

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Molekulární markery pro druhovou identifikaci
entomopatogenních hlístic (Nematoda: *Steinernematidae*)**

Bakalářská práce

Lucie Faktorová

Školitel: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.

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

České Budějovice 2014

Bakalářská práce

Faktorová, L., 2014: Molekulární markery pro druhovou identifikaci entomopatogenních hlístic (Nematoda: *Steinernematidae*) [Molecular markers for species identification of entomopathogenic nematodes (Nematoda: *Steinernematidae*). Bc.Thesis, in Czech] Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 58 pp

Annotation

For molecular markers (mitochondrial *ND2*, *ND4*, *CytB* and nuclear *ITS*) were tested for use in species identification of entomopathogenic nematodes. Markers *ND2* and *ITS* were succesfully amplified and sequenced. These aligned sequences were used for reconstruction of dendrograms and their ability to distinguish species of nematodes was tested by statistical methods.

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

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

V Českých Budějovicích, 18. 4. 2014

.....

Poděkování

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala své školitelce Martině Žurovcové za odborné vedení práce a za poskytnutí užitečných rad. Dále svému konzultantovi Vladimíru Půžovi za poskytování veškerého analyzovaného materiálu a také za cenné rady. Poděkování patří také Daniele Chundelové, za její pomoc a trpělivost, především v začátcích práce, ale i kdykoli během celého studia. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Jindřišce Tomáškové, Andree Jarošové, Aničce Sattranové a Jirkovi Nermuťovi za všechny jejich rady a připomínky, ale také za vytvoření příjemné atmosféry v laboratoři.

Velké díky patří i mé rodině a kamarádům, za jejich podporu během celého studia.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Entomopatogenní hlístice.....	1
1.1.2. Životní cyklus entomopatogenních hlístic.....	2
1.1.3. Invazní larva.....	4
1.1.4. Pohlavní dimorfismus.....	4
1.1.5. Hostitelské spektrum.....	5
1.2. Symbioza hlístovek.....	6
1.3. Mezidruhová kompetice.....	6
1.4. Identifikace jednotlivých druhů.....	7
1.4.1. Morfologická identifikace.....	7
1.4.2. Molekulární markery.....	8
1.4.2.1. Jaderné markery.....	9
1.4.2.2. Mitochondriální markery.....	10
2. Cíle práce.....	12
3. Materiál a metody.....	13
3.1. Materiál.....	13
3.2. Extrakce DNA.....	13
3.2.1. Extrakce pomocí extrakčního pufru.....	13
3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	14
3.3.1. Primery pro amplifikaci vybraných oblastí genomu.....	14
3.3.2. PCR profily.....	18
3.4. Gelová elektroforéza.....	19
3.5. Přečištění vzorků pomocí metody ExoSap.....	20
3.6. Analýza sekvencí.....	20
3.7. Statistické zpracování sekvencí.....	21
4. Výsledky.....	22
4.1. Testované markery.....	22
4.2. Charakteristika fragmentu genu <i>ITS</i>	22
4.3. Charakteristika fragmentu genu <i>ND2</i>	27
4.4. Druhová identifikace spojením testovaných markerů.....	32
5. Diskuze.....	37
5.1. Izolace DNA a metodika PCR.....	37

5.2. Metoda klouzavého okénka.....	37
5.3. Testované markery.....	38
5.3.1. Nukleární marker <i>ITS</i>	39
5.3.2. Mitochondriální marker <i>ND2</i>	40
5.4. Vytvoření dendrogramů.....	41
6. Závěr.....	44
7. Literatura.....	45
8. Přílohy.....	53

1. Úvod

Hlístice (Nematoda) představují kmen mnohobuněčných organismů, tvořící nejpočetnější skupinu živočichů na zemi (Bongers & Ferris, 1999; Torsvik et al., 2002; Curtis et al., 2002; Rappe & Giovannoni, 2003; Curtis & Sloan, 2004). Je známo obrovské množství druhů (přes 20 tisíc), z nichž některé parazitují na obratlovcích, jiné na rostlinách či hmyzu.

Tělo těchto hlístic musí být přizpůsobeno parazitnímu způsobu života, proto je válcovité a ke konci ztenčené, na jeho povrchu se vyskytuje pevná kutikula, produkovaná jednovrstevnou pokožkou, která zajišťuje pružnost a především pevnost těla. Hlístice se také vyznačují ústním ústrojím se 3 až 6 pysky, které umožňují sání tělních tekutin hostitele. Trávení je zajištěno trávicí trubicí, procházející pseudocoelem, mající na jedné straně pístitovitý hltan, který umožňuje nasávání potravy z hostitele (Adams et al., 2006).

1.1. Entomopatogenní hlístice

Hlístice čeledi Steinernematidae, také nazývané jako hlístovky (Weiser & Mráček, 1988), patří spolu s čeledí Heterorhabditidae do skupiny entomopatogenních hlístic. Ty jsou rozšířenou skupinou organismů, které se vyskytují na všech obydlených kontinentech. Jedná se o půdní organismy, žijící na polích, v sadech, zahradách či pouštích (Nermuť et al., 2012). Pro výzkum je častěji využívána čeleď Steinernematidae, zejména proto, že se u ní vyskytuje větší molekulární diverzita mezi jednotlivými druhy. Příčinou velké mezidruhové diverzity je s největší pravděpodobností stáří čeledi Steinernematidae, jejíž první výskyt je datován dříve než tomu bylo u čeledi Heterorhabditidae (Adams et al., 2002).

Výskyt původních hlístovek by mohl být datován před 350 miliony let, kdy existoval jejich pravděpodobný předchůdce, kterým byla volně žijící bakteriofágní hlístice, která nejprve požírala bakterie z mrtvých těl hmyzu a teprve postupnými změnami začala pronikat i do živého hostitele, tak jak je to známé u dnešních hlístovek (Nermuť et al., 2012). Je však důležité uvědomit si fakt, že čeledi Steinernematidae a Heterorhabditidae s největší pravděpodobností nesdílejí společného předka. Z tohoto důvodu je tato skupina hlístovek nazývána jako polyfyletická (Blaxter et al., 1998). Přesto se u dvou zmíněných čeledí vyskytují podobné znaky, které vznikly nejspíše konvergentní evolucí, při níž dochází k vývoji dvou nepříbuzných druhů. Na ně však působí stejné selekční tlaky, jako jsou prostředí či podobný styl života a na základě toho si mohou být tyto druhy podobné. Mezi společné znaky patří například entomopatogenita (infikují, zabijí a pak využijí svého

hostitele), symbióza s bakterií, životní cyklus a adaptace invazní larvy. V současné době se předpokládá, že čeleď Steinernematidae patří do skupiny Panagrolaimomorpha, zatímco čeleď Heterorhabditidae je sesterská skupině Strongylida (Blaxter et al., 1998, 2000).

Entomopatogenní hlístice parazitují na různých druzích hmyzu včetně larev motýlů, mūr, brouků i much. V laboratorních testech byla dokonce prokázána infekce u pavouků (Poinar & Thomas, 1985) a roztočů (Zhioua et al., 1995). Mezi ostatními hlísticemi vynikají především svou životní strategií, ve které kombinují saprofytismus a parazitaci, kdy svého hostitele zabíjejí pomocí symbiotické bakterie rodů *Xenorhabdus* (Steinernematidae) nebo *Photorhabdus* (Heterorhabditidae). Aby mohlo dojít v přírodě k nákaze hostitele, musí být splněna důležitá podmínka, a to výskyt alespoň jednoho z vývojových stadií v půdě (Bathon, 1996).

Tyto skupiny organismů dokáží svého hmyzího hostitele usmrtit ve 24 až 48 hodinách od infekce (Nermuť et al., 2012). Pro rostliny a obratlovce jsou však bezpečné, z čehož vyplývá i jejich obrovský význam v ochraně rostlin před hmyzími škůdci (Begley, 1990; Ehler, 1990). V současné době jsou hlístovky na trhu v mnoha produktech, které jsou zaměřeny především na biologickou kontrolu hmyzích škůdců a ochranu trávníků, okrasných rostlin, zeleniny a ovocných stromů (Smits, 1996).

První využití hlístovek v ochraně rostlin je datováno již ve 30. letech 20. století, avšak jejich největší rozmach byl pozorován v posledních desetiletích (Ehlers, 1996). Použití těchto ochranných přípravků je však v současnosti stále omezené. Důvodem může být především vysoká pořizovací cena nebo jejich složitější použití, zejména v souvislosti s citlivostí na sluneční světlo, kdy by mohlo dojít k jejich vysychání. Proto je jejich aplikace nutná v odpoledních či večerních hodinách (Hyršl, 2012).

V současné době je známo více než 80 druhů z čeledi Steinernematidae a zhruba 15 druhů čeledi Heterorhabditidae. Do čeledi Steinernematidae (Chitwood & Chitwood, 1937) se řadí rody *Steinernema* (Travassos, 1927) a rod *Neosteinernema* (Nguyen & Smart, 1994). Čeleď Heterorhabditidae (Poinar, 1976) obsahuje jediný rod *Heterorhabditis* (Poinar, 1976).

Nejvíce druhů se nachází v oblastech mírného pásu. Nejrozšířenějším druhem je *S. feltiae*, druhým nejrozšířenějším je lesní druh *S. kraussei*.

1.1.2 Životní cyklus entomopatogenních hlístic

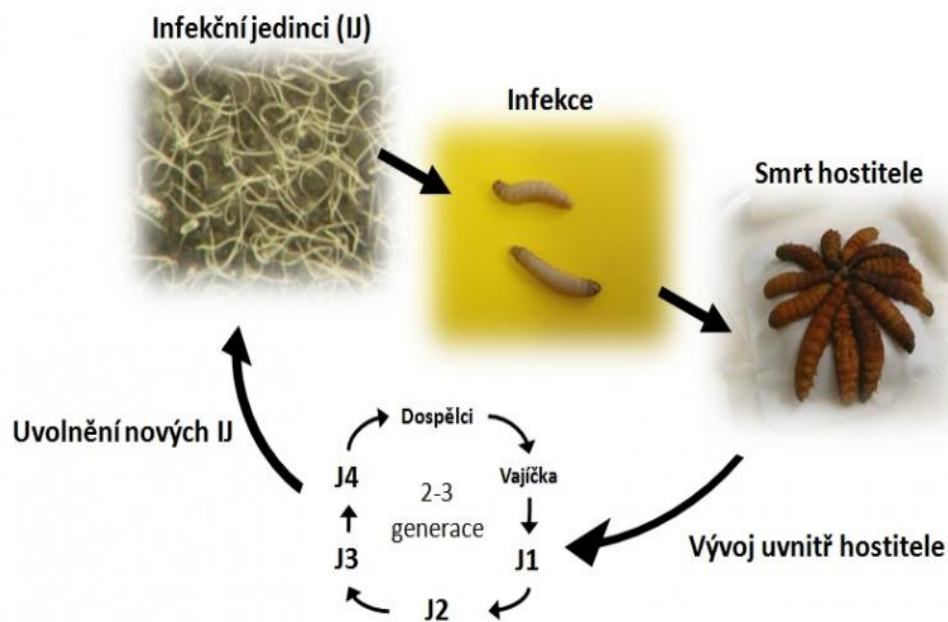
Entomopatogenní hlístice mají specifický životní cyklus, který začíná infekcí hostitele mladým infekčním jedincem (invazní larvou). Hlístice mohou pronikat do těla svého hostitele pomocí přirozených tělních otvorů, jako jsou ústní otvor a řiť. Dalším

způsobem průniku do hostitele může být průchod přes spirakula intersegmentální membránu či skrz kutikulu (Mráček et al., 1988; Ishibashi & Kondo, 1990). Některé druhy hmyzu mohou být proti nákaze hlístovkou imunní a to zejména proto, že mají příliš úzký ústní otvor nebo mají řitní otvor vybaven uzavíratelnými chlopněmi (Eidt & Thurston, 1995). Jedná se především o některé larvy dvoukřídlých (Poinar, 1979), larvy kovaříků (Eidt & Thurston, 1995) či dospělce střevlíků (Georgis et al., 1991; Ropek & Javorska, 1994). Pokud se invazní larva dostane do těla hmyzu, uvolní svým ústním otvorem symbiotickou bakterii (*Xenorhabdus* pro čeleď Steinernematidae, *Photorhabdus* pro čeleď Heterorhabditidae), která se rychle množí a způsobuje tak rychlou smrt hostitele v důsledku septikémie. Hlístice tyto bakterie dále využívají jako zdroj potravy (Nermuť et al., 2012).

Během životního cyklu dochází uvnitř hostitele k reprodukci několika generací. Invazní larvy se vyvíjejí přes larvu čtvrtého instaru do první, tzv. „obří generace“. Vyvinou se malí samci a téměř centimetrové samice, které kladou vajíčka v těle mrtvého hostitele. Z těchto vajíček se později vylíhnou larvy, které se rovněž přes 4 instary vyvíjejí v dospělého jedince, do druhé, tzv. „normální generace“. Samice z této druhé generace opět kladou vajíčka.

Tento cyklus se opakuje až do vyčerpání živin, kdy vývoj pokračuje pouze do třetího larválního instaru – invazní larvy, která opouští svého hostitele a nadále zůstává v půdě. Životní cyklus hlístovek je zpravidla dokončen v průběhu 7–15 dnů (Poinar, 1979; Adams a Nguyen, 2002).

Po dokončení celého cyklu vznikají stovky tisíc nových infekčních jedinců, velkých 0,4 – 1,5 mm, kteří hledají nového hostitele. U čeledi Steinernematidae se mladí infekční jedinci vyskytují jako samci a samice, kdežto u Heterorhabditidae se jedná o hermafrodity. Schematicky je životní cyklus znázorněn na Obr. 1.



Obr. 1: Životní cyklus entomopatogenní hlístice (Hyršl, 2012)

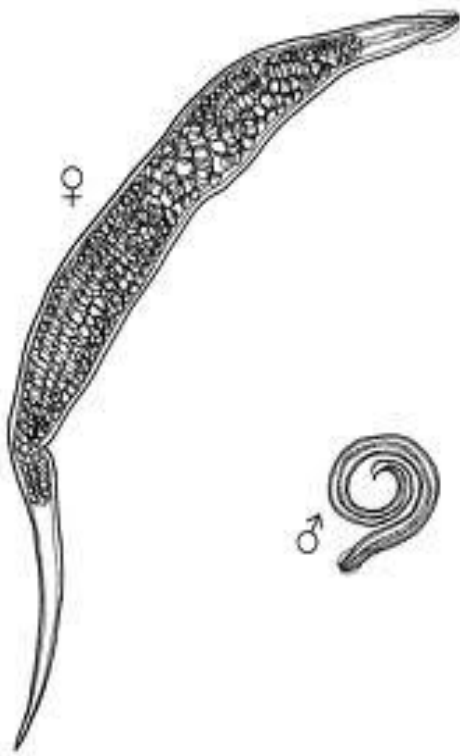
1.1.3. Invazní larva

Jediným volně žijícím stádiem v půdním prostředí je larva třetího instaru, tzv. „invazní larva“ (dauer larva). Tato larva má velice důležitý úkol – hledání nového hostitele. K tomu má specifickou výbavu, která zahrnuje mj. zesílení kutikuly. Nesvlečená kutikula chrání larvy proti predátorům i proti některým nematofágním houbám (Timper & Kaya, 1989). Dalším důležitým znakem je uzavření trávicí soustavy, larva tak nepřijímá potravu a spoléhá se pouze na svoje energetické zásoby v buňkách střeva, díky kterým může přežít poměrně dlouhou dobu (Poinar & Leutenegger, 1968; Poinar, 1990). Invazní larva dokáže svého hostitele najít pomocí citlivých smyslových orgánů (zejména papily a amfidy, které se nacházejí na boční straně hlavy), kterými dokáže zachytit látky (především trus a vydechovaný oxid uhličitý) vylučované hostitelem (Schmidt et al., 1979; Gaugler et al., 1980).

Podle způsobu napadení hostitele se invazní larvy dělí na dvě skupiny. Ty, které se aktivně pohybují v půdě a vyhledávají nové, většinou nepohyblivé hostitele, tento typ strategie je označován jako tzv. „cruiser“ a je typický pro druh *Steinernema glaseri*. Druhým typem je tzv. „ambusher“, který využívají larvy, čekající namísto a „číhající“ na pohybující se hmyz a je typický především pro druh *Steinernema carpocapsae* (Lewis et al. 1992).

1.1.4. Pohlavní dimorfismus

Důležitým znakem u čeledi Steinernematidae je výrazný pohlavní dimorfismus. Toto označení se používá u živočichů, u kterých samec vypadá jinak než samice. Samec se tedy od samice liší nejen pohlavím, ale také sekundárními znaky, jako je velikost těla či rozdílné zbarvení. U hlístic je pohlavní dimorfismus vázán na rozdíl ve velikosti těla, přičemž samice je až 10x větší než samec a dosahuje velikosti až 1 cm (Půža, ústní sdělení). Výrazný dimorfismus je zobrazen na Obr. 2.



Obr. 2: Pohlavní dimorfismus hlístic – roup dětský (O. Sychr, 2010)

1.1.5. Hostitelské spektrum

Čeď Steinernematidae zahrnuje přes 80 různých druhů, přičemž každý druh se může vyskytovat v odlišném prostředí a může parazitovat na jiném hostiteli. Mezi nejčastější hostitele patří zástupci řádů dvoukřídlí, brouci, motýli a blanokřídlí, především v larválním stádiu. U některých druhů se jedná o užší spektrum, např. *S. glaseri* napadá převážně larvy vrubounovitých brouků, jiné druhy se naopak vyznačují širším hostitelským spektrem, jako je tomu např. u *S. fetliae* (Peters 1996). Jedná se o parazitické hlístice, které jsou využívány především na ochranu proti larvám smutnic. Jejich široké spektrum zahrnuje rovněž hmyz

z mnoha dalších řádů, výjimkou nejsou ani sekáči, pavouci, stonožky nebo stejnonožní korýši.

Dalším rozšířeným druhem je *S. scapterisci*, která napadá především krtonožky (Nguyen & Smart, 1990), ale je schopná napadat i jiné druhy hmyzu (např. cvrčky) (Grewal et al., 1993). Méně známým druhem je *S. scarabaei*, jejímž hostitelem se nejčastěji stávají larvy vrubounovitých brouků (Stock & Koppenhoefer, 2003).

Rozdíl v rozsahu hostitelského spektra s největší pravděpodobností souvisí s místem působení každého druhu a s množstvím možných hostitelů, kteří se v tomto prostředí vyskytují.

1.2. Symbióza hlístovek

Hlístovky se vyskytují ve zvláštní symbióze s gramnegativními bakteriemi a to s bakteriemi rodu *Xenorhabdus* a *Photorhabdus*, které spadají do čeledi Enterobacteriaceae (Boemare et al., 1993). Tento velice těsný vztah potvrzuje fakt, že symbiotické bakterie nejsou schopné žít samostatně ve vnějším prostředí a jsou tedy zcela závislé na přítomnosti hlístovek. Hlístovky přenášejí bakterie z jednoho hostitele do druhého za použití speciálního střevního váčku nebo přímo ve střevě. Bakterie jsou naopak zodpovědné za usmrcení hostitele a vytváření potravy pro vyvíjející se hlístovky (Bird & Akhurst, 1983; Poinar, 1990). Další funkcí bakterií v této symbioze je tvorba velice důležitých látek, především antibiotik, exotoxinů, fungistatik a mnoha dalších, které jsou potřebné pro potlačení průniku dalších mikroorganismů do mrtvého těla hostitele (Forst & Clarke, 2002). Některé hlístovky jsou schopné kromě symbiotických bakterií natrávit i jiné bakterie, ale pouze v krátké době a na úkor rychlosti růstu, která je tímto způsobem potravy značně zpomalena.

1.3. Mezidruhová kompetice

Na základě pozorování častého výskytu hlístovek v druhových komplexech (Amarasinghe et al., 1994; Stuart & Gaugler, 1994; Campbell et al., 1995; Sturhan, 1999) a faktu, že se nebrání směsným infekcím s jinými druhy (Bovien, 1937; Koppenhöfer et al., 1995; Koppenhöfer & Kaya, 1996a), můžeme předpokládat, že k mezidruhové kompetici může dojít i v přirozeném prostředí.

Příkladem může být kompetice mezi hlístovkami čeledí Heterorhabditidae a Steinernematidae, které mohou společně infikovat stejného hostitele, nemohou se však společně vyvíjet, protože mezi těmito druhy dochází k „soutěžení“ a jedna z hlístic převládne

(Alatorre-Rosas & Kaya, 1990). V mrtvém hostiteli tedy dochází ke konkurenci jednotlivých druhů, což může vést k úplnému vyřazení jednoho druhu z hostitele.

Také různé druhy z čeledi Steinernematidae mohou napadnout jednoho hostitele a společně se v něm namnožit (Kondo, 1989; Koppenhöfer et al., 1995). Avšak působením kompetice jsou tyto jedinci do jisté míry negativně ovlivňováni. Z tohoto důvodu se u hlístovek vyskytují určité „ochranné“ mechanismy, které by kompetici mohly předcházet. Jedná se především o shlukovité rozmístění hlístovek v jejich přirozeném prostředí (Spiridonov et al., 2007; McGraw & Koppenhöfer, 2009), díky čemuž dochází k limitování jejich interakcí a k posílení jejich koexistence (Kaya & Koppenhofer 1996; Stuart et al., 2006).

1.4. Identifikace jednotlivých druhů

1.4.1. Morfologická identifikace

K prvotnímu určování jednotlivých druhů EPN byla využívána srovnávací morfologie, která mohla být využívána pouze v počátcích studia hlístic, kdy existoval daleko menší počet objevených druhů. Proto se stala v souvislosti se zvyšujícím se počtem objevených druhů nevhodným nástrojem pro určování jejich taxonomie. K tomu přispělo hned několik důvodů, jedním z nich je nedostatek morfologické variability, dalším důvodem jsou morfologické znaky, které jsou sice vhodným ukazatelem pro rozlišování druhů, avšak nenesou žádné fylogenetické informace (Stock, 2002; Stock & Reid, 2003).

Snaha rozlišovat jednotlivé druhy přispěla k použití další metody, kterou byla tzv. „cross“ hybridizace. V tomto případě jde o křížení hlístů – kdy se vezme jeden samec jednoho kmene a samice kmene druhého. V případě, že nejdojde k rozmnožení, jsou tyto dva druhy považovány za rozdílné, protože mají redukční bariéru. Tato metoda však byla rovněž zpochybněna v práci Adamse 1998, kde je uvedeno, že bariéru mohou mít i kmeny v rámci jednoho druhu. Výsledky této metody navíc nemají dostatečný evoluční význam, dalším problémem je hermafroditismus u čeledi Steinernematidae (Griffin et al., 2001).

