

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Genetická variabilita izolovaných populací tyrfobiontní můry
***Lithophane lamda* (Lepidoptera: Noctuidae) na jihočeských**
rašeliništích

Bakalářská práce

Jindřiška Tomášková

Školitel: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.

Školitel specialista, konzultant: Ing. Aleš Bezděk Ph.D.

České Budějovice 2014

Bakalářská práce

Tomášková, J. 2014: Genetická variabilita izolovaných populací tyrfobiontní můry *Lithophane lamda* (Lepidoptera: Noctuidae) na jihočeských rašeliništích [Genetical variability of tyrphobiont moths' isolated populations *Lithophane lamda* (Lepidoptera: Noctuidae). Bc.Thesis, in Czech] Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 54 pp.

Annotation

Molecular markers were tested for their potential to be used to perform population genetic analysis at peatbogs moths *Lithophane lambda*. Mitochondrial markers *AT*, *ND5* and nuclear *TPI* were successfully amplified and sequenced. Consequently, these sequences were used for genetic analysis of natural populations of *Lithophane lambda*. All the markers showed very low variability, suggesting thus either demographic effect (bottleneck) or selection.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích, 1. 12. 2014

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce Martině Žurovcové za odborné vedení, řadu cenných rad a poskytnutí zázemí při zpracovávání mé práce. Dále svému konzultantovi Aleši Bezděkovi za poskytování veškerého analyzovaného materiálu a odborné rady týkající se problematiky studovaného motýla. Poděkování patří také Daniele Chundelové a Andree Jarošové za jejich pomoc a trpělivost, především v začátcích práce, ale i kdykoli během celého studia. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Lucii Faktorové a Aničce Sattranové za všechny jejich rady a připomínky, ale také za vytvoření příjemné atmosféry v laboratoři. Velké díky patří i mé rodině a kamarádům, za jejich podporu během celého studia.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Rašeliniště	1
1.2	Tyrfobiontní druhy	2
1.3	Tyrfofilní druhy	3
1.4	Tyrfoneutrální druhy	3
1.5	Modelový druh <i>Lithophane lamda</i>	4
1.6	Studované lokality	5
1.6.1	Červené blato	5
1.6.2	Mrtvý luh	6
1.6.3	Jezerní slat'	7
1.6.4	Velká niva	8
1.6.5	Libořezy	9
1.7	Molekulární markery	10
1.7.1	Jaderné markery	10
1.7.1.1	Internal transcribed spacer (<i>ITS</i>)	10
1.7.1.2	EPIC	11
1.7.1.2.1	Triose-phosphate isomerase (<i>TPI</i>)	11
1.7.2	Mitochondriální markery	11
1.7.2.1	<i>AT</i> – rich	11
1.7.2.2	<i>ATP</i> oblast	12
1.7.2.3	Oblast <i>ND5</i>	12
1.7.2.4	Oblast <i>ND4</i>	12
2	Cíl práce	13
3	Materiál a metody	14
3.1	Materiál	14
3.2	Extrakce DNA	15

3.2.1	Izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)	15
3.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	15
3.3.1	Primery pro amplifikaci vybraných oblastí genomu	15
3.3.2	PCR profil k amplifikaci jednotlivých fragmentů	18
3.4	Gelová elektroforéza.....	18
3.5	Přečištění vzorku pomocí metody ExoSap.....	19
3.6	Sekvenování	19
3.7	Statistické zpracování sekvencí.....	20
4	Výsledky.....	21
4.1	Genetická variabilita markerů	21
4.2	Genetická variabilita populací.....	22
4.3	Genetická diverzita populací	25
5	Diskuze	36
5.1	Izolace DNA a metodika PCR.....	36
5.2	Testované markery	36
5.2.1	Mitochondriální marker <i>AT</i>	36
5.2.2	Mitochondriální marker <i>ND5</i>	37
5.2.3	Nukleární marker <i>TPI</i>	37
5.3	Genetická variabilita populací.....	37
5.4	Genetická diverzita populací	38
6	Závěr.....	40
7	Literatura	41
8	Přílohy	47

1 Úvod

Motýli (Lepidoptera) tvoří společně s brouky (Coleoptera) a dvoukřídlymi (Diptera) tři nejpočetnější řády hmyzu. Housenky motýlů mají dobře vyvinutou hlavu s kousacím ústním ústrojím. Na hrudi se nachází 3 páry končetin. Dále mají 2 až 8 párů panožek. Většina housenek jsou býložravci, kteří se živí například listy nebo stonky rostlin. Dospělci jsou charakterističtí přítomností dvou párů širokých blanitých křídel, která jsou pokryta šupinkami. Tyto šupinky často vytvářejí rozlišné barevné vzory, jež hrají důležitou roli jednak v namlouvání opačného pohlaví, jednak ve vnitrodruhovém rozpoznání.

Z praktického a historického hlediska se používá dělení motýlů na tzv. noční (Heterocera) a denní (Rhopalocera). Ovšem z taxonomického pohledu jde o rozdělení čistě umělé a neodpovídá fylogenetickým vztahům uvnitř celého řádu. Zpravidla jsou denní motýli hmyz s jasně zbarvenými křídly. Pokud jsou motýli v klidu, mají křídla svisele přiložená k tělu. Naopak noční motýli jsou spíše noční tvorové fádňiho vzhledu. Tykadla mohou být nitkovitá, větvenovitá nebo hřebenovitá. Křídla nočních motýlů jsou ve vodorovné poloze nebo mohou být sklopená nad hřbetem či stočená kolem jejich těla (<http://www.cals.ncsu.edu/>). V obecné češtině se pro noční motýly vžilo označení můry, což neodpovídá českému vědeckému názvosloví, kde je termín můra vyhrazen pouze pro zástupce čeledi můrovití (Noctuidae).

1.1 Rašeliniště

Fragmentace přírodních stanovišť je obecně považována za hlavní hrozbu pro mnoho druhů. Teorie populační genetiky předpovídá, že pokud dojde k izolaci malých populací, může to vést ke snížení genetické rozmanitosti (Frankham *et al.* 2002). Zvláště důležité je to pro druhy, které mají omezenou schopnost rozptýlit se na jiná stanoviště. Tyto izolace pak mohou mít za následek značné rozdíly mezi populacemi. V důsledku hodnocení rozsahu izolace stávajících populací a jejich genetické rozmanitosti hraje hlavní roli při posuzování rizika vyhynutí hrozícím taxonům (Kajtoch, 2011). Díky tomu vznikla síť chráněných oblastí podle směrnice o stanovištích Evropské unie. Avšak pouze malá část ohrožených rostlin a živočichů je chráněna místním nebo evropským zákonem (Kajtoch *et al.* 2013).

Všechna středoevropská rašeliniště, která nebyla výrazně ovlivněna lidskou činností, lze považovat za tzv. paleorefugia (tedy starobylá místa, kde přežívají specifické organismy) a stanoviště představují jednu z priorit ochrany krajiny (Nekola, 1999; Nekola a Kraft, 2002).

Od počátku holocénu jsou střeoevropská rašeliniště unikátní ekosystémy, která přetrvávají jednak ve zhruba stejné míře, ale i na stejných místech (Neuhäusel, 1972; Janovská, 1995; Rydin a Jeglum, 2006). Biodiverzita hmyzu, které se nalézají na rašeliništích je určena výskytem určité vegetace nacházející se v izolovaném prostředí. To je ovlivněno mikroklimatem a složitým systémem mikrostanovišť. Fragmentované populace žijící v těchto podmínkách mají omezené možnosti, aby měnily své stanoviště (Spitzer a Danks, 2006; Turlure *et al.* 2010; Henrikson, 2006).

Mnoho živočichů žijících na rašeliništích, zvláště pak tyrfobiontní druhy mají specifické požadavky na podmínky k přežití. Těmi jsou například kyselé a na živiny chudé prostředí či rostliny typické pro rašeliniště apod. Výsledkem je, že rašeliniště vytvářejí charakteristické „ostrovní“ biotopy v krajině. Některé tyto ostrůvky jsou velmi staré a pocházejí z periglaciálního období nebo z holocénu (12 000 až 13 000 let), kdy podnebí bylo mnohem chladnější.

Specifičnost hmyzu na těchto starobylých a oddělených ostrůvcích je předmětem zájmu výzkumu. Izolovaná evropská rašeliniště obývá mnoho druhů členovců, které pak lze najít už pouze v biomech subarktické lesotundry.

Rašeliniště v holarktické oblasti mají speciální přírodní předpoklady, které jsou nezbytné pro přežití ojedinělých populací hmyzu, jenž se adaptoval na chladnější podnebí.

Diverzita hmyzu vyskytujících se na rašeliništích je interpretována hlavně ekologickými skupinami na základě detailního faunistického a biogeografického zkoumání pro dobře známé taxony. Tyto ekologické skupiny byly prvně formulovány Peusem (1928, 1932) pro faunu střední Evropy a Krogerusem (1960) pro skandinávskou faunu. Krogerus sice použil jinou obecnější terminologii než Peus a jeho následovníci, nicméně oba systémy jsou podobné a slučitelné.

Podle Peuse systém tvoří čtyři základní ekologické kategorie rašeliništní entomofauny: a) tyrfobiontní druhy (tedy druhy výlučně vázané na rašeliniště), b) tyrfofilní druhy (dávají rašeliništím přednost), c) tyrfoneutrální druhy (vyskytují se zde, ale stejně tak jsou i v jiných typech biotopů) a d) tyrfoxenní druhy (vyhýbají se rašeliništím) (viz také Spitzer a Danks, 2006).

1.2 Tyrfobiontní druhy

Tyrfobiontní druhy se vyskytují v jižním boreálním a mírném pásu holarktické oblasti výhradně na rašeliništích a mimo rašeliniště nemohou přežívat. Nicméně platí, že v nejižnějším mírném pásu těchto stanovišť se vyskytuje tyrfobiontních druhů méně než na severu. Důležité jsou ekologické požadavky pro tento hmyz, jako jsou nízké teploty a

dostatek vody (Reichle, 1966). Někteří tyrfobionti se živí pouze rostlinami, které jsou charakteristické pro rašeliniště (Holman, 1996; Spitzer *et al.* 1991, 2003). Například nedávno objevená monofágní mšice *Symydobius nanea* je výhradně vázaná na břízu *Betula nana*. Jiné druhy mšic a housenky některých motýlů se živí na listech *Vaccinium uliginosum*, *Ledum palustre*, *Andromeda polifolia* apod. Vysoce specifictí tyrfobionti se vyskytují u vodního hmyzu. Ti vytvářejí izolovaná společenstva žijící ve velmi kyselé vodě a nízkým obsahem živin. Většina z těchto druhů jsou dravci, třeba vážky rodu *Somatochlora* nebo *Aeshna subarctica*, některé stenotopné ploštice rodu *Notonecta* a další hmyz. Izolované tyrfobiontní populace představují endemické taxony (někdy formálně klasifikované na úrovni poddruhů), které jsou jedinečné pro každou lokalitu. Například izolované populace můry *Coenophila subrosea* ukazují genetickou a geografickou obměnu. Zdá se, že mezi terestrickými hmyzími predátory a parazitoidy je mnohem méně zástupců tyrfobiontů, např. střevláci *Carabus menetriesii* a *Agonum ericeti* nebo některé druhy mravenců (Spitzer a Danks, 2006).

1.3 Tyrfofilní druhy

Tyrfofilních druhů je rozmanitá škála a vyskytují se na všech rašeliništích, ale nejsou s nimi výhradně spojeny. Obecně platí, že jejich abundance je na rašeliništích vyšší než na okolních biotopech. V mírném pásmu se kromě rašelinišť vykazují také v jiných typech mokřadů, na vřesovištích, kyselých vlhkých loukách a v horských lesích. Nejpočetnější jsou pochopitelně na rašeliništích, kde tyto druhy slouží jako indikátory nadcházejících změn. Byla shromážděna komplexní data na základě toho, čím se živí a z hlediska dlouhodobých populačních změn na různých stanovištích rašelinišť. Mezi dobře známé tyrfofilní motýly patří například *Sterrhopterix standfussi* (Psychidae), *Callophrys rubi* (Lycaenidae), *Clossiana euphrosyne* (Nymphalidae), *Itame brunneata*, *Eulithis testata* (oba z čeledi Geometridae), *Syngrapha interrogations* a *Papestra biren* (oba z čeledi Noctuidae) (Spitzer a Danks, 2006).

1.4 Tyrfoneutralní druhy

Tyrfoneutralní druhy jsou široce rozšířeny na různých stanovištích včetně rašelinišť. Jejich abundance na rašeliništích je stejná jako na okolních vhodných biotopech. Z důvodu pokračujícího ničení přírodní krajiny v mírném pásmu lidskou činností došlo k poklesu počtu tyrfoneutralního hmyzu, zahrnující mnoho skupin brouků, motýlů a můr, které byly pozorovány ještě před několika lety. Zajímavostí je, že některé z těchto druhů dnes přežívají už pouze na rašeliništích. Tento fenomén popsali Pax (1916) a Peus (1932) pod názvem

“Kulturflüchter”, což by se dalo volně přeložit jako „utečenec před civilizací“. Tyto druhy byly vytlačeny z většiny svého původního areálu výskytu a můžeme je dnes najít skoro výhradně na rašeliništích (Nekola, 1999). Příkladem “Kulturflüchter” je můra *Phyllodesma ilicifolia*, jejíž areál výskytu v Čechách se výrazně omezil. V minulosti byla tato můra rozšířena i mimo území rašelinišť v oblastech s výskytem smíšených lesů (Spitzer a Danks, 2006).

Jako první, kdo zkoumali genetickou variabilitu motýlů na třech rašeliništích ve střední Evropě, byli Šula a Spitzer (2000). Ti prováděli výzkum na můře *Coenophila subrosea* (Noctuidae), a to pomocí proteinových markerů (allozymů). Měli snahu vyvinout účinnou strategii, aby byly k dispozici informace nejen o jejich morfologické, ale i genetické variabilitě, jelikož doposud nejsou žádná data o populacích vyskytujících se na těchto rašeliništích. Došli k závěru, že zde nebyl žádný zjevný vztah mezi genetickou a geografickou vzdáleností u izolovaných populací. Tento vztah byl zaznamenán pouze v případě různého zbarvení křídel. Nejpravděpodobnější tedy je, že tyto populace se rozdělily již na začátku období holocénu. Charakteristiky morfometrického tvaru předních křídel a různé variace enzymů podporují hypotézu vysoké specifčnosti pro každou populaci nacházejících se na izolovaných rašeliništích (Šula a Spitzer, 2000).

Dalšími, kteří se zabývali obdobným studiem motýlů na rašeliništích, byli Néve *et al.* (2009). Ti věnovali svou pozornost spontánní ztrátě genetické rozmanitosti u perleťovce *Proclossiana eunomia* (Nymphalidae). V případě, že zaniknou jejich původní stanoviště, mají tendenci najít si nová vhodná prostředí k přežití. Tím pak dochází k tomu, že taková populace pak slouží jako zdroj nových kolonií. Jasný genetický vliv kolonizace je patrný na Šumavě. Silnou izolaci vzdáleností lze pozorovat jako výsledek znásobení účinku zakladatelů kolonií. Zjistili, že zakládající populace se opakovaně vyskytuje na nově vzniklých územích a samy o sobě již podléhají vysokému genetickému driftu. Výsledná genetická obměna, alespoň v allozymech, je pak více snížena u nově vzniklých kolonií. Snížená genetická různorodost dále také vzniká prostřednictvím řady expanzí u běžně se vyskytujících druhů, které mají malé ekologické požadavky (Néve *et al.* 2009).

1.5 Modelový druh *Lithophane lamda*

Rod *Lithophane* (Lepidoptera: Noctuidae) je početný rod, který zahrnuje více než 40 druhů v nearktické oblasti a 25 druhů v palearktu. Většina druhů je vázaných na podhorské a horské lesy, případně tundru. Všechny druhy rodu *Lithophane* jsou univoltinní (mají jedinou generaci do roka), dospělé můry jsou aktivní pozdě na podzim a brzy na jaře. V jižněji položených oblastech mohou dospělé můry aktivně létat přes celou zimu. Ke kladení vajíček

dochází na jaře nebo v časném létě. Housenky se živí listy dvouděložných rostlin, méně často nahosemennými rostlinami (Ronkay *et al.* 2001). *Lithophane lamda* je jediným palearktickým zástupcem rodu *Lithophane* sktriktně vázaným svým výskytem na rašeliniště (tzv. tyrfobiont). Areál jejího výskytu je široký, jde o boreálně-subarktický druh, který se nachází především na rašeliništích severní Evropy a severní Asie. Ve střední Evropě je velmi lokální, typická pro horská a nížinná rašeliniště. V rámci České republiky je známá pouze z přechodových rašelinišť třeboňské pánve (Libořezy a Červené Blato) (Povolný *et al.* 1965; Spitzer a Jaroš, 1993) a ze Šumavy, odkud je udávána hned z několika rašelinišť (např. Chalupská Slat', Jezerní Slat', Mrtvý Luh, Velká Niva, Knížecí Pláně) (Novák a Spitzer, 1972; Šumpich, 2008; Jaroš *et al.* 2014). Existují i dekádové kusy z dářských rašelinišť ve Žďárských vrších, které se ovšem už nepodařilo v poslední době potvrdit. V okolních státech (Rakousko a Německo) je její rozšíření následující. Z Rakouska je spolehlivě známá pouze z rašeliniště Bayerische Au (Malicky *et al.* 2000), které patří do komplexu šumavských rašelinišť. Starší nálezy z pomezí Horního a Dolního Rakouska nebyly v posledních letech potvrzeny. V Německu se tento druh vyskytuje hojněji pouze na severu země v Dolním Sasku (okolí Brém a Hamburku) a také v Meklenburku – Předním Pomořansku. Izolovaný výskyt byl ještě prokázán z okolí Weidenu, což je lokalita ležící nedaleko hranic západočeského kraje (Hacker a Müller, 2006). Housenka *Lithophane lamda* žije ve střední Evropě především na *Vaccinium uliginosum*, v jiných areálech svého výskytu byla také pozorována na *Ledum palustre*, *Myrica gale*, případně na *Betula*, *Alnus* a *Salix* (Ronkay *et al.* 2001).

Mým úkolem bylo přispět k těmto výzkumům, tedy provést analýzu vybraného modelového organismu v obdobném rašeliništním terénu, ale s použitím DNA markerů.

