

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Genetická variabilita populací chvostoskoka
Parisotoma notabilis (Isotomidae, Collembola)
v homogenním (městském) a heterogenním (přírodním)
prostředí.**

Bakalářská práce

Žaneta Švecová

Školitelka: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Natálie Raschmanová, PhD.

České Budějovice 2021

Bakalářská práce

Švecová, Ž., 2021: Genetická variabilita populací chvostoskoka *Parisotoma notabilis* (Isotomidae, Collembola) v homogenním (městském) a heterogenním (přírodním) prostředí. [Genetic variability of springtail *Parisotoma notabilis* (Isotomidae, Collembola) in urban and natural environment. Bc. Thesis, in Czech.] - 63 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The main aim of this thesis was to identify molecular markers that will help to determine the genetic variability among populations of springtail *Parisotoma notabilis*. Mitochondrial marker *COI* was successfully amplified and sequenced. Obtained sequences were used for genetic analysis and comparison of populations in urban and natural environment. *Wolbachia* infection was detected in all springtail samples. Consequently, phylogenies of *Wolbachia* and its host springtails were compared.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

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 dne 25. dubna 2021

Žaneta Švecová

Poděkování

Ráda bych poděkovala především své školitelce PaedDr. Martině Žurovcové, Ph.D. za poskytnutí zázemí, odborné vedení, vstřícný přístup a velkou dávku trpělivosti při zpracování této práce, dále RNDr. Natálii Raschmanové, PhD. za poskytnutí analyzovaného materiálu a cenných rad. Velké díky patří Mgr. Janu Hartmannovi za jeho pomoc v začátcích a během práce v laboratoři. Také Nicole Jánové za vytvoření příjemného pracovního prostředí a morální oporu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, příteli a kamarádům za podporu a trpělivost během celého studia.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Chvostoskoci (Collembola)	1
1.2	Urbánní habitaty	4
1.3	Molekulární markery	5
1.3.1	Jaderné markery	5
1.3.2	Mitochondriální markery	6
1.3.2.1	DNA barcoding – COI (cytochrom c oxidáza – podjednotka I)	7
1.3.3	<i>Wolbachia</i>	7
1.4	Chvostoskok <i>Parisetoma notabilis</i>	9
2	Cíle práce	11
3	Materiály a metody	12
3.1	Materiály	12
3.2	Izolace DNA	13
3.3	PCR (Polymerázová řetězová reakce)	14
3.3.1	Primery pro amplifikaci a sekvenování vybraných markerů	14
3.3.1.1	Mitochondriální marker <i>COI</i> (DNA barcoding)	14
3.3.1.2	Jaderné markery	15
3.3.2	PCR profily	18
3.4	Gelová elektroforéza	19
3.5	Sekvenování PCR produktů	20
3.6	Klonování	20
3.7	Statistické vyhodnocení sekvencí	21
4	Výsledky	23
4.1	Detekce a charakteristika <i>Wolbachia</i> u <i>P. notabilis</i>	23
4.2	Jaderné markery	24
4.3	Genetická variabilita populací <i>P. notabilis</i>	25

4.3.1	Košice – městské (urbánní) populace	25
4.3.2	Evropa – přírodní populace	32
4.3.3	Celková populace	39
5	Diskuse	44
5.1	Izolace DNA a metodika PCR	44
5.2	Jaderné markery	44
5.3	<i>Wolbachia</i>	45
5.4	Mitochondriální marker <i>COI</i>	46
5.5	Genetická variabilita městských a přírodních populací	47
6	Závěr	49
7	Literatura	50
8	Přílohy	57

1 Úvod

Současný nárůst lidské populace přináší řadu problémů přírodnímu prostředí v různých ohledech, a jedním z nich je vliv městských aglomerací na okolní ekosystém. Jak bylo shrnuto v práci (Fiera, 2009), městské (urbánní) ekosystémy jsou charakterizovány hustým lidským osídlením, intenzivní dopravou a pouze zbytky přírodních habitatů. Urbanizace zapříčiňuje řadu narušení těchto habitatů, jako jsou jejich fragmentace a izolace, změny teploty, vlhkosti a edafických podmínek a také znečištění. Je proto nezbytné porozumět tomu, jak půdní fauna na urbanizaci reaguje, aby bylo možno vytvořit strategii managementu pro optimální soužití lidí i přírody.

Nedávno bylo vytvořeno mezinárodní schéma pro vyhodnocení vlivu vzdušných polutantů na městské půdy za použití biondikátorových druhů (rostlin, zvířat a hub) jako součást projektu Life05Env/RO/000106 Air Aware. Chvostoskoci zde byli vybráni jako jeden z cílových taxonů, neboť jsou dostatečně variabilní jak taxonomicky, tak i ekologicky, vysoce abundantní a citliví na změny půdního prostředí. Společenstva chvostoskoků jsou vzhledem k různorodé potravní strategii i funkční roli v půdních procesech velmi druhově bohatá; změna jak této diverzity, tak abundance pak odráží změnu kvality daného prostředí (Fiera, 2009).

Většina prací zaměřená na úlohu chvostoskoků jako bioindikátorů znečištění prostředí se však zaměřuje na jejich druhovou diverzitu (Fiera, 2009; Santorufo et al., 2015), zatímco genetická variabilita pozorovaných druhů v tomto ohledu zkoumána nebyla. Právě fragmentace habitatů a jejich izolace však může významně ovlivnit i genetickou strukturu těchto populací omezením genetického toku, a rozdílné podmínky jednotlivých urbánních habitatů, ať už z hlediska mikroklimatu či znečištění, mohou vytvářet rozdílné selekční tlaky.

1.1 Chvostoskoci (Collembola)

Chvostoskoci (Collembola) jsou živočichové, kteří mají širokou globální (kosmopolitní) distribuci. Byli nalezeni jako fosilie v baltském jantaru, což naznačuje, že žijí v Evropě bez velkých morfologických modifikací již více než 50 milionů let. Jsou to malí, primárně bezkřídlí členovci, kteří patří mezi dobře přizpůsobené organismy (Katz et al., 2018). Taxonomicky patří do kmene Členovci (Arthropoda), podkmene Šestinozí (Hexapoda), třídy Skrytočelistí (Entognatha) (Lubbock, 1873).

Většina z nich měří pouze několik milimetrů. Nejmenší a nejméně pigmentované druhy jsou většinou ty, které žijí hlouběji v půdě. Obecně žijí krátce, málokterý se dožije jednoho či dvou let (Hopkin, 1997). Tělo chvostoskoka se skládá z hlavy, třech hrudních článků a zadečku, který je tvořen z šesti článků. Na ventrální straně na prvním článku zadečku mají všichni chvostoskoci ventrální tubus (*collophor*), který je nezbytný ke správné rovnováze tekutin, ale umožňuje jim také přilnout ke kluzkým povrchům (Hopkin, 1997). Název Collembola je odvozený od dvou řeckých slov – „kola“ (lepidlo) a „embolos“ (kolík), které souvisejí s funkcí ventrálního tubulu (Lubbock, 1873). Jeden z hlavních znaků chvostoskoků je skákací orgán na čtvrtém článku zadečku – furka (*furca*), která dává chvostoskokům schopnost uniknout před predátory. Furka je dobře vyvinuta u chvostoskoků žijících na povrchu, zatímco chvostoskoci žijící v půdě ji mají redukovanou nebo ji úplně ztratili. Druhy s velkou furkou mají tendenci vykonat jeden, ale zato dlouhý skok, kdežto ti s furkou redukovanou vykonají menší skoky, ale frekventovaněji. *Entomobrya dorsalis* – chvostoskok dlouhý pouze 2 mm – dokáže doskočit do vzdálenosti 16 cm (Hopkin, 1997).

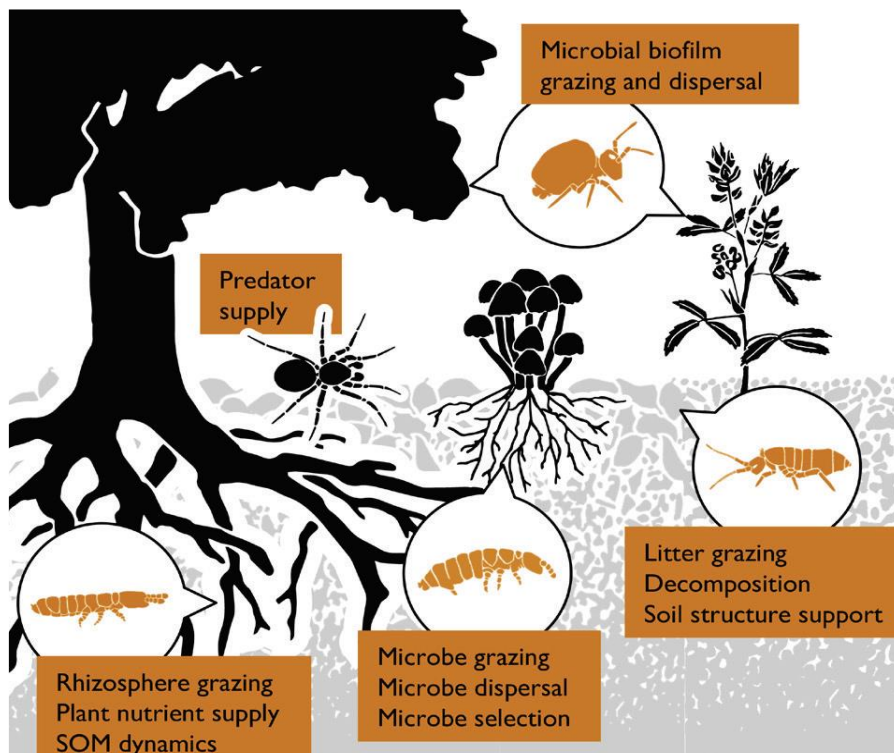
Žijí v půdě, humusu, odpadu, na vodní hladině, v jeskyních, v mechu, ale dokonce i v extrémních podmínkách jako je poušť (*Folsomides arnoli*) (Suhardjono & Greenslade, 1994) nebo polární oblast (Hopkin, 1997). Například Antarktida je domovem 15ti druhů chvostoskoků, z nichž většina je endemická (Greenslade, 1995). Antarktičtí chvostoskoci se většinou nacházejí ve vlhkém prostředí a vykazují velmi malou odolnost proti náhlé ztrátě vody. Antarktické zimy proto přežívají téměř v anhydrobiotickém stavu (Teets & Denlinger, 2014) s velmi omezeným metabolismem přizpůsobeným nedostatku vody. Díky jejich skvělé adaptaci na různá prostředí se používají jako model pro zkoumání mnoha jevů, jako je tolerance vůči chladu nebo jakost potravy pro predátory (Fountain & Hopkin, 2004).

Chvostoskoci se v půdním edafonu významně podílí na těchto ekosystémových procesech:

- 1) Účastní se koloběhu živin v rhizosféře, čím se podílí na zásobování rostlin živinami.
- 2) Rozkládají listy, kořeny či mrtvé dřevo a produkují výkaly, čímž jsou nepřímo spojeni s tvorbou půdy.
- 3) Slouží k rozptýlení mikrobiálních a rostlinných propagulí (=částí organismů sloužící k šíření a reprodukci). Ve střevech chvostoskoků se mohou vyskytovat rozmanité bakteriální propagule, a proto se předpokládá, že přispívají k šíření mikroflóry.

4) Tvoří potravu pro mnoho půdních predátorů (pavouky, roztoče, mravence, stonožky, brouky a další) (Potapov et al., 2020).

Na obrázku (Obr. 1) je shrnuta důležitost chvostoskoků v ekosystému.



Obr. 1: Procesy ekosystémů, které mohou být ovlivněny chvostoskoky (Collembola) (převzato z Potapov et al., 2020).

Jelikož se jedná o členovce citlivé na znečištění vyskytující se v půdách po celém světě, jsou považováni za významné bioindikátory. Prvním ekotoxikologickým testem s chvostoskoky byl test na filtračním papíře s DDT (dichlordifenyltrichlorethan). Modelovým druhem je chvostoskok *Folsomia candida*, který je již více než 50 let používán pro odhad účinků pesticidů a látek znečišťující životní prostředí (Fountain & Hopkin, 2004). V roce 1999 vydala Mezinárodní standardizační organizace (ISO) protokol pro použití *F. candida* jako ekotoxikologického testovacího druhu (ISO, 1999). Kromě druhu *Folsomia candida* se používají i druhy *Folsomia fimetaroides*, *Isotoma viridis*, *Orchesella cincta* (Filsler et al., 2000). Jedním z testů ekotoxicity je reprodukční test s chvostoskokem *Folsomia candida*, kdy je zjišťována míra inhibice reprodukce a přežití při pobytu v kontaminované půdě. U chvostoskoků probíhá tento test po dobu 28 dní. V poslední době jsou však v půdní ekotoxikologii rozšířenější testy únikového chování, protože nejsou tolik časově náročné (trvají 48 hodin a některé dokonce jen 24 hodin) a jejich benefitem je též i

vyšší citlivost (Priessnitz, 2008). Kvůli důležitosti druhů *F. candida* jako modelového organismu pro ekotoxikologické testy, se tento druh stal i standartním genomovým modelem v rámci taxonu Collembola.

Ačkoli je popsáno téměř 9 000 druhů, očekává se, že se jedná asi jen o 20 % existujících druhů chvostoskoků. Vzhledem k jejich malé velikosti je velice obtížné je taxonomicky rozlišit jen na základě morfologických rozdílů (Potapov et al., 2020). Narůstající počet studií založených na genetické variabilitě dokazuje, že množství druhů je skutečně podhodnoceno, neboť v rámci morfologicky definovaných druhů existuje značná „kryptická diverzita“ – tedy výrazná DNA divergence různých linií v malém i velkém geografickém rozsahu (Cicconardi et al., 2013).

1.2 Urbánní habitaty

Podle studie (Kotze et al., 2011) jsou hustě obydlená lidská sídla doprovázena ztrátou, fragmentací, izolací a znečištěním přírodních habitatů, zavlečením a rozšířením nových druhů, hromaděním odpadních produktů a změnami v klimatických, edafických a hydrologických procesech. Unikátní městské habitaty jsou všechny obklopeny neprostupnými povrchy a vysoce modifikovanou vegetací, v důsledku obhospodařování jsou spíše v prvním sukcesním stádiu. Znamená to, že jsou osídleny především generalisty, mezi něž patří i řada chvostoskoků. Lze rozlišit jednotlivé typy habitatů, charakterizované způsobem obhospodařování případné vegetace, a to např.:

- ruderalní – neudržované trávníky, skládky, stará zástavba;
- domácí zahrady – s heterogenní vegetací, mající potenciál zejména pro hmyzí společenstva;
- parky – s vysoce obhospodařovanou vegetací (stromy, trávníky, květinové záhony);
- okrajová zeleň – vegetace podél silnic a ulic, udržovaná méně než parky, velmi úzké, silně vystavené polutantům z dopravy;
- zastavěné plochy – představují teplotní ostrovy pro termofilní druhy.

Dalo by se tedy předpokládat, že urbanizační procesy budou mít na společenstva chvostoskoků velký vliv. Jak však ukázalo jejich porovnání v práci (Santorufu et al., 2015) zabývající se chvostoskoky v různě narušených půdách (lesní, zemědělská, urbánní), byly nejvíce narušenými habitaty zemědělské lokality, zatímco lesní a urbánní se příliš nelišily.

1.3 Molekulární markery

Molekulární markery jsou snadno identifikovatelné molekuly bílkovin nebo určité úseky DNA, které můžeme použít k rozeznání buněk, jednotlivců, populací nebo druhů. Jedná se o důležité molekulární nástroje, jež usnadnily studium různých biologických otázek, způsobily revoluci v biologických vědách a zasloužily se o posílení mnoha studijních oborů (Loxdale & Lushai, 1998). Běžně se používají v oblastech, jako je molekulární taxonomie, fylogenetika, populační genetika, medicína nebo forenzní věda. Hlavním úkolem molekulárních markerů je detekce variability na genetické úrovni. Ta může být ovlivněna mutační rychlostí různých genomových oblastí, stejně jako rozlišením použité techniky (tedy schopností rozeznat homozygoty a heterozygoty, identifikovat mutace exprimované a neexprimované (Awise, 2004; Allendorf & Luikart, 2013).

Molekulární markery rozdělujeme na proteinové a DNA (genetické) markery. Mezi nejrozšířenější proteinové markery patří alozymy, což jsou formy enzymů, které jsou kódovány odlišnými alelami na jednom lokusu (Richardson, 1986). Výhodou alozymů je jejich nízká cena a rychlost, avšak je potřeba mít čerstvý vzorek dostatečného objemu, což je nevýhoda oproti DNA markerům, u nichž lze použít i vzorek sušený nebo starý. Historicky jsou to první markery, které se začaly šířející používat u celé řady organismů, včetně chvostoskoků. Jednou z prvních studií bylo např. rozlišení evropských populací *Tetrodontophora bielanensis* (Fanciulli et al., 1991), a pro podobné otázky jsou používány i nadále, např. pro sledování genetické struktury populací a šíření zemědělského škůdce *Sminthurus viridis* v Austrálii (Roberts & Weeks, 2011).

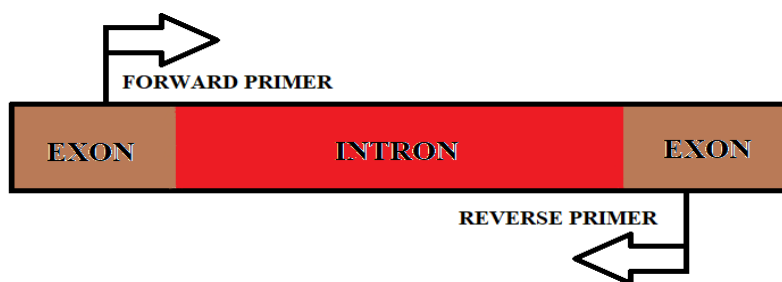
U chvostoskoků a dalších živočichů malých rozměrů nejsou alozymy ideální, proto jsou lepší volbou markery genetické, tedy na úrovni DNA. Ty můžeme dále rozdělit na jaderné (nukleární, nDNA) nebo mitochondriální (mtDNA) podle toho, kde se v buňce nacházejí (Awise, 2004).

1.3.1 Jaderné markery

Jaderná DNA se vyskytuje v jádře ve dvou kopiích všech diploidních organismů. Nevýhodou oproti mitochondriální DNA je její rychlejší degradace (Loxdale & Lushai, 1998). Tyto markery mohou být konzervované, ale naopak i vysoce variabilní, podle toho, jaká část z genomu je jako marker vybrána. Geny vyskytující se jako jeden lokus jsou

z hlediska evoluce pomalejší, a vhodné spíše pro studie fylogenetické, zabývající se evolucí na velkém časovém měřítku. Naopak pro studium populací jsou velmi výhodné mikrosatelity (jen několik bazí dlouhé úseky, které se mnohonásobně tandemově opakují), jejichž mutační rychlost je vysoká. Použití mikrosatelitů je však omezené vzhledem k technické náročnosti jejich vývoje, a navíc jsou obvykle druhově specifické a nemají proto univerzální použití.

Vyšší variabilitu vykazují také oblasti genů s introny. Introny mohou být dobrým zdrojem pro nalezení polymorfismů DNA, protože rychle akumulují mutace bez ovlivnění funkce genů (Takashi, 2015). Na detekci této variability je založena metoda EPIC (Exon-Primed-Intron-Crossing), která využívá univerzální PCR primery pro amplifikaci intronů. Tyto primery nasedají na vysoce konzervovaných exonech jaderných genů. Schéma umístění EPIC primerů je zobrazeno na obrázku (Obr. 2). Jejich výhodou je, že univerzální primery lze použít v širokém taxonomickém rozsahu (Hillis et al., 1990).



Obr. 2: Schéma polohy EPIC primerů.