Pro překonání problémů s nedostatkem informací podávaných studiem morfologie, byly využívány různé metody, jejichž výsledky se jevily jako dostačující. Jednou z nich je elektroforéza proteinů, která je vhodná zejména pro rozlišování jednotlivých druhů. Tato metoda může být využita i pro rozlišování druhů, které jsou spolu příbuzné, není však vhodná pro určování rodů či poddruhů (Akhurst, 1987). Proto se pro detailnější rozlišování využívala metoda označovaná jako „RFLP“ (restriction fragment length polymorphism),

tedy polymorfismus délky restrikčních fragmentů. Tato metoda je založena na využívání specifických enzymů, tzv. „restrikčních endonukleáz“, díky kterým se projeví rozdíly v délce restrikčních fragmentů (testované DNA z různých druhů). Tyto rozdíly jsou způsobeny odchylkami ve stavbě zkoumaných (testovaných) řetězců DNA, na což citlivě reagují štípací enzymy (King et al., 2006). Z tohoto důvodu byla RFLP vhodným nástrojem pro rozlišování jednotlivých druhů čeledi Steinernematidae a pro popisování jejich fylogenetických vztahů (Reid & Hominick, 1992; Reid, 1994; Hominick et al, 1997; Stock et al, 1998; Pamjav et al, 1999, Triga et al, 1999).

Pro posuzování a popisování fylogenetických vztahů mezi EPN byla rovněž používána tzv. „RAPD“ (Random Amplified Polymorphic DNA) metoda (Gardner et al. 1994, Liu & Berry, 1996c). Tato zkratka označuje náhodnou amplifikaci polymorfni DNA. Jedná se tedy o typ PCR reakce, kdy je využito 10 párů bazí dlouhých, náhodných primerů pro detekci náhodného segmentu genomové DNA (Williams et al., 1990). Pro tuto reakci není nutná znalost sekvence DNA cíleného genomu, proto je vhodným nástrojem pro porovnávání genomové variability v biologických systémech, ve kterých není známo velké množství sekvencí pro vzájemné porovnávání (Lynch & Milligan, 1994). Touto metodou byla také posuzována genetická variabilita mezi čeledmi Steinernematidae a Heterorhabditidae (Gardner et al., 1994; Liu and Berry, 1995; Hashmi et al., 1996; Liu and Berry, 1996). Nevýhodou této metody je však její citlivost. Výsledky mohou být ovlivněny řadou faktorů, zejména kvalitou či množstvím DNA a podmínkami, za kterých je tato reakce prováděna (Muralidharan & Wakeland, 1993, Schierwater & Ender, 1993).

V současné době se používá analýza různých jaderných (18S, ITS a 28S) a mitochondriálních (ND4) genů, pro posouzení evolučních vztahů EPN na různých taxonomických úrovních (Adams et al., 1998; Liu et al., 1999; Szalanski et al., 2000; Nguyen et al., 2001, 2004; Stock et al., 2001).

V poslední době je však nejvíce využívána analýza nukleotidové sekvence, která je vhodná jak pro taxonomické tak i pro fylogenetické studie (Adams et al., 1998; Stock et al., 2001; Nguyen et al., 2001, 2004;).

1.4.2. Molekulární markery

Molekulární marker je molekula bílkoviny nebo určitý úsek DNA, které mohou být porovnávány u jednotlivých zkoumaných druhů organismů. Tyto markery jsou proto důležitým nástrojem, který se uplatňuje při řešení problémů a otázek, týkajících se různých

oblastí biologie – jako jsou ekologie, fylogenetika a evoluce. Mají své specifické výhody, mezi které patří především možnost použití u různých stadií vývoje. Další výhodou je fakt, že jejich použití není limitováno množstvím použitého materiálu a lze je tedy využít i v případech, kdy jiné metody nejsou možné.

Molekulární markery se dělí do dvou základních skupin a to na proteinové a DNA markery. Z proteinových markerů jsou nejznámější a také nejčastěji používané tzv. alozomy (isozymy). Jedná se o variantní formy enzymů, které jsou kódovány různými alelami na stejném lokusu. DNA markery se dále rozdělují na jaderné a mitochondriální, podle místa jejich výskytu. Tyto molekulární markery se od sebe značně odlišují zejména variabilitou, typem dědičnosti, rekombinací nebo rychlostí mutací (Avisé. 2004).

Jaderná neboli nukleární DNA je obsažená v jádře všech živých organismů. Její hlavní nevýhodou je rychlá degradace, a proto se se stářím vzorku její množství snižuje. Nejčastějšími oblastmi pro tvorbu markerů jsou nekódující variabilní oblast Internal Transcribed Spacer (*ITS*) a kódující oblast elongační faktor 1 α (*EF 1 α*) (Loxdale & Lushai, 1998; Caterino et al., 2000).

Mitochondriální DNA naopak představuje část mimojaderné DNA. Jedná se o kruhovou molekulu o velikosti 15 – 18 kbp, která se svou stavbou podobá více prokaryotnímu nukleotidu než eukaryotickým chromozomům. Tato molekula se obvykle sestává z 37 genů, z toho je 22 pro tRNA, 2 pro rRNA a 13 kóduje proteiny (*ND1-6*, *ND4L*, *COXI-III*, *ATP6*, *ATP8*, *Cytb*). Výhodou mitochondriální DNA je především její mutační rychlost, která je v porovnání s mutační rychlostí jaderné DNA zhruba 20x vyšší. Další výhodou je také její výskyt ve větším množství, než je tomu u jaderné DNA. Uplatňuje se proto např. při práci se staršími vzorky, kde by mohlo dojít k degradaci jaderné DNA (Clary & Wolstenholme, 1985).

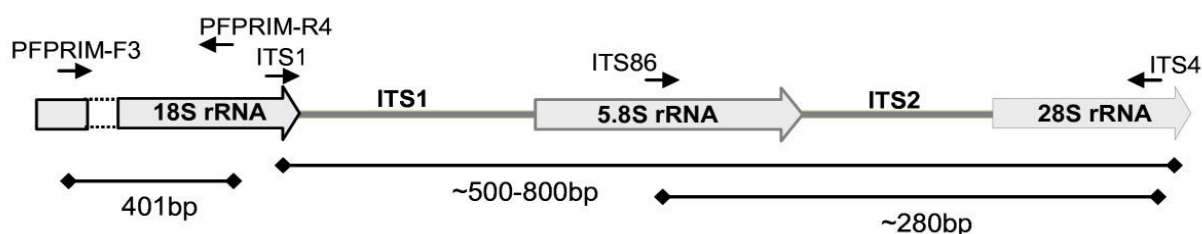
Pro tuto práci byl vybrán jaderný marker *ITS*, především proto, že je hlavním, standartně používaným, determinačním markerem u entomopatogenních hlístic. U tohoto markeru však může dojít k výskytu problémů, spojených s variabilitou v rámci jedince, a proto byly na základě porovnání mezidruhové variability mitochondriálních genů kódujících proteiny mezi druhy *Steinernema carpocapsae*, *Strongyloide stercoralis* a *Ascaris suum* vybrány úseky, kde byla tato variabilita nejvyšší. Šlo o geny *ND4*, *ND2* a *cytB*. Pro tuto studii byl použit rovněž gen *COXI*, který má výrazně nižší variabilitu, než předchozí geny. Tento gen byl použit pouze pro ověření množství získané mtDNA.

1.4.2.1. Jaderné markery

Internal transcribed spacer (*ITS*)

ITS jsou nekodující oblasti, které strukturně oddělují ribozomální RNA, konkrétně jsou umístěny mezi velmi konzervovanými kodujícími oblastmi 18S a 28S rRNA (Obr. 3). Tyto oblasti se nacházejí pouze na transkripčním prekurzoru, protože během posttranskripčních úprav dochází k jejich rychlé degradaci. Vyznačují se především vysokou variabilitou, což napovídá tomu, že se mohou uplatňovat jako velmi vhodné molekulární markery pro identifikaci organismů na nejnižších taxonomických úrovních. Proto jsou také využívány v molekulární taxonomii a fylogenetice, zvláště pro rozlišování velmi blízké příbuzných druhů a rodů.

ITS oblast se rozděluje na dvě základní podjednotky: *ITS1* mezi 18S a 5.8S a variabilnější *ITS2* mezi 5.8S a 28S (Schlötterer et al., 1994; Loxdale & Lushai, 1998; Barges et al., 2000; Douglas et al., 2001). Jedná se o opakovanou oblast s konvergentní evolucí – proto mohou v souvislosti s tímto markerem nastat problémy, když tento mechanismus selže a uvnitř jedince je více než jeden haplotyp.



Obr. 3: Jaderný marker *ITS* (Embong et al., 2008)

1.4.2.2. Mitochondriální markery

Poloha jednotlivých vybraných markerů je znázorněna na obrázku č.4.

Cytochrom oxidáza – podjednotka I (DNA „barcoding“)

Cytochrom oxidáza – podjednotka I (*COXI*) patří mezi konzervované protein-kódující geny v živočišné mtDNA (Brown, 1985). V roce 1994 byly úspěšně navrženy univerzální primery LCO1490 a HCO2198 pro část kódující oblasti genu *COXI* (Folmer et al., 1994), které umožňují amplifikaci tohoto markeru téměř u všech živočišných druhů a hub.

Na základě těchto prumerů vznikl nový projekt tzv. „DNA barcoding“ (Hebert et al., 2003), který představuje nový a efektivní způsob pro identifikaci jednotlivých živočišných i rostlinných druhů. Jeho princip spočívá v možnosti vybrání krátké sekvence ze standardizované oblasti genomu, která může sloužit jako potřebný marker pro taxonomii nebo pro rychlou identifikaci daného druhu. Jedná se o sekvenci dlouhou 648 párů bází, která se nachází v blízkosti 5' konce oblasti mitochondriální cytochrom c oxidázy podjednotky I (*COXI*). Hlavním předpokladem této techniky je fakt, že mezidruhová variabilita je zhruba 10x větší než variabilita vnitrodruhová (konkrétně u *COXI* je vnitrodruhová variabilita menší než 1%, vzácně více než 2% a mezidruhová je větší než 10%). Z tohoto důvodu je tedy vhodná jako molekulární marker pro různé živočišné skupiny (Hebert et al., 2004; Smith et al., 2006; Shearer and Cofforth, 2007).

Oblasti ND2 a ND4

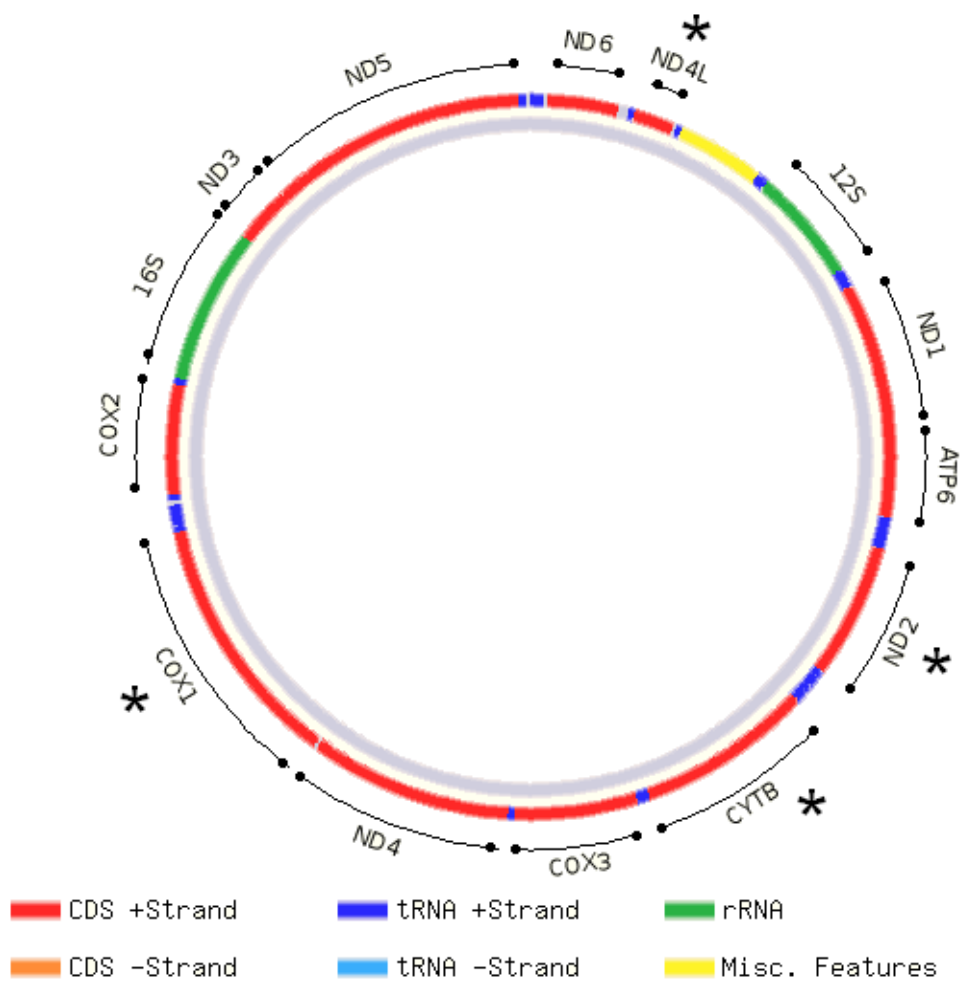
Jedná se o podjednotky NADH-dehydrogenázy, které jsou ve srovnání s ostatními mitochondriálními podjednotkami využívány méně často. Přesto byly již dříve využity, podjednotka *ND2* byla poprvé aplikovaná k analýze čeledi muchničkovitých (Molton, 2000), kdy nukleotidová variabilita činila 42,7 %. Využitím oblasti *ND4* byla u komplexu druhů *Simulium damnosum* zaznamenána variabilita 12,5 % (Tang et al., 1995).

Z těchto studií vyplývá, že tyto oblasti mitochondriálního genomu jsou vhodným molekulárním markerem s poměrně vysokou variabilitou u různých čeledí much, ale jsou také často využívány pro identifikaci čeledí mšic.

U hlístic však tyto oblasti byly studovány pouze pro fylogenetické účely, nikoli pro rozlišování jednotlivých druhů, a proto byly na základě literatury (Blouin 2001) vybrány pro tuto práci, aby byly otestovány, zda jsou vhodné pro studium taxonomie u hlístic.

Cytochrom B

Cytochrom B se vyskytuje v mitochondriích eukaryot, kde je součástí dýchacího řetězce. Je tedy běžně využíván, především pro svou vysokou variabilitu, jako mitochondriální marker pro určení fylogenetických vztahů mezi organismy. U rostlin a sinic se nevyskytuje, je zde však obdobný protein označován jako cytochrom B6 (Blankenship, 2009).



Obr. 4: Kruhová molekula mtDNA hlístic, studované oblasti označené hvězdičkou (<http://amiga.cbmeg.unicamp.br>)

Cíle práce

1) Na základě literatury posoudit vhodnost jednotlivých molekulárních markerů u entomopatogenních nematod.

2) Ověřit vhodnost vybraných markerů pro druhovou identifikaci v rámci rodu *Steinernema*.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Veškerý analyzovaný materiál poskytl RNDr. Vladimír Půža, Ph.D (Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav), který se svými zahraničními kolegy prováděl terénní sběr vzorků a jejich následnou druhovou identifikaci. Přehled jednotlivých vzorků je uveden v tabulce 1.

Tab. 1: Seznam analyzovaných vzorků

Druh	Počet kmenů	Země sběru
<i>S. feltiae</i>	11	ČR, Irsko, Polsko, Kanada, Finsko, Algerie
<i>S. weiseri</i>	1	ČR
<i>S. sp., příbuzný S. weiseri</i>	1	ČR
<i>S. litorále</i>	1	Japonsko
<i>S. xueshanense</i>	1	Čína
<i>S. cholashanense</i>	1	Čína
<i>S. aciari</i>	1	Japonsko
<i>S. jollieti</i>	1	USA
<i>S. kushidai</i>	1	Japonsko
<i>S. monticolum</i>	1	Japonsko
<i>S. sp., příbuzný S. monticolum</i>	1	Rusko
<i>S. xinbinense</i>	1	Japonsko
<i>S. carpocapsae</i>	2	Rusko, Polsko
<i>S. ichnusae</i>	1	Sardinie
<i>S. kraussei</i>	5	ČR, Bulharsko, Německo
<i>S. arenarium</i>	1	Slovensko
<i>S. intermedium</i>	7	USA
<i>S. affine</i>	6	ČR, Francie
<i>S. oregonense</i>	1	Kreton
<i>S. akhursti</i>	1	Čína
<i>S. glaseri</i>	2	USA
<i>S. poinari</i>	1	ČR

Detailnější tabulka pro jednotlivé kmeny je umístěná v Příloze 1

3.2. Extrakce DNA

Získané vzorky byly ihned po sběru zamrazeny při – 80°C a dále byly skladovány v mrazícím boxu do jejich dalšího použití. Extrakce DNA byla u všech vzorků provedena pomocí extrakčního pufru. K izolaci DNA byly použity výhradně samice hlístic, které jsou několikrát větší než samci, a proto obsahují větší množství DNA. DNA byla izolována vždy z jedné samice.

3.2.1. Extrakce pomocí extrakčního pufru (Cox and Hebert, 2001; Frati et al., 2001)

Pipetou s aerosolovou špičkou, která zabraňuje případné kontaminaci vzorku, bylo odebráno 20 µl extrakčního pufru (885µl ddH₂O; 100µl 10x PCR pufr s MgCl₂ (TopBio); 10µl 1% Tween 20; 5µl proteinázy K o koncentraci 100µg/ml) a následně bylo toto množství přidáno ke každému vzorku. Poté byly vzorky uloženy do mrazícího boxu o teplotě -20°C, kde byly ponechány po dobu 20 minut. Následovala inkubace po dobu 60 – 90 min při 65°C, závěrečným krokem byla inaktivace proteinázy K při 95°C po 8 minut. Takto vzniklá směs byla ponechána v mrazícím boxu při teplotě -20°C a připravena na další použití jako templát pro PCR.

3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR reakce byla vždy míchaná na ledu, do 0,2 ml zkumavky. Každá reakce se skládala z (množství uvedené pro jeden vzorek): 7,25µl ddH₂O, 1,25µl pufru, 1µl nukleotidů, 0,75µl primeru forward, 0,75 µl primeru revers a 0,1 µl Tag DNA polymerázy Unis (Top Bio). Celkový objem reakce byl vždy 11,1µl. Zpočátku bylo do reakce přidáváno i činidlo BSA (Bovine Serum Albumine 20mg/ml, Fermentas), které by mělo zvyšovat stabilitu reakce, ale bez jeho použití bylo paradoxně dosaženo lepších výsledků.

3.3.1. Primery pro amplifikaci vybraných oblastí genomu

a) mitochondriální markery

Pro úsek z mitochondriálního genu pro cytochrom oxidázu - podjednotka I (*COXI*) byly použity standardní primery pro „DNA barcoding“ (Folmer et al. 1994). Amplifikací tohoto fragmentu jsem ověřovala úspěšnost DNA extrakce (vzhledem k použité metodě nebylo možné stanovovat množství DNA spektrofotometricky).

Výběr nejvhodnějšího markeru z mtDNA byl proveden na základě analýzy variability mitochondriálních genů kódujících proteiny, delších než 500bp. Pro tento účel byly použity sekvence *Steinernema carpocapsae* (NC 005941), *Strongyloide stercoralis* (NC 005143) a *Ascaris suum* (NC 001327), analýza byla provedena v programu DNAsp, metodou „klouzavého okénka“. Pro vybrané úseky pak byly navrženy primery v programu PrimerSelect (programový balíček Lasergene).

Úsek označovaný jako *CytB* byl amplifikován pomocí 2 dvojic univerzálních primerů, 3 primery byly vybrány na základě literatury (Simons et al. 1994, 2006), jeden navržen v naší laboratoři.

Následně byly testovány primery pro další oblasti mtDNA, které byly navrženy v naší laboratoři. Nejprve byly vybrány primery pro oblast *ND4*.

Poslední testovanou oblastí mitochondriálního genomu byla dosud málo prostudovaná oblast *ND2*. Pro tuto oblast byly aplikovány tři dvojice primerů, přičemž jedna z nich - primery ND2for1/ND2rev1 se ukázaly jako velmi vhodné pro další použití v prováděném výzkumu.

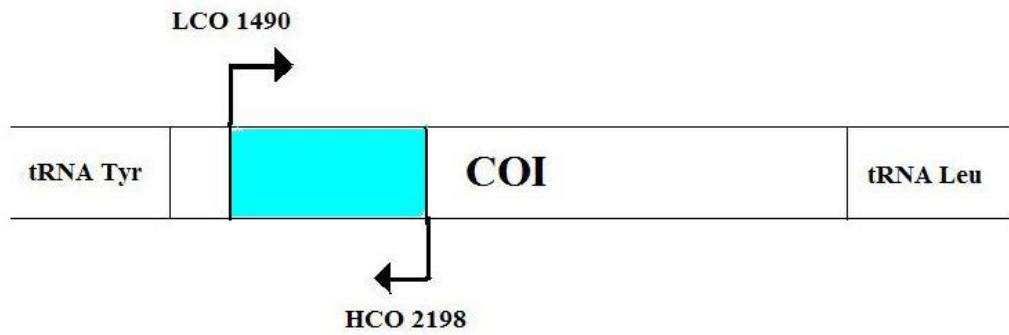
b) jaderný marker *ITS*

Pro úsek jaderného genomu, konkrétně pro oblast *ITS*, byly použity čtyři dvojice primerů vybrané na základě literatury (White et al. 1992, Hominick et al. 1997, Vrain et al. 1992). Jedna z nich (18S/28S) se opět osvědčila jako velmi vhodná pro další použití. Jednotlivé aplikované primery jsou znázorněny v tabulce 2 a místa jejich nasednutí na DNA na Obr. 5.

