

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Molekulární identifikace vybraných druhů hlístic**

*(Nematoda)*

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Tereza Libigerová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Mária Majeská Čudejková, Ph.D.</b>
Rok:	2016

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne ..... *podpis bakaláře*

Ráda bych poděkovala vedoucí práce Mgr. Márii Majeské Čudejkové, Ph.D. za věnovaný čas, trpělivost, vysvětlení dané problematiky a především za cenné rady a připomínky při zpracování této bakalářské práce.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Libigerová
Název práce	Molekulární identifikace vybraných druhů hlístic ( <i>Nematoda</i> )
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie, CRH
Vedoucí práce	Mgr. Mária Majeská Čudejková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

### Abstrakt

Hlístice patří mezi nejpočetnější mnohobuněčné organismy, které obývají široké spektrum biotopů. Vyznačují se řadou různých životních strategií, existují jako parazité nebo volně žijící druhy. Přesto, že jich dodnes bylo popsáno asi 30 000 druhů, jejich výzkum není ani zdaleka u konce. Zaměřením této bakalářské práce byla molekulární identifikace vybraných neznámých druhů hlístic, které již byly morfologicky zařazeny do určitých rodů. K tomuto účelu byly amplifikovány fragmenty DNA hlístic jaderného úseku LSU („large subunit“) a mitochondriálního genu *COI*. Tyto fragmenty byly zaklonovány do plasmidu a sekvence fragmentů byla komerčně přečtena. Pro získané sekvence byly pomocí programu BLAST nalezeny homologní sekvence, které se v současné době nachází v nukleotidové databázi NCBI. Šest z osmi získaných sekvencí odpovídalo sekvencím hlístic, jedna z nich se s nalezenou plně shodovala. Zbývající dvě sekvence byly identifikovány jako houby, což naznačuje možnost kontaminace.

Klíčová slova	hlístice, molekulární identifikace, LSU, <i>COI</i>
Počet stran	46
Počet příloh	-
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Tereza Libigerová
Title	Molecular identification of selected species of nematodes ( <i>Nematoda</i> )
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of molecular biology, CRH
Supervisor	Mgr. Mária Majeská Čudejková, Ph.D.
The year of presentation	2016

### Abstract

Nematodes belong to the one of the largest group of multicellular organisms that occupies a wide range of biotopes. They developed a broad variety of life strategies, as for example parasitic or free living life style. There has been described about 30 000 species till now, however, this number is far from complete. This bachelor thesis has been focused on molecular identification of unknown nematode species, which have already been morphologically classified into certain genus. For this purpose the DNA fragments of nuclear region LSU (large subunit) and mitochondrial gene *COI* were amplified. These fragments were inserted into the plasmid and the sequences of fragments were commercially sequenced. The sequences that have been acquired were used to search for the homologous sequences in the nucleotide database of NCBI using the program BLAST. Six of eight sequences were homologous to the sequences of nematodes found in database, one of them was found to be identical. The remaining two sequences were identified as fungi, suggesting the possibility of contamination.

Keywords	nematodes, molecular identification, LSU, <i>COI</i>
Number of pages	46
Number of appendices	-
Language	Czech

# OBSAH

<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>7</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>9</b>
2.1 Hlístice.....	9
2.1.1 Anatomie a morfologie .....	10
2.1.2 Vývojový cyklus .....	11
2.1.3 Parazitické hlístice .....	12
2.1.4 Hlístice jako bioindikátory prostředí .....	16
2.2 Identifikace hlístic založená na analýze DNA .....	16
2.2.1 Molekulární markery .....	16
2.2.1.1 Jaderné markery .....	17
2.2.1.2 Mitochondriální markery .....	18
2.2.2 Molekulární metody využívané k identifikaci hlístic .....	19
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>22</b>
3.1 Materiál .....	22
3.1.1 Biologický materiál .....	22
3.1.2 Chemikálie.....	22
3.1.3 Roztoky a média .....	23
3.1.4 Kity a návody.....	24
3.1.5 Přístroje.....	24
3.2 Metody.....	25
3.2.1 Příprava vzorků pro polymerázovou řetězovou reakci.....	25
3.2.2 Polymerázová řetězová reakce .....	25
3.2.3 Purifikace PCR produktu .....	26
3.2.4 Klonování vybraných fragmentů DNA do <i>pDrive</i> vektoru .....	26
3.2.5 Transformace bakteriálních buněk <i>E. coli</i> .....	27
3.2.6 Izolace plasmidové DNA alkalickou lyzí .....	27
3.2.7 Restrikce plasmidové DNA enzymem <i>EcoRI</i> .....	28
3.2.8 Elektroforetická separace DNA .....	29
3.2.9 „Colony“ PCR .....	29
3.2.10 Izolace plasmidové DNA pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep Kit.....	30
3.2.11 Zpracování sekvencí plasmidů .....	31
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>32</b>
4.1 Amplifikace fragmentů DNA a jejich klonování do <i>pDrive</i> vektoru .....	32
4.2 Ověření přítomnosti fragmentů v <i>pDrive</i> vektoru .....	32
4.3 Úprava sekvencí a jejich srovnávání se sekvencemi nacházejícími se v databázi NCBI .....	37
<b>5 ZÁVĚR.....</b>	<b>41</b>
<b>6 LITERATURA .....</b>	<b>42</b>
<b>7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>46</b>

## **CÍLE PRÁCE**

- Vypracování literární rešerše na téma hlístice a jejich molekulární identifikace založená na analýze DNA.
- Osvojení molekulárně-biologických technik, jako je PCR, klonování, transformace, a izolace DNA.
- Zpracování sekvencí DNA pomocí softwaru Sequence Scanner v1.0, MEGA 6.0, a BLAST.

## 1 ÚVOD

Hlístice jsou jedním z nejpočetnějších a nejrozšířenějších kmenů mnohobuněčných živočichů, kteří osidlují ohromné spektrum stanovišť. Dodnes jich bylo popsáno téměř 30 000 druhů, ale předpokládá se, že se jejich počet může pohybovat až v řádech milionů druhů. Přesto, že jsou hlístice velmi rozmanitou skupinou, charakterizují je některé společné znaky, jako je pokrytí jejich poměrně jednoduchého těla vícevrstevnou kutikulou, nebo přítomnost podélného svalstva, které jim umožňuje typický mrskavý pohyb. Vývoj hlístic je značně rozmanitý, od jednoduchých vývojových období až po různě složité. Převažují gonochoristé s odděleným pohlavím, můžeme se ale setkat i s partenogenezí, střídáním pohlavních generací s partenogenetickými cykly, nebo také s hermafrodity. Je pro ně typický pohlavní dimorfismus, kdy samičky vyrůstají do větších rozměrů než samci. Volně žijící hlístice tvoří majoritní část z jejich celkového počtu a jsou důležité pro správné fungování ekosystémů. Právě kvůli jejich všudypřítomnosti mohou sloužit jako indikátory narušení životního prostředí. Menší část zaujímají hlístice parazitující jak na rostlinách, tak živočiších a člověku. Zejména fytopatogenní hlístice, které jsou rozšířené po celém světě, způsobují značné hospodářské a ekonomické ztráty.

K identifikaci jednotlivých druhů hlístic slouží, kromě morfologických znaků, také molekulární analýza sekvence DNA. V molekulární biologii se k identifikaci hlístic využívá molekulárních markerů - znaků vypovídajících o podobnosti organismů, které jsou určovány pomocí charakteristické sekvence DNA nebo pořadím aminokyselin v proteinech. Markery můžeme dělit na proteinové nebo genetické. Jako genetické markery se využívají geny či nekódující oblasti jaderné nebo mitochondriální DNA. V současné době existuje mnoho metod, které se využívají k identifikaci hlístic, rozlišení jednotlivých druhů a stanovení fylogenetických vztahů mezi těmito organismy. Mezi nejpoužívanější patří polymerázová řetězová reakce (PCR) a sekvencování, s nímž je také spojený v posledních letech stále více populární DNA-barcoding.

V teoretické části této bakalářské práce jsou shrnuty základní poznatky o hlísticích a metodách využívaných k jejich identifikaci na základě analýzy DNA. Experimentální část obsahuje popis analýzy vybraných fragmentů DNA sekvencí hlístic rodu *Bursaphelenchus*, *Laimaphelenchus*, *Macrolaimus* a *Tylaphelenchus*. V kapitole výsledky a diskuze jsou uvedeny a diskutovány úspěchy a neúspěchy práce.

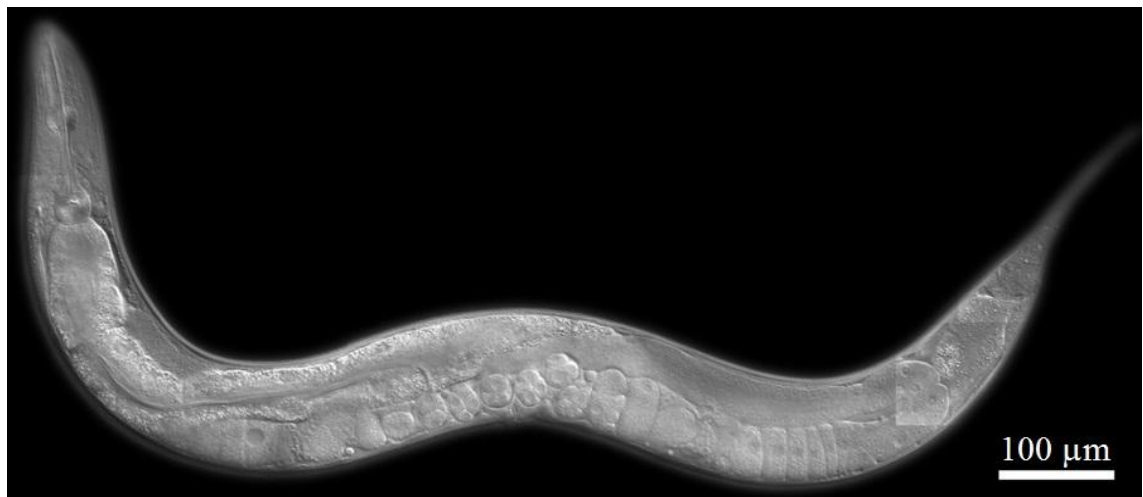


## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Hlístice

Hlístice jsou jedním z nejpočetnějších a nejrozšířenějších kmenů mnohobuněčných živočichů. Ne vždy byla tato skupina prezentována jako samostatný kmen. O jejich taxonomickém zařazení byly vedeny četné diskuze. Až v roce 1919 N. A. Cobb navrhl systém, ve kterém jsou hlístice řazeny samostatně. Hlístice (*Nematoda*) spadají do říše živočichů (*Animalia*), podříši trojlistých (*Bilateria*) a oddělení prvoústých (*Protostomia*). Odhady o existenci celkového počtu hlístic se rapidně liší, a to od 40 000 až do 10 000 000 druhů (Blaxter 1998; Yates a Boag, 2006). Hugot *et al.* (2001) udávají, že jich již bylo popsáno téměř 30 000.

Mezi nejznámější zástupce hlístic patří *Caenorhabditis elegans* neboli háďátko obecné (Obr. 1), které se v přírodě vyskytuje v podstatě po celém světě, kde se živí půdními mikroorganismy. *C. elegans* je modelovým organismem molekulární a vývojové biologie (Brenner, 1974), a to kvůli výhodám, jako je krátký životní cyklus, snadná laboratorní kultivace a potenciál pro genetickou analýzu (Brenner, 1973). Jedná se o první mnohobuněčný organismus, jehož kompletní genom byl sekvencován (CESC, 1998).



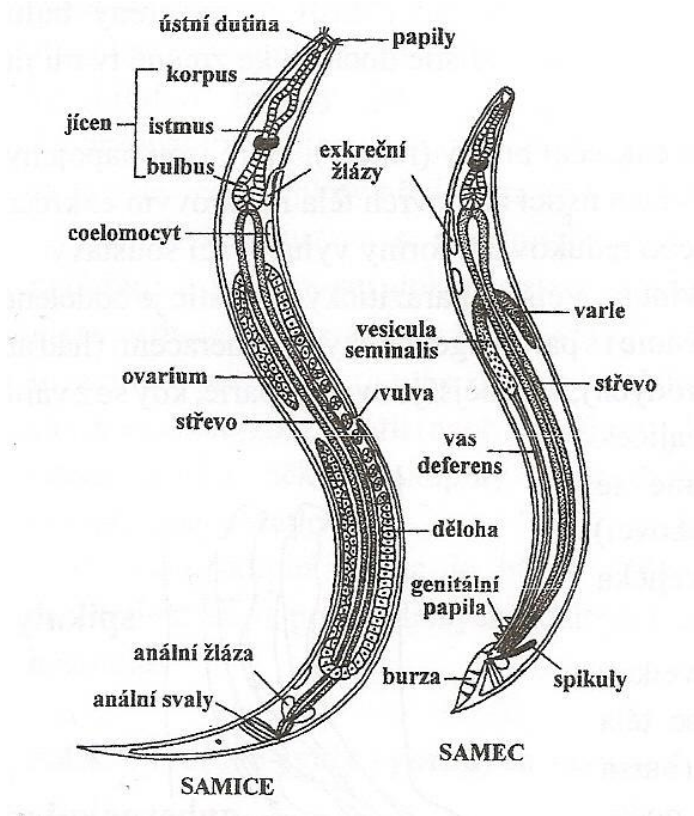
Obr. 1 *Caenorhabditis elegans* (www.chin-sang.ca).

### 2.1.1 Anatomie a morfologie

Délka těla hlístic je značně kolísavá, pohybuje se v řádech milimetrů až centimetrů, vzácně i metrů. Například *Placentonema gigantissima*, parazitující v placentě mořských savců, dosahuje velikosti téměř devíti metrů (Gubanov, 1951). Přesto, že jsou hlístice velmi rozmanitou skupinou, charakterizují je některé společné znaky (Obr. 2).

Jejich tělo je nečláňované, válcovité či vřetenovité, pokryté vícevrstevnou kutikulou, kterou tvoří proteiny, zejména keratin. Na jejím povrchu se mohou nacházet struktury jako rýhy, záhyby či trny, nebo také smyslové papily. Takové útvary mohou sloužit k rozlišení jednotlivých druhů (Volf *et al.*, 2007).

Jelikož mají hlístice tělní dutinu typu pseudocoel, není vytvořena žádná vnitřní kostra a kutikula se tak kvůli své pružnosti a pevnosti výrazně podílí na udržování tvaru těla. Pod kutikulou se nachází hypodermis a podélné svalstvo, které je kvůli nepřítomnosti okružního svalstva zodpovědné za typický mrskavý nebo hadovitý pohyb. Ústní dutina, tvořena ústním otvorem různého tvaru a velikosti, pokračuje žláznatým anebo svalnatým jícnem, na nějž navazuje trubicovité střevo, které u samic ústí do konečníku a řiti. U samců vyúsťuje konečník do kloaky (Horák a Scholz, 1998).



Obr. 2 Základní stavba samice a samce hlístic (Horák a Scholz, 1998).

Nervová soustava je gangliovitá, tvořena nervovým prstencem obcházející jícn, z něhož vystupují nervové provazce, které jsou vzájemně propojeny příčnými spojkami. Základem vylučovací soustavy jsou exkretční buňky, které směřují do exkretčních kanálků, exkretčního sinu a exkretčním pórem ústí až na povrch těla. Vzhledem k nepřítomnosti oběhového a dýchacího systému, zabezpečuje tyto funkce tělní tekutina (Weiser a Mráček, 1988).