1.3.2 Mitochondriální markery

Mitochondriální DNA je u eukaryotických organismů kruhová molekula, která je velká okolo 16 kb. Molekula se skládá z 37mi genů, přičemž 22 je pro tRNA, 2 rRNA a 13 genů kódujících proteiny (Clary & Wolstenholme, 1985). Mitochondriální DNA je cenným markerem, který indikuje tok mateřského genu, protože je převážně přenášena mateřskými liniemi. Všechny lokusy mtDNA jsou hemizygotním stavu (v jedné kopii), což usnadňuje skríning pomocí DNA sekvenování, kdy není nutno markery klonovat. Je početnější než jaderná DNA, a proto může být snadněji detekována ve starých vzorcích (Avise, 2004).

U chvostoskoků je nejpoužívanějším mitochondriálním markerem cytochrom c oxidáza I, která je dnes standardizovaným markerem pro „DNA barcoding“. U chvostoskoků (Collembola) je velmi používaný jak na úrovni druhů, tak dokonce i na rozlišení populací

(např. Roberts & Weeks, 2011; Porco et al., 2012; Von Saltzwedel et al., 2017 a další). V současné době je *COI* nejvíce zaznamenaný fragment genomu chvostoskoků (Collembola) s více než 150 000 sekvencemi (Potapov et al., 2020).

1.3.2.1 DNA barcoding – COI (cytochrom c oxidáza – podjednotka I)

Projekt pro „DNA barcoding“, byl představen v r. 2003 (Hebert et al., 2003), a to zavedením techniky používající krátký genový fragment (část mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu I, *COI*), kterým lze identifikovat živočišné druhy. Pro amplifikaci 710bp dlouhého *COI* fragmentu byly navrženy univerzální primery LCO-1490 a HCO-2198 (Folmer et al., 1994). Na základě těchto sekvencí a klasické morfologické taxonomie byla vytvořena databáze BOLD (Barcoding Of Life Database), do níž jsou průběžně získaná data ukládána. V současnosti má tento bioidentifikační systém přes 300 tisíc druhových záznamů a stal se v mnoha biologických disciplínách používajících druhovou identifikaci (ochranářská genetika, forenzní analýza potravin) uznávaným standardem (<https://www.boldsystems.org/index.php>).

Tento marker se však zcela neobejde bez problémů. Jedním z problémů může být přítomnost více než jednoho typu mtDNA sekvence u jednoho jedince neboli heteroplazmie. Řešením, jak se vyhnout problémům s heteroplazmií, je získání většího počtu sekvencí pro určení dominantního haplotypu. U členovců byla heteroplazmie zaznamenána u mnoha skupin včetně chvostoskoků (Carapelli et al., 2008; Kang et al., 2016).

Častějším problémem je možná kontaminace bakteriálními endosymbionty, jejichž gen pro *COI* se může amplifikovat zároveň s barcodovým markerem a znesnadnit tak správné přečtení sekvence. V tomto případě jde zejména o bakterii *Wolbachia*, která je široce rozšířena. Infekce touto bakterií může navíc snižovat detekovanou variabilitu. Z tohoto důvodu by při použití DNA barcodingu měla být vždy provedena detekce *Wolbachia* a případně její vliv zohlednit (Hurst & Jiggins, 2005).

1.3.3 *Wolbachia*

Wolbachia je gramnegativní bakterie čeledi Rickettsiaceae žijící v cytoplazmě v buňkách některých členovců a hlístic. Je přenášena v rámci druhu pomocí cytoplazmy vajíček (Timmermans et al., 2004). Poprvé byly kmeny *Wolbachia* nalezeny u druhu komárů

Culex pipiens a označeny *Wolbachia pipiens*. Následovalo zjištění, že jsou tyto bakterie široce rozšířeny u členovců. Kolem 20 až 75 % všech druhů hmyzu je infikováno *Wolbachia*, stejně jako mnoho pavouků a suchozemských korýšů. Tato mimořádná frekvence infekce u hmyzu řadí *Wolbachia* mezi nejrozšířenější intracelulární bakterii. Jednotlivé druhy hmyzu mohou být infikovány i několika kmeny *Wolbachia* (Baldo et al., 2006).

Mezi významné účinky infekce *Wolbachia* u členovců patří reprodukční manipulace jako cytoplazmatická inkompatibilita (tzn. dysfunkce infikovaného samce oplodnit neinfikovanou samičku), feminizace genetických samců, partenogenetická indukce a zabíjení samčích potomků infikovaných samic. Toto napomáhá mateřskému přenosu *Wolbachia* z generace na generaci a současně zvyšuje promořenost populace, protože infikované samice plodí prakticky jen samičí potomstvo schopné partenogeneze (Werren et al., 2008).

Význam *Wolbachia* sahá od jejich účinků na reprodukční biologii, ekologii a vývoj jejich hostitelů až po jejich potenciální využití při biologické kontrole škůdců a biomedicínských aplikacích. Vzrostl také zájem v oblasti medicíny o zacílení těchto bakterií při léčbě filariózy (Baldo et al., 2006).

Filarióza je nemoc způsobena hlístem filarie, který způsobuje elefantiázu a slepotu. Bylo zjištěno, že tento hlíst je běžně infikován *Wolbachia* a na rozdíl od hmyzu, kde *Wolbachia* plodnost snižuje, tak k plodnosti filarií je infekce *Wolbachia* naopak potřebná. Zřejmě se mezi hlístem a bakterií vytvořila symbióza, a proto je filarie citlivá na antibiotika, jenž poškozují bakterie (i *Wolbachia*), a díky jejich eliminaci dochází k zástavě embryogeneze (Pačes, 1999).

Pro pochopení původu *Wolbachia* a pro objasnění povahy interakce mezi *Wolbachia* a jejími hostiteli je nutná důkladná charakterizace jednotlivých linií – superskupin. Pro tento účel bylo vyvinuto jednotné schéma multilokusové sekvenční typizace (MLST), zahrnující sekvenování kratších částí pěti genů kódujících bílkoviny (*gatB*, *coxa*, *hcpA*, *FtsZ* a *fbpA*), nacházejících se v různých částech genomu (Baldo et al., 2006). Na základě tohoto systému jsou doposud detekované linie *Wolbachia* rozděleny do 17 superskupin označených A–Q, z nichž většina infikuje členovce. Superskupina E je přítomna pouze u partenogenetických chvostoskoků (Tanganelli et al., 2013; Ma et al., 2017).

1.4. Chvostoskok *Parisotoma notabilis*

Pro moji práci byl vybrán chvostoskok *Parisotoma notabilis* patřící do čeledi Isotomidae (Obr. 3).



Obr. 3: Chvostoskok *Parisotoma notabilis* (<https://collembola.co.za/parisotoma-notabilis/>).

P. notabilis je označován za ubikvistu (všudypřítomný organismus schopný žít v pestré škále biotopů). Byl popsán Schäfferem v roce 1896 a od té doby je často zaznamenáván v různých oblastech světa (Salmon, 1941). Množí se partenogenezí, v přirozených populacích se vyskytují téměř jen samičky (Chahartaghi et al., 2005). Samečci se vyskytují jen velmi zřídka nebo se ve většině populací nevyskytují. Toto je zřejmě důvodem jeho širokého výskytu a šíření do nových lokalit (Von Saltzwedel et al., 2017).

P. notabilis se hojně vyskytuje téměř na jakémkoli stanovišti v mírném a subpolárním pásmu. Populace mohou dosahovat hustoty 6 000 – 10 000 jedinců na metr čtvereční v lesních půdách, loukách, orných půdách a jeskyních (Fountain & Hopkin, 2004). Tento druh můžeme dokonce nalézt i v extrémních oblastech jako jsou ledovce či ve vysokých nadmořských výškách (Von Saltzwedel et al., 2017). Je známo, že je ekologicky plastický, vyskytuje se i na narušených a obnovujících se stanovištích, a paradoxně toleruje i reaguje na toxiny jako pesticidy, průmyslové znečištění (Kuznetsova & Potapov, 1997) a těžké kovy (Haimi & Siira-Pietikäinen, 1996). Je také součástí společenstev urbánních habitatů, kde jsou výkyvy v jeho abundanci bioindikátorem kvality prostředí (Santorufu et al., 2015).

Ve studii zabývající se rozšířením endosymbionta *Wolbachia* v rámci různých čeledí chvostoskoků byli všichni jedinci *P. notabilis* testováni pozitivně. I když byly použity jen dva markery (16S a *ftsZ*), bylo provedeno zařazení této linie do skupiny E (Tanganelli et al., 2013).

Genetickou variabilitou tohoto druhu se doposud zabývaly pouze dvě studie. (Porco et al., 2012) na vzorcích pokrývajících Evropu a Severní Ameriku pomocí DNA barcodingu a fragmentu 28S RNA z jaderného genomu popsal 4 výrazné linie, které by mohly naznačovat kryptickou speciaci. K podobným závěrům došla i druhá evropská studie (Von Saltzwedel et al., 2017), ovšem pozorovanou variabilitu přičítá spíše vlivu partenogenetického rozmnožování než existenci kryptických druhů. Na základě molekulární datace byl pak učiněn závěr, že evropské linie *P.notabilis* jsou ve srovnání s jinými chvostoskoky relativně mladé, geneticky uniformní a genetická variabilita je snížena i díky antropogennímu šíření.

Obě uvedené práce byly zaměřeny jen na jedince z přírodních populací. Proto byli v této práci analyzováni jedinci z populací městských a porovnány s již prostudovanými přírodními populacemi.

2 Cíle práce

- Na základě literatury vytipovat molekulární markery pro detekci geografické variability populací chvostoskoků *Parisotoma notabilis*.
- Ověřit infekci bakterií *Wolbachia* u všech testovaných chvostoskoků *P. notabilis*.
- Pomocí markerů provést populačně genetickou analýzu a porovnat městské vzorky s přírodními.

3 Materiály a metody

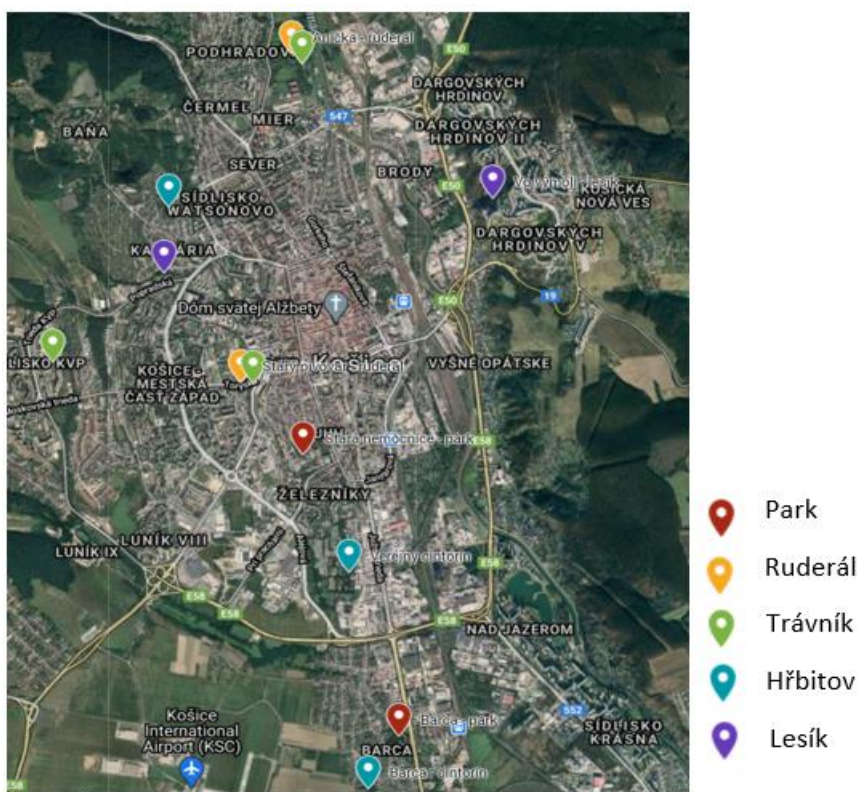
3.1 Materiály

Vzorky chvostoskoků *Parisotoma notabilis* byly nasbírány a poté identifikovány RNDr. Natálií Rashmanovou, PhD., z Univerzity P. J. Šafárika v Košicích. Šlo celkem o 80 jedinců ze 13 populací, které byly nasbírány na Slovensku ve vytipovaných městských habitatech (park, hřbitov, les, trávník, ruderal) v Košicích. Jednotlivé lokality jsou zaznamenány v tabulce (Tab. I).

Tab. I: Vzorky *Parisotoma notabilis* pro analýzu.

Oblast	Zkratka	Počet vzorků	Souřadnice
Stará nemocnica – park	SNp	2 ind	48,707N; 21,253E
Barca – park	Bap	1 ind	48,678N; 21,267E
Barca – hřbitov	Bac	5 ind	48,673N; 21,262E
Rozália – hřbitov	Roc	8 ind	48,732N; 21,234E
Veřejný hřbitov	Vec	3 ind	48,695N; 21,259E
Vo výmoli – lesík	Vvl	10 ind	48,733N; 21,280E
Račí potok – lesík	Rpl	14 ind	48,725N; 21,233E
Starý pivovar – ruderal	Spr	14 ind	48,714N; 21,244E
Anička – ruderal	Anr	5 ind	48,747N; 21,251E
KVP – ruderal	-	1 ind	48,711N; 21,220E
Anička – trávník	Ant	10 ind	48,746N; 21,253E
KVP – trávník	KVt	4 ind	48,716N; 21,217E
Starý pivovar – trávník	Spt	3 ind	48,714N; 21,246E

Polohy lokalit sběru jsou zobrazeny na mapě (Obr. 4).



Obr. 4: Jednotlivé lokality sběru vzorků (Vytvořeno přes <https://www.google.com/maps/>). Habitaty jsou barevně odlišeny.

Pro širší analýzu pomocí „DNA barcodingu“ byly použity DNA sekvence z předchozích studií, zveřejněné v databázi GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Ze studie (Von Saltzwedel et al., 2017) bylo přidáno 115 sekvencí – seznam lokalit a kódy z Genbanku jsou uvedeny v příloze 1. Ze studie (Porco et al., 2012) bylo přidáno 96 sekvencí, přičemž z této studie byly vybrány jen spolehlivé sekvence, které neobsahovaly nerozlišené nukleotidy („N“). Přehled použitých sekvencí včetně lokalit a kódy z Genbanku jsou uvedeny v příloze 2.

3.2 Izolace DNA

Vzorky – chvostokoci rodu *P. notabilis* byly po morfologické identifikaci uloženy do zkumavek s 96 % ethanolem a uchovány při -18°C. Před samotnou izolací bylo nutno jedince plně zbavit ethanolu. Extrakce byla prováděna z celého jedince pomocí komerčního kitu DNeasy Blood and Tissue kit 250 (Qiagen) dle návodu výrobce. Eluce byla provedena ve dvou krocích. Vzhledem k malým rozměrům *P. notabilis* bylo pro dosažení koncentrovanější DNA při 1. eluci použito místo 200 µl jen 50 µl elučního pufru a při 2. eluci 30 µl. Takto získaná DNA byla skladována při -18 °C, dokud nebyla dále zpracována.

3.3 PCR (Polymerázová řetězová reakce)

DNA fragmenty byly amplifikovány pomocí PCR, prováděné v termocykleru TProfessional TRIO (Biometra). Pro PCR reakci byly vždy použity 0,2 ml zkumavky a reakce byly míchány na mrazících stojácích.

Reakční směs pro PCR v objemu 12,5 µl obsahovala standardní složky, tedy ultra čistou destilovanou vodu (ddH₂O), reakční pufr, mix dNTPs, forward a reverse primery pro daný marker, DNA polymerázu a templátovou DNA.

U amplifikace *Wolbachia* bylo do směsi navíc přidáno BSA (Bovine Serum Albumine, 20 mg/ml; Thermo Fisher Scientific), pro zvýšení účinnosti reakce. Standardně byla používána polymeráza Taq DNA Unis (Top – Bio s.r.o.). U markerů, které se nám nepodařilo naamplifikovat touto polymerázou, byla použita TaKaRa ExTaq (Takara Bio). Množství a koncentrace jednotlivých chemikálií v závislosti na použité polymeráze je uvedeno v tabulce (Tab. II).

Tab. II: Množství komponent v závislosti na použité polymeráze (množství na jednu PCR reakci).

	<i>Polymeráza</i>	
	Unis [µl]	ExTaq [µl]
ddH₂O	7,25	7,75
10x pufr	1,25	1,25
dNTPs (2,5 mM)	1	1
Forward primer (5 µM)	0,75	0,75
Reverse primer (5 µM)	0,75	0,75
Polymeráza (5 U/µl)	0,1	0,05
DNA	1,5	1,5

3.3.1 Primery pro amplifikaci a sekvenování vybraných markerů

Pro amplifikaci jednotlivých markerů byly použity buď primery z literatury, nebo navrženy nově na základě sekvencí daného lokusu z modelového druhu *Folsomia candida*.

3.3.1.1 Mitochondriální marker *COI* (DNA barcoding)

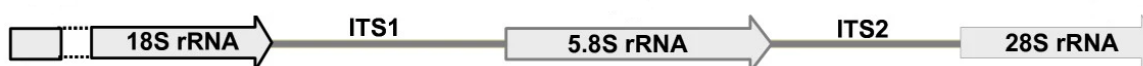
Marker pro DNA barcoding byl amplifikován pomocí standardních univerzálních primerů LCO-1490 a HCO-2198 (Folmer et al., 1994). Protože se u některých sekvencí vyskytovaly nekvalitní začátky, byly proto vně tohoto fragmentu navrženy další primery, a to TW-J-1301 a C1-N-2353.

3.3.1.2 Jaderné markery

V první řadě byly otestovány markery z předchozích studií, a to:

a) Část genu **H3** kódujícího histon, která byla použita ve studii (Von Saltzwedel et al., 2017) zabývající se přímo druhem *P. notabilis*. *H3* je konzervovanější oblast než *COI*, používá se spíše ve fylogenetice pro potvrzení klastrování větších linií. Je však více variabilní než autory rovněž použitý 28S RNA.

b) **ITS** (Internal transcribed spacer) jsou nekódující oblasti, které oddělují kódující ribozomální RNA (rRNA) a to přesněji 18S a 28S rRNA. *ITS* lze rozdělit na *ITS1*, která se nachází mezi 18S a 5.8S rRNA a *ITS2*, která odděluje 5.8S a 28S rRNA (Loxdale & Lushai, 1998). Schéma *ITS* je zobrazeno na obrázku (Obr. 5).



Obr. 5: Schéma jaderného markeru *ITS* (Embong et al., 2008).

ITS fragment byl u chvostoskoků sekvenován ve dvou fylogenetických studiích (Anslan & Tedersoo, 2015) a (Park, 2009). Vzhledem k vysoké variabilitě *ITS1* však k analýzám použili jen *ITS2*. Pro amplifikaci v předložené práci byly aplikovány jak primery univerzální, tak i nově navržené, specifitější pro chvostoskoky.

Z jaderných lokusů typu EPIC byly vybrány dva markery z univerzální sady (Hillis et al., 1990), třetí byl odvozen z alozymových studií:

a) *EF1 α* (Elongation Factor 1 α)

Tento protein se podílí na translaci, kdy z mRNA vznikají proteiny. *EF1 α* je konzervován v mnoha organismech a hraje roli v mnoha buněčných procesech, kromě translace se podílí na transportu RNA, buněčném cyklu a apoptóze (Alves et al., 2015). Předběžně byl detekován jako polymorfní u dvou druhů chvostoskoků z čeledi Neanuridae (Garrick & Sunnucks, 2006). Primery pro *EF1 α* nasedají u *F. candida* ve 2. a 3. exonu, produkt je kolem 675bp dlouhý a velikost intronu je 152bp.

b) Cal (Calmodulin)

Calmodulin je všudypřítomný vysoce konzervovaný protein vázající vápník, který se nachází v cytoplazmě všech eukaryotických buněk. Tento protein se váže a reguluje řadu různých cílových proteinů zapojených do různých funkcí, jako je metabolismus, svalová kontrakce, zánět či oplodnění. Jedná se o základní protein, mutace genů kódujících Calmodulin nebo poškození vazebných míst pro Calmodulin jsou často smrtelné (Tidow & Nissen, 2013). *Cal* primery nasedají u *F. candida* v 1. a 2. exonu, produkt je okolo 497bp dlouhý, přičemž velikost intronu je 390bp.

c) PGM (Phosphoglucomutase)

PGM (fosfoglukomutáza) je enzym, který převádí glukózu-1-fosfát na glukózu-6-fosfát. Oblast *PGM* byla vybrána na základě prací používající pro analýzu populací chvostoskoků alozymy (Simonsen & Christensen, 2001), v nichž byl značně polymorfní. Dle záznamů v databázi OrthoDB (<https://www.orthodb.org/>) patří ke genům s vyšší evoluční rychlostí, a proto se dá předpokládat i vyšší variabilita na genetické úrovni. U *PGM* lokusu *F. candida* nasedá forward primer v půlce 3. exonu a reverse primer v 5. exonu. Fragment je zhruba 650bp dlouhý a zahrnuje dva introny o velikosti 67 a 81bp.

