

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra genetiky a šlechtění**



**Populační struktura mandelinky bramborové v České republice**

**Diplomová práce**

**Bc. Michal Matyska**

**Rostlinná produkce**

**Ing. Petr Sedlák, Ph.D.**

© 2020 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Populační struktura mandelinky bramborové v České republice" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval v první řadě panu Ing. Petru Sedlákoví, Ph.D. za nesmírně obětavé vedení této diplomové práce. Velice si vážím jeho velmi lidského, a přitom stále profesionálního přístupu ke studentům jak při práci v laboratoři, tak při konzultacích, při kterých nechával velký prostor osobní iniciativě jednotlivce. Dále bych zde chtěl poděkovat Ing. Vladimíře Sedlákové Ph.D, za spoluvedení praktické části této práce a za její úžasný přístup ke studentům. Poděkování také patří svým rodičům, kteří mi poskytli podmínky umožňující tuto práci sepsat, ale i svému bratru Mgr. Janu Matyskovi, o jehož zkušenosti jsem se mohl opřít. Ing. Marku Schwarzovi a Ing. Anně Sattranové děkuji za jejich užitečné rady při práci s počítačovými programy. Na závěr Vojtěchu Horovi pak patří velké poděkování za jazykovou korekci anglického abstraktu této práce.

# Populační struktura mandelinky bramborové v České republice

## Souhrn

Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*, Say) je vážný škůdce rostlin lilku bramboru (*Solanum tuberosum*). Za situace slábnoucích účinků chemické kontroly je věnována vyšší pozornost postupům integrované ochrany rostlin. Popsání genetické struktury populací tohoto brouka na našem území je nezbytnou součástí řady účinných preventivních a kurativních opatření.

Pomocí optimalizovaného panelu 9 mikrosatelitních markerů bylo testováno 502 jedinců mandelinky bramborové pocházejících ze 14 lokalit České republiky a z jedné lokality ze Slovenska. Dvě české lokality, Travčice A, Travčice B, pak byly specifické tím, že jedinci reprezentovali potomstva dvou náhodně vybraných matek.

Na základě tohoto optimalizovaného panelu lokusů byl stanoven průměrný počet alel na lokus jednotlivých populací (N) [průměr: 3,22±0,48], míra očekávané heterozygotnosti (He) [průměr: 0,52±0,07], zjištěné heterozygotnosti (Ho) [průměr: 0,44±0,08], fixační index jednotlivých populací (F) [průměr: 0,164±0,098], koeficient inbreedingu uvnitř populací (Fis) [průměr 0.148], koeficient inbreedingu napříč populacemi – Fst [průměr: 0,071±0,043] a Genetická distance (D') [průměr: 0,088±0,048]. Byla provedena analýza molekulární variance AMOVA a analýza hlavních koordinát PCoA.

Na základě zjištěných výsledků je možné konstatovat, že uvnitř populací existuje významná genetická diference. Zároveň je však také možné konstatovat, že vzájemná diference jednotlivých populací doposud nedosáhla takové úrovně, aby bylo možné na našem území hovořit o existenci různých populačních klastrů.

**Klíčová slova:** mandelinka bramborová, *Leptinotarsa decemlineata*, mikrosatelitní DNA, genetická diverzita, populační genetika.

# Population structure of Colorado potato beetle in the Czech Republic

## Summary

The Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, Say) is a serious pest of the potato crop (*Solanum tuberosum*). It is necessary to develop new ways of integrated plant protection of potatoes because of the fading effectivity of chemical control. Describing the genetic structure of this pest can be a very useful tool for a lot of preventive or curative measures.

In this thesis we use an optimized panel of 9 microsatellite markers for testing 502 samples of the Colorado potato beetle. The beetles' samples were collected from fourteen localities in the Czech Republic and from one locality in Slovakia. Two of the Czech localities (Travčice A, Travčice B) are specific because they represent two families of two independent mothers.

On the basis of the analysis of these samples we obtained these results: The mean number of alleles per locus of each population [ $3.22 \pm 0.48$ ], expected heterozygosity ( $H_e$ ) [mean  $0.52 \pm 0.07$ ], observed heterozygosity ( $H_o$ ) [mean  $0.44 \pm 0.08$ ], the mean number of fixation index across the population ( $F$ ) [mean  $0.164 \pm 0.098$ ], and the inbreeding coefficient within the population ( $F_{is}$ ) [mean  $0.148$ ]. We also observed relations among the population using the inbreeding coefficient among the population ( $F_{st}$ ) [mean  $0.071 \pm 0.043$ ], and Nei's genetic distance coefficient  $D'$  [mean  $0.088 \pm 0.048$ ]. We done also analyses of molecular variance AMOVA and PCoA.

On the basis of these results we can say that there is a demonstrable differentiation between the beetles within the populations. On the other hand, we cannot say that the differentiation among the population is so conclusive that there would be more than one population cluster.

**Keywords:** Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, short tandem repeats, genetic diversity, population genetic.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Vědecká hypotéza.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Lilek brambor (<i>Solanum tuberosum</i>) .....</b>	<b>11</b>
3.1.1.	Historie pěstování brambor.....	11
3.1.2.	Odrůdy a varianty pěstování .....	12
3.1.3.	Pěstování brambor v České republice a ve světě .....	12
<b>3.2</b>	<b>Mandelinka bramborová.....</b>	<b>13</b>
3.2.1.	Životní cyklus .....	13
3.2.2.	Hostitelský okruh.....	14
3.2.3.	Rozšiřování hostitelského okruhu.....	14
3.2.4.	Čeď lilkovitých a jejich význam pro mandelinku bramborovou ( <i>Leptinotarsa decemlineata</i> ) u nás a ve světě .....	14
3.2.5.	Význam lilkovitých plevelů v hospodářské produkci.....	15
3.2.6.	Význam lilkovitých plevelů v České republice .....	15
3.2.7.	Využití mandelinky při herbicidní ochraně porostů hospodářských plodin vůči lilkovitým plevelům.....	16
3.2.8.	Způsoby šíření mandelinky bramborové po světě .....	17
3.2.9.	Šíření mandelinky bramborové po světě.....	17
<b>3.3</b>	<b>Populační genetik a její metody .....</b>	<b>19</b>
3.3.1.	Fenotypová a genotypová variabilita organismů .....	20
3.3.2.	Genetický polymorfismus .....	20
3.3.3.	Genetická struktura populací .....	23
3.3.4.	Vnější faktory působící na reálné populace .....	27
<b>3.4</b>	<b>Rozdíly mezi jednotlivými populacemi mandelinky bramborové..</b>	<b>30</b>

3.4.1.	Diference morfologických znaků.....	30
3.4.2.	Diference vzniklá na základě rozdílnosti isozymů .....	31
3.4.3.	Diference na základě rozdílnosti mitochondriální DNA.....	31
3.4.4.	Diference na základě polymorfismů jaderné DNA.....	34
3.4.5.	Význam diference populací mandelinky bramborové .....	35
<b>4</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Sběr vzorků a lokality původu brouků .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>Laboratorní analýzy.....</b>	<b>39</b>
4.2.1.	Izolace DNA za užití CTAB pufru .....	39
4.2.2.	Příprava vzorků na PCR.....	40
4.2.3.	PCR amplifikace mikrosatelitních lokusů.....	43
4.2.4.	Ředění DNA pro kapilární elektroforézu.....	43
4.2.5.	Kapilární elektroforéza .....	43
4.2.6.	Analýza dat .....	44
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1</b>	<b>Diference lokusů .....</b>	<b>45</b>
5.1.1.	Regionální srovnání .....	49
<b>5.2</b>	<b>Genotypová diference napříč populacemi .....</b>	<b>52</b>
5.2.1.	Unikátní genotypy.....	52
5.2.2.	Unikátní alely.....	52
<b>5.3</b>	<b>Testování a zjišťování prostorové struktury populace.....</b>	<b>55</b>
5.3.1.	Diference popsána hodnotami F-statistiky.....	55
5.3.2.	Odchylky od HW .....	58
5.3.3.	Analýza molekulární variance – AMOVA .....	59
5.3.4.	Metoda PCoA.....	60
5.3.5.	Shluková analýza .....	62
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>65</b>
<b>6.1</b>	<b>Předchozí studie .....</b>	<b>65</b>
<b>6.2</b>	<b>Mikrosatelitní lokusy .....</b>	<b>66</b>

6.2.1.	Počet používaných markerů.....	66
6.2.2.	Četnost alel.....	66
<b>6.3</b>	<b>Diference uvnitř populací.....</b>	<b>66</b>
6.3.1.	Diference jedinců s původem v nenáhodném oplození. ....	68
<b>6.4</b>	<b>Diference napříč populacemi .....</b>	<b>69</b>
6.4.1.	Analýza molekulární variance – AMOVA .....	70
6.4.2.	Analýza hlavních koordinát PCoA .....	70
6.4.3.	Shluková analýza .....	71
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>73</b>



# 1 Úvod

Mandelinka bramborová je nejvýznamnějším hospodářským škůdcem porostů lilku bramboru (*Solanum tuberosum*), který při větším výskytu na polích působí holožírý a snížení výnosu hlíz až o desítky procent.

Problém s chemickou kontrolou tohoto škůdce je způsoben vznikem rezistence jedinců na různé druhy účinných látek insekticidní ochrany. Jednou z logických cest řešení tohoto problému je kladení akcentu na nechemický způsob ochrany, což v praxi znamená maximální užití postupů integrované ochrany rostlin a postupů biologické ochrany rostlin.

Významnou součástí účinné integrované ochrany rostlin lilku bramboru je znalost genetické struktury populace mandelinky bramborové na našem území, která umožní pochopení migračních tras těchto brouků, rozdílnost v účinnosti chemické ochrany ale i zařazení lokální populace do celosvětového kontextu v boji s tímto škůdcem.

Genetickou variabilitu mezi jednotlivými populacemi lze detekovat například porovnáním vybraných morfologických znaků, pomocí testování mitochondriální DNA ale i detekcí diferencí v jaderné DNA. V této práci byly populace charakterizovány na základě tandemových repetitiv u vybraných lokusů mikrosatelitní, jaderné DNA.

Tato práce vznikla v souvislosti s grantem Ministerstva zemědělství „*Inovace integrované ochrany brambor proti mandelince bramborové založené na nových poznatcích genetických a biologických charakteristik*“, který probíhá v letech 2019-2023 pod identifikačním kódem QK1910270.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

### **2.1 Vědecká hypotéza**

- Existuje genetická variabilita vybraných mikrosatelitních lokusů uvnitř populací mandelinky bramborové v České republice.
- Existuje genetická variabilita vybraných mikrosatelitních lokusů mezi populacemi mandelinky bramborové v České republice.

### **2.2 Cíle práce**

- Izolace DNA ze vzorků odebraných brouků zakládajících generací z různých lokalit.
- Optimalizace panelu mikrosatelitních markerů.
- Charakterizace genetické diference škůdce optimalizovaným panelem.
- Zpracování výsledků a jejich interpretace v souvislosti s předloženou hypotézou.

### 3 Literární rešerše

#### 3.1 Lilek brambor (*Solanum tuberosum*)

Lilek brambor je rostlina z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*), jejíž podzemní oddenkové hlízy jsou významným zdrojem sacharidů, vitamínů a minerálů v lidské výživě. Vreugdenhil (2011) také uvádí význam této zeleniny při redukčních dietách, pro jejich nízkou energetickou hodnotu (72-75 kcal/100 g), avšak za podmínek maximální snahy o snižování hodnoty glykemického indexu brambor (např. vařením ve slupce, v páře, kombinací s vhodnými potravinami, jako je čedar, fazole aj.).

	Brambory (175g)	Těstoviny (230 g)	Rýže (180 g)
Cena na 1 porci	17 p	20 p	21 p
Energetická hodnota	126 kcal	198 kcal	248 kcal
Uhlohydráty	27 g	43 g	56 g
Tuky	0.17 g	1.15 g	2.99 g
Proteiny	3.15 g	6.9 g	4.68 g
Vláknina	2.1 g	2.07 g	0.18 g
Vitamín C	0.5 mg	neobsahuje	neobsahuje
vitamín B6	0.58 mg	0.023 mg	0.13 mg
Kys. listová	45.5 µg	6.9 µg	7.2 µg

Tabulka 1: Porovnání nutričních hodnot nových brambor vařených ve slupce, vařené rýže a vařených těstovin (British potato council 2004 b - Market Information and Statistic, in Vreugdenhil, 2011)

##### 3.1.1. Historie pěstování brambor

Smith (2012) a Reader (2009) uvádí, že brambory byly domestikovány před okolo 8000 lety v oblasti centrálních And v okolí jezera Titicaca na území dnešní Bolívie a Peru. Přibližně v roce 1570 pak byly přivezeny do Evropy a v roce 1620 i na území dnešní USA. Jako zdroj potravy byly brambory, mimo oblast Jižní Ameriky, používány až od druhé poloviny 18. století, kdy došlo k jejich rozšíření mezi obyvatelstvo.

Během posledních let došlo k rapidnímu navýšení výnosů této plodiny. Vreugdenhil (2011) uvádí, že v roce 1960 se průměrný výnos brambor ve Velké Británii pohyboval okolo 23 tun na jeden hektar, přičemž okolo roku 2010 to bylo již více jak 47 tun z jednoho hektaru.

### 3.1.2. Odrůdy a varianty pěstování

Existuje velká škála vlastností, kterými se jednotlivé brambory mohou od sebe lišit. Čermák (2019) v seznamu doporučených odrůd (SDO) uvádí v naší zemi 119 registrovaných odrůd brambor, které se navzájem odlišují na základě několika základních faktorů. Jako první faktor difference je v tomto dokumentu uváděn termín sklizně, a to na kategorie: velmi rané, rané, polorané a pozdní. Dalšími sledovanými znaky jednotlivých odrůd, dle SDO, jsou: výnos hlíz, výnos tržních hlíz, škrobnatost, odolnost vůči vybraným chorobám a škůdcům (háďátka bramborové, rakovina brambor, virové choroby, plíseň bramboru, atd...). Z pozice běžného konzumenta je však nejdůležitější rozdělení na základě varného typu (A, B, C).

Z hlediska hospodářské produkce se dle aktuální Situační a výhledové zprávy 2019 (Žižka 2019) brambory dělí dle užitkového směru jejich pěstování. Zde rozlišujeme brambory určené k prodeji na přímý konzum označené jako rané brambory, které je nutno sklídit do 31. června, brambory určené na uskladnění, škrobové brambory a konečně brambory sadbové.

### 3.1.3. Pěstování brambor v České republice a ve světě

Na území dnešní České republiky bylo v roce 2019 pěstováno 28 894 ha brambor, což odpovídá přibližně 1,2% celkové osevní plochy v naší zemi. V porovnání s předchozími deseti ročníky se jedná o mírné navýšení tohoto čísla, avšak ve srovnání s obdobím před druhou světovou válkou, kdy pěstební plocha brambor dosahovala více jak půl milionu hektarů, či s obdobím před rokem 1989 je toto číslo nízké (ČSÚ 2019).

Ve světě je situace poněkud odlišná. Plochy pěstování brambor se v celkovém pohledu znatelně zvyšují. V roce 1989 byly dle dat FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) brambory pěstovány na výměře 18 104 210 ha. V roce 2017 to bylo již 19 302 642 ha, přičemž 50,4 % těchto ploch přináleží Asii, 31,4 % nalezneme v Evropě, 11,4 % v Severní a Jižní Americe, 6,4 % v Africe a 0,4 % v Oceánii. Největším producentem brambor je Čínská lidová republika s produkcí téměř 100 mil. tun, následovaná Indií (49 mil. tun), Ruskou federací (30 mil. tun), Ukrajinou (22 mil. tun) a USA (20 mil. tun) (FAO 2019).

## 3.2 Mandelinka bramborová

Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*) neboli také kalifornský brouk je brouk z čeledi mandelinkovitých (*Chrysomelidae*), což je třetí největší čeleď řádu brouci (*Coleoptera*). Dospělí brouci jsou dle Alyokhin et al. (2013) přibližně 10 mm dlouzí, 7 mm širocí a povrch jejich krovek je zbarven bledě žlutou barvou s pěti černými pruhy. Předohrudí (pronotrum) je pak mírně oranžové barvy s černými skvrnami. Vajíčka jsou 1,5 mm dlouhá a mění barvu ze žluté, která je patrná po nakladení, po oranžovou, se kterou se lze setkat před vylíhnutím.

Capinerea (2008) uvádí, že se jedná se o nejvýznamnějšího hospodářského škůdce lilku bramboru (*Solanum tuberosum*) na severní polokouli, kde působí značné škody žírem listů. Ferro et al. (1985) uvádí, že tento žír může způsobit snížení výnosu až o 30 % - 50 %. Dále také působí značné hospodářské škody na rostlinách lilku vejcoplodého a dalších rostlinách.

Mandelinka bramborová je stále považována za invazivního škůdce. Lee (2002) tento termín užívá obvykle v případě zavlečených, nepůvodních druhů do ekosystému, které mají negativní vliv na biodiverzitu, lidské ekonomické aktivity či na lidské zdraví.

### 3.2.1. Životní cyklus

Samička, dle Tauber et al. (1986), klade vajíčka na spodní stranu listů, a to v koloniích po 40–60 kusech. Po vylíhnutí larvy požirají listy (jedna larva konzumuje až 40 cm<sup>2</sup> listové plochy do zakuklení). Larvy 4. instaru se zahrabou do země, kde se kuklí a po 10 až 20 dnech dochází k líhnutí dospělců. Imago je schopné pozřít až 10 cm<sup>2</sup> listové plochy denně. V závislosti na fotoperiodě a kvalitě potravy se pak imaga páří či se zahrabou do země, kde přechávají zimu ve stádiu diapauzy. Výše zmíněná fotoperioda, konkrétně delší den, má dle Tauber et al. (1988) společně s vyšší průměrnou denní teplotou vliv na větší aktivitu samiček při kladení vajíček.

Mandelinka tedy přezimuje jako dospělec v zemi. Lashomb et al. (1984) udává nejčastější hloubku přezimování v rozmezí 7,6 až 12,6 cm, což ji umožňuje překonat nízké zimní teploty. Dle Capinery (2008) se na jaře dospělci ze země vynoří a začínají hledat hostitelskou rostlinu, na které by se mohli živit. Po několika dnech od opuštění zimního úkrytu se jim vrací schopnost létat. Za vegetační období vytvářejí mandelinky jednu až několik generací, což je závislé na klimatických podmínkách.

### 3.2.2. Hostitelský okruh

Capinera (2008) a Reader (2009) uvádějí, že místo původu mandelinky se nachází v severní části Mexika a na jihozápadě USA, kde jejími původními hostitelskými rostlinami byly rostliny z čeledi lilkovitých jako Buffalo bur (*Solanum rostratum*) či lilek hlošinolistý (*Solanum elaeagnifolium*). Capinera (2008) uvádí, že její hostitelský okruh je poměrně úzký a silně omezený na přibližně 20 druhů rostlin z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*), kde většina zástupců pochází z rodu lilek (*Solanum*). Jednotlivé další druhy, jako například blín černý (*Hyosciamus niger*), paprika setá (*Capsicum annuum*), tabák viržinský (*Nicotiana tabacum*) pak pocházejí z ostatních rodů lilkovitých, avšak ne na všech těchto rodech byla prokázána schopnost dokončení vývojového cyklu. Konkrétně za hlavní hostitele mandelinky, na kterých je schopna se plně reprodukovat, považuje Hare (1990) a Hsiao (1978): lilek brambor (*Solanum tuberosum*), lilek potměchuť (*Solanum dulcamara*), lilek vejcoplodý (*Solanum melongena*), lilek karolínský (*Solanum carolinense*), lilek trojkvětý (*Solanum triflorum*) a lilek leskloplodý (*Solanum physalifolium*).

### 3.2.3. Rozšiřování hostitelského okruhu

Casagrande (1985) uvádí, že první popsany exemplář mandelinky bramborové z roku 1811 pochází z rostlin Bufalo buru nalezeného na hranici mezi Iowou a Nebrascou, avšak první výskyt na rostlině lilku bramboru (*Solanum tuberosum*) byl zaznamenán až v roce 1859 v Nebrasce, odkud se začíná šířit po USA. Lze tedy usoudit, že se populace mandelinky musela pro žít na rostlinách bramboru přizpůsobit. Výzkumy dle Mena-Covarrubias et al. (1996) zkoumající rozšiřování hostitelského okruhu, potvrzují tuto schopnost adaptability i v současné době vzhledem ke vztahu k plevelným rostlinám na příkladu lilku kalifornského (*Solanum carolinense*).

### 3.2.4. Čeleď lilkovitých a jejich význam pro mandelinku bramborovou (*Leptinotarsa decemlineata*) u nás a ve světě

Lilkovité plevele mohou, dle Hortona et Capinera (1987), hrát poměrně zásadní roli v životním cyklu mandelinky. Pokusy odhalily skutečnost, že populace mandelinek preferují při kladení vajíček plevelné rostliny druhu *Solanum sarrachoides* více než rostliny kulturního lilku bramboru (*Solanum tuberosum*), což je konkrétně spojené s tím, že ve stejné lokalitě nalezneme v průměru na plevelných rostlinách více vajíček než na rostlinách kulturních. Další výzkumy v této oblasti uvádějí, že plevelné rostliny nejsou atraktivnější potravou než kulturní

porosty lilku bramboru. Mena-Covarrubias et al. (1996) v této souvislosti provedl se svým týmem pokus, ve kterém laboratorně chované mandelinky preferovaly potravu složenou z listů lilku karolinského (*Solanum carolinense*) a lilku bramboru (*Solanum tuberosum*) více jak samotné listy lilku kalifornského. Současně však stejný výzkum u tří populací mandelinek potvrdil hypotézu, že larvy krmené na plevelných rostlinách jsou vitálnější než larvy krmené na rostlinách kulturního lilku bramboru. Na druhou stranu larvy živěné na bramborách dosahovaly vyšší průměrné hmotnosti.

### 3.2.5. Význam lilkovitých plevelů v hospodářské produkci

Studium interakce mezi mandelinkou bramborovou a plevelnými rostlinami je důležité z několika zásadních důvodů:

Prvním důvodem, předloženým ve výzkumu Voss et Ferro (1992), je snížení účinnosti opatření střídání plodin v osevním postupu v insekticidní ochraně, neboť plevelné rostliny slouží jako rezervoáry mandelinek v dané lokalitě.

Dalším důvodem, uváděným dle Mena-Covarrubias et al. (1996), který souvisí s předešlým bodem, je možnost vzniku ohniskového napadení porostu kulturní rostliny v okolí plevelných druhů na místech, které se mohly vyhnout insekticidní kontrole. Jedná se zejména o okraje pozemků, či o místa, která nebyla ošetřena vlivem nedbalosti obsluhy postřikovače. Výzkumy u lilku kalifornského (*Solanum carolinense*) v této souvislosti prokázaly souvislost mezi výskytem tohoto plevelu a s tím spojeným zvýšením výskytu mandelinky v dané lokalitě.

Plevelné rostliny lilkovitých mají také, jak uvádějí Drummond et al. (1992), Horton et Capinera (1987) a Capinera (2005), pozitivní funkci při udržování populací mandelinek, které slouží jako hostitelské druhy pro jejich přirozené nepřátele – parazitoidy, jako je například *Chrysomelobia labidomerae*, *Myiopharus aberrans* či *Myiopharus doryphorae*, či pro jedince citlivé k insekticidnímu ošetření.

### 3.2.6. Význam lilkovitých plevelů v České republice

Z okruhu plevelných hostitelů mandelinky bramborové, na kterých by byla schopná reprodukce, můžeme v naší zemi prokazatelně hovořit o výskytu jediného invazivního lilkovitého plevelu, a to o lilku leskloplodém (*Solanum physalifolium*). První zmínka, dle Ing. Holce z České zemědělské univerzity v Praze, o jeho výskytu v Československé socialistické republice pochází z roku 1975, kdy byl objeven poblíž vlakové stanice v Pardubicích. V roce

2006 byl pak jeho výskyt prokázán již na deseti lokalitách ČR a byl zařazen mezi invazivní plevely (Holec et al. 2006).

Vlivem klimatických změn je, podle stejných autorů, našemu území predikován brzký výskyt lilku karolínského (*Solanum carolinense*), neboť podmínky jsou na 37 % rozlohy našeho státu pro tuto rostlinu příhodné. V porovnání s ostatními zeměmi centrální Evropy je však toto číslo poměrně nízké, neboť například v Maďarsku je pro rozšíření příhodných 100 % rozlohy a v Polsku dosahuje toto číslo úrovně 83,6 % (Follak et Strauss 2010). Invazivní rozšíření tohoto druhu by znamenalo nezanedbatelné problémy pro zemědělskou produkci hospodářsky významných lilkovitých plodin. Data tohoto predikčního výzkumu jsou však již 9 let stará. V nejnovější odborné literatuře ovšem není možné dohledat jakoukoliv aktuální zmínku o výskytu tohoto plevele u nás, a tak musíme považovat tuto predikci za prozatím nenaplněnou.

### **3.2.7. Využití mandelinky při herbicidní ochraně porostů hospodářských plodin vůči lilkovitým plevelům**

Metzger et al. (2008) prokázal pozitivní vliv přirozeně se vyskytujících mandelinek jako doplněk k herbicidnímu ošetření porostů jarní pšenice, cibule, kukuřice cukrové či kukuřice koňského zubu vůči lilkovitým plevelům, jako jsou lilek trojkvětý (*Solanum triflorum*), lilek leskloplodý či plevelným bramborům. Mandelinka, při správném načasování před či po aplikaci herbicidu, může svým žírem hostitelských plevelných rostlin ušetřit nemalé náklady na chemickou kontrolu těchto rostlin, což je pozitivní i z hlediska preferované integrované ochrany rostlin.

Dalším, neméně důležitým pozitivním vlivem tohoto využití mandelinky jako herbivora, je redukce lilkovitých rostlin i mimo pole, které slouží jako rezervoáry virových chorob z čeledi *Luteoviridae*. Výzkumy provedené Alvarez et al. (2005) v této oblasti prokázaly, že porosty lilku leskloplodého na okrajích i uvnitř polí, jsou velice atraktivní pro populace mšice broskvoňové (*Myzus persicae*), která je, mimo jiné, považována za hlavní vektor viru PLVR (*Potato leaf roll virus*). Výzkum také potvrdil skutečnost, že plevelná rostlina je pro mšice dokonce atraktivnější než kulturní rostlina lilku bramboru. Metzger et al. (2008) uvádí, že záměrným okamžitým nezlikvidováním populací mandelinky bramborové můžeme tedy docílit i omezení výskytu virových chorob v dané lokalitě.