### 2.1.2 Vývojový cyklus

Vývoj hlístic je značně rozmanitý, od jednoduchých vývojových etap až po různě složité. Hlístice jsou majoritně gonochoristé s odděleným pohlavím. Můžeme se ale setkat i s partenogenezí, střídáním pohlavních generací s partenogenetickými cykly, nebo také s hermafroditou (Volf *et al.*, 2007). Je pro ně typický pohlavní dimorfismus, kdy samičky vyrůstají do větších rozměrů než samci. Zadní část těla samce je, na rozdíl od samice, často ohnutá a jsou na ní umístěny různé struktury napomáhající páření, zejména sklerotizované párové spikuly, sloužící k rozšíření pohlavního otvoru samičky (Horák a Scholz, 1998).

Dospělí jedinci se vyvíjí přes tři nebo čtyři larvální stádia. Hlístice jsou většinou vejcorodé (oviparní), vzácněji vejcoživorodé (ovoviviparní), kdy se larva vylíhne již v děloze samice. Volně žijící hlístice mají velmi jednoduchý cyklus. Z oplozeného vajíčka se vyvine larva, která prochází čtyřmi poměrně rychlými stupni vývoje, a poté se z ní stává dospělec schopný reprodukce (Sulston a Horvitz, 1977). Za nepříznivých podmínek, jako je například hladovění, vstupují hlístice do alternativního larválního stádia tzv. „dauer“ etapy. Tato larva je metabolicky nečinná a velmi odolná vůči vnějšímu prostředí (Cassada a Russell, 1975), což je základem pro dlouhodobé přežití v přírodě. Jakmile naleznou vhodné podmínky a potravní zdroj, stává se metabolicky aktivní a dochází k dalšímu vývoji.

Vývojové cykly parazitických hlístic mohou být přímé nebo nepřímé. V případě přímého vývoje se z vajíčka vylíhne larva, která prochází čtyřmi larválními stádii a přitom svléká kutikulu. Třetí larvální stádium je infekční, dochází k invazi do hostitele, v němž se svléká a stává se z ní dospělec. Parazitické hlístice s nepřímým vývojovým cyklem vyžadují mezihostitele, jako je například hmyz či kroužkovci, ve kterém dochází k vývoji larev, které až poté napadají konečného hostitele (Horák a Scholz, 1998).

### 2.1.3 Parazitické hlístice

Zástupci kmene *Nematoda* jsou jak volně žijící, tak parazitičtí. Způsobují nemoci zvířat, rostlin i lidí. Nejvíce prostudovaní jsou původci lidských nálezů. Jedná se například o roupa dětského, který cizopasí v tenkém a tlustém střevě člověka. Způsobuje entorobiózu (Cook, 1994), která se projevuje svěděním kolem konečníku. Infekci šíří hlavně děti, které nedodrží dostatečnou hygienu. Dalším parazitem, rozšířeným po celém světě, zejména v méně rozvinutých zemích, ve kterých není kladen důraz na hygienu, je škrkavka dětská (Bundy, 1994). Počet nakažených lidí se ročně odhaduje na 1,2 miliardy (de Silva *et al.*, 2003).

Fytopatogenní hlístice se vyvinuly pravděpodobně jako odpověď na sucho, kvůli kterému se uchýlili právě k pronikání do rostlin. Často se obecně nazývají háďátka, protože pro některé jedince neexistuje české pojmenování (Weiser a Mráček, 1988). Podle Jacksona a Taylora (1996) existuje přes dvacet rodů hlístic, které způsobují nemoci rostlin, a doposud jich bylo popsáno 4100 druhů (Decraemer a Hunt, 2006). Jsou rozšířeny po celém světě a způsobují značné hospodářské ztráty. Škody napáchány háďátky jsou odhadovány na 157 bilionů amerických dolarů ročně (Abad *et al.*, 2008). Z ekonomického hlediska jsou nejškodlivější kořenová a cystotvorná háďátka (Jones *et al.*, 2013). Ochranou zemědělských a lesnických rostlin před škůdci se zabývá Evropská a Středozevní organizace ochrany rostlin, známá pod zkratkou EPPO ([www.eppo.int](http://www.eppo.int)). Jednou z aktivit této organizace je sestavování seznamů karanténních jedinců (Tab. 1) a navrhování diagnostických a kontrolních postupů.

Tab. 1 Karanténní druhy háďátek podle oblasti karantény (zpracováno dle [www.eppo.int](http://www.eppo.int))

V rámci Evropy	Mimo Evropu
<i>Aphelenchoides besseyi</i>	<i>Nacobbus aberrans</i>
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	<i>Radopholus similis</i>
<i>Globodera pallida</i>	<i>Xiphinema americanum sensu stricto</i>
<i>Globodera rostochiensis</i>	<i>Xiphinema bricolense</i>
<i>Heterodera glycines</i>	<i>Xiphinema californicum</i>

Hád'átka tvořící cysty zahrnují z ekonomického hlediska nejškodlivější druhy, mezi které patří zejména škůdci brambor, sójových bobů a obilovin. Hlavním problémem je, že jsou schopna přežívat v půdě po dlouhou dobu, dokonce až dvacet let, bez přítomnosti hostitele (Grainger, 1964; Turner, 1996). V larvu se vyvíjí uvnitř vajíčka, a ta je v tomto stádiu nečinná. Líhnutí započne jako odpověď na signální chemikálie přítomné v kořenech budoucího hostitele. Jakmile jej larva lokalizuje, napadá jej a migruje kořeny až do vnitřní vrstvy primární kůry neboli kortexu. Tam se její chování mění, vyhledává vhodnou buňku, kterou napadá ústním bodcem, to vede k vytvoření mnohojaderného útvaru tzv. syncytia (Hewezi a Baum, 2013). Z něj se larva několik týdnů živí a posléze dorůstá v dospělce. Samci poté oplodní samičky, které lokalizovali pomocí feromonů. Samičky umírají, a takto se z nich stávají cysty obsahující stovky dalších vajíček a larev (Jones *et al.*, 2013).

Mezi cystotvorné druhy parazitující na bramborech patří hád'átka bramborové (*Globodera rostochiensis*) a hád'átka nažloutlé (*Globodera pallida*). Na kořenech vytváří žluté až hnědé cysty o velikosti asi půl centimetru (Obr. 3). Tato hád'átka se rozšířila do téměř všech hlavních oblastí orientujících se na pěstování brambor, a patří k nejsledovanějším karanténním patogenům (Hockland *et al.*, 2012). Odhaduje se, že cystotvorné druhy působí škody až 9 % celosvětové produkce brambor (Turner a Rowe, 2006).



Obr. 3 Cysty vytvořené na kořenech brambor hád'átkem *Globodera pallida* (Tan *et al.*, 2009).

Ze skupiny cystotvorných háďátek rovněž stojí za zmínku háďátka řepné (*Heterodera schachtii*), které cizopasí především na cukrové řepě, ale také na brukvích (Fosu-Nyarko *et al.*, 2016).

Kořenová háďátka parazitují takřka na všech druzích cévnatých rostlin. Na kořenech hostitelů vytvářejí háčky (Siddique *et al.*, 2014). Dospělé samičky snášejí vajíčka, uložena v ochranné želatinové vrstvě, která na povrchu kořenů tvoří masivní hmotu (Obr. 4). Líhnutí je závislé výhradně na vhodné teplotě a vlhkosti. Larva, nacházející se v druhém stádiu, využívá k napadení rostliny jak jehlovitého styletu, tak celulólytických a pektolytických enzymů, které štěpí buněčnou stěnu. V dalších stádiích se larva již nekrmí, a vyrůstá v dospělé. Tyto druhy se často rozmnožují partenogeneticky, a proto se samečci rodí jen za nepříznivých podmínek. Tyto háďátka způsobují škody zejména v tropických oblastech, ale existují i výjimky, jako rod *Meloidogyne*, který je rozšířen celosvětově (Trudgill a Blok, 2001).

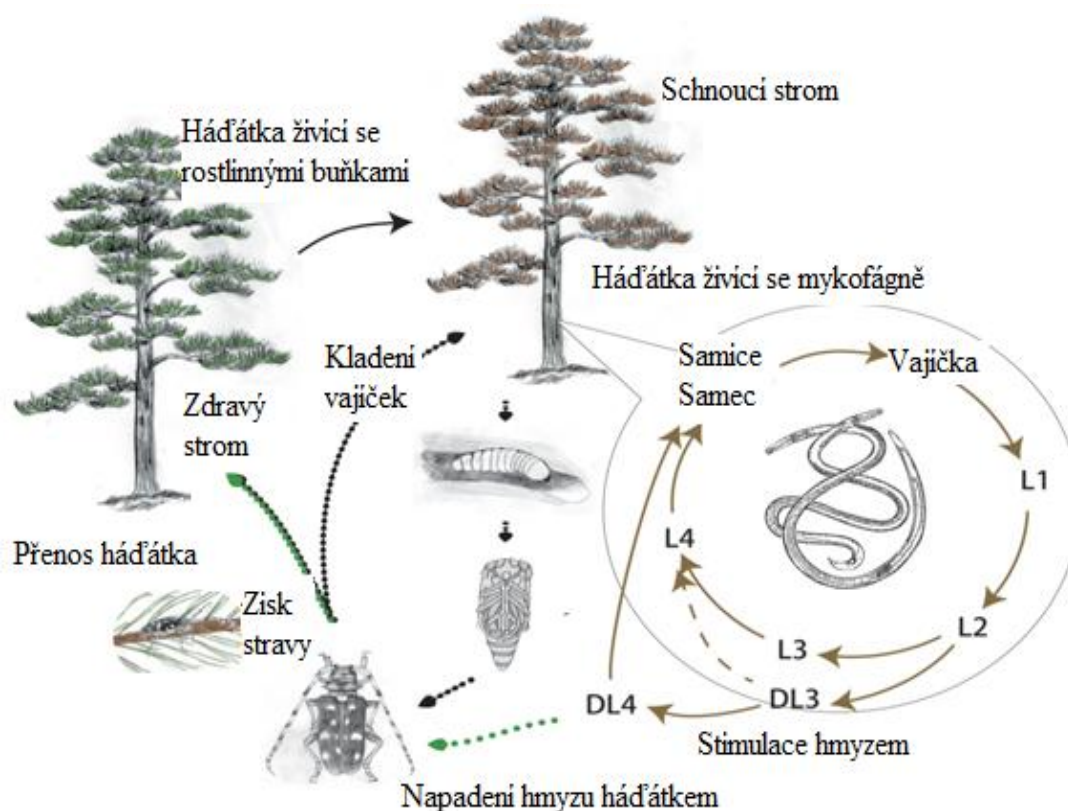
Háďátka borovicové (*Bursaphelenchus xylophilus*), původem ze Severní Ameriky, patří v Evropě k nejinvazivnějším druhům napadající borovicové lesy. Během počátku 20. století, především vlivem mezinárodního obchodu, bylo zavlečeno až do východní Asie, zejména do Japonska, Číny a Koreji. V těchto oblastech působí enormní škody. Přítomnost háďátka borovicového nebyla v České republice, kde jehličnaté stromy tvoří více jak 70 % celkové zalesněné oblasti, doposud potvrzena (Běhalová, 2006), avšak výskyt háďátek rodu *Bursaphelenchus* již prokázán byl (Čermák *et al.*, 2013).



Obr. 4 Poškození kořenů rajčete způsobené kořenovým háďátkem *Meloidogyne incognita* (Jones *et al.*, 2013).

Hád'átko borovicové má schopnost žít se jak ze stromů, tak z hub a plísní, které kolonizují schnoucí a uschlé stromy. Využívá se přes čtyři larvální stádia, ale při nedostatku stravy se mění v metabolicky nečinného jedince, který vyčkává na vhodného mezipřenašeče. Poté je aktivován další vývoj za účelem napadení tohoto přenašeče (nejčastěji brouka), pomocí kterého je přepraven na další zdroj potravy (Obr. 5). Migruje přes pletiva a živí se parenchymem, což způsobuje vadnutí stromu, na kterém se v této fázi objevují i plísně a houby. Právě na nich se hád'átko přživuje, a dochází tak k jeho rychlé reprodukci (Arakawa a Togashi, 2002; Kikuchi *et al.*, 2011).

Velmi rozšířené hád'átko je *Aphelenchoides besseyi*, které postihuje kulturní i okrasné rostliny. V oblastech mírného pásma parazituje na jahodníku, deformuje jeho listy a způsobuje jejich tmavnutí. Největší problémy ale působí na území, kde se pěstuje rýže, v těchto oblastech se šíří pomocí závlahové vody rýžových polí. Infekce se projevuje typickým zblednutím listové špičky, která poté může nekrotizovat, a omezením celkového růstu napadené rostliny. Vrcholové části květenství bývají zkroucené a produkují málo semen, která jsou většinou deformovaná (Khan *et al.*, 2012).



Obr. 5 Životní cyklus hád'átka borovicového (upraveno dle Kikuchi *et al.*, 2011).

### **2.1.4 Hlístice jako bioindikátory prostředí**

Z dosavadních znalostí vyplývá, že parazitické hlístice tvoří pouze poměrně malou část z jejich celkového počtu, a to i přes jejich rozmanitost. Velký díl reprezentují hlístice žijící volně ve sladkovodním, mořském nebo půdním ekosystému (Baldwin *et al.*, 2004).

Společně s prvky patří mezi nejpočetnější organismy půdní mikrofauny. Každý čtvereční metr může obsahovat přes 400 druhů hlístic. Právě kvůli jejich všudypřítomnosti mohou sloužit jako indikátory narušení životního prostředí (Schratzberger *et al.*, 2006; Heininger *et al.*, 2007). S tím také souvisí jejich důležité vlastnosti jako pokrytí kutikulou, která je v kontaktu s vnějším prostředím, možnost přežít v přírodě prostřednictvím kryptobiózy, a hlavně přítomnost specifických genů. Jejich exprese se zvyšuje, když jsou hlístice vystaveny stresu, vysoké teplotě, kovovým iontům či toxinům (Kammenga *et al.*, 1998). Tyto geny resp. proteiny mohou sloužit jako biomarkery při určování toxicity půd (Güven *et al.*, 1999).

## **2.2 Identifikace hlístic založená na analýze DNA**

Neustálý vývoj molekulárních metod napomáhá k identifikaci hlístic, rozlišení jednotlivých druhů a stanovení fylogenetických vztahů mezi těmito organismy (Perlman *et al.*, 2003). Tyto vztahy je možné znázornit pomocí fylogenetických stromů, které zobrazují souvislost mezi různými taxonomickými jednotkami či organismy na základě předpokladu, že mají společného předka. Fylogenetické vztahy jsou sestavovány porovnáváním homologických sekvencí DNA nebo sekvencí proteinů. Právě odlišnosti v sekvencích značí genetickou rozdílnost, která vznikla v průběhu evoluce (Patwardhan *et al.*, 2014).