3.3.1.3 Detekce endosymbionta *Wolbachia*

Pro PCR detekci a evoluční analýzu *Wolbachia* byly zvoleny jednak geny *16S* rRNA a *wsp* (*Wolbachia* surface protein), a dále soubor standardních 5 MLST lokusů – *ftsZ* (Cell division protein), *hcpA* (Conservedhypothetical protein), *coxA* (Cytochrome oxidase, subunit I), *fbpA* (Fructose-bisphosphatealdolase) a *gatB* (Glutamyl-tRNAamidotransferase, subunit B). Pro fylogenetické porovnání byly použity sekvence *Wolbachia* z dalších partenogenetických druhů chvostoskoků ze studie (Ma et al., 2017), které byly získány z GenBank a z PubMLST. Seznam použitých sekvencí *Wolbachia* je uveden v příloze 3 a seznam sekvencí partenogenetických hostitelských chvostoskoků infikovaných *Wolbachia* je uveden v příloze 4. Seznam všech použitých primerů je zaznamenám v tabulce (Tab. III).

Tab. III: Seznam všech použitých primerů. Tučně označené primery vedly k úspěšné amplifikaci.

<i>Marker</i>	<i>Lokus</i>	<i>Primer</i>	<i>Typ</i>	<i>Sekvence 5' -> 3'</i>	
mtDNA	<i>COI</i>	LCO-1490 ¹⁾	F	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	
		HCO-2198 ¹⁾	R	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	
		TW-J 1301 ²⁾	F	GTAAAWTAAACTAATARCCTTCAAA	
		C1-N 2353 ²⁾	R	GCTCGWGTATCCACATCTATWCC	
<i>Wolbachia</i>	<i>16S</i>	16Sf ³⁾	F	TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT	
		16Sr ³⁾	R	GAATAGGTATGATTTTCATGT	
	<i>gatB</i>	gatB_F1 ⁴⁾	F	GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT	
		gatB_R1 ⁴⁾	R	TGGYAAAYTCRGGYAAAGATGA	
	<i>coxA</i>	coxA_F1 ⁴⁾	F	TTGGRGCRATYAACTTTATAG	
		coxA_R1 ⁴⁾	R	CTAAAGACTTTKACRCCAGT	
	<i>hcpA</i>	hcpA_F1 ⁴⁾	F	GAAATARCAGTTGCTGCAAA	
		hcpA_R1 ⁴⁾	R	GAAAGTYRAGCAAGYTCTG	
	<i>ftsZ</i>	ftsZ_F1 ⁴⁾	F	ATYATGGARCATATAAARGATAG	
		ftsZ_R1 ⁴⁾	R	TCRAGYAATGGATTRGATAT	
	<i>fbpA</i>	fbpA_F1 ⁴⁾	F	GCTGCTCCRCTTGGYWTGAT	
		fbpA_R1 ⁴⁾	R	CCRCCAGARAAAAYYACTATTC	
		<i>wsp</i>	wspf ⁵⁾	F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC
			wspr ⁵⁾	R	AAAAATTAACGCTACTCCA
	nDNA	<i>H3</i>	H3 F2a ⁶⁾	F	ATGGCTCGTACMAAGCAGAC
			H3R4 ⁶⁾	R	TTAWGCACGTTCTCCWCGG
<i>ITS</i>		Coll18Sf1 ²⁾	F	GATCGAGTGATTTAGTGAGG	
		Coll28r1 ²⁾	R	GTTAGTTTCTTTTCCTCCGC	
<i>ITS1</i>		Coll18Sf1 ²⁾	F	GATCGAGTGATTTAGTGAGG	
		ITSr2 ⁷⁾	R	ATGTGCGTTCRAAATGTCGATGTTT	
<i>ITS2</i>		ITSf2 ⁷⁾	F	TGAACATCGACATTTYGAACGCA	
		Coll28r1 ²⁾	R	GTTAGTTTCTTTTCCTCCGC	
EPIC		<i>PGM</i>	PgmA-Fw1 ²⁾	F	AATGGAGGTCCTGCTCCAGA
			PgmA-Rev1 ²⁾	R	TATTACGATCACCATCTCCATC
	<i>EF 1α</i>	EF0-5 ⁸⁾	F	TCCGGATGGCAYGGCGAGAAYATG	
		EF2-3 ⁸⁾	R	ATGTGAGCAGTGTGGCAATCC	
	<i>Cal</i>	Cal-1 ⁹⁾	F	GCCGAGCTGCARGAYATGATCAA	
		Cal-2 ⁹⁾	R	GTGTCCTTCATTTTNCCKTGCCATCAT	

1) Folmer et al., 1994

2) Žurovcová (upraveno dle Simon et al., 2006)

3) O'Neill et al., 1992

4) Baldo et al., 2006

5) Zhou et al., 1998

6) Colgan et al., 1998

7) Ji et al., 2003

8) Villablanca et al., 1998

9) Palumbi, 1996

3.3.2 PCR profily

PCR amplifikace se standardně skládá z 6 kroků: predenaturace, denaturace, annealingu, elongace, finální elongace a ochlazení na 12°, dokud není vzorek dále zpracován. PCR profily byly převzaty z publikací nebo byly navrženy v laboratoři a dále optimalizovány. Jednotlivé časy, teploty a počet cyklů úspěšných PCR profilů jsou zaznamenány v tabulce (Tab. IV).

Tab. IV: Úspěšné PCR profily.

	<i>COI</i>	<i>COI</i>	<i>ITS</i>	<i>ITS 1</i>	<i>ITS 2</i>
1. Predenaturace	94 °C/2 min	94 °C/2 min	94 °C/2 min	94 °C/2 min	94 °C/2 min
2. Denaturace	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s
3. Annealing	44 °C/45 s	43 °C/45 s	54 °C/45 s	54 °C/45 s	54 °C/45 s
4. Elongace	72 °C/1 min	68 °C/50 s	72 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/1 min
5. Postelongace	72 °C/2 min	68 °C/2 min	72 °C/2 min	72 °C/2 min	72 °C/2 min
6. Uchování	12 °C/∞	12 °C/∞	12 °C/∞	12 °C/∞	12 °C/∞
Počet cyklů	35	35	35	35	35

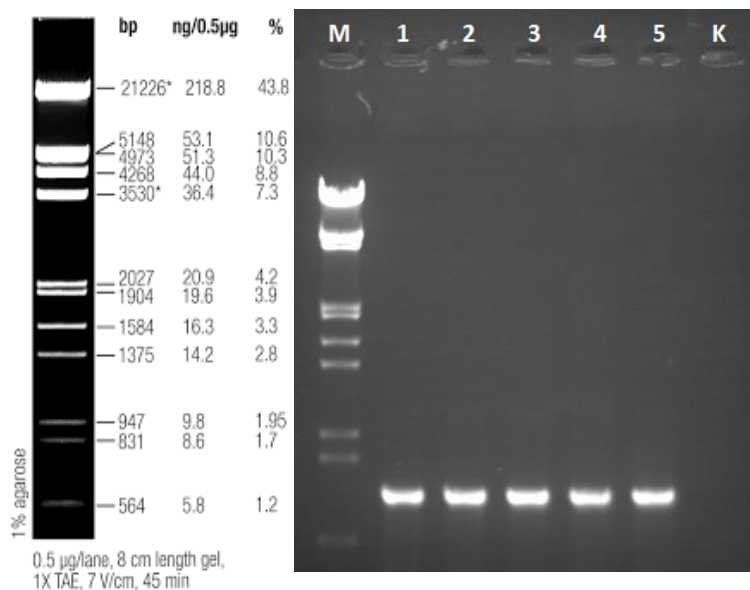
	<i>H3</i>	<i>PGM</i>	<i>16S</i>	<i>ftsZ</i>	<i>hcpA</i>
1. Predenaturace	94 °C/2 min	94 °C/2 min	94 °C/2 min	94 °C/2 min	94 °C/2 min
2. Denaturace	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s
3. Annealing	48 °C/20 s	50 °C/45 s	52 °C/40 s	52 °C/40 s	52 °C/40 s
4. Elongace	72 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/1,5 min	72 °C/1,5 min	72 °C/1,5 min
5. Postelongace	72 °C/2 min	72 °C/2 min	72 °C/10 min	72 °C/10 min	72 °C/10 min
6. Uchování	12 °C/∞	12 °C/∞	12°/∞	12°/∞	12°/∞
Počet cyklů	35	35	37	37	37

	<i>gatB</i>	<i>coxA</i>	<i>fbpA</i>
1. Predenaturace	94 °C/2 min	94 °C/2 min	94 °C/2 min
2. Denaturace	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s
3. Annealing	52 °C/40 s	52 °C/40 s	54 °C/40 s
4. Elongace	72 °C/1,5 min	72 °C/1,5 min	72 °C/1,5 min
5. Postelongace	72 °C/10 min	72 °C/10 min	72 °C/10 min
6. Uchování	12°/∞	12°/∞	12°/∞
Počet cyklů	37	37	37

3.4 Gelová elektroforéza

Úspěšnost PCR amplifikace byla ověřena pomocí elektroforetické separace, která nám zobrazila nejen přítomnost DNA fragmentů, ale rovněž i jejich přibližnou velikost a koncentraci. Pro elektroforézu byl používán 2% gel, který byl připraven ze 4 g agarózy rozpuštěné ve 200 ml 1x TAE pufru (1x TAE byl připraven ze zásobního roztoku 50x TAE pufru: 121 g TRIS; 28,55 ml kyseliny octové; 50 ml 0,5M EDTA pH 8,0; 421,45 ml H₂O). Rozpuštění bylo provedeno ohřevem v mikrovlnné troubě (2–3 minuty), a poté byl roztok zchlazen pod studenou vodou. Po zchlazení bylo do roztoku přidáno 15 µl ethidium bromidu o koncentraci 0,5 µg/µl, který pod UV světlem vizualizuje DNA. Dále byl roztok nalit do formy a přidány hřebínky, které po zchlazení vytvořily jamky, do nichž byly nanášeny vzorky. Tuhnutí gelu trvalo přibližně půl hodiny. Hotový gel byl skladován v lednici v 1x TAE pufru bez přítomnosti světla, aby nedošlo k degradaci ethidium bromidu.

Před nanášením na gel byly na mikrotitrační destičce smíchány 3 µl PCR produktu s 1 µl nanášecího pufru (700 µl ddH₂O, 300 µl glycerolu a 0,5 g bromfenolové modři). Do první jamky gelu byl přidán velikostní marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII (4 µl velikostního markeru smíchány s 1 µl nanášecího pufru) pro porovnání velikostí fragmentů a množství PCR produktu. Elektroforéza trvala přibližně 35 minut při napětí 120 V, proudu 300 mA a pokojové teplotě. Po jejím dokončení byly rozdělené fragmenty vizualizovány pod UV transiluminátorem a vyfotografovány digitální CCD kamerou. Příklad fotografie výsledného gelu a velikostního markeru je na obrázku (Obr. 6).



Obr. 6: Vlevo velikostní marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII (Thermo Fisher Scientific), vpravo příklad úspěšně naamplifikovaného úseku *COI*; M – velikostní marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII, 1.-5.testovavé vzorky fragmentu *COI* – Isno_Anř, K – negativní kontrola.

3.5 Sekvenování PCR produktů

Pokud byl daný fragment úspěšně amplifikován, bylo nezbytné PCR produkt přečistit od zbytků nespoteřovaných primerů a dNTPs, které zůstaly v PCR produktu. Přečištění proběhlo enzymaticky směsí ExoFastAp, využívající dva enzymy: Exo (Exonukleáza I; 20 U/µl; Thermo Fisher Scientific) a FastAp (Alkaline Phosphatase, 1 U/µl, Thermo Fisher Scientific). Ke každému PCR produktu bylo přidáno 0,5 µl Exo a 1 µl FastAp. Míchání probíhalo na ledu, poté byl vzorek zvortexován a vložen do termocycleru s profilem: 37 °C/30 minut a 80 °C/15 minut. Takto přečištěný vzorek byl ihned připraven k sekvenační reakci.

Sekvenační reakce byla připravena do 1,5 ml zkumavky a skládala se z 5 µl přečištěného vzorku a z 5 µl příslušného primeru (5 µM). Pro další zpracování byly vzorky označeny kódy a poslány do laboratoří společnosti Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg).

3.6 Klonování

Klonování PCR produktu bylo prováděno v následujících případech: chromatogramy z obou směrů (s oběma komplementárními primery) byly nečitelné (špatná kvalita, resp.

sekvenování neproběhlo); chromatogram byl špatně čitelný v důsledku výrazného pozadí, resp. byly detekovány dvojité „heterozygotní“ píky svědčící o existenci více haplotypů v amplikonu. Nejdříve byly připraveny agarové misky a LB médium do čistých sterilních sklenic. Agarové misky (agar, trypton, kvasinkový extrakt, NaCl, destilovaná voda) a tekuté LB médium (trypton, kvasinkový extrakt, NaCl, destilovaná voda) byly klávovány po dobu 60 minut. Po zchladnutí byl do agarových misek přidán ampicilin (1 μ l ampicilinu/ 1 ml média). Po přidání ampicilinu byl agar nalit na Petriho misky. Po zchladnutí bylo na každou misku rozetřeno pomocí sterilní kličky 64 μ l X-galu (12,5 mg/ 1 ml DDT) a 3,5 μ l IPTG (240 mg/ml). Takto připravené misky byly oblepeny parafilmem a uskladněny v lednici. Poté byl PCR produkt zaklonován do kompetentních buněk pomocí vektoru pGEM-T Easy Vector Systems™ (Promega™), bylo postupováno podle návodu výrobce, až na to, že místo SOC media bylo použito již výše zmíněné LB medium. Roztok s buňkami byl nanesen na připravené agarové misky, rozetřen pomocí sterilní kličky a dán inkubovat přes noc při 37°C. Petriho miska obsahovala bílé kolonie, které vektor nesou a modré kolonie, které vektor nenesou. Následně byla vybrána jedna z bílých kolonií a přenesena do 50 μ l ddH₂O a zahřívána na 95 °C po dobu 10 minut. Tento produkt byl využit jako templát pro PCR.

3.7 Statistické vyhodnocení sekvencí

Získané sekvence byly vizuálně zkontrolovány a opraveny v programu Chromas 2.6.6 a na obou koncích byly odstraněny nečitelné úseky, resp. sekvence primerů. Pokud byl vzorek sekvenován s oběma primery, byly chromatogramy složeny do kontinuální sekvence („contig“) v programu SeqMan. Poté byly kontrolně vloženy do databáze NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) pro ověření jejich náležitosti k druhu *Parisotoma notabilis*. Program MEGA 6 (Kumar et al., 2018) byl využit k vytvoření alignmentů metodou Muscle. Poté byl zkontrolován formát čtecího rámce (ORF). Dále byl program použit k výpočtům základních charakteristik variability sekvencí: průměrná délka, nukleotidové složení, počet variabilních a parsimoniálně informativních míst. Genetické vzdálenosti uvnitř a mezi populacemi byly stanoveny postupem standardním pro DNA barcoding, tedy použitím modelu Kimura2-parametr (Kimura 1980). Na jejich základě byly také zkonstruovány předběžné dendrogramy Neighbour – Joining (NJ).

Pro alternativní srovnání NJ dendrogramů byly vytvořeny fylogenetické stromy metodou Maximum Likelihood, pro které byl použit webový server IQ-Tree (Nguyen et al.,

2015). K nalezení nejvhodnějšího distančního modelu byl použit ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Statistická podpora dendrogramů byla ověřena metodou Ultrafastbootstrap (Hoang et al., 2018) s 1000 opakování. Dendrogramy byly zobrazeny a upraveny v programu FigTree (Rambaut, 2009).

Program DnaSP verze 6 (Rozas et al., 2017) byl použit pro identifikaci haplotypů a výpočty haplotypové diverzity (H_d), variability nukleotidů (π) a počtu haplotypů (h). Dále v něm byly vytvořeny soubory haplotypů pro další analýzu v programu Arlequin.

V programu Arlequin verze 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) byla provedena analýza haplotypů, vypočteny testy neutrality (Tajimův test, Fuův FS test) a analýzy molekulární variance (AMOVA).

Pro vytvoření haplotypových sítí pomocí metody Median-Joining (MJ) (Bandelt et al., 1999) byl použit program PopArt verze 1.7 (Leigh & Bryant, 2015).

Hypotéza o možné izolaci populací na základě geografické vzdálenosti (IBD) byla testována pomocí Mantelova testu na korelaci genetické (K_{2p}) a geografické vzdálenosti populací v programu GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Stejný program byl použit také pro klastrovou analýzu metodou hlavních souřadnic (PCoA, principal coordinate analysis).

V programovém prostředí R (RStudio Team, 2016) bylo provedeno pomocí balíčků dendextend (Galili, 2015), ape (Paradis & Schliep, 2018) a phylogram (Wilkinson & Davy, 2018) porovnání druhové fylogeneze partenogenetických chvostoskoků a jejich symbiotické *Wolbachia*. Byl zde kromě diagramů znázorňujících souběh fylogramů (tanglegramů) vypočten i koeficient „entanglement“ (entg), který udává kvalitu souběžnosti dvou fylogramů. Pokud se entg rovná 1, znamená to, že jsou fylogramy zcela nesouběžné, naopak pokud je entg roven 0, jedná se o zcela souběžné fylogramy. Dále zde byla vypočtena kofenetické korelace (ccf), která se pohybuje v rozmezí od -1 do 1, kdy hodnota kolem 0 znamená, že fylogramy, které porovnáváme, nejsou statisticky podobné.

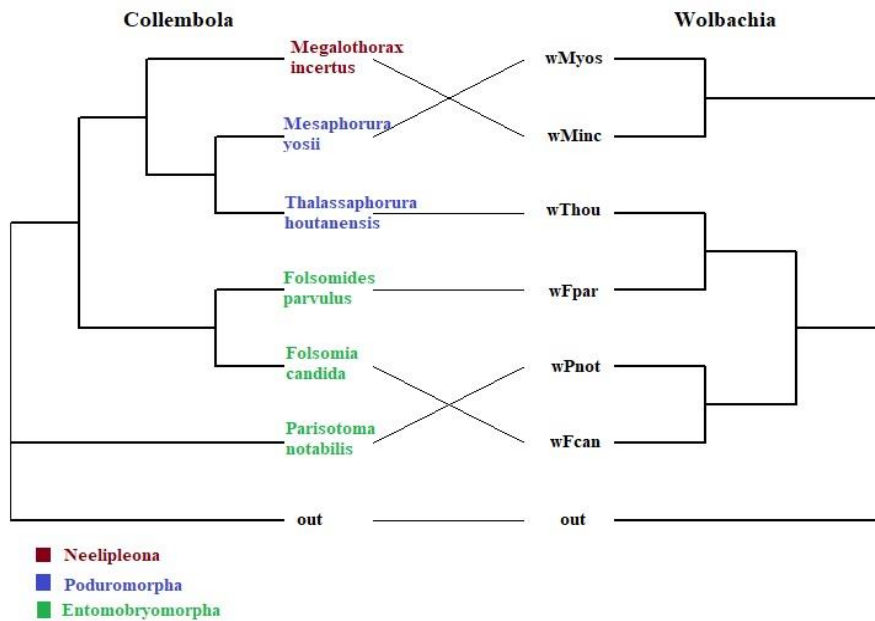
4 Výsledky

U 10 vzorků z 80 se opakovaně nedařila PCR amplifikace, a proto byla u těchto vzorků změřena DNA na nanodropu. Ukázalo se, že u vzorků nebyla naměřena DNA, tudíž nebylo možné s nimi dále pracovat.