### 3.2.8. Způsoby šíření mandelinky bramborové po světě

Studie (Voss et Ferro 1990) prokázala, že zástupci tohoto hmyzu migrují dvěma způsoby, a to buď po zemi, či létáním. Jelikož jsou však poměrně špatní letci, tak jejich šíření přispívá ponejvíce silný vítr. Za příznivých povětrnostních podmínek, dle Wikteliu (1981), jsou však jedinci mandelinky bramborové schopni překonat vzdálenost i přes 100 km přes moře, jak je doloženo v případě invaze jedinců tohoto druhu do Skandinávie.

Brouci mandelinky bramborové se podle Tauber et al. (1986) a Voss et Ferro (1990) během roku přemísťují většinou třikrát. K první migraci dochází na jaře, kdy přezimující brouci hledají hostitelské rostliny. Mnoho brouků tuto první migraci absolvuje jednoduše chůzí. K dalšímu přesunu dochází pak v červenci, kdy někteří dospělci první generace migrují na jiná stanoviště, kde se následně páří, a kde také zůstávají. K poslední migraci v daném roce pak dochází v září. Dospělci volí jednu ze tří možností. První možností je setrvání na místě, kde došlo k jejich vylíhnutí a vstup do diapauzy. Druhou možností je pak přelet na nové stanoviště a třetí je přesun na nové stanoviště po zemi chůzí.

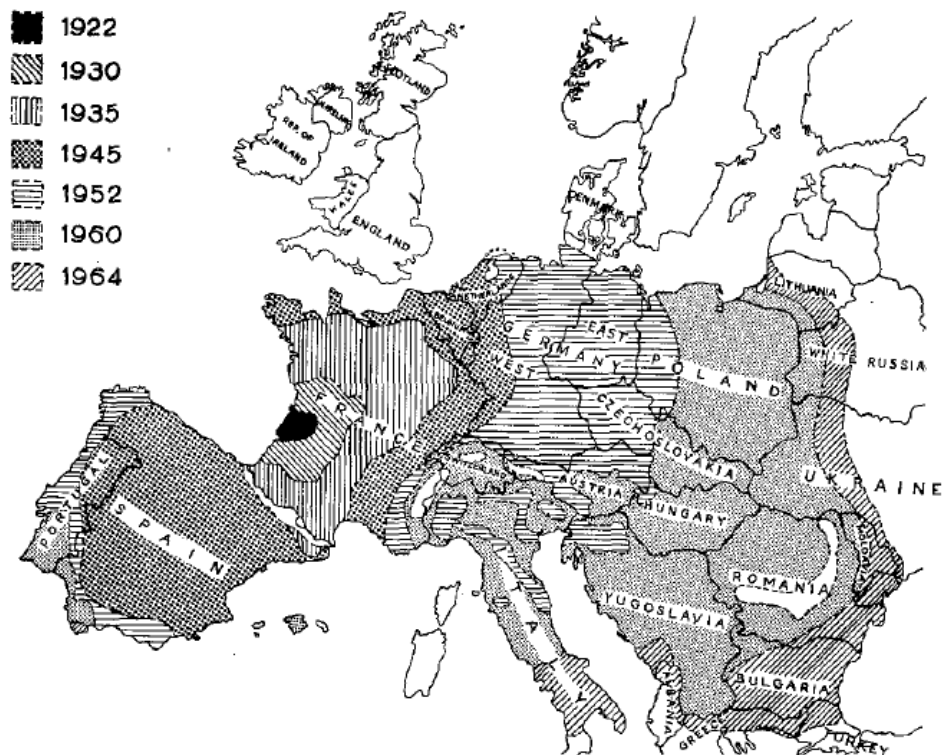
Při migraci existuje rozdíl mezi pohlavími. Voss et Ferro (1990) uvádí, že ve vzdušných pastech, ale i v pastech pozemních, testujících lokální pohyb brouků, se více objevují samci než samičky. Lze proto usuzovat, že jsou samci v daných lokalitách více pohybliví než samice. Při testování migrace na delší vzdálenosti je však již poměr mezi pohlavími víceméně vyrovnaný.

### 3.2.9. Šíření mandelinky bramborové po světě

Způsob, jakým se šířila mandelinka po světě, je velice pozoruhodný. První zmínka o tomto živočichovi pochází z roku 1811, kdy byla objevena Thomasem Nuttalem. Jako druh však byla popsána až Thomasem Sayem na již zmíněné hranici mezi Nebrascou a Iowou v roce 1824 (Casagrande 1985). K jejímu rozšíření po světě však přispěla již výše zmíněná adaptace na porosty lilku bramboru z roku 1859, která byla prvně pozorována v Nebrasce (střed USA). Odtud se již rychle rozšířila po celém území Spojených států. Johnson (1967) uvádí, že východního pobřeží dosáhla až v roce 1874, a to vzhledem k převládajícímu směru proudění větru v USA.

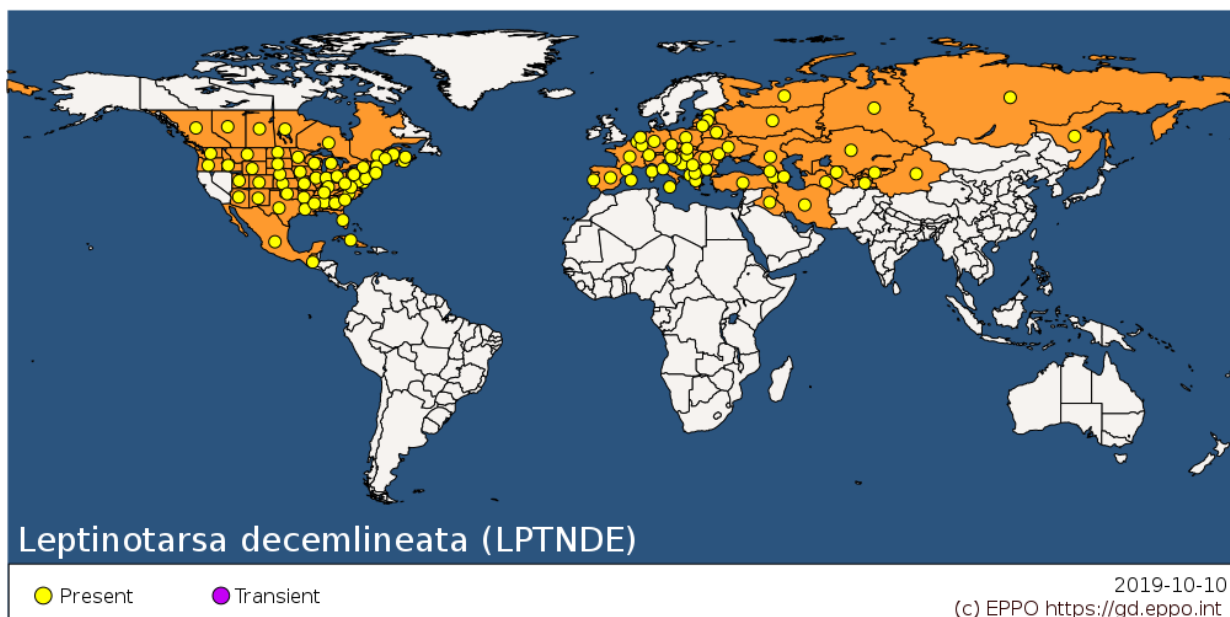
Podle Jacques (2019) a Grapputo et al. (2005) došlo k první invazi do Evropy v roce 1875, kdy byli objeveni jedinci mandelinky ve Velké Británii, odkud se brzy rozšířila i do severních oblastí v Německu a o rok později do Polska. Za užití karanténních opatření se však

podarilo této invazi úspěšně čelit, a tak všechny objevené populace byly záhy eradikovány. K úspěšné invazi do Evropy pak došlo až v roce 1921 ve Francii (Bordeaux), odkud se tato populace během 30 let rozšířila po celé Evropě, jak je patrné z obrázku č. 1.



Obrázek 1: Postup rozšíření mandelinky bramborové v Evropě mezi lety 1922 až 1964. Na území dnešní České republiky se s ní setkáváme již před rokem 1952 (Johnson 1967).

V období po přelomu tisíciletí se mandelinka šířila již po území Sibiře a v současnosti již v provincii Xinjiang překonala hranice Číny, jak je patrné z obrázku 2 (EPPO 2019). Aktuální informace o výskytu tohoto škůdce lze nalézt na stránkách Evropské a středomořské organizace pro ochranu rostlin (European and Mediterranean Plant Protection Organization – EPPO).



Obrázek 2: Aktuální světové rozšíření mandelinky bramborové. Dle EPPO (2019).

### 3.3 Populační genetika a její metody

Populační genetika zkoumá genetickou variabilitu uvnitř populací. Zahrnuje zkoumání a modelování změn ve frekvencích genů a alel v populacích, v prostoru a čase. Populace je soubor jedinců stejného druhu, kteří mají společný genofond. Druh je poté souhrn jedinců, kteří jsou si navzájem fenotypově podobní a jsou schopni při rozmnožování vytvářet plodné potomstvo. Termínu populace je pak nadřazen termín rasy. Rasa je populace, či soubor populací, která se od podobných populací liší frekvencí některých alel. Dalším termínem je pak plemeno, které označuje rasy vzniklé záměrnou činností člověka. Děj, kterým došlo k rozlišení druhů na rasy, se nazývá mikroevoluce, což je proces, který označuje vývoj četnosti jednotlivých alel jedinců v průběhu generací. K těmto změnám pak dochází za účasti komplexu genetických mechanismů (Hamilton 2011).

Mnohé geny, které nalzáme uvnitř živočišných, rostlinných či jiných společenstev mohou být takzvaně polymorfní, což znamená, že se mohou vyskytovat v mnohých různých formách neboli alelách. K popisu genetické variability jednotlivých společenstev zde slouží matematické modely, jejichž výstupy slouží k vytváření predikcí výskytu specifických alel či jejich kombinací. Tyto závěry jsou poté interpretovány v kontextu Mendelových zákonů a poznatků moderní evoluční teorie a nejnovějších výzkumů (Hartl et al. 1997; Gillespie 2004).

### 3.3.1. Fenotypová a genotypová variabilita organismů

Jedinci jednotlivých populací se od sebe vzájemně liší. Tuto odlišnost či rozmanitost lze pozorovat z různých úhlů pohledu. Jedná se především o rozdělení na základě fenotypu, tedy, dle Templetona (2006), souboru konkrétních viditelných vlastností a znaků živého organismu, či na základě genotypu jedince. Genotyp je konkrétní, unikátní, soubor genů pozorovaného jedince ze zkoumané populace. Existence této variability je zásadní podmínkou všech evolučních změn a její studium v přírodních populacích umožňuje pochopení vývoje a chování jednotlivých organismů (Templeton 2006).

#### 3.3.1.1. Vznik, stabilizace a míra genetické variability

Ve většině reálných populací se setkáváme s genetickou variabilitou, která je podmíněná existencí většího množství variant (alel) jednotlivých genů. Příčinou vzniku těchto různých alel jsou náhodné mutace v sekvencích DNA, které se vlivem evolučních mechanismů ukotvily v genofondu organismu. Geny, u kterých známe alespoň 2 alely, přičemž každá z nich se v populaci vyskytuje v četnosti vyšší než 1 %, se označují jako polymorfní. Hamilton (2011) pak uvádí tyto polymorfní geny za klíč k variabilitě u diploidních organismů, přičemž čím více má konkrétní gen možných alel, tím větší genetickou rozmanitost lze v potomstvu objevit.

Stabilizace genetické variability, tedy náhodných mutací, je složitý proces, který souvisí s mnoha faktory populační genetiky, které budou představeny v následujících kapitolách.

Měřítkem míry genetické variability, tedy četnosti různých variant genů v populaci, je buď podíl vybraných polymorfních lokusů v populaci, či míra heterozygotnosti zkoumaných míst u jedince. Obě měřítka jsou vztažena na vybrané úseky DNA. Relichová (2009) uvádí, že obvykle stačí testování 20 lokusů na vzorku populace a výsledek je pak vztažen na celkovou populaci.

#### 3.3.2. Genetický polymorfismus

Fusté (2012) uvádí, že polymorfismy se vyskytují jak na úrovni celého chromozomu či jeho částí, tak na úrovni jednotlivých genů či jejich úseků. V detailu rozlišujeme krátké polymorfní úseky (RFLP), krátké tandemové repetice (STR, mikrosatelity, minisatelity), či polymorfismy v pořadí jednotlivých nukleotidů DNA (SNP). Vše se týká jak jaderné, tak mitochondriální DNA. Tyto změny se pak mohou projevit v povaze produkovaných enzymů. Jestliže se průměrná základní bílkovina skládá přibližně z 300 aminokyselin, což odpovídá 900 nukleotidům, tak již několik změn aminokyselin může způsobit odlišnou stavbu daného

enzymu. Těmto funkčně stejným, avšak strukturně odlišným enzymům, kódovaným na stejném lokusu jako původní enzymy se pak říká aloenzymy, či pokud jsou kódovány geny z různých lokusů izoenzymy (Richardson 2012). Přítomnost polymorfismů může, ale také nemusí, znamenat pro jeho nositele změnu některého jeho fenotypového projevu.

Hamilton (2011) rozlišuje dva základní typy polymorfismů. Bodový polymorfismus (SNP – single nucleotide polymorphism), který označuje mutace jednotlivých nukleotidů ústících v možnou záměnu produkovaných aminokyselin, a repetitivní sekvence, což jsou úseky nukleotidů, často z nekódujících oblastí, které se v DNA objevují v mnohačetných kopiích (minisatelity, mikrosatelity). V populacích se však jejich počty a délky významně odlišují.

Pro stanovení genetických polymorfismů DNA, které jsou tedy takzvanými genetickými markery umožňující rozlišení jednotlivých populací, je užíváno metod přímých i nepřímých. Přímou metodou označujeme sekvencování variabilní oblasti DNA (např. Sangerova metoda). Nepřímé metody jsou pak založené na amplifikaci DNA (tedy metody postavené na přímém užití PCR), restriční endonukleázové analýze spojenou s PCR (RFLP, mikrosatelity, minisatelity a jiné) či na specifických sondách účastnících se selektivní hybridizace restričních fragmentů (DNA sondy, DNA microarrays). Další postupy využívají rozdílné pohyblivosti mutantních a standardních úseků DNA při elektroforéze, či jsou schopné detekce jednonukleotidových polymorfismů (SNP). Tyto metody lze různým způsobem kombinovat, a tak jejich výčet v tomto případě není vyčerpávající (Goodwin et al. 2011). Některé z nich však budou představeny podrobněji v následující kapitole.

### **3.3.2.1. Sangerova metoda sekvenování**

Tato přímá metoda sekvence DNA, je založena na enzymaticky katalyzovaném ukončení syntézy DNA po začlenění dideoxyribonukleotidů do nově vytvářejícího se komplementárního vlákna. Výstupem použití této metody je detailní zápis pořadí jednotlivých nukleotidů z testovaného úseku DNA, což umožňuje odhalení testovaných polymorfismů (Sanger et Coulson 1975).

### **3.3.2.2. Metody založené na amplifikaci DNA**

Amplifikaci neboli zvětšení či rozmnožení úseků DNA lze, ve specifické úpravě, také úspěšně využít k detekci polymorfismů v testovaném vzorku. Metoda PCR (Polymerase Chain

Reaction) (Mullis et al. 1986), které se tato práce podrobněji věnuje v kapitole týkající se metodiky, umožňuje rychlé a specifické rozmnožení úseků DNA. V principu je k tomuto užíváno denaturace zkoumaných úseků DNA a jejich následná renaturace specifickými primery (rozlišujeme „přední“ (*forward*) a „koncové“ (*reverse*)) s volnými oligonukleotidy v pufrovaném prostředí. Dále probíhá elongace vzniklých produktů, kdy navázané oligonukleotidy slouží jako primery DNA polymerázy. Vše probíhá za užití specifických teplot pro jednotlivé fáze a běžně v 30násobném opakování, které zajišťuje exponenciální nárůst koncentrace množené DNA

Při detekci genových polymorfismů se užívá alelově specifické modifikace této reakce (ASPCR), tak jak byla představena Ugozzolim et Walacem (1991). Pro odhalení odlišných alel či mutací v testovaném vzorku však musí být k dispozici specifické primery pro úseky, ve kterých se daná alela liší od ostatních, či místo, kde lze najít hledanou mutaci. Pokud je v testovaném vzorku přítomná odpovídající sekvence, tak reakce proběhne běžným způsobem a její produkty bude možné detekovat odpovídajícími postupy. Pokud v testovaném vzorku odpovídající sekvence přítomná není, tak se DNA neamplifikuje.

### **3.3.2.3. Metody užívající restrikčních endonukleáz**

Je-li působeno na sekvenci DNA specifickými restriktázami, které štěpí DNA většinou na palindromatických úsecích čítající nejčastěji 4 až 6 bází, tak může docházet k vytváření různých dlouhých řetězců štěpené DNA. Tento rozdíl může vzniknout na základě mutace (substituce, inserce, delece) některého nukleotidu v cílové sekvenci štěpení. Fusté (2012) uvádí, že tyto změny pak mohou znamenat prodloužení restrikčních fragmentů, či naopak zkracování dlouhých úseků za vzniku krátkých, tandemově se opakujících, repetitiv DNA. Jedinci stejného druhu se pak pod působením stejných restrikčních endonukleáz mohou lišit ve velikosti těchto úseků. Tato skutečnost je pak nazývána polymorfismem v délce restrikčních fragmentů neboli RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism. Templeton (2006) uvádí, že délky těchto fragmentů se dědí dle klasických principů Mendelistické genetiky a lze je měřit za užití různých variant elektroforézy. Jejich využití je pak široké a například umožňují i zobrazení konkrétního profilu DNA testovaného jedince (DNA fingerprinting), kterého lze například užít i při sporech v soudním řízení.

Relichová (2009) v tomto případě za validní považuje dva typy repetitiv: Za první to jsou tandemové repetice o variabilním počtu (VNTR – Variable Number of Tandem Repeats neboli

minisatelity), které mají délku repeticí v rozpětí mezi 10 až 80 bázemi a velikost jejich fragmentů se pohybuje mezi 50 až 1500 bázemi. Za druhé to jsou krátké tandemové repetice (STR – Short Tandem Repeats neboli mikrosatelity), jejichž repetice je kratší, a to mezi 2 až 10 bázemi a jejich velikost se pohybuje v rozmezí 50 až 500 bází.

#### **3.3.2.4. DNA čipy (DNA microarrays)**

Poslední popisovanou metodou, v tomto užším výběru používaných metod, je detekce genových polymorfismů na základě užití DNA čipů. Jedná se o velmi nákladnou metodu, která je schopna detekce i jednonukleotidových polymorfismů v testované sekvenci. Principem této metody, dle Hellera (2002), je cDNA (komplementární DNA, která se skládá pouze z kódujících oblastí genu), která vznikla přepisem mRNA testované tkáně, nanesená na skleněné destičky, kde hybridizuje s fluorescenčním barvivem. To pak umožní sledovat, které geny jsou ve tkáni v daném období aktivní. Existuje mnoho různých variant této metody, jejichž popis a dělení by bylo již nad rámec této práce.

#### **3.3.3. Genetická struktura populací**

Relichová (2009) uvádí, že „*populace je soubor jedinců stejného druhu, kteří mají společný genofond*“. Tento genofond je tvořen specifickými alelami jednotlivých genů, které se v populaci vyskytují v různé intenzitě. Intenzita výskytu jednotlivých alel je podmíněna mnoha genetickými mechanismy a principy, z nichž některé, nejdůležitější, budou představeny v následujících kapitolách. V tomto kontextu různé distribuce výskytu alel uvnitř populací je v první řadě zcela zásadní skutečnost, jakým způsobem probíhá oplození. V základu rozlišujeme oplození náhodné a nenáhodné.

##### **3.3.3.1. Náhodné oplození**

Náhodné oplození neboli panmixie dle Templetona (2006) označuje stav, ve kterém je pravděpodobnost páření jedince s jiným zástupcem stejného genotypu rovna frekvenci tohoto genotypu v populaci. Předpověď genových četností, za podmínek nepřekrývajících se generací, není za těchto okolností zvláště složitá a řídí se základními pravidly populační genetiky.

##### **3.3.3.1.1 Hardy – Weinbergova rovnováha**

Dle Hartl et al. (1997) tento princip praví, že se poměr jednotlivých alel v populaci nemění. To vše je však platné pouze za předpokladu, že je zkoumaný organismus diploidní, rozmnožuje se pohlavně, nepřekrývají se jednotlivé generace, sledovaný gen má dvě alely, jejichž frekvence je u samců i samic totožná, páření je náhodné, populace se skládá z obrovského počtu (teoreticky nekonečného) jedinců, migrace je nepatrná, ignorují se mutace a přírodní selekce nemá vliv na sledované znaky.

Matematicky je možné základní princip zákona popsat rovnicí:

$$p + q = 1$$

příčemž  $p$  značí četnost dominantního alely a  $q$  značí četnost alely recesivní. Součet četností obou alel se pak rovná 1 což odpovídá 100 % jedinců. Z této rovnice pak lze odvodit výpočet pro četnost dominantních či recesivních homozygotů či heterozygotů:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Využití tohoto principu je široké pro předvídaní četností jednotlivých alel z konkrétních fenotypových projevů. Například je možné v ideální situaci odhalit pravděpodobnost výskytu nemocí způsobených recesivně homozygotní sestavou alel.

### 3.3.3.1.2 Modifikace Hardy Weibergovy rovnováhy

Dle Crow et Kimura (1970) existují různé modifikace této rovnováhy. Prvním specifickým případem, který vyžadoval úpravu výše zmíněného principu, je existence tří a více alel podílejících se na kódování polymorfního genu. Touto problematikou se zabýval již i sám Weinberg na počátku 20. století a po něm i další vědci napříč následujícími generacemi. Jednu z těchto modifikací HWE přináší například Louis et Dempster (1987).

Bruce (1910) uvádí modifikaci této rovnováhy dnes nazvanou „*Bruceho poměry*“, která upravuje pravděpodobnost dědičnosti jednotlivých alel za předpokladu různé distribuce gamet od samců a samic.

Další korekce pak existuje pro situace, kdy jsou geny vázány na heterologním úseku chromozomu X u jedinců produkujících dva různé typy gamet. Například savčí samice budou mít genotypy tří typů:  $AA$ ,  $Aa$ ,  $aa$ , samci pak pouze typů  $A$  a  $a$ . Graffelman et Weir (2016) popisuje, že tato skutečnost pak má důsledky na četnosti jednotlivých alel v populaci, protože



zatímco u samčího pohlaví jsou genotypové četnosti určené dle Hardy-Weinbergovy rovnováhy, tzn.  $p^2$ ,  $2pq$ ,  $q^2$ , tak u samčího pohlaví odpovídají genotypy alelovým četnostem  $p$ ,  $q$ . Praktický důsledek tohoto jevu je patrný v případech chorob, které jsou způsobovány recesivní alelou. Protože četnost recesivní alely je z výše uvedené distribuce vyšší u jedinců samčího pohlaví, tak je logické, že na tyto choroby budou trpět více samci než samice.

Poslední zde uvedenou opravou HW principu je existence vazbové či rekombinační rovnováhy. Hamilton (2011) uvádí, že jednotlivé geny, lokusy, které se nacházejí na chromozomu blízko sebe, mohou, dle Morganových zákonů, společně vzájemně interagovat, a může tak snáze dojít k jejich společnému dědění. Takto společně děděné geny se pak nazývají haplotypy. Hartl et al. (1997) předkládá, že tímto způsobem může dojít ke zvýšení variability populace, a to konkrétně tím, že sexuálně se rozmnožující jedinci za užití genové vazby operativněji fixují pozitivní mutace, na rozdíl od jedinců, kteří se rozmnožují za pomoci nepohlavního rozmnožování.

Existence genové vazby proto může vychýlit četnost jednotlivých alel vytvořit tak vazebnou nerovnováhu, která se pak logicky liší od četností stanovené Hardy-Weinbergovou rovnováhou.

### **3.3.3.2. Nenáhodné oplození**

Dle Crow et Kimura (1970) a Relichové (2009) nenáhodné oplození označuje situaci, ve které se pravděpodobnost páření mezi jednotlivci stejného genotypu nerovná četnosti daných genotypů, což v důsledku mění poměry výskytu jednotlivých genotypů. Je rozlišováno několik typů tohoto oplození: příbuzenské křížení (inbreeding) a nenáhodné oplození, či pozitivní a negativní (asortativní) výběrové oplození.

#### **3.3.3.2.1 Příbuzenské křížení (inbreeding, inzucht)**

Fusté (2012) popisuje inbreeding jako druh nenáhodného oplození, jehož principem je zvýšení četnosti páření mezi příbuznými jedinci. To má za důsledek zvýšení počtu homozygotních alel v populaci. Rozdíl mezi populacemi, které vznikly náhodným oplozením s četností alel dle HW rovnováhy a těmi, ve kterých vlivem příbuzenského křížení dochází k redukci heterozygotnosti lze měřit za užití tzv. koeficientu inbreedingu. Tento koeficient lze také vyjádřit poměrem autozygotních alel (alely stejného původu) vzhledem k původní populaci, kde byly teoreticky všechny alely původu alyzygotního (alely neidentického původu)

Dle Relichové (2009) a Templetona (2006) je v praxi inbreeding využíván ve šlechtitelství, kde pomocí příbuzenského křížení vznikají homozygotní linie. U kříženců těchto linií pak v první generaci dochází k výskytu takzvané heteroze, která označuje stav, kdy dochází ke vzrůstu celkové zdatnosti potomstva. Opačným, negativním, důsledkem příbuzenského křížení je jev zvaný inbreední deprese. Jejím principem je negativní důsledek zvýšení homozygotnosti ústící ke snížení celkové zdatnosti potomstva, neboť recesivně homozygotní alely bývají příčinou rozvoje dědičných chorob.

V souvislosti s evropskou invazí jedinců mandelinky bramborové z roku 1921 je nutné počítat u dnešních potomků s určitou mírou proběhlého inbreedingu, či inbreední deprese z minulosti, která se projevuje ve frekvenci určitých alel u populací z USA a v Evropě. Inbreední deprese však také mohla být příčinou ozdravení genofondu invazní populace, neboť vazbou na letální alely opouštějící genofond, mohla podpořit adaptaci na nové podmínky (Grapputo et al. 2005). Důkazem dobré vitality potomstva invazních jedinců je úspěšná kolonizace celého Starého světa.