### **2.2.1 Molekulární markery**

Molekulární markery jsou vlastnosti či znaky vypovídající o podobnosti organismů, které jsou určovány pomocí charakteristické sekvence DNA nebo pořadím aminokyselin v proteinech. Můžeme je rozlišovat dle různých hledisek – dle umístění v buňce na jaderné a mitochondriální, dle variability na proteinové či genetické markery, dle genetické funkce na oblasti kódující ribozomální RNA (rRNA), transferovou RNA (tRNA), proteiny a nekódující sekvence. Proteinové markery jsou v současné době na ústupu a stále více se využívají markery genetické, a to právě díky



reprodukovatelnosti a množství poskytnutých informací. Jako genetické markery se využívají geny či nekódující oblasti jaderné nebo mitochondriální DNA (Sunnucks, 2000).

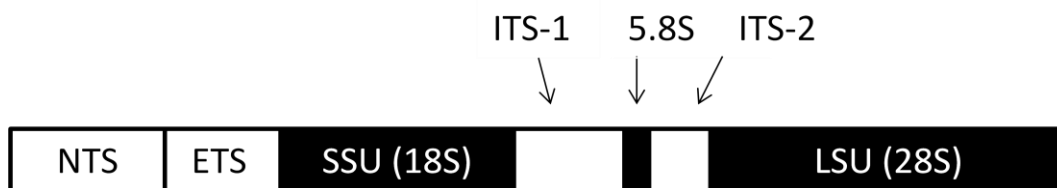
### 2.2.1.1 Jaderné markery

Jaderná ribozomální DNA (rDNA) neboli rRNA geny, patří mezi nejčastěji využívané molekulární markery v molekulární diagnostice. Tyto geny se v genomu nacházejí v mnoha kopiích, což usnadňuje jejich amplifikaci. Jsou uspořádány tandemově a tvoří oblasti zvané NORs (“nucleolus organizer regions”) - organizátory jadérka (Chen a Pikaard, 1997). Jsou to geny kódující ribozomální RNA (Obr. 6), a to malé i velké ribozomální podjednotky (SSU - „small subunit“, LSU - „large subunit“). Jsou zde přítomny i transkribované interní (ITS - „internal transcribed spacer“) a externí (ETS - „external transcribed spacer“) sekvence, a netranskribovaná intergenová sekvence neboli mezigenový mezerník (IGS - „intergenic spacer“) (Obr. 6) (Fatica a Tollervey, 2002).

SSU rRNA geny (Obr. 6) jsou často využívané jako molekulární marker u hlístic, ale i jiných organismů, protože patří mezi DNA úseky s nejnižší mutační rychlostí. Díky tomu jsou vhodné pro studium dávných evolučních událostí. Jejich konzervativní povaha umožňuje použití univerzálních primerů, které tak mohou být využity k amplifikaci DNA v rámci skupin organismů, o kterých neexistují téměř žádné informace (Hillis a Dixon, 1991). 53 sekvencí SSU bylo využito například ke studiu nejznámějších druhů parazitických i volně žijících hlístic (Blaxter *et al.*, 1998).

LSU rRNA geny jsou více proměnlivé než SSU geny (Obr. 6). Jsou využívány zejména k výzkumu evolučních událostí, které se staly v průběhu prvohor a druhohor (Hillis a Dixon, 1991). Právě kvůli rychlejší mutační rychlosti sekvence v této oblasti se Ye *et al.* (2007) domnívají, že je vhodná k objasnění vztahů na úrovni druhů, tj. relativně recentních evolučních událostí. Sekvence LSU genů (Obr. 6) umožnily například objasnění fylogenetických vztahů mezi hlísticemi patřícími do rodu *Steinernema* (Stock *et al.*, 2001).

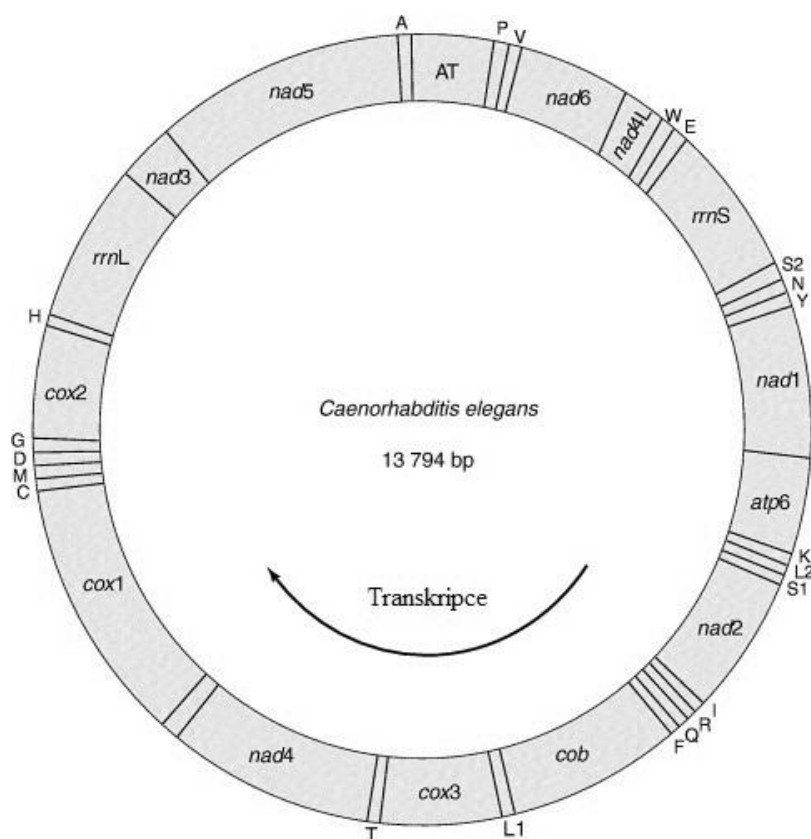
Oblast ITS zahrnuje tři regiony, a to ITS-1, 5.8S a ITS-2 (Obr. 6). Sekvence regionu 5.8S je krátká a značně konzervovaná. ITS-1 a ITS-2 rRNA oblast v průběhu evoluce mutovala rychleji, a proto je vhodná k fylogenetickým studiím na úrovni druhů i celé populace (Cherry *et al.*, 1997).



Obr. 6 Schematické pořadí rRNA genů u eukaryot (upraveno podle Hillis a Dixon, 1991).

### 3.2.1.2 Mitochondriální markery

Mitochondrie jsou buněčné orgány, jejichž genom je haploidní, tvořen dvouřetězcovou DNA, která se vyskytuje v několika kopiích. Obvykle je malý, a to od 13 do 26 kb. Kódující geny jsou od sebe separovány dlouhými oblastmi nekódující DNA. Mitochondriální genom obvykle obsahuje 12-13 genů kódujících proteiny, 22 genů pro tRNA a 2 geny pro rRNA (Hu a Gasser, 2006) (Obr. 7). Mitochondriální genom je bohatým zdrojem genetických markerů, zejména díky jejich vysoké mutační rychlosti.



Obr. 7 Struktura mitochondriálního genomu *Caenorhabditis elegans*. Velikost genomu je 13 794 bp a obsahuje 12 genů kódující proteiny (*atp6*, *cob*, *cox1-3*, *nad1-6* a *4L*), 22 genů kódujících tRNA (písmena charakterizující jednotlivé aminokyseliny) a 2 geny kódující rRNA (*rrnS* a *rrnL*) (upraveno dle Hu a Gasser, 2006).

Jedním z mitochondriálních genů využívaných jako molekulární marker pro populační genetiku je gen *COI* kódující podjednotku I cytochrom c oxidasy, zapojený do elektronového transportního řetězce účastnícího se oxidativní fosforylace v mitochondriích. Vzhledem k ostatním mitochondriálním genům sekvence *COI* v průběhu evoluce mutuje relativně pomalu, a proto se nejčastěji užívá při molekulární identifikaci, zejména na rodové úrovni (Peat *et al.*, 2009).

### 2.2.2 Molekulární metody využívané k identifikaci hlístic

Odlíšnosti hlístic v jejich životní strategii, toleranci k prostředí, reprodukci a dalších mnoha faktorů, podnítili zájem vědců je plně geneticky charakterizovat. Identifikace hlístic je také spojována s nechtěným dovozem (při importu zboží) exotických druhů, které vytlačují druhy přirozeně se vyskytující (Stock, 2005).

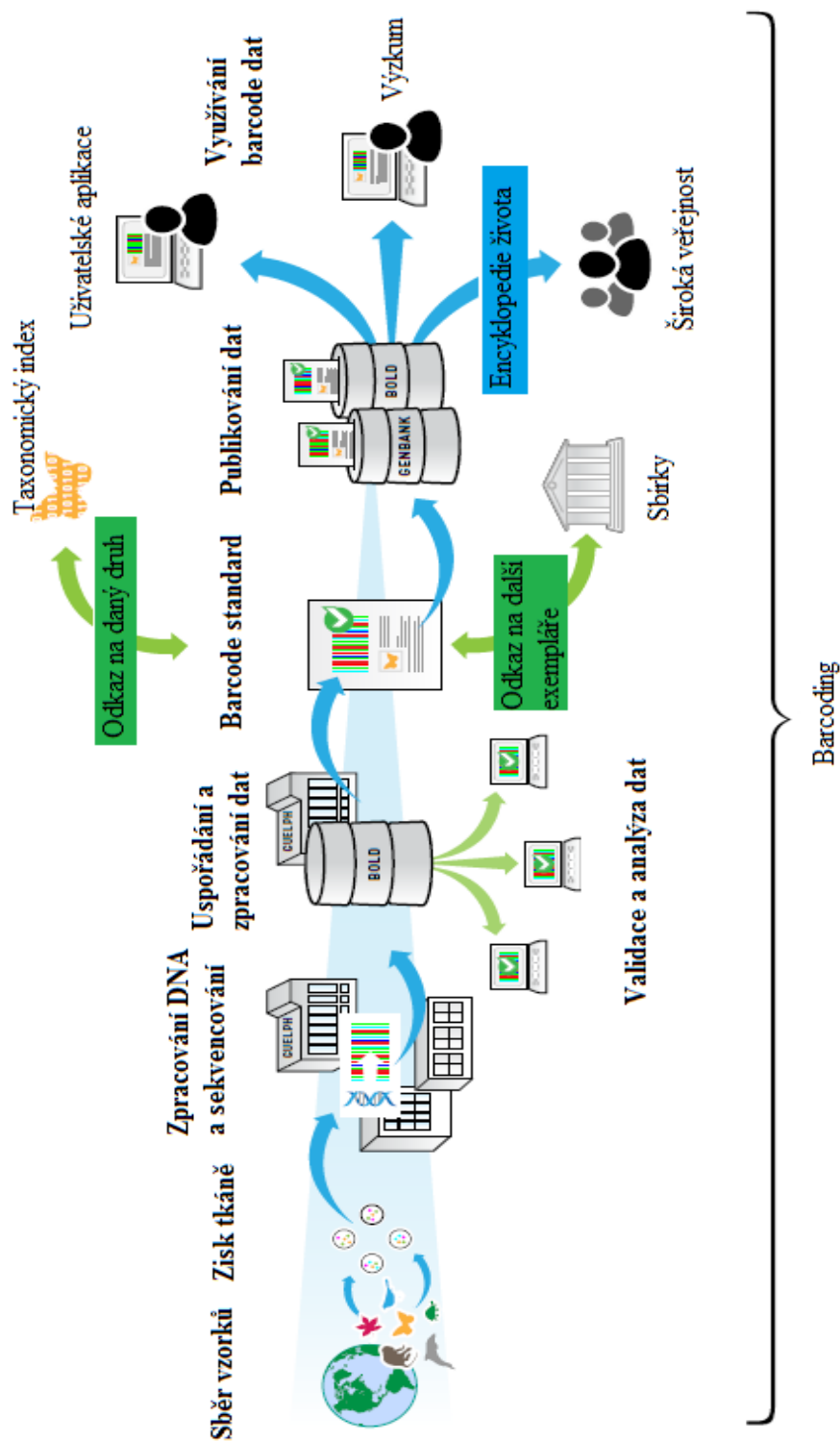
Mezi metody, které jsou v poslední době k molekulární identifikaci hlístic nejvíce využívané, patří polymerázová řetězová reakce (PCR), která slouží k amplifikaci fragmentů DNA *in vitro*. Při této reakci je dvouvláknová DNA, sloužící jako templát, nejprve denaturována na jednovláknové řetězce. Poté dochází k nasednutí dvou primerů, které ohraničují úsek amplifikovaného fragmentu DNA, od jejichž 3' konce začíná termostabilní DNA polymerasa syntetizovat vlákno komplementární k DNA matici (Hue-Roye a Vege, 2008). Reakci je nutno nejprve optimalizovat, aby nedocházelo k nespecifické hybridizaci primerů a amplifikaci nespecifických DNA fragmentů. Využití PCR v molekulární diagnostice může být založeno na použití druhově nebo rodově specifických primerů, které umožní amplifikaci žádaného fragmentu DNA jedině v případě, že templátová DNA patří danému druhu/rodu. Takovým způsobem je například možné identifikovat sedm druhů hlístic patřících do rodu *Longidorus* a *Paralongidorus* (Hübschen *et al.*, 2004), anebo čtyři druhy rodu *Xiphinema* (Wang *et al.*, 2002).

K amplifikaci náhodných částí DNA se využívá metoda náhodné amplifikace polymorfní DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA - RAPD), založená na principu PCR. Mezi její výhody patří využívání krátkého náhodně vytvořeného primeru, není tedy třeba znát cílovou sekvenci DNA. Primery mají délku asi 10 nukleotidů a při zvolení nižší teploty hybridizace mají schopnost nasedat na různá místa genomové DNA. Díky tomu dochází k amplifikaci směsi fragmentů o různých velikostech (Lynch a Milligan, 1994). Fragmenty DNA můžeme vizualizovat

v agarosovém gelu po proběhnutí elektroforézy, kdy se v elektrickém poli dělí dle své velikosti. Při metodě RAPD dochází k amplifikaci různě velkých fragmentů DNA, které tvoří profil, který může být druhově/rodově specifický, a u zkoumaných vzorků lze pak určit jejich vzájemné genetické vztahy (Vieira *et al.*, 2007). Tato metoda byla použita například při studiu genetických vztahů u tří druhů rodu *Bursaphelenchus* (Irdani, 2000). Jednoduchost této metody ji dělá ideální pro genetické mapování, ale nevýhodou je její citlivost na teplotní podmínky v termocykleru, což ji činí méně opakovatelnou a nízko reprodukovatelnou (Stock, 2009).

Metoda založená na použití restrikčních endonukleas se nazývá polymorfismus délký restrikčních fragmentů (Restriction fragment length polymorphism - RFLP). Jejím principem je štěpení amplifikovaných fragmentů DNA pomocí restrikčních endonukleas, kdy jsou všechny vzorky štěpeny stejnými restrikčními endonukleasami. Podle obsahu restrikčních míst v sekvenci DNA vzniknou fragmenty lišící se velikostí. Různý počet restrikčních míst je dán sekvencí štěpené DNA, a může být například druhově specifický (Patrelle *et al.*, 2014). Metoda RFLP byla použita pro identifikaci 44 druhů hlístic z rodu *Bursaphelenchus* (Burgermeister *et al.*, 2009).