4.1 Detekce a charakteristika *Wolbachia* u *P. notabilis*

PCR amplifikace lokusu *wsp* se nezdařila u žádného vzorku, naopak amplifikace *16S* rRNA a všech 5 MLST (*ftsZ*, *gatB*, *hcpA*, *fbpA* a *coxA*) lokusů byla pozitivní u všech 70 jedinců. Z toho plyne, že se podařilo potvrdit 100 % infekci *Wolbachia* dohromady pomocí šesti lokusů. Pro charakterizaci, resp. ověření superskupiny tohoto symbionta byla provedena multilokusová typizace, tedy osekvenování jednotlivých lokusů z vybraného jedince, a následně i ověření fylogenetické zařazení této *Wolbachia*. Sekvence jednotlivých lokusů byly spojeny do konkatenované sekvence, a obdobné konkatenované sekvence byly vytvořeny z publikovaných dat (GenBank, PubMLST) získaných z jiných partenogenetických chvostoskoků. (viz příloha 3). Pro srovnání evoluce *Wolbachia* s evolucí jejich hostitelských chvostoskoků byla pro konstrukci fylogramu chvostoskoků vytvořena konkatenovaná sekvence z lokusů *COI*, *18S* a *28S* rRNA získaných z GenBanku (viz příloha 4).

Tangleram, tedy grafické znázornění srovnání fylogeneze chvostoskoků a jejich symbiotické *Wolbachia*, je na obrázku (Obr. 7). Koeficient souběžnosti entg vyšel 0,661, což naznačuje, že souběžnost není optimální. Hodnota korelačního kofenetického koeficientu *ccf* je rovna 0,160 tedy fylogramy, si nejsou příliš statisticky podobné. Z obrázku vyplývá, že fylogramy nejsou zcela paralelní, a to poukazuje na fakt, že evoluce *Wolbachia* nekopíruje evoluci chvostoskoků.



Obr. 7: Srovnání fylogeneze chvostoskoků a jejich symbiotické *Wolbachia*. Fylogram *Wolbachia* (vpravo) byl zakořeněn pomocí druhu *Zootermopsis nevadensis* (out). Fylogram hostitelských druhů chvostoskoků (vlevo) byl zakořeněn pomocí druhu *Baculentulus tianmushanensis* (out). Chvostoskoci (Collembola) jsou barevně odlišeni podle jejich taxonomického řádu.

4.2 Jaderné markery

Celkem bylo otestováno 6 vybraných jaderných markerů. U oblastí *ITS* (i jednotlivých fragmentů *ITS1* a *ITS2*) a *H3* se sice podařila úspěšná amplifikace, avšak sekvence nebyly ani po zaklonování dostatečně kvalitní pro další analýzu.

Ze tří EPIC markerů se povedla úspěšná amplifikace pouze u jednoho, a to u lokusu *PGM*. Sekvenováním bylo zjištěno, že amplifikovaná oblast zahrnuje dva introny, které jsou 67 a 81 bp dlouhé. Pro porovnání, chvostoskok *Folsomia candida* má 1. intron o 3 bp kratší a 2. intron o 22 bp kratší, než má *Parisotoma notabilis*. V tabulce (Tab. V) je zaznamenána přibližná délka fragmentů jednotlivých oblastí.

Tab. V: Přibližná délka jednotlivých oblastí.

Lokus	Přibližná délka PCR produktu [bp]
<i>ITS 1</i>	800
<i>ITS 2</i>	700
<i>ITS</i>	1400
<i>H3</i>	560
<i>PGM</i>	650

4.3 Genetická variabilita populací *P. notabilis*

Pro zjištění genetické variability u chvostoskoků *P. notabilis* byla z mitochondriálních markerů vybrána oblast *COI*, u které byla porovnávána genetická variabilita našich košických městských vzorků s přírodními evropskými vzorky. Úspěšně se podařilo naamplifikovat 70 jedinců z Košic, přičemž 4 sekvence nebyly dostatečně kvalitní. Pro porovnání této sady městských košických populací s evropskými přírodními populacemi bylo použito 211 sekvencí z databáze GenBank.

4.3.1 Košice – městské (urbánní) populace

U fragmentu *COI* bylo úspěšně osekvenováno 66 jedinců z 12 košických městských populací. Finální sekvence po úpravách mají délku 615bp. Počet variabilních míst byl 157, to je 25,5 %. Parsimoniální variabilita (variabilita alespoň ve dvou nukleotidech, která se vyskytuje minimálně u dvou sekvencí) byla nalezena na 136 místech, což je 22,1 %. Singletonů (unikátních mutací) bylo 21 a to je 3,4 %.

Genetické vzdálenosti (K2p) uvnitř populací se pohybuje od nuly na lokalitě Starý pivovar – trávník, do maxima 0,130 a to u lokality Vo výmoli – lesík. V tabulce (Tab. VI) jsou uvedeny hodnoty genetické vzdálenosti a standardní chyby uvnitř populací.

Tab. VI: Vnitropopulační genetické vzdálenosti (Kimura 2-parametr, K2p) košických městských populací. SE –standardní chyba.

	K2p	SE
Stará nemocnica – park	n/c	n/c
Barca – park	n/c	n/c
Barca – hřbitov	0,002	0,001
KVP – trávník	0,002	0,002
Anička – trávník	0,004	0,002
Starý pivovar – trávník	0,000	0,000
Starý pivovar – ruderál	0,012	0,002
Anička – ruderál	0,008	0,003
Rozália – hřbitov	0,002	0,001
Račí potok – lesík	0,126	0,012
Vo výmoli – lesík	0,130	0,012
Veřejný hřbitov	0,001	0,001

n/c – nelze stanovit průměrná vzdálenost, protože byl osekvenován pouze jeden vzorek.

Genetické vzdálenosti (K2p) vzdálenosti mezi populacemi jsou zaznamenány v tabulce (Tab. VII). Nulová hodnota byla zjištěna mezi populacemi Barca – park (Bap) a Stará nemocnice – park (SNp). Největší genetická vzdálenost s hodnotou 0,158 byla zjištěna mezi populacemi Vo výmoli – lesík (Vvl) a Anička – trávník (Ant).

Tab. VII: Mezipopulační genetické vzdálenosti (Kimura 2-parametr, K2p, pod diagonálou) košických městských populací (standartní chyby modře nad diagonálou). Zkratky lokalit viz tabulka I.

	SNp	Bap	Bac	KVt	Ant	Spt	Spr	Anr	Roc	Rpl	Vvl	Vec
SNp		0,000	0,001	0,001	0,001	0,000	0,002	0,002	0,001	0,013	0,015	0,001
Bap	0,000		0,001	0,001	0,001	0,000	0,002	0,002	0,001	0,013	0,015	0,001
Bac	0,001	0,001		0,001	0,002	0,001	0,002	0,002	0,001	0,013	0,015	0,001
KVt	0,001	0,001	0,002		0,002	0,001	0,002	0,002	0,001	0,013	0,015	0,001
Ant	0,003	0,003	0,003	0,003		0,001	0,002	0,002	0,002	0,013	0,015	0,002
Spt	0,000	0,000	0,001	0,001	0,003		0,002	0,002	0,001	0,013	0,015	0,001
Spr	0,007	0,007	0,008	0,009	0,010	0,008		0,0022	0,002	0,013	0,015	0,002
Anr	0,004	0,004	0,005	0,006	0,006	0,005	0,011		0,002	0,013	0,015	0,002
Roc	0,001	0,001	0,002	0,002	0,004	0,001	0,009	0,006		0,013	0,015	0,001
Rpl	0,136	0,136	0,135	0,135	0,136	0,134	0,135	0,136	0,135		0,011	0,013
Vvl	0,157	0,157	0,158	0,157	0,158	0,157	0,157	0,157	0,158	0,120		0,015
Vec	0,001	0,001	0,002	0,001	0,004	0,001	0,008	0,006	0,001	0,134	0,157	

Variabilita mezi populacemi (nukleotidová variabilita – π , haplotypová diverzita – Hd a počet haplotypů – h) jsou zaznamenány v tabulce (Tab. VIII). Celková haplotypová diverzita činila 0,550 a nukleotidová diverzita 0,059. Analýza rozlišila 18 haplotypů, přičemž největší zastoupení měl haplotyp 1 (45 jedinců).

Tab. VIII: Nukleotidová variabilita (π), haplotypová variabilita (Hd) a počet haplotypů (h).

<i>Lokalita</i>	π	Hd	H
Stará nemocnica – park	n/c	n/c	1
Barca – park	n/c	n/c	1
Barca – hřbitov	0,000	0,000	1
KVP – trávník	0,000	0,000	1
Anička – trávník	0,000	0,000	1
Starý pivovar – trávník	0,000	0,000	1
Starý pivovar – ruderál	0,003	0,506	5
Anička – ruderál	0,003	0,500	2
Rozália – hřbitov	0,002	0,500	2
Račí potok – lesík	0,095	0,909	9
Vo výmoli – lesík	0,097	0,944	7
Veřejný hřbitov	0,000	0,000	1

n/c – nelze stanovit, protože byl osekvenován pouze jeden vzorek.

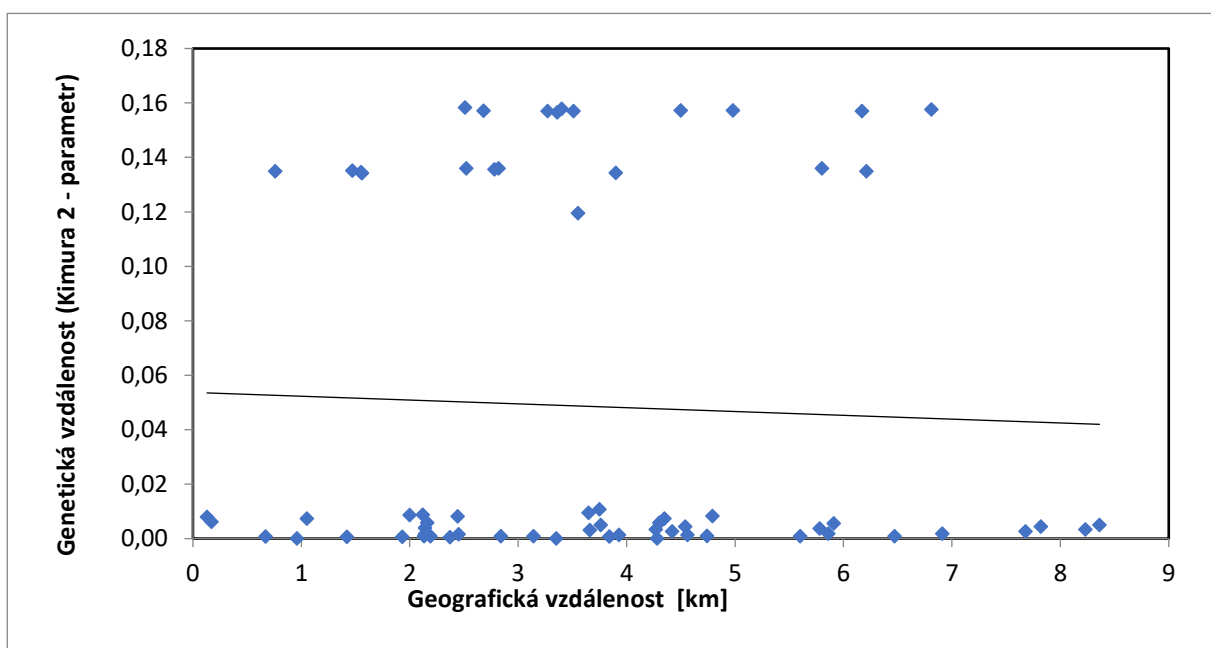
Výsledky testů neutrality, které umožňují zaznamenat demografické události, jsou uvedeny v tabulce (Tab. IX). U žádné z lokalit nebyl ani jeden z testů signifikantní. Pokud hodnota Tajimova D dosahuje záporných hodnot, může to značit populační expanzi, naopak kladná hodnota může značit nedávný „bottleneck“, kdy mohl nastat prudký pokles počtu jedinců v populaci. Stejně tak záporná hodnota Fuova FS může být důkazem nadměrného počtu alel, jak by se dalo očekávat u nedávné populační expanze. Kladná hodnota značí nedostatek alel, což mohlo nastat při nedávném „bottlenecku“.

Tab. IX: Testy neutrality pro jednotlivé košické městské populace. N – počet jedinců, S - počet segregujících míst, Pi- průměrná párová diverzita, p - hodnota pravděpodobnosti.

Lokalita	N	Tajimův test				Fuův test		
		S	Pi	D	p	počet alel	FS	p
Stará nemocnica – park	1	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A
Barca – park	1	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A
Barca – hřbitov	5	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A
KVP – trávník	2	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A
Anička – trávník	8	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A
Starý pivovar – trávník	3	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A
Starý pivovar – ruderál	14	7	1,462	-1,240	0,118	5	-0,693	0,280
Anička – ruderál	4	3	1,500	-0,754	0,233	2	1,716	0,729
Rozália – hřbitov	4	2	1,000	-0,710	0,290	2	1,099	0,651
Račí potok – lesík	12	79	44,455	2,714	0,994	9	3,356	0,959
Vo výmoli – lesík	9	88	42,194	1,563	0,896	7	3,458	0,950
Veřejný hřbitov	3	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A

N.A – nelze stanovit (not applicable).

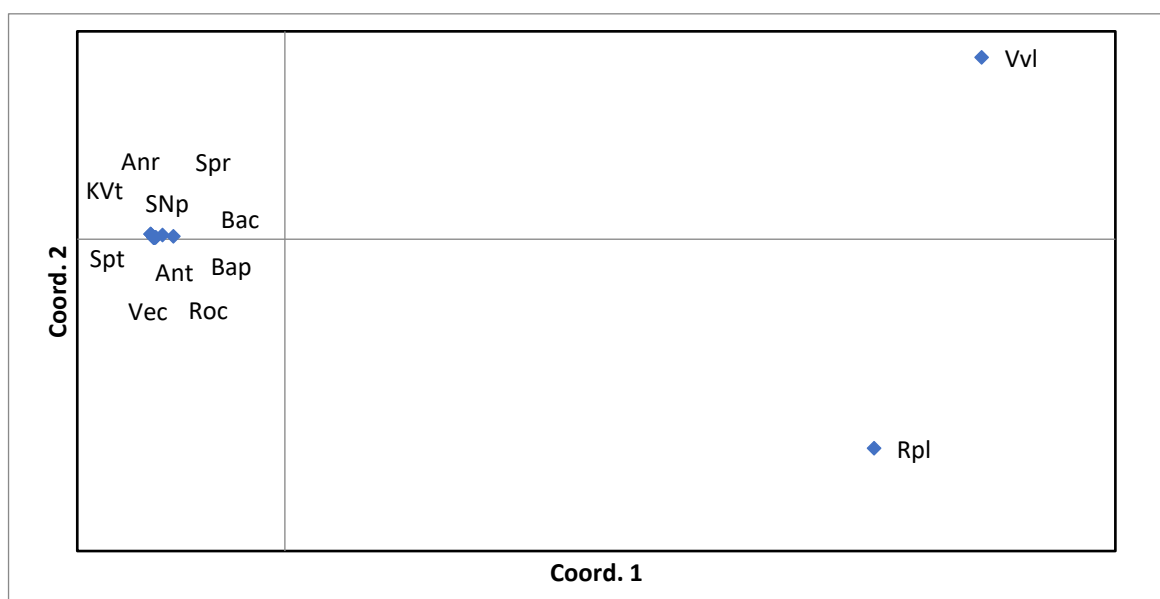
Výsledek testu na izolaci vzdáleností (IBD) je znázorněn graficky na obrázku (Obr. 8). Hodnota Mantelova testu $R_{xy} = -0,042$ a $p = 0,471$ znamenají, že není signifikantní, mezi genetickou a geografickou vzdáleností neexistuje žádná závislost, která by mohla vést k odlišení populací.



Obr. 8: Izolace vzdáleností - vztah mezi genetickou a geografickou vzdáleností u košických městských vzorků (Mantelův test).

Populační strukturu analýzou molekulárních variací (AMOVA) se nepodařilo stanovit. I přes několik způsobů seskupení populací (podle habitatu, kdy byly populace přiřazeny do 4 skupin – lesík, hřbitov, trávník, ruderal, ale i sloučení příbuzných habitatů nebo podle geografického hlediska) vycházely fixační indexy a variance negativní. Tento jev je matematický artefakt, který může vzniknout jako důsledek malého počtu vzorků na populaci a velké haplotypové diverzity. Pokud by bylo vzorkování vyvážené, pak negativní hodnoty poukazují na absenci populační struktury (Excoffier & Lischer, 2010).

Výsledek klastrovací analýzy PCoA na základě genetické vzdálenosti (K2p) mezi populacemi je znázorněn na obrázku (Obr. 9). Zřetelně se tu vyčlenily dvě populace – Račí potok-lesík a Vo výmoli – lesík, ostatní populace se naopak nahloučily do jednoho klastru, od těchto dvou populací přibližně stejně vzdáleného. Obě lokality habitatu „lesík“ jsou v jiných kvadrantech, a tedy i geneticky oddělené.



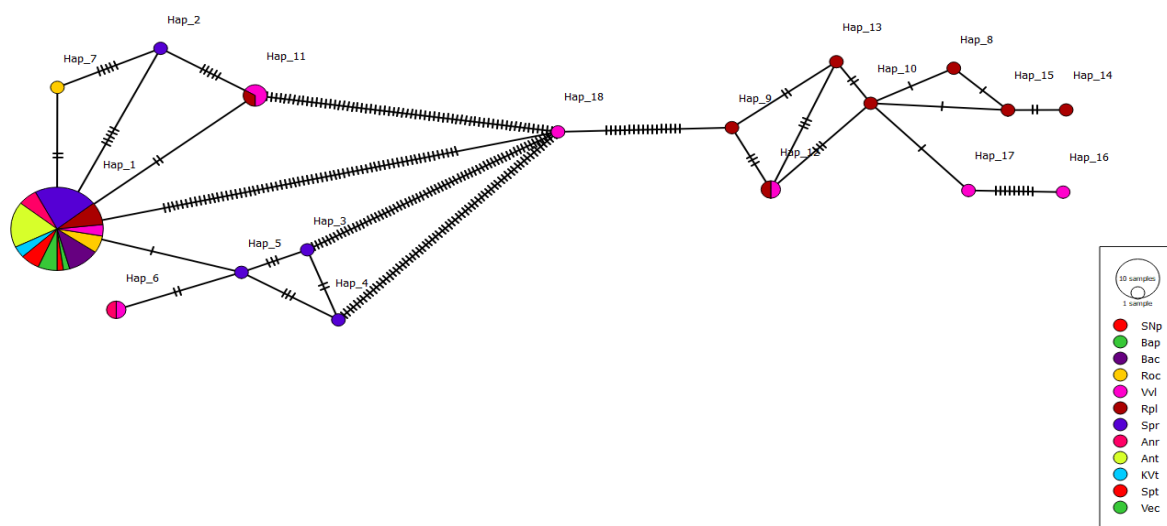
Obr. 9: PCoA graf pro městské košické vzorky. Zkratky lokalit jsou uvedeny v tabulce I.

Dendrogramy zkonstruované na základě genetických vzdáleností mezi jedinci vykazují podobné seskupení (Obr. 10 a Příloha 5). Oba dendrogramy jsou rozděleny do dvou klastrů. V menším klastru se vyskytují pouze jedinci z lesíků a ve druhém (větším) se objevují jedinci ze všech populací včetně některých jedinců z lesíků.