Tento fakt ozdravení genofondu způsobený inbreední depresí pak Frankham et al. (2005) nazývá tzv. genetickým paradoxem, který z definice označuje stav, kdy se z několika málo jedinců, vytvoří funkční populace se značnou genetickou variabilitou, která netrpí příznaky předpokládané inbreední deprese. S tímto jevem se nejčastěji setkáváme právě v případech invazivních druhů. Jsou známy i případy, dle Groombridge (2000), kdy k obnově populace došlo pouze z jednoho páru rodičů. To je patrné například na případě obnovy populace u poštolky skvrnitě (*Falco punctatus*).

#### **3.3.3.2 Výběrové oplození**

Dle Templeton (2006) výběrové oplození představuje situace, při nichž dochází k preferenci, či naopak k odmítání páření se s jedinci podobného fenotypu. Tato preference se jinak označuje jako „pozitivní výběrové oplození“ nebo také asortativní oplození. Odmítání páření s jedinci stejného fenotypu také jinak nazýváme jako „negativní výběrové oplození“ neboli disasortativní oplození. Tyto skutečnosti pak mají v důsledku vliv na vychýlení alelových četností populace, která se tak nenachází v HW rovnováze. Prakticky lze konstatovat, že při křížení asortativním, kdy si tedy jedinci vybírají sobě podobné sexuální partnery, dochází ke zvýšení počtu homozygotů v populaci a snížení počtu heterozygotů. U křížení

disasortativního, kde dochází k preferenci odlišných fenotypů, dochází naopak ke zvýšení heterozygotnosti a snížení počtu homozygotů v dané populaci.

### **3.3.3.2.3 Nenáhodné oplození**

Posledním zde zmíněným případem odchylky od normy náhodného oplození je samotné oplození nenáhodné, které označuje situaci, kdy vybraný jedinec významně ovlivní alelovou strukturu celé populace. Příkladem této situace může být plemenitba krav, které jsou inseminovány semenem býka s nejlepšími užitkovými a plemenářskými vlastnostmi (Relichová 2009).

### **3.3.4. Vnější faktory působící na reálné populace**

Alelové četnosti jednotlivých populací jsou ovlivňovány dalšími systematickými, disperzivními a evolučními silami. Dle Relichové (2009) lze mezi procesy systematické řadit procesy mutace a migrace, které umožňují odhadnout rychlost i směr změny alelových četností. Za disperzivní proces pak považujeme genetický drift, který dovoluje odhad rychlosti změn alelových četností. Významnou evoluční silou je však také přírodní výběr, který jako jediný podporuje adaptaci populací na podmínky prostředí a zabraňuje tak narušujícím vlivům ostatních procesů. Následující kapitoly tyto mechanismy blíže představí.

#### **3.3.4.1. Genetický drift, efekt hrdla lahve, efekt zakladatele**

U velmi malých populací může dojít k jevu, který je označován pojmem genetický drift. Fusté (2012) tímto termínem popisuje situace, kdy v populaci stoupne četnost některé alely, nehledně na její prospěšnost v přírodním výběru, ale spíše vlivem náhody. Touto náhodou jsou pak myšleny situace, kde malý počet jedinců nesoucí výjimečnou alelu zaujme v nově vznikající malé populaci poměrově mnohem větší procento zastoupení. Toto procento zastoupení se však nevztahuje k celkovému počtu jedinců v populaci, ale pouze k jedincům, kteří aktivně přispívají do genofondu potomstva (tzv. efektivní velikost populace). S genetickým driftem se můžeme setkat například u invazivních druhů osídlujících nové lokality, jako například u Darwinových pěnkav na Galapágách či při již zmíněné invazi mandelinky bramborové do Evropy v roce 1921.

Zvláštním případem tohoto jevu jsou pak populace, které prošly tzv. „hrdlem lahve“. Podle Nei et al. (1975) o tomto jevu hovoříme, pokud dojde k náhlému poklesu počtu jedinců v populaci na 50 % a méně. V takovémto případě dochází k výraznému poklesu genetické

diverzity populace. Pokles genové variability jedinců v populaci je nevratný, neboť alely jsou vymřením jejich nositelů ztraceny. V budoucnosti však může dojít k obnovení diverzity populace na základě mutací, ale i k rapidnímu poklesu četnosti potomstva, který může být způsoben inbreední depresí v důsledku fixace semiletálních a letálních alel.

Zvláštním případem genetického driftu je pak tzv. efekt zakladatele (founder effect), se kterým se setkáváme v situaci, kdy nové území kolonizuje velmi úzká skupina jedinců a jejich ne široký genofond je pak důvodem malé variability populace v následujících generacích (Hamilton 2011).

### 3.3.4.2. Mutace

Mutace jsou náhodné změny v genetickém materiálu jedince, které se mohou zapříčinit změny na úrovni genu, chromozomu, či celého genomu. Samy o sobě tak mohou být podstatným zdrojem genetické variability, ačkoliv jejich četnost v přírodě je velmi nízká. Konkrétně je Hartl et al. (1997) uváděna hodnota pravděpodobnosti jejich výskytu v rozmezí od  $10^{-4}$  až  $10^{-6}$  na gen v jedné generaci. Četnost těchto mutací pak označujeme jako mutační rychlost či mutační tlak.

Hartl et al. (1997) dělí mutace na různé druhy. První jejich rozdělení je na základě místa v genomu a jejího projevu. Rozlišujeme tak mutace v kódujících oblastech a nekódujících oblastech, které se většinou neprojevují a označují se jako tzv. tiché mutace. Dále je rozlišujeme na základě změny genetické informace, a to na bodové mutace (změny na úrovni jednotlivých nukleových kyselin, spadají sem jednotlivé delece, inserce, substituce, které mohou způsobit změnu výskytu jednotlivých aminokyselin) a na mutace rozsáhlejších oblastí, které mohou způsobit značné změny ve struktuře polypeptidů a v důsledku i pozměnit funkci jimi kódovaných proteinů.

Vzniku mutací brání takzvané reparační procesy DNA, či tzv. reversní mutace, které jsou schopné odlišnosti v sekvencích opravovat. Ne vždy se však podaří těmto obranným mechanismům úspěšně zasáhnout (Hartl et al. 1997).

K výpočtu četností alel v populaci, ve které počítáme s probíhajícími mutacemi, lze užít specifickou modifikaci HW rovnováhy, kterou lze nalézt v dostupné literatuře.

### 3.3.4.3. Migrace

Pojem migrace neboli genový tok (gene flow) je podstatný evoluční mechanismus, který zapříčiňuje přesun alel jednotlivých genů mezi populacemi a vzniká tehdy, když se jedinci z jednotlivých populací navzájem kříží (Relichová 2009).

Hartl et al. (1997) rozlišuje migraci na jednosměrnou, kde dochází pouze k obohacení genofondu recipientní populace a obousměrnou, kde je výchozí populace jak recipientem, tak donorem. Při takovéto fúzi subpopulací dochází k redukci počtu homozygotních genotypů. Tento jev pak je nazýván Wahlundův princip (Crow et Kimura 1970). Velikost migrace je značně rozdílná a pouze teoreticky lze její hodnoty nalézt v logaritmické závislosti, při znalostech odpovídajících parametrů.

### 3.3.4.4. Přírodní výběr

Přírodní výběr, dle Crow et Kimura (1970), označuje princip, který praví, že konkrétní genetické varianty mají různou pravděpodobnost reprodukce. Jinými slovy, někteří jedinci s výhodnější genetickou výbavou mají větší šanci na zanechání potomstva než jedinci geneticky odlišní.

Tato teorie pochází již od Charlese Darwina (1872), který ve svém díle O původu druhů označuje přírodní výběr (přírodní selekci – natural selection) za hlavního hybatele evolučního procesu. Jedná se o jeden ze základních mechanismů populační genetiky, neboť při tomto procesu dochází ke genetickému rozrůznění populací, a to adaptací na podmínky konkrétního prostředí. Při stejných podmínkách prostředí ovšem může působit i opačně, a to zvýšením adaptace, které může způsobit omezení genetické rozmanitosti.

Crow et Kimura (1970) uvádí, že přírodní výběr působí na konkrétní fenotyp jedince, který je determinován souborem děděných genů a jejich vzájemnou interakcí. Míru schopnosti podílení se jedince na vzniku dalších generací pak vyjadřuje pojmem selekční či adaptivní hodnota. Celkovou adaptivní hodnotu pak tvoří různé složky, přičemž hlavními z nich jsou životnost a plodnost. Logicky poté jedinci s vyšší adaptivní hodnotou více přispívají do genofondu potomstva a naopak. Hodnotu poklesu četnosti nevýhodného genotypu pak popisuje tzv. selekční koeficient (Templeton 2006).

### 3.4 Rozdíly mezi jednotlivými populacemi mandelinky bramborové

Jedinci druhu mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*) mohou vykazovat různé úrovně vzájemné difference, které mohou vznikat výše představenými evolučně genetickými mechanismy. Na tuto rozdílnost lze nahlížet a pozorovat ji jak z pohledu morfometrického, tak z pohledu fenetického.

Mandelinka bramborová je druh, který se těší velké pozornosti vědců po celém světě. V roce 2018 byl finálně publikován její genom (Schoville et al. 2018), který je volně dostupný na webu amerického ministerstva zemědělství – USDA (United States Department of Agriculture) (Schoville et al. 2017).

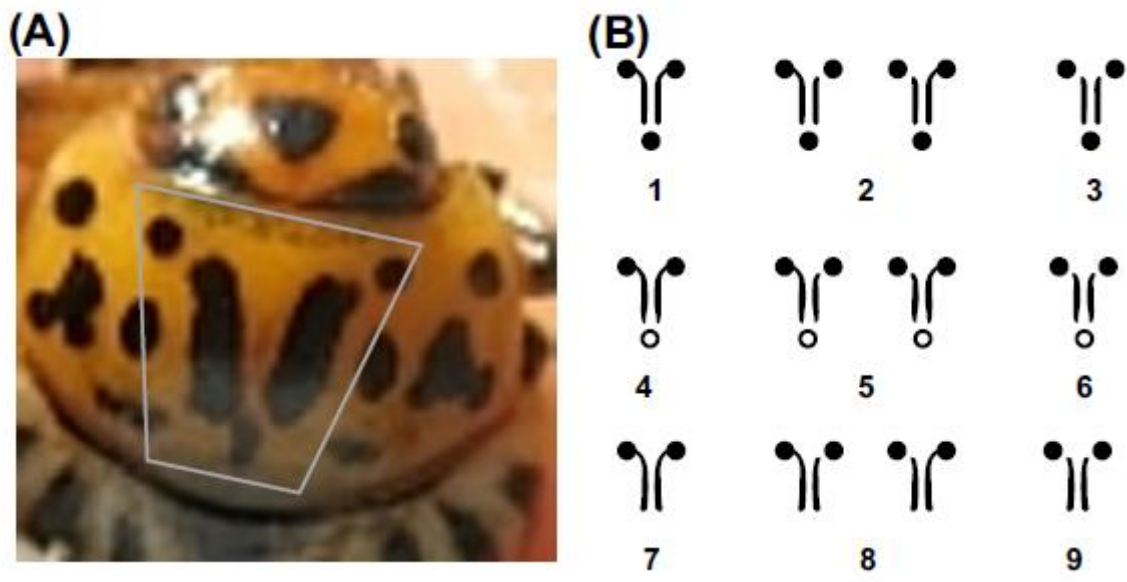
Na základě tohoto výzkumu byla rozlišena existence tří hlavních populací: středozápadní populace USA, severovýchodní populace USA a Evropská populace, přičemž je patrné, že poslední dvě jmenované populace se odštěpily od populace původní ze středozápadu USA a podstoupily značný genetický drift. Stejný autor pak předpokládá, že na genetickou strukturu evropské populace měl vliv i inbreeding. Grapputo (2005) pak uvádí hodnotu genetické divergence ( $F_{ST}$ ) mezi nejvzdálenějšími populacemi z Wisconsinu a z Evropy na úrovni 0,182. Míra genetického polymorfismu ( $\theta$ ) je pak u populace z USA také násobně větší než u populací z Evropy ( $\theta$  pop. Michigan = 93956,  $\theta$  pop. Evropa = 3,07), což znovu poukazuje na jedinou úspěšnou introdukci mandelinky do Evropy.

Schoville et al. (2018) uvádí, že v genomu tohoto druhu lze nalézt 1.34 milionů bialelických jednonukleotidových polymorfismů (SNP), což odpovídá zhruba 1 variabilnímu místu na 22 párů bází (pb) kódující DNA, což je, v porovnání s jinými druhy brouků či obratlovců vysoké číslo. Například u lejnožrouta (*Onthophagus taurus*) nacházíme polymorfismy 1x na 176 pb (Choi et al. 2010) či, u kura domácího (*Gallus gallus f. domestica*) pak 1x za 500 pb (International Chicken Polymorphism Map Consortium 2004). Tato vysoká hodnota polymorfismů se poté projevuje ve velké variabilitě jednotlivých jedinců tohoto druhu. Tuto variabilitu lze nahlížet z různých úhlů pohledu. Některé z nich jsou představeny v následujících kapitolách.

#### 3.4.1. Diference morfologických znaků

Z hlediska morfologického, konkrétně z analýzy vzorů skvrn na předohrudi lze dle Fasulati (1985) a Benkovskaya et al. (2004) rozlišit tři poddruhy mandelinky bramborové.

Jedná se o americký, evropsko-sibiřský a centrálně asijský poddruh. Tyto skvrny se však během jednotlivých generací u stejných populací vyvíjejí, což může znamenat jisté mikroevoluční procesy, vzniklé například v závislosti na adaptaci na agrochemickou kontrolu.



Obrázek 3: Rozlišení jedinců na základě morfologických odlišností - Vzory možných skvrn na předohrudi (Alyokhin et al. 2013).

### 3.4.2. Diference vzniklá na základě rozdílnosti izozymů

Jacobson et Hsiao (1983) a Hsiao (1982) provedli analýzu polymorfismů vybraných izozymů na vzorku brouků ze dvanácti různých lokalit USA, Mexika, Nizozemska a Španělska. Výsledkem bylo, že z 11 testovaných izozymů byly pouze 4 monomorfní ve všech populacích a 7 bylo polymorfních. Z genetického hlediska se nejvíc ze všech testovaných populací odlišovaly mandelinky z Mexika, které dosahovaly mnohem větší míry heterozygotnosti než zbylých 11 populací. Tato rozdílnost je natolik markantní, že by podle jejich názoru mělo být uvažováno o rozdělení tohoto druhu na dva poddruhy.

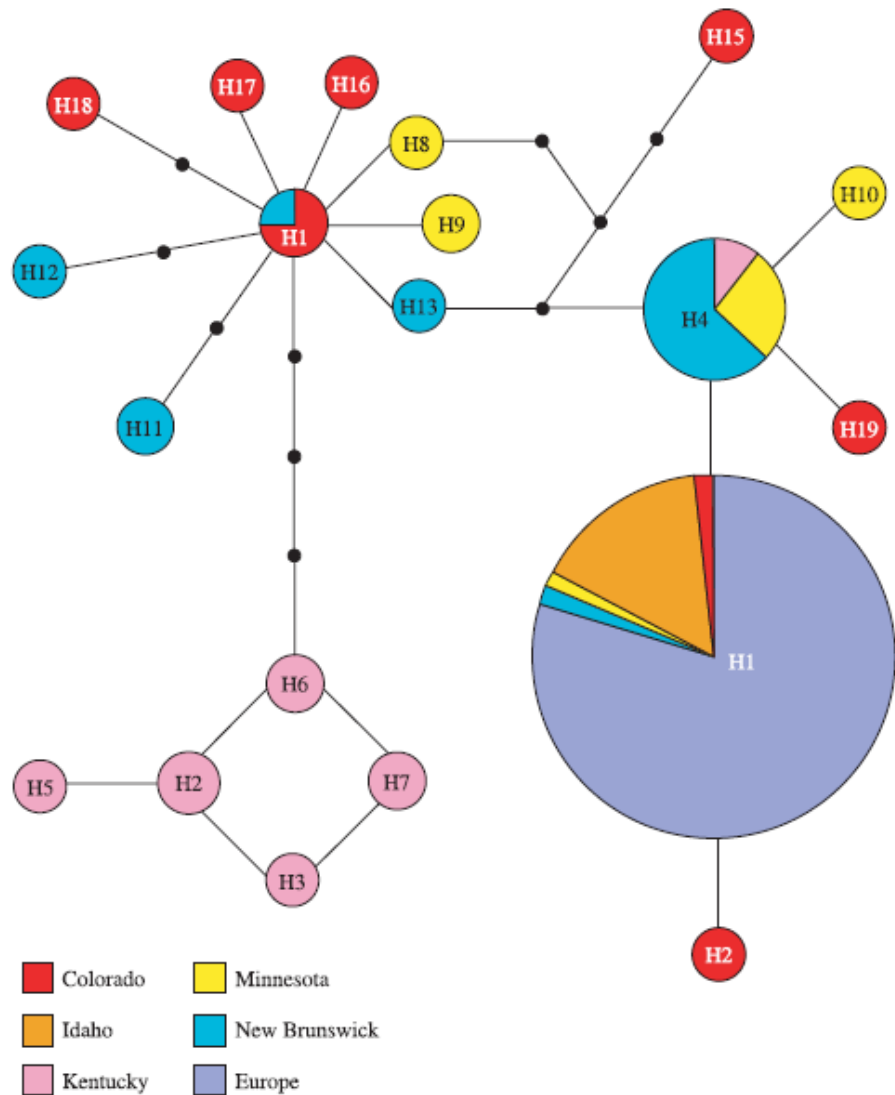
### 3.4.3. Diference na základě rozdílnosti mitochondriální DNA

Azeredo-Espin et al. (1996) při testování mtDNA více jak 500 jedinců mandelinky bramborové prokázal rozdílnost populací v USA a tento samý autor již v roce (1991) označil tři restriční místa a enzymy *EcoRI*, *HpaI* a *PstI* jako prakticky použitelné při determinaci

jednotlivých variant mtDNA. Výzkumy Grapputo et al. (2005) rozlišují 20 různých světových haplotypů mtDNA. Jejich vzájemná procentuální variabilita se pohybuje na úrovni 3,81 %. Tři z těchto haplotypů (H1, H4 a H14) jsou sdílené napříč populacemi. Všechny ostatní haplotypy jsou pak omezeny pouze na jednu populaci. Výzkum dále potvrdil, že všech osm testovaných evropských populací obsahuje mtDNA shodnou s haplotypem H1. Tuto totožnou mutaci také obsahovala populace mandelinky z několika států v USA, nejvíce však byla zastoupená u jedinců ze státu Idaho.

Grapputo et al. (2005) vyjadřuje vztah mezi jednotlivými haplotypy na základě difference mtDNA pomocí schématické sítě vztahů. Tato síť představuje tři skupiny haplotypů, jejichž divergence mezi jednotlivými skupinami dosahuje hodnot v rozpětí 0,6 % až 1,4 %. Jedna skupina haplotypů se skládá pouze z haplotypů pocházejících z Kentucky (H2, H3, H5, H6 a H7). Druhá skupina haplotypů je utvořena okolo haplotypu H14 a dalších, které se liší jedním až dvěma mutačními kroky. Třetí, největší skupina haplotypů, je tvořena haplotypy H1 a H4 a jejich blízkým mutacím. Vše je nejlépe patrné z níže uvedené schématické mapy.





Graf 1: Síť mitochondriálních haplotypů. Velikost oblasti uvnitř kruhů je úměrná počtu jedinců, kteří sdílí daný haplotyp. Linky znázorňují jednonukleotidové mutace a černé kruhy odpovídají nesledovaným haplotypům. Odlišné barvy reprezentují odlišné populace viz legenda (Grapputo et al. 2005).

Z toho všeho tedy vyplývá, že užití metody porovnávají mtDNA k rozlišení jednotlivých populací mandelinky lze úspěšně aplikovat pouze na populace ze severní Ameriky. V USA lze, dle Grapputo (2005), konstatovat, že největší vzájemné diference dosahují jedinci z její centrální oblasti, kteří při invazi na toto území podstoupili genetický vývoj množstvím procesů jako je efekt zakladatele (founder effect) či efekt hrdla lahve (bottleneck effect) a došlo tak oddělení jednotlivých haplotypů. Při rozlišování jednotlivých populací jedinců z Evropy je však tato metoda nevyhovující, neboť evropská populace je z hlediska mtDNA ve značné míře podobná. Villablanca et al. (1998) uvádí, že tato skutečnost však není překvapivá vzhledem k předchozím výzkumům invazivních druhů, které při

osídlování nových území z malého množství jedinců, přicházejí nejvíce o variabilitu v oblasti zastoupených isoenzymů a poté právě v mtDNA.

#### 3.4.4. Diference na základě polymorfismů jaderné DNA

Jelikož není možné v Evropě odlišit jednotlivé populace na základě rozdílů mtDNA, tak bylo pro tento účel užito metody AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), která umožňuje porovnání jaderné DNA.

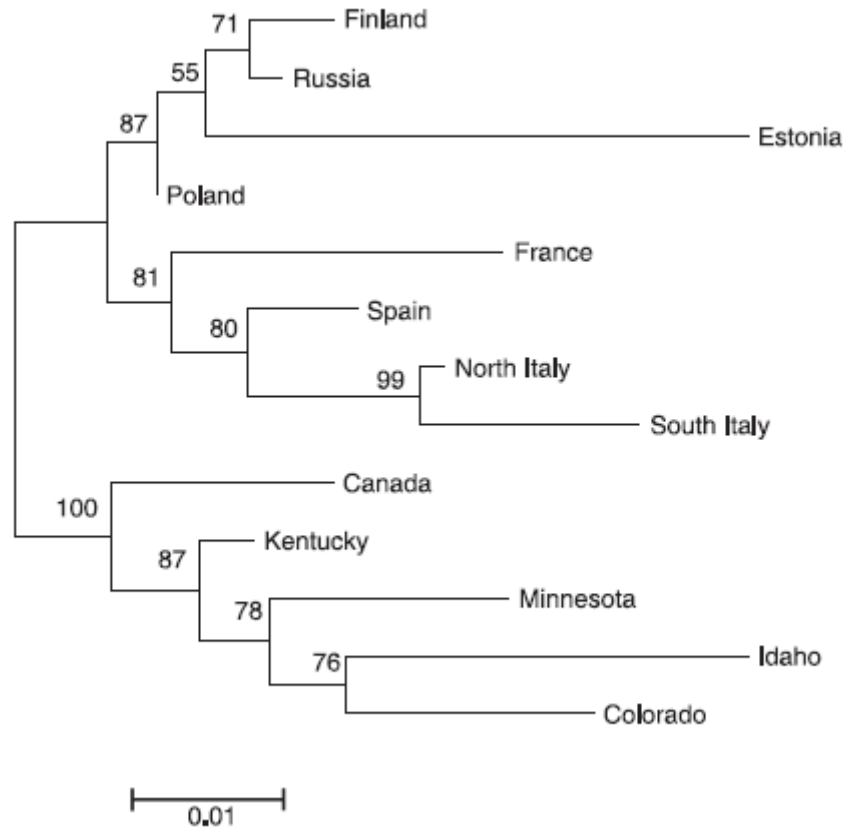
Užití této metody potvrdilo předpoklad snížení genetické variability uvnitř invazní populace. Grapputo et al. (2005) uvádí například, že nejvíce polymorfismů se u testovaných jedinců vyskytovalo ve vzorcích pocházejících z Colorada, ( $P$  [procentická molekulární variance] = 75 %) a naopak nejméně polymorfismů vykazovali jedinci pocházející z Francie ( $P$  = 38 %). Míra heterozygotnosti se pak v daných vzorcích pohybovala od 0,25 v Novém Brunšviku do 0,14 ve Francii. Obecně lze tedy konstatovat, že v obou sledovaných znacích dosahovaly větší variability vzorky pocházející ze severní Ameriky než vzorky z Evropy.

Přes znatelný úbytek jaderné genetické variability si evropská populace udržela její značnou míru. Grapputo et al. (2005) se domnívá, že tento fakt může indikovat skutečnost, že se zakládající populace skládala ze širšího množství jedinců či to, že k invazi došlo vícekrát ze stejného místa v USA. Dále je možné současnou jadernou genetickou variabilitu evropské populace vysvětlit evolučními procesy jednotlivých lokálních populací, které se přizpůsobují novému prostředí.

##### 3.4.4.1. Dělení populací na základě jaderné DNA

Dle výsledků analýz AFLP, provedené Grapputo et al. (2005), byla potvrzena přítomnost dvou základních větví populace mandelinky bramborové. Brouci ze severní Ameriky a Evropy vytvořily dvě separátní skupiny, které se navzájem liší. Mandelinky z USA tolik neinklinují k vytváření nových populací a populace, které se již v USA nachází, jsou si velmi blízké. Naproti tomu evropské populace těchto brouků se chovají odlišně a během let vytvořili i několik populací, které jsou navzájem mnohem odlišnější. Dokonce v rámci jednoho státu, například ve Francii či v Itálii, můžeme hovořit o minimálně dvou populacích, které se na daném území vyskytují. Obecně lze konstatovat, že dle analýzy polymorfismů DNA můžeme dle příbuznosti rozdělit evropské mandelinky do dvou velkých skupin, a to na východní skupinu (Estonsko, Rusko, Polsko aj.) a západní skupinu (Francie, Španělsko, Itálie).

Hranice výskytu jednotlivých evropských populací se však značně prolínají, takže například příslušníky populace z jižní Itálie lze najít i v lokalitách příslušejících populaci severní a naopak. Může to být způsobeno do jisté míry vlivem obchodu, povětrnostní situace a jiných příčin.



Graf 2: Fylogenetický strom populací mandelinky bramborové sestavený na základě Neiovi genetické distance (Nei's genetic distance) (Nei et al. 1975). Zaváděcí hodnoty jsou prezentovány v uzlových bodech (Grapputo et al. 2005).

### 3.4.5. Význam difference populací mandelinky bramborové

Význam studia a determinace jednotlivých populací může být naprosto zásadním klíčem k pochopení mnoha otázek, které si v souvislosti s invazivními živočichy klademe.