Vlivem technologického pokroku je v současné době velice populární, a dá se říct i nevyhnutelné, sekvencování DNA, které umožňuje přečtení přesného pořadí nukleotidů v molekule DNA. Technologie sekvencování se v průběhu času zjednodušila a také zlevnila kvůli používání automatických sekvenátorů (Shendure a Ji. 2008). Sekvencování je klíčovou metodou pro v současné době populární tzv. DNA-barcoding (Obr. 8). DNA-barcoding využívá krátkou DNA sekvenci zvanou DNA-barcod, sloužící jako jedinečný identifikátor – marker pro různé organismy. Jako perspektivní DNA-barcod může sloužit 600 bazí dlouhá sekvence mitochondriální cytochrom c oxidasy I (*COI*), která může poskytnout dostatek informací pro určení totožnosti různých živočichů (Hebert *et al.*, 2003). Sekvence barcodů jsou shromažďovány do databází (Obr. 8), přičemž v současné době existují dvě takové databáze, a to Barcode of Life Database (BOLD) a The International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC). Dále se sekvencování používá i pro určení nukleotidové sekvence jiných markerů, jako jsou výše uváděné LSU, SSU nebo ITS. Nukleotidové sekvence jsou sdružované do databází, jako je například GenBank na stránkách NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), ve kterých lze vyhledávat sekvenci homologickou k sekvenci zadané.



Obr. 8 Princip DNA-barcodingu. DNA vzorků se zpracuje a sekvencuje, získaná data se uspořádají a obdržené sekvence barcodů se vloží do veřejné databáze (upraveno dle [www.barcodeoflife.org](http://www.barcodeoflife.org)).

Pro co nejpreciznější fylogenetickou identifikaci je vhodné kombinovat informace získané studiem více markerů a doplnit je také s taxonomií (Peat *et al*, 2009).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Biologický materiál

Při práci byly k amplifikaci cílového fragmentu použity hlístice, které byly morfologicky zařazené do rodu *Bursaphelenchus*, *Laimaphelenchus*, *Macrolaimus* a *Tylaphelenchus* (Mendelova univerzita v Brně, Ústav ochrany lesů a myslivosti, Brno). Dále byly využity chemicky kompetentní buňky *Escherichia Coli* TOP10 (*E.coli*) (NEB, Velká Británie).

#### 3.1.2 Chemikálie

- 1 Kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)
- 5x Flexi pufr (Promega, USA)
- 5x Phusion HF (High-Fidelity) pufr (NEB, Velká Británie)
- 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific, USA)
- 10x CutSmart pufr (NEB, Velká Británie)
- 10x EcoRI pufr (NEB, Velká Británie)
- Agar (Himedia, Indie)
- Agarosa (Amresco, USA)
- Amplicilin (Sigma-Aldrich, USA)
- dNTPs 10mM (BioRad, USA)
- DMSO (Duchefa, Nizozemsko)
- EDTA (Penta, Česká republika)
- EcoRI restriční endonukleasa (NEB, Velká Británie)
- Ethanol (Lach-ner, Česká republika)
- Ethidium bromid (NeoLab, Německo)
- Glukosa (Lach-ner, Česká republika)
- GoTaq DNA Polymerasa (Promega, USA)
- Hydroxid sodný (Penta, Česká republika)
- Chlorid draselný (Lach-ner, Česká republika)
- Chlorid hořečnatý (Finnzymes, Finsko)

- Chlorid sodný (Lach-ner, Česká republika)
- IPTG (Duchefa, Nizozemsko)
- Isopropanol (MACH, Česká republika)
- Kanamycin (Duchefa, Nizozemsko)
- Kvasinkový extrakt (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina octová (Lach-ner, Česká republika)
- Nuclease-free voda (Qiagen, Německo)
- Octan draselný (Penta, Česká republika)
- Phusion HF DNA Polymerasa (NEB, Velká Británie)
- Proteinasa K (Macherey-Nagel, Německo)
- RNasa (Top-Bio, USA)
- SDS (Penta, Česká republika)
- Tris (Duchefa, Nizozemsko)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypton (Duchefa, Nizozemsko)
- X-gal (Duchefa, Nizozemsko)

**Sekvence použitých primerů (Sigma-Aldrich, USA):**

D2A            5' - ACAAGTACCGTGAGGGAAAGT - 3'  
D3B            5' - TGCGAAGGAACCAGCTACTA - 3'  
JB3            5' - TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT - 3'  
JB4            5' - TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG - 3'

**3.1.3 Roztoky a média**

- 1% agarosový gel: 1 g agarosy, 100 ml TAE pufu
- Extrakční pufr: 10 mM Tris-HCl (pH = 8,8), 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 (v/v), autoklávováno a přidáno 100 µg/ml proteinasy K
- LB médium (1 L): 10 g trypton, 10 g NaCl, 5 g kvasinkový extrakt, pH = 7,0, autoklávováno
- LB agar (1 L): 10 g trypton, 10 g NaCl, 5 g kvasinkový extrakt, 15 g agar, pH = 7,0, autoklávováno
- P1 roztok (250 mL): 1,51 g Tris-HCl, 0,93 g EDTA-NA<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH = 8,0, po autoklávování a ochlazení přidáno 200 µl RNasy do 50 ml roztoku

- P2 roztok (250 mL): 2 g NaOH, 2,5 g SDS, autoklávováno
- P3 roztok (250 mL): 73,6 g CH<sub>3</sub>COOK, pH = 5,5, autoklávováno
- SOC médium (1 L): 20 g trypton, 5 g kvasinkový extrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 250 mmol.l<sup>-1</sup> KCl, pH = 7,0, po autoklávování přidáno 5 ml 2 mol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 20 ml 1 mol.l<sup>-1</sup> glukosy
- TAE pufr 50x (1 L): 242 g Tris-acetát, 57,1 ml CH<sub>3</sub>COOH, 100 ml 0,5 mol.l<sup>-1</sup> EDTA (pH = 8,0)

### 3.1.4 Kity a návody

- Qiagen PCR Cloning Kit (Qiagen, Německo)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo)
- Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, Německo)

### 3.1.5 Přístroje

- Centrifuga SCANSPEED 1730R (LaboGene, Nizozemsko)
- Digestor (MERCİ, Česká republika)
- Elektroforetická komůrka (Biometra, Německo)
- Flowbox (MERCİ, Česká republika)
- Inkubátor (Memmert, Německo)
- Inkubátor Cool-Hotter Dry (Major Science, USA)
- Mikrocentrifuga Eppendorf Microcentrifuge 5417R (Eppendorf, Německo)
- Nanodrop Lite Spectrophotometr (Thermo Scientific, USA)
- PC se softwarem Image Lab<sup>TM</sup> (BIO-RAD, USA), MEGA 6.0 (MegaSoftware, USA), Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems, USA)
- Termoblok (BIOER, Čína)
- Termocykler gradient T (Biometra, Německo)
- Termocykler personal T (Biometra, Německo)
- Třepačka inkubovaná Unimax 1010 (Heidolph, Německo)
- UV transiluminátor (Vilber Lourmat, Francie)
- Vortex (Labnet, USA)
- Zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra, Německo)



## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava vzorků pro polymerázovou řetězovou reakci

Vzhledem k jednoduché stavbě těla hlístic nebylo potřeba izolovat DNA složitými postupy. DNA byla získána dle Čermák *et al.* (2014). Vzorky hlístic, umístěny ve 20 µl extrakčního pufru, byly v 1,5 ml zkumavce rozdrobeny mikrotloučkem. Extrakční pufr obsahoval 1% Trition X-100 k rozrušení cytoplazmatické membrány a proteinasu K, jejímž cílem byla lýze proteinů a štěpení endonukleas, čímž došlo k ochraně uvolněné nukleové kyseliny před degradací. Vzorky byly inkubovány při 55 °C po dobu jedné hodiny, následně při 95 °C 10 minut a poté vloženy do ledu. Takto připravená směs byla zmrazena na -20 °C a přichystána jako templátová DNA pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR).

### 3.2.2 Polymerázová řetězová reakce

PCR byla provedena k amplifikaci vybraných fragmentů DNA, specifických molekulárních markerů, za účelem klonování do vektoru *pDrive*. Pro úsek jaderného genomu, konkrétně oblast LSU, byly použity primery D2A a D3B, pro mitochondriální gen *COI* primery JB3 a JB4. Aby byl amplifikovaný úsek DNA přesnou kopií sekvence templátové DNA, byla použita Phusion Polymerasa, která vykazuje 3' → 5' exonukleasovou aktivitu, ale vytváří tupé konce. Z toho důvodu byla v případě navazujícího TA klonování, před závěrečnou elongací, přidána GoTaq Polymerasa (0,5 µl na 50 µ reakce) pro získání 3' poly A konce. Složení jednotlivých reakčních směsí (Tab. 2) se lišilo pouze v přidávaných primerech. Nastavení podmínek v termocykleru se po optimalizaci reakcí v rámci *COI* nelišilo (Tab. 3), u LSU se program mírně lišil, a to nejen teplotou hybridizačního kroku, ale i počty cyklů (Tab. 4).

Tab. 2 Složení reakčních směsí pro PCR

Složka	Objem [µl]	Finální koncentrace
H <sub>2</sub> O	32,7	
5x HF pufr	10	1x
Fw primer (10 µmol.l <sup>-1</sup> )	2	0,4 µmol.l <sup>-1</sup>
Rev primer (10 µmol.l <sup>-1</sup> )	2	0,4 µmol.l <sup>-1</sup>
dNTPs (10 mmol.l <sup>-1</sup> )	1	0,2 mmol.l <sup>-1</sup>
DNA templát	2	
Phusion polymerasa	0,3	0,6 U
Celkový objem	50	

Tab. 3 Program pro PCR (COI)

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Opakování
1. Počáteční denaturace	98	30	1
2. Denaturace	98	10	40
3. Hybridizace	41	90	
4. Elongace	72	30	
5. Závěrečná elongace	72	600	1

Tab. 4 Program pro PCR (LSU)

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Opakování
1. Počáteční denaturace	98	30	1
2. Denaturace	98	10	35/30/33
3. Hybridizace	55/56/57	30	
4. Elongace	72	30	
5. Závěrečná elongace	72	600	1

### 3.2.3 Purifikace PCR produktu

PCR produkt byl purifikován pomocí kitu Wizard SV Gel and PCR Clean-up System. K PCR produktu byl přidán stejný objem roztoku “Membrane Binding Solution”. Směs byla přepipetována do kolonky umístěné ve 2 ml zkumavce, následovala inkubace po dobu 1 min a centrifugace 1 min. Roztok, který protekl kolonkou, byl odstraněn a kolonka byla vrácena do zkumavky. Na membránu bylo nepipetováno 700  $\mu$ l roztoku “Membrane Wash Solution”, následovala centrifugace 1 min. Proteklý roztok byl odstraněn a kolonka byla promyta 500  $\mu$ l roztoku “Membrane Wash Solution”, následovala centrifugace 5 min. Po odstranění proteklého roztoku byla prázdná kolonka se zkumavkou centrifugována 1 min. Kolonka byla poté přemístěna do nové 1,5 ml zkumavky a přímo na membránu bylo napipetováno 15  $\mu$ l vody, aby došlo k eluci DNA. Vzorek byl inkubován 1 min a poté 1 min centrifugován. Všechny centrifugace probíhaly při 14 000 rpm a laboratorní teplotě.

### 3.2.4 Klonování vybraných fragmentů DNA do *pDrive* vektoru

Pro klonování vybraných fragmentů DNA, které obsahovaly 3' poly A konce, do *pDrive* vektoru, který je založen na principu TA klonování, byl použit Qiagen PCR Cloning Kit. Ligační směs (Tab. 5) byla inkubována přes noc při 16 °C v termobloku. Ligasa byla poté inaktivována inkubací při 70 °C po dobu 10 min.

Tab. 5 Složení ligační směsi pro *pDrive* vektor

Složka	Objem [μl]	Finální koncentrace
2x ligační směs	5	1x
DNA insert	4	
<i>pDrive</i> vektor	1	50 ng
Celkový objem	10	

### 3.2.5 Transformace bakteriálních buněk *E. coli*

Ligační směs byla pomocí tepelného šoku transformována do chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10. Buňky byly nejdříve rozmrazeny na ledu, a poté bylo k 50 μl buněk napipetováno 5 μl ligační směsi a tato směs byla inkubována na ledu po dobu 30 min. Po uplynutí této doby byly buňky s ligační směsí inkubovány při 42 °C 30 s a následovně přeloženy do ledu na 5 min. Pak bylo k buňkám přidáno 500 μl SOC média, ve kterém byly inkubovány na třepačce při 180 rpm po dobu 1 h při 37 °C.

Vzhledem k tomu, že vektor *pDrive* obsahuje gen *lacZ*, je možné selektovat kolonie *E. coli* na základě systému modrobílé selekce. Gen *lacZ* kóduje β-galaktosidasu, enzym štěpící glykosidickou vazbu v bezbarvém substrátu X-Gal na modrý produkt. Pokud je do vektoru úspěšně vložena cizí DNA, gen *lacZ* je narušen, a *E. coli* tak nemůže produkovat β-galaktosidasu, kolonie jsou proto bílé. IPTG se využívá jako induktor exprese *lacZ* genu. Z toho důvody byly transformované buňky kultivovány na petriho miskách s LB agarem, který obsahoval antibiotikum ampicilin (100 μgml<sup>-1</sup>), IPTG (50 μgml<sup>-1</sup>) a X-gal (80 μgml<sup>-1</sup>). Ve flowboxu bylo na misky za použití sterilní hokejky rozetřeno 50 μl nebo 100 μl transformovaných buněk. Poté byly misky obaleny parafilmem a inkubovány dnem vzhůru při 37 °C přes noc.

Další den byly bílé kolonie, pravděpodobně obsahující insert, přeočkovány pomocí sterilního párátko do 2 ml tekutého LB média, které obsahovalo ampicilin (100 μgml<sup>-1</sup>). Bakterie byly poté kultivovány přes noc na třepačce při 37 °C a 200 rpm.