Obr. 10: Dendrogram pro městské vzorky z Košic (Maximum Likelihood, TIM2+F+G4 model, bootstrap 1000x). Strom byl zakořeněn pomocí chvostoskoka *Folsomia candida*. Jednotlivé populace jsou barevně odlišeny a zkratky lokalit jsou uvedeny v tabulce (Tab. I).

Vztahy mezi haplotypy urbánních vzorků graficky popisuje haplotypová síť vytvořená metodou Median –Joining (Obr. 11). Z obrázku je patrné, že nejvíce zastoupeným haplotypem je haplotyp 1, který se vyskytuje ve všech habitatech.



Obr. 11: Grafické znázornění haplotypů (metodou Median-Joining). Každý kruh znázorňuje jeden haplotyp, přičemž velikost a rozdělení kruhu odpovídá počtu jedinců s jednotlivými haplotypy, mutace jsou znázorněny čárkami na spojnicích. Lokality jsou odděleny barevně a zkratky lokalit jsou uvedeny v tabulce výše (Tab. I).

4.3.2 Evropa – přírodní populace

Pro porovnání s našimi městskými vzorky, byly staženy sekvence z GenBanku z přírodních populací. Jednalo se o 211 sekvencí ze 47 populací. Sekvence byly zkráceny na jednotnou délku 657bp. Počet variabilních míst byl 248, což je 37,7 %. Parsimoniální variabilita byla nalezena na 240 místech (36,5 %), singletonů bylo 8 (1,2 %).

Největší vnitropopulační genetická vzdálenost (K2p, Tab. X) byla u populace DK (Humblebaek), a to 0,165. Naopak nulová vzdálenost byla zaznamenána u celkem 11 populací z různých geografických oblastí: francouzské FR4 (Rambouillet), FR5 (Korsika, Olmi-Capella), L_FR1 (Drome, Verclause), L_FR2 (Pas-de-Calais, Wimereux) a L_FR4 (Pyrenees-Orientales, Corsavy); německé DE3 (Solling, Neuhaus) a L_DE (Hamburg, Blankenese); ruské RU2 (Znamenskoe); britské GB1 (Melrose) a GB2 (Island of Arran); španělské ES2 (Ponga).

Tab. X: Vnitropopulační genetické vzdálenosti (Kimura 2-parametr, K2p) evropských přírodních populací. SE –standardní chyba. Zkratky lokalit jsou uvedeny v přílohách (Příloha 1 a 2).

	K2p	SE			K2p	SE
BG	0,008	0,003		L_DE	0,000	0,000
HR	0,003	0,002		L_FR2	0,000	0,000
DK	0,165	0,014		L_GB	n/c	n/c
FR1	0,001	0,001		L_NE	n/c	n/c
FR5	0,000	0,000		L_ES1	0,081	0,008
FR2	0,005	0,002		L_ES2	n/c	n/c
FR3	0,004	0,002		L_FR1	0,000	0,000
FR4	0,000	0,000		L_FR7	0,008	0,003
DE1	0,081	0,008		L_FR9	0,002	0,001
DE2	0,004	0,002		L_FR10	0,001	0,001
DE3	0,000	0,000		L_FR3	0,124	0,011
GR	0,004	0,002		L_FR4	0,000	0,000
IT	0,006	0,002		L_FR5	0,007	0,002
NO1	0,008	0,003		L_FR6	0,003	0,002
NO2	0,002	0,001		L_IT1	n/c	n/c
RU1	0,002	0,001		L_MD1	0,012	0,004
RU2	0,000	0,000		L_MD2	0,068	0,011
GB1	0,000	0,000		L_FR8	n/c	n/c
GB2	0,000	0,000		L_FR11	0,002	0,002
RS	0,006	0,002		L_IT2	n/c	n/c
ES1	0,007	0,003		L_PO	n/c	n/c
ES2	0,000	0,000		L_SL	n/c	n/c
SL	0,001	0,001				
TR	0,002	0,001				
UA	0,006	0,002				

n/c – nelze stanovit průměrná vzdálenost, protože byl osekvenován pouze jeden vzorek.

Genetická vzdálenost mezi populacemi (K2p, viz elektronická příloha) byla také zaznamenána s nulovou hodnotou u dvojic L_FR4 (Pyrenees-Orientales, Corsavy) a FR5 (Pyrenees-Orientales, L'Albere), L_GB (England, Hampshire) a L_FR2 (Pas-de-Calais, Wimereux), L_NE (Zutphen) a L_DE (Hamburg, Blankenese). Největší genetická vzdálenost s hodnotou 0,240 pak byla nalezena mezi populacemi L_FR2 (Pas-de-Calais, Wimereux) a GR (Chrysovitsi), L_GB (England, Hampshire) a GR (Chrysovitsi).

Další parametry genetické variability populací (nukleotidová variabilita – π , haplotypová diverzita – Hd a počet haplotypů – h) jsou zaznamenány v tabulce (Tab. XI). Bylo rozlišeno 51 haplotypů, přičemž je nejvíce zastoupen haplotyp 1. Celková haplotypová diverzita byla 0,939 a nukleotidová diverzita 0,125.

Tab. XI: Nukleotidová variabilita (π), haplotypová variabilita (Hd) a počet haplotypů (h).

Zkratky lokalit jsou uvedeny v přílohách (Příloha 1 a 2).

<i>Lokalita</i>	π	Hd	h	<i>Lokalita</i>	π	Hd	h
BG	0,008	0,900	4	L_DE	0,000	0,000	1
HR	0,004	1,000	4	L_FR1	0,000	0,000	1
DK	0,142	0,800	3	L_FR2	0,000	0,000	1
FR1	0,001	0,500	2	L_FR3	0,108	0,781	7
FR2	0,005	0,400	2	L_FR4	0,000	0,000	1
FR3	0,004	0,900	4	L_FR5	0,007	0,500	2
FR4	0,000	0,000	1	L_FR6	0,003	0,600	2
FR5	0,000	0,000	1	L_FR7	0,008	0,600	2
DE1	0,071	0,700	3	L_FR8	n/c	n/c	1
DE2	0,004	0,833	3	L_FR9	0,002	0,400	2
DE3	0,000	0,000	1	L_FR10	0,001	0,400	2
GR	0,004	0,900	4	L_FR11	0,002	1,000	2
IT	0,006	0,500	2	L_MD1	0,012	1,000	2
NO1	0,008	1,000	4	L_MD2	0,064	1,000	2
NO2	0,002	0,500	2	L_ES1	0,071	0,733	3
RU1	0,002	0,700	3	L_ES2	n/c	n/c	1
RU2	0,000	0,000	1	L_GB	n/c	n/c	1
GB1	0,000	0,000	1	L_NE	n/c	n/c	1
GB2	0,000	0,000	1	L_IT1	n/c	n/c	1
RS	0,005	0,400	2	L_IT2	n/c	n/c	1
ES1	0,007	0,667	2	L_PO	n/c	n/c	1
ES2	0,000	0,000	1	L_SL	n/c	n/c	1
SL	0,001	0,667	2				
TR	0,002	0,700	3				
UA	0,005	0,400	2				

n/c – nelze stanovit, protože byl osekvenován pouze jeden jedinec.

Výsledky testy neutrality (Tajimův D test a Fuův FS test) pro jednotlivé populace jsou uvedeny v tabulce (Tab. XII). Ani jeden z testů však není u žádné populace signifikantní, přitom výkyvy ve směru kladném (signál bottlenecku) či záporném (svědčící o populační expanzi) jsou bez jednotného uspořádání.

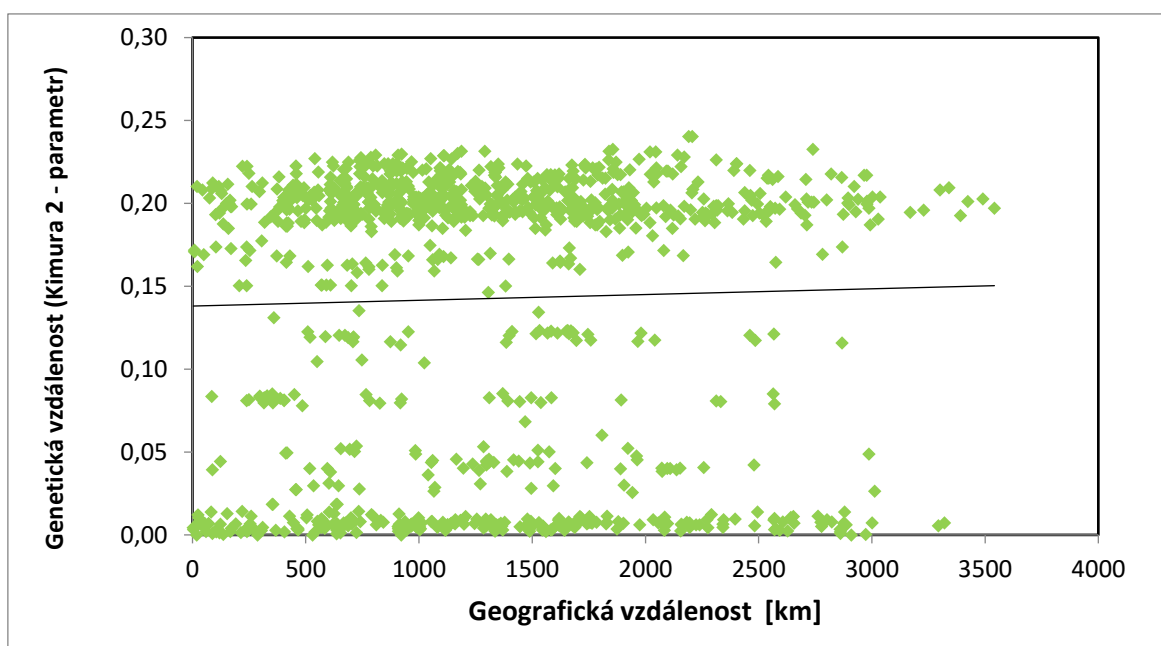
Tab. XII: Testy neutrality pro jednotlivé evropské přírodní populace. N - počet jedinců, S - počet segregujících míst, Pi- průměrná párová diverzita, p - hodnota pravděpodobnosti. Zkratky lokalit jsou uvedeny v přílohách (Příloha 1 a 2).

Lokalita	N	Tajimův test				Fuův test		
		S	Pi	Tajimovo D	p hodnota	Počet alel	FS	p hodnota
BG	5	10	5,200	0,596	0,709	4	0,552	0,543
HR	4	4	2,333	0,650	0,802	4	-1,622	0,050
DK	5	167	93,400	1,259	0,889	3	9,799	0,999
FR1	4	1	0,500	-0,612	0,370	2	0,172	0,324
FR5	5	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
FR2	5	8	3,200	-1,174	0,061	2	3,679	0,950
FR3	5	5	2,400	0,000	0,589	4	-0,701	0,193
FR4	4	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
DE1	5	116	46,400	-1,268	0,002	3	7,798	0,997
DE2	4	5	2,500	-0,797	0,163	3	0,461	0,490
DE3	5	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
GR	5	5	2,400	0,000	0,599	4	-0,701	0,214
IT	4	8	4,000	-0,824	0,131	2	3,526	0,943
NO1	4	9	5,167	0,522	0,749	4	-0,480	0,208
NO2	4	2	1,000	-0,710	0,273	2	1,099	0,610
RU1	5	3	1,400	-0,175	0,446	3	0,061	0,334
RU2	5	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
GB1	5	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
GB2	5	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
RS	5	9	3,600	-1,184	0,046	2	3,967	0,953
ES1	3	7	4,667	0,000	1,000	2	2,884	0,859
ES2	5	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
SL	3	1	0,667	0,000	1,000	2	0,201	0,391
TR	5	3	1,400	-0,175	0,445	3	0,061	0,330
UA	5	9	3,600	-1,184	0,047	2	3,967	0,957
L_DE	8	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
L_FR2	4	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
L_GB	1	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
L_NE	1	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
L_ES1	6	125	46,600	-0,963	0,199	3	10,054	1,000
L_ES2	1	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
L_FR1	2	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
L_FR7	5	9	5,400	1,777	0,986	2	5,042	0,982
L_FR9	5	3	1,200	-1,048	0,086	2	1,688	0,757
L_FR10	5	1	0,400	-0,817	0,309	2	0,090	0,295
L_FR3	31	150	71,148	3,431	1,000	7	36,737	1,000
L_FR4	7	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
L_FR5	4	9	4,500	-0,829	0,129	2	3,777	0,950
L_FR6	5	3	1,800	1,573	0,975	2	2,429	0,857
L_IT1	1	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.

L_MD1	2	8	8,000	0,000	1,000	2	2,079	0,562
L_MD2	2	42	42,000	0,000	1,000	2	3,738	0,615
L_FR8	1	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
L_FR11	2	1	1,000	0,000	1,000	2	0,000	0,279
L_IT2	1	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
L_PO	1	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.
L_SL	1	0	0,000	0,000	1,000	1	0,000	N.A.

N.A – nelze stanovit (not applicable).

Výsledek testu na izolaci vzdáleností (IBD) je znázorněn graficky (Obr. 12). Hodnota Mantelova testu $R_{xy} = 0,030$ není signifikantní ($p = 0,283$), geografická vzdálenost proto nemá na genetickou vzdálenost výrazný vliv.



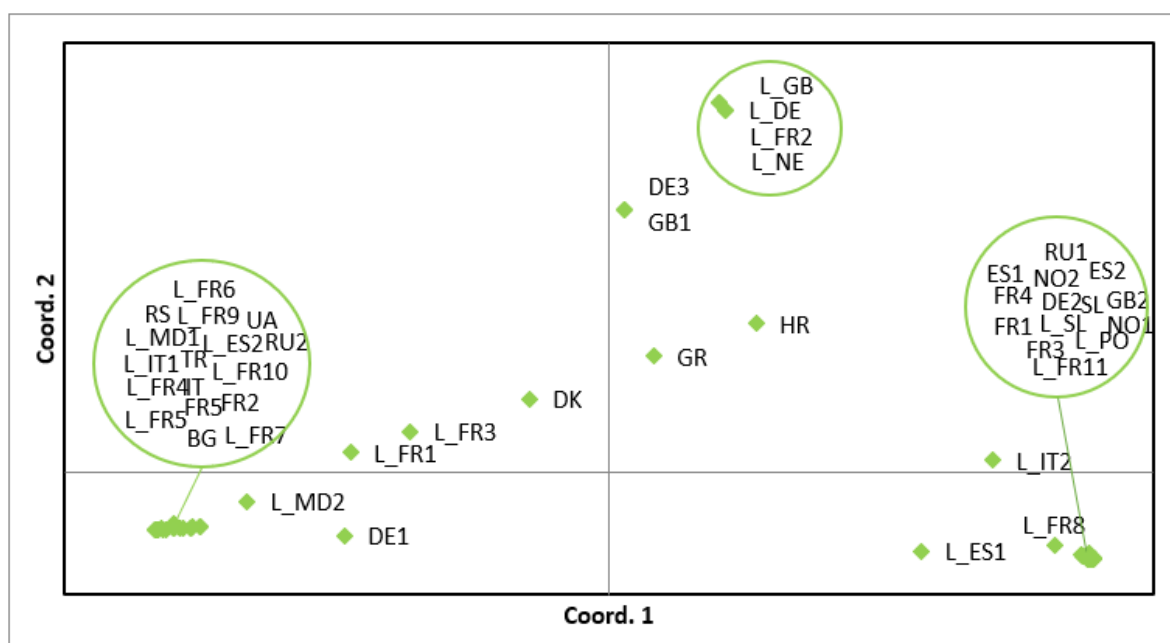
Obr. 12: Izolace vzdáleností – vztah mezi genetickou a geografickou vzdáleností u přírodních evropských vzorků (Mantelův test).

Pro Analýzu Molekulární Variance (AMOVA) byly populace uspořádány do skupin podle států. Výsledky (Tab. XIII) naznačují, že větší variabilita je mezi populacemi uvnitř skupin než mezi skupinami, což znamená, že populace nemají hierarchickou strukturu.

Tab. XIII: Analýza variance alelických frekvencí (AMOVA) přírodních populací.

Zdroj variability	d.f.	Suma čtverců	Variance komponentů	Vysvětlená variabilita [%]
<i>Mezi skupinami</i>	17	5392,751	9,931 Va	13,36
<i>Mezi populacemi uvnitř skupin</i>	29	6694,240	48,348 Vb	65,05
<i>Uvnitř populací</i>	163	2614,495	16,039 Vc	21,58
<i>Celková variabilita</i>	209	14701,487	74,319	

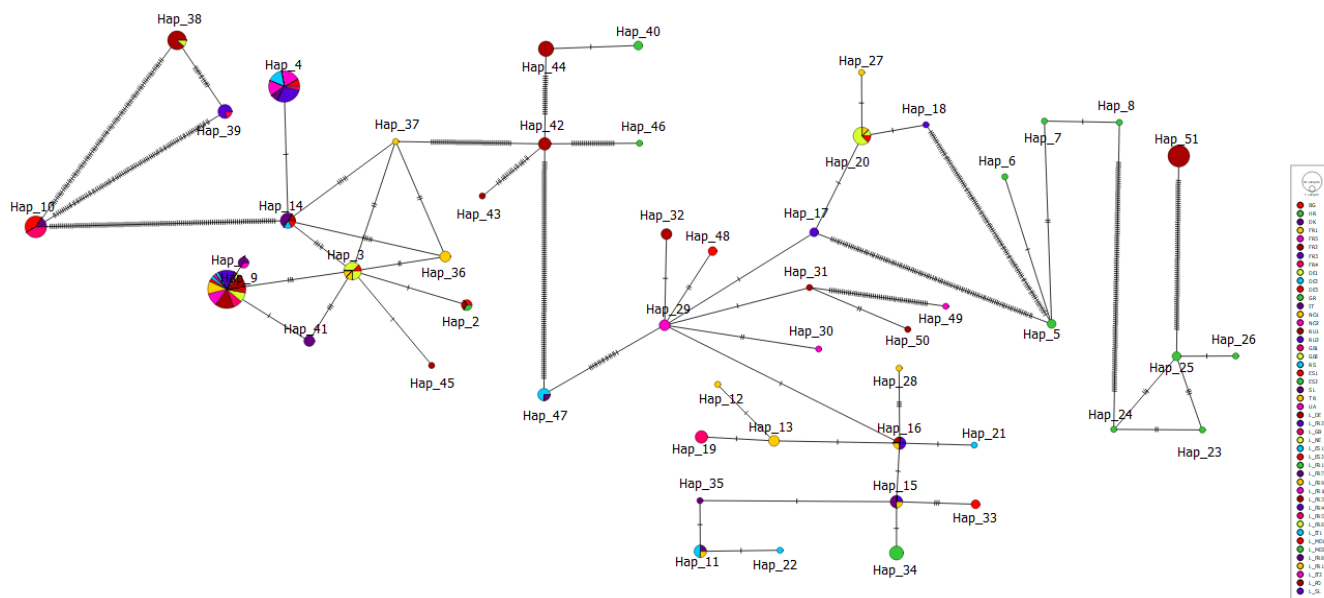
Klastrová analýza metodou hlavních souřadnic (PCoA) (Obr. 13) rovněž neodhalila strukturovanost populací – nahloučení do klastrů nezávisle na geografii vypovídá o minimální genetické struktuře.



Obr. 13: PCoA graf pro přírodní evropské vzorky. Zkratky lokalit jsou uvedeny v přílohách (Příloha 1 a 2). Zelené kruhy označují shluky populací, u nichž jednotlivé značky nešlo rozlišit.

Analýza pomocí dendrogramů pro přírodní evropské vzorky (Maximum Likelihood – Obr. 14, NJ – Příloha 6) opět potvrdila, že výrazně oddělené klastry tvoří jedinci z různých geografických lokalit.

Vztahy mezi haplotypy vzorků z přírodních populací graficky popisuje haplotypová síť vytvořená metodou Median – Joining (Obr. 15). V tomto případě je nejvíce zastoupen haplotyp 1 (37 jedinců).