1.6 Studované lokality

1.6.1 Červené blato

Jedná se o přechodové oligotrofní rašeliniště o rozloze 331,4 ha ležící nedaleko obce Šalmanovice v okrese Jindřichův Hradec (Obr. 1). Nachází se v nadmořské výšce 460 – 470 m n. m. Klimatické podmínky jsou mírně teplé, mírně vlhké a průměrná roční teplota se pohybuje kolem 7 °C. O jeho vznik se zasloužilo zarůstání přirozené sníženiny terénu a dodnes je živeno spodní vodou. Předpokládá se, že vzniklo koncem doby ledové a jeho stáří se tedy odhaduje na 10 – 12 000 let. Zpočátku zde převládaly keřovité vrby, které později nahradily formace *Scheuchzerio – Caricetae fusceae*, s bohatě vyvinutým mechovým patrem. V období

mladších čtvrtohor došlo k oteplení a to způsobilo rozvoj vodní vegetace a zarůstání mnohých jezer. Nejvíce se zde rozšířil druh *Betula nana* a na počátku boreálu vzrostl význam keříčkovitých společenstev třídy *Oxycocco – Sphagnetea*. Velký vliv na vývoj rašeliniště měla jeho těžba v době, kdy byla založena sklárna v blízké osadě Jiříkovo Údolí. Borovice blatka *Pinus rotundata* je zde dominantní rostlinou, která se vyskytuje v různých formacích a to jak v původních nestejnověkých, tedy pralesního charakteru, tak i ve stejnověkých. Entomofauna není dostatečně známa, studovány zatím byly hlavně dva řády hmyzu – Coleoptera (Carabidae) a Lepidoptera (Spitzer *et al.* 1999)



Obr. 1: Oligotrofní rašeliniště Červené blato (<http://ziva.avcr.cz/>).

1.6.2 Mrtvý luh

Přírodní rezervace Mrtvý luh o rozloze 350 ha se nalézají na Šumavě, ohraničena toky Teplé a Studené Vltavy. Mrtvý luh je částí jádrové zóny národního parku Šumava (Obr. 2). Jedná se o jedinečnou bezstromovou střední část rašeliniště pokrytou keřovitými útvary *Pinus × pseudopumilio*. *Vaccinium uliginosum*, *Andromeda polifolia*, *Eriophorum vaginatum*, a *Calluna vulgaris* jsou nejhojnější druhy rostlin, které se zde vyskytují. Na okrajích rašeliniště roste borový les, kde dominují polykormní keře a monokormní stromy *P. × pseudopumilio*. Přizemní vrstvu tvoří různé druhy *Vaccinium*, hlavně *V. myrtillus* (Jaroš *et al.* 2014). Fauna motýlů je známá relativně dobře (Bezděk *et al.* 2006; Jaroš *et al.* 2014).



Obr. 2: Přírodní rezervace Mrtvý luh (<http://www.ceskehory.cz/>).

1.6.3 Jezerní slat'

Rozsáhlé rašeliniště Jezerní slat' se rozkládá mezi obcemi Kvilda a Horská Kvilda na rozvodí mezi Otavou a Vltavou a současně na pomezí jižních a západních Čech (Obr. 3). Jeho rozloha je 103 ha. Vyskytuje se zde například borovice *P. × pseudo pumilio* a kleč *P. mugo*. Toto rašeliniště umožňuje růst zakrslých keřů *Betula nana* spolu s Vlochyňí bahenní a Suchopýrem pochvatým, kteří tady dominují. V minulosti byla část rašeliniště poničena a dnes se na těchto místech nachází zakrslé keře jako Vlochyňě bahenní či *Calluna vulgaris* (Jaroš *et al.* 2014). Jedná se o jedno z nejstudenějších míst v České republice, kdy průměrná roční teplota dosahuje pouze 2 °C. Je zde i vysoký výskyt srážek s ročním průměrem 1200 – 1300 mm. Průměrná mocnost rašeliniště dosahuje 2,5 m a v severozápadní neporušené části je hluboké až 7,6 m. V roce 1933 byla Jezerní slat' vyhlášena státní přírodní rezervací (<http://www.sumavaregion.cz/>). Entomofauna motýlů – viz Jaroš *et al.* (2014).



Obr. 3: Přírodní rezervace Jezerní slat' (<http://www.sumavanet.cz/>).

1.6.4 Velká niva

Lesní rašeliniště o rozloze 120,31 ha se nachází v okrese Prachatice a leží v nadmořské výšce 748 – 775 m n. m (Obr. 4). Uvnitř rozlehlé rezervace se vyskytují zejména porosty blatkových borů (*Pino rotundatae – Sphagnetum*), borovice blatka (*Pinus rotundata*) a malé příměsi břízy pýřité (*Betula pubescens*). Okraje jsou tvořeny rašelinnými bory (*Vaccinio uliginosi – Pinetum*) s borovicí lesní a příměsemi břízy bělokoré (*Betula pendula*) a smrku ztepilého (*Picea abies*). Vyskytuje se zde i řada vzácných hub jako je mňhavka vodní (*Vibrissea truncorum*), která roste na dřevu v čistých potůčcích či ohňovec hladký (*Phellinus laevigatus*) ležící na kmenech břízy (<http://www.cittadella.cz/>). Fauna motýlů byla zpracována teprve nedávno (Jaroš *et al.* 2014).



Obr. 4: Lesní rašeliniště Velká niva (<http://www.kultura.cz/>).

1.6.5 Libořezy

Rašeliniště Libořezy se nalézá v Jihočeském kraji v okrese Jindřichův Hradec (Obr. 5). Jeho podloží je tvořeno převážně dvojslídnu žulou, která je překryta holocenním rašelinným ložiskem o mocnosti pouhých pár metrů. Postupně přechází v rašelinné slatiny. Na okrajích je skalní podklad zčásti překryt pleistocenními a holocenními diluviálními sedimenty či pleistocenními vátými písky (Albrecht *et al.* 2003). O entomofauně existují pouze kusé informace – viz např. Povolný *et al.* (1965).



Obr. 5: Rašeliniště Libořezy (<http://trebonsko.ochranaprirody.cz/>).

1.7 Molekulární markery

Molekulární markery se staly významným nástrojem sloužícím k řešení problémů ve fylogenetice, ekologii a evoluci. Používají se i u evolučně se vyvíjejících organismů, u nichž je obtížné přesné morfologické určení.

Markerem může být molekula bílkoviny (tzv. allozymy, což jsou enzymy kódované různými alelami na stejném lokusu) či určitý úsek DNA. Lze je tak tedy pozorovat u jednotlivých druhů organismů i různých vývojových stádií. Mezi jejich další výhody patří i to, že jejich použití není omezeno množstvím materiálu. To se využívá v případech, kdy není možné aplikovat jiné metody.

DNA markery se dělí podle umístění v buňce na mitochondriální a jaderné. V obou případech se jedná o geny, části genů nebo nekódující úseky DNA (Loxdale a Lushai, 1998).

Jaderná DNA je obsažena v buňce diploidních organismů pouze ve dvou kopiích. Její nevýhodou je snadná degradace, tudíž je méně dostupná u starších vzorků. Naopak výhodou je přítomnost intronů, které u ní zvyšují variabilitu. Často používaným nukleárním markerem pro identifikaci a rozlišení druhů je nekódující oblast Internal Transcribed Spacer (*ITS*) a kódující oblast elongační faktor 1 α (*EF 1 α*) (Loxdale a Lushai, 1998; Caterino *et al.* 2000). *ITS* oblast obsahuje velké množství polymorfismů. Pomocí těchto polymorfismů lze rozdělit organismy i do nejnižších taxonomických úrovní (Douglas *et al.* 2001).

Mitochondriální DNA je kruhová molekula o velikosti 15 – 18 kpb. Má vyšší mutační rychlost než jaderná DNA – přibližně 20krát. Představuje pouze část mimojaderné DNA a její stavba více připomíná prokaryotní nukleoid než eukaryotní chromozom. Nejčastěji je složena z 37 genů, z toho je 22 pro tRNA, 2 pro rRNA a 13 kóduje proteiny (*ND1-6*, *ND4L*, *COXI-III*, *ATP6*, *ATP8*, *Cytb*) (Clary a Wolstenholme, 1985). Je pro ni charakteristická vysoká mezidruhová variabilita a vysoký počet kopií v buňce dosahující stovky až tisíce. Výhodou je hemizygotní konstituce, dědičnost pouze v maternální linii, a také možnost získání DNA i z malých vzorků (Loxdale a Lushai, 1998).

Na základě literatury jsme pro tuto práci vybrali řadu markerů jaderných i mitochondriálních, které se jeví jako optimální.

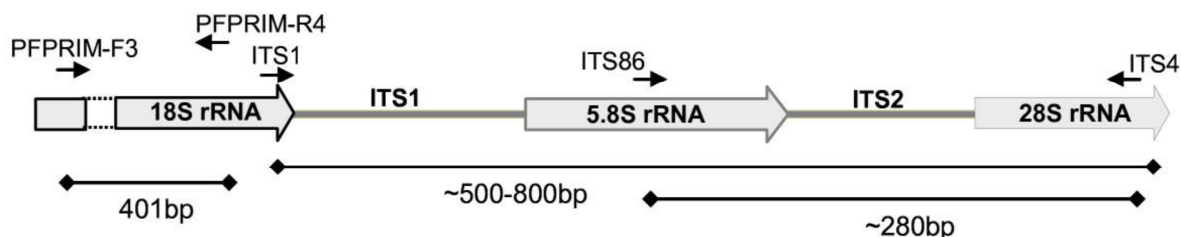
1.7.1 Jaderné markery

1.7.1.1 Internal transcribed spacer (*ITS*)

Jedná se o nekódující oblasti strukturně oddělující ribozomální RNA. Nachází se mezi velmi konzervovanými oblastmi 18S a 28S rRNA (Obr. 6). Můžeme je nalézt pouze na transkripčním prekurzoru, jelikož dochází k jejich rychlé degradaci v průběhu

posttranskripčních úprav. Jejich vývoj je rychlejší než u většiny jiných genů, a proto se mohou lišit nejen mezi úzce příbuznými druhy, ale i populacemi.

Oblast je rozdělena na 2 základní podjednotky: *ITS1* mezi 18S a 5,8S a *ITS2* mezi 5,8S a 28S. *ITS2* je variabilnější než *ITS1* (Schlötterer *et al.* 1994; Loxdale a Lushai, 1998; Barges *et al.* 2000; Douglas *et al.* 2001). U tohoto markeru mohou nastat problémy, jelikož se jedná o opakovanou oblast s konvergentní evolucí. Tudíž tento mechanismus může selhat, pokud se uvnitř jedince objeví více než jeden haplotyp.



Obr. 6: Jaderný marker *ITS* (Embong *et al.* 2008).

1.7.1.2 EPIC

Polymorfismus intronů byl použit v populačně genetických výzkumech a má značný přínos ve variabilitě (Corte – Real *et al.* 1994; Daguin a Borsa, 1999; Lessa, 1992). Podle přilehlých exonů lze navrhnout PCR primery, pomocí nichž můžeme naamplifikovat daný intron. Od tohoto je odvozen jeho název EPIC – exon – primed introncrossing (Palumbi, 1995).

1.7.1.2.1 Triose-phosphate isomerase (*TPI*)

TPI je důležitý enzym pro metabolismus sacharidů kódovaný pohlavně vázaným jaderným genem u lepidopter. Očekávalo se, že kopie tohoto genu ponesou samičky. Primery pro *TPI* byly umístěny v exonu 3 a 4 u *Heliothis* a překlenují intron 3 z *TPI* genu. Protože geny podílející se na druhové odlišnosti u motýlů se přednostně nacházejí na pohlavních chromozomech, je tedy možné, že *TPI* gen by mohl být spojen s faktory, které ovlivňují chování jednotlivých druhů, např. na čem se živí (Nagoshi, 2010).

1.7.2 Mitochondriální markery

Poloha vybraných mitochondriálních markerů je zobrazena na obrázku č. 7.

1.7.2.1 *AT* – rich

Název *AT* – rich, jinak také „control region“ se používá ve spojitosti s hmyzem (Clary a Wolstenholme, 1985). Míní se, že tento úsek je zapojen do regulace transkripce a kontroly DNA replikace (Clayton, 1992). Jde o nekódující oblast mitochondriálního genomu, která je

bohatá na nukleotidy adeninu a thyminu (Zhang a Hewitt, 1997). Oblast je délkově a sekvenčně variabilní. Využívá se pro fylogenetické a populační studie u blízce příbuzných taxonů (Taylor *et al.* 1993), protože může obsahovat tandemové repetice (Zhang a Hewitt, 1997).

1.7.2.2 ATP oblast

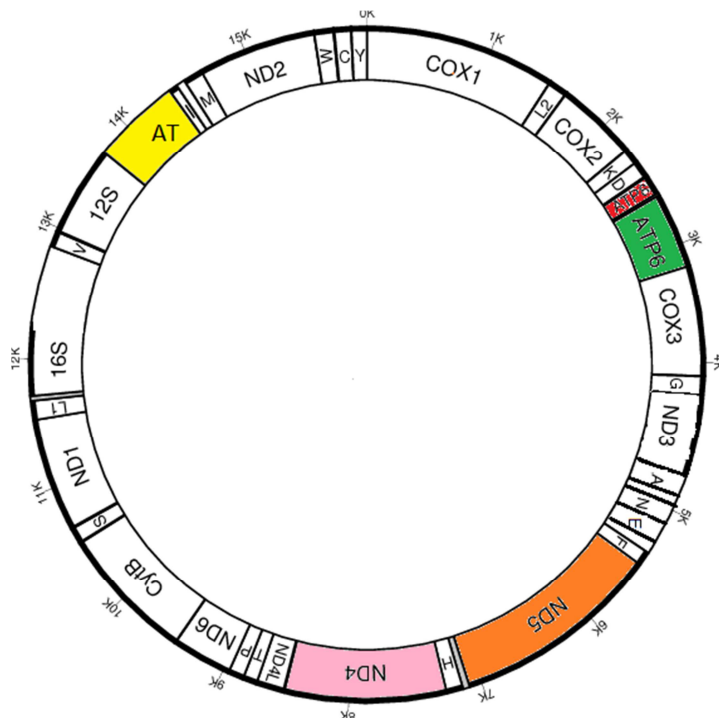
ATP oblast je úsek mitochondriální DNA ležící mezi podjednotkami II a III cytochrom oxidázy. Jsou zde geny pro *tRNA^{lys}*, *tRNA^{asp}*, *ATP8* a *ATP6* (Simon *et al.* 1994).

1.7.2.3 Oblast ND5

Tento gen je zakódovaný v mitochondrii a poskytuje instrukce pro přípravu proteinu zvaného NADH dehydrogenáza 5. Protein je aktivní v mitochondriích, které slouží k výrobě energie prostřednictvím procesu oxidativní fosforylace. Ta využívá kyslík a jednoduché cukry k výrobě adenosintrifosfátu (ATP). NADH dehydrogenáza 5 je součástí velkého komplexu enzymu známého jako komplex I (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MT-ND5>).

1.7.2.4 Oblast ND4

NADH dehydrogenáza 4 je složkou velkého komplexu enzymu, která je zakódovaná v mitochondrii (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MT-ND4>).



Obr. 7: Kruhová molekula mtDNA.

2 Cíl práce

1) Na základě rešerše literatury a prací týkajících se genetické variability přírodních populací Lepidoptera posoudit vhodnost jednotlivých molekulárních markerů.

2) Pomocí vybraných markerů provést populačně genetickou analýzu u tyrfobiontní můry *Lithophane lambda* na vybraných lokalitách v jižních Čechách.

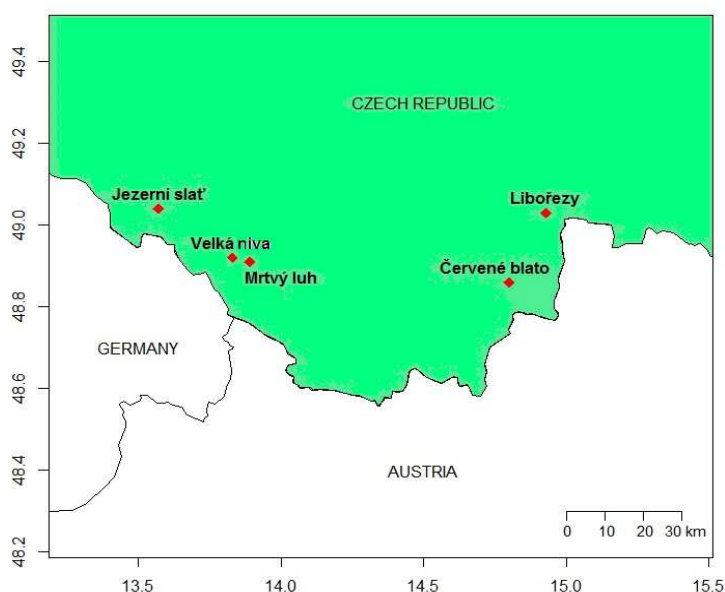
3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Veškerý analyzovaný materiál poskytl Ing. Aleš Bezděk Ph.D., Ing. Josef Jaroš a doc. Ing. Karel Spitzer CSc. (Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav). Vzorky pocházejí z 5 lokalit na území České republiky (Obr. 8) a jejich přehled je uveden v tabulce 1.

Tab. 1: Seznam analyzovaných vzorků.

Lokalita	Počet jedinců	Celkový počet jedinců	Datum sběru	GPS
Červené blato	10	38	VI. 2011; VI. 2012	48°52'51,39''N; 14°54'23,97''E
Libořezy	10	47	VI. 2011; V. – VI. 2012	49°1'N; 14°56'E
Mrtvý luh	10	14	VI. 2011; VI. 2012	48°52'49,88''N; 13°52'21,51''E
Velká niva	10	11	VI. 2011	48°55'20,19''N; 13°50'8,65''E
Jezerní slat'	2	2	VI. 2011	49°2'23,04''N; 13°34'31,56''E



Obr. 8: Geografická poloha lokalit sběru vzorků.

3.2 Extrakce DNA

Všechny vzorky byly determinovány a ihned uloženy v mrazáku při – 80 °C až do dalšího zpracování. Další laboratorní metody byly prováděny za pomoci aerosolových špiček, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci mezi vzorky.

3.2.1 Izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)

Postup dle návodu výrobce.

3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Základní PCR reakce byla míchána na ledu, do 0,2 ml zkumavky. Do reakce se vždy přidávalo BSA (Bovine Serum Albumine 20mg/ml, Fermentas), která slouží pro stabilizaci enzymů v reakci (zabraňuje jejich ulpívání na stěnách zkumavky) a zvýšení účinnosti reakce. Pro jeden vzorek se reakce skládala z 7,25µl ddH₂O, 1,25µl pufru, 1µl nukleotidů 0,75µl primeru forward, 0,75 µl primeru revers a 0,1 µl Tag DNA polymerázy Unis (Top Bio). Do každé zkumavky byl přidán 1 µl DNA. Výsledný objem reakce byl tedy 12,6 µl.

3.3.1 Primery pro amplifikaci vybraných oblastí genomu

a) Jaderné markery

Pro úsek z jaderného genu pro EPIC, konkrétně pro oblast *TPI* byly použity různé dvojice primerů vybrané na základě literatury (Beltrán *et al.* 2002; Nagoshi, 2010). Nejvíce se osvědčila dvojice primerů *Tpi282f/Tpi850gR*. Pro oblast *ITS* byly použity dvě dvojice primerů (White *et al.* 1990; Simon *et al.* 1994).

b) Mitochondriální markery

Pro úsek mitochondriálního genomu *AT* oblasti byly použity dvě dvojice primerů, z nichž se pro další práci použila dvojice 12s/J6 – Ile (Žurovcová; Kuřátková). Následně byly testovány primery pro další oblasti mtDNA a to pro oblast *ATP*, *ND4* a nakonec *ND5*. Primery pro oblast *ND5* byly aplikovány dvě dvojice primerů, přičemž primery N5 – J – 7077/N4 – N- 8487 (Simon *et al.* 1994) se ukázaly vhodné pro další použití v prováděném výzkumu. Přehled primerů, které se použily pro získání výsledků, jsou uvedené v tabulce 2 a místa jejich nasednutí na DNA na Obr. 9. Seznam všech použitých primerů je zaznamenán v tabulce 3.

Tab. 2: Přehled použitých primerů.

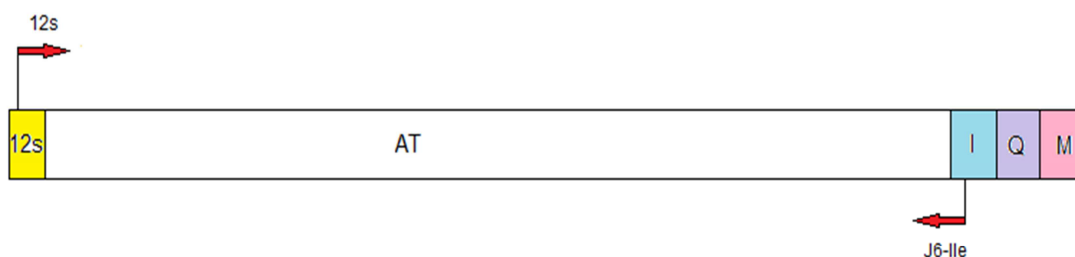
GEN	PRIMER	TYP	SEKVENCE 5' → 3'
AT	12s ¹⁾	F	TAG GGT ATC TAA TCC TAG TT
	J6-Ile ¹⁾	R	GGT AAT CCT TTA ATC AGG CAC TCC
ND5	N5-J7572 ²⁾	F	AAA AGG AAT TTG AGC TCT TTT WGT
	N4-N-8487 ²⁾	R	TAT CAG CTA ATA TAG CAG CTC C
EPIC	Tpi282f ³⁾	F	GGT GAA ATC TCC CCT GCT ATG
	Tpi850gR ³⁾	R	AAT TTT ATT ACC TGC TGT GG

1) Žurovcová

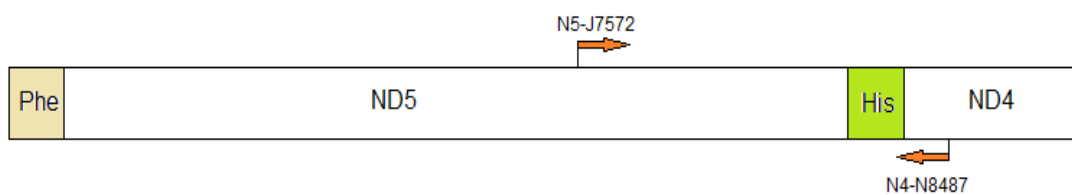
2) Simon *et al.*, 1994

3) Nagoshi, 2010

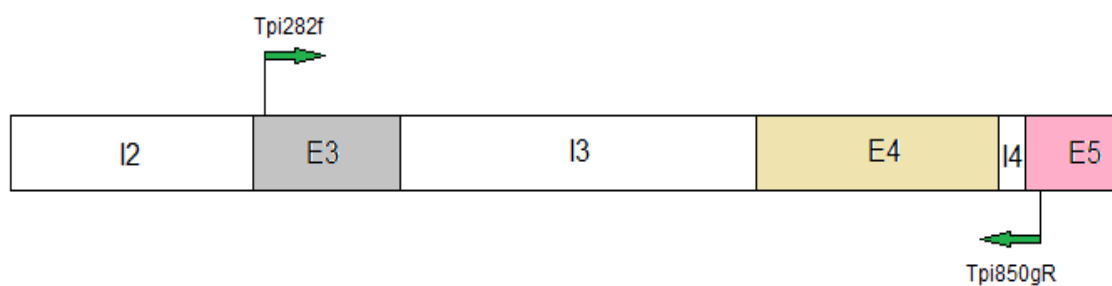
a)



b)



c)



Obr. 9: Místa nasednutí primerů na DNA (a – oblast AT, b – oblast ND5, c – oblast TPI).

Tab. 3: Přehled aplikovaných primerů.

GEN	PRIMER	TYP	SEKVENCE 5' → 3'
ITS	ITSf1 ¹⁾	F	TAC ACA CCG CCC GTC GCT ACT A
	ITSr1 ¹⁾	R	CTT TTC CTC CSC TTA YTR ATA TGC
	ITS4r ⁶⁾	R	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
	ITSnewF ²⁾	F	TTG CTG GGA AGT TGA CCA AAC
	ITSnewR ²⁾	R	GAC TTT ACG CAT CGC AAC CC
	ITSr2 ¹⁾	R	ATG TGC GTT CRA AAT GTC GAT GTT C
EPIC	Ddc-for ³⁾	F	CAG AGG GTC AAG GAA CAG CAC
	Ddc-ri ³⁾	R	CGA AAG CGC AAG ACG ATG TAG
	Mpi-F ³⁾	F	ATT CAA GCT CAT CCA ACT AAG G
	Mpi-R ³⁾	R	TTA TGA AGT TGT TCT GCA TGG T
	Tpi1 ³⁾	F	GGT CAC TCT GAA AGG AGA ACC ATC TT
	Tpi2 ³⁾	R	CAC AAC ATT TGC CCA GTT GTT GCC AA
	Tpi56f ⁴⁾	F	CAA AAT GGG TCG CAA ATT CG
	Tpi282f ⁴⁾	F	GGT GAA ATC TCC CCT GCT ATG
	Tpi412f ⁴⁾	F	CCG GAC TGA AGG TTA TCG CTT G
	Tpi698R ⁴⁾	R	AGT CAC TGA CCC ACC ATA CTG
	Tpi850gR ⁴⁾	R	AAT TTT ATT ACC TGC TGT GG
	Tpi385R ⁴⁾	R	GCA ACA AGA TCA TCT TTC TCA C
AT	SeqLepMet-rev ⁵⁾	R	TGA GGT ATG ARC CCA AAA GC
	LepAT2B-for ²⁾	F	ATT AAA TTT TTG TAT AAC CGC AAC
	J6-Ile ²⁾	R	GGT AAT CCT TTA ATC AGG CAC TCC
	12s ²⁾	F	TAG GGT ATC TAA TCC TAG TT
ATP	LepATP3746f ²⁾	F	GAC TGA AAG CAA GTA CTG GTC CT
	LepATP4753r ²⁾	R	GGT CAG CCT CTA TAA TCT AC
	LepND9623for ²⁾	F	AAC CTA AAG CTC CTT CAC AAA CTG
	LepND10572rev ²⁾	R	AAG ATA GGG TGT GAT TTA CGA ATT G
ND4	N-9733r ⁶⁾	R	GAT TCA TAA TAA ATT CCT CGT CC
	J-8795f ⁶⁾	F	TCA ATA ATT CGT ACT CAT GG
	J-8442f ⁶⁾	F	TAT TAT ACT GGT GTA TCT CGG G
ND5	N5-J-7077 ⁶⁾	F	TTA AAT CCT TWG ART AAA AYC C
	N5-J7572 ⁶⁾	F	AAA AGG AAT TTG AGC TCT TTT WGT
	N4-N-8487 ⁶⁾	R	TAT CAG CTA ATA TAG CAG CTC C

1) White *et al.*, 1990

2) Žurovcová

3) Beltrán *et al.*, 2002

4) Nagoshi, 2010

5) Kuřátková

6) Simon *et al.*, 1994

3.3.2 PCR profil k amplifikaci jednotlivých fragmentů

PCR profily probíhaly na termocyclerech TC – XP Cycler (Bioer) a BioerGenePro podle následujících programů, které jsou v tabulce 4.

Tab. 4: PCR profily.

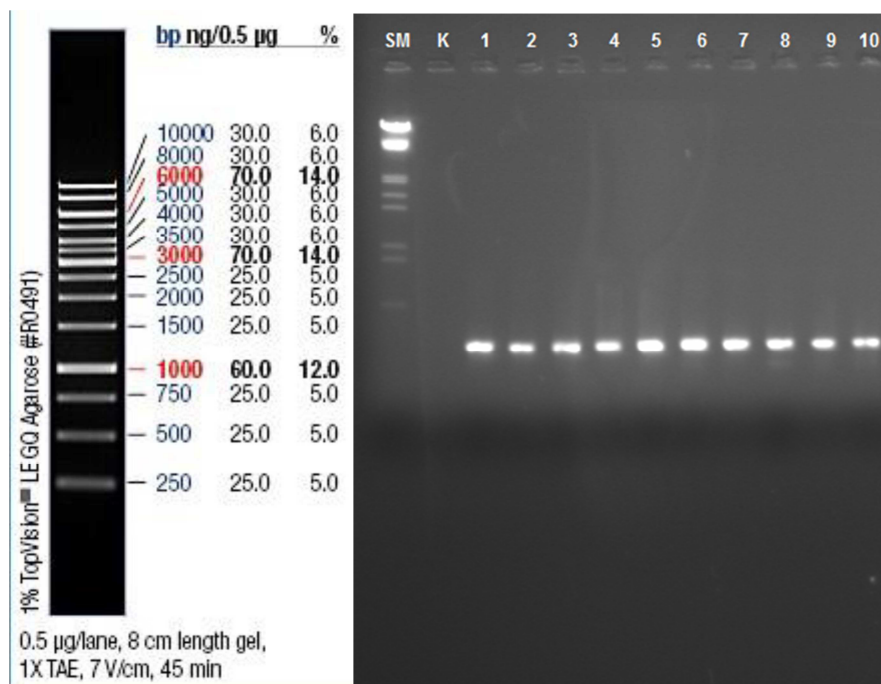
	<i>AT</i> oblast		<i>ND5</i> oblast		<i>TPI</i> oblast	
	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)
1. predenaturace	95	120	94	60	94	60
2. denaturace	94	60	94	30	94	30
3. annealing	51	90	49	45	49	45
4. elongace	65	60	68	60	68	60
5. postelongace	65	420	68	120	68	120
6. uchování	4	∞	4	∞	4	∞

3.4 Gelová elektroforéza

Po proběhnutí PCR reakce byla použita elektroforetická verifikace, která slouží k ověření její úspěšnosti. Umožňuje určit množství a velikost fragmentu DNA. Na 2% agarózový gel byly nanášeny 2 µl PCR produktu smíchaného se 2 µl nanášecího pufru (700 µl ddH₂O, 300 µl 100% glycerolu, 0,5 mg bromfenolové modři).

Gel byl připraven rozpuštěním 4 g agarózy ve 200 ml 1x TAE pufru (zásobní roztok 50x TAE pufr: 121 g TRIS; 28,55 ml kyseliny octové; 50 ml 0,5M EDTA pH 8,0; 421,45 ml H₂O). Poté se nechal rozehrát v mikrovlnné troubě zhruba 2 – 3 minuty a následně byl zchlazen na 45 °C pod proudem studené vody. Do již vychlazeného gelu bylo přidáno 15 µl ethidium bromidu o koncentraci 0,5 µg/µl. Následovalo nalití gelu do připravené formy a umístění hřebíků, které vytvořili jamky. Gel tuhnul asi 45 minut při pokojové teplotě, a pokud nebyl hned používán, byl uložen v lednici v 1x TAE pufru při teplotě 4 °C.

Elektroforéza probíhala při pokojové teplotě cca 40 minut na 120 V. Na gel byl také nanášen velikostní marker *Lambda* DNA/EcoRI+Hind III (FERMENTAS), který slouží k porovnání velikosti a množství PCR produktu. Po ukončení elektroforézy byl PCR produkt zviditelněn na UV transiluminátoru (UVP Transilluminator). UV transiluminátor je spojen s digitální kamerou UVP. Byly pořízeny fotografie výsledného gelu (Obr. 10).



Obr. 10: Vlevo Lambda DNA/EcoRI+Hind III marker, vpravo výsledná fotografie rozdělených PCR produktů. SM Lambda DNA/EcoRI+Hind III marker, K kontrolní PCR reakce bez DNA, 1 – 10 úspěšně amplifikované testované vzorky fragmentu *TPI* u jednotlivých lokalit (1 – 2 Červené blato, 3 – 4 Libořezy, 5 – 6 Mrtvý luh, 7 – 8 Velká niva a 9 – 10 Jezerní slat').

3.5 Přečištění vzorku pomocí metody ExoSap

Po úspěšné amplifikaci daného fragmentu bylo nutné PCR produkt přečistit. Ten obsahuje nespoteřované dNTPs a primery, které zůstaly v produktu PCR směsi. K přečištění produktu jsem využila metodu ExoSap, která využívá 2 hydrolytické enzymy – Exonuclease I (Exo I) a Shrimp Alkaline Phosphatase (Sap). Exo I degraduje zbytkové jedno řetězcové primery a jakékoliv cizí jednovláčkové DNA, které vznikly během PCR reakce. Sap hydrolyzuje zbývající dNTPs z PCR produktu, které by narušovaly sekvenční reakci (Dugan *et al.* 2002). Míchání proběhlo na ledu, kde jsem k cca 9 µl produktu přidala 0,5µl ddH₂O, 0,5 µl Exo I a 1 µl Sap. Následně jsem vzorek zvortexovala a vložila do cycleru, kde byl inkubován při 37 °C 30 min a při 80 °C 15 min. Vzniklý vzorek mohl být použit ihned pro sekvenční reakci nebo zmražen pro další použití.

3.6 Sekvenování

Vzorky byly odeslány do firmy SEQME a při přípravě jejich odeslání se postupovalo dle instrukcí firmy.

3.7 Statistické zpracování sekvencí

Za použití NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) byla prováděna kontrolní identifikace sekvencí. Pomocí programu MEGA 6 (Tamura *et al.* 2011) byly sekvence vizuálně zkontrolovány a v případě nutnosti také opraveny. Program MEGA 6 byl použit k vytvoření alignmentů pomocí metody ClustalW. Dále byl tento program využit k výpočtům základních charakteristik sekvencí, jako je průměrná délka, nukleotidové složení, variabilní místa, parsimoniální variabilita a vybrán model pro genetickou vzdálenost. Za použití výše zmíněných modelů v uvedeném programu byly také vytvořeny dendrogramy metodami Minimum – Evolution (ME) a Maximum Likelihood (ML); dále pak metodou Maximum Parsimony (MP).

Statistická podpora jednotlivých stromů byla testována pomocí metody bootstrap (1000 opakování). Při tvorbě všech dendrogramů byl jako „outgroup“ (srovnávací taxon) použit motýl *Helicoverpa armigera*, který patří do čeledi Noctuidae a všechny mnou použité fragmenty již u něho byly osekvenovány a uloženy v GenBank (GU188273.1).

Haplotypy byly identifikovány a standardní genetické indexy jako haplotypová rozmanitost (H_d), variabilita nukleotidů (π) a počet haplotypů (h) byly vypočítány s použitím programu DnaSP v. 5 (Librado a Rozas, 2009).

Na základě parametrů π , H_d a h byla provedena analýza mezi populacemi pomocí Kruskal-Wallisova testu.

Analýza haplotypů a jejich frekvencí byla také provedena v programu Arlequin ver 3.5 (Excoffier a Lischer, 2010). Prostřednictvím tohoto programu byly spočítány testy neutrality s cílem prozkoumat demografickou historii.

Haplotypové networky byly provedeny pomocí statistické parsimoniální metody (Templeton *et al.* 1992) v programu Network (Clement *et al.* 2000).

Program GenAlEx 6.5 (Peakall a Smouse, 2012) byl použit pro testování hypotézy o izolaci vzdáleností Mantelovým testem (Mantel, 1967) a vytvoření grafů porovnávajících genetické a geografické vzdálenosti mezi lokalitami.

4 Výsledky

Pro zjištění genetické rozmanitosti a fyleografické struktury středoevropské populace *L. lambda* a její úroveň izolace jsem v první fázi práce testovala řadu markerů pomocí většího množství primerů. Z jaderných markerů to byl jednak fragment *ITS2*, který se naamplifikovat nepodařilo, a celkem tři markery EPIC. Z nich se podařilo naamplifikovat část genu *TPI*, která obsahuje jeden intron, a to intron 3.

Z mitochondriálních markerů (*AT*, *ATP*, *ND4* a *ND5*) se podařilo naamplifikovat dva, a to *AT* a *ND5*.

4.1 Genetická variabilita markerů

U fragmentu genu *AT* bylo analyzováno a úspěšně osekvenováno 42 jedinců z pěti lokalit, sekvence byly upraveny na jednotkovou délku 362 bp. Počet variabilních míst byl 44 (12,15% z celkové délky sekvence), parsimoniální variabilita byla na jednom místě (0,28%). (Parsimoniálně informativní místa v sekvenci jsou taková místa, která obsahují nejméně dva různé nukleotidy a alespoň dva z nich se vyskytují dvakrát). Délková variabilita nebyla pozorována.

Markeru *ND5* byl osekvenováno u 41 jedinců z pěti lokalit, poté byly sekvence upraveny na délku 577 bp. Počet variabilních míst je 11, což je 1,91% z celkové délky sekvence. Parsimoniální variabilita se vyskytovala na 3 místech (0,52%).

Oblast *TPI* se podařilo osekvenovat u 42 jedinců z pěti lokalit. Ze sekvencí byl vytvořen alignment, který byl následně upraven na délku 327 bp. Počet variabilních míst je 29 (8,87% z celkové délky sekvence). Parsimoniální variabilita je na 14 místech (4,28%). Intron nebyl délkově variabilní.

Pro všechny markery byly vypočteny frekvence nukleotidů a jejich průměrné frekvence, které jsou zaznamenány v tabulce 5. Průměrné zastoupení nukleotidů u *AT* oblasti je 44,1% T, 2,7% C, 47,9% A, 5,3% G, u *ND5* oblasti je to obdobné, kde 51,7% T, 3,8% C, 33,4% A, 11% G. Oblast *TPI* má vyrovnané průměrné frekvence nukleotidů 24,9% T, 21% C, 32,1% A a 22% G viz tabulka 5.

Tab. 5: Průměrná frekvence nukleotidů u daných lokalit.

Lokalita	Průměrná frekvence nukleotidů (%)				Průměrná frekvence nukleotidů (%)				Průměrná frekvence nukleotidů (%)			
	u AT oblasti				u ND5 oblasti				u TPI oblasti			
	T(U)	C	A	G	T(U)	C	A	G	T(U)	C	A	G
Červené blato	44,1	2,7	47,9	5,3	51,7	3,8	33,4	11,1	24,9	20,9	32,2	22
Libořezy	44,2	2,5	48	5,3	51,7	3,8	33,5	11	24,9	21,1	32	22
Mrtvý luh	44	2,8	47,9	5,3	51,7	3,8	33,4	11	24,9	21,2	32,1	22,1
Velká niva	43,9	2,7	48	5,3	51,8	3,8	33,4	11	25	20,9	32	22,1
Jezerní slať	44,1	2,5	47,5	6	52,1	3,9	33,3	10,7	25,2	21	31,9	21,9
Průměr	44,1	2,7	47,9	5,3	51,7	3,8	33,4	11	24,9	21	32,1	22

4.2 Genetická variabilita populací

Pro jednotlivé markery byly vypočteny vzdálenosti (metoda p – distance, Bootstrap 1000x) uvnitř lokalit uvedené v tabulce 6. Největší genetická vzdálenost uvnitř lokalit je u Jezerní slati u AT oblasti. U oblastí AT a ND5 nebyla zjištěná žádná genetická variabilita u lokalit Mrtvý luh a Velká niva.

Tab. 6: Genetické vzdálenosti uvnitř lokalit (směrodatné odchylky modře).

Genetické vzdálenosti uvnitř lokalit			
Lokalita	Průměrné vzdálenosti u jednotlivých markerů		
	AT oblast	ND5 oblast	TPI oblast
Červené blato	0,001 (0,001)	0,003 (0,001)	0,000 (0,000)
Libořezy	0,001 (0,001)	0,002 (0,001)	0,015 (0,004)
Mrtvý luh	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)	0,024 (0,005)
Velká niva	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)	0,007 (0,003)
Jezerní slať	0,123 (0,016)	0,002 (0,002)	0,021 (0,008)

Následně byly vypočítány testy neutrality pro jednotlivé lokality, jejichž hodnoty jsou zaznamenány v tabulce 7. Nízké hodnoty nezbytně neindikují neutrální molekulární evoluci mezi jednotlivými lokalitami. Tajimův test je také citlivý k dalším faktorům jako je například nedávný populační „bottleneck“ nebo populační růst. Ani u jedné z lokalit nebyl žádný z obou testů signifikantní. Pro srovnání byly také testovány vzorky souhrnně jako celková populace (CP). V tomto případě byly testy signifikantní pro markery mitochondriální, TPI však signifikantní nebylo.

Tab. 7: Testy neutrality.

Testy neutrality u <i>AT</i> oblasti						
Lokalita	ČB	L	ML	VN	JS	CP
Počet vzorků	10	10	10	10	2	42
Tajimův test						
S	1	1	0	0	43	43
pi	0,356	0,467	0,000	0,000	43,000	2,372
Tajima's D	0,015	0,82	0,000	0,000	0,000	-2,674
Tajima's D p-value	0,723	0,852	1,000	1,000	1,000	0,000
Fuův FS test						
Počet alel	2	2	1	1	2	3
FS	0,417	0,818	0	0	3,761	5,420
FS p-value	0,365	0,514	N.A.	N.A.	0,977	0,975
Testy neutrality u <i>ND5</i> oblasti						
Lokalita	ČB	L	ML	VN	JS	CP
Počet vzorků	10	10	10	9	2	41
Tajimův test						
S	2	4	0	1	1	7
pi	0,667	0,800	0,000	0,222	1,000	0,478
Tajima's D	-0,184	-1,667	0,000	-1,088	0,000	1,950
Tajima's D p-value	0,331	0,031	1,000	0,180	1,000	0,005
Fuův FS test						
Počet alel	3	2	1	2	2	6
FS	-0,272	1,744	0,000	-0,263	0,000	-3,067
FS p-value	0,313	0,763	N.A.	0,163	0,232	0,005
Testy neutrality u <i>TPI</i> oblasti						
Lokalita	ČB	L	ML	VN	JS	CP
Počet vzorků	10	10	10	10	2	42
Tajimův test						
S	0	11	27	6	7	29
pi	0,000	4,867	7,756	2,422	7,000	4,107
Tajima's D	0,000	1,127	-0,896	0,588	0,000	-1,330
Tajima's D p-value	1,000	0,896	0,157	0,757	1,000	0,068
Fuův FS test						
Počet alel	1	6	6	4	2	15
FS	0,000	0,325	1,460	1,029	1,946	-2,879
FS p-value	N.A.	0,550	0,779	0,713	0,493	0,144

Pro marker *AT* analýza rozlišila 3 haplotypy, kde největší zastoupení měl haplotyp 1, u *ND5* 6 haplotypů (haplotyp 2 byl nejvíce zastoupen) a u *TPI* 15 haplotypů, přičemž nejvíce jedinců mělo haplotyp 3. Počet haplotypů je uveden v tabulce 8. Sekvence haplotypů jsou uvedeny v Příloze 1.

Tab. 8: Počet haplotypů v populacích.

Počet haplotypů v populacích u <i>AT</i> oblasti					
Haplotyp	ČB (10)	L (10)	ML (10)	VN (10)	JS (2)
Hap_1	8	3	10	10	1
Hap_2	0	0	0	0	1
Hap_3	2	7	0	0	0
Počet haplotypů v populacích u <i>ND5</i> oblasti					
Hapotyp	ČB (10)	L (10)	ML (10)	VN (9)	JS (2)
Hap_1	0	0	0	0	1
Hap_2	6	9	10	8	1
Hap_3	0		0	1	0
Hap_4	3	0	0	0	0
Hap_5	1	0	0	0	0
Hap_6	0	1	0	0	0
Počet haplotypů v populacích u <i>TPI</i> oblasti					
Hapotyp	ČB (10)	L (10)	ML (10)	VN (10)	JS (2)
Hap_1	0	0	0	0	1
Hap_2	0	0	1	0	1
Hap_3	10	5	5	6	0
Hap_4	0	0	0	2	0
Hap_5	0	0	0	1	0
Hap_6	0	0	0	1	0
Hap_7	0	0	1	0	0
Hap_8	0	0	1	0	0
Hap_9	0	0	1	0	0
Hap_10	0	0	1	0	0
Hap_11	0	1	0	0	0
Hap_12	0	1	0	0	0
Hap_13	0	1	0	0	0
Hap_14	0	1	0	0	0
Hap_15	0	1	0	0	0

Variabilita mezi populacemi (parametry π , haplotypová diverzita H_d a počet haplotypů h) byly vypočítány s použitím programu DnaSP, které jsou zaznamenány v tabulce 9. Celková haplotypová diverzita pro *AT* oblast byla 0,382 a nukleotidová diverzita 0,00689. Pro *ND5* oblast byla haplotypová diverzita 0,312, nukleotidová diverzita 0,00092. U *TPI* oblasti to bylo obdobné, haplotypová diverzita 0,312, ale nukleotidová diverzita byla vyšší 0,0126.

Tab. 9: Nukleotidová (π) a haplotypová variabilita (H_d a h).

Oblast	Lokalita	π	H_d	h
AT	ČB	0,00099	0,356	2
	L	0,00135	0,467	2
	ML	0,00000	0,000	1
	VN	0,00000	0,000	1
	JS	0,12256	1,000	2
ND5	ČB	0,00195	0,711	4
	L	0,00213	0,378	3
	ML	0,00000	0,000	1
	VN	0,00041	0,222	2
	JS	0,00188	1,000	2
TPI	ČB	0,00000	0,000	1
	L	0,01493	0,778	6
	ML	0,02376	0,778	6
	VN	0,00743	0,644	4
	JS	0,02147	1,000	2

4.3 Genetická diverzita populací

Kruskal-Wallisova testy genetické diverzity mezi populacemi neprokázaly významnou odlišnost ($P_\pi = 0,34$; $P_{H_d} = 0,091$ a $P_h = 0,693$).

Dále byly vypočítány genetické vzdálenosti mezi populacemi (metoda párová p – distance, Bootstrap 1000x). Získané hodnoty jsou v tabulce 10. Největší genetické vzdálenosti byly mezi lokalitou Jezerní slat' a ostatními lokalitami. Toto tvrzení platí zejména pro oblast *AT*. U *TPI* oblasti byly hodnoty srovnatelné. Mezi lokalitami Mrtvý luh a Velká niva nebyla zjištěna žádná genetická variabilita a to u oblastí *AT* a *ND5*.

Tab. 10: Genetické vzdálenosti mezi lokalitami (směrodatné odchylky modře).

Genetické vzdálenosti mezi lokalitami					
Lokalita	AT oblast				
	Červené blato	Libořezy	Mrtvý luh	Velká niva	Jezerní slať
Červené blato		0,002	0,001	0,001	0,008
Libořezy	0,002		0,002	0,002	0,008
Mrtvý luh	0,001	0,002		0,000	0,008
Velká niva	0,001	0,002	0,000		0,008
Jezerní slať	0,061	0,061	0,061	0,061	
Lokalita	ND5 oblast				
	Červené blato	Libořezy	Mrtvý luh	Velká niva	Jezerní slať
Červené blato		0,001	0,001	0,001	0,001
Libořezy	0,002		0,000	0,000	0,001
Mrtvý luh	0,001	0,001			0,001
Velká niva	0,002	0,001	0,000		0,001
Jezerní slať	0,002	0,002	0,001	0,001	
Lokalita	TPI oblast				
	Červené blato	Libořezy	Mrtvý Luh	Velká niva	Jezerní slať
Červené Blato		0,004	0,003	0,002	0,004
Libořezy	0,011		0,004	0,004	0,004
Mrtvý Luh	0,014	0,019		0,005	0,005
Velká niva	0,005	0,012	0,016		0,004
Jezerní slať	0,011	0,015	0,019	0,011	

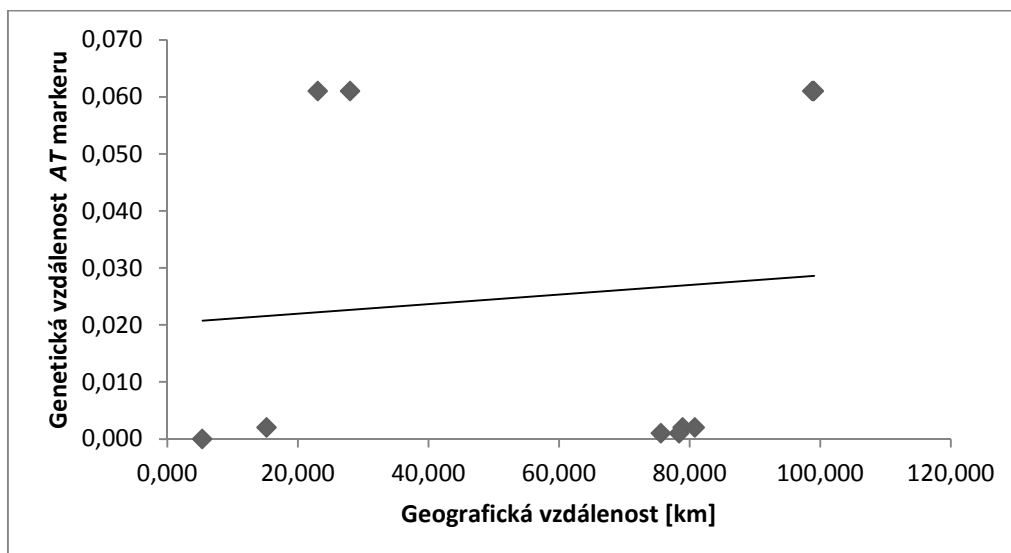
Dále byly vypočítány hodnoty F_{ST} , které jsou v tabulce 11. Oproti očekávání vyplývající z povahy izolovaných stanovišť těchto populací a také nízké schopnosti druhu rozptýlit se na delší vzdálenosti, jsou tyto hodnoty značně vysoké, i když ne signifikantně.

Tab. 11: Hodnoty F_{ST} .

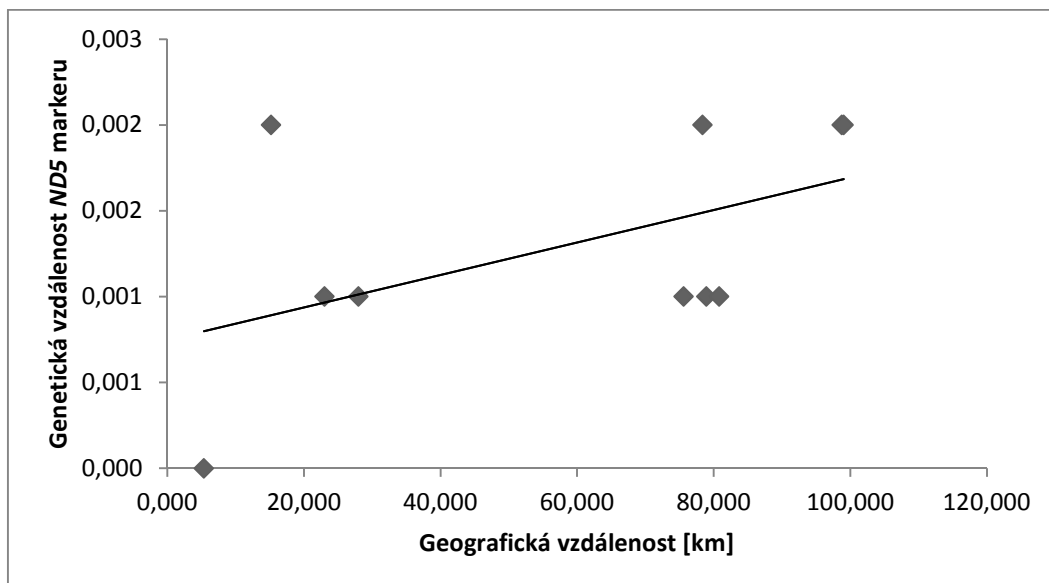
Hodnoty F_{ST} u AT oblasti					
Lokalita	ČB	L	ML	VN	JS
ČB	0,00000				
L	0,33692	0,00000			
ML	0,11111	0,66667	0,00000		
VN	0,11111	0,66667	0,00000	0,00000	
JS	0,66580	0,65906	0,68750	0,68750	0,00000
Hodnoty F_{ST} u ND5 oblasti					
Lokalita	ČB	L	ML	VN	JS
ČB	0,00000				
L	0,05983	0,00000			
ML	0,16667	0,00000	0,00000		
VN	0,12281	-0,00648	0,01235	0,00000	
JS	0,16667	0,05093	0,68750	0,35252	0,00000
Hodnoty F_{ST} u TPI oblasti					
Lokalita	ČB	L	ML	VN	JS
ČB	0,00000				
L	0,30476	0,00000			
ML	0,13827	0,00141	0,00000		
VN	0,19259	0,06553	0,00608	0,00000	
JS	0,68750	-0,12489	-0,19329	-0,00139	0,00000

Pro jednotlivé oblasti byly vytvořeny grafy, znázorňující vztah mezi genetickou vzdáleností lokalit a jejich geografickou vzdáleností (Obr. 11 a – c). Pro oblast *AT* vyšla hodnota $R_{xy} = 0,099$ a $p = 0,424$. Pro oblast *ND5* $R_{xy} = 0,506$ a $p = 0,047$ a pro oblast *TPI* $R_{xy} = -0,163$ a $p = 0,271$. Ve všech případech jsou hodnoty p vyšší nebo na hranici 0,05, nejsou tedy signifikantní.

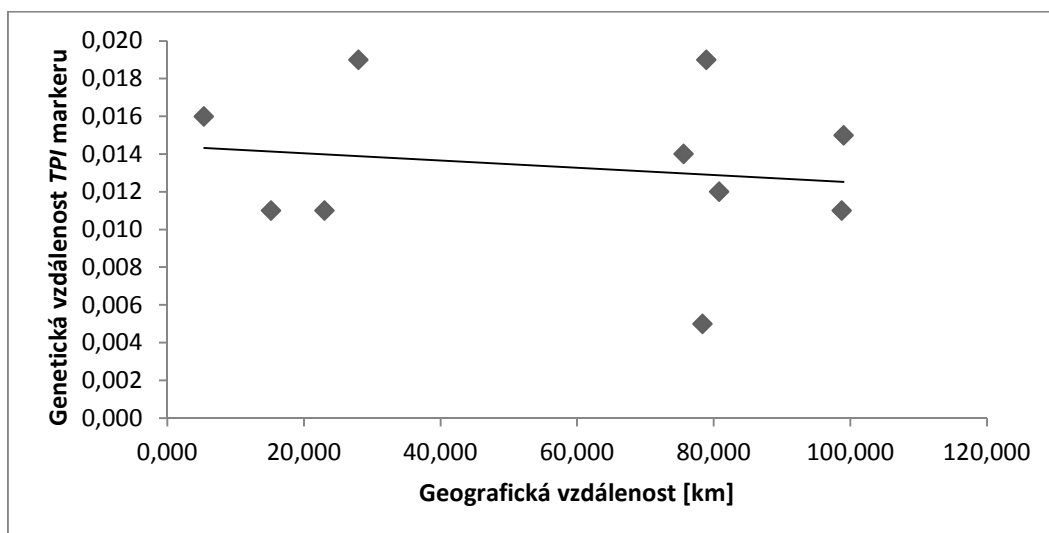
a)



b)

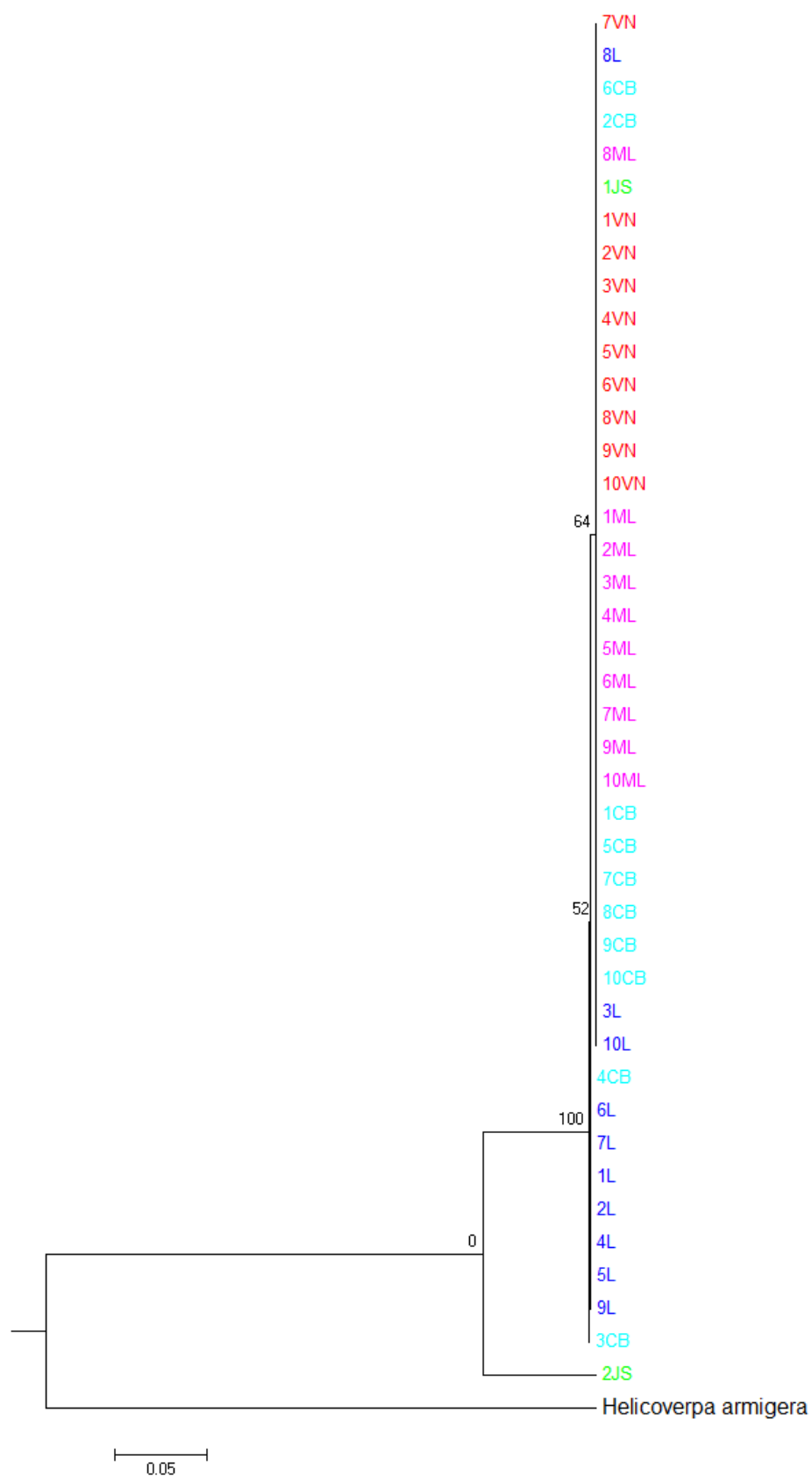


c)

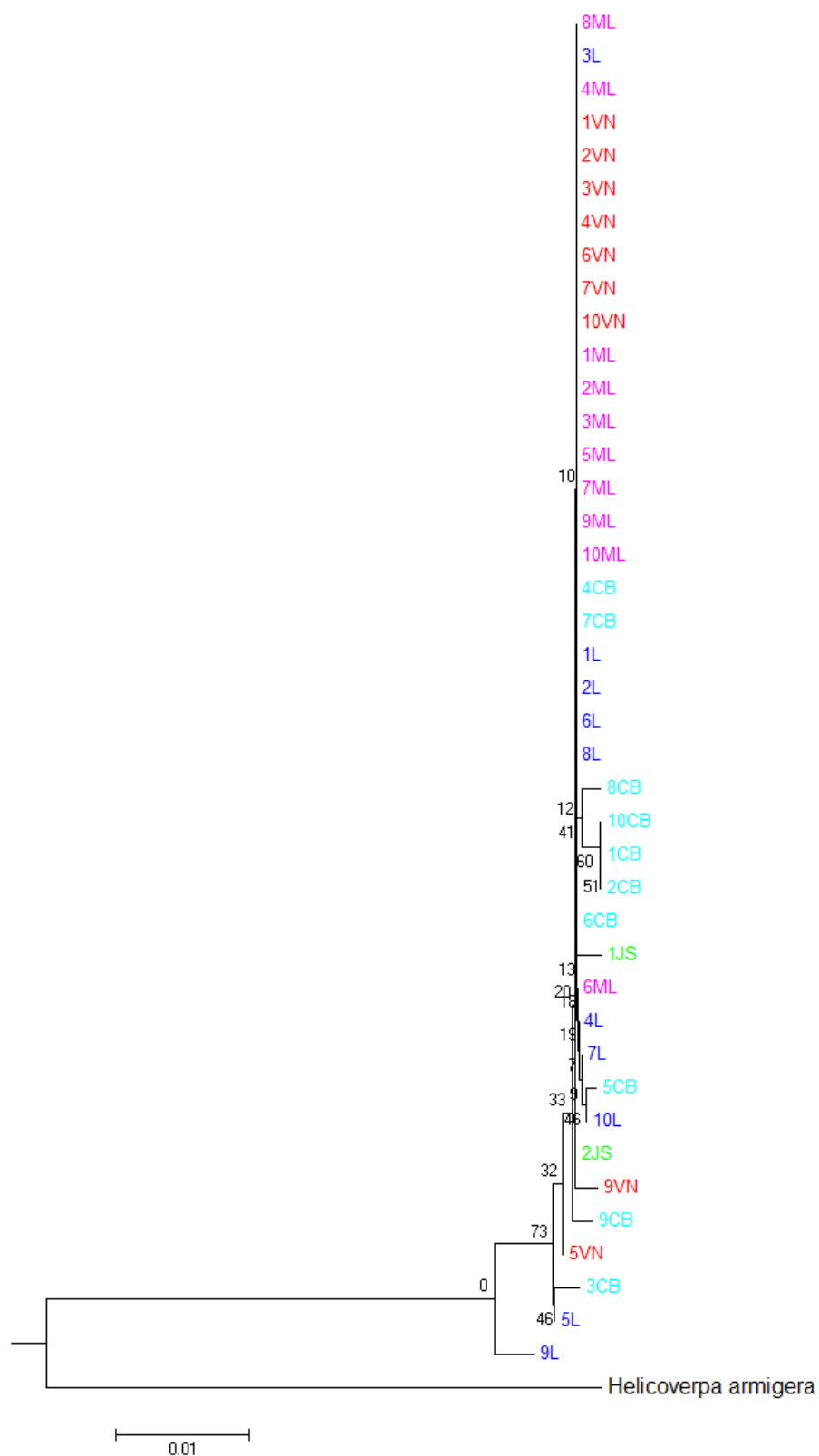


Obr. 11: Vztah mezi genetickou a geografickou vzdáleností u jednotlivé oblasti (a – *AT* oblast, b – *ND5* oblast, c – *TPI* oblast).

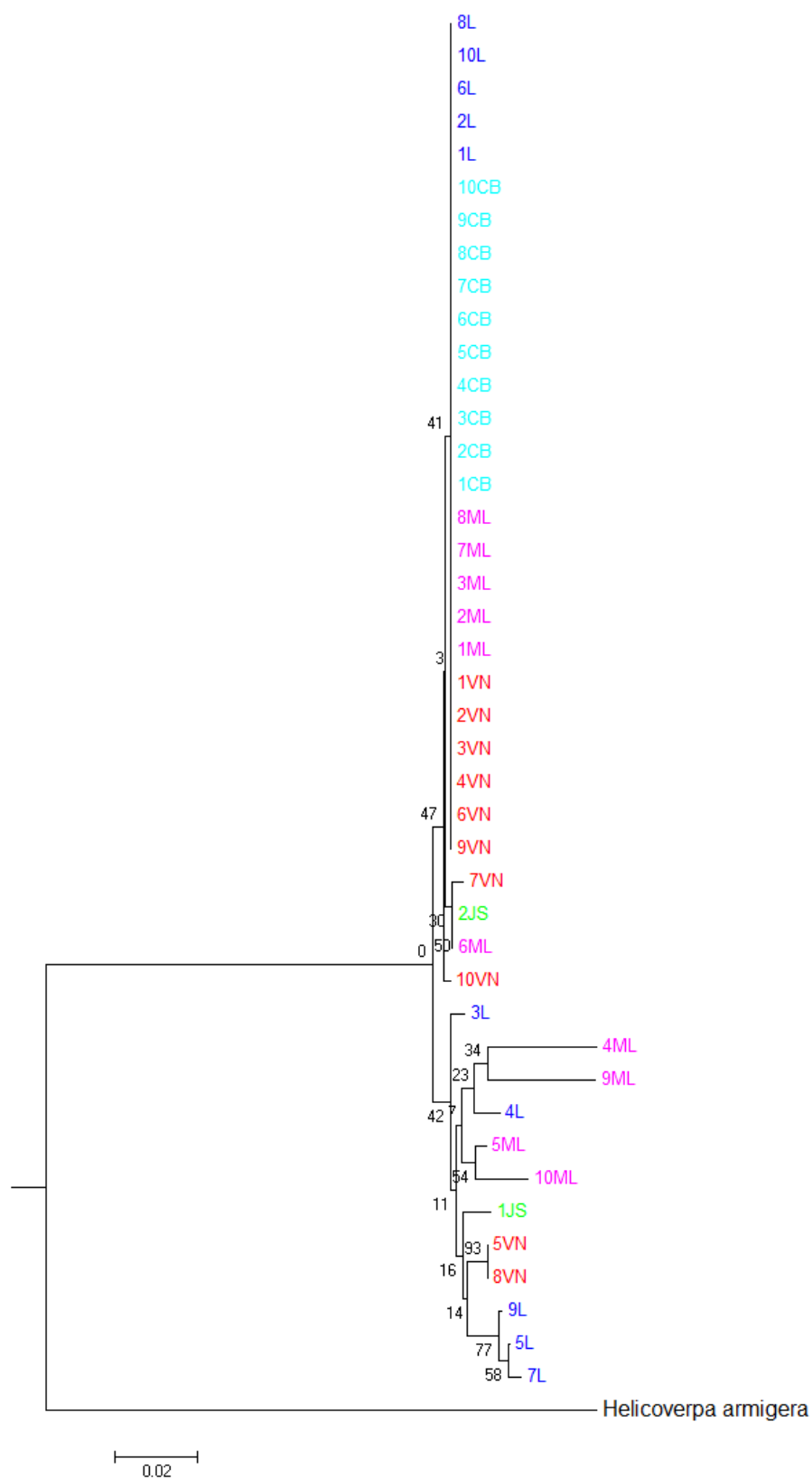
Ze získaných sekvencí byly sestrojeny dendrogramy pro dané markery metodou Minimum – Evolution (ME) (Obr. 12 – 14). Dendrogramy sestrojené metodami Maximum Likelihood (ML) a Maximum Parsimony (MP) jsou v Příloze 2 – 7. U metody Maximum Likelihood byl použit model Tamura 3 – parameter u markerů *AT* a *TPI*. Pro marker *ND5* byl vybrán model Hasegawa – Kishino – Yano. Ani v jednom případě, jak je patrné z následujících obrázků, nedošlo k rozdělení jednotlivých populací do klastrů dle geografického původu.



Obr. 12: Dendrogram AT (Minumum – Evolution, p – distance, Use all sites, Bootstrap 1000x). Strom zakořeněn pomocí motýla *Helicoverpa armigera*. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně.



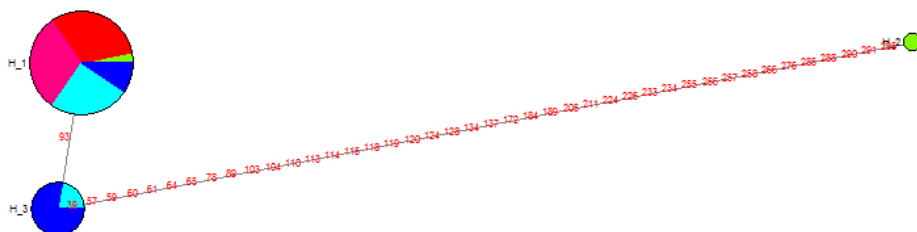
Obr. 13: Dendrogram *ND5* oblasti (Minimum – Evolution, p – distance, Use all sites, Bootstrap 1000x). Strom zakořeněn pomocí motýla *Helicoverpa armigera*. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně.



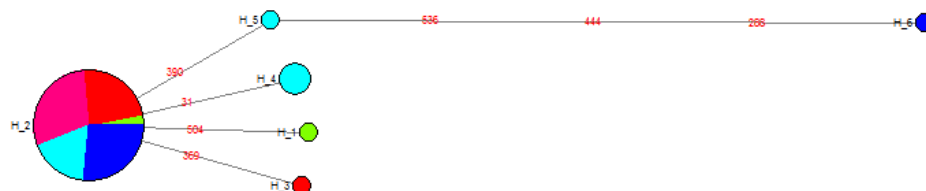
Obr. 14: Dendrogram *TPI* oblasti (Minimum – Evolution, p – distance, Use all sites, Bootstrap 1000x). Strom zakořeněn pomocí motýla *Helicoverpa armigera*. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně.

Na základě získaných frekvencí haplotypů byly graficky znázorněny vztahy mezi haplotypy u daných markerů (Obr. 15 a – c). Toto grafické znázornění bylo provedeno proto, abych se ukázalo, jak vztahy mezi haplotypy odpovídají jejich geografické poloze.

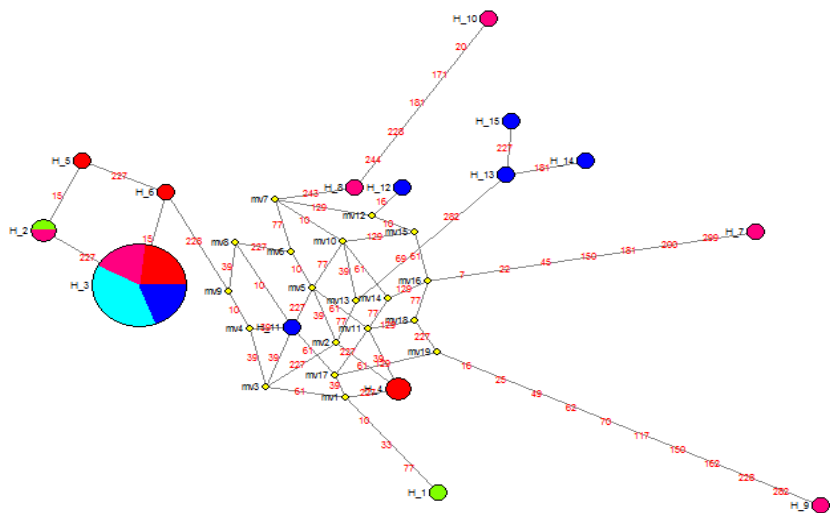
a)



b)



c)



Obr. 15: Grafické znázornění haplotypů pro jednotlivé markery (a - AT oblast, b – ND5 oblast, c – TPI oblast). Každý kruh reprezentuje 1 haplotyp a rozdělení kruhu odpovídá počtu vzorků u daných lokalit. Červeně je vyznačena lokalita Velká niva, žlutozeleně Jezerní slat', růžově Mrtvý luh, tmavě modře Libořezy a světle modře Červené blato.

Pomocí programu *Icong Congruence Test* byly porovnány topologie dendrogramů ze všech oblastí, které byly vytvořeny pomocí metody Minimum – Evolution. Zjištěné hodnoty kongruence mezi jednotlivými markery jsou zapsány v tabulce 12.

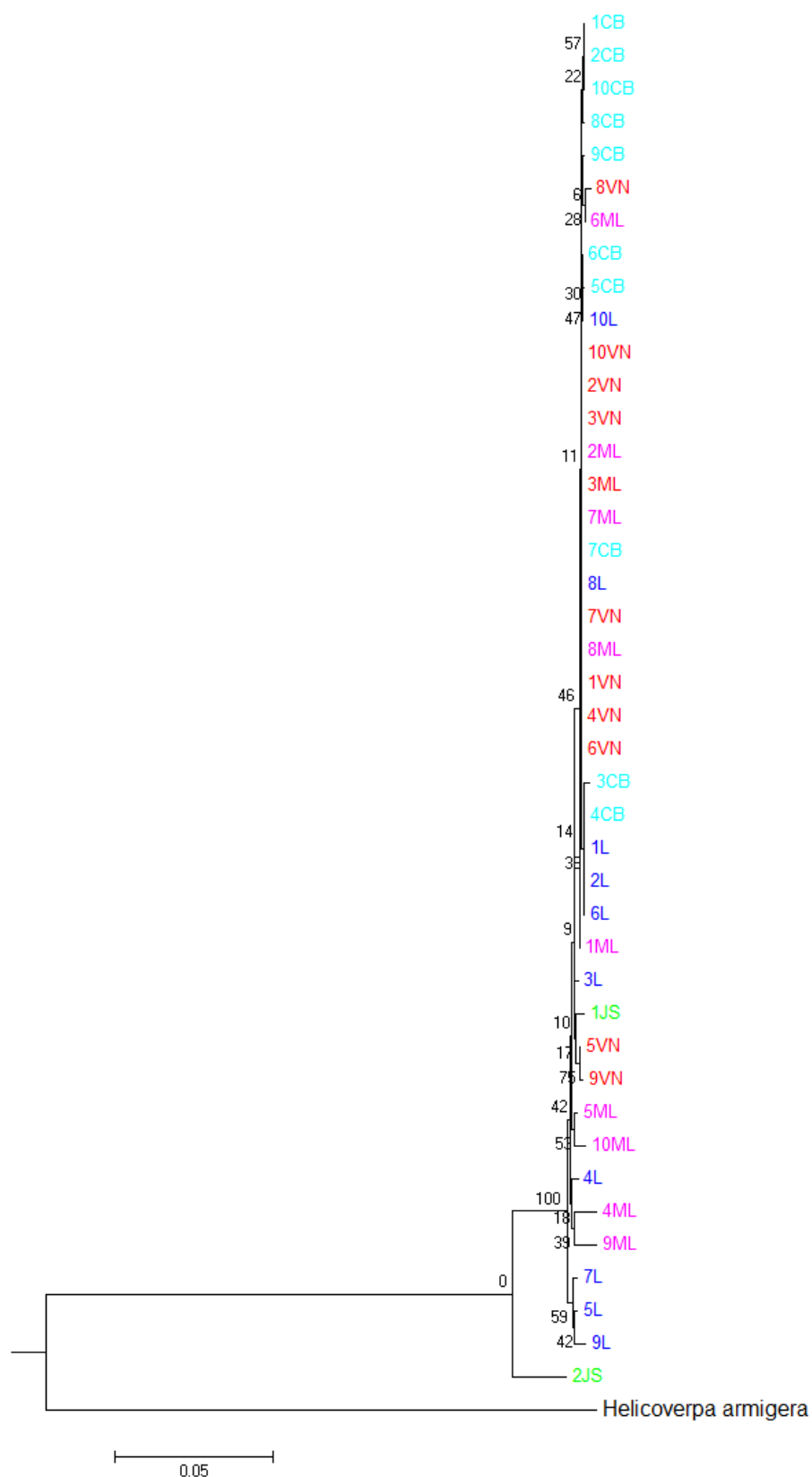
Tab. 12: Výsledky testu kongruence.

Marker	<i>AT</i>	<i>ND5</i>	<i>TPI</i>
<i>AT</i>	-	1,13 x 10 ⁻⁷	29,559 x 10 ⁻⁷
<i>ND5</i>	2,1886	-	187,084 x 10 ⁻⁷
<i>TPI</i>	0,8338	0,7295	-

Hodnoty I_{cong} jsou v levém dolním rohu, pravděpodobnosti v pravém horním.

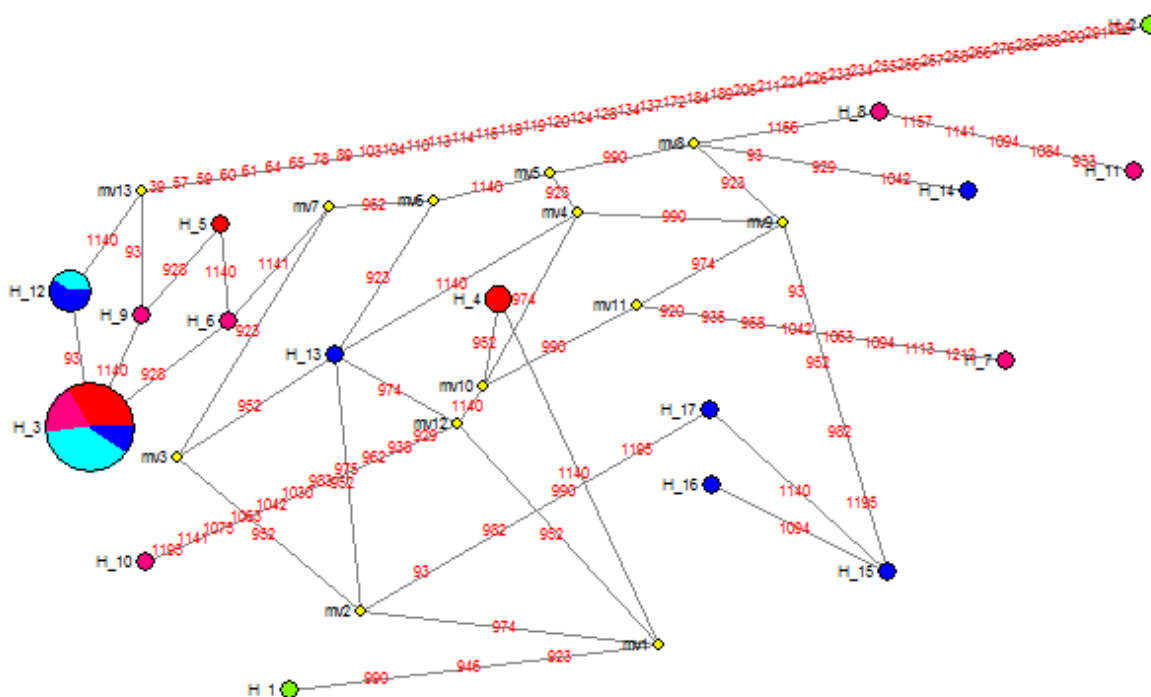
Přestože testy kongruence nebyly signifikantní, na závěr byl vytvořen spojený („concatenated“) marker, který využívá všechny sekvence (*AT* a *ND5* a *TPI*). Cílem bylo zjistit, zda takto zkombinovaný marker může přispět k rozlišení některých méně jasných klastrů.

Tímto způsobem bylo získáno 42 společných a následně z nich byl vytvořen dendrogram metodou Minimum – Evolution. Statistická podpora stromu byla testována metodou Bootstrap, 1000 opakování. Vytvořený dendrogram je znázorněn na Obr. 16.



Obr. 16: Společný dendrogram oblastí AT, ND5 a TPI (Minimum – Evolution, p – distance, Use all sites, Bootstrap 1000x). Strom zakořeněn pomocí motýla *Helicoverpa armigera*. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně.

Dále byly zjištěny haplotypy pro spojený marker. Analýza rozlišila 17 haplotypů, jejichž vztah byl graficky znázorněn (Obr. 17). Přehled sekvencí haplotypů je v Příloze 8.



Obr. 17: Grafické znázornění haplotypů u všech oblastí. Každý kruh reprezentuje 1 haplotyp a rozdělení kruhu odpovídá počtu vzorků u daných lokalit. Červeně je vyznačena lokalita Velká niva, žlutozeleně Jezerní slat', růžově Mrtvý luh, tmavě modře Libořezy a světle modře Červené blato.

5 Diskuze

5.1 Izolace DNA a metodika PCR

Jelikož byla použita pouze jedna metoda k získání DNA, a to pomocí DNAeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN), která byla úspěšná u všech analyzovaných vzorků, nebylo potřeba zkoušet jiné metody k izolaci DNA.

PCR reakce jsem prováděla podle standartního postupu. Tento postup byl úspěšný u všech vzorků, tudíž nebylo nutné měnit množství přidaných složek.

5.2 Testované markery

Na základě literatury zabývající se populační genetikou lepidopter i jiného hmyzu jsem postupně vybírala vhodné markery, u nichž byla pozorována variabilita mezi geografickými populacemi. Tyto jsem pak zkoušela naamplifikovat pomocí univerzálních i specifitějších primerů, které byly buď přejaty z literatury, nebo navrhované v naší laboratoři na základě sekvencí z druhů co nejpříbuznějších *L. lambda*.

Mezi první odzkoušené patřil marker *AT*, který se v literatuře jevil jako nejvariabilnější. V pilotním vzorku 10 sekvencí se však neprokázala žádná variabilita, proto jsem pokračovala dále s markerem *ND5*. Jaderný marker *ITS*, který je úspěšně používán u řady jiných druhů, se nepodařilo naamplifikovat. Dalšími obdobně neúspěšnými markery byly *ATP* a *ND4*. K následujícím jaderným markerům patřil soubor EPIC lokusů (*DDC*, *MPI* a *TPI*), které jsem amplifikovala pomocí primerů univerzálních pro hmyz. Z těchto se podařilo získat pouze fragment pro *TPI*.

Příčina neúspěchu bude pravděpodobně jednak vysoký obsah *AT* bází, které při uspořádání do „řetízku“ (např. AAAAAAAAAAAAAAAAAA) způsobují jednak sklouzávání DNA polymerázy, jednak mohou vytvářet sekundární sktruktury, díky nimž se nedaří PCR amplifikace nebo sekvenování. Nutno ovšem připustit i možnost, že použité primery nebyly pro dané úseky dostatečně specifické.

5.2.1 Mitochondriální marker *AT*

Zpočátku se tento marker jevil jako vhodný, díky své hypervariabilitě u mnoha druhů. Je to dokonce nejvariabilnější oblast mtDNA genomu (Uimaniemi *et al.* 2000). Podle Taylora *et al.* (1993), který navrhl, že by tato oblast mohla být slibným zdrojem polymorfních markerů pro populační genetiku a fylogenetické rekonstrukce úzce souvisejících taxonů se *AT* oblast začala používat jako molekulární marker u lepidopter. Wan *et al.* (2011) ve své studii, která ukázala rozdíl v míře genetické vzdálenosti mezi populacemi, použil markery pro *AT* oblast a *ITS2*. U *ITS2* byl stupeň genetického dělení

vyšší, což autoři zdůvodnili tím, že *AT* oblast je děděna maternálně v mtDNA segmentu, zatímco *ITS2* je zděděna ze segmentu jaderné DNA. V důsledku toho má mitochondriální genom čtyřikrát menší efektivní velikost populace, než nukleární DNA. To má za následek rychlejší upevnění a posílení populace při dělení než jaderné DNA. Toto potvrzuje i má práce, kdy se jako variabilnější jevil jaderný marker *TPI*.

Ve své práci jsem nejprve použila dvojice primerů LepAT2B/SeqLepMet, které by mohly naamplifikovat celou oblast *AT*. Zřejmě z důvodu velkého počtu A a T se mi nepodařilo získat žádné sekvence, protože polymeráza nedokázala naamplifikovat tak dlouhý a monotónní fragment. Poté jsem vyzkoušela dvojice primerů 12s/J6 – Ile, u které bylo získáno 42 sekvencí ze všech použitých vzorků. Nicméně po osekvenování všech vzorků se variabilita u daných lokalit projevila jen v 12,15% z celkové sekvence.

5.2.2 Mitochondriální marker *ND5*

Marker *ND5* poskytuje v populační genetice více rozlišení, poněvadž obecně platí, že má u bezobratlých rychlejší evoluční rychlost, která může být způsobena pozitivní selekcí (Ballard J. W. O., 2000; Meiklejohn C. D. *et al.* 2007). Mou snahou bylo osekvenovat, co největší část oblasti *ND5* pomocí dvojice primerů N5 – J – 7077/N4 – N – 8487. Tento úsek se ale naamplifikovat nepodařil, proto jsem zkusila amplifikovat kratší úsek za použití primerů N5 – J – 7572/ N4 – N – 8487.

U tohoto markeru se mi podařilo úspěšně osekvenovat 41 vzorků. I když u tohoto markeru byl osekvenován delší fragment než u *AT* oblasti, variabilita byla nižší - pouze 1,91% z celkové délky sekvence.

5.2.3 Nukleární marker *TPI*

Pro nukleární marker *TPI* bylo nejdříve vyzkoušeno více dvojic primerů, avšak nejvíce se osvědčila dvojice Tpi282f/Tpi850gR, která obsahovala jeden intron. Ačkoliv sekvenování proběhlo relativně úspěšně, bylo zřejmé, že pro dokonalé rozlišení jednotlivých haplotypů, resp. genotypů, by bylo vhodnější PCR produkty zaklonovat. K tomu jsem však z časových důvodů nepřistoupila. Pomocí již výše zmíněných primerů se mi podařilo osekvenovat 42 vzorků z pěti lokalit. I zde se projevila určitá variabilita, a to v 8,87% z celkové délky sekvence.

5.3 Genetická variabilita populací

U markeru *AT* se velká variabilita neprojevila až na oblast Jezerní slat'. Naopak u markeru *TPI* se určitá variabilita prokázala. Jako nejméně vyhovující marker se jevil *ND5*, u kterého byly již zpočátku problémy s amplifikací a sekvenováním.

Jelikož jsou populace od sebe vzdáleny a vyskytují se na izolovaných stanovištích, očekávala jsem, že nebudou sdílet společné haplotypy. V případě, že by je sdílely, tak pouze mezi oblastmi, které jsou k sobě blíže (Červené blato x Libořezy – nacházející se v Třeboňské pánvi, a Mrtvý luh x Velká niva x Jezerní slat' ležící na Šumavě). Ale ani v tomto případě tomu tak nebylo. Různé lokality většinou měly stejný dominantní (převládající sdílený) haplotyp, i když se například u *TPI* markeru objevilo 15 haplotypů. Tento výsledek může vyplývat z genetického toku (migrace) nebo polymorfismu předcházejících generací. Tento model může vyplývat i z kombinace pomalé evoluce a delší doby, která je potřebná pro třídění jaderného polymorfismu v dané linii, jak tomu bylo i v práci Kajtocha, (2011). Ten zjistil, že to může být ovlivněno i pohlavím, kdy u brouka *Centricnemus leucogrammus* jsou obě pohlaví nelétavá. Tím pádem nedochází, k tomu že by sameček byl více stěhovavý než samička. Určitou úlohu by mohlo hrát snížení vnitropopulační variability genetickým „bottleneckem“, ovšem testy neutrality tento jev nepotvrdily, jelikož pro celkovou populaci byly hodnoty D u Tajimova testu záporné a výrazně odchýleny od nuly u oblastí *AT* a *ND5*, i když se jedná o nekódující část mtDNA genomu.

5.4 Genetická diverzita populací

V další fázi analýz jsem obrátila svou pozornost na genetickou diverzitu populací. Například v práci Kajtocha *et al.* (2013), který zjišťoval genetickou rozdílnost u populace v Polsku na mandelince *Cheilotoma musciformis* (obývá pouze 3 oblasti v Polsku), dospěl k výsledkům, že jediný rozdíl byl pozorován u *COI* - pouze 1 mutace. To vedlo k extrémně nízké úrovni genetické diferenciace, což není v souladu s geografickou izolací. Jeho závěr je podobný jako v mém případě. U populací není signifikantní závislost mezi genetickou a geografickou vzdáleností, což je v souladu s hodnotami F_{ST} naznačujících u některých lokalit vysokou migraci. Vysvětlením může být to, že ubyl počet jedinců na daném rašeliništi, což vedlo k drastickému snížení jejich genetické rozmanitosti. K tomu mohlo dojít zejména u populace z lokality Jezerní slat', kde byli získáni pouze dva jedinci z důvodu nepříznivých klimatických podmínek za poslední roky. Živná rostlina důležitá pro přežití motýla *Lithophane lambda* byla spálena mrazem.

Obdobná situace nastala i u vytvořených dendrogramů. Očekávala jsem, že se jednotlivci rozdělí do klastrů podle jejich geografického výskytu, ale ani v jednom případě k tomu nedošlo. Tento výsledek potvrdil i výpočet genetické vzdálenosti mezi populacemi, kdy dané populace si jsou velmi podobné, proto mezi nimi nehraje roli jejich geografická vzdálenost.

K rozlišení populací nedošlo ani při vytvoření konkatenovaného dendrogramu, který jsem zkonstruovala ze spojení všech úspěšně získaných sekvencí. Jak jsem ale očekávala, výsledný dendrogram nerozdělil populace do jednotlivých klastrů, což naznačil i fakt, že opět sdílejí stejné haplotypy.

Jednou z možností, které mohly ovlivnit výsledky testů, jsou i relativně malé počty vzorkovaných jedinců. U některých lokalit by toto mohlo být napraveno opakovaným sběrem, ovšem např. u lokality Jezerní slat' je toto v důsledku ekologických změn na stanovišti vyloučeno.

Pro další studium *Lithophane lambda* by bylo vhodné zaměřit se spíše na jaderný genom, který z výsledků vycházel jako nejvhodnější marker. Nutné by bylo získané PCR produkty zaklonovat, popřípadě použít specifitější primery.

Z mtDNA genomu by bylo možné vybrat jiný marker, například porovnáním celých mitogenomů u příbuzných druhů a otestováním, zda se všechny geny vyvíjejí neutrálně, protože selekce může zastírat působení demografických procesů. Ten by se následně porovnal s nukleárním markerem.

6 Závěr

Podářilo se úspěšně naamplifikovat a osekvenovat dvě oblasti mtDNA genomu, *AT* oblast a *ND5*. Navzdory tomu, tyto markery nebyly schopné rozdělit populace na základě jejich variability, jak se očekávalo dle studované literatury. Důležité je zohlednit fakt, že se jedná o oblast s vysokým výskytem *AT*. Z tohoto důvodu bych navrhla zkusit osekvenovat větší část této oblasti, zda by se v ní projevila větší variabilita.

Z jaderného genomu se podařilo získat sekvence pouze z markeru *TPI*. Tento marker se jevil variabilnější než mitochondriální markery. Nicméně ani pomocí *TPI* se nepodařilo rozdělit jedince do populací podle jejich výskytu.

U celkové populace vyšly testy neutrality signifikantní, což naznačuje možný „bottleneck“ u zakládající populace, případně působení selekce. V dalších studiích by bylo vhodné pokusit se vyvzorkovat co největší počet jedinců z různých lokalit v celém areálu rozšíření daného druhu a pokusit se zjistit, která lokalita obsahuje zakládající populaci.

7 Literatura

- Albrecht J., Mackovčín P. a Sedláček M., 2003:** Českobudějovicko: Chráněná území ČR, svazek VIII. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR a EkoCentrum Brno, 536 pp.
- Ballard J. W. O., 2000:** Comparative genomics of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans*. *J. Mol. Evol.* 51: 64 – 75.
- Bargues M. D., Marcilla A., Ramsey J. M., Dujardin J. P., Schofield C. J. a MasComa S., 2000:** Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95: 567 – 573.
- Beltrán M., Jiggins Ch. D., Bull V., Linares V., Mallet J., Owen McMillan W. a Bermingham E., 2002:** Phylogenetic Discordance at the Species Boundary: Comparative Gene Genealogies Among Rapidly Radiating *Heliconius* Butterflies. *Mol. Biol. Evol.* 19 (12): 2176 – 2190.
- Bezděk A., Jaroš J., a Spitzer K. 2006:** Spatial distribution of ground beetles (Coleoptera: Carabidae) and moths (Lepidoptera) in the Mrtvý Luh bog, Šumava Mts. (Central Europe): a test of habitat island community. *Biodiversity and Conservation* 15: 395 – 409.
- Caterino M. S., Cho S. a sperling F. A. H., 2000:** The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of Babel. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 1 – 54.
- Clary D. O. a Wolstenholme D. R., 1985:** The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nukleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, Vol. 22, No. 3, 252 – 271 pp.
- Clayton D. A., 1992:** Transcription and Replication of Animal Mitochondrial DNAs. *Internacional Review of Cytology.* 141: 217 – 232.
- Clement M., Posada D. a Crandall K. A., 2000:** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657 – 1659.
- Corte-Real H. B. S. M., Dixon D. R. a Holland P. W. H., 1994:** Intron-targeted PCR: a new approach to survey neutral DNA polymorphism in bivalve populations. *Marine Biology.* 120: 407 – 413.
- Daguin C. a Borsa P., 1999:** Genetic characterisation of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in North West Africa using nuclear DNA markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 235: 55 – 65.
- Douglas L. J. a Haymer D. S., 2001:** Ribosomal ITS1 polymorphisms in *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae). *Entomological Society of America* 94: 726 – 731.

- Dugan K. A., Lawrence H. S., Hares D. R., Fisher C. L. a Budowle B., 2002:** An Improved method for post – PCR purification for mtDNA sequence analysis. *Journal of Forensic Science*. 47 (4): 811 – 8.
- Embong Z., Hitam W. H. W., Yean Ch. Y., Rashid N. H. A., Kamarudin B., Abidin S. K. Z., Osman S., Zainuddin Z. F. a Ravichandran M., 2008:** Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratics. *BMC Ophthalmology*. 8: 7.
- Excoffier L. a Lischer H. E. L., 2010:** Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564 – 567.
- Frankham R. Ballou J. D. a Briscoe D. A., 2002:** Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hacker H. a Müller J. 2006:** Die Schmetterlinge der bayerischen Naturwaldreservate. Arbeitsgemeinschaft Bayerischer Entomologen e.V. Bamberg, 272 pp.
- Henrikson B. – I., 2006:** Sphagnum mosses as a microhabitat for invertebrates in acidified lakes and colour adaptation and substrate preference in *Leucorrhinia dubia* (Odonata, Anisoptera). *Ecography* 16: 143 – 153.
- Holman J., 1996:** *Symydobius nanae* sp. n. (Sternorrhyncha: Aphidoidea: Aphididae) and other aphids living on *Betula nana* in Šumava National Park, Czech Republic. *Eur. J. Entomol.* 93: 239 – 48.
- Jankovská V., 1995:** Relationship between the Late Glacial and Holocene vegetation and the animal component of their ecosystems. *Geolines* 2: 11 – 16.
- Jaroš J., Spitzer K. a Zikmundová H., 2014:** Variability of Lepidoptera communities (moths and butterflies) along an altitudinal gradient of peat bogs the Třeboň Basin up to the Bohemian Forest (South Bohemia, Central Europe). *Silva Gabreta* 20: 55 – 95.
- Kajtoch L., 2011:** Conservation genetics of xerothermic beetles in Europe: the case of *Centricnemus leucogrammus*. *J. Insect Conserv.* 15: 787 – 797.
- Kajtoch L., Kubisz D., Lachowska – Cierlik D. a Mazur M. A., 2013:** Conservation genetics of endangered leaf-beetle *Cheilotoma musciformis* populations in Poland. *J. Insect Conserv.* 17: 67–77.
- Krogerus R., 1960:** Ökologischen Studien über nordischen Moorarthropoden. Artenbestand, ökologische Faktoren, Korrelation der Arten. *Soc. Sci. Fenn. Comm. Biol.* 21: 1 – 238.
- Lessa E. P., 1992:** Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. *Mol. Biol. Evol.* 9: 323 – 330.

- Librado P. a Rozas J., 2009:** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451–1452.
- Loxdale H. D. a Lushai G., 1998:** Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research* 88: 577 – 600.
- Malicky M., Hauser E., Huemer P. a Wieser C. 2000:** Verbreitungsatlas der Tierwelt Österreichs: Noctuidae sensu classico. *Stapfia*. 74: 3 – 278.
- Mantel N., 1967:** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209 – 220.
- Meiklejohn C. D., Montooth K. L. a Rand D. M., 2007:** Positive and negative selection on the mitochondrial genome. *Trends Genet.* 23: 259 – 263.
- Nagoshi R. N., 2010:** The Fall Armyworm Triose Phosphate Isomerase (*Tpi*) Gene as a Marker of Strain Identity and Interstrain Mating. *Annals of the Entomological Society of America*. 103 (2): 285 – 286.
- Nekola J. C., 1999:** Paleoreugia and neoreugia: the influence of colonization history on community pattern and proces. *Ecology* 80: 2459 – 2473.
- Nekola J. C. a Kraft C. E., 2002:** Spatial constraint of peatland butterfly occurrences within a heterogenous landscape. *Oecologia* 130: 53 – 61.
- Neuhäusl R., 1972:** Subkontinentale Hochmoore und ihre Vegetation. *Studie ČSAV*. 13: 1 – 121.
- Néve G., Pavličko A. a Konvička M., 2009:** Loss of genetic diversity through spontaneous colonization in the bog fritillary butterfly, *Procllossiana eunomia* (Lepidoptera: Nymphalidae) in the Czech Republic. *Eur. J. Entomol.* 106: 11 – 19.
- Novák I. a Spitzer K., 1972:** Výsledky faunisticko-ekologického studia Lepidopter (Noctuidae a Geometridae) rašeliniště Mrtvý luh u Volar a okolí [Ergebnisse des faunistisch-ökologischen Studiums der Lepidopteren-fauna (Noctuidae a Geometridae) des Hochmoores Mrtvý luh bei Volary and dessen Umgebung]. *Sborník Jihočeského Muzea v Českých Budějovicích, Přírodní Vědy*. 12 (1): 1– 63.
- Palumbi S. R., 1995:** Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In: *Molecular Systematics* 2nd edn (eds Hillis D., Moritz C.), pp. 205 – 247. Sinauer, Sunderland, MA.
- Pax F., 1916:** Die Tierwelt der deutschen Moore und ihre Gefährdung durch Meliorierungen. *Beitr. Naturdenkmal.* 5: 236 – 248.
- Peus F., 1928:** Beiträge zur Kenntnis der Tierwelt nordwestdeutscher Hochmoore. *Z. Morphol. Oekol.* 12: 533 – 683.
- Peus F., 1932:** *Die Tierwelt der Moore unter besonderer Berücksichtigung der europäischen Hochmoore*. Berlin: Borntraeger. 277 pp.

- Povolný D., Spitzer K. a Marek J., 1965:** Versuch einer zoozöologischer Auswertung der Noctuidenfauna des südböhmischen Hochmoores bei Libořezy. *Acta Faunistica Entomologica Musei Nationalis Pragae*. 11: 245 – 264.
- Reichle D. E., 1996:** Some Pselaphid beetles with boreal affinities and their distribution along the postglacial fringe. *Syst. Zool.* 15: 330 – 344.
- Ronkay L., Yela J. L. a Hreblay M., 2001:** Hadeninae II. – Noctuidae Europae, volume 5, Sorø.
- Rydin H. a Jeglum L., 2006:** The biology of peatlands. Oxford Universit Press, Oxford, 343 pp.
- Schlötterer Ch., Hauser M. T., von Haeseler A. a Tautz D., 1994:** Comparative Evolutionary Analysis of rDNA ITS Regions in Drosophila. *Mol. Biol. Evol.* 11 (3): 513 – 522.
- Simon Ch., Frati F., Beckenbach A. Crespi B., Liu H a Flook P., 1994:** Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*. 87 (6): 651 – 701.
- Peakall R. a Smouse P. E., 2012:** GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 28: 2537 – 2539.
- Spitzer K., Jaroš J. a Svensson I., 1991:** Geographical variation in food plant selection of *Eupithecia gelidata* Möschler, 1860 (Lepidoptera, Geometridae). *Entomol. Fenn.* 2: 33 – 36.
- Spitzer K. a Jaroš J., 1993:** Lepidoptera associated with the Červené Blato bog (Central Europe): Conservation implications. *European Journal of Entomology* 90: 323 – 336.
- Spitzer K., Bezděk A. a Jaroš J. 1999:** Ecological succession of a relict Central European peat bog and variability of its insect biodiversity. *Journal of Insect Conservation* 3: 97 – 106.
- Spitzer K., Jaroš J. a Bezděk A., 2003:** Leafspinning moths (Lepidoptera) feeding on *Vaccinium uliginosum* L. along an ecological gradient of central European peat bogs. *Entomol. Fenn.* 14: 46 – 52.
- Spitzer K. a Danks H. V., 2006:** Insect biodiversity of boreal peat bogs. *Ann. Rev. Entomol.* 51: 137 – 161.
- Šula J. a Spitzer K., 2000:** Allozyme polymorphism in isolated populations of the moth *Coenophila subrosea* (Lepidoptera: Noctuidae) from the Central European peat bogs. *Eur. J. Entomol.* 97: 7 – 12.

Šumpich J., 2006: Fauna motýlů dářských rašeliňů ve Źďářských vrůích [Lepidopteran fauna (Lepidoptera) of peat bogs near Malé and Velké Dářko lakes in the Źďářské vrchy Hills]. *Klapalekiana* 42: 235 – 326.

Šumpich J., 2008: Výsledky průzkumu motýlí fauny (Lepidoptera) Knížecích Plání na Šumavě. Results of the survey of lepidopteran fauna (Lepidoptera) of Knížecí Pláně in the Bohemian Forest. *Silva Gabreta* 14: 49 – 72.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. a Kumar S., 2011: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731 – 2739.

Taylor M. F., McKechnie S. W., Pierce N. a kreitman M., 1993: The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 10 (6): 1259 – 1272.

Templeton A. R., Crandall K. A. a Sing C. F., 1992: A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*. 132: 619 – 633.

Turlure C., Choutt J., Baguette M. a Dyck H., 2010: Microclimatic buffering and resource – based habitat in a glacial relict butterfly: significance for coservation under climate change. *Global Change Biology*. 16: 1883 – 1893.

Uimaniemi L., Orell M., Mönkkönen M., Huhta E., Jokimäki J. a Lumme J., 2000: Genetic diversity in the Siberian jay *Perisoreus infaustus* in fragmented old – growth forests of Fennoscandia. *Ecography*. 23: 669 – 677.

Wan X., Li J., Kim M. J., Park H. Ch., Kim S. – S. a Kim I., 2011: DNA Sequence of the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), Determined by Mitochondrial A+T – rich Region and Nuclear ITS2 Sequence. *Biochem. Genet.* 49: 760 – 787.

White T. J., Bruns T. Lee S. Taylor J., 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York. pp. 315 – 332.

Zhang D. X. a Hewitt G. M., 1997: Insect Mitochondrial Control Region: A Review of its Structure, Evolution and Usefulness in Evolutionary Studies. *Biochemical Systematics and Ecology*. 25 (2): 99 – 120.

Internetové zdroje:

<http://www.cals.ncsu.edu>

<http://ziva.avcr.cz>

<http://www.ceskehory.cz>

<http://www.sumavaregion.cz>

<http://www.sumavanet.cz>

<http://www.cittadella.cz>

<http://www.kultura.cz>

<http://trebonsko.ochranaprirody.cz>

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MT-ND5>

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MT-ND4>

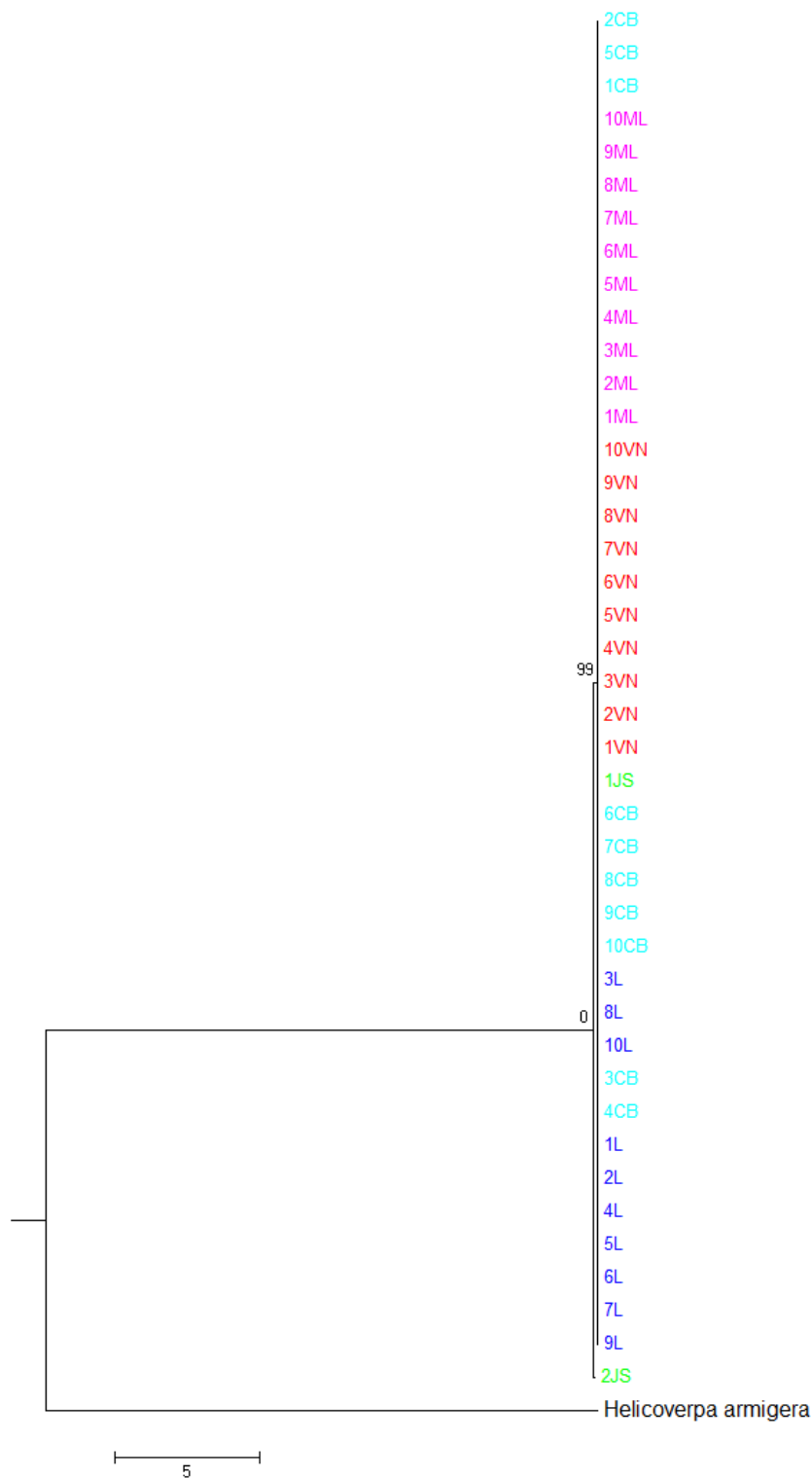
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

8 Přílohy

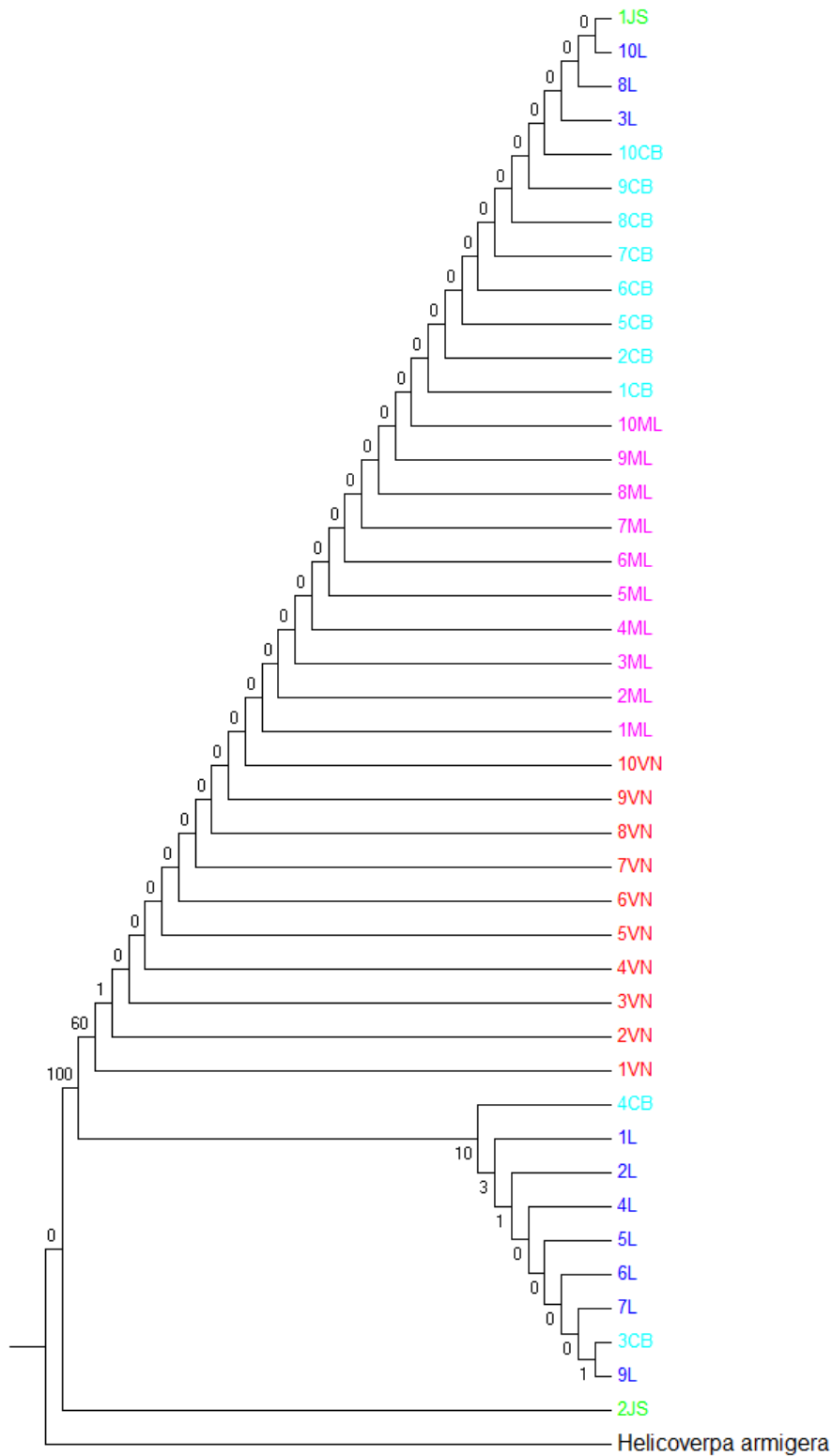
Příloha 1: Sekvence haplotypů u jednotlivých markerů.

Sekvence haplotypů u jednotlivých markerů	
Haplotyp	Sekvence haplotypu u AT oblasti
Hap_1	TAAATATAACATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAA
Hap_2	ATTTATATGTGAAAATTAATGATAGTGTTTAACTTGAGAAGG
Hap_3	TAAATATAATATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAA
Haplotyp	Sekvence haplotypu u ND5 oblasti
Hap_1	AAGGTTG
Hap_2	AAGGTAG
Hap_3	AATGTAG
Hap_4	GAGGTAG
Hap_5	AAGATAG
Hap_6	ATGAAAA
Haplotyp	Sekvence haplotypu u TPI oblasti
Hap_1	CTTCGAAATGGTCACCTTGCGGCAGAAGG
Hap_2	CTGCGAAGGGGACACTTTGCGGCGAAAGG
Hap_3	CTGCGAAGGGGACACTTTGCGGCAAAAGG
Hap_4	CCTCGAAGTGGTCACTTTGCGGCGGAAGG
Hap_5	CTTCGAAGGGGACACTTTGCGGCGAAAGG
Hap_6	CTTCGAAGGGGACACTTTGCGGCAAAAGG
Hap_7	ACTCGAGCCGTACCTGCCGAAGGAAGC
Hap_8	CTTCGAAGCGGACACCTTGCGGCGGGAGG
Hap_9	CCTTGACGCGATTAATCGCAGGCAAAAAG
Hap_10	CTTCAAAGCGGACACCTTGCCACGAGGGG
Hap_11	CCTCGAAGCGGACACTTTGCGGCAGAAGG
Hap_12	CTTTGAAGCGGACACCTGGCGGCGGAAGG
Hap_13	CCTCGAAGTGGACGCCTTGCGGCGGAAAG
Hap_14	CCTCGAAGTGGACGCCTTGCGACGAAAG
Hap_15	CCTCGAAGTGGACGCCTTGCGGCAGAAAG

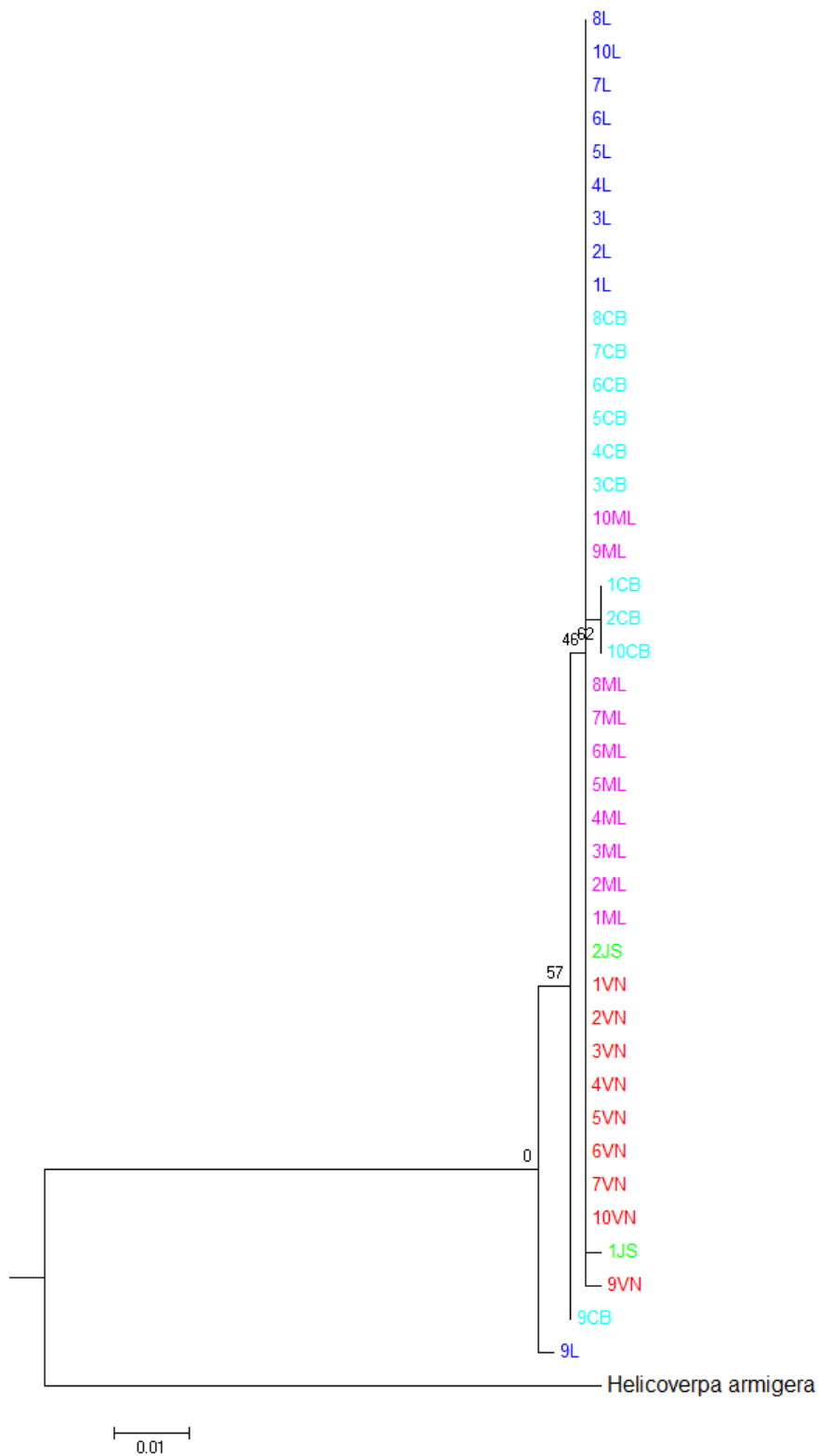
Příloha 2: Dendrogram AT (Maximum Likelihood, Tamura 3 – parameter, use all sites, Bootstrap 1000x). Zakořeněný strom pomocí motýlu *Helicoverpa armigera*. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně.



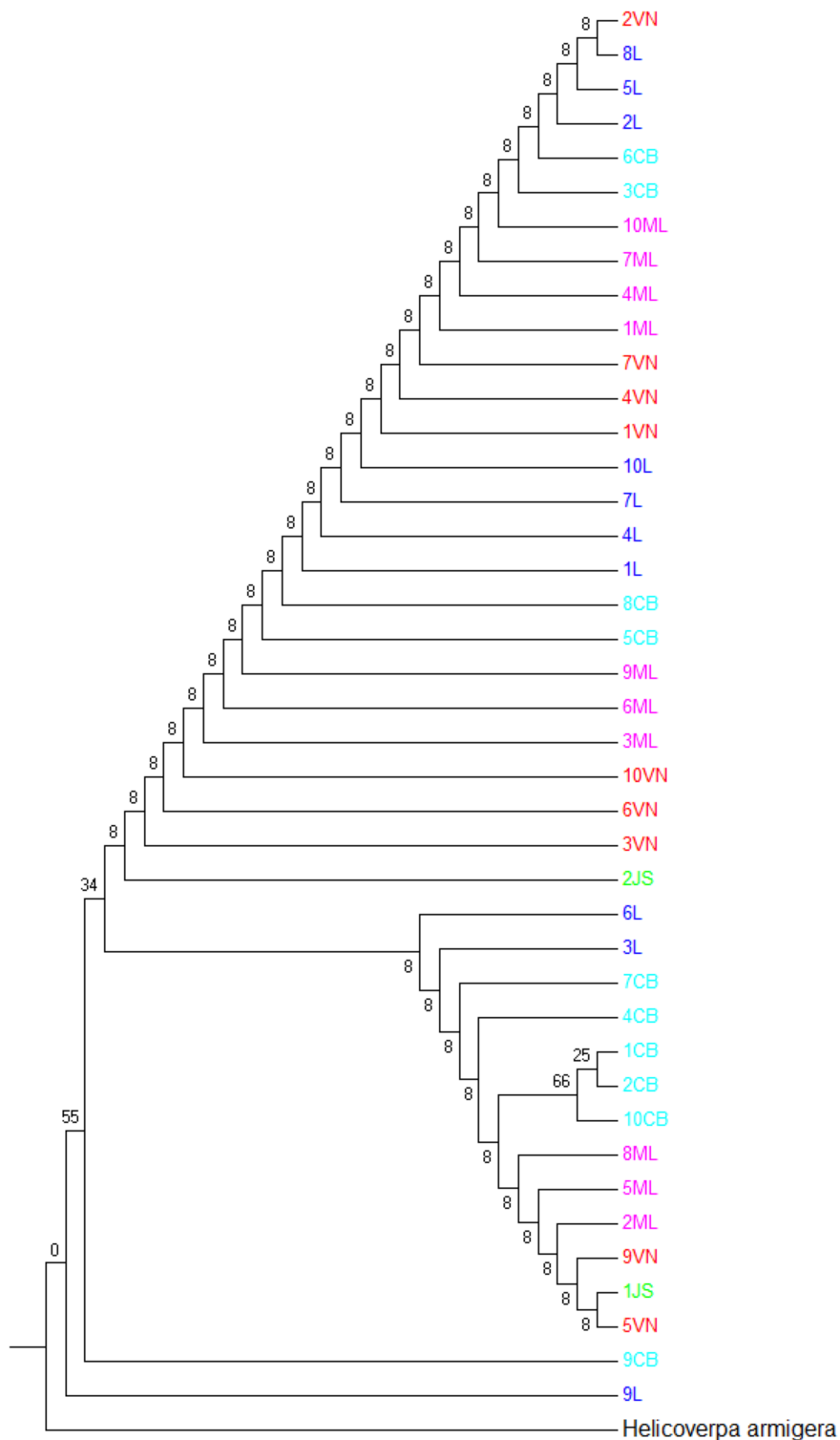
Příloha 3: Dendrogram AT (Maximum Parsimony, Use all sites, Bootstrap 1000x). Zakořeněný strom pomocí motýlu *Helicoverpa armigera*. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně.



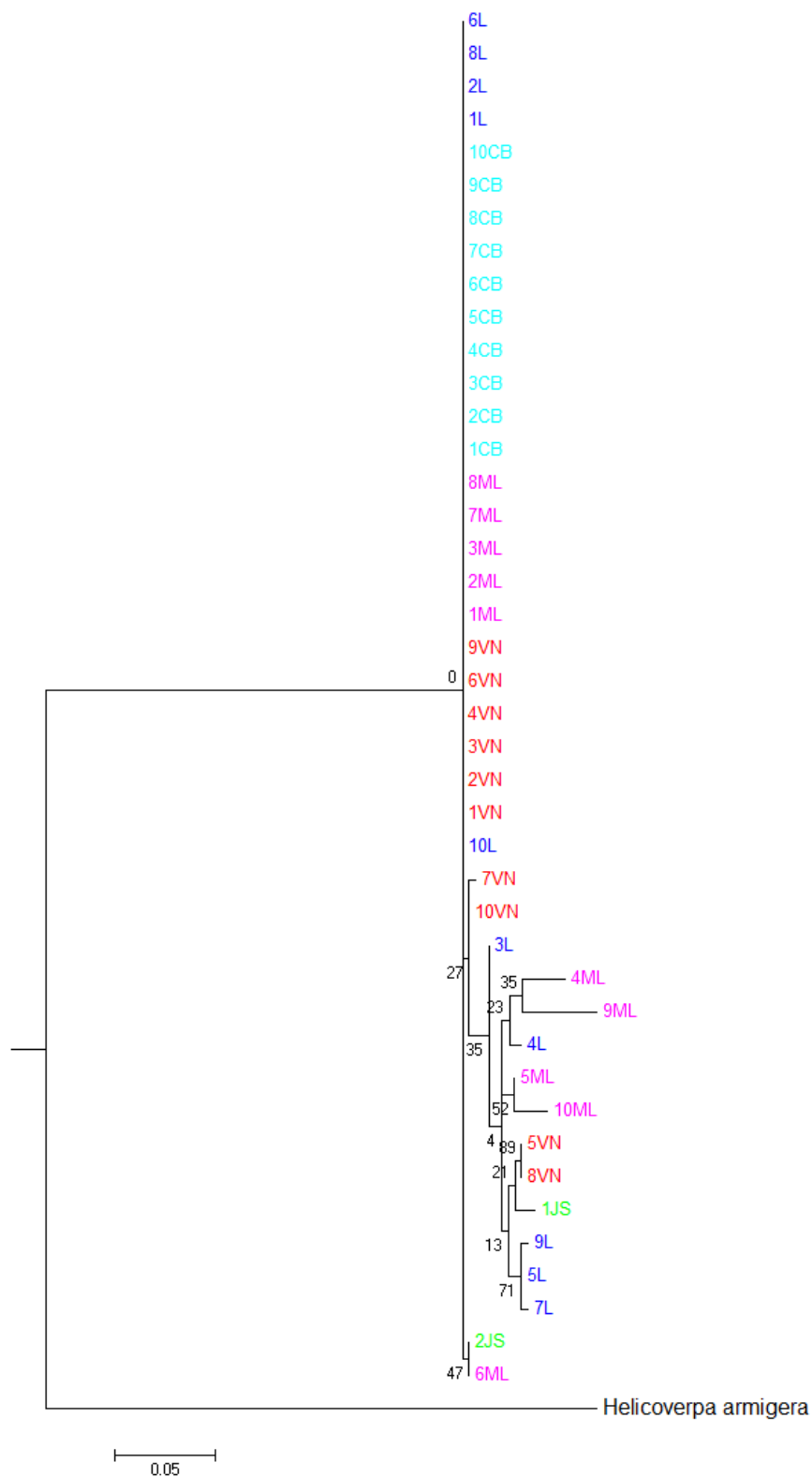
Příloha 4: Dendrogram oblasti ND5 (Maximum Likelihood, Hasegawa – Kishino – Yano, use all sites, Bootstrap 1000x). Zakořeněný strom pomocí motýlu *Helicoverpa armigera*. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně.



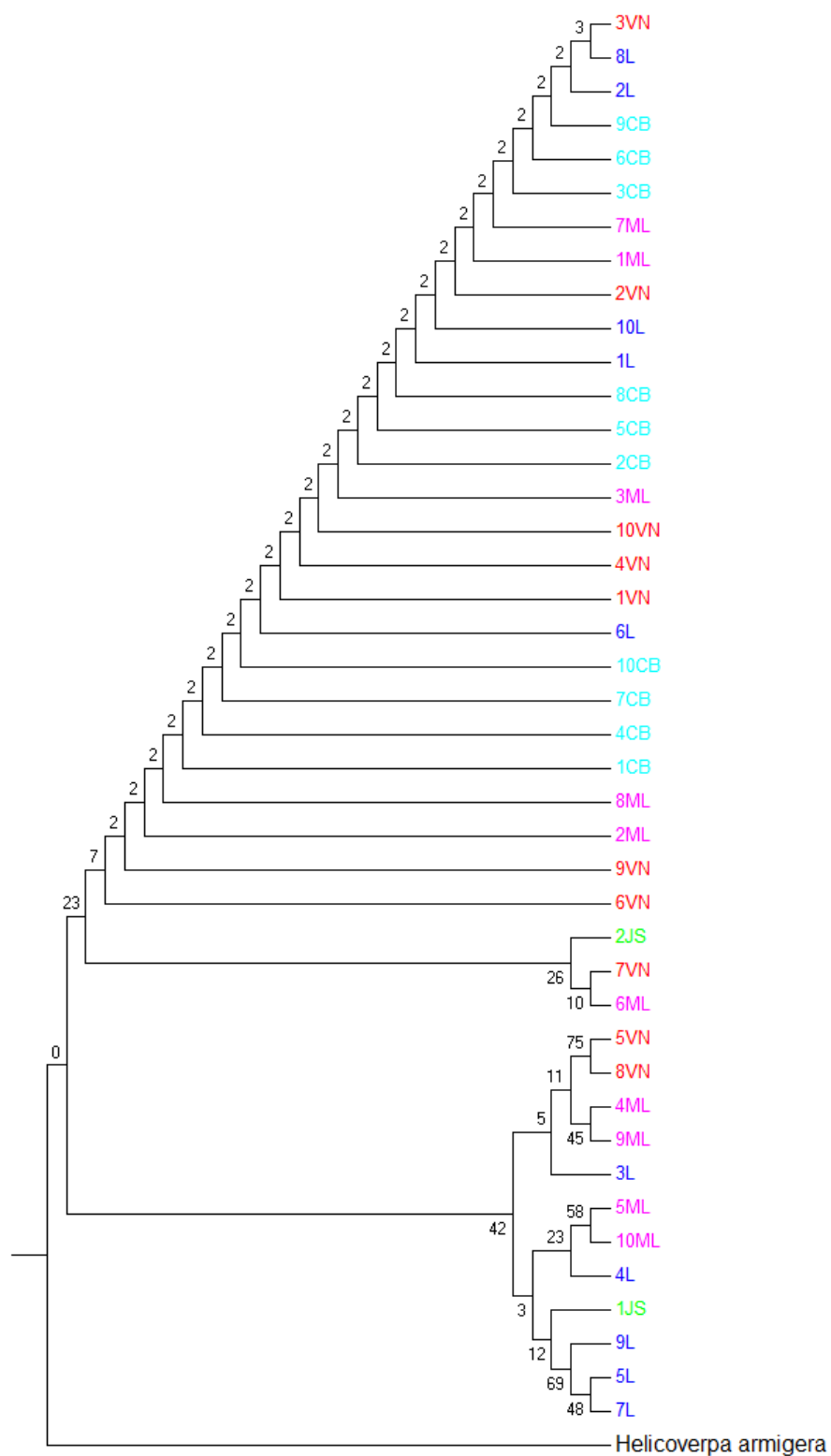
Příloha 5: Dendrogram oblasti ND5 (Maximum Parsimony, Use all sites, Bootstrap 1000). Zakořeněný strom pomocí motýlu *Helicoverpa armigera*. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně



Příloha 6: Dendrogram oblasti *TPI* (Maximum Likelihood, Tamura 3 – parameter, use all sites, Bootstrap 1000x). Zakořeněný strom pomocí motýlu *Helicoverpa armigera*. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně.



Příloha 7: Dendrogram oblasti *TPI* (Maximum Parsimony, Use all sites, Bootstrap 1000x). Zakořeněný strom pomocí motýlu *Helicoverpa armigera*. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně



Příloha 8: Přehled sekvencí haplotypů.

Haplotyp	Sekvence haplotypů
Hap_1	TAAATATAACATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTCGAAATGGTCACCTTGCGGCAGAAGG
Hap_2	ATTTATATGTGAAAATTAATGATAGTGTTTAAACTTGAGAAGGCTGCGAAGGGGACACTTTGCGGCGAAAGG
Hap_3	TAAATATAACATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTGCGAAGGGGACACTTTGCGGCAAAAGG
Hap_4	TAAATATAACATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTCGAAGTGGTCACCTTGCGGCGGAAGG
Hap_5	TAAATATAACATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTCGAAGGGGACACTTTGCGGCGAAAGG
Hap_6	TAAATATAACATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTCGAAGGGGACACTTTGCGGCAAAAGG
Hap_7	TAAATATAACATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACTCGCAGCCGTCACCTGCCGAAGGAAGC
Hap_8	TAAATATAACATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTCGAAGCGGACACCTTGCGGCGGGAGG
Hap_9	TAAATATAACATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTGCGAAGGGGACACTTTGCGGCGAAAGG
Hap_10	TAAATATAACATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTTGACGCGATTAATCGCAGGCAAAAAG
Hap_11	TAAATATAACATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTCAAAGCGGACACCTTGCCACGAGGGG
Hap_12	TAAATATAATATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTGCGAAGGGGACACTTTGCGGCAAAAGG
Hap_13	TAAATATAACATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTCGAAGCGGACACTTTGCGGCAGAAGG
Hap_14	TAAATATAATATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTTGAAGCGGACACCTGGCGGCGGAAGG
Hap_15	TAAATATAATATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTCGAAGTGGACGCCTTGCGGCGGAAAG
Hap_16	TAAATATAATATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTCGAAGTGGACGCCTTGCACGGAAGG
Hap_17	TAAATATAATATTGTAATTATTATAAAAAATTTTCCTGAGGAACCTCGAAGTGGACGCCTTGCGGCAGAAGG