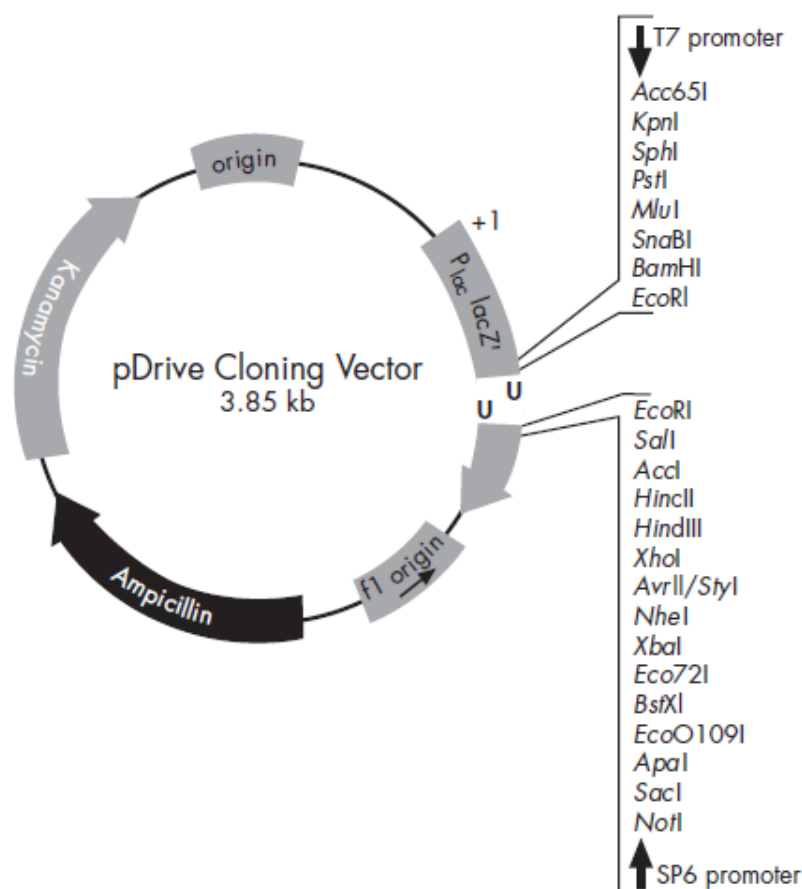
### 3.2.6 Izolace plasmidové DNA alkalickou lyzí

1,5 ml bakteriální kultury bylo centrifugováno 1 min při laboratorní teplotě, aby došlo k separaci buněk od média. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován ve 300 μl P1 roztoku. Poté bylo k roztoku přidáno 300 μl lyzačního roztoku P2, směs byla promíchána převrácením zkumavky 6x. Po 5 min inkubaci bylo přidáno 300 μl P3 roztoku, který sráží jadernou DNA a proteiny, a směs byla opět promíchána otočením zkumavky 6x. Po 5 min inkubaci na ledu následovala centrifugace 10 min při 4 °C.

Supernatant, který obsahoval plasmidovou DNA, byl přepipetován do čisté 1,5 ml zkumavky. K supernatantu bylo za účelem sražení plasmidové DNA napipetováno 600  $\mu$ l isopropanolu a směs byla promíchána převrácením zkumavky. Po 30 min centrifugaci při laboratorní teplotě byl isopropanol opatrně odstraněn a k peletu bylo přidáno 500  $\mu$ l 70% ethanolu (- 20 °C). Po 5 min centrifugaci při laboratorní teplotě byl ethanol odstraněn. K peletu bylo opět přidáno 500  $\mu$ l 70% ethanolu (- 20 °C), který byl po 5 min centrifugaci při laboratorní teplotě odstraněn pipetováním. Zkumavka byla ve flowboxu ponechána otevřená, aby došlo k odpaření zbylého ethanolu. Pelet obsahující plasmidovou DNA byl resuspendován ve 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Všechny centrifugace probíhaly při 13 000 rpm.

### 3.2.7 Restrikce plasmidové DNA enzymem *EcoRI*

Restrikce byla provedena za účelem ověření přítomnosti DNA insertu v *pDrive* plasmidu (Obr. 9). Restrikční směs (Tab. 6) byla inkubována přes noc při 37 °C.



Obr. 9 Mapa *pDrive* klonovacího vektoru (www.qiagen.com).

Tab. 6 Složení restrikční směsi s endonukleasou *EcoRI*

Složka	Objem [μl]	Finální koncentrace
10x <i>EcoRI</i> pufr	2	1x
<i>EcoRI</i> enzym	0,1	1 U
H <sub>2</sub> O	16,9	
Plasmidová DNA	1	
Celkový objem	20	

### 3.2.8 Elektroforetická separace DNA

Všechny PCR reakce a restrikce byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy. Do 100 ml 1% agarosového gelu bylo napipetováno 10 μl 0,5% ethidium bromidu a do gelu byl umístěn hřebínek k vytvoření jamek. Po zatuhnutí byl gel vložen do horizontální elektroforetické komůrky, hřebínek byl odstraněn a komůrka byla zaplněna TAE pufrem tak, aby byl gel ponořen.

Ke vzorku byl napipetován vzorkovací pufr 6x DNA Loading Dye v celkové koncentraci 1x a poté byl vzorek přenesen do jamek v gelu. Jako standard byl použit 1 Kb plus DNA Ladder. Elektroforetická komůrka byla uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza probíhala při napětí 120 V po dobu přibližně 30 min. Poté byl gel vyfocen pomocí dokumentačního softwaru Image Lab<sup>TM</sup>.

### 3.2.9 „Colony“ PCR

Pro ověření přítomnosti DNA insertu v *pDrive* plasmidu byla použita i metoda „colony“ PCR. Nastavení programu v termocykleru (Tab. 7) se lišilo hybridizační teplotou a počty cyklů dle testovaného vzorku. Do premixu (Tab. 8) byly, místo templátové DNA, pomocí sterilní špičky přeneseny vybrané kolonie z LB agarové plotny.

Tab. 7 Program pro „colony“ PCR (LSU)

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Opakování
1. Počáteční denaturace	95	180	1
2. Denaturace	95	30	35/30/33
3. Hybridizace	55/56/57	30	
4. Elongace	72	60	
5. Závěrečná elongace	72	600	1

Tab. 8 Složení reakční směsi pro „colony“ PCR

Složka	Objem [ $\mu$ l]	Finální koncentrace
H <sub>2</sub> O	8,18	
5x Flexi pufr	2,5	1x
D2A primer (10 $\mu$ mol.l <sup>-1</sup> )	0,25	0,2 $\mu$ mol.l <sup>-1</sup>
D3B primer (10 $\mu$ mol.l <sup>-1</sup> )	0,25	0,2 $\mu$ mol.l <sup>-1</sup>
dNTPs (10 mmol.l <sup>-1</sup> )	0,25	0,2 mmol.l <sup>-1</sup>
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol.l <sup>-1</sup> )	1	2 mmol.l <sup>-1</sup>
GoTaq polymerasa	0,07	0,35 U
Celkový objem	12,5	

### 3.2.10 Izolace plasmidové DNA pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep

#### Kit

Po potvrzení přítomnosti DNA insertu v *pDrive* plasmidu byla takto ověřená pozitivní kolonie přeočkována z LB agarové plotny do 3 ml LB tekutého média obsahujícího ampicilin (100  $\mu$ gml<sup>-1</sup>). Kultura byla inkubována na třepačce při 37 °C a 200 rpm přes noc. Na druhý den byla plasmidová DNA, určená pro sekvencování, izolována pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep Kit. 3 ml bakteriální kultury byly postupně centrifugovány v 2 ml zkumavce. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován ve 250  $\mu$ l P1 pufru. Poté bylo přidáno 250  $\mu$ l P2 pufru, směs byla promíchána převrácením zkumavky 6x. Dále bylo přidáno 250  $\mu$ l N3 pufru, směs byla opět promíchána převrácením zkumavek 6x. Po 10 min centrifugaci byl supernatant přepipetován do kolonky a centrifugován 1 min. Směs, která protekla kolonkou, byla odstraněna, poté bylo na kolonku napipetováno 500  $\mu$ l PB pufru a následovala centrifugace 1 min. Směs, která protekla, byla opět odstraněna. Na kolonku bylo napipetováno 750  $\mu$ l PE pufru a kolonka byla centrifugována 1 min. Proteklá směs byla odstraněna a pro úplné odstranění promývacího pufru byla prázdná kolonka opětovně centrifugována 1 min. Pak byla kolonka přenesena do čisté 1,5 ml zkumavky a přímo na membránu bylo napipetováno 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Po 1 min inkubaci byla zkumavka centrifugována 1 min a kolonka byla odstraněna, proteklý roztok obsahoval plasmidovou DNA. Všechny centrifugace probíhaly při laboratorní teplotě a při 13 000 rpm. Koncentrace DNA byla změřena pomocí Nanodropu.

Plasmidová DNA byla poslána firmě SEQme s.r.o. (Dobříš, Česká republika), kde proběhlo sekvencování za pomoci univerzálních primerů M13 forward a M13 reverse.

### 3.2.11 Zpracování sekvencí plasmidů

Sekvence, zasláné firmou SEQme s.r.o., byly zkontrolovány a upraveny v programech Sequence Scanner v1.0 ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)) a MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Každý vzorek byl sekvencován dvakrát, a to jednou pomocí univerzálního M13 „forward“, a jednou pomocí univerzálního M13 „reverse“ primeru. Jelikož jsou začátky a konce sekvencí nekvalitní, byly v programu Sequence Scanner v1.0 ořezány. Poté byla celá výsledná sekvence po jednotlivých nukleotidech zkontrolována s histogramem dané sekvence. Upravené sekvence byly překopírovány do programu MEGA 6.0, ve kterém byl proveden reverzní komplement sekvence sekvencované pomocí M13 „reverse“ primeru, a tak byly obě dvě sekvence zarovnané pomocí algoritmu ClustalW. Poté byly k zarovnané sekvenci stejným způsobem postupně zarovnané sekvence obou specifických primerů, z toho jeden byl ve formě reverzního komplementu, a to podle toho, jakým směrem byl DNA insert do vektoru zaklonován. Zarovnané sekvence specifických primerů ohraničovaly DNA insert vložený do *pDrive* plasmidu. Konečná sekvence byla získána odstraněním sekvencí specifických primerů a plasmidu z obou stran.

Takto zpracované sekvence byly použity pro hledání homologních sekvencí v nukleotidové databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) pomocí programu BLAST (Altschul *et al.*, 1990, dostupného na stránkách <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlístice patří mezi nejpočetnější skupiny organismů, které se nachází prakticky všude na zemi - od zemské půdy, přes řeky, až po moře (Baldwin *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2016). Volně žijící druhy se v přírodě podílejí na transformaci organického materiálu na minerály a živiny (Ingham *et al.*, 1985). Parazitické druhy způsobují řadu nemocí a ovlivňují zejména hospodářské výnosy (Jones *et al.*, 2013). K jejich studiu se využívá jak morfologických znaků, které mohou být typické pro určité druhy hlístic, tak molekulárních metod, které jsou v nepřetržitém vývoji, a jejich cílem je zkonstruovat protokoly pro přesnou a rychlou identifikaci všech druhů hlístic (Powers, 2004). V této bakalářské práci bylo cílem zjistit sekvence jaderného úseku LSU a mitochondriálního genu *COI* u vybraných druhů hlístic, které již byly morfologicky zařazeny do určitých rodů, aby je bylo možné zařadit molekulárně a studovat jejich fylogenezi.

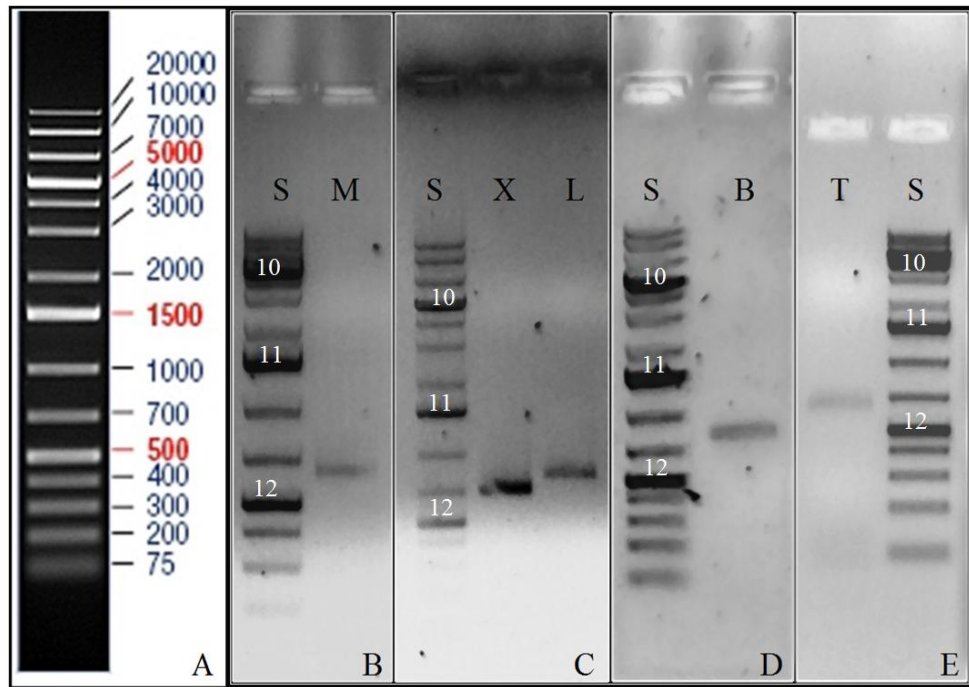
### 4.1 Amplifikace fragmentů DNA a jejich klonování do *pDrive* vektoru

Po optimalizaci PCR byly amplifikovány fragmenty DNA hlístic rodu *Bursaphelenchus* (B), *Laimaphelenchus* (X, L), *Macrolaimus* (M) a *Tylaphelenchus* (T) z jaderné oblasti LSU a mitochondriálního genu *COI* (3.2.2). Pro potvrzení amplifikace žádaného fragmentu byla provedena agarosová elektroforéza (3.2.8) (Obr. 10, 11). Velikost LSU fragmentů byla přibližně 700 bp pro vzorky M, X, a T, a 800 bp pro vzorky L a B (782 bp podle Čermák *et al.*, 2014). Z velikostí fragmentů vzorků X a L rodu *Laimaphelenchus* je zřejmé, že se jedná o dva rozdílné druhy (Obr. 10). Velikost amplifikovaného fragmentu genu *COI* byla přibližně 500 bp pro vzorek M a 400 bp pro vzorky X a T. Amplifikace *COI* fragmentů vzorků B a L prováděna nebyla. PCR produkty byly purifikovány (3.2.3) a na základě TA klonování vloženy do *pDrive* vektoru (3.2.4).

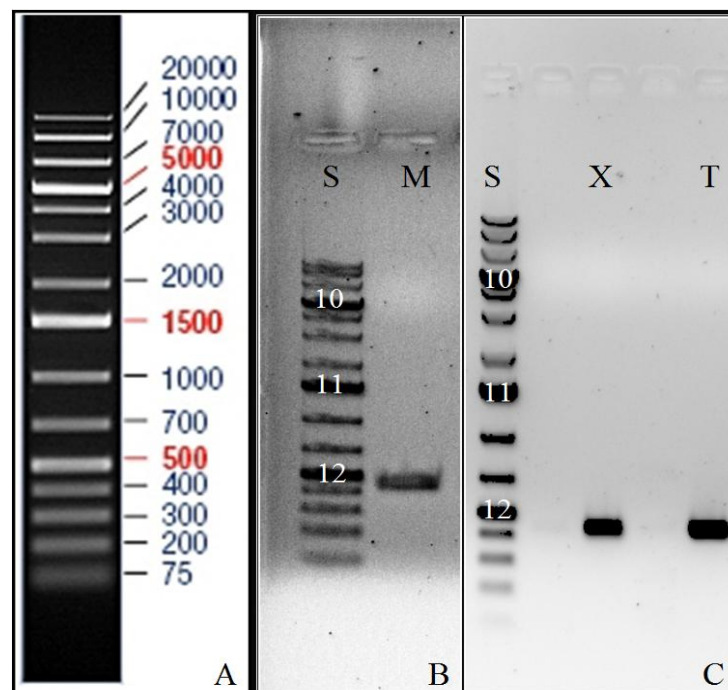
### 4.2 Ověření přítomnosti fragmentů v *pDrive* vektoru

Plasmidy s insertem byly transformovány do chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10 pomocí tepelného šoku. Pravděpodobně pozitivní kolonie byly odlišeny od negativních kolonií za využití principu modrobílé selekce (3.2.5), a byly přeočkovány do tekutého LB média s ampicilinem. Z tekuté kultury byla izolována plasmidová DNA (3.2.6), která byla následně štěpena pomocí restriční endonukleasy *EcoRI* (3.2.7).