Obr. 15: Grafické znázornění haplotypů pro přírodní evropské vzorky. Každý kruh znázorňuje jeden haplotyp, přičemž velikost a rozdělení kruhu odpovídá počtu jedinců s jednotlivými haplotypy, mutace jsou znázorněny čárkami na spojnicích. Populace jsou odděleny barevně a zkratky lokalit jsou uvedeny v přílohách (Příloha 1 a 2).

4.3.3 Celková populace

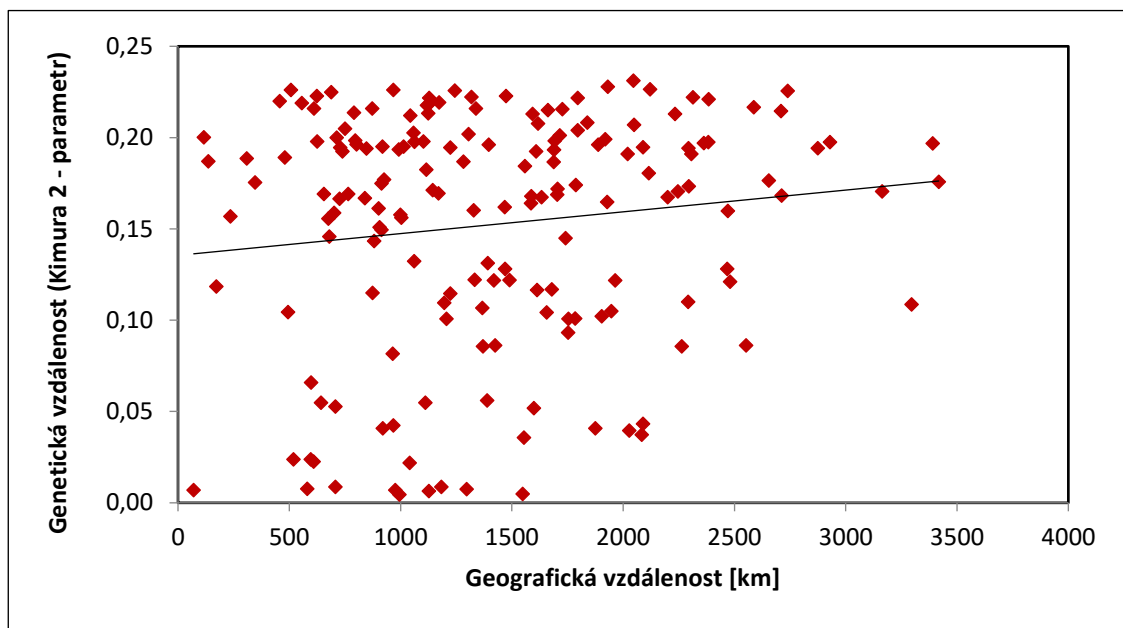
Z výsledků vyplývá, že mezi městskými a přírodními populacemi nejsou příliš velké rozdíly (Tab. XIV). Rozmezí genetické vzdálenosti uvnitř i mezi populacemi a haplotypová nukleotidová diverzita je u přírodních vzorků vyšší, ale to je pravděpodobně způsobeno větším počtem vyšetřených jedinců.

Tab. XIV: Průměrné hodnoty parametrů genetické variability u městských a přírodních populací *P. notabilis*. N – celkový počet jedinců, P – počet populací, π – nukleotidová variabilita, Hd – haplotypová diverzita, h – celkový počet haplotypů, K2p – Kimura 2-parametr rozmezí genetické vzdálenosti (uvnitř populací a mezi populacemi).

	N	P	π	Hd	h	K2p uvnitř populací	K2p mezi populacemi
Městské populace	66	12	0,059	0,550	18	0 – 0,130	0 – 0,158
Přírodní populace	211	47	0,125	0,939	51	0 – 0,165	0 – 0,240

Pro ověření těchto závěrů byly provedeny tyto analýzy: izolace vzdáleností (Mantelův test), hierarchická struktura populací (AMOVA), graf PCoA a dendrogram, do kterých byly zahrnuty přírodní a městské populace dohromady.

Jako v obou předchozích analýzách, Mantelův test nebyl signifikantní ($R_{xy} = 0,130$, $p = 0,131$). Z grafu (Obr. 16) je zřejmé, že spojení populací přírodních a městských nemělo na tuto analýzu zásadní vliv.



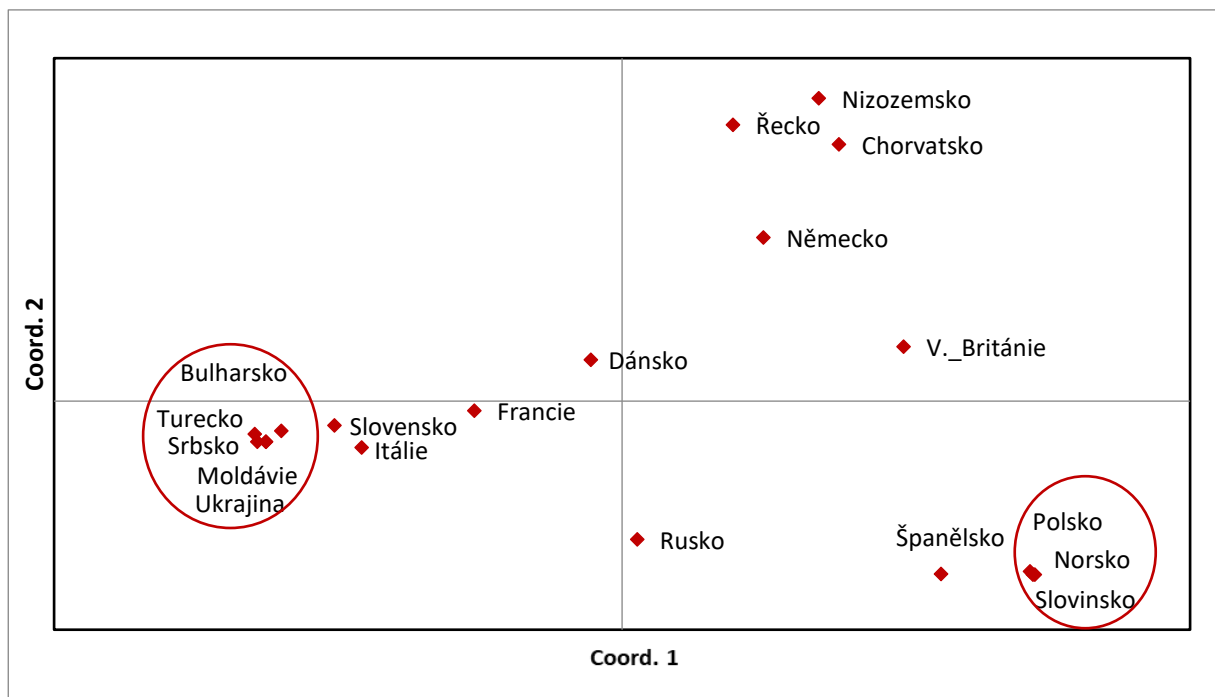
Obr. 16: Izolace vzdáleností - vztah mezi genetickou a geografickou vzdáleností u celkové populace (Mantelův test).

Pro analýzu molekulární variance (AMOVA) byly populace uspořádány do dvou skupin, v první skupině byly přírodní populace a v druhé městské košické populace. Z výsledků (Tab. XV) je zřejmé, že mezi přírodními a městskými populacemi nejsou příliš velké rozdíly a daleko větší variabilita se vyskytuje uvnitř skupin než mezi nimi.

Tab. XV: Analýza molekulární variance (AMOVA) pro celkovou populaci.

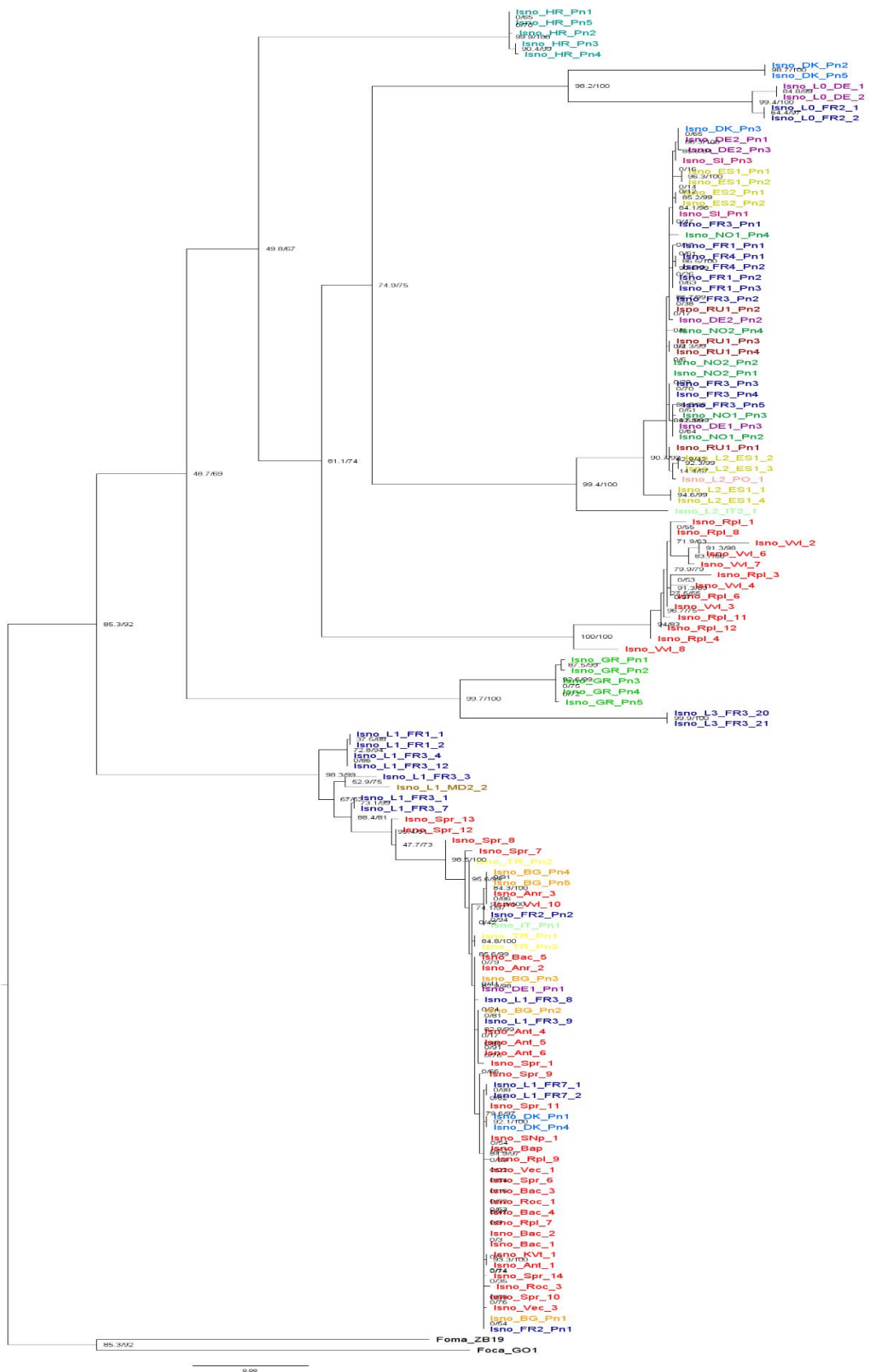
Zdroj variability	d.f.	Suma čtverců	Variance komponentů	Vysvětlená variabilita [%]
<i>Mezi skupinami</i>	1	504,909	2,798 Va	7,55
<i>Mezi populacemi uvnitř skupin</i>	57	7024,650	25,005 Vb	67,51
<i>Uvnitř populací</i>	218	2013,548	9,236 Vc	24,94
<i>Celková variabilita</i>	276	9543,106	37,040	

Také pro celkovou populaci byl sestaven PCoA graf (Obr. 17). Na grafu jsou zobrazeny populace podle států, a ani v tomto případě se geografie neprojevuje specifickým uspořádáním – klastry nejsou vytvořeny ani dle světových stran (jižní a severní, východní a západní), ani podle pohoří či podobných zeměpisných dominant.



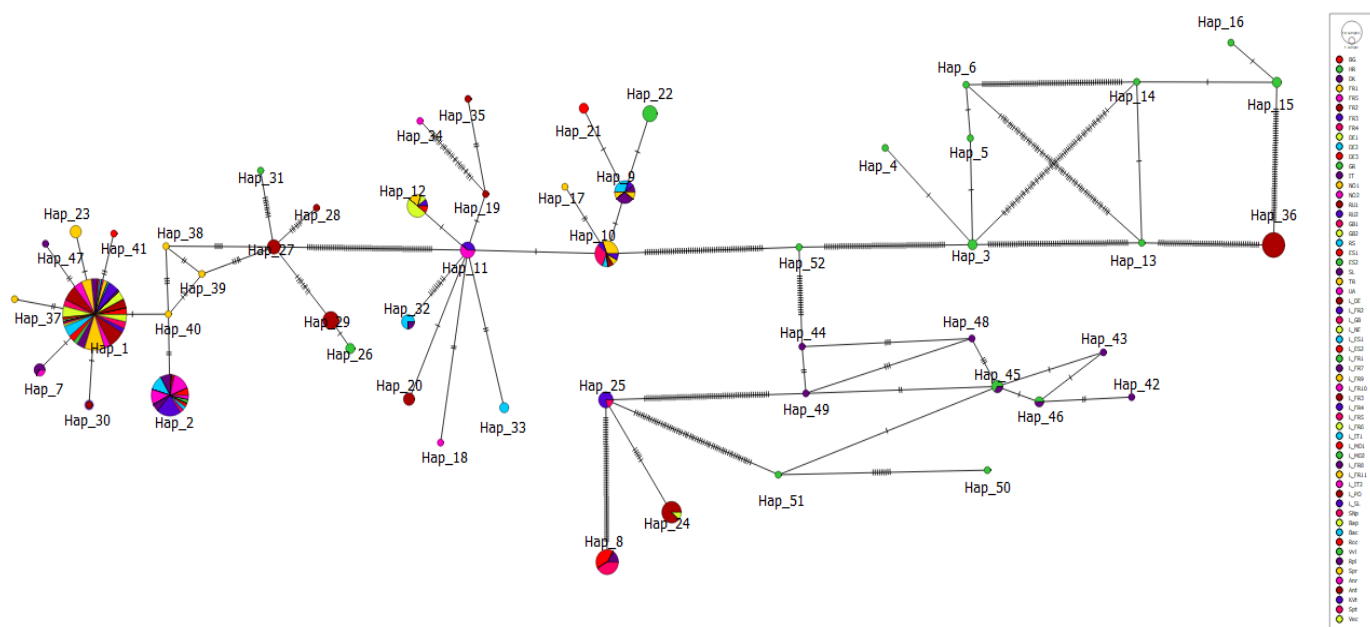
Obr. 17: PCoA graf pro celkovou populaci. Červené kruhy zahrnují populace, u nichž je přiřazení ke značkám špatně rozlišitelné.

Z obou dendrogramů (Maximum Likelihood – Obr. 18, NJ – Příloha 7) plyne, že není rozdíl mezi přírodními a městskými populacemi, protože se tyto populace na dendrogramech mísí.



Obr. 18: Dendrogram pro přírodní i městské vzorky (Maximum likelihood, TIM2+F+G4 model, Bootstrap 1000x). Strom zakořeněn pomocí chvostoskoka *Folsomia candida* a *Folsomia manolachei*. Jednotlivé státy jsou barevně odlišeny a zkratky lokalit jsou uvedeny v přílohách (Příloha 1 a 2).

Z haplotypové sítě (Obr. 19) je vidět, že se od sebe přírodní a městské populace neoddelily a sdílejí stejné haplotypy. Opět je nejvíce zastoupený haplotyp 1, který zahrnuje jedince z populací městských i přírodních.



Obr. 19: Haplotypová síť (Median-Joining) pro celkovou populaci. Každý kruh znázorňuje jeden haplotyp, přičemž velikost a rozdělení kruhu odpovídá počtu jedinců s jednotlivými haplotypy, mutace jsou znázorněny čárkami na spojnicích. Populace jsou odděleny barevně a zkratky lokalit jsou uvedeny v přílohách (Příloha 1 a 2) a v tabulce (Tab. I).

5 Diskuse

5.1 Izolace DNA a metodika PCR

DNA byla izolována pouze jednou metodou, a to pomocí komerčního kitu DNeasy Blood and Tissue kit 250 (Qiagen). Přestože je izolace touto metodou obvykle velmi úspěšná a u chvostoskoků často používaná (Park et al., 2009; Von Saltzwedel et al., 2017), po změření na nanodropu nebyla u 10 vzorků z 80 naměřena DNA. Důvodem neúspěšné izolace zřejmě byla velmi malá velikost izolovaného jedince.

Standardně byla k PCR amplifikaci používána UNIS polymeráza, avšak pokud se nepodařila amplifikace s touto polymerázou, byla testována citlivější ExTaq polymeráza (TaKaRa), kterou bylo dosaženo lepších výsledků. Při detekci *Wolbachia* z počátku nepomohla ani citlivější polymeráza, a proto bylo přidáno BSA, s kterým se podařila amplifikace většiny testovaných lokusů (*I6S* a pět MLST lokusů). Jedinou výjimkou byl lokus *wsp*, jehož amplifikace se nepodařila optimalizovat.

U lokusů *EF 1 α* a *Cal* se amplifikace nepodařila ani po optimalizaci PCR profilu, změně polymerázy či přidání BSA, proto nebyly tyto markery dále zkoumány.

5.2 Jaderné markery

Na základě literatury byly vybrány markery, které byly naamplifikovány pomocí univerzálních, ale i specifických primerů. Primery byly přejaty z literatury nebo specificky navrženy v naší laboratoři. V průběhu práce se podařilo úspěšně naamplifikovat markery *H3*, *ITS* a z EPIC markerů se podařila amplifikace lokusu *PGM*.

Ačkoliv byl marker *H3* vybrán na základě předchozí studie (Von Saltzwedel et al., 2017), v níž byl použit pravděpodobně bez problémů, i přes úspěšnou amplifikaci u našich vzorků nedosahovaly výsledné sekvence dostatečné kvality, a to dokonce ani po zaklonování. Je možné, že k tomu přispěla kontaminace z vnějšího prostředí. Nicméně tento marker je spíš nezbytný pro fylogenetiku než analýzu populací, a tak nebyl dále testován.

Oblast *ITS* je u chvostoskoků (*Collembola*) málo prozkoumaná. Možností využít tento marker se zabývali ve studiích (Park, 2009) a (Anslan & Tedersoo, 2015), přičemž se část *ITS1* jevila v důsledku své vyšší variability pro fylogenetiku nevhodná. Pro populační genetiku by tato variabilita měla být naopak užitečná, proto byl tento marker do testování zahrnut. Celkovou oblast *ITS*, i jednotlivé fragmenty *ITS1* i *ITS2*, se sice podařilo

naamplifikovat, ale sekvence nebyly pro další zpracování dostatečně kvalitní. V tomto případě by bylo nutné dále pracovat s klonováním, což však již z časových důvodů nebylo možné.

Marker *PGM* byla vybrán na základě literatury (Simonsen & Christensen, 2001), kde byl tento alozym dostatečně variabilní. K amplifikaci byly použity univerzální hmyzí primery. Sekvence z přímého sekvenování PCR produktu nebyly dostatečně kvalitní, ale po zaklonování byl tento nedostatek vyřešen a získaná DNA sekvence se v porovnání s fragmentem u *F. candida* jevila odlišná. Stejně jako u *ITS* testování z časových důvodů nemohlo pokračovat.

5.3 *Wolbachia*

Vzhledem k předchozí informaci o možném výskytu endosymbionta *Wolbachia* u *P. notabilis* (Tanganelli et al., 2013) byly všechny vzorky podrobeny skríninku na jeho přítomnost.