Například, podle Sakai et al. (2001), mimo znalosti reprodukčního chování a způsobů rozšiřování zkoumaných invazivních druhů je znalost populační příbuznosti další velice

užitečný nástroj při vytváření strategií ochrany ekosystémů, plodin a jiného před těmito živočichy.

Dalším příkladem ilustrujícím význam pochopení této problematiky je také rozdílnost v hostitelském okruhu jednotlivých populací mandelinky bramborové. Horton et Capinera (1988) na základě pozorování a experimentálních pokusů prokázali, že různé populace obývající odlišná prostředí preferují jiné spektrum hostitelských rostlin užívaných pro své rozmnožování a potravu. Tento výzkum probíhal na dvou, geograficky ne příliš vzdálených, populacích při jejich interakci s plevely *Solanum sarrachoides* a *Solanum rostratum* (Bufalo Bur) a kulturní rostlinou lilku bramboru (*Solanum tuberosum*). Výsledkem pokusu byla prokázána totožná interakce populací vůči rostlinám bramboru a Bufalo buru, avšak zároveň byla statisticky průkazně zjištěna rozdílnost v interakci s plevelem *Solanum sarrachoides*. U populace z první farmy byl zaznamenán na rostlinách *Solanum sarrachoides* rychlý vývoj s minimální mortalitou jedinců, zatímco druhá populace při stejném pokusu vykazovala ztráty až na úrovni 70 % spojeném s velmi slabým vývojem přeživších jedinců.

Z praktického hlediska nejdůležitějším důvodem testování polymorfismů jednotlivých populací je vzniklá rezistence k určitým typům insekticidní ochrany. Tímto tématem se zabýval již Forgash (1984), který ve své studii uvádí přehled v minulosti účinných látek a dobu, kdy došlo u mandelinky k první zmínce o rezistenci. Z 15 testovaných účinných látek u 3 došlo k oznámení vzniku rezistence ještě v tom samém roce, u 9 byla reportována rezistence do 5 let, u 1 postřiku do 10 let, u 1 postřiku až po 60 letech a u posledního testovaného, fenalvalerátu v kombinaci s piperonylbutoxidem, rezistence v době výzkumu nebyla známa.

V roce 1999 označuje Lee et al. (1999) recesivně homozygotní gen *LdVssc1* za gen kandidátní, tedy za potencionální příčinu rezistence k pyretroidům. Hawthorne (2001). Pomocí AFLP mapování genomu prokázal jeho předpokládané umístění na chromozomu X (Heim et al. (1992) a potvrdil správnost označení tohoto genu za příčinu rezistence k pyretroidům. Hawthorne (2003) navíc přidává v souvislosti s výzkumem insekticidní rezistence význam tzv. knockdown rezistenci, způsobenou bodovou mutací (SNP), cytosinu přeměněného na thymin. Konkrétně jde o (L1014Fkdr a M918T super kdr). Dle Rinkevich et al. (2012) tato mutace vznikla nezávisle na sobě na různých místech světa.

Tato problematika rozšiřující se insekticidní rezistence mandelinky je značně rozsáhlé téma, viz například práce Malekmohammadi et al. (2012) a Malekmohammadi et Galehdari

(2016) o mutaci acetylcholin esterázy a jejím vlivu při insekticidní ochraně u iránské populace tohoto brouka či práce Fu et al. (2015), který se principem rozvíjející se rezistence vypořádává za užití genového „umlčování“ (gene silencing) 49 speciálních strukturních proteinů bHLH (basic helix loop helix) metodou RNAi (RNA interference), která může být dle Mamta et Rajam (2017) budoucností insekticidní ochrany. V České republice se pak tímto tématem zabývá Zichová et al. (2010) z výzkumného ústavu v Ruzyni, která sledovala rezistenci české populace mandelinky vůči organofosfátům a pyretroidům.

## 4 Metodika

### 4.1 Sběr vzorků a lokality původu brouků

Sběr vzorků mandelínek probíhal ve spolupráci s pracovníky VÚB HB a Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích. Z každé ze 13 lokalit ČR a jedné lokality z východu SR bylo odebráno 100 brouků, kteří byli zmrazeni a v termoboxech zasláni na pracoviště ČZU. Sběr probíhal během června a července roku 2019. Vybraní jedinci pochází ze zástupců staré zimní (jarní) generace. Lokality odběrů byly vybírány tak, aby byly maximálně pokryty oblasti s vyšším zastoupením pěstování brambor. Lokalita Stakčín (SR) reprezentuje výrazněji geograficky izolovanou populaci pro možnost porovnávání.

Do jisté míry odlišnými lokalitami ze všech testovaných jsou lokality Travčice A a Travčice B, které jsou unikátní tím, že jejich testovaní jedinci jsou vždy potomci jedné náhodně oplozené samice.

Rozmístění jednotlivých lokalit je patrné z následující mapy (obrázek 4) a tabulky (tabulka 2). Čísla lokalit v tabulce odpovídají číslům zaneseným na mapě. Roztřídění lokalit do regionů proběhlo na základě geografického umístění jednotlivých lokalit, kdy bylo cílem blízké lokality propojit do stejného regionu.

Lokalita	Okres	Region	Zem. šířka	Zem. délka
1 Bojanovice	Klatovy	Plzeňsko	49.2952192N,	13.6350417E
2 Bělčice	Strakonice	Plzeňsko	49.5057981N,	13.8681967E
3 České Budějovice	České Budějovice	J. Čechy	48.9845322N,	14.4213594E
4 Čelákovice	Praha – východ	S. od Prahy	50.1601811N,	14.7772483E
5 Chlumín	Mělník	S. od Prahy	50.2872792N,	14.4568278E
6 Čížov	Znojmo	J. Morava	48.8791622N,	15.8693608E
7 Havlíčkova Borová	Havlíčkův Brod	Vysočina	49.6405228N,	15.7941717E
8 Jámy	Žďár nad Sázavou	Vysočina	49.5318772N,	16.0027469E
9 Malonty	Český Krumlov	J. Čechy	48.6820467N,	14.5689025E
10 Dolní Hořice - Oblajovice	Tábor	Vysočina	49.4445492N,	14.8783194E
11 Stakčín (Slovensko)	Snina	Slovensko	49.0046822N,	22.2244244E
12 Travčice	Litoměřice	S. od Prahy	50.5010056N,	14.1880422E
13 Valečov	Havlíčkův Brod	Vysočina	49.6432406N,	15.4946897E
14 Žabčice	Brno – venkov	J. Morava	49.0018942N,	16.5916219E
15 Želiv	Pelhřimov	Vysočina	49.5276297N,	15.2110433E

Tabulka 2: Seznam odběrových lokalit vzorků mandelinky bramborové. Zkratky regionů: S. od Prahy = lokality ležící na sever od hl. města Praha; J. Čechy = jižní Čechy.



Obrázek 4: Mapa odběrových lokalit vzorků v České republice a na Slovensku. Čísla jednotlivých lokalit odpovídají číslům v tabulce č. 2.

## 4.2 Laboratorní analýzy

### 4.2.1. Izolace DNA za užití CTAB pufru

#### 4.2.1.1. Extrakce DNA

Po určení pohlaví testovaného jedince pro další analýzy byly každému broukovi opálenou pinzetou odebrány 4 nožičky, které byly vloženy do zkumavky s objemem 1,5 ml. Následně bylo přidáno 400  $\mu$ l CTAB pufru, 2  $\mu$ l merkaptoethanolu a vše bylo zhomogenizováno kulatou skleněnou tyčinkou. Po přidání 2  $\mu$ l proteinázy K byly vzorky vortexovány a inkubovány při 60 °C po několik hodin, obvykle přes noc.

#### 4.2.1.2. Purifikace DNA

Ráno, po proběhlé inkubaci vzorků, byly ke každému vzorku přidány 4  $\mu$ l RNázy a vše bylo důkladně vortexováno s následnou inkubací po 20 min při 25°C. Následně byla do každé zkumavky, v prostředí digestoře, aplikována směs 400  $\mu$ l fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu v poměru 25:24:1 (Roth) a vše bylo důkladně zvortexováno. Poté byly vzorky centrifugovány při 14 000 rpm (revolutions per minute) po 10 minut pro oddělení jednotlivých frakcí. Vzniklý supernatant neboli tekutina nad sedimentem, byl opatrně převeden do nové 1,5 ml zkumavky. Snahou bylo odebrat množství vzorku minimálně v rozmezí 300 – 350  $\mu$ l, a přitom nenabrat fenol, který sedimentoval na dno zkumavky. Do nové zkumavky pak bylo

přidáno 400 µl směsi chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1. Vše bylo důkladně zvortexováno a centrifugováno při 12 000 rpm po 10 minut. Následně byla opět svrchní frakce, přibližně 250 µl odpipetována a převedena do nové, definitivní 0,5 ml zkumavky s plochým víčkem.

#### **4.2.1.3. Srážení nukleových kyselina a rozpouštění peletu**

Do těchto nových zkumavek poté bylo přidáno ekvální množství vychlazeného izopropanolu, tedy cca 250 – 280 µl. Převrácením bylo vše důkladně promícháno, dokud se tvořila sraženina a následně byly vzorky inkubovány při -20 °C po 1,5 hodiny. Po inkubaci následovala centrifugace při 10 000 rpm po 10 min a opatrné oddělení supernatantu se současným přidáním 225 µl 70% etanolu a 25 µl octanu sodného (pH 5,6) pro opláchnutí peletu. Následovala znovu centrifugace 10 min při 10 000 rpm a následné oddělení supernatantu slítím, neboť je v tuto chvíli již pelet DNA dobře viditelný. Poté bylo přidáno 200 µl absolutního ethanolu pro odstranění octanu sodného a vše bylo centrifugováno po 10 min při 10 000 rpm. Po centrifugaci byl etanol odstraněn odsát pipetou a všechny vzorky byly následně vysušené v termobloku při teplotě v rozmezí 45 – 50°C. Suchý pelet byl poté rozpuštěn přes noc v 40 – 50 µl TE pufru. TE pufr se skládal z 1,0mM Edta, 10mM triss s výsledným pH = 8.

#### **4.2.2. Příprava vzorků na PCR**

V této diplomové práci byly použity primery dle Grapputo et al. (2006). Grapputo ve své práci představil 11 mikrosatelitních lokusů, složení jejich repetitivních dinukleotidových sekvencí, jejich primery, rozsah velikostí, barvitelnost při elektroforéze a další vlastnosti. Vše je patrné nejlépe z tabulky č. 3.



Lokus	Primery	Bar. (DP)	Opak.	Rozsah GR	N (GR)	N (DP)
LdA11b	F 5' CAACGTACAGTGTGCTTCATTTG 3'	VIC	(GT)8	163-169	6	3
	R 5' GTTTCTTTCAAGATTTGTTGCAGACATCA 3'					
LdB8b	F 5' TGCTCATTTCAAATATGGTTTTG 3'	VIC	(CA)9	94-104	5	4
	R 5' GTTTCTTCCAACAGGTATCCAACAAACG 3'					
LdD4h	F 5' GGAAAAATGTGTGGTTCAAGG 3'	6-FAM	(TG)9T	251-289	15	0
	R 5' ACAGCGTCCCTGTCACTTCT 3'		(TG)4			
LdE10e	F 5' ACAGCGTCCCTGTCACTTCT 3'	PET	(CA)10	115-132	5	2
	R 5' GTTTCTTCCCAGCGAGGTTTATTAGGA 3'					
LdE11c	F 5' GCGGCCAGATGTTATCAGTT 3'	6-FAM	(CA)8	138-160	5	4
	R 5' GTTTCTTACC CGACTTCAAAGGTAT 3'					
LdAC5-2	F 5' CACTCTGGGGTCAAATAGAG 3'	6-FAM	(CA)5TA	208-231	11	0
	R 5' GTTTCTTTTCGAGTGACTTGTGTGTGT 3'		(CA)18			
LdAC5-22	F 5' CGTTTATGATTAGCATTTCTGA 3'	VIC	(TCGT)5	147-160	3	3
	R 5' GTTTCTTACTTTCAATAAAAAGTGCGAT 3'					
LdGA4-5	F 5' CCAGTTGATATTGAGAGAGA 3'	NED	(GA)9	208-230	8	6
	R 5' GTTTCTTCAAACGCACTCAGTACAAAA 3'					
LdGA5-11	F 5' TTTGGTGGGTGTTTCTATTCT 3'	NED	(CT)10	175-189	9	6
	R 5' GTTTCTTAAATGCGCCTGATGATAG 3'					
LdGA4-18	F 5' GCTCGTCAAATCTAGGAAGA 3'	PET	(TC)10	204-212	7	4
	R 5' GTTTCTTAAGAATGAAATCCAGGAGAA 3'					
LdGA5-30	F 5' GTTTCCATCATGATCCATT 3'	6-FAM	(TC)11	173-182	8	5
	R 5' GTTTCTTATAGGAAGCAACGACCATC 3'					

Tabulka 3: Charakteristika 11 mikrosatelitních lokusů mandelinky bramborové. Zprava: lokus, primery, v laboratořích ČZU užití fluorescenční barvivo, opakující se motiv mikrosatelitu, rozsah hodnot produktů PCR dle Grapputa, kterých lokusy mohou nabývat; Počty alel dle Grapputo (N GR); Počet alel detekovaných laboratoři ČZU (N - DP). Lokusu LdD4h není přiřazeno žádné barvivo, neboť byl z analýzy této práce vyloučen – viz dále. Dle Grapputo 2006, upraveno M. Matyska 2020

Pro podmínky laboratoře ČZU byly tyto primery optimalizovány. Tato optimalizace spočívala zejména v modifikaci všech reversových primerů na 5'konci sekvencí 5'GTTTCTT3' dle Brownstein et al. (1996) pro podporu adenylace 3'konce značených ssDNA fragmentů. F-primery byly na 5'konci označeny jedním z fluorochromů (6-FAM, VIC, NED, PET: Life Technologies, USA). Každý marker byl nejprve otestován zvlášť na referenční sadě vzorků (koncentrace každého primeru v reakci byla 0,2 μM). Bylo zjištěno, že marker LdD4h opakovaně neamplifikoval, pročež byl navržen nový R primer. Bylo však zjištěno, že se sekvence tohoto mikrosatelitu nachází v genomu ve více kopiích, marker LdD4h byl tedy z následných analýz vyřazen. Pro multiplex analýzu tak bylo použito zbylých 10 mikrosatelitů. Vzhledem k velikostním překryvům produktů PCR amplifikace u některých markerů se stejnou

fluorescenční barvou a křížovým amplifikacím byly markery, ve vhodných koncentracích, rozděleny do dvou multiplexů. Teplota pro nasedání primerů (annealing) byla optimalizována na 56 °C. Výsledky optimalizační práce a konkrétní zvolený postup přípravy vzorků na PCR jsou patrné z tabulky 4 a 5.

MULTIPLEX 1			
Složka	Koncentrace	pipetovaný objem	Fl. Značka
DNA vzorku	[5ng/μl]	1 μl	
Q. Multiplex PCR		5 μl	
LdAC5-2 – F	4 μM	0,2 μl	6-FAM
LdAC5-2 – R	4 μM	0,2 μl	
LdE11c – F	4 μM	0,1 μl	6-FAM
LdE11c - R	4 μM	0,1 μl	
LdGA4-5 - F	4 μM	0,2 μl	NED
LdGA4-5 - R	4 μM	0,2 μl	
LdAC5-22 - F	4 μM	0,1 μl	VIC
LdAC5-22 - R	4 μM	0,1 μl	
DDI - H2O		2,8 μl	
Celkem		10 μl	

Tabulka 4: Složení Multiplexu 1

MULTIPLEX 2			
Složka	Koncentrace	pipetovaný objem	Fl. Značka
DNA vzorku	[5ng/μl]	1 μl	
Q. Multiplex PCR		5 μl	
LdB8b - F	4 μM	0,1 μl	VIC
LdB8b - R	4 μM	0,1 μl	
LdGA5-30 -F	4 μM	0,2 μl	6-FAM
LdGA5-30 -R	4 μM	0,2 μl	
LdGA5-11 - F	4 μM	0,2 μl	NED
LdGA5-11 - R	4 μM	0,2 μl	
LdE10e - F	4 μM	0,2 μl	PET
LdE10e - R	4 μM	0,2 μl	
LdA11b - F	4 μM	0,15 μl	VIC
LdA11b - R	4 μM	0,15 μl	
LdGA4-18 - F	4 μM	0,5 μl	PET
LdGA4-18 - R	4 μM	0,5 μl	
DDI - H2O		1,3 μl	
Celkem		10 μl	

Tabulka 5: Složení multiplexu 2.

Do zkumavek pro PCR byly pipetovány vzorky DNA, primerové jednotlivých mikrosatelitů, Qiagen ® Multiplex PCR Plus Kit (složení: Taq DNA polymeráza, MgCl<sub>2</sub>, dNTP

Mix, Q-Solution, RNase free water) a vše bylo doplněno dvakrát deionizovanou vodou na objem 10 µl. Všechny přidávané látky byly po rozmrznutí před pipetováním zvortexovány. Příprava těchto vzorků pro PCR probíhala v laminárních boxech. Koncentrace a objemy jednotlivých pipetovaných složek se měnily v závislosti na připravovaném multiplexu.

#### 4.2.3. PCR amplifikace mikrosatelitních lokusů

Výše připravené vzorky byly vloženy buď do termocykleru C1000 (BioRad) s kapacitou 2x 48 vzorků. Konkrétní průběh PCR, tedy jednotlivé užití teploty a proběhlé fáze, jsou uvedeny v tabulce 6.

Fáze reakce	Úvodní denaturace	Denaturace	Annealing	Elongace	Závěrečná extense	Chlazení
T (°C)	95	94	56	72	60	12
t (min)	6	0,5	1,5	1	48	∞
opakování	1	35			1	

Tabulka 6: Průběh PCR

#### 4.2.4. Ředění DNA pro kapilární elektroforézu.

Produkty PCR byly ředěny v poměru 1:29 dvakrát deionizovanou vodou. Z této směsi byl odebrán 1 µl, který byl pipetován do zkumavek o objemu 0,2 ml. Následně bylo k tomuto množství vzorku přidáno 11,8 µl Hi-Di (vysoce deionizovaný formamid) a 0,2 µl hmotnostního standartu GeneScan-600LIZ. Takto připravené vzorky byly převedeny do speciálních zkumavek ve stripech po 8 pro kapilární elektroforézu a opatřeny patřičnými uzávěry. V termocykleru poté proběhla jejich denaturace při 95 °C.

#### 4.2.5. Kapilární elektroforéza

Vzorky byly analyzovány na kapilární elektroforéze ABI PRISM A310 (Life Technologies, USA). Délka užití skleněné kapiláry byla 36 cm a její vnitřní povrch byl kryt polymerem POP4 pro kontrolu elektroosmotického toku. Bylo užito nástřiku 15kV po dobu 5

sekund. Elektroforéza probíhala 23 minut při 15kV. Výstupem elektroforézy byla data ve formátu fsa.

Elektroforeogramy byly analyzovány a alely detekovány v programu GeneMapper. Dále byly v tomto programu připraveny moduly pro automatickou detekci píků ve stanovených lokusech. Tyto moduly byly využity, avšak každý vzorek byl dále podroben manuální kontrole, při níž došlo k odstranění falešných alel. Za referenční alely zde byly použity výsledky pokusných vzorků 90 imag populací Oblajovice (okr. Tábor), Stakčín (Slovensko) a Valečov (okr. Havlíčkův Brod). Výsledky byly exportovány ve formátu .txt a následně převedeny do formátu .xlsx, který je základem pro hodnocení v příslušném programu MS Excel. Dalším výsledkem těchto analýz bylo vyloučení lokusu LdAC5-2, neboť jeho hodnoty nebyly dostatečně průkazné pro pozdější analýzu. Ve výsledcích této práce je tak pracováno pouze s 9 mikrosatelitními markery.

#### 4.2.6. Analýza dat

Data v programu MS Excel byla upravena do formátu pro analýzy v programu GenAIEx 6.51b2 (Peakall et Smouse 2006), který funguje jako doplněk k programu MS Excel. Fylogenetický strom byl zpracován v programu Darwin 6 (Perrier et Jacquemoud-Collet 2019).

## 5 Výsledky

### 5.1 Diference lokusů

V programu GenAIEx byla provedena analýza zastoupení alel na jednotlivých lokusech, a to jak na úrovni populací, tak na úrovni regionální. Na všech 9 analyzovaných lokusech bylo možné detekovat více než jednu alelu. Nejvíce alel obsahovaly lokusy LdGA5-11 a LdGA4-5 a to šest. Naopak nejméně alel, pouze dvě, obsahoval lokus LdE10e. Aritmetický průměr alel na lokus vychází na 4,11. Četnost všech alel detekovaných na jednotlivých lokusech a míra jejich zastoupení ve všech testovaných vzorcích je patrná z tabulky 7.

LdGA5-30		LdGA5-11		LdGA4-18		LdE10e		LdB8b		LdA11b		LdAC5-22		LdE11c		LdGA4-5	
Alely	Freq	Alely	Freq	Alely	Freq	Alely	Freq	Alely	Freq	Alely	Freq	Alely	Freq	Alely	Freq	Alely	Freq
N	439	N	502	N	490	N	502	N	502	N	502	N	502	N	499	N	502
<b>180</b>	0.01	<b>179</b>	0.43	<b>210</b>	0.52	<b>128</b>	0.5	<b>100</b>	0.2	<b>169</b>	0.4	<b>152</b>	0.17	<b>152</b>	0.953	<b>206</b>	0.001
<b>181</b>	0.33	<b>185</b>	0.31	<b>211</b>	0.08	<b>131</b>	0.5	<b>103</b>	0.2	<b>171</b>	0	<b>160</b>	0.42	<b>154</b>	0.001	<b>212</b>	0.002
<b>183</b>	0.3	<b>187</b>	0	<b>215</b>	0			<b>105</b>	0.2	<b>173</b>	0.6	<b>164</b>	0.41	<b>160</b>	0.043	<b>214</b>	0.123
<b>185</b>	0.05	<b>189</b>	0.13	<b>217</b>	0.4			<b>107</b>	0.4					<b>164</b>	0.003	<b>218</b>	0.026
<b>186</b>	0.32	<b>191</b>	0.13													<b>220</b>	0.212
		<b>194</b>	0													<b>226</b>	0.636

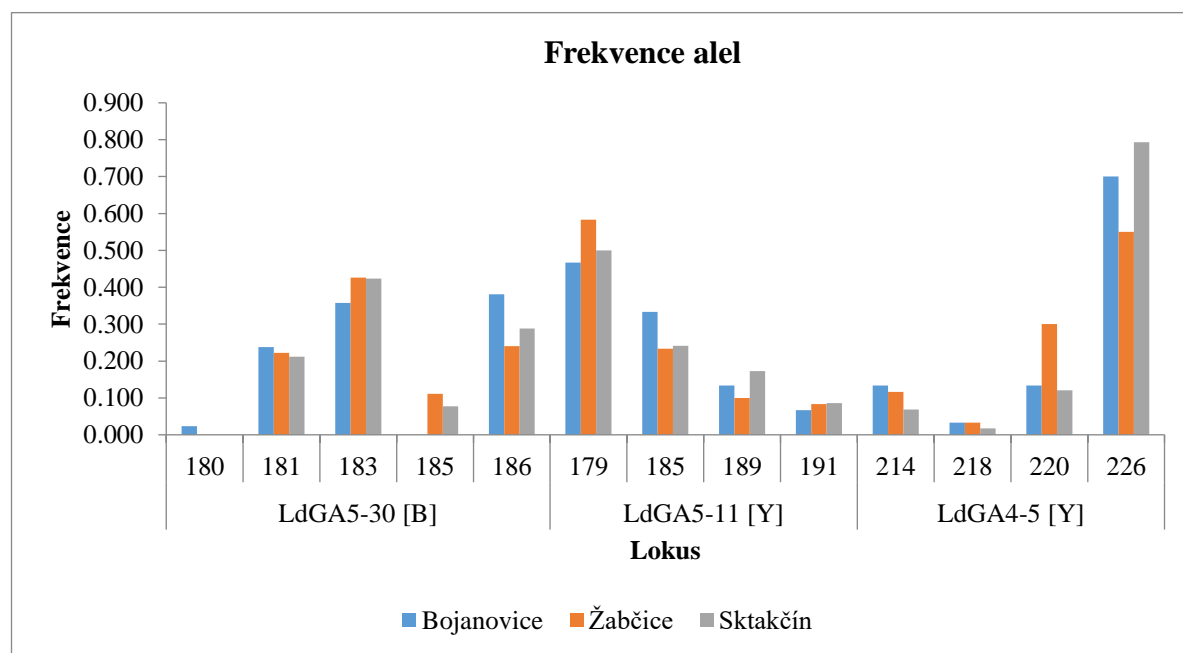
Tabulka 7: Zastoupení jednotlivých alel na testovaných lokusech. U některých testovaných jedinců nebyla na vybraných lokusech elektroforézou detekována žádná alela, a tak se počty analyzovaných vzorků na lokus vzájemně liší – viz hodnoty vpravo vedle písmene N.

Zastoupení alel se lišilo napříč populacemi. Pro názorné porovnání byly v níže uvedené tabulce 8 vybrány tři nejvíce polymorfní lokusy LdGA5-30, LdGA5-11, LdGA4-5 a tři populace, které byly zvoleny tak, aby co nejvíce reprezentovaly rozdílnost zeměpisné délky.

LdGA5-30 [B]				LdGA5-11 [Y]				LdGA4-5 [Y]			
alela	Boj.	Žab.	Stak.	alela	Boj.	Žab.	Stak.	alela	Boj.	Žab.	Stak.
N	21	27	26	N	30	30	29	N	30	30	29
<b>180</b>	0.024	0	0	<b>179</b>	0.467	0.58	0.5	<b>206</b>	0	0	0
<b>181</b>	0.238	0.222	0.212	<b>185</b>	0.333	0.23	0.24	<b>212</b>	0	0	0
<b>183</b>	0.357	0.426	0.423	<b>187</b>	0	0	0	<b>214</b>	0.133	0.117	0.069
<b>185</b>	0	0.111	0.077	<b>189</b>	0.133	0.1	0.17	<b>218</b>	0.033	0.033	0.017
<b>186</b>	0.381	0.241	0.288	<b>191</b>	0.067	0.08	0.09	<b>220</b>	0.133	0.3	0.121
				<b>194</b>	0	0	0	<b>226</b>	0.7	0.55	0.793

Tabulka 8: Porovnání 3 vybraných, nejpolymorfnějších lokusů na 3 vybraných lokalitách Bojanovice, Žabčice a Stakčín..