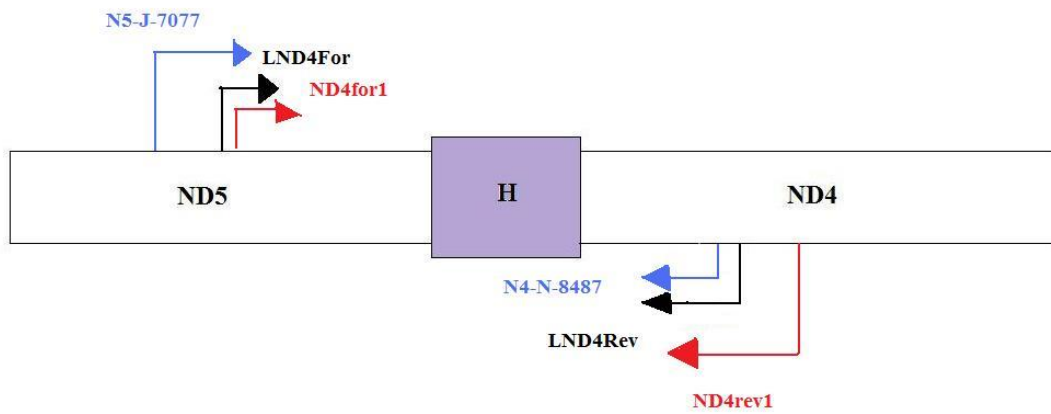
Tab. 2: Přehled všech použitých primerů

Gen	Primer	Typ	Typ sekvence primeru 5' → 3'	Publikováno
<i>COXI</i>	LCO 1490	F	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	Folmer et al. 1994
	HCO 2198	R	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT	Folmer et al. 1994
<i>ND4</i>	ND4for1	F	CTT TTT ATC TTA GGC GTA GTA	Žurovcová et al. 2012
	ND4rev1	R	CTG AAA CAA AAG ACA AAG AAG G	Žurovcová et al. 2012
	LND4For	F	GGC TGG CTT ATT ATT AAA ATT AG	Žurovcová et al. 2012
	LND4Rev	R	CAA AGA ATA ATA AAA AGA TAC CAA	Žurovcová et al. 2012
	N5-J-7077	F	TTA AAT CCT TWG ART AAA AYC C	Žurovcová et al. 2012
	N4-N-8487	R	TAT CAG CTA ATA TAG CAG CTC C	Simons et al. 1994, 2006
<i>ND2</i>	ND2for1	F	AAT ATT CTT GTT TGA TGG AGT GGT	Žurovcová et al. 2012
	ND2rev1	R	AAA AAG TAA AAG TAA AAG GTA T	Žurovcová et al. 2012
	ND2F	F	TAT TCT TGT TTG AGT GAG TG	Žurovcová et al. 2012
	ND2R	R	AAA TGA AAA ACT AAT TAT CCT CA	Žurovcová et al. 2012
	TM-J-210b	F	AAG CTA CTG GGT TCA TAC CC	Simons et al. 1994, 2006
	1460rev	R	GGC TGA AGT TTA GGC GAT AAA TTG TA	Žurovcová et al. 2012
<i>CytB</i>	N4-J-8944	F	GGA GTC TCA ACA TGA GCT TT	Simons et al. 1994, 2006
	CB-N-10920	R	CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC	Simons et al. 1994, 2006
	CB-J-10933	F	TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC	Simons et al. 1994, 2006
	AdelCytBr1 11340	R	AAA AAT ATC ATT CTG GTT GAA TAT GA	Žurovcová et al. 2012
<i>ITS</i>	ITSf2	F	TGA ACA TCG ACA TTT YGA ACG CA	White et al. 1992
	ITSr1	R	CTT TTC CTC CSC TTA YTR ATA TGC	White et al. 1992
	ITSf1	F	TAC ACA CCG CCC GTC GCT ACT A	White et al. 1992
	ITSr2	R	ATG TGC GTT CRA AAT GTC GAT GTT C	White et al. 1992
	AV 28	F	ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT	Hominick et al. 1997
	TW 81	R	GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC	Hominick et al. 1997
	18S	R	TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT	Vrain et al. 1992
	28S	F	TTTCAC TCG CCG TTA CTA AGG	Vrain et al. 1992

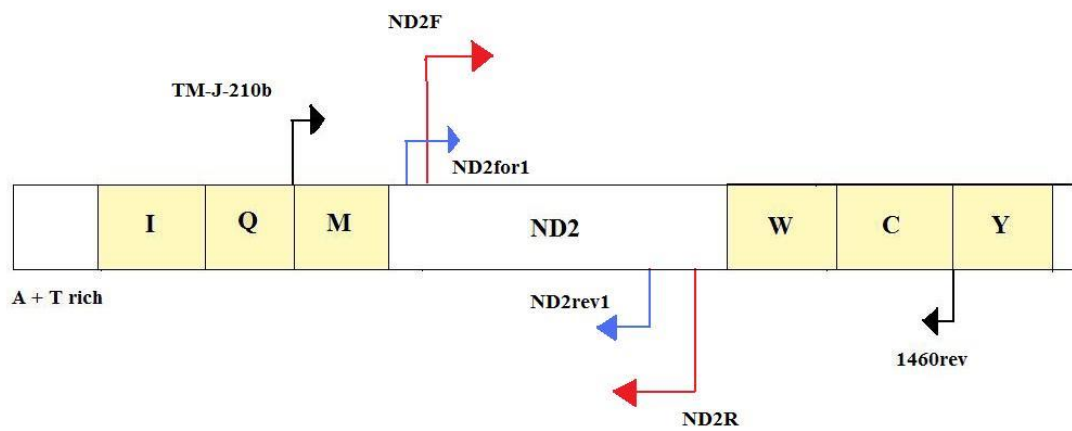
a)



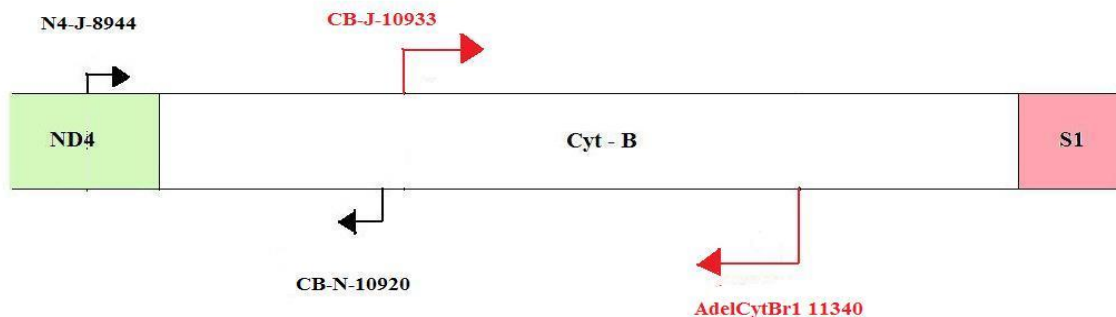
b)



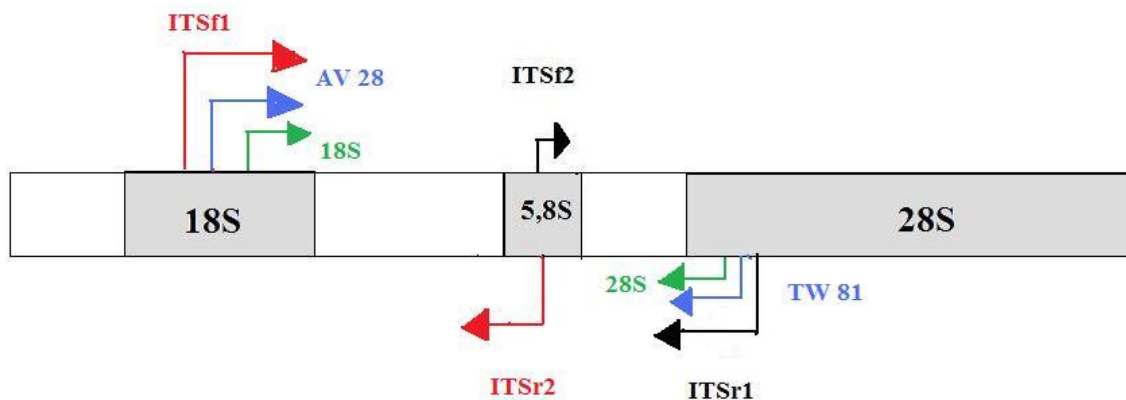
c)



d)



e)



Obr. 5: Místa nasedání primerů na DNA (a- oblast *COXI*, b- oblast *ND4*, c- oblast *ND2*, d- oblast *CytB*, e- oblast *ITS*)

3.3.2 PCR profily

Oblast *COXI* („Barcoding“)

Všechny provedené amplifikace proběhly za těchto kroků: predenaturace 94°C, 1 min., následovalo 35 cyklů (denaturace 94°C, 30 s, aneling 47°C, 35 s, elongace 72°C, 1 min. 30s), reakce byla ukončena postelongací 72°C, 1 min. 30s.

Oblast *ND2*

Provedené amplifikace probíhaly podle profilů, které se se lišily u jednotlivých dvojic primerů. Pro primery ND2F/ND2R byly kroky následující: predenaturace 94°C, 2

min., následovalo 35 cyklů (denaturace 94°C, 1 min, annealing 54°C, 30 s, elongace 68°C, 45 s), reakci opět ukončila postelongace 68°C, 2 min.

Pro primery TM-J-210b/1460rev byla reakce opět zahájena predenaturací 94°C, 2 min., následovalo 35 cyklů (denaturace 94°C, 1 min, annealing 57°C, 45 s, elongace 68°C, 1 min. 15s), reakci ukončila postelongace 68°C, 2 min.

Pro poslední dvojici primerů byly kroky následující: predenaturace 94°C, 2 min., následovalo 35 cyklů (denaturace 94°C, 1 min, annealing 52°C, 30 s, elongace 68°C, 45 s. 15s), reakci ukončila postelongace 68°C, 2 min.

Oblast *ND4*

Pro tuto oblast byly vybrány rovněž tři dvojice primerů. Provedené amplifikace probíhaly podle stejného profilu: predenaturace 94°C, 2 min., dále 35 cyklů (denaturace 94°C, 1 min, annealing 30 s, elongace 68°C, 45 s), reakci ukončila postelongace 68°C, 2 min. U jednotlivých dvojic primerů se však lišila teplota annealingu. Pro primery ND4for1/ND4rev1 byla tato teplota nastavena na 53°C, pro primery LND4For/LND4Rev na 56°C, a pro dvojici N5-J-7077/ N4-N-8487 byla teplota annealingu navržena na 59°C.

Oblast *CytB*

Prováděné amplifikace rovněž probíhaly podle následujícího profilu, který byl totožný pro obě použité dvojice primerů (N4-J-8944/ CB-N-10920 a CB-J-10933/11340): predenaturace 94°C, 2 min., dále 35 cyklů (denaturace 94°C, 1 min, annealing 55°C 30 s, elongace 68°C, 2 min), reakci ukončila postelongace 68°C, 2 min.

Oblast *ITS*

Pro jednotlivé amplifikace byly navrženy následující profily. Primery AV28/TW81: predenaturace 94°C, 2 min, následovalo 35 cyklů (denaturace 94°C, 30 sec, annealing 50°C, 1 min, elongace 72°C, 1 min 30 sec), závěrnou fází byla opět postelongace 72°C, 10 min.

Pro primery ITSr1/ITSf2 a primery ITSr2/ITSf1 byl použit stejný profil: predenaturace 94°C, 1 min, následovalo 35 cyklů (denaturace 94°C, 30 sec, annealing 55°C, 45 sec, elongace 60°C, 1 min), závěrnou fází byla postelongace 72°C, 2 min.

U primerů 18S/28S, které se osvědčily, jako vhodné markery byl zvolen profil: predenaturace 94°C, 7 min, následovalo 35 cyklů (denaturace 94°C, 1 min, annealing 50°C, 1 min, elongace 72°C, 1 min), reakci ukončila opět postelongace 72°C, 10 min.

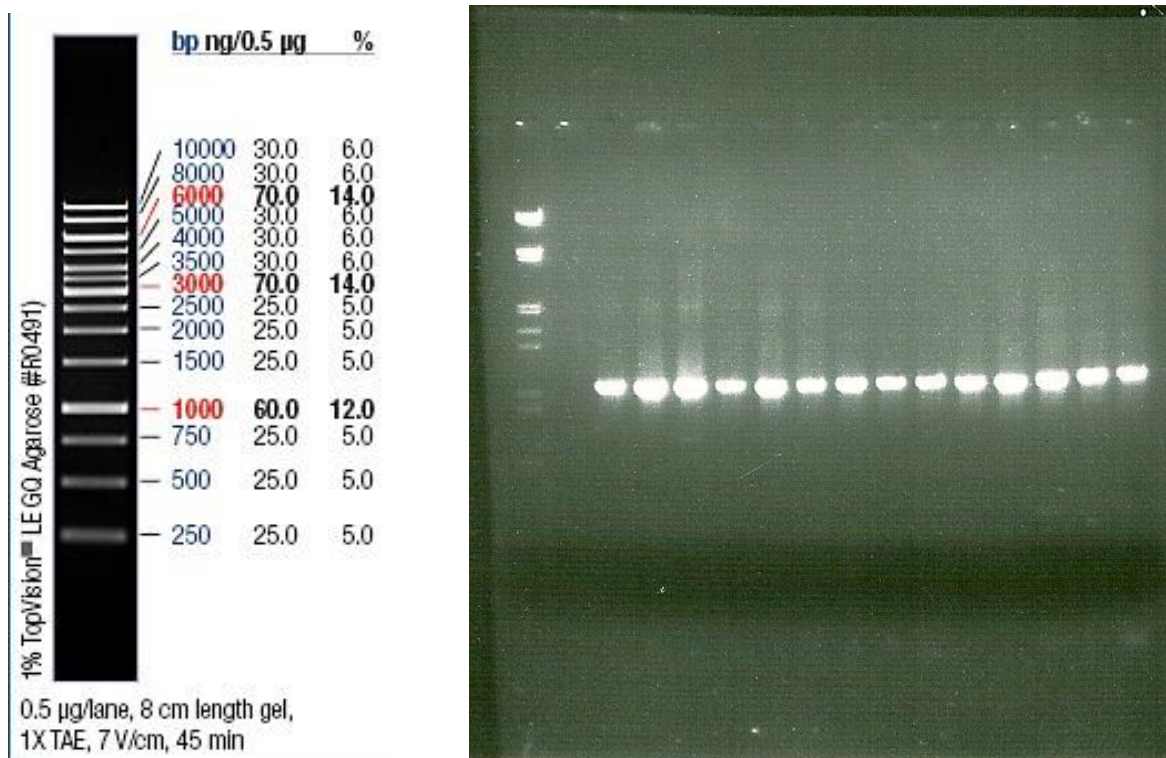
3.4. Gelová elektroforéza

Po proběhnuté PCR reakci bylo nutné ověřit její úspěšnost, k čemuž byla využita elektroforetická verifikace, pomocí které byla rovněž zjištěna velikost a množství DNA fragmentu. Probíhala na 2% agarozovém gelu, který byl připraven rozpuštěním 4g agarozy ve 200ml 1x TAE pufru (zásobní roztok 50x TAE pufr: 121 g TRIS; 28,55 ml kyseliny octové; 50 ml 0,5M EDTA pH 8,0; 421,45 ml H₂O) a následným rozpuštěním v mikrovlnné troubě po dobu cca 2 - 3 minuty.

Poté byl gel zchlazen pod proudem tekoucí vody na 45 °C. Do takto zchlazeného gelu bylo přidáno 15 µl ethidium bromidu o koncentraci 0,5µg/µl. Dalším krokem bylo nalití gelu do připravené formy a následné umístění hřebínků, které zajistily vznik jamek. Hotový ztuhlý gel byl uložen do nádoby s 1x TAE puftrem a vložen do lednice, kde byl při 4°C uchováván pro další použití.

Na připravený gel byly nanесeny 2µl PCR produktu smíchaného se 2 µl Loading Dye (700 µl ddH₂O, 300 µl 100% glycerolu, 0,5 mg bromfenolové modři). Elektroforéza běžela při pokojové teplotě, při napětí 120V přibližně 45 min. Pro porovnání množství a velikosti PCR produktu byl do první jamky gelu nanесen velikostní marker Lambda 17 DNA/EcoRI+Hind III (FERMENTAS).

Po proběhnutí elektroforézy byl rozdělený PCR produkt pozorován pod UV transiluminátorem. Výsledkem je fotografie gelu, která je znázorněna na Obr. 6.



Obr. 6: Vlevo Lambda DNA/EcoRI+Hind III marker, vpravo výsledná fotografie rozdělených PCR produktů. SM Lambda DNA/EcoRI+Hind III marker, K kontrolní PCR reakce bez DNA, 1-14 úspěšně amplifikované testované vzorky fragmentu *ITS* (1-11 *S. feltiae*, 12-14 *S. xinbinense*)

3.5. Přečištění vzorku pomocí metody ExoSap

Po ověření úspěšnosti amplifikace daného fragmentu musel být PCR produkt přečištěn. K tomu byla využita metoda ExoSap (Dugan et al., 2002), při které bylo k PCR produktu (cca 9 µl) přidáno 0,5 µl ddH₂O, 0,5 µl Exo a 1 µl Sap. Míchání probíhalo na ledu, vzorek byl po přidání činidel zvortexován a následně inkubován v cycleru při 37 °C 30 min a při 80 °C 15 min. Takto vzniklý produkt byl použit na sekvenační reakci

3.6. Analýza sekvencí

Sekvence proběhla na přístroji ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) v laboratoři genomiky na Ústavu molekulární biologie rostlin, BC AV ČR. Vzorek byl před sekvenací namíchan do 0,2ml zkumavky na celkový objem 7,5 µl, přičemž bylo do zkumavky napipetováno 6,5 µl dd H₂O, 0,5 µl přečištěného PCR produktu a 0,5 µl primeru ředěného v poměru 1 µl primeru : 19 µl ddH₂O.

Dalším způsobem zpracování přečištěných vzorků bylo jejich odeslání do firmy SEQme. Vzorky musely být před odesláním namíchaný následovně: do 0,6ml zkumavky bylo nepipetováno 5 μ l přečištěného PCR produktu a 5 μ l primeru (který byl ředěný v poměru 1 μ l primeru : 19 μ l ddH₂O).

3.7. Statistické zpracování sekvencí

Kontrolní identifikace sekvencí byla prováděna pomocí databáze NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sekvence byly dále vizuálně zkontrolovány a v případě potřeby opraveny v programu Mega 5 (Tamura et al., 2011). Program MEGA 5 byl použit také pro tvorbu alignmentů (vytvořeny metodou ClustalW). U kódujících oblastí byl zohledněn čtecí rámeček, u nekódujících oblastí ITS byla zohledněna RNA a spacers byly následně opraveny podle vizuálního vyhodnocení. Dále byla v tomto programu vypočtena průměrná délka a nukleotidové složení sekvencí, určen počet variabilních míst, parsimoniální variabilita a genetická vzdálenost, použit byl Kimura2-Parameter, který je používán jako standardní model.

Pomocí metody Neighbour-Joining (NJ) na základě modelu genetické vzdálenosti Kimura2-Parametr byly vytvořeny dendrogramy. Metoda NJ byla zvolena podle jejího ověřeného použití pro „DNA barcoding“. Následně byly vytvořeny další dendrogramy za použití metody Maximum Likelihood (ML), která byla zvolena jako alternativní metoda pro srovnání vytvořené topologie. Mezery (gaps) byly u genu *ND2* považovány za chybějící data, proto byla při tvorbě dendrogramu použita volba „Complete deletion“. U markeru *ITS* byly gaps brány jako variabilita, nikoliv jako chybějící data, proto byla použita volba „Pairwise deletion“. Statistická podpora stromu byla následně testována metodou bootstrap (1000 opakování).

Pro tvorbu histogramů vnitrodruhové a mezidruhové variability byly využity výsledky z programu TaxonDNA (Meier et al., 2006) (metoda „pairwise summary“), které byly následně zpracovány v programu Microsoft Excel.

Analýza haplotypů a jejich frekvencí byla provedena pomocí programu DnaSP ver. 5 (Rozas J., Librado P., 2009), který byl použit již v přípravné fázi pro srovnávání mitochondriálních genomů metodou „klouzavého okénka“.

4. Výsledky

4.1. Testované markery

Pro tuto práci byly vybrány 3 mitochondriální markery a 1 jaderný marker. Úspěšnou amplifikaci a následnou sekvenaci se podařilo provést u 2 mitochondriálních oblastí, a to u oblasti *ND2* a také u oblasti *COXI* (oblast *COXI* byla zvolena jen k ověřování množství získané DNA, nikoli k otestování variability) a u testované jaderné oblasti *ITS*. Zvolené markery pro oblasti *ND4* a *CytB* se ukázaly jako nevhodné, i když se u oblasti *ND4* podařilo úspěšně provést amplifikaci, sekvence se získat nepodařilo.

Tato práce byla následně zaměřena na porovnání vhodnosti a účinnosti úspěšně zvolených markerů (jaderný *ITS* a mitochondriální *ND2*) při druhové identifikaci entomopatogenních hlístic čeledi Steinernematidae. Celkem bylo analyzováno 225 jedinců.

4.2. Charakteristika fragmentu genu *ITS*

U oblasti genu *ITS* bylo analyzováno 37 sekvencí ze 17ti druhů. Úspěšně se podařilo osekvenovat 29 sekvencí z 9ti druhů (zbylých 8 sekvencí pro kmeny KUM (AF122017.1), ISHI (AY787660.1), AICHI (JF892546.1), DEG (FJ666052.1), GAR (EF431959.1), KUSH GQ497741.1), SARD EU421129.1) a SIS AF122019.1 bylo převzatých z databáze GenBank - www.ncbi.nlm.nih.gov). Sekvence byly následně upraveny na jednotnou délku 1101 bp. Byl vypočten počet variabilních míst, který je 663 což představuje 60,2% z celkové délky sekvence. Dále byla vypočtena hodnota pro parsimoniální variabilitu, která je 565 tj. 51,3% z celkové sekvence.

Dále byly vypočteny frekvence nukleotidů a jejich průměrné frekvence, které jsou uvedené v tabulce 3. Podrobnější informace o poměrech mezi nukleotidy jsou uvedeny v Příloze 2. Průměrné zastoupení nukleotidů je 33,4% T, 18,0% C, 25,3% A, 23,7% G, přičemž největší rozdíl mezi AT a GC je u druhu *S. intermedium* (AT/GC = 63,5/36,4).

Tab. 3: Frekvence nukleotidů u oblasti ITS.