Infekce *Wolbachia* byla prokázána u všech vzorků, a to pomocí 6 markerů ze sedmi doporučených. Nepodařila se amplifikace *wsp* lokusu, což se ukázalo jako nepřekvapivé, protože ve studii (Timmermans et al., 2004) se amplifikace lokusu *wsp* u některých druhů také nezdařila. I když se tento výsledek dal na základě předchozích studií a partenogenezi tohoto druhu předpokládat, je to zatím největší počet jedinců *P. notabilis* se 100 % prokázaným endosymbiontem.

Skrínink *Wolbachia* byl zpočátku plánován hlavně kvůli možnosti ovlivnění kvality *COI* sekvencí při přímém sekvenování PCR produktu markeru pro DNA barcoding. Tento předpoklad se však nepotvrdil, protože *Wolbachia* byla detekována i u jedinců, u kterých se problém s *COI* sekvencemi nevyskytoval. Po charakterizaci multilokusového haplotypu se navíc ukázalo, že sekvence *Wolbachia* (konkrétně gen *coxA*) se příliš s *COI* sekvencí nepřekrývá, a proto je snižena kvalita chromatogramů způsobena jiným činitelem (viz dále). I tak se zkoumání *Wolbachia* ukázalo jako zajímavé, protože předchozí populačně-genetické studie zabývající se chvostoskokem *Parisotoma notabilis* se o *Wolbachia* nezmiňují (Porco et al., 2012; Von Saltzwedel et al., 2017).

Pro kompletní obrázek byla porovnána evoluce mezi touto *Wolbachia* a jejím hostitelským chvostoskokem *P. notabilis*, a to podle schématu ze studie (Ma et al., 2017). Z šesti úspěšně osekvenovaných lokusů byla vytvořena konkatenovaná sekvence a

porovnána evoluce s hostitelským chvostoskokem. Pro širší analýzu byly přidány sekvence ze studie (Ma et al., 2017). Ze srovnání fylogramů *Wolbachia* s jejich partenogenetickými hostiteli vyplývá, že evoluce *Wolbachia* neprobíhá souběžně s jejich hostitelskými chvostoskoky, neboť fylogramy endosymbiontů a hostitelských druhů nejsou evolučně souběžné. Tento fakt je zcela v souladu s předchozími zjištěními (Tanganelli et al., 2013; Ma et al., 2017), stejně jako potvrzení o zařazení *Wolbachia* z *P. notabilis* do superskupiny E.

5.4 Mitochondriální marker *COI*

Lokus *COI* je často využíván pro rozlišení druhu, ale u chvostoskoků (Collembola) i v rámci populací. Oblast *COI* byla použita pro srovnání genetické variability městských populací *Parisotoma notabilis* z Košic s přírodními populacemi z Evropy. Protože byly v této práci získáni jedinci pouze z městských populací, byly sekvence z přírodních populací staženy z GenBanku. Bylo převzato 115 sekvencí ze studie (Von Saltzwedel et al., 2017) a 96 sekvencí ze studie (Porco et al., 2012). Ze studie (Porco et al., 2012) byly vybrány jen spolehlivé sekvence bez nerozlišených nukleotidů („N“) z Evropy.

K amplifikaci *COI* oblasti byly použity univerzální primery LCO-1490 a HCO-2198 (Folmer et al., 1994). S těmito primery bylo dosaženo úspěšné amplifikace u všech vzorků, ale některé sekvence obsahovaly nerozlišené nukleotidy nebo nekvalitní začátky. Proto byly poslány sekvenovat PCR produkty s opačným primerem – HCO-2198, ale ani toto u všech problémových vzorků nepomohlo. Proto byly navrženy specifitější primery – TW-J 1301 a C1-N 2353, které jsou lokalizovány vně původního fragmentu. Nejdříve byl PCR produkt poslán sekvenovat s forward primerem TW-J 1301, který se ukázal nevhodný pro sekvenování (pravděpodobně proto, že nasedá na tRNA a párování není ideální), a proto byl PCR produkt poslán k sekvenování s opačným – reverse primerem C1-N 2353, s nímž se podařilo kvalitní sekvence získat. Tyto primery sice vyřešily problém u některých sekvencí, avšak u některých sekvencí stále zůstaly nerozlišené nukleotidy. Zaklonování těchto problémových sekvencí by mohlo tento problém pravděpodobně vyřešit.

Jak už bylo zmíněno, studium oblasti *COI* se neobešlo bez komplikací. Některé sekvence obsahovaly nerozlišené nukleotidy a u některých se vyskytovaly nekvalitní začátky. Důvodů může být více. Prvním důvodem může být kontaminace symbiontem, tedy konkrétně *Wolbachia*. Ve studii (Hurst & Jiggins, 2005) dokonce došli k závěru, že detekce *Wolbachia* by měla být u DNA barcodingu založeného na mitochondriálním markeru *COI*

standardem. Avšak jak se ukázalo, sekvence *Wolbachia* (konkrétně její gen *coxA*) vypadá při porovnání s *COI* sekvencí jinak, i když místa nasedání primerů LCO-1490 a HCO-2198 jsou do jisté míry konzervovaná i v sekvenci *coxA*. Dalším důvodem může být kontaminace z prostředí. Chvostoskoci jsou omnivorní živočichové, proto se mohlo stát, že mohli požívat jiného chvostoskoka a došlo tak i k amplifikaci markeru z jiného druhu. Existuje zde i možnost heteroplazmie (existence více mitochondrií v jedné buňce). To že se jedná o rozšířený problém dokládá studie (Kang et al., 2016), která zmiňuje, že heteroplazmie byla zaznamenána u mnoha skupin hmyzu. U chvostoskoků však byla dokumentována jen v tzv. AT-oblasti mitogenomu u druhu *T. bielanensis* (Fanciulli et al., 1991), takže by u genu *COI* byla spíše překvapením. K zodpovězení této otázky by mohlo přispět zaklonování tohoto markeru z problémových vzorků, a prosekvenování většího množství jednotlivých klonů.

Problém s *COI* sekvencemi je zřejmě rozšířeným problémem, protože u datasetu (Porco et al., 2012) bylo nutno vyřadit téměř polovinu sekvencí z důvodu, že sekvence obsahovaly mnoho nerozlišených nukleotidů („N“) nebo kvůli jejich krátké sekvenci – zkrácení se obvykle provádí, pokud jsou 5' a 3' konce chromatogramů nečitelné.

5.5 Genetická variabilita městských a přírodních populací

Různé populace měly většinou stejné převládající haplotypy. U městských populací bylo nalezeno 18 haplotypů a u přírodních 51; tento rozdíl je však dán především počtem vyšetřených vzorků (v urbánním souboru jich bylo 66, zatímco data z přírodních populací získaná z databáze GenBank měla jedinců 211, tedy více než trojnásobek). V celkové populaci bylo zjištěno 52 haplotypů, z čehož vyplývá, že se přírodní a městské haplotypy překrývají. Takové množství haplotypů může odrážet fakt, že některé sekvence obsahovaly nerozlišené nukleotidy a singletony, které mohly způsobit tolik haplotypů.

Rozlišení populací nebylo příliš výrazné, a to ani městských, ani přírodních. Zjištění, že genetická a geografická vzdálenost spolu nekoreluje a na struktuře populací se geografická vzdálenost nepodílí, bylo potvrzeno v podstatě všemi analýzami (dendrogramy, PCoA, AMOVA a IBD - Mantelův test).

Přírodní evropské populace byly převzaty ze studií (Von Saltzwedel et al., 2017) a (Porco et al., 2012). Podle studie (Porco et al., 2012) byly populace *P. notabilis* rozděleny do čtyř genetických linií, které byly označeny za možné kryptické druhy. Studie (Von Saltzwedel et al., 2017) sice na studii (Porco et al., 2012) navazuje, ale jeho data zahrnutá nebyla. I když i zde byly pozorovány výrazně oddělené genetické linie, pozorovaná

genetická variabilita vysvětlována partenogenezí. Proto byly do současné práce zahrnuty přírodní populace z obou předchozích studií. Z dendrogramů evropských přírodních populací je zřejmé, že se nadefinované linie ze studie (Porco et al., 2012) mísí s klastry ze studie (Von Saltzwedel et al., 2017). Z celkového dendrogramu je zřetelné i to, že se mísí přírodní populace s městskými. Otázka, zda se jedná o nedávno rozdělené populace či kryptické druhy tak zůstává stále otevřená.

V daném souboru dat urbánní prostředí genetickou variabilitu *P. notabilis* nijak neovlivnilo, ať už negativně či pozitivně. Předpokládaná fragmentace městských lokalit nevedla ke strukturovanosti populací – buď byly odděleny teprve nedávno, nebo naopak antropogenní činnost umožňuje pasivní šíření chvostoskoků, a tedy i genový tok mezi populacemi. Nebyl také pozorován žádný vliv typu habitatu – odlišnou skupinu tvořily jen populace odebrané z lesíků, ovšem i zde byly nalezeny haplotypy geneticky bližší populacím z jiných habitatů. U městských populací je nutno také brát v úvahu, že vzorkování nebylo rovnoměrné, a celkový počet vyšetřených jedinců rovněž nebyl dostatečný pro robustní biostatistickou analýzu.

6 Závěr

V této práci bylo zjištěno, že přírodní a městské populace chvostoskoka *Parisotoma notabilis* se od sebe příliš neodlišují a městské prostředí zřejmě nemá na genetickou variabilitu tohoto druhu významný vliv. U studovaných populací – jak přírodních, tak městských – nebyla objevena výrazná genetická variabilita mezi populacemi, což může být způsobeno nerovnoměrným vzorkováním, možným výskytem kryptických druhů. Roli může hrát i to, že se jedná o partenogenetický druh. Pravděpodobně se ale populace oddělily nedávno, a proto se nestihly více geneticky oddělit.

V dalších studiích by bylo dobré pracovat s rovnoměrně zastoupenými populacemi, prozkoumat existenci kryptických druhů a zejména nalézt další molekulární markery vhodnější pro tento typ analýzy. Slibně se jeví lokusy *PGM* a *ITS*. Bylo také zjištěno, že všichni testovaní jedinci byli infikováni *Wolbachia* a potvrzeno, že nemá stejnou evoluci s jejími hostitelskými chvostoskoky.

7 Literatura

Allendorf, F. W., & Luikart, G. (2013). *Conservation and the genetics of populations*. Wiley-Blackwell, Chichester.

Alves, L. R., Oliveira, C., & Goldenberg, S. (2015). Eukaryotic translation elongation factor-1 alpha is associated with a specific subset of mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiology*, *15*, 104. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0436-2>

Anslan, S., & Tedersoo, L. (2015). Performance of cytochrome c oxidase subunit I (*COI*), ribosomal DNA Large Subunit (LSU) and Internal Transcribed Spacer 2 (*ITS2*) in DNA barcoding of Collembola. *European Journal of Soil Biology*, *69*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2015.04.001>

Avise, J. C. (2004). *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Sinauer, Sunderland, MA.

Baldo, L., Hotopp, J. C. D., Jolley, K. A., Bordenstein, S. R., Biber, S. A., Choudhury, R. R., Hayashi, C., Maiden, M. C. J., Tettelin, H., & Werren, J. H. (2006). Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(11), 7098–7110. <https://doi.org/10.1128/AEM.00731-06>

Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *16*(1), 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>

Carapelli, A., Comandi, S., Convey, P., Nardi, F., & Frati, F. (2008). The complete mitochondrial genome of the Antarctic springtail *Cryptopygus antarcticus* (Hexapoda: Collembola). *BMC Genomics*, *9*, 315. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-315>

Chahartaghi, M., Langel, R., Scheu, S., & Ruess, L. (2005). Feeding guilds in Collembola based on nitrogen stable isotope ratios. *Soil Biology and Biochemistry*, *37*(9), 1718–1725. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.02.006>

Cicconardi, F., Fanciulli, P. P., & Emerson, B. C. (2013). Collembola, the biological species concept and the underestimation of global species richness. *Molecular Ecology*, *22*(21), 5382–5396. <https://doi.org/10.1111/mec.12472>

Clary, D. O., & Wolstenholme, D. R. (1985). The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of*

Molecular Evolution, 22(3), 252–271. <https://doi.org/10.1007/BF02099755>

Colgan, D., McLauchlan, A., Wilson, G., Livingston, S., Edgecombe, G., Macaranas, J., Cassis, G., & Gray, M. (1998). Histone *H3* and *U2* snRNA DNA sequences and arthropod evolution. *Australian Journal of Zoology - AUST J ZOOL*, 46.

Embong, Z., Wan Hitam, W. H., Yean, C. Y., Rashid, N. H. A., Kamarudin, B., Abidin, S. K. Z., Osman, S., Zainuddin, Z. F., & Ravichandran, M. (2008). Specific detection of fungal pathogens by *18S* rRNA gene PCR in microbial keratitis. *BMC Ophthalmology*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2415-8-7>

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*, 10(3), 564–567.

Fanciulli, P. P., Frati, F., Dallai, R., & Rusek, J. (1991). High genetic divergence among populations of *Tetrodontophora bielanensis* (Insecta, Collembola) in Europe. *Revue d'Ecologie et de Biologie Du Sol*, 28, 165–173.

Fiera, C. (2009). Biodiversity of Collembola in urban soils and their use as bioindicators for pollution. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(8), 868–873. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2009000800010>

Filser, J., Wittmann, R., & Lang, A. (2000). Response types in Collembola towards copper in the microenvironment. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 107(1), 71–78. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(99\)00130-x](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(99)00130-x)

Folmer, O., Black, M., Wr, H., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.

Fountain, M. T., & Hopkin, S. P. (2004). Biodiversity of Collembola in urban soils and the use of *Folsomia candida* to assess soil “quality”. *Ecotoxicology (London, England)*, 13(6), 555–572. <https://doi.org/10.1023/b:ectx.0000037192.70167.00>

Galili, T. (2015). dendextend: An R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*, 31(22), 3718–3720. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv428>

Garrick, R. C., & Sunnucks, P. (2006). Development and application of three-tiered

nuclear genetic markers for basal Hexapods using single-stranded conformation polymorphism coupled with targeted DNA sequencing. *BMC Genetics*, 7(February). <https://doi.org/10.1186/1471-2156-7-11>

Greenslade, P. (1995). Collembola from the Scotia Arc and Antarctic Peninsula including descriptions of two new species and notes on biogeography. *Polskie Pismo Entomologiczne*, 64(1–4).

Haimi, J., & Siira-Pietikäinen, A. (1996). Decomposer animal communities in forest soil along heavy metal pollution gradient. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 354(5), 672–675.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321.

Hillis, D. M., Moritz, C., & others. (1990). Molecular systematics. *Molecular Systematics*, 588.

Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular biology and evolution*. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518–522. <https://doi.org/10.5281/zenodo.854445>

Hopkin, S. P. (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford: Oxford University Press.

Hurst, G. D. D., & Jiggins, F. M. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: The effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1572), 1525–1534. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3056>

ISO. (1999). Soil quality-inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants.: Vol. Rep. No. I.

Ji, Y.-J., Zhang, D., & He, L. (2003). Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes*, 3, 581–585.

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Von Haeseler, A., & Jermini, L. S.

- (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Kang, A. R., Kim, M. J., Park, I. A., Kim, K. Y., & Kim, I. (2016).** Extent and divergence of heteroplasmy of the DNA barcoding region in *Anapodisma miramae* (Orthoptera: Acrididae). *Mitochondrial DNA. Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 27(5), 3405–3414. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1022730>
- Katz, A. D., Taylor, S. J., & Davis, M. A. (2018).** At the confluence of vicariance and dispersal: Phylogeography of cavernicolous springtails (Collembola: Arrhopalitidae, Tomoceridae) codistributed across a geologically complex karst landscape in Illinois and Missouri. *Ecology and Evolution*, 8(20), 10306–10325. <https://doi.org/10.1002/ece3.4507>
- Kotze, J., Venn, S., Niemelä, J., & Spence, J. (2011).** Effects of urbanization on the ecology and evolution of arthropods. *Urban Ecology, Patterns, Processes and Applications*. Oxford University Press, New York, 159–166.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018).** MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuznetsova, N. A., & Potapov, M. B. (1997).** Changes in structure of communities of soil springtails (Hexapoda: Collembola) under industrial pollution of the south-taiga bilberry pine forests. *Russian Journal of Ecology*, 28(6), 386–392.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015).** POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Loxdale, H. D., & Lushai, G. (1998).** Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 88(6), 577–600. <https://doi.org/10.1017/s0007485300054250>
- Lubbock, J. (1873).** *Monograph of the Collembola and Thysanura*. Ray Society.
- Ma, Y., Chen, W. J., Li, Z. H., Zhang, F., Gao, Y., & Luan, Y. X. (2017).** Revisiting the phylogeny of *Wolbachia* in Collembola. *Ecology and Evolution*, 7(7), 2009–2017. <https://doi.org/10.1002/ece3.2738>
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015).** IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies.

Molecular Biology and Evolution, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

O'Neill, S. L., Giordano, R., Colbert, A. M., Karr, T. L., & Robertson, H. M. (1992). 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), 2699–2702. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2699>

Pačes, V. (1999). Bakteriální genomika: úspěch za úspěchem. Molekulární podstata symbiózy hlíst a bakterie. *Vesmír*, 78(4), 195–196.

Paradis, E., & Schliep, K. (2018). ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35(3), 526–528. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>

Park, K. H. (2009). Molecular biological study on speciation and phylogeny of the order Entomobryomorpha (Collembola: Hexapoda). *Entomological Research*, 39(5), 334–340. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2009.00241.x>

Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>

Porco, D., Potapov, M., Bedos, A., Busmachiu, G., Weiner, W. M., Hamra-Kroua, S., & Deharveng, L. (2012). Cryptic Diversity in the Ubiquist Species *Parisotoma notabilis* (Collembola, Isotomidae): A Long-Used Chimeric Species? *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046056>

Potapov, A., Bellini, B., Chown, S., Deharveng, L., Janssens, F., Kováč, L., Kuznetsova, N., Ponge, J.-F., Potapov, M., Querner, P., Russell, D., Sun, X., Zhang, F., & Berg, M. (2020). Towards a global synthesis of Collembola knowledge: challenges and potential solutions. *Soil Organisms*, 92(3), 161–188. <https://doi.org/10.25674/so92iss3pp161>

Priessnitz, J. (2008). Testy únikového chování v půdní ekotoxikologii [online]. Dostupné

Rambaut, A. (2009). FigTree v1.4.4. In *Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology*.

Richardson, B. J. (Barry J. (1986). *Allozyme electrophoresis a handbook for animal systematics and population studies* (P. R. (Peter R. Baverstock & M. (Mark) Adams (eds.)) [Book]. Academic Press.