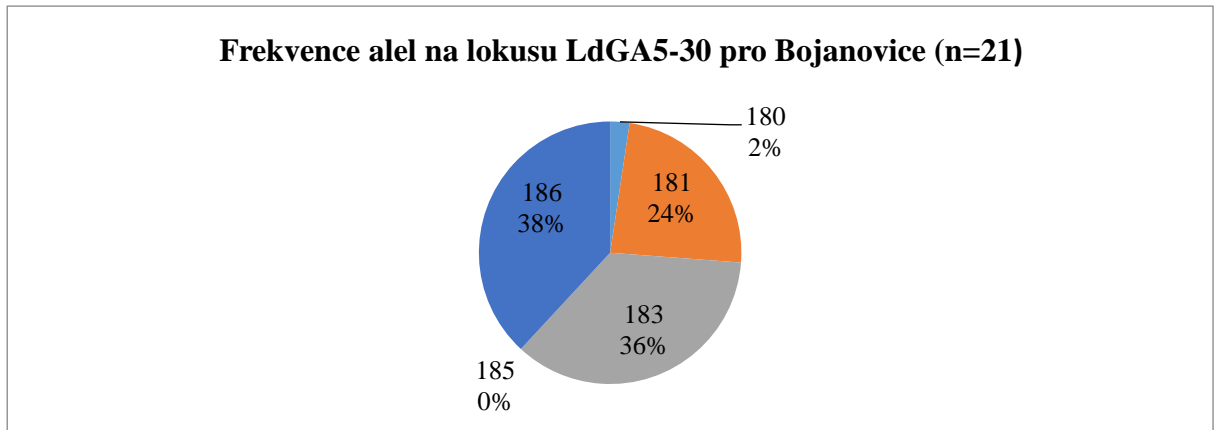
Z výše uvedené tabulky, ale i z následujícího grafu č. 3, je patrné, že se frekvence alel zastoupených ve vybraných populacích liší. Například alelu 180 z lokusu LdGA5-30 lze v tomto výběru detekovat pouze u populace z Bojanovic. Naopak například alelu 185 ze stejného lokusu u jedinců pocházejících z Bojanovic nenalezneme. Tento fakt může indikovat jistou míru diference jednotlivých populací.



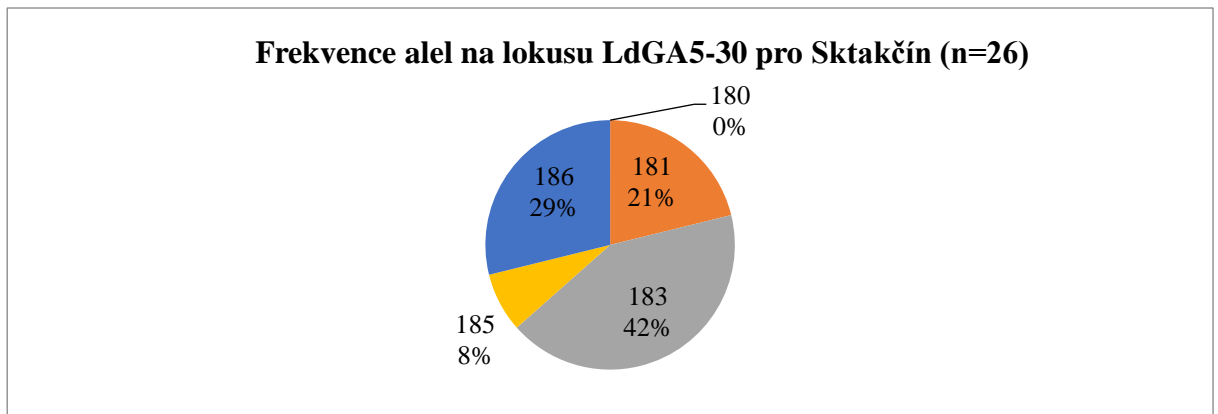
Graf 3: Graficky zpracovaná frekvence alel u tří nejpolymorfnějších lokusů na třech vybraných lokalitách.

Pro ukázkou množství polymorfismů na jediném lokusu byl z výše uvedených lokusů vybrán LdGA5-30, na němž je v koláčovém grafu demonstrována rozdílnost alel napříč třemi vybranými populacemi. Z grafů 3, 4 a 5 je, mimo výše uvedené, dobře patrná rozdílnost ve

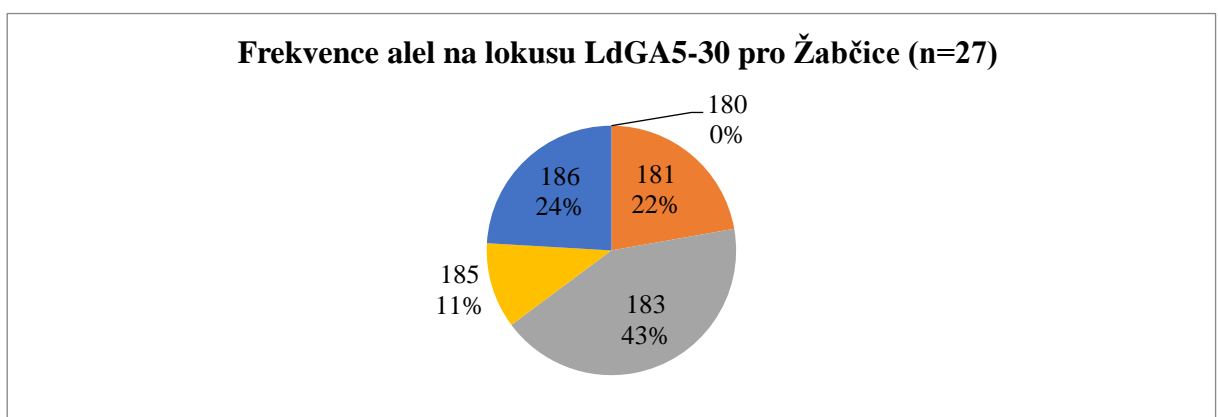
frekvenci zastoupení alely 186, která u nejzápadnější populace z Bojanovic kompenzuje absenci alely 185 u populací Žabčice a Stakčín



Graf 4: Frekvence alel na lokusu LdGA5-30 v lokalitě Bojanovice. Za pozornost stojí mimo jiné frekvence alely 180, která se v jiných lokalitách nevyskytuje.

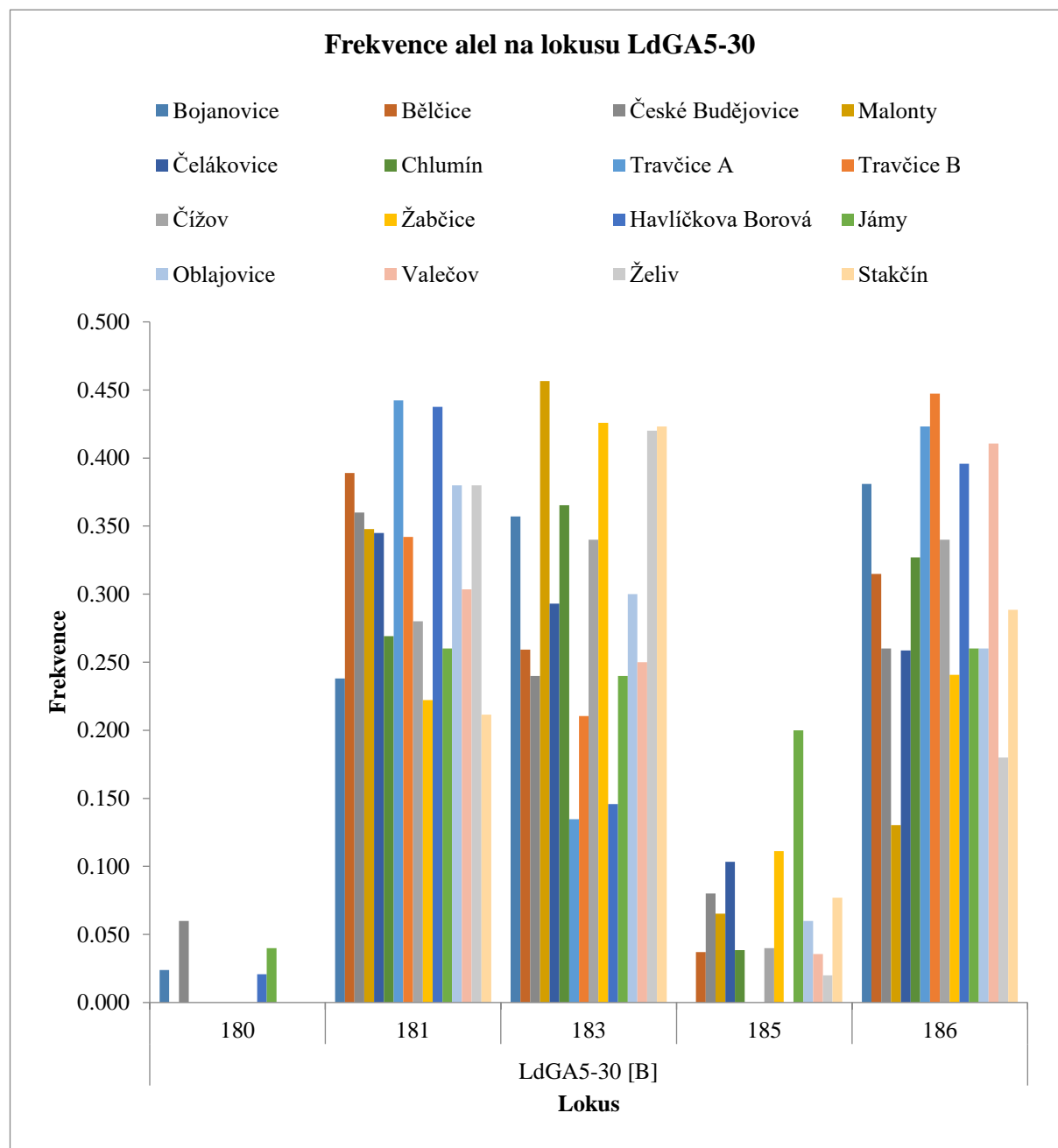


Graf 5: Frekvence alel na lokusu LdGA5-30 v lokalitě Stakčín



Graf 6: Frekvence alel na lokusu LdGA5-30 v lokalitě Žabčice. Patrný je nárůst frekvence alely 185.

Porovnáním frekvence alel stejného lokusu se všemi testovanými populacemi získáme níže uvedený graf 7. Je z něj patrné, že nejméně zastoupenou alelou je alela 180, která je specifická pouze pro populace pocházející z oblasti jihozápadu Čech (Boj, ČB, Jámy) a pro jednu populaci z Vysočiny (HB). Do jisté míry je také odlišná populace z Malont, jejíž alela 183 dosahuje nejvyšší frekvenci výskytu napříč všemi ostatními. Tento enormní výskyt je však kompenzován u alely 186, která je u populace z Malont nejméně zastoupená. Alela 185 pak chybí u 4 populací ze 16 (Boj, TrA, TrB, HB).

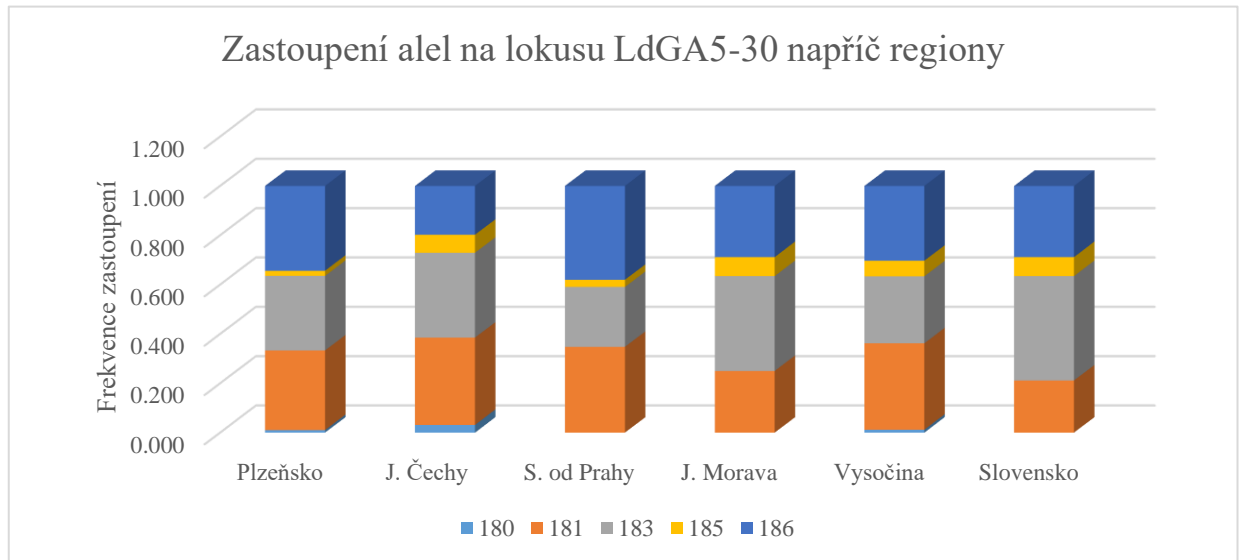


Graf 7: Frekvence jednotlivých alel na lokusu LdGA5-30 u všech populací.

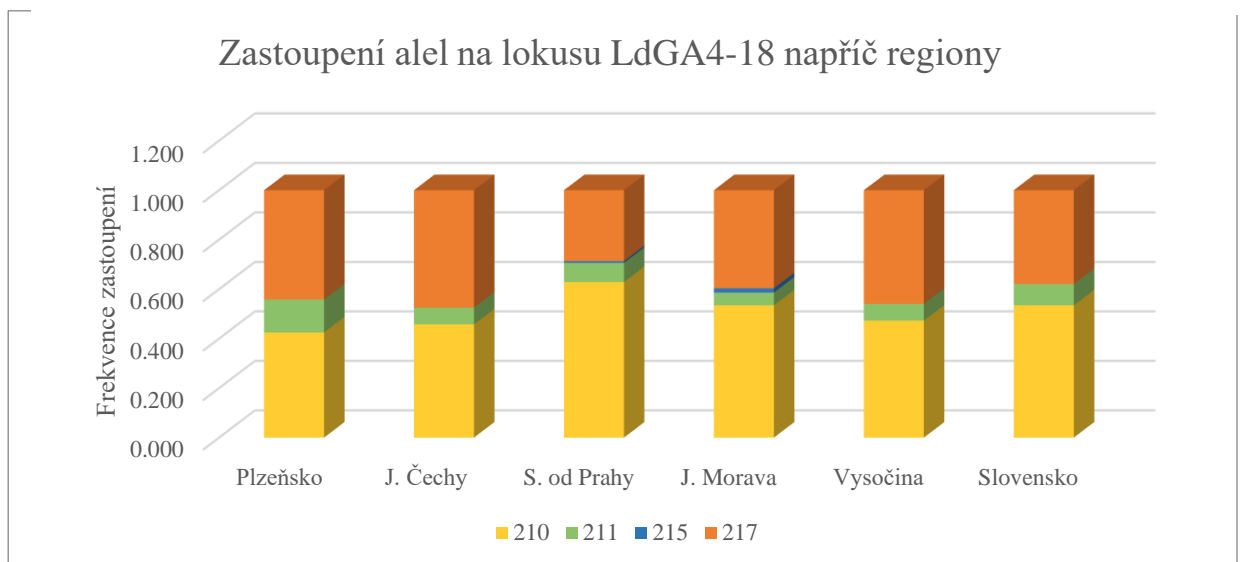


### 5.1.1. Regionální srovnání

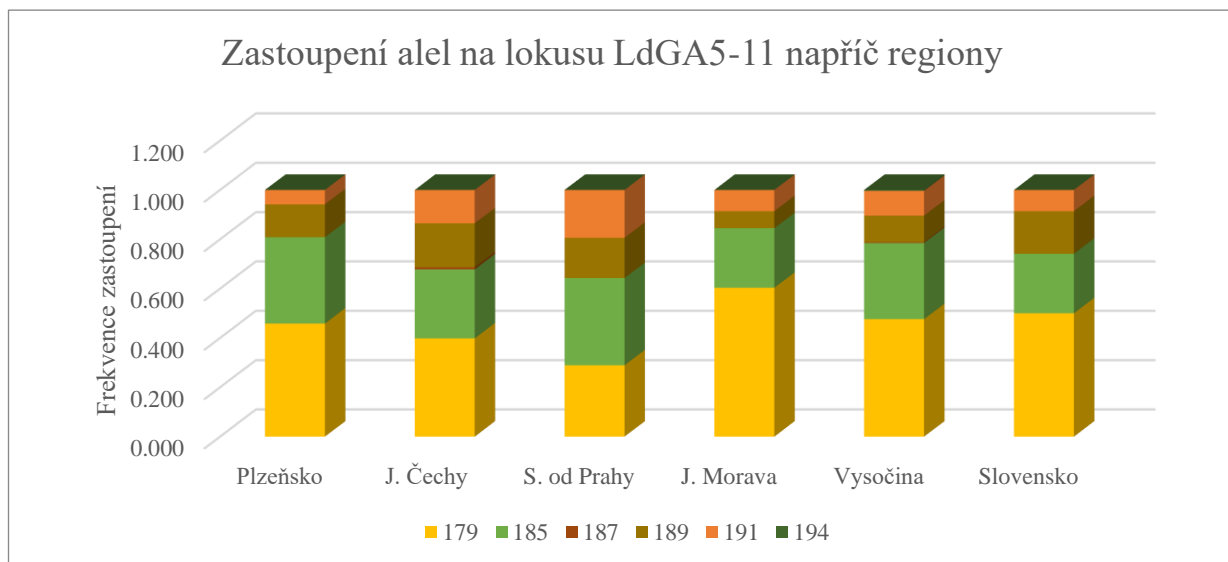
Frekvence jednotlivých alel na testovaných lokusech se také lišila napříč jednotlivými regiony. Vše je nejlépe patrné z následujících grafů 8 - 13 pro pět nejpolymorfnějších lokusů.



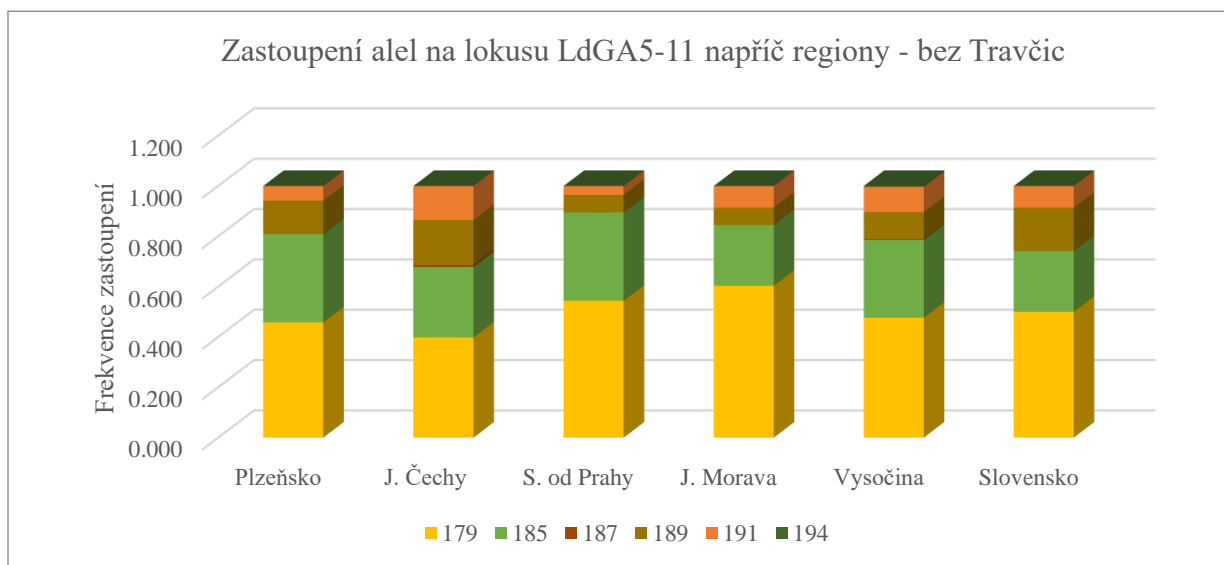
*Graf 8: Regionální srovnání frekvence jednotlivých alel na lokusu LdGA5-30. Z grafu je patrné výše uvedené konstatování zastoupení alely 180 pouze u populací nacházejících se na jihozápadě Čech. Také je z grafu patrné, že taktéž výskyt alely 185 je vázán na oblast severozápadu Čech.*



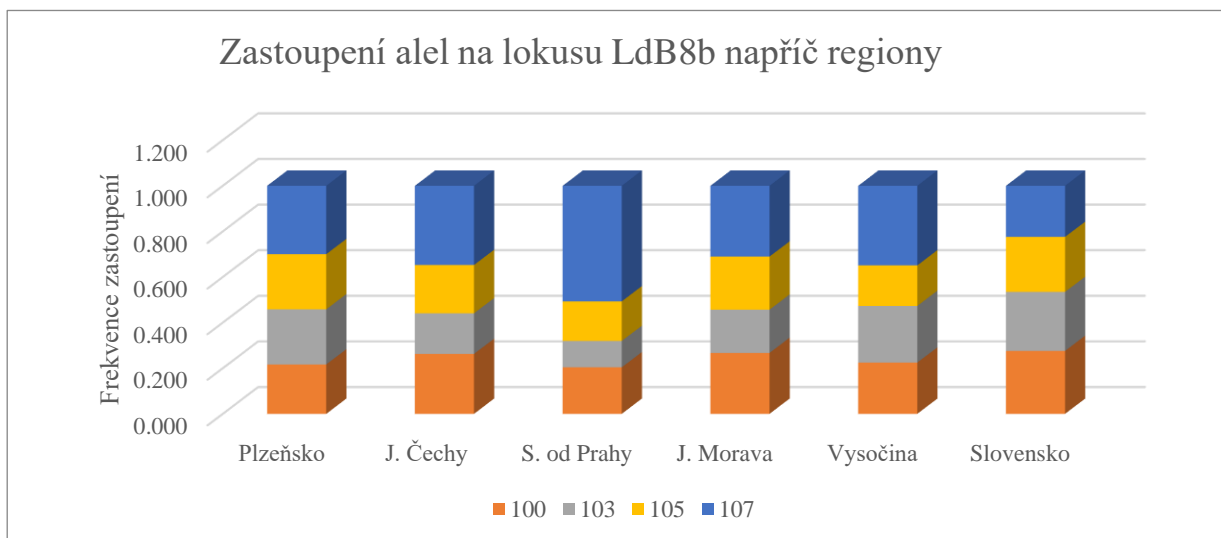
*Graf 9: Regionální srovnání frekvence alel na lokusu LdGA4-18. Nejpolymorfnějšími regiony u tohoto lokusu jsou jižní Morava a region na sever od Prahy, kde se můžeme setkat s přítomností alely 215.*



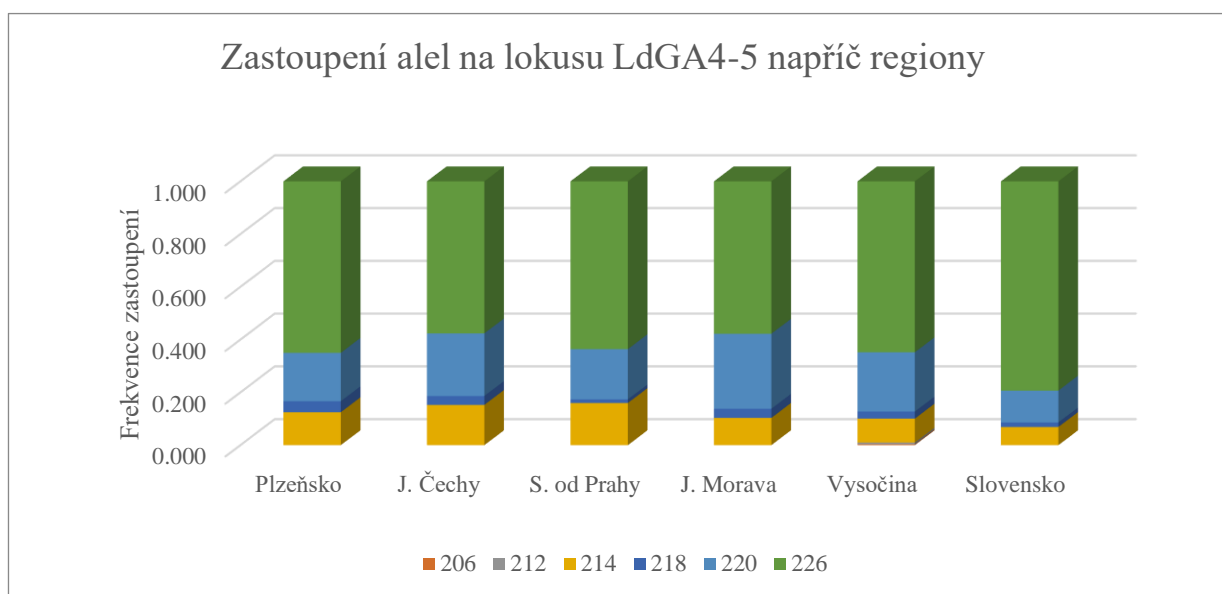
Graf 10: Regionální srovnání frekvence alel na lokusu LdGA4-5. Zajímavá je zde nízká míra polymorfismu u populací z jižní Moravy. Naopak nejvíce polymorfni jsou jedinci z regionu severně od Prahy, což je paradoxní vzhledem k populacím z Travčic, jejichž frekvence alel je ovlivněna nenáhodným oplozením rodičovské generace.



Graf 11: Regionální srovnání frekvence alel na lokusu LdGA4-5 bez zahrnutí populace z Travčic. Z grafu je patrné že přítomnost Travčické populace výrazně ovlivňuje zastoupení alel v regionu Sever od Prahy. Lze tak konstatovat, že fakt nenáhodného oplození u těchto vzorků způsobil vychýlení četnosti všech alel v tomto regionu.



Graf 12: Regionální srovnání frekvence alel na lokusu LdB8b. Nejmarkantnější je zde rozdíl ve frekvenci alely 107, jejíž četnost je nejvyšší v regionu ležícím na sever od Prahy.



Graf 13: Regionální srovnání frekvence alel na lokusu LdGA4-5. V tomto grafu je patrná největší frekvence zastoupení alely 226 u regionu Slovensko. Naopak nejvíce polymorfni jsou regiony Jižní Morava a Jižní Čechy, kde je poměr zastoupení alely 226 u testovaných jedinců nejnižší.