Druh	Průměrné frekvence nukleotidů (%)				
	T(U)	C	A	G	Celkem
<i>S. intermedium</i>	38,5	15,3	25,3	21,1	884,1
<i>S. weiseri</i>	34,3	17,4	25,7	46,4	856,0
<i>S. feltiae</i>	33,3	17,9	23,0	12,6	937,0
<i>S. kraussei</i>	32,1	18,6	26,1	23,2	947,0
<i>S. cholashanense</i>	31,4	19,4	25,7	23,6	976,0
<i>S. kushidai</i>	30,1	20,4	24,2	25,3	995,0
<i>S. xinbinense</i>	32,4	18,8	25,3	23,6	976,0
<i>S. carpocapsae</i>	35,2	16,9	25,0	22,9	933,0
<i>S. monticolum</i>	31,3	17,4	27,4	23,9	916,0
příbuzný <i>S. monticolum</i>	32,0	16,7	27,4	23,9	880,0
<i>S. aciari</i>	30,2	20,6	23,9	25,3	994,0
<i>S. litorale</i>	32,7	18,0	26,6	22,7	966,0
<i>S. xueshanense</i>	35,1	17,7	25,0	22,1	795,0
<i>S. ichnusae</i>	35,7	17,9	24,8	21,6	793,0
<i>S. poinari</i>	38,3	16,0	25,0	20,7	849,0
<i>S. akhursti</i>	31,4	19,5	25,1	24,0	970,0
<i>S. oregonense</i>	31,7	19,3	25,5	23,5	968,0
<i>S. affine</i>	37,1	16,5	25,2	21,0	998,0
<i>S. feltiae</i>	33,4	17,9	25,8	23,0	937,0
Průměr	33,4	18,0	25,3	23,7	924,7

Podrobnější tabulka pro jednotlivé kmeny viz. Příloha 2

Nakonec byly vypočteny genetické vzdálenosti uvnitř a mezi druhy. Tyto hodnoty jsou uvedené v tabulce 4 a v tabulce 5. Nejmenší vnitrodruhovou vzdálenost má druh *S. feltiae*, největší *S. intermedium*. U mezidruhové vzdálenosti byla nejnižší hodnota 0,020 a to mezi druhy *S. aciari* a *S. kushidai*, naopak největší mezidruhová vzdálenost s hodnotou 0,577 se objevila mezi druhy *S. oregonense* a *S. poinari*.

Tab. 4: Vnitrodruhové genetické vzdálenosti u ITS

Druh	Průměrná vzdálenost	Směrodatná odchylka
<i>S. feltiae</i>	0,012	0,002
<i>S. weiseri</i>	0,023	0,006
<i>S. kraussei</i>	0,032	0,004
<i>S. litorale</i>	n/c	n/c
<i>S. xueshanense</i>	n/c	n/c
<i>S. cholashanense</i>	n/c	n/c
<i>S. ichnusae</i>	n/c	n/c
<i>S. xinbinense</i>	n/c	n/c
<i>S. monticolum</i>	n/c	n/c
<i>S. monticolumlike</i>	n/c	n/c
<i>S. affine</i>	0,032	0,005
<i>S. intermedium</i>	0,044	0,005
<i>S. poinari</i>	n/c	n/c
<i>S. akhursti</i>	n/c	n/c
<i>S. oregonense</i>	n/c	n/c
<i>S. aciari</i>	n/c	n/c
<i>S. kushidai</i>	n/c	n/c
<i>S. carpocapsae</i>	n/c	n/c

n/c – u druhu byl osekvenován pouze jeden jedinec, průměr tedy nebyl vypočten

Tab. 5: Mezidruhové genetické vzdálenosti u ITS (směrodatné odchylky modře)

Druh	<i>S. felt.</i>	<i>S. weis.</i>	<i>S. krau.</i>	<i>S. lit.</i>	<i>S. xues.</i>	<i>S. chol.</i>	<i>S. ichn.</i>	<i>S. xin.</i>	<i>S. mon.</i>	<i>S. mon2.</i>	<i>S. aff.</i>	<i>S. int.</i>	<i>S. poi.</i>	<i>S. akh.</i>	<i>S. ore.</i>	<i>S. aci.</i>	<i>S. kus.</i>	<i>S. carp.</i>
<i>S. felt.</i>		0,006	0,009	0,006	0,011	0,008	0,007	0,009	0,018	0,018	0,031	0,032	0,037	0,013	0,010	0,021	0,021	0,024
<i>S. weis.</i>	0,049		0,009	0,005	0,010	0,008	0,007	0,009	0,019	0,020	0,033	0,034	0,039	0,013	0,009	0,023	0,023	0,026
<i>S. krau.</i>	0,093	0,088		0,009	0,011	0,006	0,010	0,006	0,019	0,019	0,031	0,031	0,037	0,013	0,009	0,022	0,021	0,025
<i>S. lit.</i>	0,051	0,034	0,097		0,011	0,009	0,007	0,009	0,017	0,018	0,033	0,033	0,040	0,013	0,010	0,020	0,020	0,024
<i>S. xues.</i>	0,104	0,088	0,090	0,093		0,007	0,011	0,011	0,022	0,021	0,034	0,033	0,037	0,014	0,011	0,025	0,025	0,029
<i>S. chol.</i>	0,074	0,063	0,055	0,081	0,036		0,009	0,007	0,016	0,017	0,031	0,032	0,039	0,013	0,009	0,020	0,020	0,025
<i>S. ichn.</i>	0,038	0,039	0,095	0,038	0,090	0,072		0,010	0,020	0,021	0,035	0,035	0,039	0,014	0,010	0,025	0,025	0,028
<i>S. xin.</i>	0,081	0,077	0,052	0,086	0,077	0,048	0,086		0,020	0,018	0,031	0,031	0,038	0,013	0,009	0,021	0,021	0,026
<i>S. mon.</i>	0,221	0,218	0,233	0,210	0,252	0,195	0,231	0,231		0,006	0,034	0,034	0,040	0,018	0,018	0,020	0,020	0,021
<i>S. mon2.</i>	0,234	0,227	0,227	0,209	0,245	0,207	0,237	0,219	0,032		0,033	0,034	0,039	0,017	0,018	0,021	0,021	0,022
<i>S. aff.</i>	0,521	0,519	0,531	0,537	0,497	0,542	0,507	0,523	0,553	0,540		0,004	0,007	0,028	0,032	0,032	0,032	0,032
<i>S. S. int.</i>	0,506	0,506	0,512	0,509	0,497	0,508	0,507	0,497	0,518	0,516	0,041		0,005	0,028	0,032	0,031	0,031	0,033
<i>S. poi.</i>	0,541	0,543	0,554	0,564	0,527	0,559	0,539	0,547	0,577	0,549	0,054	0,046		0,033	0,039	0,035	0,036	0,039
<i>S. akh.</i>	0,178	0,167	0,166	0,168	0,146	0,141	0,165	0,144	0,255	0,228	0,506	0,466	0,508		0,013	0,017	0,018	0,021
<i>S. ore.</i>	0,109	0,093	0,091	0,100	0,084	0,078	0,091	0,079	0,251	0,228	0,546	0,513	0,577	0,124		0,020	0,020	0,024
<i>S. aci.</i>	0,332	0,334	0,336	0,305	0,339	0,301	0,341	0,302	0,294	0,276	0,540	0,505	0,554	0,239	0,273		0,004	0,021
<i>S. kus.</i>	0,331	0,330	0,335	0,301	0,341	0,304	0,340	0,302	0,292	0,276	0,542	0,504	0,555	0,252	0,270	0,020		0,020
<i>S. carp.</i>	0,379	0,377	0,382	0,352	0,399	0,369	0,378	0,375	0,333	0,319	0,529	0,523	0,568	0,317	0,355	0,299	0,301	

S. felt.-*S. feltiea*, *S. weis.*-*S. weiseri*, *S. krau.*-*S. kraussei*, *S. lit.*-*S. litorale*, *S. xues.*-*S. xueshanense*, *S. chol.*-*S. cholashanense*, *S. ichn.*-*S. ichnusae*, *S.xin.*-*S. xinbinense*, *S. mon.*-*S. monticolum*, *S.mon2.*- příbuzný *S. monticolum*, *S. aff.*-*S. affine*, *S. poi.*-*S. pionari*, *S. akh.*-*S. akhursti*, *S. ore.*-*S. oregonense*, *S. aci.*-*S. aciari*, *S. kus.*-*S. kushidai*, *S. carp.*-*S.carpocapsae*

Ve 37 analyzovaných sekvencích se vyskytovalo 32 různých haplotypů, které byly rozděleny rovnoměrně mezi jednotlivé druhy. Dále byly vypočteny haplotypové diverzity u jednotlivých druhů, všechny hodnoty jsou zaznamenány v tabulce 6.

Tab. 6: Haplotypové diverzity u *ITS*

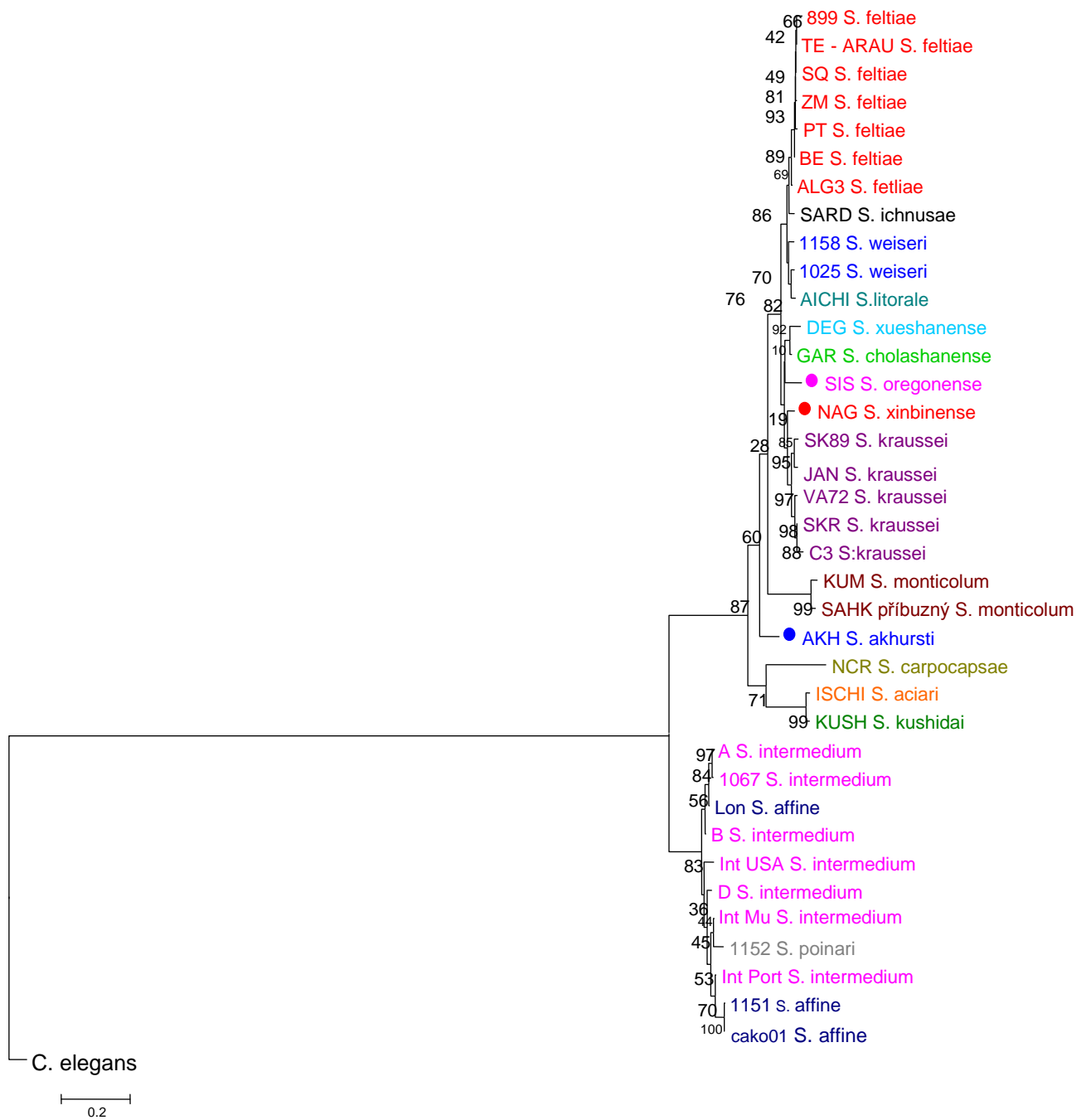
Druh	Počet haplotypů	Haplotypová diverzita
<i>S. feltiae</i>	6	0,952
<i>S. weiseri</i>	2	1
<i>S. kraussei</i>	4	0,9
<i>S. affine</i>	2	0,667
<i>S. intermedium</i>	6	0,952
<i>S. litorale</i>	1	n/c
<i>S. poinari</i>	1	n/c
<i>S. akhursti</i>	1	n/c
<i>S. oregonense</i>	1	n/c
<i>S. aciari</i>	1	n/c
<i>S. kushidai</i>	1	n/c
<i>S. carpocapsae</i>	1	n/c
<i>S. xueshanense</i>	1	n/c
<i>S. chaloshanense</i>	1	n/c
<i>S. ichnusae</i>	1	n/c
<i>S. xinbinense</i>	1	n/c
<i>S. monticolum</i>	1	n/c
příbuzný <i>S. monticolum</i>	1	n/c

n/c- u druhu byl osekvenován pouze jeden jedinec, haplotypovou diverzitu nebylo možné vypočítat

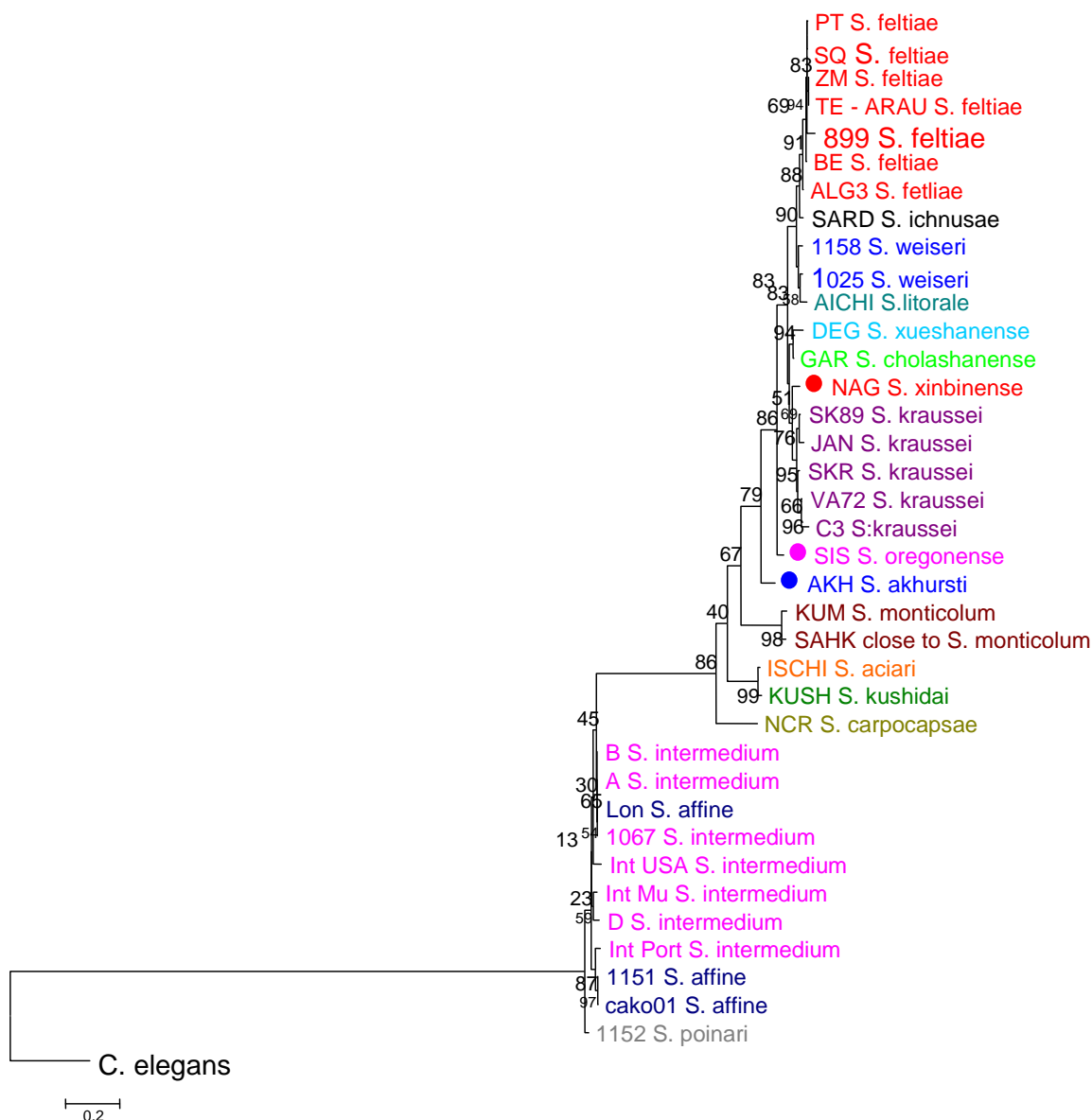
Detailnější tabulka rozložení haplotypů pro jednotlivé kmeny je umístěna v Příloze 3

Rozložení haplotypů je znázorněno i na vytvořených dendrogramech (Obr. 7 a Obr. 8), kdy jednotlivé druhy tvořily celistvé klastry s výjimkou druhů *S. affine* a *S. intermedium*, *S. weiseri* a *S. litorale*.

Topologie obou stromů vytvořených rozdílnými metodami byla velice podobná. Rozdíl můžeme pozorovat v podpoře jednotlivých větví, kdy u stromu vytvořeného metodou ML je výrazně větší podpora, kterou můžeme najít např. u druhu *S. feltiae* (bootstrap 90%) nebo *S. kraussei* (bootstrap 97%). V dendrogramech je rovněž patrné, že došlo ke spojení druhů *S. monticolum* a druhu, který je s ním příbuzný. V tomto případě byla podpora bootstrap 99% což potvrzuje jejich příbuznost.

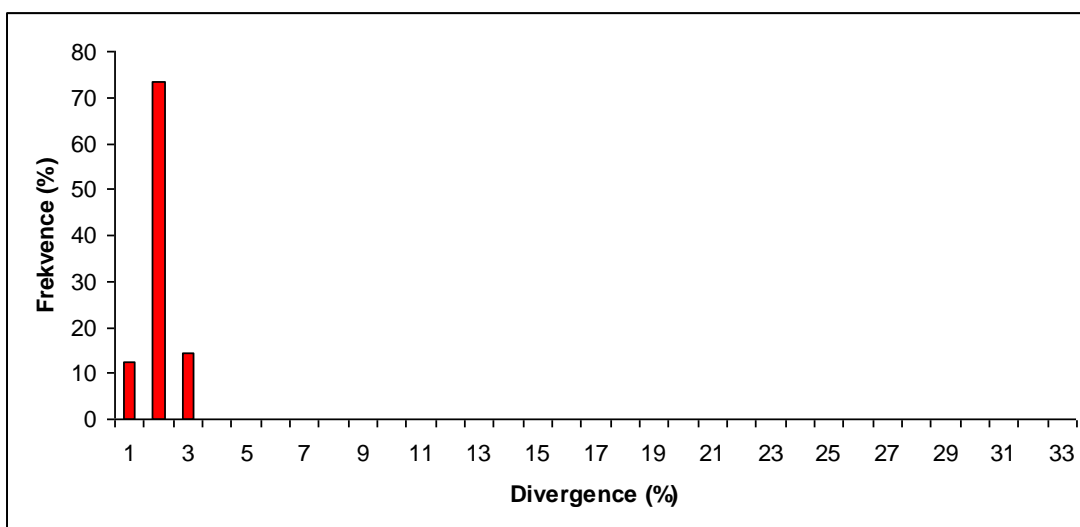


Obr. 7: Dendrogram *ITS* (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parametr, Pairwise deletion, Bootstrap 1000). Zakořeněný strom. Jako outgroup byla vybrána *C. elegans*. Jednotlivé druhy jsou odděleny barevně.

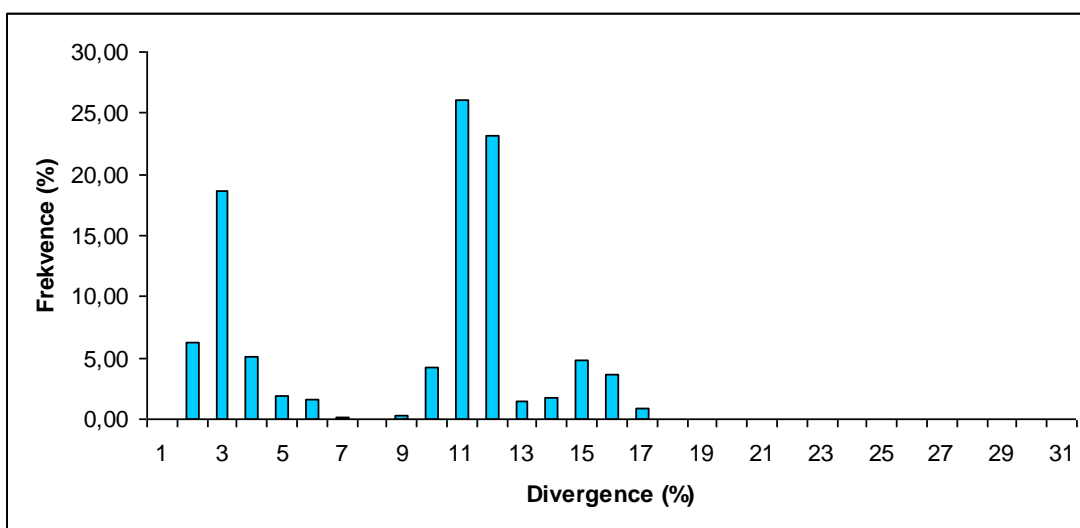


Obr. 8: Dendrogram *ITS* (Maximum Likelihood, Kimura 2-Parametr, Use all sites, Bootstrap 1000). Zakořeněný strom. Jako outgroup byla vybrána *C. elegans*. Jednotlivé druhy jsou odděleny barevně.

Vytvořené histogramy znázorňující vnitrodruhovou a mezidruhovou variabilitu jsou na Obr. 9 a na Obr. 10. Průměrná vnitrodruhová variabilita je 2,8 % a mezidruhová je 29,5 %.