- Roberts, J. M. K., & Weeks, A. R. (2011).** Genetic structure and long-distance dispersal in populations of the wingless pest springtail, *Sminthurus viridis* (Collembola: Sminthuridae). *Genetics Research*, 93(1), 1–12. <https://doi.org/10.1017/S0016672310000510>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sanchez-Gracia, A. (2017).** DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- RStudio Team. (2020).** *RStudio: Integrated Development Environment for R*. <http://www.rstudio.com/>
- Salmon, J. T. (1941).** *The collembolan fauna of New Zealand, including a discussion of its distribution and affinities*.
- Santorufu, L., Cortet, J., Nahmani, J., Pernin, C., Salmon, S., Pernot, A., Morel, J. L., & Maisto, G. (2015).** Responses of functional and taxonomic collembolan community structure to site management in Mediterranean urban and surrounding areas. *European Journal of Soil Biology*, 70, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2015.07.003>
- Simon, C., Buckley, T. R., Frati, F., Stewart, J. B., & Beckenbach, A. T. (2006).** Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 545–579. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110018>
- Simonsen, V., & Christensen, P. G. (2001).** Clonal and genetic variation in three collembolan species revealed by isozymes and randomly amplified polymorphic DNA. *Pedobiologia*, 45(2), 161–173. <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00077>
- Suhardjono, Y. R., & Greenslade, P. (1994).** *Folsomides arnoldi* n. sp. (Isotomidae): a new collembolan abundant in arid Australia, with a redescription of *Folsomides denisi* (Womersley). *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 114(1–4), 21–27. <http://biostor.org/reference/68613>
- Takashi, S. C. (2015).** Universal Primers for Exon-Priming Intron-Crossing (EPIC) PCR on Ribosomal Protein Genes in Marine Animals. *Journal of Marine Science: Research & Development*, 05(02). <https://doi.org/10.4172/2155-9910.1000160>

Tanganelli, V., Fanciulli, P. P., Nardi, F., & Frati, F. (2013). Molecular phylogenetic analysis of a novel strain from Neelipleona enriches Wolbachia diversity in soil biota. *Pedobiologia*, 57(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2013.08.004>

Teets, N. M., & Denlinger, D. L. (2014). Surviving in a frozen desert: Environmental stress physiology of terrestrial Antarctic arthropods. *Journal of Experimental Biology*, 217(1), 84–93. <https://doi.org/10.1242/jeb.089490>

Tidow, H., & Nissen, P. (2013). Structural diversity of calmodulin binding to its target sites. *The FEBS Journal*, 280(21), 5551–5565. <https://doi.org/10.1111/febs.12296>

Timmermans, M. J. T. N., Mariën, J., Roelofs, D., Van Straalen, N. M., & Ellers, J. (2004). Evidence for multiple origins of Wolbachia infection in springtails. *Pedobiologia*, 48(5–6), 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2004.07.008>

Von Saltzwedel, H., Scheu, S., & Schaefer, I. (2017). Genetic structure and distribution of *Parisotoma notabilis* (Collembola) in Europe: Cryptic diversity, split of lineages and colonization patterns. *PLoS ONE*, 12(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170909>

Werren, J., Baldo, L., & Clark, M. (2008). Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Micro* 6: 741-751. *Nature Reviews. Microbiology*, 6, 741–751. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>

Wilkinson, S. P., & Davy, S. K. (2018). phylogram: an R package for phylogenetic analysis with nested lists. *Journal of Open Source Software*, 3(26), 790. <https://doi.org/10.21105/joss.00790>

Zhou, W., Rousset, F., & O'Neill, S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265(1395), 509–515. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0324>

Internetové zdroje:

<https://www.boldsystems.org/index.php>

<https://collembola.co.za/parisotoma-notabilis/>

<https://www.google.com/maps/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

<https://pubmlst.org/>

<https://www.orthodb.org/>

8 Přílohy

Příloha 1: Seznam použitých *COI* sekvencí včetně lokalit sběru s kódy z GenBanku (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Země	Lokalita	Zkratka	Souřadnice	GenBank kód
<i>Bulharsko</i>	Bosnek	BG	42,50N; 23,17E	KJ792225-9
<i>Německo</i>	Uelzen	DE1	52,93N; 10,61E	KJ792263-7
	Norden	DE2	53,58N; 7,24E	KJ792268-71
	Solling, Neuhaus	DE3	51,71N; 9,64E	KJ792272-6
<i>Dánsko</i>	Humlebaek	DK	55,96N; 12,53E	KJ792235-9
<i>Španělsko</i>	Oviedo	ES1	43,36N; 6,00W	KJ792324-6
	Ponga	ES2	43,19N; 5,16W	KJ792327-31
<i>Francie</i>	Voegtlinshoffen	FR1	48,02N; 7,27E	KJ792240-3
	Salavas	FR2	44,39N; 4,37E	KJ792249-53
	Chartreuse	FR3	45,42N; 5,81E	KJ792254-8
	Rambouillet	FR4	48,62N; 1,86E	KJ792259-62
	Korsika, Olmi-Capella	FR5	42,52N; 9,02E	KJ792244-8
<i>Velká Británie</i>	Melrose	GB1	55,59N; 2,72W	KJ792309-13
	Island of Arran	GB2	55,58N; 5,21W	KJ792314-8
<i>Řecko</i>	Chrysovitsi	GR	37,56N; 22,20E	KJ792282-6
<i>Chorvatsko</i>	Sljeme	HR	45,90N; 15,95E	KJ792230-4
<i>Itálie</i>	Felitto	IT	40,37N; 15,22E	KJ792287-90
<i>Norsko</i>	Rod	NO1	59,07N; 10,23E	KJ792291-4
	Skjervemoen, FössaÖst	NO2	59,45N; 10,07E	KJ792295-8
<i>Srbsko</i>	Sreckovac	RS	43,03N; 22,69E	KJ792319-23
<i>Rusko</i>	Petrozavodsk, Karelia	RU1	61,77N; 34,22E	KJ792299-303
	Znamenskoe	RU2	55,73N; 37,18E	KJ792304-8
<i>Slovinsko</i>	Postojna	SI	45,76N; 14,21E	KJ792332-4
<i>Turecko</i>	Kayseri	TR	38,67N; 35,53E	KJ792335-9
<i>Ukrajina</i>	Kubalach, Crimea	UA	45,00N; 34,82E	KJ792340-4

Příloha 2: Seznam použitých *COI* sekvencí včetně lokalit sběru s kódy z GenBanku

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Země	Lokalita	Počet vzorků	Zkratka	Souřadnice	GenBank kód
<i>Francie</i>	Drome, Verclause	2	L_FR1_1	44,38N; 5,45E	JQ935095
			L_FR1_2		JQ935094
	Pas-de-Calais, Wimereux	4	L_FR2_1	50,77N; 1,62E	HQ559494
			L_FR2_2		HQ559493
			L_FR2_3		HQ559490
			L_FR2_4		HQ559489
	Paris	31	L_FR3_1	48,84N; 2,35E	JQ935147
			L_FR3_2		JQ935146
			L_FR3_3		JQ935143
			L_FR3_4		JQ935140
			L_FR3_5		JQ935135
			L_FR3_6		JQ935134
			L_FR3_7		JQ935132
			L_FR3_8		JQ935125
			L_FR3_9		JQ935123
			L_FR3_10		JQ935121
			L_FR3_11		JQ935110
			L_FR3_12		JQ935109
			L_FR3_13		JQ935138
			L_FR3_14		JQ935106
			L_FR3_15		JQ935105
			L_FR3_16		JQ935054
			L_FR3_17		JQ935048
			L_FR3_18		JQ935040
			L_FR3_19		GQ373667
			L_FR3_20		JQ935203
			L_FR3_21		JQ935200
			L_FR3_22		JQ935201
			L_FR3_23		JQ935199
			L_FR3_24		JQ935198
			L_FR3_25		JQ935197
			L_FR3_26		JQ935196
			L_FR3_27		JQ935195
			L_FR3_28		JQ935194
			L_FR3_29		JQ935193
			L_FR3_30		JQ935192
			L_FR3_31		JQ935191
	Pyrenees-Orientales, Corsavy	7	L_FR4_1	42,48N; 2,55E	GU656418
			L_FR4_2		GU656419
			L_FR4_3		GU656420
			L_FR4_4		GU656421

			L_FR4_5		GU656422
			L_FR4_6		GU656423
			L_FR4_7		HM397729
	Pyrenees-Orientales, L'Albere	4	L_FR5_1	42,46N; 2,88E	GU656408
			L_FR5_2		GU656409
			L_FR5_3		GU656410
			L_FR5_4		GU656411
	Pyrenees-Orientales, Les Cluses	5	L_FR6_1	42,48N; 2,85E	JQ935089
			L_FR6_2		JQ935086
			L_FR6_3		JQ935080
			L_FR6_4		JQ935079
			L_FR6_5		JQ935038
	Pyrenees-Orientales, Mosset	5	L_FR7_1	42,67N; 2,29E	HQ942680
			L_FR7_2		HQ942682
			L_FR7_3		HQ942683
			L_FR7_4		HQ942684
			L_FR7_5		HQ942685
	Ariege, Le Port	1	L_FR8_1	42,84N; 1,39E	HM398181
	Haute-Garonne, Toulouse	5	L_FR9_1	43,60N; 1,46E	JN298130
			L_FR9_2		JN298131
			L_FR9_3		JN298132
			L_FR9_4		JN298133
			L_FR9_5		JN298134
	Hautes-Pyrenees, Tarbes	5	L_FR10_1	43,24N; 0,07E	JN298125
			L_FR10_2		JN298126
			L_FR10_3		JN298127
			L_FR10_4		JN298128
			L_FR10_5		JN298129
	Savoie, Saint-Jeans-de-Couz	2	L_FR11_1	45,47N; 5,82E	JQ935161
			L_FR11_2		JQ935186
<i>Německo</i>	Hamburg, Blankenese	8	L_DE_1	53,57N; 9,80E	JQ935027
			L_DE_2		JQ935028
			L_DE_3		JQ935029
			L_DE_4		JQ935030
			L_DE_5		JQ935031
			L_DE_6		JQ935032
			L_DE_7		JQ935010
			L_DE_8		JQ935019
<i>Itálie</i>	Siena, Vagliali	1	L_IT1_1	43,41N; 11,35E	JQ935100
	Verona, Erbezzo	1	L_IT2_1	45,64N; 11,00E	JQ935179
<i>Moldávie</i>	Rezina	2	L_MD1_1	46,67N; 29,60E	JQ935099
			L_MD1_2		JQ935097
	Baius	2	L_MD2_1	46,46N; 28,48E	JQ935098
			L_MD2_2		JQ935093
<i>Nizozemsko</i>	Zutphen	1	L_NE_1	52,15N; 6,23E	JQ935013
<i>Polsko</i>	Tatra Mts, Mala Laka valley	1	L_PO_1	49,28N; 19,90E	JQ935180

<i>Slovinsko</i>	BohinjskaBistrica	1	L_SL_1	46,27N; 13,95E	JQ935176
<i>Španělsko</i>	Catalonia, Gerona	6	L_ES1_1	42,42N; 2,79E	JN298119
			L_ES1_2		JN298120
			L_ES1_3		JN298121
			L_ES1_4		JN298122
			L_ES1_5		JN298123
			L_ES1_6		JN298124
	Navarra, Aritzikuren	1	L_ES2_1	42,82N; 1,64E	HQ559271
<i>Velká Británie</i>	England, Hampshire	1	L_GB_1	50,93N; 1,52E	JQ935022

Příloha 3: Seznam použitých sekvencí *Wolbachia* z GenBanku a z databáze PubMLST

(<https://pubmlst.org/>).

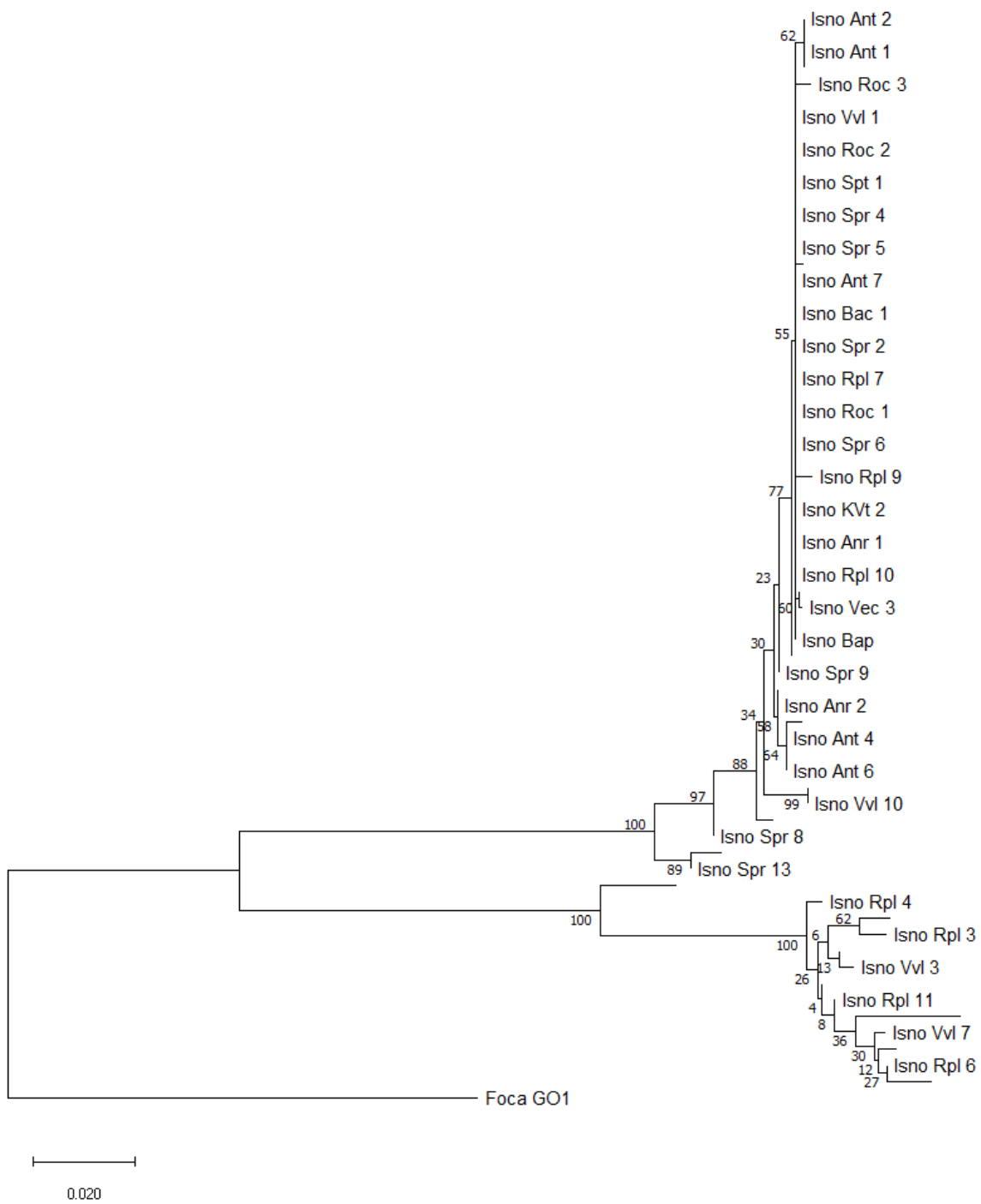
	16S	coxA	fbpA	ftsZ	gatB	hcpA
<i>Folsomia candida DK</i>	KT799585	KT799590	KT799595	KT799600	KT799605	KT799610
<i>Folsomides parvulus</i>	KT799586	KT799591	KT799596	KT799601	KT799606	KT799611
<i>Thalassaphorura houtanensis</i>	KT799587	KT799592	KT799597	KT799602	KT799607	KT799612
<i>Mesaphorura yosii</i>	KT799588	KT799593	KT799598	KT799603	KT799608	KT799613
<i>Megalothorax incertus</i>	KT799584	KT799589	KT799594	KT799599	KT799604	KT799609
<i>Zootermopsis nevadensis</i>	AY764280	207 (staženo z PubMLST)				

Příloha 4: Seznam partenogenetických chvostoskoků infikovaných *Wolbachia*, sekvence

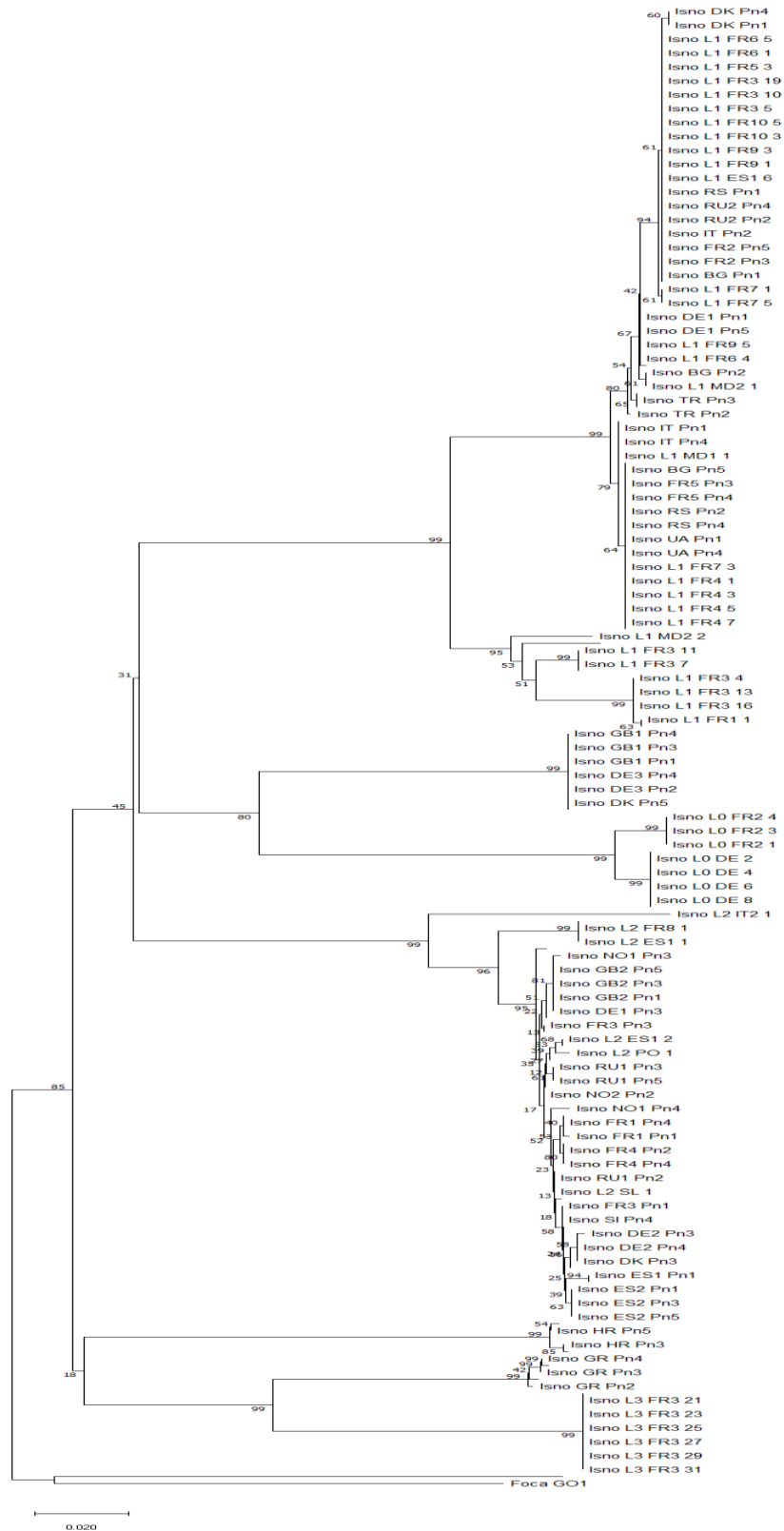
staženy z GenBanku (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

	mtCOI	18SrRNA	28SrRNA
<i>Folsomia candida</i>	JN981072	KT799625	KT799630
<i>Parisotoma notabilis</i>	JN970935	JN981038	JN981064
<i>Folsomides parvulus</i>	JN981069	KT799626	KT799631
<i>Thalassaphorura houtanensis</i>	KT799635	KT799627	KT799632
<i>Mesaphorura yosii</i>	KT799636	KT799628	KT799633
<i>Neelus incertus</i>	KT799634	KT799624	KT799629
<i>Baculentulus tianmushanensis</i>	HQ882817	AY037169	AF416872

Příloha 5: Dendrogram pro městské vzorky z Košic (Neighbour – Joining, Kimura 2 – Parametr, Pairwise deletion, Bootstrap 1000x). Strom zakořeněn pomocí chvostoskoka *Folsomia candida*. Zkratky lokalit jsou uvedeny v tabulce (Tab. I).



Příloha 6: Dendrogram pro přírodní vzorky z Evropy (Neighbour – Joining, Kimura 2 – Parametr, Pairwise deletion, Bootstrap 1000x). Strom zakořeněn pomocí chvostoskoka *Folsomia candida* a *Folsomia manolachei*. Zkratky lokalit jsou uvedeny v přílohách (Příloha 1 a 2).



Příloha 7: Dendrogram pro přírodní i městské vzorky (Neighbour – Joining, Kimura 2 – Parametr, Pairwise deletion, Bootstrap 1000x). Strom zakoreněn pomocí chvostoskoka *Folsomia candida* a *Folsomia manolachei*. Zkratky lokalit jsou uvedeny v přílohách (Příloha 1 a 2) a v tabulce I.