## 5.2 Genotypová diference napříč populacemi

### 5.2.1. Unikátní genotypy

Ze všech 502 testovaných jedinců bylo na 9 lokusech detekováno 495 unikátních genotypů, přičemž 488 z nich se vyskytlo pouze jednou a pouze 7 genotypů se v testovaných vzorcích objevilo 2x. Z těchto sedmi dvakrát opakujících se genotypů připadá pět na lokalitu Travčice, která je specifická z důvodu nenáhodného původu testovaných jedinců popsaného výše.

### 5.2.2. Unikátní alely

U tří testovaných populací byly zaznamenány unikátní alely, které se jinde v populaci nevyskytovaly. Jmenovitě se jedná o vzorky Čížov 29 s unikátní alelou 154 [lokus LdE11C] Oblajovice 21 s unikátní alelou 194 [lokus LdGA5-11] a Želiv 15 s unikátní alelou 206 [lokus LdGA4-5].

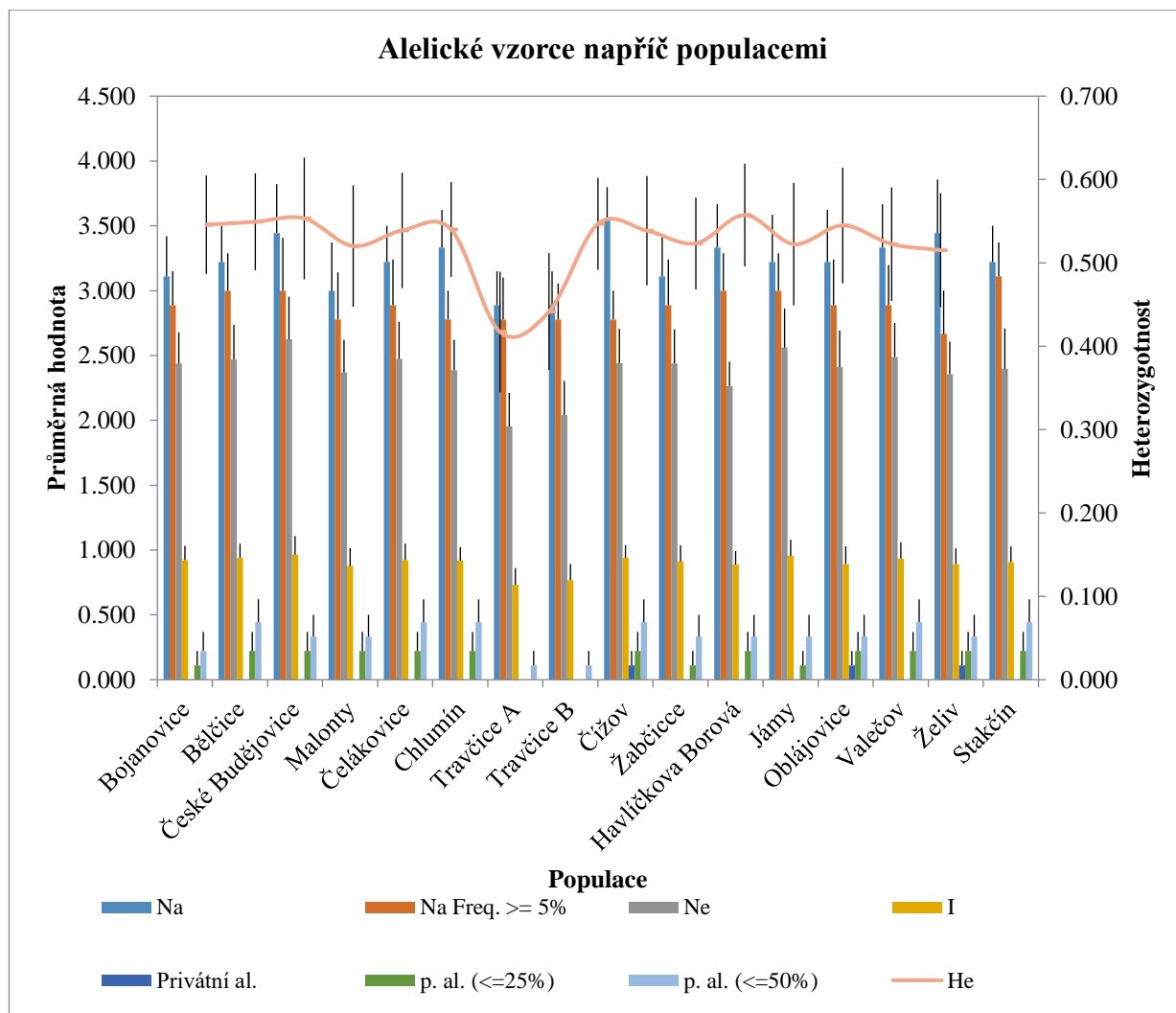
Kromě unikátních alel byl také u všech 16 populací sledován průměrný počet alel na lokus, počet alel s frekvencí větší nebo rovno 5 %, počet efektivních alel, Informační index, který je ekvivalentní Shannon-Weaver diversity indexu, počty alel, které se nacházely v populaci s frekvencí vyšší nebo rovno 5 % a nižší jak 25 %, či 50 %, genetická diverzita a nestranný odhad genetické diverzity. Výsledky těchto analýz jsou nejlépe patrné z tabulky 9.

Populace	Boj	Běl	ČB	Mal	Čel	Chl	TrA	TrB
<b>Na</b>	3.11 ±0.31	3.22 ±0.28	<b>3.44</b> ±0.38	3 ±0.37	3.22 ±0.28	3.33 ±0.29	<b>2.89</b> ±0.26	<b>2.89</b> ±0.26
<b>Na Freq. &gt;= 5%</b>	2.89 ±0.26	3 ±0.29	3 ±0.41	2.78 ±0.36	2.89 ±0.35	2.78 ±0.22	2.78 ±0.32	2.78 ±0.28
<b>Ne</b>	2.44 ±0.24	2.47 ±0.27	2.62 ±0.33	2.37 ±0.25	2.47 ±0.29	2.39 ±0.23	1.95 ±0.26	2.04 ±0.26
<b>I</b>	0.92 ±0.11	0.94 ±0.11	0.96 ±0.14	0.88 ±0.14	0.92 ±0.13	0.92 ±0.10	<b>0.73</b> ±0.13	<b>0.77</b> ±0.12
<b>Privátní al.</b>	0 ±0.00	0 ±0.00	0 ±0.00	0 ±0.00	0 ±0.00	0 ±0.00	0 ±0.00	0 ±0.00
<b>p. al. (&lt;=25%)</b>	0.11 ±0.11	0.22 ±0.15	0.22 ±0.15	0.22 ±0.15	0.22 ±0.15	0.22 ±0.15	0 ±0.00	0 ±0.00
<b>p. al. (&lt;=50%)</b>	0.22 ±0.15	0.44 ±0.18	0.33 ±0.17	0.33 ±0.17	0.44 ±0.18	0.44 ±0.18	0.11 ±0.11	0.11 ±0.11
<b>He</b>	0.55 ±0.06	0.55 ±0.06	0.55 ±0.07	0.52 ±0.07	0.54 ±0.07	0.54 ±0.06	0.42 ±0.07	0.44 ±0.07

Populace	Číž	Žab	HB	Jám	Obl	Val	Žel	Sta
<b>Na</b>	<b>3.56</b> ±0.24	3.11 ±0.31	3.33 ±0.33	3.22 ±0.36	3.22 ±0.40	3.33 ±0.33	<b>3.44</b> ±0.41	3.22 ±0.28
<b>Na Freq. &gt;= 5%</b>	2.78 ±0.22	2.89 ±0.35	3 ±0.29	3 ±0.29	2.89 ±0.35	2.89 ±0.31	2.67 ±0.33	<b>3.11</b> ±0.26
<b>Ne</b>	2.44 ±0.26	2.44 ±0.26	2.26 ±0.19	2.56 ±0.30	2.41 ±0.28	2.49 ±0.26	2.36 ±0.25	2.4 ±0.31
<b>I</b>	0.94 ±0.10	0.91 ±0.12	0.89 ±0.10	0.95 ±0.12	0.89 ±0.14	0.93 ±0.13	0.89 ±0.12	0.91 ±0.12
<b>Privátní al.</b>	0.11 ±0.11	0 ±0.00	0 ±0.00	0 ±0.00	0.11 ±0.11	0 ±0.00	0.11 ±0.11	0 ±0.00
<b>p. al. (&lt;=25%)</b>	0.22 ±0.15	0.11 ±0.11	0.22 ±0.15	0.11 ±0.11	0.22 ±0.15	0.22 ±0.15	0.22 ±0.15	0.22 ±0.15
<b>p. al. (&lt;=50%)</b>	0.44 ±0.18	0.33 ±0.17	0.33 ±0.17	0.33 ±0.17	0.33 ±0.17	0.44 ±0.18	0.33 ±0.17	0.44 ±0.18
<b>He</b>	0.55 ±0.06	0.54 ±0.07	0.52 ±0.06	0.56 ±0.06	0.52 ±0.07	0.54 ±0.07	0.52 ±0.07	0.52 ±0.07

Tabulka 9: Průměrný počet alel na lokus (**Na**); Počet alel s frekvencí >=5% (**Na Freq**>= 5%); Počet efektivních alel (**Ne**), Informační index (**I**); Počet privátních alel napříč lokusy (**Privátní al.**); Počet alel s frekvencí <=25% (**p. al. (<=25%)**); Počet alel s frekvencí <=50% (**p. al. (<=50%)**); Genetická diverzita (**He**); Nestranný odhad genetické diverzity (**uHe**).

Z tabulky je patrné, že nejvyššího průměrného počtu alel na lokus dosahují populace Čížov, České Budějovice a Želiv. Naopak nejméně alel na lokus vykazovaly populace z Travčic. Nejvíce alel s frekvencí větší nebo rovno 5 %, dosahuje populace ze Stakčína. Hodnoty informačního indexu, poukazující na vnitřní diverzitu populace se napříč jednotlivými testovanými populacemi prokazatelně neliší s výjimkou populací z Travčic. Podobná je situace i u množství privátních alel, která je opět víceméně napříč populacemi podobná, avšak opět s výjimkou u populací z Travčic. Míra heterozygotnosti, která je pro srovnání nejlépe patrná z následujícího grafu, je na tom pak totožně.



Graf 14: Průměrný počet alel na lokus (**Na**); Počet alel s frekvencí  $\geq 5\%$  (**Na Freq**  $\geq 5\%$ ); Počet efektivních alel (**Ne**), Informační index (**I**); Počet privátních alel napříč lokusy (**Privátní al.**); Počet alel s frekvencí  $\leq 25\%$  (**p. al.** ( $\leq 25\%$ )); Počet alel s frekvencí  $\leq 50\%$  (**p. al.** ( $\leq 50\%$ )); Genetická diverzita (**He**); Nestranný odhad genetické diverzity (**uHe**).

### 5.3 Testování a zjišťování prostorové struktury populace

Mimo rozdílných alelických četností a unikátních alel v populacích je možné genetickou diverzitu popsat i z hlediska prostorového a vnitřního uspořádání populace. Toto uspořádání lze popsat mimo jiné na základě hodnot genetické vzdálenosti, F-statistiky, odchylek od HW rovnováhy, Neiovy genetické distance (Nei's genetic distance) a na základě analýzy molekulární variance AMOVA či analýzy hlavních koordinát PCoA.

#### 5.3.1. Diference popsaná hodnotami F-statistiky

Všech 502 testovaných vzorků bylo v programu GenAIEx podrobena výpočtu hodnot F statistiky – Fst, F a Fis.

Fixační index (F) pro kodominantní data indikuje původ testované populace. Hodnoty tohoto indexu blízké nule naznačují, že testovaná populace vznikla náhodným oplozením probíhajícím v rodičovské generaci. Hodnoty vyšší pak indikují buď přítomnost inbreedingu či nedetekované nulové alely. Záporné hodnoty pak označují přítomnost negativního výběrového křížení či heterózní selekci.

Inbreední koeficient jedinců (Fis) popisuje redukci heterozygotnosti jedince na základě nenáhodného oplození uvnitř každé subpopulace. Záporné hodnoty tohoto indexu předpokládají vyšší hodnoty inbreedingu. Inbreední koeficient subpopulací (Fst) pak měří genetickou odlišnost od ostatních populací.

Mimo výše uvedených hodnot jsou v tabulkách 10 a 11 uvedeny hodnoty očekávané heterozygotnosti (genetické distance - He), pozorované heterozygotnosti (Ho) a poměr těchto dvou hodnot.

Lokalita	N	SE	He	SE	Ho	SE	He-Ho	F	SE	Fis
Bojanovice	28.78	1	0.55	0.06	0.47	0.07	0.08	0.181	0.078	0.14
Bělčice	29.67	0.33	0.55	0.06	0.44	0.08	0.1	<b>0.259</b>	0.107	0.19
České Budějovice	29.44	0.56	0.55	0.07	0.44	0.09	0.12	0.197	0.107	0.21
Malonty	28.33	0.67	0.52	0.07	0.47	0.1	0.05	0.119	0.11	0.1
Čelákovice	29	0	0.54	0.07	0.47	0.08	0.07	0.121	0.095	0.13
Chlumín	27.78	0.22	0.54	0.06	0.4	0.08	<b>0.14</b>	<b>0.279</b>	0.123	0.26
Travčice A	29.44	0.44	0.42	0.07	0.44	0.09	-0.03	-0.078	0.101	-0.06
Travčice B	58.56	1.12	0.44	0.07	0.51	0.08	-0.07	-0.161	0.065	-0.16
Čížov	27.67	0.33	0.55	0.06	0.46	0.07	0.08	0.178	0.07	0.16
Žabčice	29.67	0.33	0.54	0.07	0.45	0.07	0.09	0.142	0.063	0.16
Havlíčkova Borová	29.33	0.67	0.52	0.06	0.35	0.07	<b>0.17</b>	<b>0.393</b>	0.117	<b>0.33</b>
Jámy	28.56	0.44	0.56	0.06	0.48	0.07	0.08	0.168	0.087	0.14
Oblákovice	29.44	0.56	0.52	0.07	0.43	0.08	0.09	0.168	0.101	0.18
Valečov	29.67	0.24	0.54	0.07	0.46	0.08	0.08	0.136	0.093	0.15
Želiv	29.44	0.56	0.52	0.07	0.4	0.09	0.12	0.23	0.108	0.23
Stakčín	28.56	0.34	0.52	0.07	0.41	0.1	0.1	<b>0.291</b>	0.137	0.2
Průměr	30.83	0.49	0.52	0.07	0.44	0.08	0.08	0.164	0.098	0.148

Tabulka 10: Diference popsaná hodnotami  $F$  statistiky:  $N$  – průměrný počet alel na lokus;  $SE$  – směrodatná odchylka;  $He$  – očekávaná heterozygotnost;  $Ho$  – zjištěná heterozygotnost; Rozdíl mezi heterozygotností očekávanou a zjištěnou ( $He-Ho$ )  $F$  – fixační index,  $Fis$  – inbreední koeficient uvnitř populace. Data pro všech 16 testovaných populací.

V následující tabulce 11 jsou v její pravé části uvedeny hodnoty  $F_{st}$ . V její levé části jsou pak uvedeny hodnoty Neiova indexu genetické vzdálenosti (Nei's genetic distance). Vyšší hodnoty tohoto indexu odpovídají populacím, které jsou geneticky odlišné napříč ostatními testovanými populacemi.



	Boj	Běl	ČB	Mal	Čel	Chl	TrA	TrB	Číž	Žab	HB	Jám	Obl	Val	Žel	Sta
Boj		0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	<b>0.07</b>	<b>0.06</b>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03
Běl	0.04		0.01	0.01	0.02	0.01	<b>0.08</b>	<b>0.07</b>	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02
ČB	0.02	<b>0.01</b>		0.01	0.01	0.01	<b>0.07</b>	<b>0.06</b>	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03
Mal	0.05	0.03	0.03		0.02	0.02	<b>0.09</b>	<b>0.08</b>	0.02	0.01	<b>0.04</b>	0.02	0.01	0.02	0.02	0.03
Čel	0.02	0.03	0.02	0.05		0.01	<b>0.06</b>	<b>0.05</b>	0.01	0.01	0.01	<b>0</b>	0.01	0.01	0.01	<b>0.05</b>
Chl	0.02	0.03	0.03	0.04	0.03		<b>0.07</b>	<b>0.06</b>	0.01	<b>0</b>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03
TrA	0.14	0.17	0.13	0.19	0.13	0.13		0.01	<b>0.08</b>	<b>0.07</b>	<b>0.05</b>	<b>0.06</b>	<b>0.07</b>	<b>0.05</b>	<b>0.06</b>	<b>0.13</b>
TrB	0.12	0.15	0.12	0.17	0.11	0.12	<b>0.01</b>		<b>0.07</b>	<b>0.07</b>	<b>0.04</b>	<b>0.05</b>	<b>0.07</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.12</b>
Číž	0.02	0.02	0.02	0.04	0.02	0.01	0.17	0.15		<b>0</b>	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03
Žab	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.01	0.16	0.14	<b>0.01</b>		0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03
HB	0.03	0.06	0.04	0.08	0.03	0.03	0.1	0.09	0.04	0.04		0.01	0.02	0.01	0.02	<b>0.06</b>
Jám	0.02	0.04	0.03	0.04	<b>0.01</b>	0.03	0.13	0.11	0.03	0.03	0.03		0.01	0.01	0.01	0.04
Obl	0.02	0.02	<b>0.01</b>	0.02	0.02	0.02	0.14	0.13	<b>0.01</b>	0.02	0.04	0.02		0.01	0.01	0.03
Val	0.02	0.03	0.02	0.06	<b>0.01</b>	0.03	0.12	0.1	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02		0.01	0.04
Žel	0.02	0.04	0.03	0.05	<b>0.01</b>	0.02	0.12	0.11	0.03	0.03	0.04	0.02	0.02	0.02		<b>0.05</b>
Sta	0.06	0.05	0.05	0.05	0.09	0.07	<b>0.3</b>	0.28	0.05	0.05	<b>0.13</b>	0.09	0.05	0.09	0.1	

Tabulka 11: V pravé horní části: hodnoty Inbreedního indexu napříč populacemi ( $F_{st}$ ) (hodnoty vyšší jak 0,05 znamenají průkazný rozdíl mezi populacemi). V levé spodní části jsou uvedeny hodnoty Neiovy genetické distance ( $D'$ ). V obou případech jsou zde tučně vyznačeny extrémní hodnoty (nejvyšší, nejnižší).

### Regionální srovnání

Region	Plzeňsko	J. Čechy	S. od Prahy	J. Morava	Vysočina	Slovensko
Plzeňsko			0.01	0.03	0.01	0.02
J. Čechy	0.01			0.03	0.01	0.03
S. od Prahy	0.06	0.07			0.03	<b>0.08</b>
J. Morava	0.01	0.02	0.07		0.01	0.03
Vysočina	0.01	0.02	0.04	0.01		<b>0.04</b>
Slovensko	0.05	0.05	<b>0.18</b>	0.05	<b>0.08</b>	

Tabulka 12: Porovnání hodnot  $F_{st}$  a genetické distance podle Neie ( $D'$ ) v regionálním pohledu. V pravém horním rohu jsou data koeficientu inbreedingu  $F_{st}$ ; V pravém dolním rohu jsou pak uvedeny data genetické distance. Tučně jsou v grafu vyznačeny nejvíce extrémní hodnoty.

Hodnoty  $F_{st}$  v regionálním srovnání nevykázaly prokazatelnou vzájemnou odlišnost populací mimo regionů Sever od Prahy vs Slovensko. Možná odlišnost však může existovat mezi regiony Vysočina a Slovensko. Tato odlišnost však není průkazná.

### 5.3.2. Odchylky od HW

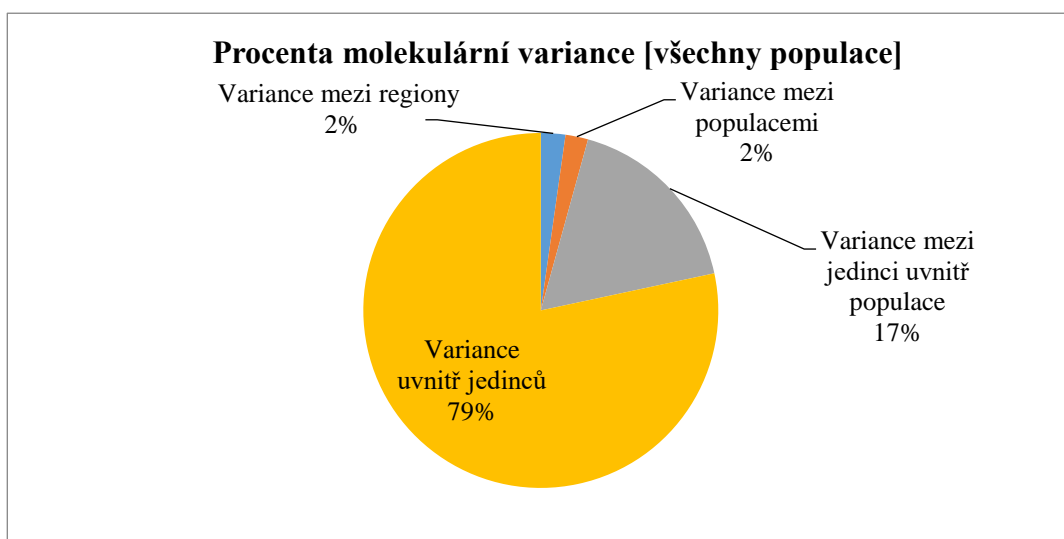
Jednotlivé populace byly také testovány z hlediska odchylky od předpokládané HW rovnováhy na 9 testovaných lokusech. Výsledky této analýzy jsou patrné z následující tabulky:

	odch.	lok.1	lok.2	lok.3	lok.4	lok.5	lok.6	lok.7	lok.8	lok.9
Boj	2	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	*	ns
Běl	4	***	ns	ns	**	ns	*	ns	***	ns
ČB	3	***	ns	ns	**	ns	*	ns	ns	ns
Mal	3	***	ns	ns	**	*	ns	ns	ns	ns
Čel	3	***	*	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns
Chl	4	***	ns	***	***	ns	ns	ns	*	ns
TrA	1	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TrB	4	***	**	ns	ns	***	ns	ns	ns	***
Číž	1	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Žab	1	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HB	4	***	ns	ns	**	ns	ns	***	***	ns
Jám	3	***	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	ns
Obl	3	***	ns	ns	*	ns	ns	***	ns	ns
Val	2	**	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
Žel	4	***	ns	*	***	ns	*	ns	ns	ns
Sta	4	***	ns	ns	***	ns	**	ns	***	ns
Celk.	46	14	2	4	11	2	4	2	6	1
%	31.94	87.5	12.5	25	68.75	12.5	25	12.5	37.5	6.25

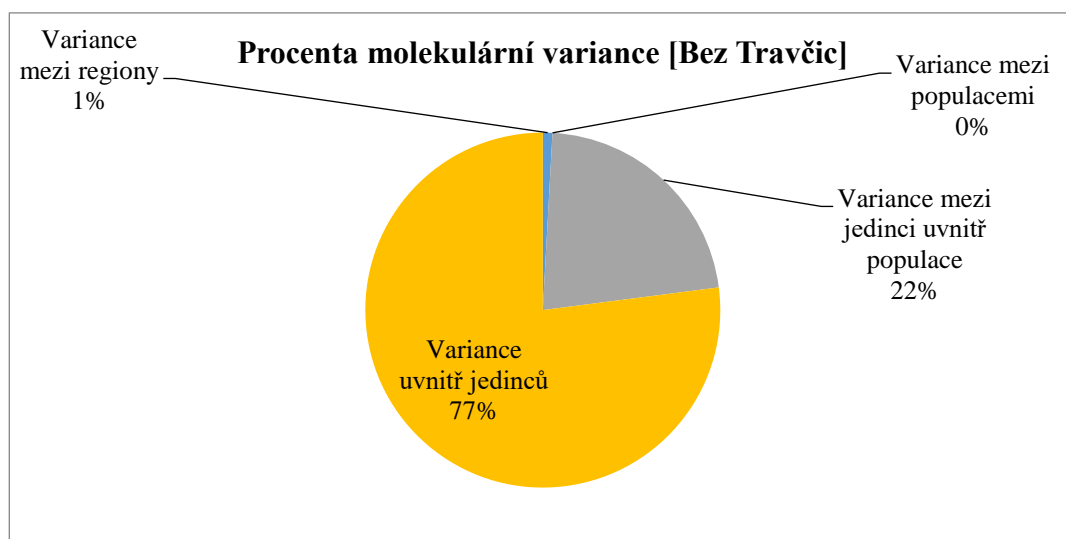
Tabulka 13: Odchylky jednotlivých lokusů od HW rovnováhy. Klíč: ns=not significant/neprůkazné, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; Lokus 1 až 9: LdGA5-30 [B]; LdGA5-11 [Y]; LdGA4-18 [R]; LdE10e [R]; LdB8b [G]; LdA11b [G]; LdAC5-22 [G]; LdE11c [B]; LdGA4-5 [Y].

### 5.3.3. Analýza molekulární variance – AMOVA

Tato analýza uvádí, jaká část z celkové variance existuje mezi populacemi, uvnitř populace a napříč regiony. Výsledky této analýzy jsou uvedeny níže ve dvou grafech. Jeden popisuje data všech populací, druhý popisuje molekulární varianci bez populací z Travčic, které jsou odlišné vlivem nenáhodného oplození.