Obr. 9: Vnitrodruhová variabilita genu ITS



Obr. 10: Mezdruhová variabilita genu ITS

4.3. Charakteristika fragmentu genu *ND2*

Cílovou oblast genu *ND2* se podařilo osekvenovat u 74 jedinců z 11ti druhů, poté byly sekvence upraveny na jednotnou délku 521 bp. Celkový počet variabilních míst je 337 což představuje 64,7% z celkové délky sekvence. Parsimoniální variabilita (neboli místa v sekvenci, která obsahují minimálně dva různé nukleotidy a alespoň dva z nich se vyskytují dvakrát) byla pozorována na 308 místech tj. 59,1% z celkové sekvence.

Dále byly vypočteny frekvence nukleotidů a průměrné frekvence pro jednotlivé druhy, které jsou zaznamenány v tabulce 7. Následně byly vypočteny poměry nukleotidů AT/GC, které jsou uvedené v detailnější tabulce v Příloze 4. Z této tabulky je patrné, že u stejných druhů jsou jednotlivé hodnoty velmi podobné, avšak mezi různými druhy se tyto hodnoty mohou značně lišit. Průměrné zastoupení nukleotidů je 51,5% T, 11,0% C, 24,2% A,

13,2% G, přičemž největší rozdíl mezi AT a GC je opět u druhu *S. intermedium* (AT/GC =83,3/16,6).

Tab. 7: Frekvence nukleotidů u ND2

Druh	Průměrné frekvence nukleotidů (%)				
	T(U)	C	A	G	Celkem
<i>S. intermedium</i>	54,6	7,5	28,7	9,1	497,0
<i>S. weiseri</i>	49,3	13,2	20,6	16,8	499,0
příbuzný <i>S. weiseri</i>	50,6	12,0	24,6	12,6	436,0
<i>S. kraussei</i>	48,1	13,1	24,4	14,2	396,0
<i>S. cholashanense</i>	44,8	14,8	25,9	14,5	440,0
<i>S. kushidai</i>	56,0	7,9	23,0	13,0	492,0
<i>S. ichnusae</i>	50,6	11,9	24,2	13,2	478,0
<i>S. carpocapsae</i>	56,3	7,7	22,5	13,5	440,0
<i>S. monticolum</i>	55,4	8,7	25,5	10,5	439,0
<i>S. litorale</i>	50,0	12,4	21,9	15,7	498,0
<i>S. feltiae</i>	50,4	12,2	25,4	11,8	486,0
Průměr	51,5	11,0	24,2	13,2	463,7

Podrobnější tabulka pro jednotlivé kmeny viz. Příloha 4

Poté byly spočítány genetické vzdálenosti uvnitř druhů, které jsou znázorněné v tabulce 8 a vzdálenosti mezidruhové v tabulce 9. Nejnižší hodnota vnitrodruhové vzdálenosti 0,006 se objevila u druhu *S. carpocapsae*, nejvyšší hodnota 0,191 u *S. kraussei*. U mezidruhové vzdálenosti byla nejnižší hodnota 0,258 a to mezi druhy *S. intermedium* a *S. monticolum*, naopak největší mezidruhová vzdálenost s hodnotou 0,558 se objevila mezi druhy *S. carpocapsae* a *S. cholashanense*.

Tab. 8: Vnitrodruhové genetické vzdálenosti u ND2

Druh	Průměrná vzdálenost	Směrodatná odchylka
<i>S. intermedium</i>	0,050	0,006
<i>S. weiseri</i>	0,141	0,014
<i>S. kraussei</i>	0,191	0,023
<i>S. litorale</i>	n/c	n/c
<i>S. cholashanense</i>	n/c	n/c
<i>S. kushidai</i>	0,017	0,003
<i>S. ichnusae</i>	0,030	0,006
<i>S. carpocapsae</i>	0,006	0,003
<i>S. feltiae</i>	0,053	0,005
<i>S. monticolum</i>	n/c	n/c

n/c – u druhu byl osekvenován pouze jeden jedinec, průměr tedy nebyl vypočten

Tab. 9: Mezidruhové genetické vzdálenosti u ND2 (směrodatné odchylky modře)

Druh	<i>S. inter.</i> ¹⁾	<i>S. weiseri</i>	<i>S. kraussei</i>	<i>S. litorale</i>	<i>S. chol.</i> ²⁾	<i>S. kushidai</i>	<i>S. ichnusae</i>	<i>S. carp.</i> ³⁾	<i>S. feltiae</i>	<i>S. mont.</i> ⁴⁾
<i>S. inter.</i> ¹⁾		0,029	0,028	0,033	0,038	0,030	0,029	0,036	0,030	0,027
<i>S. weiseri</i>	0,356		0,025	0,024	0,032	0,035	0,031	0,039	0,025	0,030
<i>S. kraussei</i>	0,326	0,286		0,029	0,030	0,036	0,029	0,039	0,027	0,032
<i>S. litorale</i>	0,371	0,276	0,310		0,036	0,037	0,028	0,040	0,026	0,033
<i>S. chol.</i> ²⁾	0,417	0,369	0,307	0,389		0,044	0,039	0,048	0,033	0,036
<i>S. kushidai</i>	0,340	0,427	0,403	0,422	0,498		0,035	0,011	0,034	0,034
<i>S. ichnusae</i>	0,357	0,375	0,325	0,301	0,435	0,417		0,039	0,025	0,032
<i>S. carp.</i> ³⁾	0,391	0,461	0,429	0,447	0,558	0,064	0,450		0,040	0,039
<i>S. feltiae</i>	0,341	0,302	0,305	0,270	0,373	0,401	0,271	0,463		0,030
<i>S. mont.</i> ⁴⁾	0,258	0,320	0,329	0,334	0,376	0,366	0,317	0,419	0,305	

1) *S. intermedium*, 2) *S. cholashanense*, 3) *S. carpocapsae* 4) *S. monticolum*

V 74 úspěšně získaných sekvencích se vyskytovalo celkem 44 různých haplotypů, které byly rozděleny rovnoměrně mezi druhy. Dále byly vypočteny haplotypové diverzity pro jednotlivé druhy, které jsou znázorněny v tabulce 10.

Tab. 10: Haplotypové diverzity u ND2

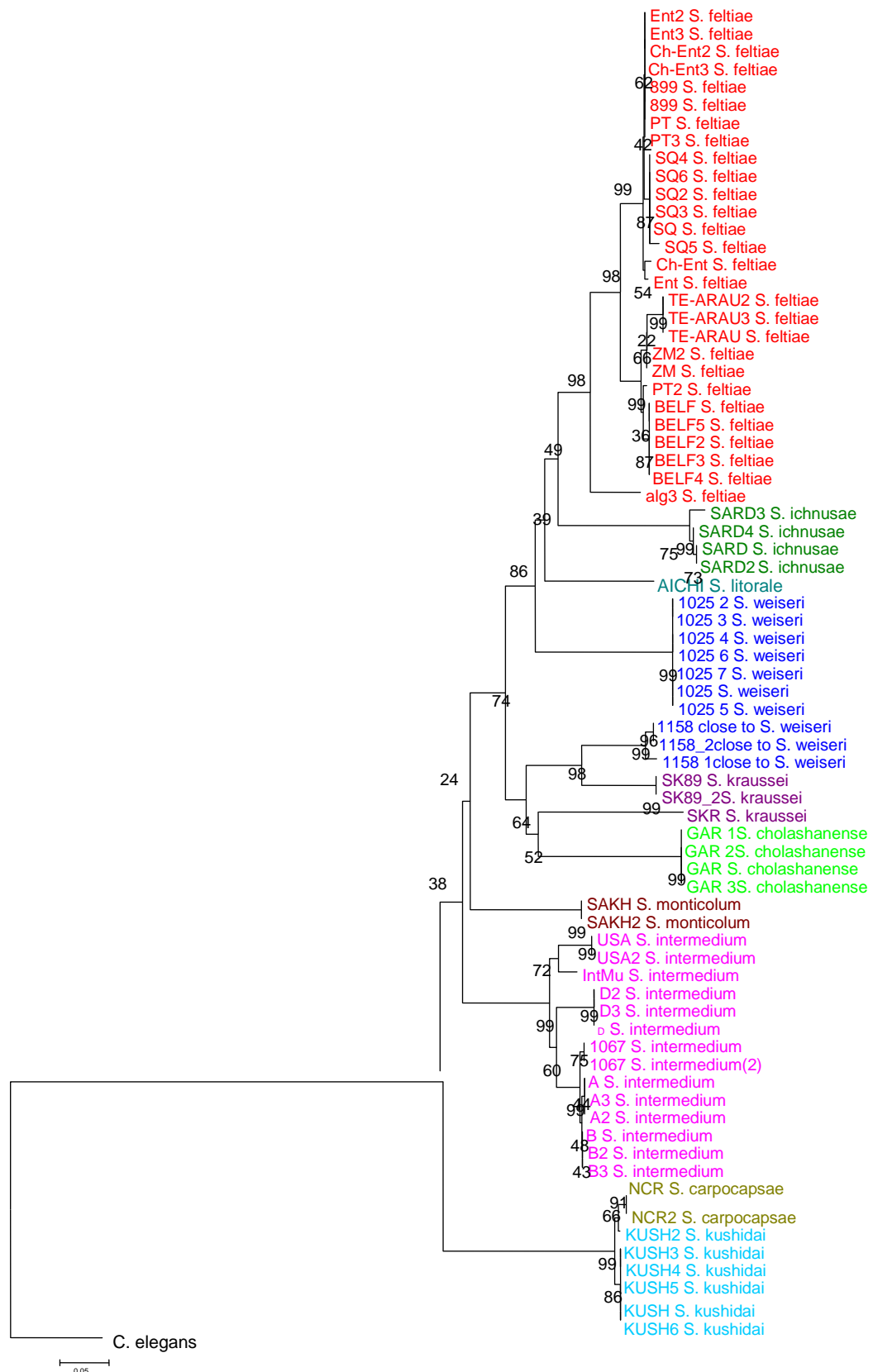
Druh	Počet haplotypů	Haplotypová diverzita
<i>S. intermedium</i>	9	0,934
<i>S. carpocapsae</i>	2	1,000
<i>S. cholashanense</i>	1	n/c
<i>S. feltiae</i>	16	0,947
<i>S. ichnusae</i>	3	0,833
<i>S. kraussei</i>	2	0,667
<i>S. kushidai</i>	6	1,000
<i>S. monticolum</i>	1	n/c
<i>S. weiseri</i>	1	n/c
příbuzný <i>S. weiseri</i>	2	0,667
<i>S. litorale</i>	1	n/c

n/c- u druhu byl osekvenován pouze jeden jedinec, haplotypovou diverzitu nebylo možné vypočítat

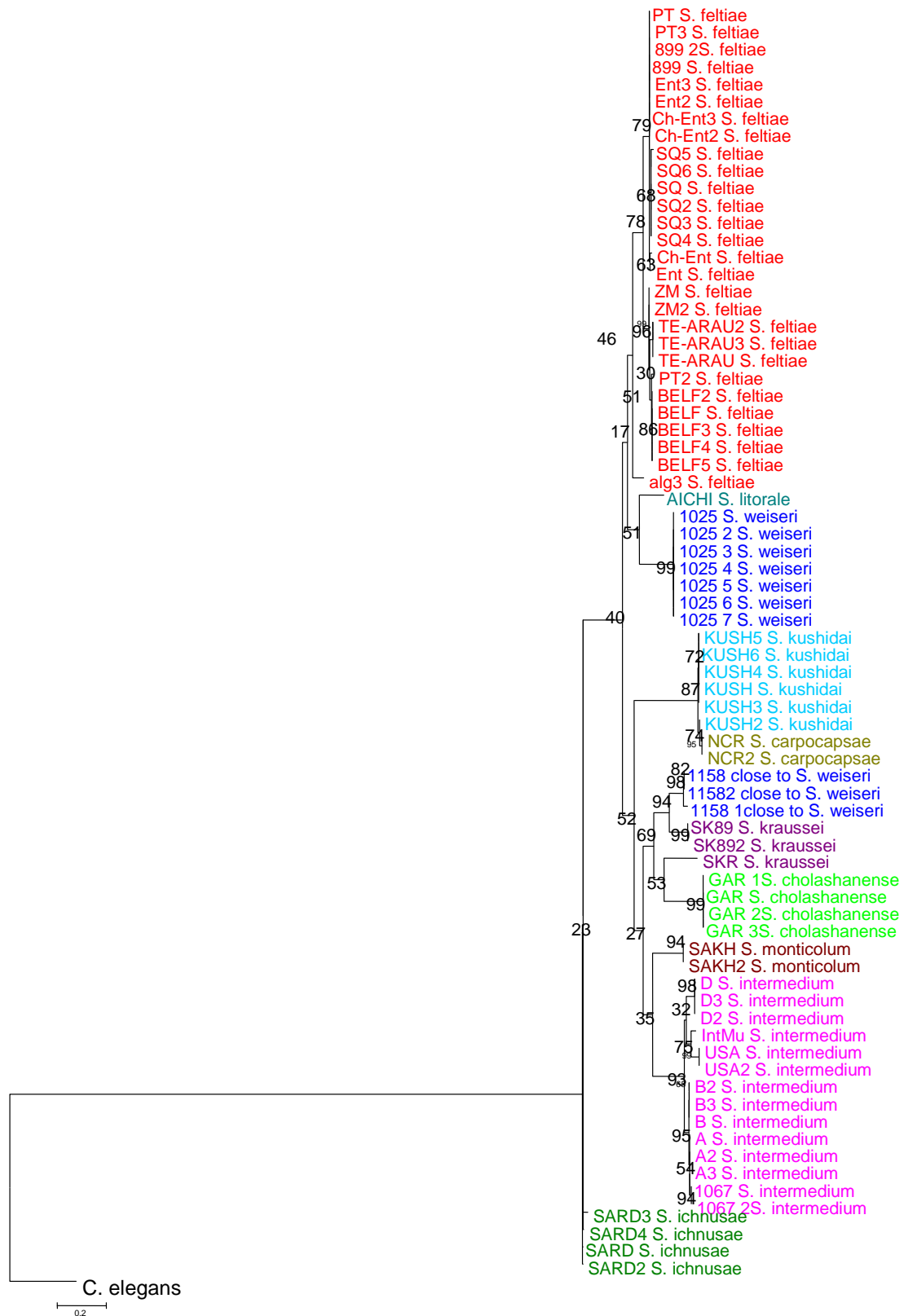
Detailnější tabulka pro jednotlivé kmeny je umístěna v Příloze 5

Rozložení haplotypů bylo možné pozorovat na vytvořených dendrogramech, znázorněných na Obr. 11 a Obr. 12, kdy jednotlivé druhy tvořily celistvé klastry s výjimkou druhů *S. carpocapsae* a *S. kushidai*.

Topologie obou stromů vytvořených rozdílnými metodami byla také velice podobná. Rozdíl byl opět pozorován v podpoře jednotlivých větví, kdy u stromu vytvořeného metodou NJ je výrazně větší podpora, kterou můžeme najít např. u druhu *S. feltiae* (bootstrap 98%), dále u druhů *S. ichnusae*, *S. intermedium*, *S. cholashanense*, *S. monticolum*, *S. weiseri*, *S. kraussei* (bootstrap 99%). Tato vysoká podpora u jednotlivých druhů svědčí o vhodnosti ND2 pro druhovou specifikaci.

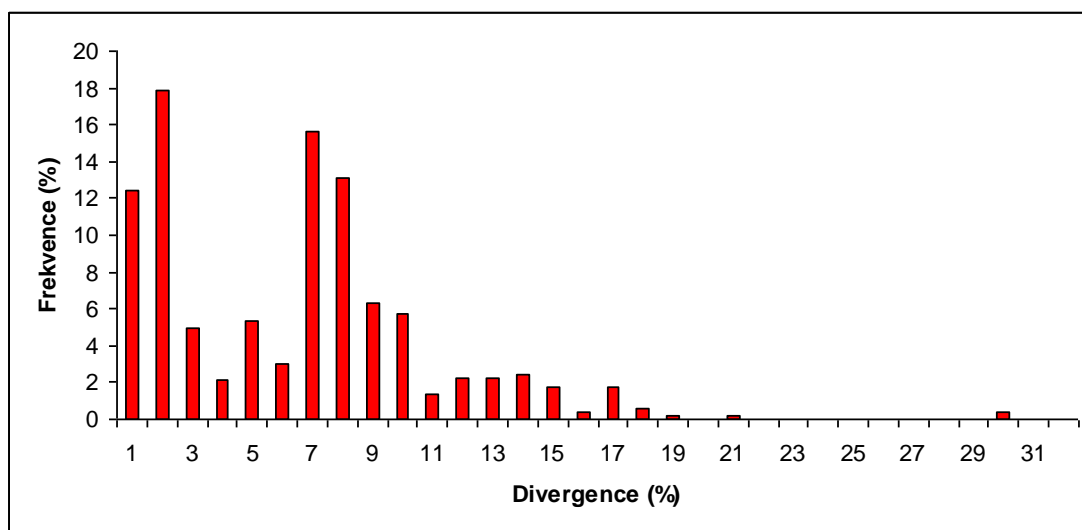


Obr. 11: Dendrogram *ND2* (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parametr, Complete deletion, Bootstrap 1000). Zakořeněný strom. Jako outgroup byla vybrána *C. elegans*. Jednotlivé druhy jsou odděleny barevně.

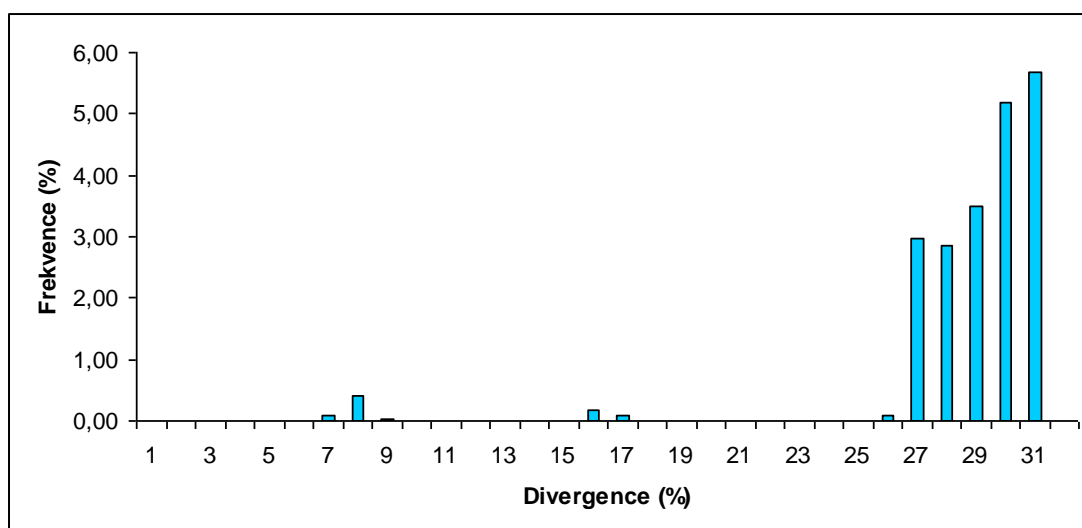


Obr. 12: Dendrogram ND2 (Maximum Likelihood, Kimura 2-Parametr, Complete deletion, Bootstrap 1000). Zakořeněný strom. Jako outgroup byla vybrána *C. elegans*. Jednotlivé druhy jsou odděleny barevně.

Histogramy znázorňující vnitrodruhovou a mezidruhovou variabilitu jsou na Obr. 13 a Obr. 14. Průměrná vnitrodruhová variabilita je 5,4 % a mezidruhová 36,1 %.



Obr. 13: Vnitrodruhová variabilita genu ND2



Obr. 14: Mezidruhová variabilita genu ND2

4.4. Druhová identifikace spojením testovaných markerů

Na závěr byl vytvořen spojený („concatenated“) marker, který využívá obě sekvence (*ITS* a *ND2*). Cílem bylo zjistit, zda takto zkombinovaný marker může přispět k rozlišení některých méně jasných klastrů. Proto byly vybrány pouze sekvence, úspěšně osekvenované u obou genů. Jendotlivé druhy jsou uvedené v tabulce 11.

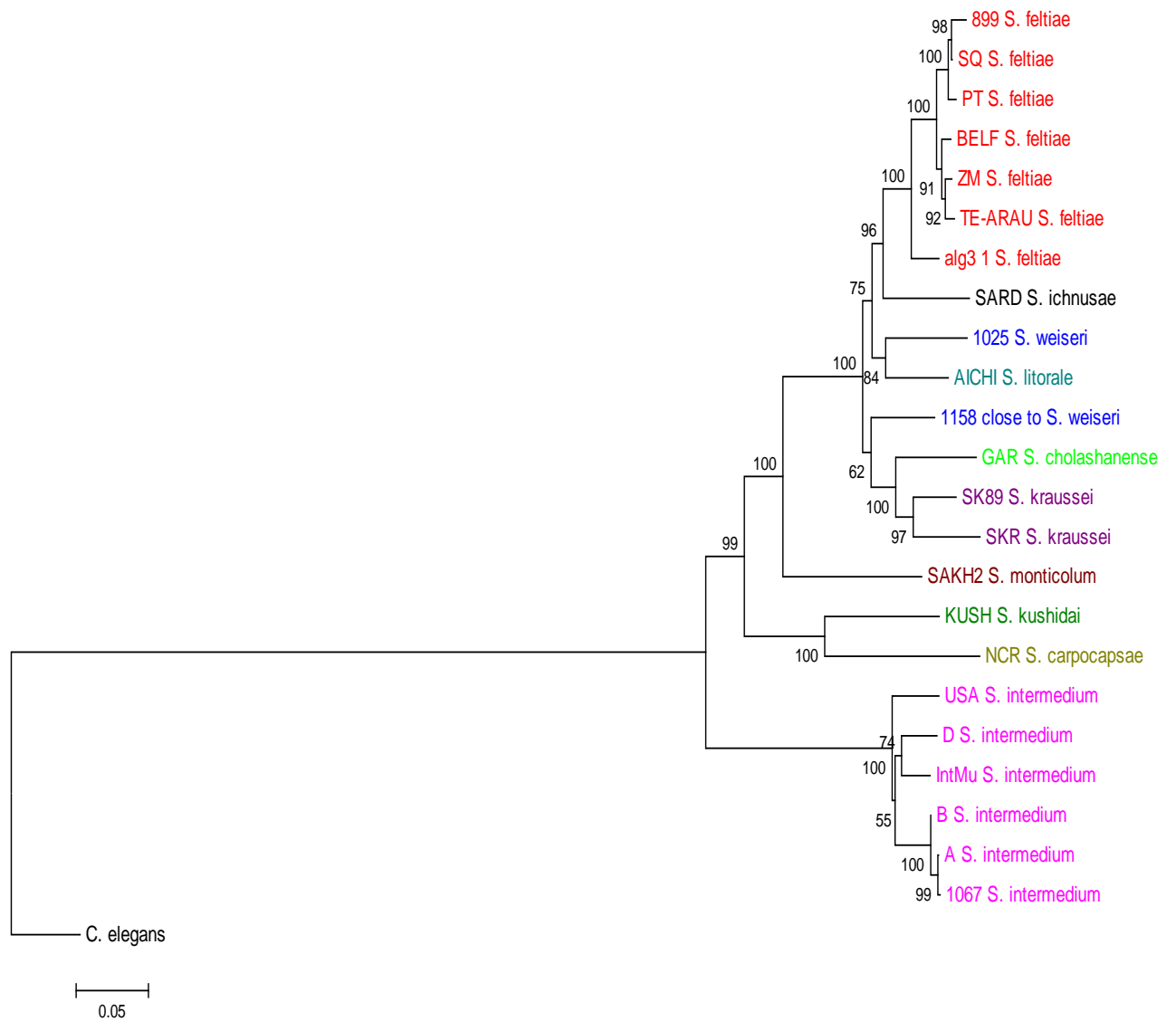
Tímto způsobem bylo získáno 46 sekvencí, které byly upraveny na 23 společných a následně z nich byly vytvořeny společné dendrogramy a to metodami Neighbour-Joining modelem Kimura 2-Parameter a Minimum Likelihood. Při tvorbě dendrogramů se gapy zohledňovaly jako další znak (použita volba „Pairwise deletion“). Statistická podpora stromů byla testována metodou Bootstrap, 1000 opakování. Vytvořené dendrogramy jsou znázorněné na Obr. 15 a Obr. 16.