Obr. 10 Elektroforetogram amplifikovaných fragmentů DNA. A: 1 kb plus DNA Ladder, B – E: fragmenty DNA jaderné oblasti markeru LSU u vzorků B: *Macrolaimus* (M), C: *Laimaphelenchus* (X, L), D: *Bursaphelenchus* (B) a E: *Tylaphelenchus* (T), S: standard (1 kb plus DNA Ladder). Velikost označených fragmentů ve standardu: 10 - 5000 bp, 11 - 1500 bp a 12 - 500 bp).



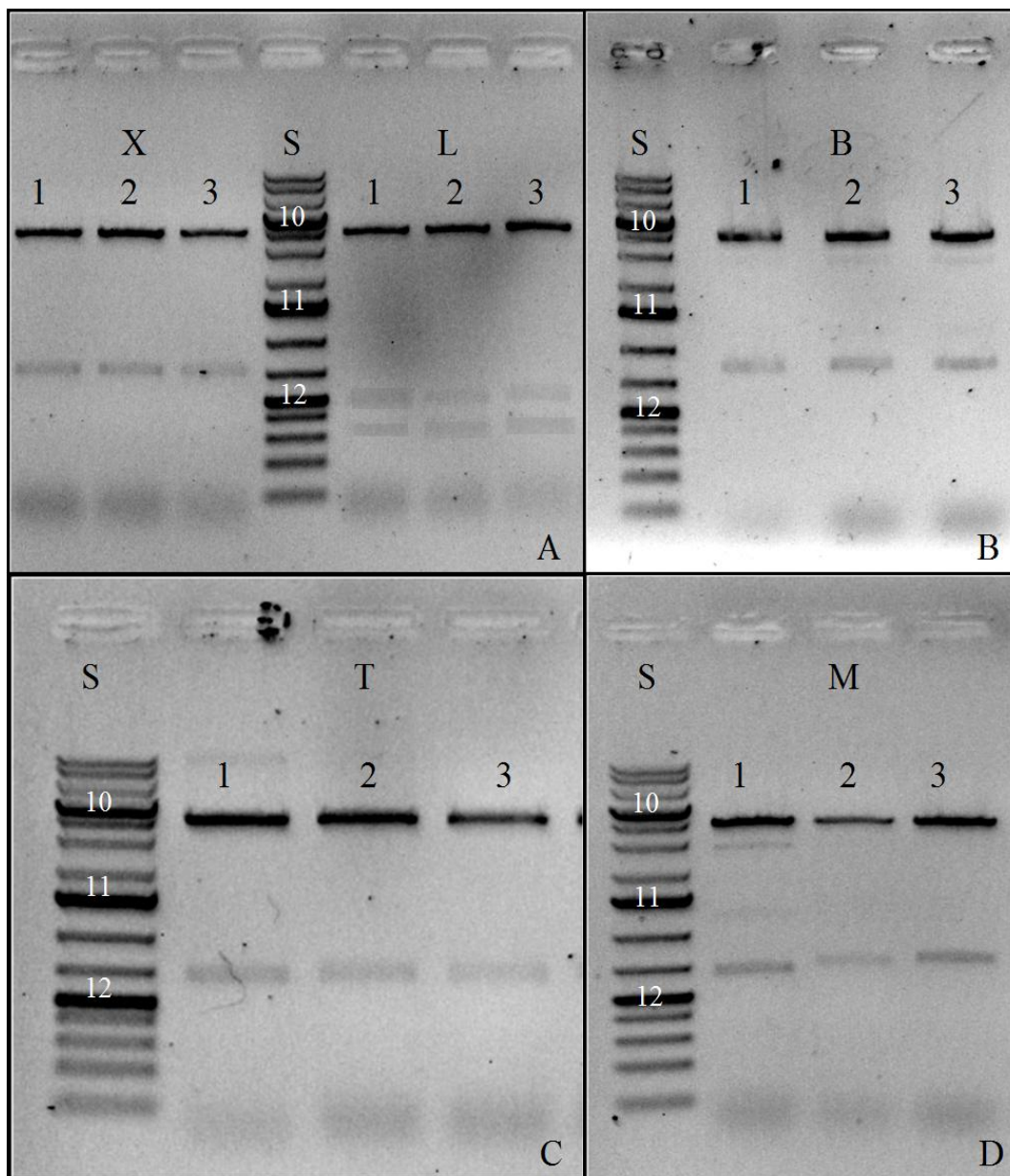
Obr. 11 Elektroforetogram amplifikovaných fragmentů DNA. A: 1 kb plus DNA Ladder, B – C: fragmenty DNA mitochondriální oblasti markeru *COI* vzorků B: *Macrolaimus* (M), C: *Laimaphelenchus* (X) a *Tylaphelenchus* (T), S: standard (1 kb plus DNA Ladder). Velikost označených fragmentů ve standardu: 10 - 5000 bp, 11 - 1500 bp a 12 - 500 bp).

Přítomnost konkrétního fragmentu v *pDrive* vektoru byla potvrzena elektroforézou v agarosovém gelu (3.2.8). Enzym *EcoRI* rozpoznává palindromovou sekvenci v plasmidu *pDrive*, v mnohočetném klonovacím místě, která se nachází na obou koncích původně lineárního plasmidu. Vložený DNA insert by se měl nacházet mezi dvěma restrikčními místy pro tento enzym, a proto bychom na elektroforetogramu rozštěpeného plasmidu měli pozorovat fragment linearizovaného *pDrive* vektoru o velikosti 3851 bp a vložený fragment DNA o stejné velikosti, jako měl vložený insert. V případě, že by insert obsahoval restrikční místo pro *EcoRI*, pozorovali bychom na elektroforetogramu kromě linearizovaného vektoru více fragmentů, přičemž součet jejich velikostí by měl být stejný jako velikost insertu.

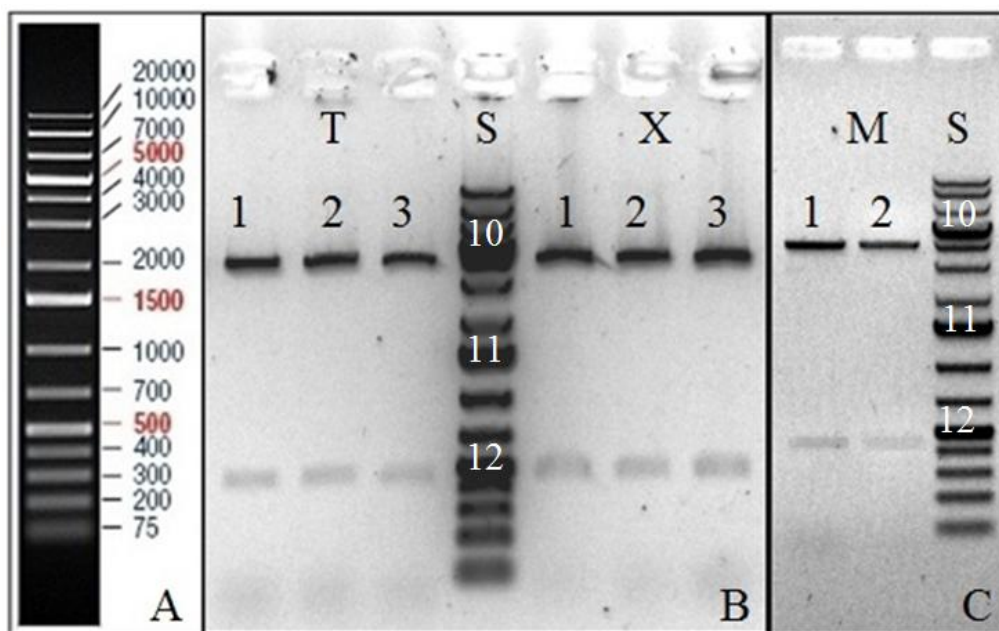
V *COI* sekvencích vzorků T, X a M, stejně tak jako v LSU sekvencích vzorků B, T a M na elektroforetogramu (Obr. 12 a 13) pozorujeme fragment linearizovaného plasmidu o přibližné velikosti 4000 bp a fragmenty odpovídající daným insertům, přičemž v sekvenci těchto insertů se nenacházelo restrikční místo pro *EcoRI*. V případě LSU sekvence vzorku L na elektroforetogramu pozorujeme (Obr. 12), kromě fragmentu linearizovaného vektoru, dva fragmenty, jejichž součet je přibližně 800 bp a odpovídá velikosti insertu, a to znamená, že sekvence insertu obsahovala restrikční místo pro použitý enzym.

V případě, že byla přítomnost insertu v *pDrive* plasmidu potvrzena (Obr. 12 a 13), byla jedna pozitivní kolonie opětovně kultivována v tekuté kultuře, plasmidová DNA byla izolovaná kitem a poslaná k sekvencování (3.2.10).

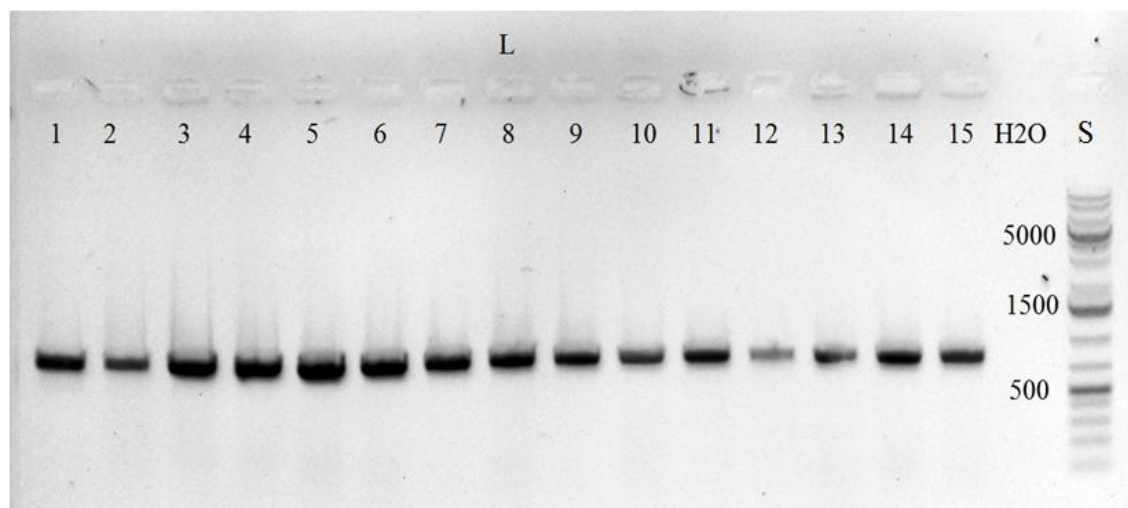
Vzhledem k tomu, že viditelnost požadovaných fragmentů po štěpení plasmidové DNA nebyla vždy uspokojivá, a že restrikční enzym nebyl vždy aktivní (byl pak nahrazen novým), byla v některých případech k ověření přítomnosti DNA insertu ve vektoru použita také metoda „colony“ PCR (Obr. 14) (3.2.9). Výsledek „colony“ PCR byl poté potvrzen i opětovnou restrikcí.



Obr. 12 Elektroforetogram restrikční analýzy rozštěpeného *pDrive* plasmidu s LSU inserty. A: rozštěpená plasmidová DNA vzorku *Laimaphelenchus* (X) extrahovaná z kolonií 1-3 a vzorku *Laimaphelenchus* (L) extrahovaná z kolonií 1-3, B: rozštěpená plasmidová DNA vzorku *Bursaphelenchus* (B) extrahovaná z kolonií 1-3, C: rozštěpená plasmidová DNA vzorku *Tylaphelenchus* (T) extrahovaná z kolonií 1-3, D: rozštěpená plasmidová DNA vzorku *Macrolaimus* (M) extrahovaná z kolonií 1-3, S: standard - 1 kb plus DNA Ladder. Velikost fragmentu *pDrive* vektoru: 3851 bp. Velikost označených fragmentů ve standardu: 10 - 5000 bp, 11 - 1500 bp a 12 - 500 bp).



Obr. 13 Elektroforetogram restrikční analýzy rozštěpeného *pDrive* plasmidu s *COI* inserty. A: 1 kb plus DNA Ladder, B: rozštěpená plasmidová DNA vzorku *Tylyphelenchus* (T) extrahovaná z kolonií 1-3 a vzorku *Laimaphelenchus* (X) extrahovaná z kolonií 1-3, C: rozštěpená plasmidová DNA vzorku *Macrolaimus* (M) extrahovaná z kolonií 1-2, S: standard - 1 kb plus DNA Ladder. Velikost fragmentu *pDrive* vektoru: 3851 bp. Velikost označených fragmentů ve standardu: 10 - 5000 bp, 11 - 1500 bp a 12 - 500 bp).



Obr. 14 Elektroforetogram vybraných kolonií po provedení „colony“ PCR z oblasti LSU. 1-15: kolonie bakterií vzorku L (*Laimaphelenchus*). H<sub>2</sub>O: negativní kontrola. S - standard (1 kb plus DNA Ladder s vyznačením velikostí vybraných fragmentů v bp).

### 4.3 Úprava sekvencí a jejich srovnávání se sekvencemi nacházejícími se v databázi NCBI

Finální sekvence (Obr. 15) byly získány úpravou sekvencí zaslanych firmou SEQme s.r.o. a bylo zkontrolováno, zda jejich velikost souhlasí s přibližnou velikostí fragmentů v elektroforetogramech. Celkem byly upravovány sekvence pro osm fragmentů, a to fragmenty vzorků T, X a M z mitochondriálního genu *COI* a vzorků X, L, B, T a M z jaderné oblasti LSU. Z toho se jedna (T-LSU) neshodovala velikostí s fragmentem na elektroforetogramu. Přibližná velikost tohoto fragmentu byla podle elektroforézy 700 bp, ale sekvencovaný fragment měl velikost 585 bp.