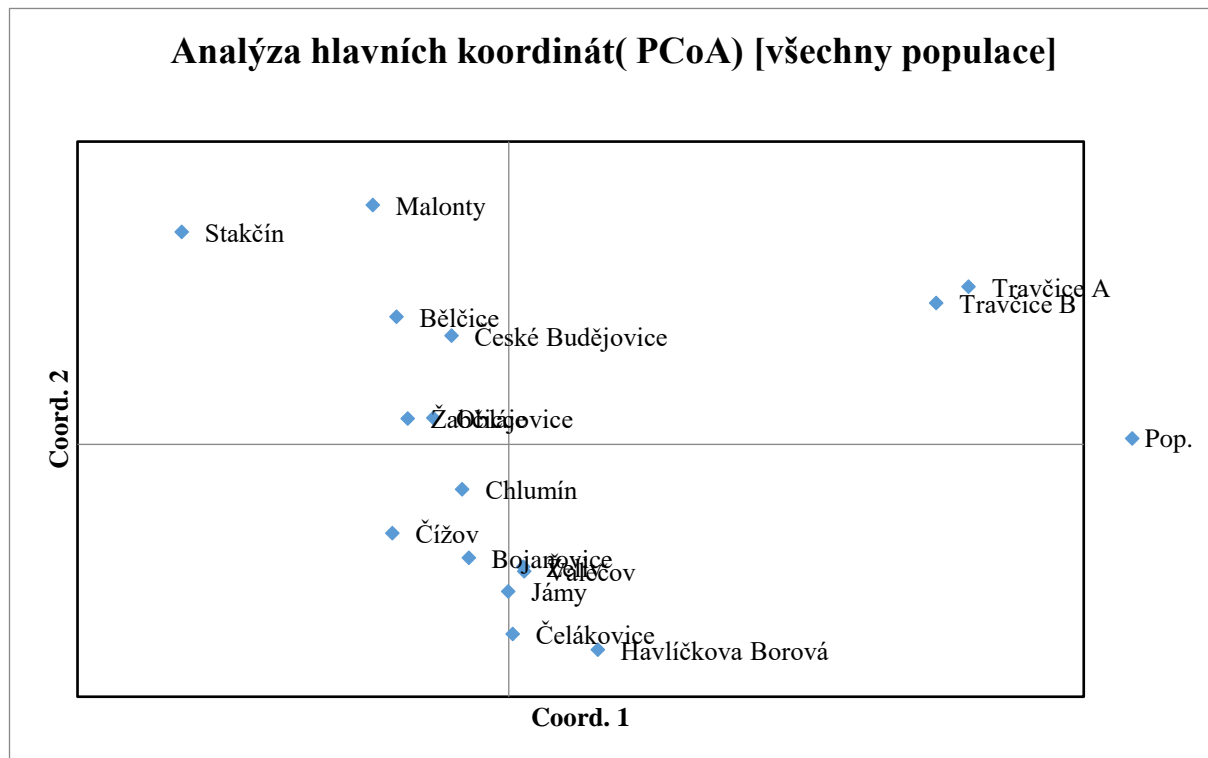
Graf 15: Analýza molekulární variance AMOVA pro všechny populace.



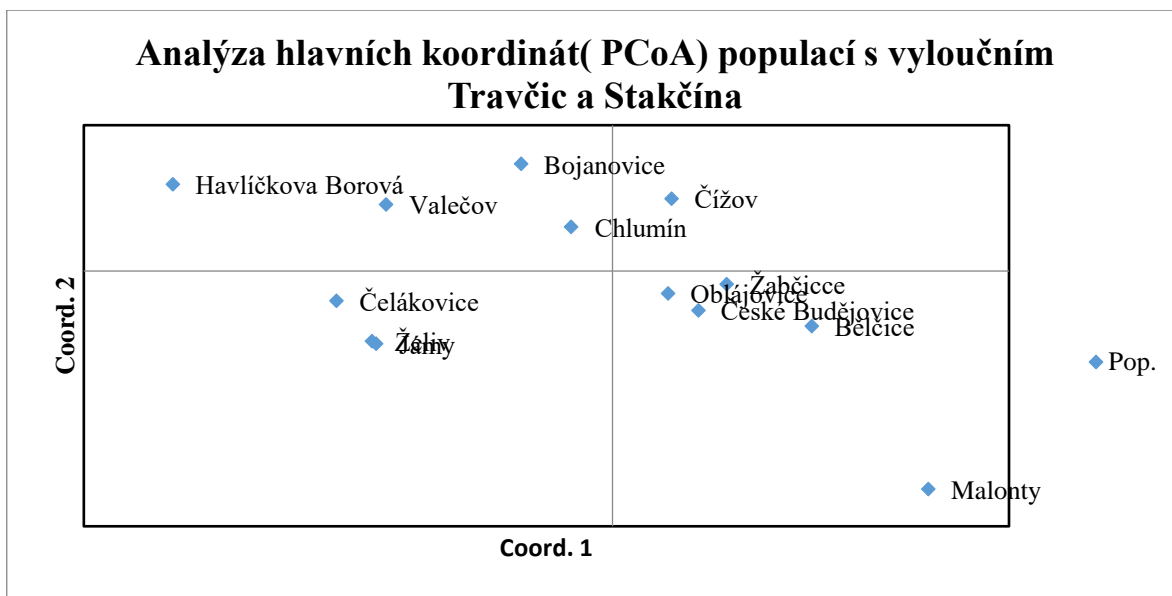
Graf 16: Analýza molekulární variance AMOVA pro všechny populace s vyloučením Travčic. Z grafu je patrné, jakou měrou přispěla tato vyloučená, inbrední populace k celkové diferencii vzorků. Více v kapitole diskuze.

#### 5.3.4. Metoda PCoA

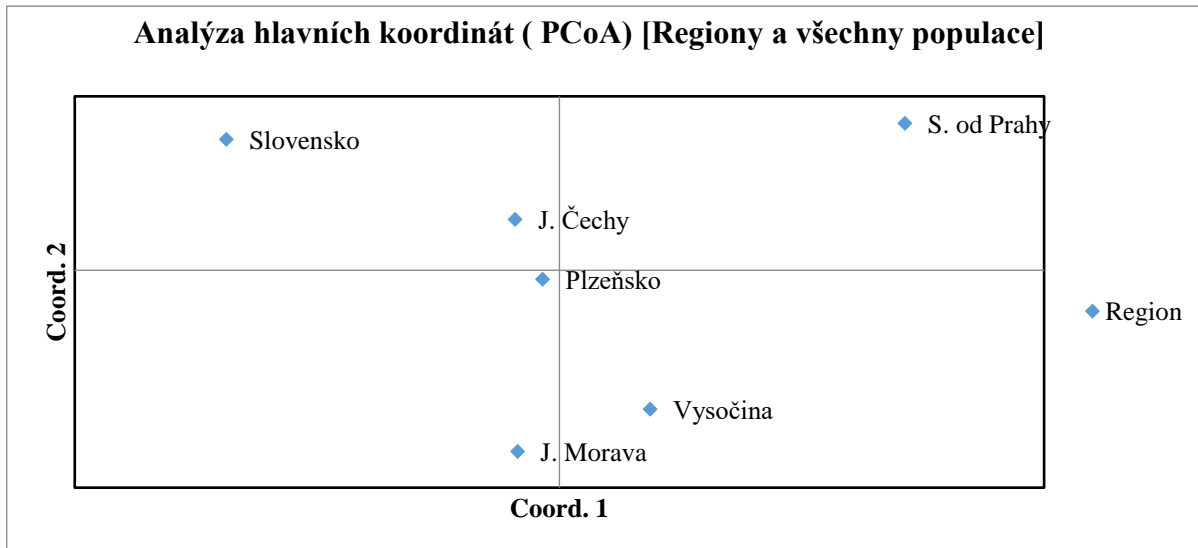
Za užití metody PCoA byly sestrojeny programem GenAlEx grafy příbuznosti jednotlivých populací založené na porovnávání Genetické distance dle Nei et al. (1975). „Příbuznější“ populace jsou zde blíže u sebe a vytváří samostatné skupiny. Grafy PCoA byly konstruovány jak pro všechny populace, tak pro populace bez zahrnutí Travčice a Stakčina (graf 18). Dále byl zkonstruován graf 19 syntetizující jednotlivé populace do regionů.



Graf 17: Analýza PCoA pro všechny populace. Z grafu je patrná vzájemná vzdálenost jednotlivých populací. Nejvíce jsou v tomto ohledu odlišné populace z Travčice (nejsevernější populace) a ze Stakčina (Slovensko) Ostatní populace taktéž vykazují jistou míru vzájemné blízkosti, která je však lépe patrná z následujících grafů.



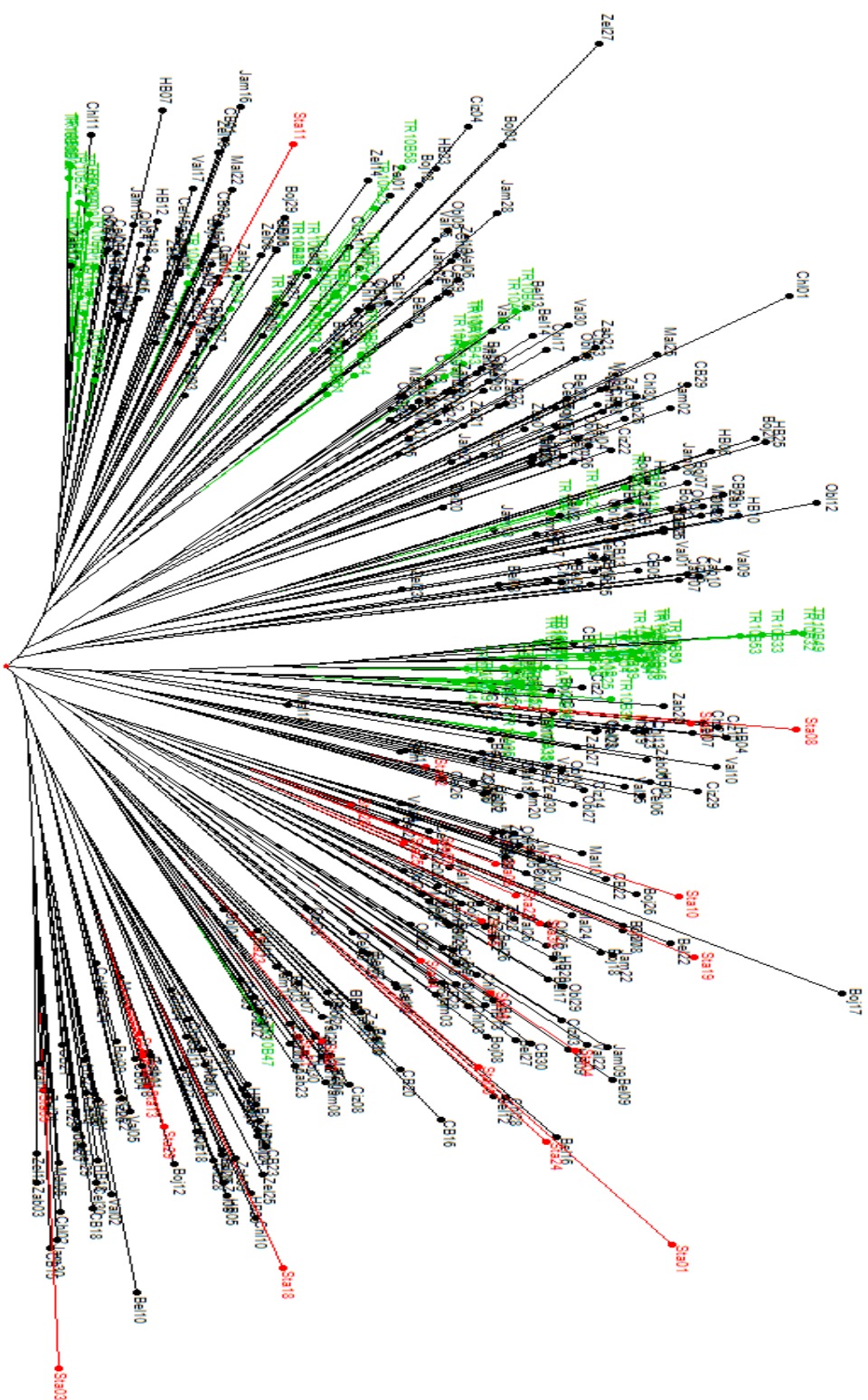
Graf 18: Analýza PCoA s vyloučením extrémních hodnot Travčic a Stakčína. Z tohoto grafu je dobře patrné tendence některých populací ke shlukování do regionů. Například lokality Želiv a Jámy jsou vzájemně vzdáleny přibližně jen 56 km, což je patrné i z výsledku této analýzy. Jako nejvíce odlišné pak vycházejí populace Malonty a Havlíčkova Borová. Populace Čelákovice a Chlumín nevykazují samostatně žádné extrémní hodnoty.



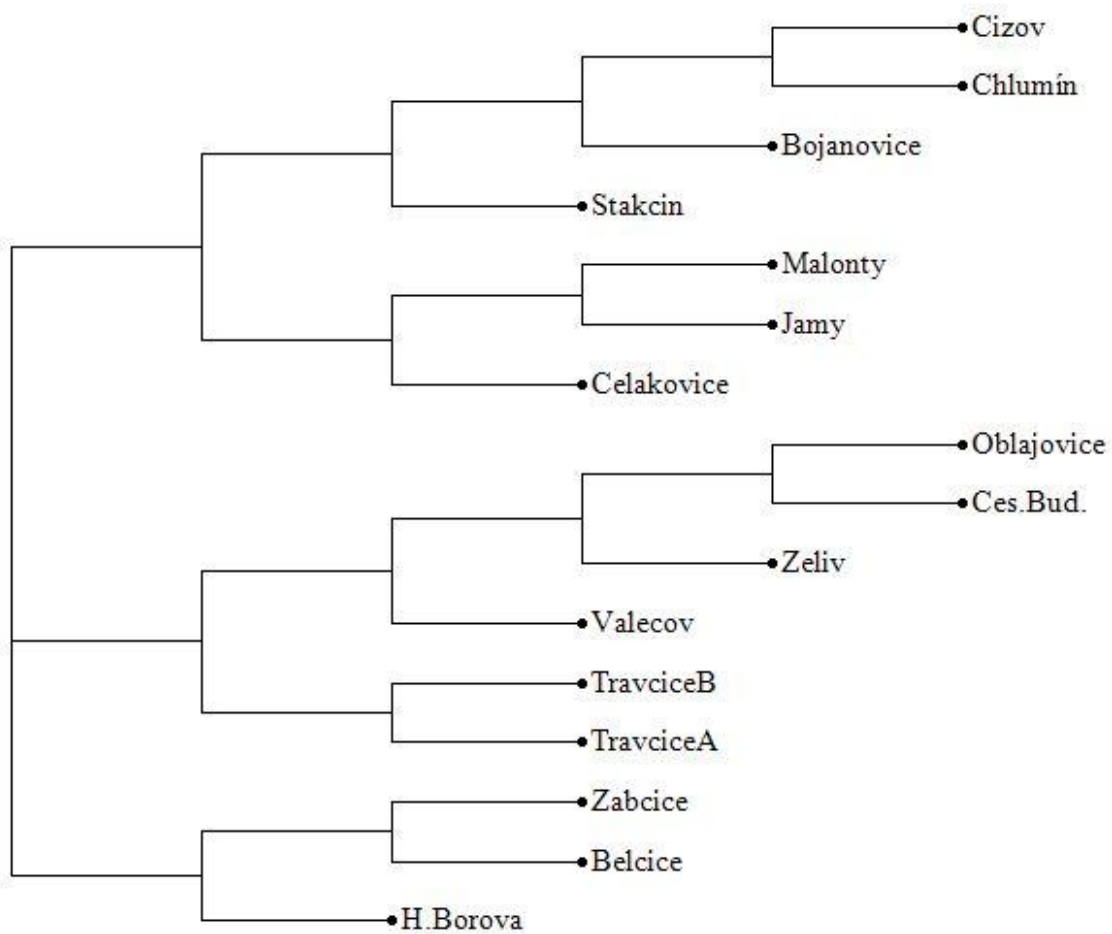
Graf 19: Regionální analýza PCoA. Spojí-li se jednotlivé populace do souhrnných regionálních větších skupin, pak získáme tento graf prokazující vzájemnou blízkost regionů z jihozápadních Čech. Stejně tak tento graf prokazuje blízkost regionů Vysočina a Jižní Morava, která taktéž odpovídá skutečné geografické vzdálenosti jednotlivých regionů. Z tohoto grafu také plyne, že populace z Travčic jsou sami o sobě vysoce odlišné, neboť společně s neextrémními hodnotami Čelákovice a Chlumín (viz předešlý graf) vykazuje region S. od Prahy stále vysokou odlišnost od ostatních. Více viz příslušná kapitola v sekci diskuze.

### 5.3.5. Shluková analýza

Za užití programu DarWin6 byl z hodnot získaných kapilární elektroforézou sestaven fylogenetický strom vzájemné příbuznosti vzorků pro otestování jejich vzájemné genetické vzdálenosti. Z grafu 20, při barevném rozlišení jednotlivých populací bylo patrné, že vzorky jednotlivých populací jsou si vzájemně velmi blízké a netvoří, až na výjimky Travčic a Stakčina, separátní skupiny, nýbrž jsou rozloženy rovnoměrně napříč celým genetickým spektrem. Dále byla sestrojena shluková analýza podle lokalit původu vzorků pro zjištění vzájemného vzáthu mezi jednotlivými populacemi. Výsledky jsou patrné z grafu 21.



*Graf 20: Fylogenetický strom populací mandelinky bramborové v České republice; Zelenou barvou jsou vyznačeny populace Travníč tvořící smluky jednotlivců; Červenou barvou je vyznačena populace ze Stakčína tvořící smluky v pravé polovině grafu.*



Graf 21: Shluková analýza vzorků vytvořená dle jednotlivých populací



## 6 Diskuze

### 6.1 Předchozí studie

Tématem detekce genetické diference populací mandelinky bramborové se ve své práci zabýval Fin Alesandro Grapputo (2006), který stanovil panel 11 mikrosatelitních lokusů užívaných v této práci. 54 vzorků mandelinek pro stanovení tohoto panelu pocházelo z Ruska (15 jedinců), ze dvou lokalit z Estonska (12 jedinců každá lokalita) a z USA, Kentucky, odkud pocházelo 15 vzorků.

Na tuto práci bylo navázáno v Číně (Zhang et al. 2013), kde v provincii Xinjiang v Ujgurském autonomním regionu, bylo testováno 10 populací za užití panelu 7 mikrosatelitních markerů. V tomto výzkumu bylo testováno 392 dospělých jedinců odebraných mezi léty 2007 a 2009. Jelikož v Číně proběhla invaze mandelinky bramborové teprve nedávno, v roce 1993, tak genetická diverzita mezi jednotlivými populacemi nebyla příliš vysoká. Na druhou stranu je tento výzkum velice užitečný jako určitý světový standard práce s mikrosatelitními lokusy mandelinky bramborové a je možné porovnávat tyto výsledky s výsledky předloženými v mé diplomové práci.

V letošním roce byla v časopisu *Journal of Integrative Agriculture* publikovaná zatím poslední studie, zabývající se stejným tématem. Yang et al. (2020) na totožném území jako Zhang et al. (2013), tedy v Xinjiangu, testoval 9 populací mandelinky bramborové panelem 9 mikrosatelitních lokusů definovaných dle Grapputo (2006). Z každé testované populace bylo pro analýzu vybráno 13 až 30 jedinců. Dohromady bylo testováno 232 vzorků. Tento výzkum, na rozdíl od Zhang (2013), potvrzuje existenci dvou populačních klastrů a předpokládá dvě migrační vlny mandelinky na území Číny.

Z tohoto přehledu dosavadních studií věnujících se tomuto tématu je patrné, že výzkum v této diplomové práci může být co do rozsahu světově nejrozsáhlejší s počtem 15 analyzovaných lokalit a 502 testovaných vzorků na 9 lokusech a nabízí tak validní data vzhledem ke světovému standartu.

## 6.2 Mikrosatelitní lokusy

### 6.2.1. Počet používaných markerů

Z jedenácti definovaných lokusů dle Grapputo (2006), jich bylo užito v této diplomové práci devět, což je stejný počet, který užívá při analýzách Yang (2020). Osm z těchto námi užívaných lokusů bylo totožných. Devátý, který Yang et al. (2020) ve své práci využívá, a to LdAC5-2, byl v naší práci zařazen v multiplexu 1, avšak jeho výsledky nebyly průkazné a byl tak z testování vyloučen. Naopak lokus LdAC5-2 Yang (2020) ve svém výzkumu nevyužívá. Sedm lokusů užívaných Zhang et al. (2013) jsou totožné s těmi, které jsou užité v této práci.

### 6.2.2. Četnost alel

V práci Grapputo (2006) se uvádí průměrný počet  $7,2 \pm 3,2$  alely na lokus. Výsledný průměrný počet alel na lokus zjištěný u populací z České republiky a Slovenska je  $3,22 \pm 0,48$ , což je podobné výsledkům z Číny, kde Zhang (2013) uvádí  $3,09 \pm 1,09$  alel na lokus a Yang (2020) předkládá číslo 3,62. Vyšší průměrný počet alel u Grapputo (2006), který je téměř dvojnásobný, než výsledky této diplomové práce může být způsoben větší genetickou rozmanitostí populace z USA, která neprošla evropským „hrdlem lahve“.

Z tabulky č. 9 z kapitoly 5.2.2. vyplývá, že nejbohatší, co do počtu alel na lokus, jsou z námi testovaných populací jedinci z Českých Budějovic, Želiva a Stakčina. Tyto tři populace, pocházející z různých regionů, jsou od sebe prokazatelně vzdáleny vzhledem k zeměpisné délce a není tak možné konstatovat, že by populace jednoho konkrétního regionu vykazovaly větší bohatost unikátních alel. Jistý rozdíl způsobený odlišností frekvence alel, z důvodu prostorové izolace, můžeme spatřit u populace ze Stakčina, kde se nachází nejvyšší počet alel s frekvencí vyšší nebo rovno 5 % a lze tak předpokládat jistou míru fixace frekvence alel v populaci. Nižší hodnoty alelické bohatosti populace z Travčic lze pokládat za důkaz vlivu nenáhodného výběru vzorků na genetickou výbavu populace.

## 6.3 Diference uvnitř populací

Z tabulky č. 10 v kapitole výsledků 5.3.1. vyplývá, že průměrná očekávaná heterozygotnost populací ( $H_e$ ) se pohybuje v rozmezí 0,56 (Jámy) až 0,42 (Travčice A) a dosahuje průměrné úrovně  $0,52 \pm 0,07$ . Tyto výsledky jsou srovnatelné s výsledky z Číny, kde první studie Zhang (2013) uvádí hodnoty očekávané heterozygotnosti v rozmezí  $0,60 \pm 0,14$  až

$0,37 \pm 0,18$  s průměrem na úrovni  $0,47 \pm 0,13$ . Yang (2020) pak uvádí rozmezí 0,60 až 0,47 s průměrem 0,52, což je totožná výsledná hodnota jako v naší práci.

Po odečtení zjištěné heterozygotnosti ( $H_o$ ) od předpokládané ( $H_e$ ) je patrné, že většina populací se nachází v blízkosti HW rovnováhy, byť mírně vychýlené směrem k celkové homozygotnosti. Výjimku v tomto ohledu pak tvoří populace Havlíčkova Borová (0.17) a Chlumín (0.14), kde mají populace tendenci z této rovnováhy vybočovat. Tuto tezi pak podporuje fakt, že obě tyto populace společně se Stakčínem mají nejnižší hodnotu zjištěné heterozygotnosti. Příčinou tohoto faktu může být například zvýšená intenzita chemické ochrany v těchto lokalitách, možné nepostihnutí celkové difference lokality výběrem pouze 30 jedinců či jiný důvod. Při hledání příčiny zvýšené homozygotnosti u jedinců z těchto lokalit je však nutné mít na paměti fakt rozdílnosti regionů, odkud vzorky pochází.

Z hlediska fixačního indexu ( $F$ ) je většina výsledků populací blízká hodnotě 0, a tak je možné tvrdit, že původ testovaných jedinců lze nalézt v náhodném oplození probíhajícím v rodičovské generaci. Vyšší míru potenciálního inbreedingu pak vykazují opět populace Havlíčkova Borová, Chlumín, Stakčín, ale i Bělčice.

Havlíčkova Borová vykazuje nejvyšší míru koeficientu  $F_{is}$ .

Možnou odchylku od HW rovnováhy může také indikovat analýza lokusů, kde z tabulky č. 13 v kapitole 5.3.2. je patrné, že lokusy LdGA5-30, LdE10e, LdE11c jsou mezi populacemi výrazně vychýlené z této rovnováhy. Možnou příčinou tohoto vychýlení může být přítomnost nulových alel na těchto lokusech. Lokus LdGA5-30 má například nejvyšší procento zastoupení chybějících dat z výstupu elektroforézy, a to v celých 12,55 % případů, avšak zjištěné genotypy jsou většinou značně heterozygotní. Naopak u lokusu LdE11c sice v 1 % případů také chybí výsledky, avšak u tohoto lokusu je většina vzorků homozygotních. U lokusu LdE10e byly elektroforeticky zaznamenány alely ve všech případech, avšak velká většina vzorků je taktéž homozygotních. U těchto dvou markerů je proto výskyt nulových alel velmi pravděpodobný.

Z populací, které jsou na jednotlivých lokusech nejvíce vychýleny od HWE lze uvést populace Bělčice, Travčice B, Havlíčkova Borová, Želiv a Stakčín, které byly vychýlené ve více jak 4 lokusech.

### 6.3.1. Diference jedinců s původem v nenáhodném oplození.

V kontextu slábnoucích účinků insekticidní ochrany porostů lilku bramboru vůči jedincům mandelinky, který popisuje řada autorů jako například Mamta a Rajam (2017) či Zichová et al. (2010) je naprosto zásadní pohled na výsledky populací Travčice A a Travčice B. Nenáhodný výběr testovaných jedinců z této lokality může velmi dobře simulovat mikrosatelitní profil nově rezistentních brouků vzniklých v přírodních podmínkách. Tato, do jisté míry unikátní data mohou být velice užitečná pro další výzkumy ve světovém testování genetické struktury populace mandelinky bramborové, neboť je možné na jejich základě lépe usuzovat o důvodech odlišností testovaných populací. Populace vzniklé na základě jedinců s nově vzniklou rezistencí a logickým následným inbreedingem napomáhajícím fixaci této vlastnosti, by totiž měly vykazovat podobné výsledky, jako jsou hodnoty zjištěné u populací z Travčic. Data z Travčic inbreední původ jednoznačně prokazují – viz tabulka č. 10 z kapitoly 5.3.1. kde v hodnoty parametru  $F_{is}$ , dosahují pouze u populací z této lokality záporných čísel (-0,06 TrA, -0,16 TrB). Bylo tak prokázáno, že původ jedinců z Travčic je velmi vázaný, na rozdíl od ostatních lokalit, kde je původ testovaných brouků náhodný. Stejně tak data z grafu č. 14 z kapitoly 5.2.2. vykazují naprosto markantní propad očekávané heterozygotnosti ( $H_e$ ) u populací z této lokality. Souhrnně lze na základě všech analyzovaných parametrů konstatovat, že u populací z Travčic došlo k redukci genetické diverzity.