Na vytvořených dendrogramech jsou patrné stejné topologie, jako tomu bylo u stromů vytvořených pro jednotlivé markery. O poznání lepší podpora je u stromu vytvořeného metodou NJ, kdy jednotlivé druhy mají většinou podporu bootstrap 100%.

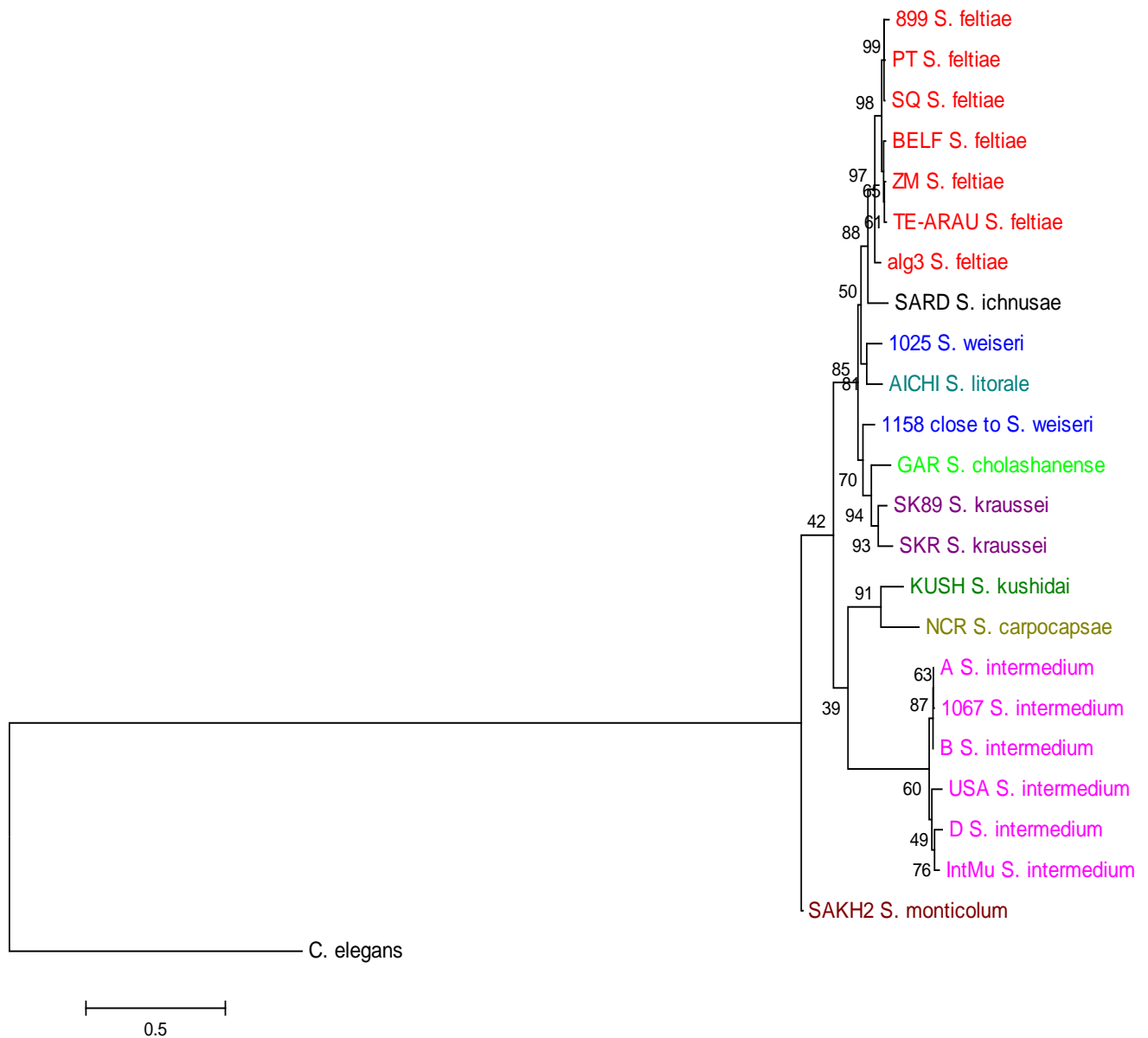
Nicméně spojením markerů se nepodařilo rozlišit nejasné klastry, a proto tvorba společného dendrogramu nepřinesla jiné výsledky, než které byly zjištěny jednotlivými markery.

Tab. 11: Přehled úspěšně osekvenovaných druhů u obou testovaných markerů

Druh	Kmen
<i>S. feltiae</i>	899, PT, Zm, SQ, TE-ARAU, BELF, ALG
<i>S. intermedium</i>	A, B, D, 1067, IntMu, IntUSA
<i>S. weiseri</i>	1025
příbuzný <i>S. weiseri</i>	1158
<i>S. kraussei</i>	SK89, SKR
<i>S. litorale</i>	AICHI
<i>S. cholashanense</i>	GAR
<i>S. kushidai</i>	KUSH
<i>S. ichnusae</i>	SARD
<i>S. carpocapsae</i>	NCR
<i>S. monticolum</i>	SAKH



Obr. 15: Společný dendrogram oblastí *ITS* a *ND2* (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parametr, Pairwise deletion, Bootstrap 1000). Zakořeněný strom. Jako outgroup byla vybrána *C. elegans*. Jednotlivé druhy jsou odděleny barevně.



Obr. 16: Společný dendrogram pro oblasti *ITS* a *ND2* (Maximum Likelihood, Kimura 2-Parametr, Use all sites, Bootstrap 1000). Zakořeněný strom. Jako outgroup byla vybrána *C. elegans*. Jednotlivé druhy jsou odděleny barevně.

5) Diskuze

5.1. Izolace DNA a metodika PCR

Pro izolaci DNA byla vyzkoušena pouze jedna metoda, a to izolace pomocí extrakčního pufru (Cox and Hebert, 2001; Frati et al., 2001). Tato metoda byla úspěšná u všech analyzovaných vzorků, a proto nebylo třeba zkoušet další metody izolace DNA.

PCR reakce byla nejprve prováděna podle standartního postupu, každá reakce se tedy skládala z (množství uvedené pro jeden vzorek): 7,2 μ l ddH₂O, 0,5 μ l BSA (Bovine Serum Albumine 20mg/ml, Fermentas), 1,25 μ l pufru, 1 μ l nukleotidů, 0,75 μ l primeru forward, 0,75 μ l primeru revers a 0,1 μ l Tag DNA polymerázy Unis (Top Bio). Celkový objem reakce byl 11,5 μ l. Následně byl k reakci přidán 1 μ l vyextrahované DNA.

Takto připravenou reakcí bylo dosaženo kladných výsledků pouze u markeru *COXI* za použití primerů LCO1490/HCO2198. U oblastí *ND2* a *ITS* tento způsob přípravy reakce nebyl úspěšný. Po nanesení na gel se objevovaly nespecifické produkty, které na výsledné fotografii vytvářely „pruhy“, které přetrvávaly i po změně profilů PCR reakce.

Proto bylo třeba změnit postup v přípravě reakce pro tyto dvě oblasti. Prvním pokusem bylo odebrání BSA z reakce. Tento pokus přinesl úspěšné, avšak paradoxní výsledky, protože činidlo BSA slouží v reakci ke zvyšování její stability, ale bez něho bylo dosaženo o poznání lepších výsledků. Tento postup se však neosvědčil u všech použitých primerů, kladných výsledků bylo dosaženo pouze s primery 18S/28S pro oblast *ITS* a ND2for1/ND2rev1 pro oblast *ND2*.

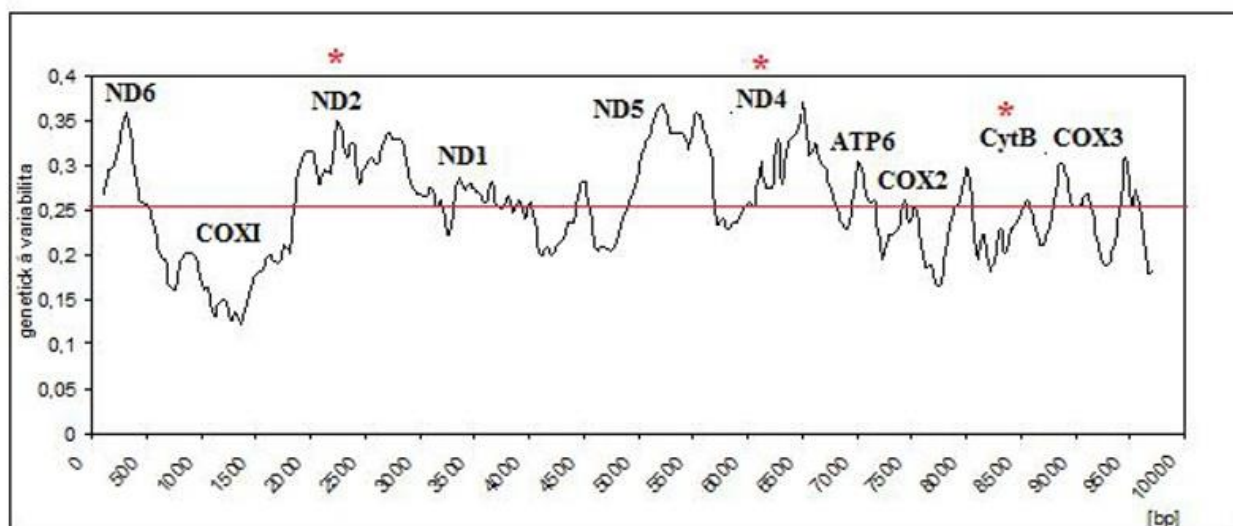
5.2. Metoda klouzavého okénka

Pro tento výzkum bylo třeba vybrat marker z mtDNA, který by mohl být porovnán s nukleárním markerem *ITS*. Výběr nejvhodnějšího markeru z mtDNA byl proveden na základě analýzy variability mitochondriálních genů kódujících proteiny delších než 500bp. Pro tento účel byly použity sekvence *Steinernema carpopapsae* (NC 005941), *Strongyloide stercoralis* (NC 005143) a *Ascaris suum* (NC 001327) z databáze MetAmiga (<http://amiga.cbmeg.unicamp.br>). Sekvence ve formátu FASTA byly nejdříve zalignovány podle čtecího rámce (open reading frame, „ORF“) a analýza provedena v programu DNAsp, metodou „klouzavého okénka“, při níž je variabilita vyhodnocována v intervalu, který se postupně posouvá po délce celé sekvence (velikost intervalu a kroku posunutí je stanovena arbitrárně; v tomto případě byla velikost intervalu 200 bazí a velikost kroku 50 bazí).

Takto vzniklé údaje jsou pak zaznamenány do grafu a vyhodnoceny vizuálně (Obr. 17, testované oblasti označené hvězdičkou), přibližné polohy jednotlivých oblastí jsou uvedé v tabulce 12. Z výsledného grafu byly vizuálně vyhodnoceny oblasti s největší variabilitou, pro které byly následně navrženy primery.

Pro náš výzkum byly vybrány oblasti *CytB*, *ND4* a *ND2*. Oblast *ND4*, která byla již dříve úspěšně testována u některých druhů nematod (Blouin 2001), vykazovala i v našem případě nejvyšší variabilitu, přesto se u tohoto markeru nepodařilo získat úspěšné sekvence. Můžeme tedy předpokládat, že tento marker není vhodný pro identifikaci druhu *Steinernematidae*. Naopak oblast *ND2* s nižší variabilitou byla úspěšným markerem.

Úspěch by mohl být předpokládán i u oblastí *ND6* a *ND5*, které rovněž vykazují vysokou variabilitu. Pro časovou náročnost našeho výzkumu však tyto oblasti nebyly studovány.



Obr. 17 : Graf pro metodu klouzavého oka (oblasti s nízkou variabilitou a příliš konzervovaná tRNA nejsou zakresleny)

Tab. 12: Přibližné polohy jednotlivých oblastí

Oblast	Začátek (bp)	Konec (bp)
<i>ND6</i>	0	461
<i>COX1</i>	462	2045
<i>ND2</i>	2046	2933
<i>ND1</i>	2934	3818
<i>ND5</i>	3819	5445
<i>ND4</i>	5446	6678
<i>ATP6</i>	6679	7279
<i>COX2</i>	7280	8082
<i>CytB</i>	8083	9200
<i>COX3</i>	9201	9811

5.3. Testované markery

Během práce v laboratoři se podařilo úspěšně amplifikovat jeden nukleární marker (*ITS*) a dva markery mitochondriální (*ND2* a *COXI*), přičemž marker *COXI* byl použit pouze pro ověření množství získané vyizolované DNA, protože se neosvědčil jako vhodný marker pro rozlišování druhové variability u hlístic. Hlavním důvodem je velmi nízká variabilita, která vyplývá i ze srovnání mitochondriálních genů.

U fragmentu *ND2* bylo potřeba zjistit, zda by mohl být vhodným markerem pro rozdělování hlístic *Steinernematidae* na druhové úrovni, jako je tomu u fragmentu *ITS* a následně jejich vhodnost porovnat.

U těchto dvou testovaných markerů byla rovněž porovnána průměrná hodnota AT/GC. U *ITS* byla tato hodnota 59,8/40,2, u *ND2* 76,8/23,3. U markeru *ND2* je patrný vysoký počet AT oblastí, čímž mohly být způsobeny problémy při sekvenování.

5.3.1. Nukleární marker *ITS*

Pro amplifikaci tohoto markeru byly použity 4 dvojice univerzálních primerů, ale pouze jedna dvojice (18S/28S) se ukázala jako vhodná a s jejím použitím bylo dosaženo úspěšné amplifikace.

Studium markeru *ITS* se však neobešlo bez problémů. Analyzováno bylo celkem 225 jedinců z 22 druhů, ale amplifikací bylo úspěšně získáno pouze 29 sekvencí z 9 druhů. Pro porovnání vhodnosti s markerem *ND2* bylo třeba získat větší množství sekvencí, proto byly sekvence pro 8 druhů, které byly u oblasti *ND2* úspěšně amplifikované, převzaty z databáze GenBank.

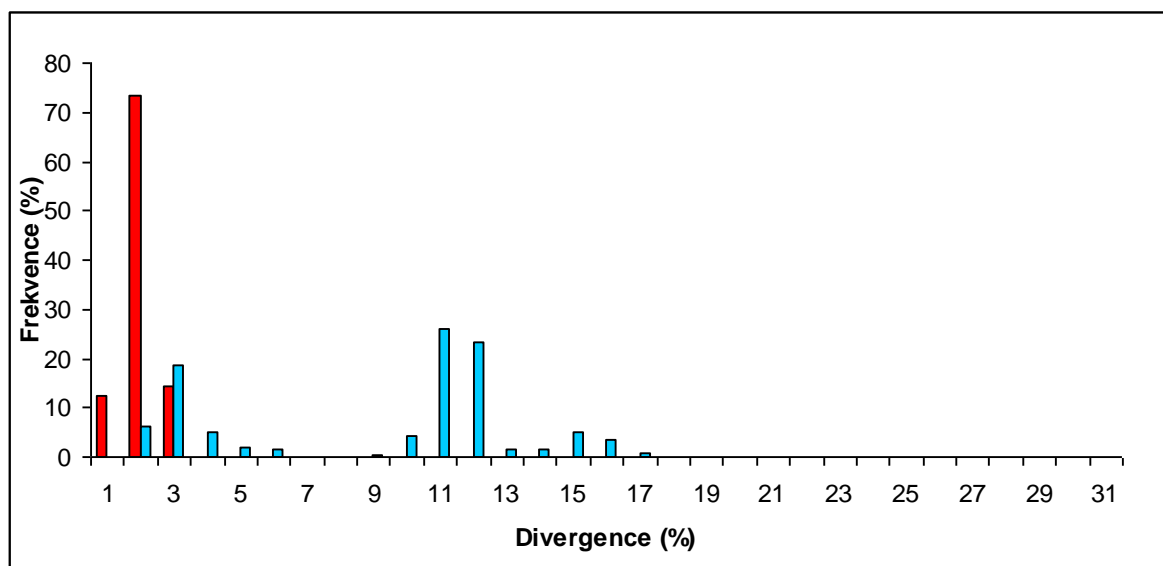
Problémy u markeru *ITS* se s největší pravděpodobností vyskytovaly v závislosti na intraindividuální variabilitě. I u některých úspěšně získaných sekvencí (jedná se především o jedince z druhu *S. feltiae* z kmenů: Zm, TE-ARAU, 899, PT a SQ) se zpočátku tato variabilita vyskytovala, ale po opakovaném sekvenování se podařilo sekvence získat – zřejmě z toho důvodu, že tato variabilita se nevyskytovala u všech jedinců daného druhu a opakovaným sekvenováním se podařilo na tyto jedince bez intraindividuální variability „natrefit“.

Po vytvoření dendrogramu pro tuto nekódující oblast byly jednotlivé druhy rozděleny relativně správně, výjimka se vyskytovala u druhů *S. affine* a *S. intermedium*.

Po vytvoření histogramu zobrazujícího vnitrodruhovou a mezidruhovou variabilitu na základě párového srovnání (Obr. 18) bylo patrné, že u tohoto genu dochází k

výraznému překryvu variabilit. Dále jsme mohli pozorovat, že u tohoto genu se vyskytuje vysoká mezidruhová variabilita s průměrnou hodnotou 29,5% a poměrně nízká vnitrodruhová variabilita s průměrnou hodnotou 2,8%. V podstatě tyto hodnoty odpovídají obecnému pravidlu pro „DNA barcoding“, tedy že vnitrodruhová variabilita by měla být asi 10x menší než je variabilita mezidruhová.

Po shrnutí těchto zjištění jsme došli k závěru, že mezidruhová variabilita je u markeru *ITS* celkem rozsáhlá, proto může být vhodným markerem pro rozlišování této variability. Problematická je však skutečnost, že část mezidruhové variability se překrývá s variabilitou vnitrodruhovou, a proto může být u některých jedinců či druhů tento marker zavádějící. Konkrétně to bylo způsobeno u druhů *S. affine* a *S. intermedium*, které sdílejí společný haplotyp. Sdílení společného haplotypu dvěma různými druhy může mít 2 vysvětlení. Prvním může být kontaminace vzorku, během práce v laboratoři, ale tato kontaminace nebyla potvrzena u markeru *ND2*. Druhým vysvětlením může být skutečná shoda haplotypu, což by znamenalo zaměřit pozornost na tyto druhy, navýšit množství sekvencí a provést další studii. Nicméně pro časovou náročnost jsme tuto studii nemohli provést.



Obr. 18: Histogram znázorňující překryv vnitrodruhové (červeně) a mezidruhové (modře) variability u genu *ITS*

Celkové množství detekované variability také mohlo být ovlivněno relativně malým počtem srovnávaných vzorků, zejména na vnitrodruhové úrovni.

5.3.2. Mitochondriální marker *ND2*

Po problémech s intraindividuální variabilitou, vyskytujících se u genu *ITS*, byl studován mitochondriální marker *ND2*, u kterého se předpokládalo, že tyto problémy nenastanou a proto bude vhodnějším markerem využívaným při druhové specifikaci u hlístic.

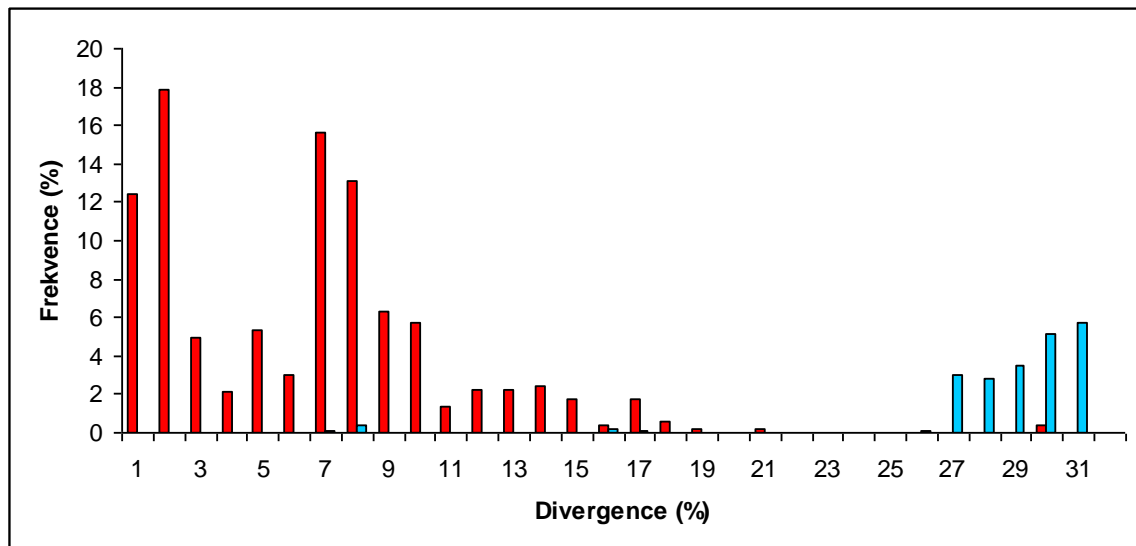
Při získávání sekvencí byly použity 3 dvojice primerů, z nichž jedna dvojice primerů *ND2for1/ND2rev1*, která byla navržena v naší laboratoři, se ukázala jako velmi vhodná pro další studium. Co se týče amplifikace, v případě počtu získaných sekvencí byla úspěšnější, než tomu bylo u oblasti *ITS*. V podstatě jde ale o paradoxní výsledek, protože platí, že sekvence z oblasti *ITS* mohou být získány téměř vždy, pokud se objeví variabilita, je možné provést klonování. Tento paradox tedy můžeme přisuzovat nižšímu počtu jedinců, kteří byli testováni pro oblast *ITS* a dále skutečnosti, že pro časovou náročnost nebylo možné zaklonovat všechny jedince, u kterých se nepodařilo získat úspěšné sekvence.

V případě genu *ND2* bylo z 225 analyzovaných jedinců získáno 74 sekvencí z 11ti druhů. Bylo tedy získáno více než dvojnásobné množství sekvencí, než u oblasti *ITS*. Můžeme to přisuzovat faktu, že u tohoto markeru se skutečně neobjevily problémy s intraindividuální variabilitou.

I pro oblast *ND2* byly vytvořeny dendrogramy, ze kterých je patrné správné rozdělení jednotlivých druhů, v tomto případě se všechny klastry shodují s druhovým zařazením, výjimku tvoří druhy *S. carpocapsae* a *S. kushidai*.

Po vytvoření histogramu, který zobrazuje vnitrodruhovou a mezidruhovou variabilitu na základě párového srovnání (Obr. 19), byl i u tohoto genu zjištěn překryv vnitrodruhové a mezidruhové variability, který byl však mnohem nižší, než tomu bylo u markeru *ITS*. Vnitrodruhová variabilita měla průměrnou hodnotu 5,4% a mezidruhová variabilita průměrnou hodnotu 36,1%. V tomto případě tedy hodnoty zcela neodpovídaly obecnému předpokladu pro barcoding, že vnitrodruhová variabilita by měla být průměrně 10x menší než variabilita mezidruhová, přesto je zde výrazný rozdíl a hodnoty se tomtu předpokladu přibližují.

Po shrnutí výsledků jsme došli k rozdílnému zjištění, než u oblasti *ITS*. V tomto případě je rozdělení vnitrodruhové a mezidruhové variability daleko výraznější, a proto se *ND2* jeví jako marker pro druhovou identifikaci daleko spolehlivější.



Obr. 19: Znázornění překryvu vnitrodruhové (červeně) a mezidruhové (modře) variability u genu *ND2*

5.4. Vytvoření dendrogramů

Pro tvorbu dendrogramů byla zvolena metoda Neighbour-Joining a model Kimura-2-Parametr, která je standardem pro „DNA barcoding“. Pro porovnání vhodnosti studovaných markerů byla přidána alternativní metoda Maximum Likelihood, která pracuje na základě složitějšího algoritmu než metoda NJ.

Dendrogramy vytvořené těmito různými metodami si byly u obou markerů velice podobné, jejich topologie byla stejná, lišily se jen v podpoře jednotlivých větví. U všech vytvořených dendrogramů byla většinou velmi dobře podpořená vnitrodruhová příbuznost, mezidruhová příbuznost byla podpořena méně. Při porovnání vytvořených stromů bychom mohli říci, že lepších výsledků bylo u *ITS* dosaženo použitím metody Maximum Likelihood, protože u takto vytvořeného stromu pozorujeme větší podpory jednotlivých větví, na rozdíl od *ND2*, kde byla podpora větší u metody Neighbour-Joining.

V obou případech jsou tedy použité metody vhodné pro rozlišování druhů, pro fylogenetické účely by však nemusely být jednoznačné.

Dendrogramy pro oblast *ITS* a pro oblast *ND2*

U obou markerů došlo u všech vytvořených stromů k rozdělení odpovídajícímu druhovému určení. Rozdíly mezi markery se především ukázaly na pravděpodobně chybném zařazení některých jedinců k jiným druhům. Zatímco u *ITS* se to týkalo druhů *S.*

intermedium, *S. affine* a *S. poinari* ale také *S. litorale* a *S. weiseri*, u *ND2* to bylo u *S. carpocapsae* a *S. kushidai*, následně u druhů *S. kraussei* a *S. cholashanense*.

Příčin může být několik – kontaminace vzorků při zpracování v laboratoři, špatné určení druhů (což by se však projevilo u obou markerů zároveň). Vzhledem k nízké hodnotě bootstrapu těchto sporných zařazení u markeru *ND2* lze také uvažovat i o statistické chybě.

U těchto vzorků by další informace přineslo sekvenování většího počtu jedinců ze všech zmíněných druhů, nejlépe z různých geografických oblastí.

Společný dendrogram pro oblasti *ND2* a *ITS*

Pro zpřesnění rozlišovací schopnosti spojením dvou testovaných markerů byly vytvořeny dva společné dendrogramy, které obsahovaly pouze sekvence, které byly úspěšně získány u obou testovaných genů. Tyto dendrogramy byly opět vytvořeny pomocí dvou metod – tedy Neighbour-Joining a Maximum Likelihood. V obou případech sice došlo k rozdělení jednotlivých druhů do klastřů, avšak v případě stromu vytvořeného metodou NJ bylo dosaženo lepších výsledků, s daleko většími podporami jednotlivých větví.

Topologie společných dendrogramů byla stejná jako tomu bylo u stromů vytvořených pro jednotlivé oblasti. Opět zde můžeme pozorovat přidružení druhů *S. carpocapsae* a *S. kushidai*, a druhů *S. kraussei* a *S. cholashanense*, které jsme pozorovali již u vytvořených dendrogramů pro oblast *ND2*. Ve společném dendrogramu můžeme ještě navíc pozorovat další přidružení druhů *S. litorale* a *S. weiseri*, které bylo u stromu pro oblast *ITS*. Promíchání druhů *S. intermedium*, *S. affine* a *S. poinari*, pozorované u dendrogramu pro oblast *ITS* se v tomto případě nemohlo potvrdit, protože se nepodařilo získat společné sekvence těchto druhů pro oba testované markery.

Vytvořením společného dendrogramu mělo být docíleno lepšího rozdělení druhů do celistvých klastřů. Nicméně vytvoření tohoto stromu nepřineslo znatelně lepší výsledky.

6. Závěr

Na základě získaných výsledků lze vyvodit, že lepšího rozdělení jednotlivých druhů bylo dosaženo použitím markeru pro gen *ND2*, u něhož byl překryv vnitrodruhové a mezidruhové variability minimální. U tohoto markeru se navíc nevyskytuje intraindividuální variabilita a nedochází zde k vytváření heterozygotnosti. Z toho důvodu bych navrhla, že marker *ND2* by mohl být úspěšně používán pro druhovou specifikaci, přinejmenším jako druhý marker.

Důležité je ale zohlednit fakt, že ani tento marker se nemusí obejít bez problémů. Hlavním z nich může být vysoká frekvence výskytu AT oblastí, což může být příčinou neúspěšného sekvenování u některých druhů.

Je nutné brát v úvahu i možnost zkreslenosti výsledků pro oblast *ITS*, která může být způsobena nedostatkem analyzovaných sekvencí. V dalších studiích by bylo vhodné získat větší soubor jedinců a jejich sekvencí, popř. zvolit další, třetí marker a porovnat jeho úspěšnost s těmito testovanými markery.

7. Literatura

- Adams, B.J., 1998.** Species concepts and the evolutionary paradigm in modern nematology. *J. Nematol.* 30, 1–21
- Adams, B.J., Burnell, A.M., Powers, T.O., 1998.** A Phylogenetic analysis of Heterorhabditis (Nemata: Rhabditidae) based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. *Journal of Nematology*, 30, 22 – 39
- Adams B.J., Nguyen K.B., 2002.** Taxonomy and systematics. In: Gaugler, R., Kaya, H.K., (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in Biol. Control. CRC Press, Boca Raton, Florida*, pp. 357–372
- Adams B.J., et al., 2006.** Reprint of “*Biodiversity and systematics of nematode–bacterium entomopathogens*” *Biol. Control* 37,32–49
- Akhurst, R.J., 1987.** Use of starch gel electrophoresis in the taxonomy of the genus Heterorhabditis (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica* 33, 1–9
- Alatorre-Rosas R., Kaya H.K., 1990.** Interspecific competition between entomopathogenic nematodes in the genera Heterorhabditis and Steinernema for an insect host in sand. *J. Invertebr. Pathol.* 55, 179–188
- Amarasinghe L.D., Hominick W.M., Briscoe B.R., Reid A.P., 1994.** Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in Sri Lanka. *J. Helminthol.* 68, 277–286
- Avise J.C., 2004.** Molecular markers, natural history and evolution. *Sinauer, Sunderland, MA.* (684 pp.)
- Bargues, M. D., Marcilla, A., Ramsey, J. M., Dujardin, J. P., Schofield, C. J., MasComa, S., 2000.** Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas’ disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95, 567-573
- Bathon H., 1996.** Impact of entomopathogenic nematodes on non-target hosts
- Beomare N.E., Akhurst R.J., Mourant R.G. 1993.** DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 249–255
- Begley J.W., 1990.** Efficiency against insects in habitats other than soil. In: Gaugler, R., Kaya, H.K., (Eds.), *Entomopathogenic nematodes in Biol. Control. CRC Press, Boca Raton, Florida*, pp. 215–227
- Bird A.F., Akhurst R.J., 1983.** The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *Int. J. Parasitol.* 13, 599 – 605

- Blankenship, Robert, 2009.** Molecular Mechanisms of Photosynthesis. *Blackwell Publishing*. Pp. 124 – 132
- Blaxter M.L., De Ley P., Garey J.R., 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
- Blaxter, M.L., Dorris, M., De Ley, P., 2000.** Patterns and processes in the evolution of animal parasitic nematodes. *Nematology* 2 (1), 43-55
- Blouin, M.S., 2001.** Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *Parasitology* 32 (2002) 527-531
- Bongers, Ferrit, 1999; Curtis, Sloan, 2004; Curtis et al., 2002; Rappe, Giovannoni, 2003; Torsvik et al., 2002.** Reprint of “Biodiversity and systematics of nematode–bacterium entomopathogens” *Biol. Control* 37 (2006), 32–49
- Brown, W. M., 1985.** The Mitochondrial Genome of Animals. *Molecular Evolutionary Genetics*, s. 95-130
- Caterino M. S., Cho S., Sperling F. A. H., 2000.** The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of Babel. *Annu. Rev. Entomol.*, 45, 1-54
- Campbell J.F., Lewis E.E., Yoder F., Gaugler R., 1995.** Entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) seasonal population dynamics and impact on insect populations in turfgrass. *Biol. Control*. 5, 598–606
- Clary, D. O., Wolstenholme, D.R.** The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 1985, Vol. 22, No. 3, s. 252-271
- Cox A.J., Hebert P.D.N. (2001).** Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology*. 10, 331-386
- Dugan, K. A., Lawrence, H. S., Hares, D. R., Fisher, C. L., Budowle, B., 2002.** An Improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis. *Journal of Forensic Science*, 47(4), 811-8
- Douglas, L. J., Haymer, D. S., 2001.** Ribosomal ITS1 polymorphisms in *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae). *Entomological Society of America*, 94, 726-731
- Ehler L.E., 1990.** Some contemporary issues in Biological control of insects. In: Gaugler, R., Kaya, H.K., (Eds.), Entomopathogenic nematodes in Biol. Control. *CRC Press, Boca Raton, Florida*, pp. 1–16
- Ehlers R.U., 1996.** Current and future use of nematodes in biocontrol: practice and

commercial aspects with regard to regulatory policy issues. *Biocontrol. Sci. Techn.* 6, 303–316

Ehlers, R.-U., Mason, J.P. (Eds.). Genetics of Entomopathogenic Nematode–Bacterium Complexes. *European Commission Luxembourg City, Luxembourg*, pp. 49–58

Eidt D.C., Thurston G.S., 1995. Physical deterrents to infection by entomopathogenic nematodes in wireworms (Coleoptera: Elateridae) and other soil insect. *Can. Entomol.* 127, 423–429

Folmer, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, Vol. 3, No. 5, s. 294-299.

Forst S., Clarke D., 2002. Bacteria – nematode symbiosis. In: R. Gaugler (Ed), Entomopathogenic nematology, CABI publishing, Wallingford, Oxon, UK. p. 57–77

Fрати F., Spinsanti G., Dallai R. (2001). Genetic variation of mtCOII gene sequences in the collembolan *Isotoma klovstadi* from Victoria Land, Antarctica: evidence for population differentiation. *Polar Biol.* 24, 934-940.

Gardner, S.L., Stock, S.P., Kaya, H.K., 1994. A new species of Heterorhabditis from the Hawaiian islands. *J. Parasitol.* 80, 100–106

Gaugler R., Lebeck L., Nakagaki B., Boush G.M. 1980. Orientation of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae*, to carbon dioxide. *Environ. Entomol.* 9, 649–652

Georgis R., Kaya H.K., Gaugler R. 1991. Effect of steinernematid and heterorhabditid nematodes (Rhabditida, Steinernematidae and Heterorhabditidae) on nontarget arthropods. *Environ. Entomol.* 20, 815–822

Grenier, E., Castagnone-Sereno, P., Abad, P., 1997. Satellite DNA sequences as taxonomic markers in nematodes of agronomic interest. *Parasitol. Today* 13, 398–401

Grewal P.S., Gaugler R., Kaya H.K., Wusaty M., 1993. Infectivity of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* (Nematoda, Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 62, 22–28

Griffin, C.T., O' Callaghan, K.M., Dix, I., 2001. A self-fertile species of *Steinernema* from Indonesia: further evidence of convergent evolution amongst entomopathogenic nematodes? *Parasitology* 122, 181–186

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., De Waard, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London, August 2003, Vol. 270, No. 1, s. S96-S99

Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W., 2004

- Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 101, 14812-14817
- Hominick, W.M., Briscoe, B.R., del Pino, F.G., Heng, J.A., Hunt, D.J., Kozodoy, E., Mráček, Z., Nguyen, K.B., Reid, A.P., Spiridonov, S., Stock, P., Sturhan, D., Waturu, C., Yoshida, M., 1997.** Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. *J. Helminthol.* 71, 271–298
- Ishibashi N., Kondo E., 1990.** Behavior of infective Juveniles. In: Gaugler, R., Kaya, H.K., (Eds.), Entomopathogenic nematodes in Biol. Control. *CRC Press, Boca Raton, Florida*, pp. 139–150
- Kaya H.K., Koppenhöfer A.M., 1996.** Effects of microbial and other antagonistic organisms and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol. Sci. Techn.* 6, 357–371
- Kondo E., 1989.** Studies on the infectivity and propagation of entomogenous nematodes, *Steinernema* spp. (Rhabdititida: Steinernematidae) in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bull. Fac. Agric. Saga Univ.* 67, 1–87
- Koppenhofer A.M., Kaya H.K., Shanmugam S., Wood G.L., 1995.** Interspecific competition between steinernematid nematodes within an insect host. *J. Invertebr. Pathol.* 66, 99–103
- Lewis E.E., Gaugler R., Harrison, R., 1992.** Entomopathogenic nematode host finding – response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology* 105, 309–315
- Librado, P. and Rozas, J., 2009.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452
- Liu, J., Berry, R.E., 1995.** Differentiation of isolates in the genus *Steinernema* (Nematoda: Steinernematidae) by random amplified polymorphic DNA fragments and morphological characters. *Parasitology* 111, 119 – 125
- Liu, J., Berry, R.E., 1996c.** Phylogenetic analysis of the genus *Steinernema* by morphological characters and randomly amplified polymorphic DNA fragments. *Fundamental and Applied Nematology* 19, 463–469
- Liu, J., Berry, R.E., Blouin, M.S., 1999.** Molecular differentiation and phylogeny of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditi dae) based on ND4 gene sequences of mitochondrial DNA. *J. Parasitol.* 85, 709–715
- Loxdale, H. D. & Lushai, G., 1998.** Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 88, 577-600

- Lynch, M. and Milligan, B.G., 1994.** Analysis of population genetic structure within RAPD markers. *Molecular Ecology* 3, 91 – 99
- McGraw B.A., Koppenhofer A.M., 2009.** Population dynamics and interactions between endemic entomopathogenic nematodes and annual bluegrass weevil populations in golf course turfgrass. *App. Soil Ecol.* 41, 77–89
- Meier, R., Kwong, S., Vaidya, G., Ng, Peter K. L., 2006.** DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: a Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. *Systematic Biology*, 55, 715-728
- Moulton, J. K., 2000.** Molecular sequence data resolves basal divergences within Simuliidae (Diptera). *Syst. Entomol.* 25, 95-113
- Mráček Z., Hanzal R., Kodrik D., 1988.** Sites of penetration of juvenile Steinernematids and Heterorhabditids (Nematoda) into larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol.* 52, 477–478
- Mráček Z., Weiser J., 1983.** Pathogenicity of *Neoplectana carpocapsae* (Nematoda) for the flea, *Xenopsylla cheopis*. *J. Invertebr. Pathol.* 42, 133–134
- Muralidharan, K. & WakeInd, E.K., 1993.** Concentration of primer and template qualitatively affects products in random – amplified polymorphic DNA PCR. *BioTechniques* 14, 362 – 364
- Nguyen K.B., Smart G.C., 1990.** *Steinernema scapterisci* n. sp. (rhabditida, steinernematidae). *J. Nematol.* 22, 187–199
- Nguyen, K.B., Maruniak, J., Adams, B.J., 2001.** Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. *J. Nematol.* 33, 73–82
- Nguyen, K.B., Shapiro-Ilan, D.I., Stuart, R.J., McCoy, C.W., James, R.R., Adams, B.J., 2004.** *Heterorhabditis mexicana* n. sp (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. *Nematology* 6, 231–244
- Nermut’ et al., 2012.** Entomopathogenic and molluscoparasitic nematodes – the Invisible Soil Killers. *Ziva 1/2012*, 10.
- Pamjav, H., Triga, D., Buzas, Z., Vellai, T., Lucskai, A., Adams, B., Reid, A.P., Burnell, A., Griffin, C., Glazer, I., Klein, M.G., Fodor, A., 1999.** Novel application of PhastSystem polyacrylamide gel electrophoresis using restriction fragment length polymorphism— internal transcribed spacer patterns of individuals for molecular identification of entomopathogenic nematodes. *Electrophoresis* 20, 1266–1273
- Peters A., 1996.** The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their

impact on insect populations. *Biocontrol. Sci. Techn.* 6, 389–402

Poinar G.O., Jr., Leutenegger R., 1968. Anatomy of the infective and normal third-stage juveniles of *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Steinernematidae: Nematoda). *The J. Parasitol.* 54, 340–350

Poinar G.O., Jr., 1979. Nematodes for Biological Control of insects. *CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida*, pp. 249

Poinar G.O., Jr., Thomas G.M., 1985. Laboratory infection of spiders and harvestman (Arachnida: Araneae and Opiliones) with *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* nematodes (Rhabditoidea). *J. Arachnol.* 13, 297–302

Poinar G.O., Jr., 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R., Kaya, H.K., (Eds.), Entomopathogenic nematodes in Biol. Control. *CRC Press, Boca Raton, Florida*, pp. 23–61

Reid, A.P., Hominick, W.M., 1992. Restriction fragment length polymorphisms within ribosomal DNA repeat unit of British entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). *Parasitology* 105, 317–323

Reid, A.P., 1994. Molecular taxonomy of *Steinernema*. In: *Burnell, A.M*

Robert C. King; William D. Stansfield; Pamela K. Mulligan. A Dictionary of Genetics, Seventh Edition. [s.l.] : *Oxford University Press*, 2006

Ropek D., Jaworska M., 1994. Effect of an entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* Weiser (Nematoda, Steinernematidae), on carabid beetles in field trials with annual legumes. *Anzeiger fur Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz* 67, 97–100

Rozas, J., Librado, P. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.

Shearer, T. L., Coffroth, M. A., 2007. Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Molecular Ecology Notes (published ahead online)*

Schlötterer, Ch., Hauser, M. T., von Haeseler, A., Tautz, D., 1994. Comparative Evolutionary Analysis of rDNA ITS Regions in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.*, 11(3), 513-522

Schmidt J., All J.N., 1979. Attraction of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) to common excretory products of insect. *Environ. Entomol.* 8, 55–61

Smits P.H., 1996. Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol. Sci. Techn.* 6, 379–387

Smith, M. A., Wood, D. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Hebert, P. D. N., 2006. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies

(Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 104, 4967-4972

Spiridonov S.E., Moens M., Wilson M.J., 2007. Fine scale spatial distributions of two entomopathogenic nematodes in a grassland soil. *App. Soil Ecol.* 37, 192–201

Stock, S.P., Somsook, V., Reid, A.P., 1998. *Steinernema siamkayai* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Thailand. *Syst. Parasitol.* 41, 105–113

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. *J. Parasitol.* 87, 877–889

Stock, S.P., 2002. New trends in entomopathogenic nematode systematics: impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. In: Monduzzi, S.P.A. (Ed.), *Proceedings of the International Conference on Parasitology. Vancouver, Canada*, pp. 1–8

Stock S.P., Koppenhofer A.M., 2003. *Steinernema scarabaei* n. sp (Rhabditida : Steinernematidae), a natural pathogen of scarab beetle larvae (Coleoptera : Scarabaeidae) from New Jersey, USA. *Nematology* 5, 191–204

Stuart R.J., Gaugler, R., 1994. Patchiness in populations of entomopathogenic nematodes. *J. Invertebr. Pathol.* 64, 39–45

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

Sturhan D., 1999. Prevalence and habitat specificity of entomopathogenic nematodes in Germany. *Proceedings Workshop of entomopathogenic nematodes, Todi, May 1995. Brussels*

Szalanski, A.L., Taylor, D.B., Mullin, P.G., 2000. Assessing nuclear and mitochondrial DNA sequence variation within *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae). *J. Nematol.* 32, 229–233

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S., 2011 MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis usány Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximu Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731 – 2739

Tang, J., Toé, L., Back, C., Unnasch, T. R., 1995. Mitochondrial Alleles of *Simulium* *Damnosum* sensu lato Infected with *Onchocerca volvulus*. *Int. J. Parasitol.* 25(10), 1251-1254.

- Timper P., Kaya H.K., 1989.** Role of second-stage cuticle of entomogenous nematodes in preventing infection by nematophagous fungi. *J. Invertebr. Pathol.* 54, 314–321
- Triga, D., Pamjav, H., Vellai, T., Fodor, A., Buzas, Z., 1999.** Gel electrophoretic restriction fragment length polymorphism analysis of DNA derived from individual nematodes, using the PhastSystem. *Electrophoresis* 20, 1274–1279
- Williams, J.G.K., Anne, R.K., Kenneth, J.L., Antoni, J.R., Scott, V.T., 1990.** DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531 – 6535
- Zhioua E., Lebrun R.A., Ginsberg G.S., Aeschliman A., 1995.** Pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* and *S. glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 32, 900–905

Internetové zdroje:

- <http://www.zoologie.frasma.cz>
- <http://ziva.avcr.cz>
- <http://www.chempoint.cz>
- <http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu>
- <http://amiga.cbmeg.unicamp.br>
- <http://www.barcodinglife.org>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

8. Přílohy

Příloha 1: Detailní seznam analyzovaných vzorků

Kmen	Druh	Lokalita sběru	Sběr
735	<i>S. feltiae</i>	ČR, Řitka	S. Bečvář
930	<i>S. feltiae</i>	ČR, Živořice	Z. Mráček
899	<i>S. feltiae</i>	ČR, Dynín, topoly	Z. Mráček
1025	<i>S. weiseri</i>	ČR, Výškov	Z. Mráček
1158	<i>S. sp., příbuzný S. weiseri</i>	ČR, Stříbrná huť	Z. Mráček
AICHI	<i>S. litorale</i>	Japonsko, Zichu	M. Yoshida
BELF	<i>S. feltiae</i>	Irsko, Belfast	C. Griffin
DEG	<i>S. xueshanense</i>	Čína, Yunnan, Tibet	Z. Mráček
GAR	<i>S. cholashanense</i>	Čína, Sichuan, Tibet, Garze	Z. Mráček
ISHI	<i>S. aciari</i>	Japonsko, Ischikawa	M. Yoshida
JOL	<i>S. jollieti</i>	USA, New Persey	S. Spiridonov
KUSH	<i>S. kushidai</i>	Japonsko	M. Yoshida
KUM	<i>S. monticolum</i>	Japonsko, Kumamoto	M. Yoshida
NAG	<i>S. xinbinense</i>	Japonsko, Nagano	M. Yoshida
NCR	<i>S. carpocapsae</i>	Rusko, St. Petersburg	Veremcuk
PTLEIN	<i>S. feltiae</i>	Polsko	M. Tomalak
SARD	<i>S. ichnusae</i>	Sardinie	E. Tarasco
SK89	<i>S. kraussei</i>	Německo,	Z. Mráček
SKR	<i>S. kraussei</i>	ČR, Vrbenské rybníky ČB, doubrava	V. Půža
SLOV	<i>S. arenarium</i>	Slovensko, Lakšár	Z. Mráček
SQ	<i>S. feltiae</i>	Kanada, Quebec	Z. Mráček
TE-ARAU	<i>S. feltiae</i>	Finsko	I. Vanninen
USA	<i>S. intermedium</i>	USA	A. Bednarek
ZM	<i>S. feltiae</i>	Kanada	Z. Mráček
SAKH	<i>příbuzný S. monticolum</i>	Rusko, Sachalin	M. Yoshida
Ch-Ent	<i>S. feltiae</i>	komerční kmen	Koppert Biological Systéme
Ent	<i>S. feltiae</i>	komerční kmen	Koppert Biological Systéme
1152	<i>S. poinari</i>	ČR, Pernatec	Z. Mráček
A	<i>S. intermedium?</i>	Bulharsko	D. Gradinarov
B	<i>S. intermedium?</i>	Bulharsko	D. Gradinarov
D	<i>S. intermedium?</i>	Bulharsko	D. Gradinarov
1067	<i>S. intermedium?</i>	ČR, Bílé Karpaty – Vápenky	Z. Mráček
IntMu	<i>S. intermedium?</i>	Německo, Monster	Z. Mráček
Int Port	<i>S. intermedium?</i>	Portugalsko	V. Valadas
Lon	<i>S. affine</i>	Francie	P. Tailliez
PL8	<i>S. carpocapsae</i>	Polsko	M. Tomalak
SIS	<i>S. oregonense</i>	Kreton	Z. Mráček
AKH	<i>S. akhursti</i>	Čína, North Yunnann	Z. Mráček
JAN	<i>S. kraussei</i>	ČR, Jankov	V. Půža, J. Nermuť
LIP	<i>S. kraussei</i>	ČR, Lipí	V. Půža, J. Nermuť
CB	<i>S. affine</i>	ČR, Ruda	N. H. Adensko
MB	<i>S. affine</i>	ČR, Skuhrov	N. H. Adensko
1151	<i>S. affine</i>	ČR, Píšťany	V. Půža
Cak01	<i>S. affine</i>	ČR, Čakov	V. Půža, J. Nermuť
cako01	<i>S. affine</i>	ČR, Čakovec	V. Půža, J. Nermuť
VA72	<i>S. kraussei</i>	Bulharsko, Vitosha, subalpínská louka, 2250m	M. Shishioniva
FL4	<i>S. glaseri</i>	USA, Gainesville	V. Půža, J. Nermuť
FL10	<i>S. glaseri</i>	USA, Gainesville	V. Půža, J. Nermuť
ALG3	<i>S. feltiae</i>	Algerie	E. Tarasco

Příloha 2: Detailní přehled frekvencí nukleotidů u ITS

Jedinec	Frekvence nukleotidů (%)					Poměr nukleotidů AT/GC
	T(U)	C	A	G	Celkem	
PT <i>S. feltiae</i>	32,7	18,5	25,8	23,1	970,0	58,5/41,6
899 <i>S. feltiae</i>	32,6	17,9	25,7	23,8	979,0	58,3/41,7
ZM <i>S. feltiae</i>	33,3	18,2	25,3	23,2	954,0	58,6/41,4
SQ <i>S. feltiae</i>	34,0	17,7	25,6	22,7	921,0	59,6/40,4

TE - ARAU <i>S. feltiae</i>	33,6	17,6	26,0	22,8	920,0	59,6/40,4
BE <i>S. feltiae</i>	33,5	17,7	26,3	22,6	899,0	59,8/40,3
ALG3 <i>S. feltiae</i>	33,8	17,6	25,8	22,8	917,0	59,6/40,4
1025 <i>S. weiseri</i>	35,9	16,5	25,3	22,3	750,0	61,2/38,8
1158 <i>S. weiseri</i>	32,7	18,2	26,1	22,9	965,0	58,8/41,1
VA72 <i>S. kraussei</i>	31,3	19,2	26,1	23,5	966,0	57,4/42,7
SK89 <i>S. kraussei</i>	32,5	18,7	25,9	22,9	985,0	58,4/41,6
SKR <i>S. kraussei</i>	31,7	18,9	25,9	23,5	899,0	57,6/42,4
JAN <i>S. kraussei</i>	32,7	18,0	26,5	22,8	944,0	59,2/40,8
C3 <i>S. kraussei</i>	32,3	18,5	25,9	23,3	941,0	58,2/41,8
AICHI <i>S. litorale</i>	32,7	18,0	26,6	22,7	966,0	59,3/40,7
DEG <i>S. xueshanense</i>	35,1	17,7	25,0	22,1	795,0	60,1/39,8
GAR <i>S. cholashanense</i>	31,4	19,4	25,7	23,6	976,0	57,1/43
SARD <i>S. ichnusae</i>	35,7	17,9	24,8	21,6	793,0	60,5/39,5
NAG <i>S. xinbinense</i>	32,4	18,8	25,3	23,6	976,0	57,7/42,4
KUM <i>S. monticolum</i>	31,3	17,4	27,4	23,9	916,0	58,7/41,3
SAHK close to <i>S. monticolum</i>	32,0	16,7	27,4	23,9	880,0	59,4/40,6
1151 <i>S. affine</i>	36,3	17,1	25,4	21,2	1032,0	61,7/38,3
cako01 <i>S. affine</i>	36,5	17,0	25,3	21,3	1025,0	61,8/38,3
Lon <i>S. affine</i>	38,7	15,5	25,1	20,7	936,0	63,8/36,2
A <i>S. intermedium</i>	37,8	15,7	25,6	20,9	963,0	63,4/36,6
B <i>S. intermedium</i>	38,0	15,5	25,8	20,8	924,0	63,8/36,3
1067 <i>S. intermedium</i>	37,5	16,0	25,5	21,0	973,0	63/37
Int Mu <i>S. intermedium</i>	38,8	15,0	24,9	21,3	794,0	63,7/36,3
Int Port <i>S. intermedium</i>	38,9	14,9	25,4	20,8	814,0	64,3/35,7
Int USA <i>S. intermedium</i>	39,2	14,5	25,0	21,2	811,0	64,2/35,7
D <i>S. intermedium</i>	37,8	15,8	24,6	21,8	910,0	62,4/37,6
1152 <i>S. poinari</i>	38,3	16,0	25,0	20,7	849,0	63,3/36,7
AKH <i>S. akhursti</i>	31,4	19,5	25,1	24,0	970,0	56,5/43,5
SIS <i>S. oregonense</i>	31,7	19,3	25,5	23,5	968,0	57,2/42,8
ISCHI <i>S. aciari</i>	30,2	20,6	23,9	25,3	994,0	54,1/45,9
KUSH <i>S. kushidai</i>	30,1	20,4	24,2	25,3	995,0	54,3/45,7
NCR <i>S. carpocapsae</i>	35,2	16,9	25,0	22,9	933,0	60,2/39,8
Průměr	34,2	17,6	25,6	22,6	924,4	59,8/40,2

Příloha 3: Rozložení haplotypů pro jednotlivé kmeny u ITS

Haplotyp	Četnost	Druhy (kmen)
1	1	<i>S. feltiae</i> (PT)
2	1	<i>S. feltiae</i> (899)
3	2	<i>S. feltiae</i> (Zm, TE-ARAU)
4	1	<i>S. feltiae</i> (SQ)
5	1	<i>S. feltiae</i> (BE)
6	1	<i>S. feltiae</i> (ALG3)
7	1	<i>S. weiseri</i> (1025)
8	1	<i>S. weiseri</i> (1158)
9	2	<i>S. kraussei</i> (VA72, C3)
10	1	<i>S. kraussei</i> (SK89)
11	1	<i>S. kraussei</i> (SKR)
12	1	<i>S. kraussei</i> (JAN)
13	1	<i>S. litorale</i> (AICHI)
14	1	<i>S. xueshanense</i> (DEG)
15	1	<i>S. cholashanense</i> (GAR)
16	1	<i>S. ichnusae</i> (SARD)
17	1	<i>S. xinbinense</i> (NAG)

18	1	<i>S. monticolum</i> (KUM)
19	1	příbuzný <i>S. monticolum</i> (SAKH)
20	2	<i>S. affine</i> (1151, cako01)
21	2	<i>S. affine</i> (Lon), <i>S. intermedium</i> (1067)
22	2	<i>S. intermedium</i> (A, B)
23	1	<i>S. intermedium</i> (IntMu)
24	1	<i>S. intermedium</i> (IntPort)
25	1	<i>S. intermedium</i> (IntUSA)
26	1	<i>S. intermedium</i> (D)
27	1	<i>S. poinari</i> (1152)
28	1	<i>S. akhursti</i> (AKH)
29	1	<i>S. oregonense</i> (SIS)
30	1	<i>S. aciari</i> (ISCHL)
31	1	<i>S. kushidai</i> (KUSH)
32	1	<i>S. carpocapsae</i> (NCR)

Příloha 4: Detailní přehled frekvencí nukleotidů u ND2

Jedinec	Frekvence nukleotidů (%)					Poměr nukleotidů AT/GC
	T(U)	C	A	G	Celkem	
A <i>S. intermedium</i>	55	7,2	28,7	9	498	83,7/16,2
A2 <i>S. intermedium</i>	55	7,2	28,5	9,2	498	83,5/16,4
A3 <i>S. intermedium</i>	55	7,2	28,5	9,2	498	83,5/16,4
B <i>S. intermedium</i>	55	7,2	28,9	8,8	498	83,9/16
B2 <i>S. intermedium</i>	55	7,2	28,9	8,8	498	83,9/16
B3 <i>S. intermedium</i>	55	7,2	28,9	8,8	498	83,9/16
D <i>S. intermedium</i>	54,2	8	28,3	9,4	498	82,5/17,4
D2 <i>S. intermedium</i>	54,2	8	28,1	9,6	498	82,3/17,6
D3 <i>S. intermedium</i>	54,2	8	28,3	9,4	498	82,5/17,4
1067 <i>S. intermedium</i>	54,7	7,4	29	8,9	497	83,7/16,3
1067 <i>S. intermedium</i>	54,7	7,4	29	8,9	497	83,7/16,3
IntMu <i>S. intermedium</i>	55,3	7,4	28,4	8,9	497	83,7/16,3
USA <i>S. intermedium</i>	53,5	8	29,4	9,1	497	82,9/17,1
USA2 <i>S. intermedium</i>	53,8	8	29,1	9	498	82,9/17
1025 <i>S. weiseri</i>	49,3	13,2	20,6	16,8	499	69,9/30
1025 2 <i>S. weiseri</i>	49,3	13,2	20,6	16,8	499	69,9/30
1025 3 <i>S. weiseri</i>	49,3	13,2	20,6	16,8	499	69,9/30
1025 4 <i>S. weiseri</i>	49,3	13,2	20,6	16,8	499	69,9/30
1025 5 <i>S. weiseri</i>	49,3	13,2	20,6	16,8	499	69,9/30
1025 6 <i>S. weiseri</i>	49,3	13,2	20,6	16,8	499	69,9/30
1025 7 <i>S. weiseri</i>	49,3	13,2	20,6	16,8	499	69,9/30
1158 close to <i>S. weiseri</i>	50,9	12,1	24,3	12,6	428	75,2/24,5
1158 close to <i>S. weiseri</i>	50,5	12	24,8	12,7	440	75,3/24,7
1158 close to <i>S. weiseri</i>	50,5	12	24,8	12,7	440	75,3/24,7
SK89 <i>S. kraussei</i>	47,3	13	25	14,6	376	72,3/27,6
SK89 <i>S. kraussei</i>	47,3	13	25	14,6	376	72,3/27,6
SKR <i>S. kraussei</i>	49,8	13,3	23,4	13,5	436	73,2/26,8
AICHI <i>S. litorale</i>	50	12,4	21,9	15,7	498	71,9/28,1
GAR <i>S. cholashanense</i>	44,8	14,8	25,9	14,5	440	70,7/29
GAR <i>S. cholashanense</i>	44,8	14,8	25,9	14,5	440	70,7/29
GAR 2 <i>S. cholashanense</i>	44,8	14,8	25,9	14,5	440	70,7/29
GAR 3 <i>S. cholashanense</i>	44,8	14,8	25,9	14,5	440	70,7/29
KUSH <i>S. kushidai</i>	56,2	7,9	22,8	13	491	79/20,9
KUSH2 <i>S. kushidai</i>	55	7,9	24,1	13	493	79,1/20,9
KUSH3 <i>S. kushidai</i>	56,6	7,9	22,6	12,9	495	79,2/20,8
KUSH4 <i>S. kushidai</i>	56,1	7,9	23	13	492	79,1/20,9
KUSH5 <i>S. kushidai</i>	56,2	7,9	22,9	13	493	79,1/20,9
KUSH6 <i>S. kushidai</i>	56,3	8	22,7	13,1	490	79/21,1
SARD <i>S. ichnusae</i>	51,1	11,6	24	13,2	499	75,1/24,8
SARD2 <i>S. ichnusae</i>	51,1	11,6	24	13,2	499	75,1/24,8
SARD3 <i>S. ichnusae</i>	49	13	24,8	13,2	416	73,8/26,2
SARD4 <i>S. ichnusae</i>	51,3	11,6	23,8	13,2	499	75,1/24,8
NCR <i>S. carpocapsae</i>	56,6	7,7	22,2	13,6	442	78,8/21,3
NCR2 <i>S. carpocapsae</i>	56	7,7	22,8	13,4	439	78,8/21,1
SAKH <i>S. monticolum</i>	55,4	8,7	25,5	10,5	439	80,9/19,2
SAKH2 <i>S. monticolum</i>	55,4	8,7	25,5	10,5	439	80,9/19,2

alg3 <i>S. feltiae</i>	51,6	11,6	25	11,8	500	76,6/23,4
Ch-Ent <i>S. feltiae</i>	47,6	11,7	28,5	12,2	435	76,1/23,9
Ch-Ent2 <i>S. feltiae</i>	50,3	12,8	25,3	11,6	439	75,6/24,4
Ch-Ent3 <i>S. feltiae</i>	50,5	12,7	25,1	11,8	442	75,6/24,5
Ent <i>S. feltiae</i>	48	11,5	27,6	12,9	442	75,6/24,4
Ent2 <i>S. feltiae</i>	50,1	12,8	25,1	12,1	439	75,2/24,9
Ent3 <i>S. feltiae</i>	50,5	12,7	25,1	11,8	442	75,6/24,5
899 <i>S. feltiae</i>	50,5	12,4	25,5	11,6	499	76/24
899 <i>S. feltiae</i>	50,5	12,4	25,5	11,6	499	76/24
PT <i>S. feltiae</i>	50,5	12,4	25,5	11,6	499	76/24
PT2 <i>S. feltiae</i>	51,3	11,8	24,4	12,4	499	75,5/24,2
PT3 <i>S. feltiae</i>	50,5	12,4	25,5	11,6	499	76/24
ZM <i>S. feltiae</i>	51,3	11,4	25,3	12	499	76,6/23,4
ZM2 <i>S. feltiae</i>	51,3	11,4	25,3	12	499	76,6/23,4
SQ <i>S. feltiae</i>	50,7	12,2	25,3	11,8	499	76/24
SQ2 <i>S. feltiae</i>	50,7	12,2	25,3	11,8	499	76/24
SQ3 <i>S. feltiae</i>	50,7	12,2	25,3	11,8	499	76/24
SQ4 <i>S. feltiae</i>	50,7	12,2	25,3	11,8	499	76/24
SQ5 <i>S. feltiae</i>	50,9	12,2	25,3	11,6	499	76,2/23,8
SQ6 <i>S. feltiae</i>	50,7	12,2	25,3	11,8	499	76/24
TE-ARAU <i>S. feltiae</i>	50,3	12,4	25,7	11,6	499	76/24
TE-ARAU2 <i>S. feltiae</i>	50,3	12,4	25,7	11,6	499	76/24
TE-ARAU3 <i>S. feltiae</i>	50,3	12,4	25,7	11,6	499	76/24
BELF <i>S. feltiae</i>	50,7	12,4	24,8	12	499	75,5/24,4
BELF2 <i>S. feltiae</i>	50,7	12,4	24,8	12	499	75,5/24,4
BELF3 <i>S. feltiae</i>	50,5	12,4	24,6	12,4	499	75,1/24,8
BELF4 <i>S. feltiae</i>	50,5	12,4	25,1	12	499	75,6/24,4
BELF5 <i>S. feltiae</i>	50,7	12,4	24,8	12	499	75,5/24,4
Průměr	51,6	11	25,2	12,3	479,2	76,8/23,3

Příloha 5: Rozložení haplotypů pro jednotlivé kmeny u ND2

Haplotyp	Četnost	Druhy (kmen)
1	1	<i>S. intermedium</i> (A)
2	2	<i>S. intermedium</i> (A2, A3)
3	3	<i>S. intermedium</i> (B, B2, B3)
4	2	<i>S. intermedium</i> (D, D3)
5	1	<i>S. intermedium</i> (D2)
6	2	<i>S. intermedium</i> (1067_1, 1067_2)
7	1	<i>S. intermedium</i> (IntMu)
8	1	<i>S. intermedium</i> (USA)
9	1	<i>S. intermedium</i> (USA2)
10	7	<i>S. weiseri</i> (1025_2, 1024_3, 1025_4, 1025_5, 1025_6, 1025_7)
11	1	příbuzný <i>S. weiseri</i> (1152)
12	2	příbuzný <i>S. weiseri</i> (1152_2, 1152_3)
13	2	<i>S. krausei</i> (SK89, SK89_2)
14	1	<i>S. krausei</i> (SKR)
15	4	<i>S. cholashanense</i> (GAR, GAR2, GAR3, GAR4)
16	1	<i>S. kushidai</i> (KUSH)
17	1	<i>S. kushidai</i> (KUSH2)
18	1	<i>S. kushidai</i> (KUSH3)
19	1	<i>S. kushidai</i> (KUSH4)
20	1	<i>S. kushidai</i> (KUSH5)
21	1	<i>S. kushidai</i> (KUSH6)
22	2	<i>S. ichnusae</i> (SARD, SARD2)
23	1	<i>S. ichnusae</i> (SARD3)
24	1	<i>S. ichnusae</i> (SARD4)
25	1	<i>S. carpocapsae</i> (NCR)

26	1	<i>S. carpocapsae</i> (NCR2)
27	2	<i>S. monticolum</i> (SAKH1, SAKH2)
28	1	<i>S. feltiae</i> (ALG)
29	1	<i>S. feltiae</i> (CHent)
30	1	<i>S. feltiae</i> (CHent2)
31	2	<i>S. feltiae</i> (CHent3, Ent3)
32	1	<i>S. feltiae</i> (Ent)
33	1	<i>S. feltiae</i> (Ent2)
34	2	<i>S. feltiae</i> (899, 899_2)
35	2	<i>S. feltiae</i> PT,PT3)
36	1	<i>S. feltiae</i> (PT2)
37	2	<i>S. feltiae</i> (Zm, Zm2)
38	5	<i>S. feltiae</i> (SQ, SQ2, SQ3, SQ4, SQ6)
39	1	<i>S. feltiae</i> (SQ5)
40	3	<i>S. feltiae</i> (TE-ARAU, TE-ARAU2, TE-ARAU3)
41	3	<i>S. feltiae</i> (BELF, BELF2, BELF5)
42	1	<i>S. feltiae</i> (BELF3)
43	1	<i>S. feltiae</i> (BELF4)
44	1	<i>S. litorale</i> (AICHI)