>B-LSU

```
TGAAAAGTACTTTGAAAAGAGAGTGCAAAAAGAACGCGAAACCGGTGTAATGGAAGCATATGG
AGTTGTCTGATCTGGTGTGTGTTTCAGCTGTCGGGCGTGCCGATTGCTGGGTTTGGCATTCCG
CAAGGTTGTCGGCTCGGTATTGTCGGTGGGTTTCGGCGGTGCATTACACGCACGGAGTGCGCCG
AGTCGCGTGGCGCTGTCGATCGAAGCGCGTTAAGAGGACTTGTCTTCGGGCGAGAACCCTTG
GCGTGTGTAGGTTCGGTGGTGTGCTGCGTGATTTTCGTGGAGGCACGGGCTTGTGCGCTGTCAG
GCGGCGATTGTAGTGGTTCGCGTTGGACACATGTGTACTGCGCTTATGATTGCGGTGTCGTCG
CGGGCGGTGCTCTGTGCTCTTCTCGGTGTATAGACAATGACCCATTTGACCCGTCTTGAAC
ACGGACCAAGGAGTTTATGGTATACGCGAGTCATTGGGCTTCGAAACCCATAGGCGTAATGA
AAGTGAGACCTTACTGGTTTTAATGTGATCGTTGGTGTTCGACGGCCGGCGAGCAACATT
GCCCCGTTTCGAGGACTTGTCCGTGTGCGGAGGTTGAGCGTATGCTATGAGACCCGAAAGAT
GGTGAACCTATGCCTGAGCAGGATGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAAGTCCGAAGCGGTTTC
TGACGTGCAAATCGATCGTCTGACTTTGGTATAGGGGCGCAAGACTAATCGAACCATC
```

>L-LSU

```
TGAAAAGCACCTTTGAAAAGAGAGTGCAAGAGAACGTGAAACCGACATAATGGAAACGGATGG
AGCCGACGTATCGTGATGTATTCAATTGCATCGCATTGTAAGCTGCGAGTTGTGCATTCCG
CAAGGTTGCCGGCTCGTAGTGTGCCGTGTGAGTGTAGTGCATTTGCATGCAGAGTGCGCCG
AGTGGGTTGGCCTTGCTGCTGGAAGCTTGTATAGAGGATCATACTTCGGTACGGAACCCTGT
GCTTGTGGATGGCAGATGAGGCTGACTTTCACATGTTGTGATGCTGGTGAATTCGTGGCTTT
GGTTGGTGGCTTAGTTGGCTTGTAGGTGACGCATGCGCTGCTTGTGCGTTGGGTCGTCGGCC
TTGACTACCCCGCATCAACTCGGTGTTTCAGTCGGTCACCCATTTGACCCGTCTTGAACAC
GGACCAAGGAGTTAAGGTGTACGCAAGTCATTGGGATCCTGAAACCCAAAGGCGTAATGAA
AGTGAGACACTTGGTGTCTGTGATGTGAACGGTTTTTCGTTTCGACGGTGGCTGTGCAGCATC
GCCCTATGCTTGGGACTTGTCCGTGGCGTGGAGGCTGAGCGTACGCTTTGAGACCCGAAAGAT
GGTGAACCTATGCCCGAACAGGATGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAAGTCCGAAGCGGTTTC
TGACGTGCAAATCGATCGTCTGATTTGGTATAGGGGCGCAAGACTAATCGAACCATC
```

Obr. 15 Konečné sekvence LSU a *COI* fragmentů DNA hlístic pro rody *Bursaphelenchus* (B), *Laimaphelenchus* (X, L), *Macrolaimus* (M) a *Tylaphelenchus* (T) (1. část).

>X-LSU

TGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGCAAGAGAACGTGAAACCGACATAATGGAAGCAAATGG  
AGCTGACGTATCGGGCTTGTATTCAACCGTTTAGTGTGGGATCGGTTGTTTTGGTATTCCG  
CAAGGTTGCCTGACTGCCGTTGTCCTAGCATGAAGCGGTGCATTTGCAAGCGGAGTGCGCCG  
AGTGGGTTGATTCTGCTGCTTGAAGCTTTCGAAGAGGACTCGACCGCAAGGTTGAGAACCCT  
GCGATTGTGGATGGCGGATGGGGTCGGCTCTTGTGTGATGCCTAGCATCCGACTCGGTGTTT  
AGTCAGTCACCCATTTGACCCGCTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTTTAAGGTGTACGCAAGT  
CATTGGGCTTCAAACCCAAAGGCGTAATGAAAGTGAGCTGCTTAGCGGCTGTAATGTGACC  
CGCGGTTAATTCGTTGACTACGGTGCAACATTGCCCGTGCCTAGAACTTGTCTGGCGCGG  
AGGTTGAGCGTACGCTTTGAGACCCGAAAGATGGTGAACATATGCCTGAACAGGATGAAGTCA  
GAGGAACTCTGATGGAAGTCCGAAGCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCTGATTTGGT  
ATAGGGGCGCAAGACTAATCGAACCATC

>M-LSU

GATGGTTCGATTAGTCTTTTCGCCCCTATACCCAAATTTGACGATCGATTTGCACGTCAGAAC  
CGCTGCGAGCCTCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCGCCCTATTCAGGCATAGTTCCACCATCT  
TTCGGGTCCTAACATATATGCTCTTACGCAGACCCATCCGAGAACATCAGGGCCGGTTCGATG  
GTGCTCCTTGCGGATCCCACCTGCATTTACTTTTATTACGCTCATGGGTTTTGCCACCCAAA  
ACTCGCACACATGTTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGCCACTTAAAGCCATTACG  
CCAGCATCCTAAGTGTGAAGGTGTCCGAAGACCCGCCAGAGGGCACACTGCGTTCCTTGGT  
CTACGTCGTCGTATCCTGCACAGGGCTATAACACATCCGAGGATGCCACATTCCCATGCGC  
TTCTCCGACGACACAAACCAATGCTGGCTTGCTACCGAGAAATACACCAAGCAAAGCCAGG  
CTGAGTCTCAAGCAGCATGGCTGACTTCAAGTGTTCCTTTCGACAATTTACGTAATTTT  
AACTCTCTTTCCAAAGTGCTTTTCATCTTTCCCTCACGGTACTTGTATCTGAATTCGTGAC  
AAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTAGACCACACGTGTGGGGGCCGAGCTCGCGGCCGCT  
GTATTCTATAGTGTACCTAAATGGCCGCACAATTCACTGGCCGTCGTTTT

>T-LSU

GATGGTTCGATTAGTCTTTTCGCCCCTATACCCAAATTTGACGATCGATTTGCACGTCAGAAC  
CGCTGCGAGCCTCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCGCCCTATTCAGGCATAGTTCCACCATCT  
TTCGGGTCCTAACATATATGCTCTTACTCAGACCCATCCGAGAAGTTCAGGGCCGGTTCGATG  
GTGCTCCTTGCGGATCCCACCTGTATTACTTTTATTACGCTCATGGGTTTTGCCACCCAAA  
ACTCGCACACATGTTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGCCACTTAAAGCCATTACG  
CCAGCATCCTAAGTGTGAAGGTGTCCGAAGACCCGCCAGAGGGCACACTGCGTTCCTTGGT  
CCAGGTCGTCGTATCCTGCATAAGGCTATAACACGTCCGGAGACGCTACATTCCCTATGCGC  
TTCTCCGACGACCCAAACCAATGCTGGCTTGCCACCGAGAAATACACCAAGCCAAAGGCCA  
GGCTGAGTCTCAAGCAGCATGGCTGACTTCAAGTGTTCCTTTCGACAATTTACGTAATTT  
TTAACTCTCTTTCCAAAGTGCTTTTTCA

>T-COI

TTTGATTCTTCCTGCTTTTGGTGTGTGAAGTCAGAGGGCCCTTTATTTATCGGGGAAAAAGG  
AAGTTTTTGGTAATTTGGGTATGGTTTATGCTATTTAAGAATTGGTCTTATTGGTTGTGTT  
GTCTGGGCGCACCATATGTATACTGTTGGTATAGATTTGGATTCTCGTGCATTTTTACTGC  
TGCTACTATGGTTATTGCGGTTCCCTACTGGAGTGAAGGTTTTTAGCTGGTTGGCTACTTTGT  
ATGGTGCTTCTTTTTCTTTTCAGCCTGTTCTTTACTGAATTTTGGGTTTTATTTTTTGTGTT  
ACGGTGGGTGGTCTTTCGGGTGTTATTTTGTCTAATTCCTAGCCTTGATCTCATTTTGCATGA  
TACCTATTATGTTGTTAGG

Obr. 15 Konečné sekvence LSU a COI fragmentů DNA hlístic pro rody *Bursaphelenchus* (B), *Laimaphelenchus* (X, L), *Macrolaimus* (M) a *Tylaphelenchus* (T) (2. část).

```

>M-COI
AGCAACAACATAGTAAGTGTCGTGAAAAACAATATCCAAACTAGAAATTAGATAAAAATAACAC
CTGTTAAACCACCGATAGTAAATAAAAAAATAAGACCTAAAACCCATAAAAAGCAAAGGTTGA
TATTTTCATTTTAGTGCCAAATAATGTAGCCAACCAACTAAAGACCTTAACCCCAGTTGGAAC
AGCAATAACCATAGTAGCAGCAGTAAAATAAGCAGGAGAATCCAAATCTATACCCACTGTAT
ATATATGATGAGCTCAAACCTACACAGCCAATGAGACCAATACTTAAAATAGCATAGATCATA
CCTAAAGTACCAAAAACCTCTTTTTTACCCTGTTAAAATATAGTTCTCTGACTAATAATACC
AAAAGCAGGTAAAATCAAA

>X-COI
TCTTATTTTACCAGCTTTTGGAAATTATCAGTCAAAGTACTTTGTATTTAACTGGTAAGAAAG
AGGTTTCTGGTAATTTAGGTATAGTTTATGCTATTTAAGTATTGGTCTTATTGGTTGTGTT
GTCTGAGCTCATCATATGTATACAGTTGGTATAGATCTTGATTCTCGAGCTTATTTTACTGC
TGCTACAATGGTGATTGCTGTTCCAACCTGGTGTAAAAGTCTTTTCTTGATTAGCAACTCTTT
ATGGTTCTCATTGATGAAATCTAGTGTTTTGATATGAGTTCTTGGATTTGTTTTTCTATTT
ACAATTGGAGGTCTCACTGGTGTTATTTTATCAAATCTAGTTTAGATATTATTTTACATGA
CACTTATTATGTTGTTAGT

```

Obr. 15 Konečné sekvence LSU a COI fragmentů DNA hlístic pro rody *Bursaphelenchus* (B), *Laimaphelenchus* (X, L), *Macrolaimus* (M) a *Tylaphelenchus* (T) (3. část).

K upraveným tj. finálním sekvencím daných úseků byly pomocí programu BLAST vyhledány homologní sekvence v nt (“Nucleotide”) databázi NCBI („National Center for Biotechnology Information“). Nejlepší výsledek vyhledávání pro každou sekvenci je shrnut v Tab. 9.

Tab. 9: Srovnání sekvencí hlístic se sekvencemi existujícími v databázi NCBI pomocí algoritmu BLAST

Vzorek	Nejpodobnější organismus	GenBank ID <sup>*</sup>	Pokrytí [%] <sup>†</sup>	E-hodnota <sup>‡</sup>	Shoda [%] <sup>§</sup>
T-COI	<i>Toxascaris sp.</i>	KT223040.1	99	6e-95	83
M-COI	<i>Halicephalobus gingivalis</i>	KP347444.1	97	6e-139	90
L-COI	<i>Aphelenchoides besseyi</i>	KJ739799.1	99	1e-110	85
B-LSU	<i>Bursaphelenchus rufipennis</i>	AB368530.1	99	0.0	88
L-LSU	<i>Laimaphelenchus deconincki</i>	KF998578.1	100	0.0	99
X-LSU	<i>Laimaphelenchus persicus</i>	JN006987.1	83	2e-125	89
T-LSU	<i>Malassezia globosa</i>	KT310070.1	100	0.0	99
M-LSU	<i>Malassezia</i>	KF419454.1	82	0.0	99

\* identifikační kód nalezené sekvence

† procentuální zarovnání zadané sekvence s nalezenou sekvencí

‡ kolikrát je možné nalezení zarovnání se stejným skóre, jako mají navzájem porovnávané sekvence v dané databázi

§ procentuální shoda nukleotidových bází mezi zarovnanými sekvencemi

U šesti získaných sekvencí (T-COI, M-COI, L-COI, X-LSU, L-LSU a B-LSU) patřila nejlepší nalezená homologní sekvence hlísticím. Sekvence L-LSU se zcela shoduje se sekvencí nalezenou v databázi, která byla určena jako LSU druhu *Laimaphelenchus deconincki*. Pět dalších sekvencí (T-COI, M-COI, L-COI, X-LSU a B-LSU) bylo nalezeným homologním sekvencím pouze podobných, a pravděpodobně se jedná o sekvence druhů, které ještě nebyly sekvencovány, nebo jejich sekvence nebyly zadány do prohledávané databáze.

V databázi „Nucleotide“ (NCBI, 25. 4. 2016) se nenachází žádná COI sekvence pro rod *Tylaphelenchus* ani *Macrolaimus*. Jsou tam k nalezení tři sekvence LSU pro rod *Macrolaimus*, ale druh není specifikován, a jedna sekvence pro *Tylaphelenchus jiaae*. Pro známější rod *Bursaphelenchus* je v databázi přítomno několik stovek sekvencí, jak z oblasti LSU, tak COI. Pro rod *Laimaphelenchus* se v databázi nachází čtyři sekvence genu COI a devět sekvencí LSU. Sekvence získané v rámci této bakalářské práce budou zařazeny do výše zmíněné databáze a budou použity pro studium fylogenetických vztahů.

Pro sekvence T-LSU a M-LSU odpovídala nejlepší nalezená homologní sekvence LSU sekvenci houby rodu *Malassezia*, což znamená, že tyto vzorky mohly být kontaminovány. Zástupci tohoto rodu jsou součástí mikroflóry nacházející se na kůži zvířat i člověka. V současné době je známo 13 druhů této houby a některé mohou způsobovat kožní problémy (Gaitanis *et al.*, 2012). LSU úseky těchto vzorků byly amplifikovány, zaklonovány do vektoru a sekvencovány dvakrát, a se stejným výsledkem. Jelikož byla práce se vzorky vykonávána vždy s rukavicemi, je pravděpodobnost kontaminace malá, ale nelze ji vyloučit. Další možností je, že vzorky byly kontaminovány ještě před tím, než jsme je obdrželi. Je možné, že použití jiných primerů by mohlo tento problém vyřešit. Jiné primery než D2A a D3B nebyly pro amplifikaci LSU úseku v této bakalářské práci použity. V rozsáhlé studii fylogenetických vztahů podřádu *Cephalobina* použili Nadler *et al.* (2006) k amplifikaci LSU úseku 53 taxonů (mezi které patřil i *Macrolaimus sp.*) jiné než D2A/D3B primery. Používali dokonce kombinace různých primerů, až dokud se jim nepodařilo amplifikovat žádaný úsek DNA. Proto by pro amplifikaci fragmentů T-LSU a M-LSU bylo v budoucnu vhodné celý postup opakovat, a při PCR použít například primery, které byly použity ve výše zmíněné studii.



## 5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla vypracována literární rešerše na téma hlístice, se zaměřením na jejich anatomii a morfologii a vývojový cyklus. Byly popsány některé parazitické druhy hlístic a využití hlístic jako bioindikátorů prostředí. Dalším tématem byla molekulární identifikace hlístic popisující nejběžněji používané metody a markery.

V experimentální části této práce byly pomocí PCR amplifikovány fragmenty DNA hlístic rodu *Bursaphelenchus* (B), *Laimaphelenchus* (X, L), *Macrolaimus* (M) a *Tylaphelenchus* (T). Z jaderné oblasti LSU byly amplifikovány fragmenty DNA všech vzorků, z mitochondriálního genu *COI* pouze vzorky L, M a T. Všechny tyto amplifikované fragmenty byly jednotlivě zaklonovány do *pDrive* vektoru, a jejich sekvence byla komerčně přečtena pomocí univerzálních primerů M13.