Otázkou v tomto kontextu však zůstává i vlastní původ ostatních 14 populací. Pokud se v prvních letech od invaze mandelinky do ČSSR uplatňovala ochrana ručním sběrem v rámci již legendárního boje s americkým broukem shazovaným domnělými agenty z USA, tak se na našem území mohlo, vlivem často nedokonalého sběru, rozvinout více populací vzniklých během 30 let uplynulých od úvodní úspěšné invaze do Francie. Tato genetická diverzita však mohla být redukována na základě rozvoje insekticidní ochrany. Je poté teoreticky možné, že současná nižší diference populací brouků mandelinky bramborové může být tímto ovlivněna. Mohou tomu totiž odpovídat hodnoty parametru  $F_{is}$ , který například u populace z Malont dosahuje úrovně pouze 0,1. Jednoznačnou odpověď na tuto otázku tato práce nepřináší, neboť její zodpovězení by vyžadovalo dalších laboratorních analýz.

## 6.4 Diference napříč populacemi

Zhang et al. (2013) uvádí vzájemnou odlišnost jednotlivých populací na základě vnějšího inbreedního koeficientu ( $F_{st}$ ) a genetické distance ( $D'$ ) dle Nei. Z hlediska inbreedního koeficientu  $F_{is}$  dosahuje jeho testovaný soubor vzorků hodnot v rozmezí 0,00 až 0,18. Průměrnou hodnotu tohoto indexu pak uvádí na úrovni  $0,071 \pm 0,043$ . Hodnoty genetické distance ( $D'$ ) se pak v jeho výzkumu pohybují v rozmezí 0,02 až 0,20. Průměrnou hodnotu této distance pak uvádí na úrovni  $0,088 \pm 0,048$ .

V našem testovaném souboru dosahoval koeficient  $F_{is}$  hodnot v rozmezí 0,00 (Jámy x Čelákovice; Žabčice x Chlumín; Žabčice x Čížov) až 0,13 (Travčice A x Stakčín) respektive 0,06 (Stakčín x Havlíčkova Borová), pokud z této analýzy vynecháme původem více inbreední Travčice. Hodnoty tohoto indexu vyšší jak 0,05 prokazují diferenci populací. Z prezentovaných výsledků je patrné, že při vyloučení Travčic, jsou všechny české populace podobné. Potenciální odlišnost populací však můžeme pozorovat v případě Stakčina, kde hodnoty tohoto koeficientu v porovnání s populacemi z Čelákovic, Havlíčkovy Borové a ze Želiva přesahují hodnotu 0,05. S ostatními populacemi však průměrně tento koeficient dosahuje hodnoty 0,03 a není možné tak na základě těchto čísel jednoznačně konstatovat přítomnost dvou populačních klastrů. Míra genetické distance ( $D'$ ) v našem souboru vzorků dosahovala hodnot v rozmezí 0,01 (7x) až 0,30 (Travčice A x Stakčín) respektive 0,13 (Stakčín x Havlíčkova Borová) při vyloučení Travčic. Ani tyto hodnoty nepoukazují na přítomnost separátních populačních skupin lišících se na genetickém základu. Z regionálního srovnání koeficientů  $F_{st}$  a  $D'$ , které je patrné z tabulky č. 11 v kapitole 5.3.1., sice vyplývá vyšší genetická vzdálenost mezi regiony z Vysočiny a Slovenska dosahující u parametru  $F_{st}$  hodnoty 0,04, avšak průkazný rozdíl mezi jednotlivými regiony zde není. Například Yang (2020), jehož výsledky prokázaly existenci dvou populačních klastrů, dosahuje průměrné hodnoty  $F_{is}$  0,127 a  $D'$  0,217, které jsou mnohem vyšší než hodnoty zjištěné v této práci. Interpretace této vzájemné regionální odlišnosti je velmi obtížná, neboť oba regiony jsou si do jisté míry podobné vzhledem k nadmořské výšce. Hledisko nadmořské výšky, o němž je logické uvažovat vzhledem k ovlivnění délky vegetační sezony, by však také neobstálo vzhledem k porovnání s regiony Jižní Čechy a Plzeňsko, které se nachází v podobných podmínkách, a tak musí být příčina vzájemné odlišnosti přímo těchto regionů hledána jinde. Jelikož ale zvýšenou míru odlišnosti s regionem Slovensko vykazují i ostatní české a moravské regiony, tak lze z hodnot parametru  $F_{is}$  konstatovat, že tento nejvýhodnější

region nacházející se na hranicích Polska a Ukrajiny vykazuje tendenci k odlišnosti vzhledem k ostatním regionům.

#### 6.4.1. Analýza molekulární variance – AMOVA

Z grafu č. 15 v kapitole 5.3.3. plyne, že největší variance populací se nachází uvnitř genotypů jednotlivců uvnitř populace a dále mezi jedinci testované populace. Molekulární variance napříč regiony (2%) a napříč populacemi (2%) je velmi nízká, což odpovídá recentní invazi mandelinky na naše území, která prozatím stále nevytvořila difference mezi jednotlivými regiony. Možnou příčinou malých rozdílů mezi populacemi lze teoreticky hledat v nízké různorodosti námi vybraných sběrových lokalit. Čtrnáct míst odběru vzorků v České republice pro analýzy této práce pokrývá oblasti s nejvyšší intenzitou pěstování brambor v naší zemi. Pokud by však přístup k výběru lokalit byl odlišný, například pokud bychom zvolili i vzorky domácích pěstitelů z Ostravska, Trutnovska či z okolí Aše, tak by mohla být různorodost jednotlivých vzorků mnohem vyšší.

Zajímavá data také poskytuje Graf 16. Je z něj patrné, z jaké míry jsou hodnoty variance ovlivněny původem inbreední populace z Travčic. Po vyloučení jedinců z této lokality se snížila molekulární variance napříč regiony na pouhé 1 % a molekulární variance napříč populacemi na hodnotu 0 %. Tyto výsledky znamenají paradoxně značný vliv omezení genetické rozmanitosti na vývin geneticky odlišných, nových, populací. Dále lze tedy konstatovat, i v kontextu předchozích závěrů z ostatních analýz, že případný vznik nové, rezistentní populace by bylo možné prokázat i s pomocí tohoto panelu mikrosatelitních markerů.

#### 6.4.2. Analýza hlavních koordinát PCoA

Z analýzy hlavních koordinát v kapitole 5.3.4. vyplývá příbuznost jednotlivých populací a regionů a jejich vzájemná blízkost či vzdálenost. Z grafů je patrné, že genetická vzdálenost populace ze Stakčína může být zapříčiněna do jisté míry genetickým driftem, který může v následujících letech vyústit ve vznik separátní populace. Stejně tak graf, kde nebyly zahrnuty Travčice, prokázal genetickou neodlišnost populací pocházejících z regionu na sever od Prahy (Čelákovice, Chlumín). Regionální graf víceméně kopíruje geografickou blízkost na mapě ČR, což může indikovat možnost regionálního rozrůznění v následujících letech.

Pozoruhodné je postavení populace Malonty, která se v grafu nezobrazujícím Travčice a Stakčín stává nejextrémněji vzdálená od ostatních. Tato vzdálenost je o to závažnější, neboť v žádné jiné analýze (HWE, Fis, F, počet alel) tato populace nevykazovala jakoukoliv známku odlišnosti. Jediná předchozí situace, kdy byla tato populace nějak odlišná od ostatních byla frekvence alel na lokusu LdGA5-30 v kapitole 5.1.. V kontextu předchozích výsledků je také zajímavé sledovat v grafu č. 18 postavení populací Havlíčkova Borová a Želiv. Obě tyto populace vykazovaly značnou míru odlišností od ostatních v analýze odchylek od HWE a značnou míru inbreedingu uvnitř populace (FIS). Z těchto dvou populací pak v analýze PCoA byly odlišní jen jedinci z Havlíčkovy Borové, což ale může korespondovat se zvýšenou hodnotou koeficientu  $F_{st}$ , který tato populace vykazovala při porovnání s populací Malonty, jejíž výsledky jsou v této analýze taktéž značně rozdílné.

#### 6.4.3. Shluková analýza

Z fylogenetického stromu (Graf20) v kapitole 5.3.5. je patrné, že jednotlivci z různých populací jsou vzájemně rovnoměrně rozmístěni napříč celým spektrem testovaných vzorků a nevytváří tak signifikantní shluky ve vztahu k lokalitám. Jedinými výjimkami jsou však populace Stakčín a Travčice, které tyto shluky do značné míry vytvářejí.

Z grafu 21, taktéž z kapitoly 5.3.5., který zobrazoval pouze jednotlivé lokality je patrná vzájemná vzdálenost populací z Havlíčkovy Borové, Želiva, Stakčína a Čelákovic, které při analýze koeficientem Fis, tedy vzdáleností vzorků uvnitř populace, vykazovaly nejvyšší míru odlišností. Z předešlých, prezentovaných, výsledků je zřejmé, že populace nejsou navzájem prozatím natolik odlišné, aby bylo možné uvažovat o zásadnějších, průkazných, rozdílech mezi nimi, a tak je nutné i výsledky z tohoto grafu brát v tomto kontextu.

Diverzifikace jednotlivých populací je spojená s izolovaností, možností se vyvíjet, s možností migrace a s dalšími faktory. Od původní imigrace mandelinky bramborové do Evropy a na naše území uplynulo prozatím ještě málo času, a proto jsou tyto vzájemné vzdálenosti mezi populacemi malé. Insekticidní tlak, vznik rezistencí k postřikům, klimatické změny a s nimi spojené změny v proudění větrů, snížení ročního úhrnu srážek a rozšíření nových plevelných druhů mohou v budoucnu způsobit větší vzájemné rozdíly nejen mezi námi zkoumanými lokalitami, ale i v kontextu celého evropského prostředí. To však by již mělo být předmětem dalších studií v budoucnosti. Výsledky této práce by těmto následným studiím mohly sloužit jako vhodný referenční materiál, pro jejich vlastní výzkum této problematiky.

## 7 Závěr

- Bylo úspěšně testováno 502 jedinců mandelinky bramborové pocházející z 15 různých lokalit. 14 z těchto lokalit se nachází na území České republiky, jedna lokalita pocházela z východního Slovenska.
- Jedinci z těchto populací byli testováni optimalizovaným panelem mikrosatelitních markerů. Z původních 11 užitých markerů jich bylo pro analýzu dat použito 9. Marker LdAC5-2 byl z finální analýzy vyřazen pro neprůkaznost dat při jejich odečítání z výsledků kapilární elektroforézy. Marker LdD4h byl z analýzy taktéž vyloučen, neboť při PCR opakovaně neamplifikoval.
- Na základě tohoto optimalizovaného panelu byl stanoven průměrný počet alel na lokus, míra očekávané ( $H_e$ ) a zjištěné heterozygotnosti ( $H_o$ ), fixační index jednotlivých populací ( $F$ ), koeficient inbreedingu uvnitř populací ( $F_{is}$ ), koeficient inbreedingu napříč populacemi ( $F_{st}$ ) a genetická distance ( $D'$ ). Byla provedena analýza molekulární variance AMOVA a analýza hlavních koordinát PCoA.
- Z hodnot, které byly prezentovány v kapitole výsledků, je průkazné, že uvnitř populací existuje genetická variabilita, a lze tak potvrdit první nulovou hypotézu.
- Z hodnot prezentovaných v kapitole výsledků není průkazné, že by v České republice proběhl takový evoluční vývoj, který by umožňoval potvrzení druhé nulové hypotézy o populační variabilitě mezi jednotlivými lokalitami na našem území, i přesto, že se zde mandelinka bramborová vyskytuje již více jak 70 let. Z dat je patrné, že naše i Slovenská populace tohoto brouka vznikla na základě invaze ze stejných předků a jednotlivé lokality sběru nelze považovat za dostatečně prostorově izolované.



## 8 Literatura

- Alvarez, J. M., & Srinivasan, R. 2005. Evaluation of hairy nightshade as an inoculum source for aphid-mediated transmission of potato leafroll virus. *Journal of economic entomology*, 98(4), 1101-1108.
- Alyokhin, A., Vincent Ch. & Giordanengo P., 2013. *Insect pests of potato: global perspectives on biology and management*. Boston: Elsevier / Academic Press. ISBN 978-0-12-386895-4. 2,11.
- Azeredo-Espin, A. M. L., Schroder, R. F. W., Roderick, G. K., & Sheppard, W. S. 1996. Intraspecific mitochondrial DNA variation in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biochemical genetics*, 34(7-8), 253-268.
- Benkovskaya, G. V., Udalov, M. B., & Poskryakov, A. V. 2004. Phenogenetic polymorphism of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say is an indicator of resistance to insecticides. *Agrochemistry*, 12, 1-6.
- Brownstein, M. J., Carpten, J. D., Smith, J. R. 1996. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques*, 20(6): 1004-1006, 1008-1010.
- Bruce, A. B. 1910. The Mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor. *Science*, 32(827), 627-628.
- Casagrande, R. A. 1985. The "Iowa" potato beetle, its discovery and spread to potatoes. *Bulletin of the ESA*, 31(2), 27-29.
- Capinera, J. L. 2005. Relationships between insect pests and weeds: an evolutionary perspective. *Weed science*, 53(6), 892-901.
- Capinera, J. L. (Ed.). 2008. *Encyclopedia of entomology*. Springer Science & Business Media.
- Crow, J. F., & Kimura, M. 1970. An introduction to population genetics theory. *An introduction to population genetics theory*.
- Čermák, V. 2019. Seznam doporučených odrůd bramboru 2019. 1. vyd. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. s.94. ISBN: 978-80-7401-174-0.
- ČSÚ. 2019 Osevní plochy zemědělských plodin. Český statistický úřad. K 4.7.2019. Dostupné online z: <https://www.czso.cz/documents/10180/91232947/270145-19.xls/247ae8ca-ff85-4500-9550-a53ce7769448?version=1.1> (accessed April 2020).
- Darwin, C. 1872. On the origin of species 6th edn London. UK: John Murray.
- Drummond, F. A., Casagrande, R. A., & Logan, P. A. 1992. Impact of the parasite, *Chrysomelobia labidomerae* Eickwort, on the Colorado potato beetle. *International journal of acarology*, 18(2), 107-115.

- EPPO. 2019: Distribution of *Leptinotarsa decemlineata*. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Paris. Last updated: 2019-10-01. Available from: <https://gd.eppo.int/taxon/LPTNDE/distribution> (accessed April 2020).
- FAO. 2019. FAOSTAT: Croops - Production quantities of Potatoes by country. Food and agriculture organization of the United nations, Rome. Last update: march 2020. Available from : <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (accessed April 2020).
- Fasulati, S. R. 1985. Polymorphism and population structure of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say in the European part of the USSR. *Ekologiya*, 6, 50-56.
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological conservation*, 126(2), 131-140.
- Ferro, D. N., Logan, J. A., Voss, R. H., & Elkinton, J. S. 1985. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) temperature-dependent growth and feeding rates. *Environmental entomology*, 14(3), 343-348.
- Forgash, A. J. 1984. *History, evolution, and consequences of insecticide resistance. Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22(2), 178–186. doi:10.1016/0048-3575(84)90087-7
- Follak, S., & Strauss, G. 2010. Potential distribution and management of the invasive weed *Solanum carolinense* in Central Europe. *Weed Research*, 50(6), 544-552.
- Fu, K. Y., Meng, Q. W., Lü, F. G., Guo, W. C., Ahmat, T., & Li, G. Q. 2015. The basic helix–loop–helix transcription factors in the colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(2), 197-203.
- Fusté, M. C. (Ed.). 2012. *Studies in Population Genetics*. BoD–Books on Demand.
- Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. 2011. *An introduction to forensic genetics* (Vol. 2). John Wiley & Sons.
- Gillespie, J. H. 2004. *Population genetics: a concise guide*. JHU Press.
- Grapputo, A., Boman, S., Lindstroem, L., Lyytinen, A., & Mappes, J. 2005. The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. *Molecular ecology*, 14(14), 4207-4219.
- Grapputo, A. 2006. Development and characterization of microsatellite markers in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 1177-1179.
- Graffelman, J., & Weir, B. S. 2016. Testing for Hardy–Weinberg equilibrium at biallelic genetic markers on the X chromosome. *Heredity*, 116(6), 558-568.
- Groombridge, J. J., Jones, C. G., Bruford, M. W., & Nichols, R. A. 2000. Conservation biology: ‘Ghost’ alleles of the Mauritius kestrel. *Nature*, 403(6770), 616.
- Hamilton, M. 2011. *Population genetics*.
- John Wiley & Sons. Hare, J. D. 1990. Ecology and management of the Colorado potato beetle. *Annual review of entomology*, 35(1), 81-100.

- Hartl, D. L., Clark, A. G., & Clark, A. G. 1997. *Principles of population genetics* (Vol. 116). Sunderland, MA: Sinauer associates.
- Hawthorne, D. J. 2001. AFLP-based genetic linkage map of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*: sex chromosomes and a pyrethroid-resistance candidate gene. *Genetics*, 158(2), 695-700.
- Hawthorne, D. J. 2003. Quantitative trait locus mapping of pyrethroid resistance in Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say)(Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of economic entomology*, 96(4), 1021-1030.
- Heller, M. J. 2002. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annual review of biomedical engineering*, 4(1), 129-153.
- Heim, D. C., Kennedy, G. G., Gould, F. L., & Van Duyn, J. W. 1992. *Inheritance of fenvalerate and carbofuran resistance in colorado beetles-Leptinotarsa decemlineata(Say)-from North Carolina. Pesticide Science*, 34(4), 303–311. doi:10.1002/ps.2780340402
- Holec, J., Soukup, J., Jursík, M., & Hamouz, P. 2006. Occurrence and spread of *Solanum physalifolium*-a new invasive weed in the Czech Republic. *Zeitschrift für pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz-sonderheft*-, 20, 493.
- Horton, D. R., & Capinera, J. L. 1987. Effects of plant diversity, host density, and host size on population ecology of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental entomology*, 16(4), 1019-1026.
- Horton, D. R., Capinera, J. L., & Chapman, P. L. 1988. Local differences in host use by two populations of the Colorado potato beetle. *Ecology*, 69(3), 823-831.
- Hsiao, T. H. 1978. Host plant adaptations among geographic populations of the Colorado potato beetle. *Entomologia experimentalis et applicata*, 24(3), 437-447.
- Hsiao, T. H. 1982, March. Geographic variation and host plant adaptation of the Colorado potato beetle. In *Proceedings of the 5th International Symposium on Insect-Plant Relationships* (pp. 315-324).
- Choi, J. H., Kijimoto, T., Snell-Rood, E., Tae, H., Yang, Y., Moczek, A. P., & Andrews, J. 2010. Gene discovery in the horned beetle *Onthophagus taurus*. *BMC genomics*, 11(1), 703.
- Jacobson, J. W., & Hsiao, T. H. 1983. Isozyme variation between geographic populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 76(2), 162-166.
- Jacques, R. L. 1988. *The potato beetles: the genus Leptinotarsa in North America (Coleoptera, Chrysomelidae)*. New York: E.J. Brill. ISBN 0916846407. s 144.
- Jacques, R. L. 2019. *The potato beetles*. Crc Press.
- Johnson, C. G. 1967. International dispersal of insects and insect-borne viruses. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 73(1), 21-43.

- International Chicken Polymorphism Map Consortium. 2004. A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. *Nature*, 432(7018), 717.
- Lashomb, J. H., & Ng, Y. S. 1984. Colonization by Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* (Say)(Coleoptera: Chrysomelidae), in rotated and nonrotated potato fields. *Environmental Entomology*, 13(5), 1352-1356.
- Lee, S. H., Dunn, J. B., Clark, J. M., & Soderlund, D. M. 1999. Molecular Analysis of kdr-like Resistance in a Permethrin-Resistant Strain of Colorado Potato Beetle. *Pesticide biochemistry and physiology*, 63(2), 63-75.
- Lee, C. E. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in ecology & evolution*, 17(8), 386-391.
- Louis, E. J., & Dempster, E. R. 1987. An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. *Biometrics*, 805-811.
- Mamta, B., & Rajam, M. V. 2017. RNAi technology: a new platform for crop pest control. *Physiology and molecular biology of plants*, 23(3), 487-501.
- Malekmohammadi, M., Hejazi, M. J., Mossadegh, M. S., Galehdari, H., Khanjani, M., & Goodarzi, M. T. 2012. Molecular diagnostic for detecting the acetylcholinesterase mutations in insecticide-resistant populations of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(2), 150-156.
- Malekmohammadi, M., & Galehdari, H. 2016. Target site insensitivity mutations in the AChE enzyme confer resistance to organophosphorous insecticides in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Pesticide biochemistry and physiology*, 126, 85-91.
- Metzger, C., Boydston, R., Ferguson, H., Williams, M. M., Zack, R., & Walsh, D. 2008. Interactions between population density of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and herbicide rate for suppression of solanaceous weeds. *Journal of Insect Science*, 8(1), 38.
- Mena-Covarrubias, J., Drummond, F. A., & Haynes, D. L. 1996. Population dynamics of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on horsenettle in Michigan. *Environmental Entomology*, 25(1), 68-77.
- Mullis, F., Falcoma, F., Scharf, S., Snikl, R., Horm, G., & Erlich, H. 1986. PCR a practical approach.
- Nei, M., Maruyama, T., & Chakraborty, R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29(1), 1-10.
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.
- Perrier, X., & Jacquemoud-Collet, J. P. 2019. DARwin software: dissimilarity analysis and representation for Windows (version 6.0. 021).
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Reader, J. 2009. *Potato: a history of the propitious esculent*. Yale University Press.

- Relichová, J. 2009. *Genetika populací*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4795-2. s. 188.
- Richardson, B. J., Baverstock, P. R., & Adams, M. 2012. *Allozyme electrophoresis: a handbook for animal systematics and population studies*. Academic press.
- Rinkevich, F. D., Su, C., Lazo, T. A., Hawthorne, D. J., Tingey, W. M., Naimov, S., & Scott, J. G. 2012. Multiple evolutionary origins of knockdown resistance (kdr) in pyrethroid-resistant Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 104(3), 192-200.
- Tauber, M. J., Tauber, C. A., & Masaki, S. 1986. *Seasonal adaptations of insects*. Oxford University Press on Demand.
- Tauber, M. J., Tauber, C. A., Obrycki, J. J., Gollands, B., & Wright, R. J. 1988. Geographical variation in responses to photoperiod and temperature by *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) during and after dormancy. *Annals of the Entomological society of America*, 81(5), 764-773.
- Templeton, A. R. 2006. *Population genetics and microevolutionary theory*. John Wiley & Sons.
- Ugozzoli, L., & Wallace, R. B. 1991. Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods*, 2(1), 42-48.
- Sakai, A. K., Allendorf, F. W., Holt, J. S., Lodge, D. M., Molofsky, J., With, K. A., ... & McCauley, D. E. (2001). The population biology of invasive species. *Annual review of ecology and systematics*, 32(1), 305-332.
- Sanger, F., & Coulson, A. R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441-448.
- Schoville, S. D., Chen, Y. H., Andersson, M. N., Benoit, J. B., Bhandari, A., Bowsher, J. H., ... & Childers, C. 2018. A model species for agricultural pest genomics: the genome of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Scientific reports*, 8(1), 1-18.
- Schoville, Sean; Chen, Yolanda; Poelchau, Monica; Hughes, Daniel S.T.; Robertson, Hugh M.; Benoit, Joshua B.; Rosendale, Andrew J.; Jones, Jeffery W.; Palli, Subba R.; Kumar, Abhishek; Ruiz-Arroyo, Victor-Manuel ; Childers, Anna; Bowsher, Julia ; Cappelle, Kaat ; Clements, Justin; Engsontia, Patamarerk ; García-Robles, Inmaculada; Grapputo, Alessandro; Jennings, Emily C.; Vargas Jentsch, Iris M.; Kalsi, Megha; Li, Fei; Lorenzen, Marcé D.; Ma, Xingzhou; Martynov, Alexander; Miller, Nicholas; Mitchell, Robert F.; Munoz-Torres, Monica ; Panfilio, Kristen A.; Pauchet, Yannick; Petek, Marko ; Rinehart, Joseph P.; Szuter, Elise M.; Torson, Alex; Yates, Ashley; Yocum, George D.; Andersson, Martin ; Khan, Sher; Richards, Stephen. 2017. *Leptinotarsa decemlineata* Official Gene set v1.1. Ag Data Commons. Available from <https://doi.org/10.15482/USDA.ADC/1410183>. Accessed 2020-04-29.
- Smith, A. F. (2012). *Potato: A global history*. Reaktion Books.

- Villablanca, F. X., Roderick, G. K., & Palumbi, S. R. 1998. Invasion genetics of the Mediterranean fruit fly: variation in multiple nuclear introns. *Molecular Ecology*, 7(5), 547-560.
- Vreugdenhil, D., Bradshaw, J., Gebhardt, C., Govers, F., Taylor, M. A., MacKerron, D. K., & Ross, H. A. (Eds.). 2011. *Potato biology and biotechnology: advances and perspectives*. Elsevier.
- Voss, R. H., & Ferro, D. N. 1990. Ecology of migrating Colorado potato beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) in western Massachusetts. *Environmental Entomology*, 19(1), 123-129.
- Voss, R. H., & Ferro, D. N. 1992. Population dynamics of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in western Massachusetts. *American Potato Journal*, 69(8), 473-482.
- Wikteliu, S. 1981. Wind dispersal of insects. *Grana*, 20(3), 205-207.
- Zhang, J. J., Yang, J., Li, Y. C., Liu, N., & Zhang, R. Z. 2013. Genetic relationships of introduced Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* populations in Xinjiang, China. *Insect science*, 20(5), 643-654.
- Yang, F. Y., Guo, J. J., Ning, L. I. U., & Zhang, R. Z. 2020. Genetic structure of the invasive Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* populations in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(2), 350-359.
- Zichová, T., Kocourek, F., Salava, J., Nad'ová, K., & Stará, J. 2010. Detection of organophosphate and pyrethroid resistance alleles in Czech *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations by molecular methods. *Pest management science*, 66(8), 853-860.
- Žižka, J. 2019. Situační a výhledová zpráva. 1. vyd. Praha: Ministerstvo zemědělství, s. 44. ISBN: 978-80-7434-516-6