Sekvence byly zpracovány pomocí softwaru Sequence Scanner v1.0 a MEGA 6.0. Pomocí programu BLAST byly vyhledány homologické sekvence v „Nucleotide“ databázi NCBI. U šesti získaných sekvencí (T-*COI*, M-*COI*, L-*COI*, X-LSU, L-LSU a B-LSU) odpovídala nejlepší nalezená homologní sekvence hlísticím, z toho sekvence L-LSU se zcela shodovala se sekvencí nalezenou v databázi. Sekvence vzorků T-LSU a M-LSU byly identifikovány jako sekvence houby, což znamená, že tyto vzorky byly pravděpodobně kontaminovány.

## 6 LITERATURA

- Abad P., Gouzy J., Aury J. M., Castagnone-Sereno P., Danchin E. G. J., Deleury E., Perfus-Barbeoch L., Anthouard V., Artiguenave F., Blok V. C., Caillaud M. C., Coutinho P. M., Dasilva C., De Luca F., Deau F., Esquibet M., Flutre T., Goldstone J. V., Hamamouch N., Hewezi T., Jaillon O., Jubin C., Leonetti P., Magliano M., Maier T. R., Markov G. V., McVeigh P., Pesole G., Poulain J., Robinson-Rechavi M., Sallet E., Segurens B., Steinbach D., Tytgat T., Ugarte E., van Ghelder C., Veronico P., Baum T. J., Blaxter M., Bleve-Zacheo T., Davis E. L., Ewbank J. J., Favery B., Grenier E., Henrissant B., Jones J. T., Laudet V., Maule A. G., Quesneville H., Rosso M. N., Schiex T., Smant G., Weissenbach J., Wincker P. (2008): Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Moloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* **26**, 909-915.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- Applied Biosystems homepage: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/software-community/free-ab-software.html> (16. 3. 2016).
- Arakawa Y. a Togashi K. (2002): Newly discovered transmission pathway of *Bursaphelenchus xylophilus* from males of the beetle *Monochamus alternatus* to *Pinus densiflora* trees via oviposition wounds. *Juornal of Nematology* **34**, 396-404.
- Baldwin J. G., Nadler S. A., Adams B. J. (2004): Evolution of plant parasitism among nematodes. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 83-105.
- Barcode of Life homepage: <http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding> (2. 3. 2016).
- Běhalová M. (2006): Recent surveys for *Bursaphelenchus xylophilus* in the Czech republic. *EPPO bulletin* **36**, 467-469.
- Blaxter M. (1998): *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science* **282**, 2041-2046.
- Blaxter M. L., De Ley P., Garey J. L., Liu L. X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J. R., Mackey L. Y., Dorris M., Frisse L. M., Vida J. T., Thomas W. K. (1998): A molecular evolutionary framework for the phylum *Nematoda*. *Nature* **392**, 71-75.
- Brenner S. (1973): Genetics of behavior. *British Medical Bulletin* **29**, 269-271.
- Brenner S. (1974): Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Bundy D. A. P. (1994): Immunoepidemiology of intestinal helminthic infections. 1. The global burden of intestinal nematode disease. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* **88**, 259-261.
- Burgermeister W., Braasch H., Metge K., Gu J., Schröder T., Woldt E. (2009): ITS-RFLP analysis, an efficient tool for differentiation of *Bursaphelenchus* species. *Nematology* **11**, 649-668.
- Cassada R. C. a Russell R. L. (1975): The dauerlarva, s post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **46**, 326-342.
- CESC (*C. elegans* Sequencing Consitorium) (1998): Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-2018.
- Cobb N. A. (1919): The orders and classes of nemas. In: *Contributions to a science of nematology*. (Cobb N. A. ed.), Williams & Wilkins Co., Baltimore, 213-216.
- Cook G. C. (1994): *Enterobius vermicularis* infection. *Gut* **35**, 1159-1162.
- Čermák V., Vieira P., Čudejková M., Gaar V., Tománková K., Mikušková K., Eisenback J. D., Mota M. (2014): *Bursaphelenchus hofmanni* Braasch, 1998 associated with peat growth substrate in hops nurseries in the Czech republic. *Nematology* **16**, 739-742.
- Čermák V., Vieira P., Gaar V., Čudejková M., Foit J., Zouhar M., Douda O., Mota M. (2013): On the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Parasitaphelenchinae) associated with wood and insects from declining forest trees in the Czech republic. *Forrest Pathology* **43**, 306-316.
- Decraemer W. a Hunt D. J. (2006): Structure and classification. In: *Plant Nematology*. (Perry R. N. a Moens M. eds.), CAB International, Wallingford, 3-32.

- de Silva N. R., Brooker S., Hotez P. J., Montresor A., Engels D., Savioli L. (2003): Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends in Parasitology* **19**, 547-551.
- EPPO homepage: <http://www.eppo.int/QUARANTINE/quarantine.htm> (24. 2. 2016).
- Fatica A. a Tollervey D. (2002): Making ribosomes. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 313-318.
- Fosu-Nyarko J., Nicol P., Naz F., Grill R., Jones M. G. K. (2016): Analysis of the transcriptome of the infective stage of the beet cyst nematode, *H. schachtii*. *Plos One* **11**:e0147511. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0147511>.
- Gaitanis G., Magiatis P., Hantschke M., Bassukas I. D., Velegaki A. (2012): The *Malessezia* genus in skin and systemic diseases. *Clinical Microbiology Reviews* **25**, 106-141.
- Grainger J. (1964): Factors affecting the kontrol of eelworm diseases. *Nematologica* **10**, 5-20
- Gubanov N. M. (1951): Giant nematode from the placenta of Cetacea - *Placentonema gigantissima* nov. gen., nov. sp. *Doklady Akademii nauk SSSR* **77**, 1123-1125.
- Güven K., Power R. S., Avramides S., Allender R., de Pomerai D. I. (1999): The toxicity of dithiocarbamate fungicides to soil nematodes, assessed using a stress-inducible transgenic strain of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **13**, 324-333.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., DeWaard J. R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **270**, 313-321.
- Heininger P., Höss S., Claus E., Pelzer J., Traunspurger W. (2007): Nematode communities in contaminated river sediments. *Environmental Pollution* **146**, 64-76.
- Hewezi T. a Baum T. J. (2013): Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 9-16.
- Hillis D. M. a Dixon M. T. (1991): Ribosomal DNA - molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of biology* **66**, 411-453.
- Hockland S., Niere B., Grenier E., Blok V. C., Phillips M. S., Den Nijs L., Anthoine G., Pickup J., Viaene N. (2012): An evaluation of the implications of virulence in non-European populations of *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* for potato cultivation in Europe. *Nematology* **14**, 1-13.
- Horák P. a Scholz T. (1998): *Biologie helmintů*. 1. vyd., Karolinum, Praha, Česká republika, 140 stran.
- Hu M. a Gasser R. B. (2006): Mitochondrial genomes of parasitic nematodes - progress and perspectives. *Trends in Parasitology* **22**, 78-84.
- Hübschen J., Kling L., Ipach U., Zinkernagel V., Brown D. J. F., Neilson R. (2004): Development and validation of species-specific primers that provide a molecular diagnostic for virus-vector longidorid nematodes and related species in German viticulture. *Juornal of Plant Pathology* **110**, 883-891.
- Hue-Roye K a Vege S. (2008): Principles of PCR-based assays. *Journal of Blood Group Serology and Education* **24**, 170-175.
- Hugot J. P., Baujard P., Morand S. (2001): Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology* **3**, 199-208.
- Chen Z. J. a Pikaard C. S. (1997): Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: Biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in *Brassica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 3442-3447.
- Cherry T., Szalanski A. L., Todd T. C., Powers T. O. (1997): The internal transcribed spacer region of *Belonolaimus* (Nemata: Belonolaimidae). *Journal of Nematology* **29**, 23-29.
- Chin-sang home page: <http://post.queensu.ca/~chinsang/photos-and-movies/c-elegans-photo-album/> (9. 2. 2016).
- Ingham R. E., Trofymow J. A., Ingham E. R., Coleman D. C. (1985): Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers - effects on nutrient cycling and plant-growth. *Ecological Monographs* **55**, 119-140.

- Irdani T. (2000): Genetic analysis of three *Bursaphelenchus* species by random amplified polymorphic DNA. *Nematologia Mediterranea* **28**, 111-120. <http://journals.fcla.edu/nemamedi/article/view/63506>.
- Jackson A. O. a Taylor C. B. (1996): Plant-microbe interactions: life and death at the interface. *The Plant Cell* **8**, 1651-1668.
- Jones J. T., Haegeman A., Danchin E. G. J., Gaur H. S., Helder J., Jones M. G. K., Kikuchi T., Manzanilla-López R., Palomares-Rius J. E., Wesemael W. M. L., Perry R. N. (2013): Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* **14**, 946-961.
- Kammenga J. E., Arts M. S. J., Oude-Breuil W. J. M. (1998): HSP60 as a potential biomarker of toxic stress in the nematode *Plectus acuminatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **34**, 253-258.
- Khan M. R., Handoo Z. A., Rao U., Rao S. B., Prasad J. S. (2012): Observations on the foliar nematode, *Aphelenchoides besseyi*, infecting tuberoses and rice in India. *Journal of Nematology* **44**, 391-398.
- Kikuchi T., Cotton J. A., Dalzell J. J., Hasegawa K., Kanzaki N., McVeigh P., Takanashi T., Tsai I. J., Assefa S. A., Cock P. J. A., Otto T. D., Hunt M., Reid A. J., Sanchez-Flores A., Tsuchihara K., Yokoi T., Larsson M. C., Miwa J., Maule A. G., Sahashi N., Jones J. T., Berriman M. (2011): Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*. *Plos Pathogens* **7**:e1002219. <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002219>.
- Liu X., Xu M., Hua E., Zhang Z. (2016): Biodiversity of free-living marine nematodes in the southern Yellow Sea, China. *Journal of Ocean University of China* **15**, 1-10.
- Lynch M a Milligan B. G. (1994): Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**, 91-99.
- Nadler S. A., De Ley P., Mundo-Ocampo M., Symthe A. B., Stock S. P., Bumbarger D., Adams B. J., De Ley I. T., Holovachov O., Baldwin J. G. (2006): Phylogeny of Cephalobina (Nematoda): Molecular evidence for recurrent evolution of probolae and incongruence with traditional classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **40**, 696-711.
- NCBI homepage: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (22. 3. 2016).
- Patrelle C., Ferte H., Jouet D. (2014): Identification of Chabertiidae (Nematoda, Strongylida) by PCR-RFLP based method: A new diagnostic tool for cross transmission investigation between domestic and wild ruminants in France. *Infection Genetics and Evolution* **28**, 15-20.
- Patwardhan A., Ray S., Roy A. (2014): Molecular markers in phylogenetic studies – A review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology* **2**:131. <http://www.esciencecentral.org/journals/molecular-markers-in-phylogenetic-studies-a-review-2329-9002-2-131.pdf>.
- Peat S. M., Hynam B. C., Adams B. J. (2009): Phylogenetics and population genetics of entomopathogenic and insect-parasitic nematodes. In: *Insect pathogens. Molecular approaches and techniques*. (Stock S. P., Vandenberg J., Glazer I., Boemare N. eds.), CAB International, Cambridge, U.S.A., 164-192.
- Perlman S. J., Spicer G. S., Shoemaker D. D., Jaenike J. (2003): Associations between mycophagous *Dorsophila* and their *Howardula* nematode parasites: a worldwide phylogenetic shuffle. *Molecular Biology* **12**, 237-249.
- Powers T. (2004): Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 367-383.
- Qiagen homepage: <https://www.qiagen.com/cz/resources/resourcedetail?id=4d546584-2550-4806-a663-995fef1431d9&lang=en> (12. 4. 2016).
- Shendure J. a Ji H. L. (2008): Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* **26**, 1135-1145.
- Schratzberger M., Bolam S., Whomersley P., Warr K. (2006): Differential response of nematode colonist communities to the intertidal placement of dredged material. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **344**, 244-255.

- Siddique S., Endres S., Sobczak M., Radakovic Z. S., Fragner L., Grundler F. M. W., Weckwerth W., Tenhaken R., Bohlmann H. (2014): Myo-inositol oxygenase is important for the removal of excess myo-inositol from syncytia induced by *Heterodera schachtii* in Arabidopsis roots. *New Phytologist* **201**, 476-485.
- Stock S. P. (2005): Insect-parasitic nematodes: From lab curiosities to model organisms. *Journal of invertebrate Pathology* **89**, 57-66.
- Stock S. P. (2009): Molecular Approaches and the Taxonomy of Insect-parasitic and Pathogenic Nematodes. In: *Insect pathogens. Molecular approaches and techniques*. (Stock S. P., Vandenberg J., Glazer I., Boemare N. eds.), CAB International, Cambridge, U.S.A., 71-100.
- Stock S. P., Campbell J. F., Nadler S. A. (2001): Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology* **87**, 877-889.
- Sulston J. E. a Horvitz H. R. (1977): Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **56**, 110-156.
- Sunnucks P. (2000): Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution* **15**, 199-203.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013): MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725-2729.
- Tan M. Y. A., Park T. H., Alles R., Hutten R. C. B., Visser R. G. F., van Eck H. J. (2009): *GpaXI<sup>tar</sup>* originating from *Solanum tarijense* is a major resistance locus to *Globodera pallida* and is localised on chromosome 11 of potato. *Theoretical and Applied Genetics* **119**, 1477-1487.
- Trudgill D. L. a Blok V. C. (2001): Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and demaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. **39**, 53-77.
- Turner S. J. (1996): Population decline of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) in field soils in Northern Ireland. *Annals of Applied Biology* **129**, 315-322.
- Turner S. J. a Rowe J. A. (2006): Cyst nematodes. In: *Plant Nematology*. (Perry R. N. a Moens M. eds.), CAB International, Wallingford, 90-122.
- Vieira P., Burgermeister W. Mota M., Mtge K., Silva G. (2007): Lack of genetic variation of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal revealed by RAPD-PCR analyses. *Journal of Nematology* **39**, 118-126.
- Volf P., Horák P., Čepička I., Flegr J., Lukeš J., Mikeš L., Svobodová M., Vávra J., Votýpka J. (2007): *Paraziti a jejich biologie*. 1. vyd., Triton, Praha, Česká republika, 318 stran.
- Wang X. R., Bosselut N., Castagnone C., Voisin R., Abad P., Esmenjaud D. (2003): Multiplex polymerase chain reaction identification of single individuals of the longidorid nematodes *Xiphinema index*, *X-diversicaudatum*, *X-viuttonenzi*, and *X-italiae* using specific primers from ribosomal genes. *Phytopathology* **93**, 160-166.
- Weiser J. a Mráček Z. (1988): *Parazitické hlístice hmyzu*. 1. vyd., Academia, Praha, Česká republika, 260 stran.
- Yates G. W. a Boag B. (2006): Female size shows similar trends in all clades of the Phylum Nematoda. *Nematology* **8**, 111-127.
- Ye W., Giblin-Davis R. M., Davies K. A., Purcell M. F., Scheffer S. J., Taylor G. S., Center T. D., Morris K., Thomas W. K. (2007): Molecular phylogenetics and the evolution of host plant associations in the nematode genus *Fergusobia* (Tylenchida: Fergusobiinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **45**, 123-141.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- bp – pár bází
- DMSO - dimethylsulfoxid
- dNTPs – deoxynukleotidtrifosfáty
- EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina
- IPTG – isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
- SDS – dodecylsírán sodný
- X-gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid