

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Nukleotidová variabilita genu *enol-1* u entomopatogenních  
hlístic *Heterorhabditis bacteriophora*  
a *Steinernema feltiae***

Bakalářská práce

**Martina Flegrová**

Školitelka: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.

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

České Budějovice 2015

Flegrová M., 2015: Nukleotidová variabilita genu *enol-1* u entomopatogenních hlístic *Heterorhabditis bacteriophora* a *Steinernema feltiae*. [Nucleotide variability in *enol-1* gene of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema feltiae* Bc.Thesis, in Czech] – 37 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The topic of this bachelor thesis is *enol-1*, parasitism-related gene in entomopathogenic nematodes. First part of this thesis deals with pattern of the *enol-1* nucleotide variability. Nucleotide sequence of *enol-1* was obtained from 9 strains of *Heterorhabditis bacteriophora* and 8 strains of *Steinernema feltiae*. I characterised and compared its structure and nucleotide variability. Phylogenetic analysis of *enol-1* was done with closely related nematode coding sequences, acquired from internet databases. The second part of this thesis is devoted to virulence testing. Larvae of *Galleria mellonella* were infected with different strains of entomopathogenic nematodes, and their mortality was summarized.

Tato práce je součástí grantového projektu GA ČR číslo P504/12/2352 a GA JU 137/2010/P.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval/a 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 dne 21.4. 2015

.....

# Obsah

<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
Enoláza ( <i>enol-1</i> ).....	3
Pokusné organismy.....	4
<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>6</b>
<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>7</b>
Materiál.....	7
Izolace DNA .....	8
Navrhování primerů.....	8
PCR amplifikace.....	9
Elektroforetická separace.....	10
Přečištění vzorků a sekvenace .....	10
Klonování .....	10
Zpracování sekvencí a statistické zhodnocení .....	11
Testy virulence.....	12
Metodika testů virulence.....	12
Statistické zhodnocení testů virulence .....	13
<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>14</b>
Nukleotidový polymorfismus a divergence.....	14
Distribuce variability .....	15
Testy neutrality a selekční koeficient $K_a/K_s$ .....	16
Fylogenetická analýza .....	18
Testy virulence.....	22
<b>DISKUZE</b> .....	<b>25</b>
Molekulárně-fylogenetická analýza.....	25
Testy virulence.....	26
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>27</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>28</b>
<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>32</b>

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Martině Žurovcové za odborné vedení, za velkou trpělivost a za všechno společné úsilí, které jsme do této práce vložily. Také děkuji Vladimíru Půžovi a Jiřímu Nermuťovi nejen za poskytnutí hlístic, ale také za přátelskou atmosféru a osobitý humor. Dále Lucii Faktorové, Monice Šťackové a Jindřišce Tomáškové za vytvoření příjemného pracovního prostředí, a zvláště pak Michaela Raškové za to, že mi po celou dobu byla morální oporou. Poslední dík patří kamarádům, příteli a rodině, protože bez jejich podpory by tato práce nemohla vzniknout.

# 1. Úvod

Hlístice (*Nematoda*) jsou považovány za jeden z nejpočetnějších kmenů živočišné říše. Počet druhů je odhadován mezi 1 až 10 miliony, z čehož bylo dosud popsáno pouhých ~25 000 druhů. Ačkoliv naše znalosti kmene *Nematoda* ještě zdaleka nejsou kompletní, již teď můžeme s jistotou říct, že hlístice jsou naprosto všudypřítomné, a přirozeně se vyskytují jak v mořských tak terestrických habitatech s vysokou abundancí. Lze mezi nimi najít jak druhy volně žijící, tak i druhy parazitující na rostlinách, zvířatech a člověku (Sommer & Streit, 2011).

Díky nedostatku jasně homologních znaků a naprosté absenci fosilních záznamů nebylo dříve dost dobře možné zrekonstruovat evoluční rámec kmene – avšak pomocí analýzy 53 sekvencí malé podjednotky rDNA se Blaxterovi a jeho týmu (Blaxter *et al.*, 1988) podařilo fylogenetické vztahy mezi hlísticemi objasnit. Jejich práce rozlišuje 5 hlavních kladů, z nichž každý obsahuje parazitické druhy. Naznačuje tedy, že parazitický způsob života se u hlístic vyvinul opakovaně, nezávisle na sobě – konkrétně třikrát u rostlin, a čtyřikrát u živočichů. Hlístice tak představují ideální skupinu pro studium evoluce parazitismu. Toto téma je zajímavé nejen z hlediska evoluce jako takové, ale i pro případné směřování výzkumu, který je zaměřen na obranu proti parazitům (v případě, že jsou zdrojem nemoci) nebo naopak jejich využití pro biologický boj s organismy, které jsou pro člověka škodlivé a mezi parazitickými hlísty mají přirozené nepřátele.

Myšlenkou, že by parazitický způsob života hlístic mohl mít polyfyletický původ, se zabýval již zakladatel americké nematologie N.A. Cobb (1898). Jedna z prvních hypotéz o evoluci parazitismu byla zformulována roku 1956 německým vědcem G.Oschem, který považuje foresi (kdy parazit využívá hostitele jen jako možnost širší disperze či úkrytu) a nekromenii (parazit vyčkává na smrt hmyzího hostitele, na jehož kadaveru se poté živí) za preadaptace k parazitismu. Předpokládá, že selekční změny, které umožnily hlísticím snáze přežít v organickém substrátu jakožto volně-žijícím saprobiontním organismům, se později ukázaly jako užitečné adaptace i k parazitickému způsobu života. Jako příklad uvádí nutnost přežít v anaerobním prostředí či vyrovnat se s nestálou hladinou kyslíku, schopnost snášet vyšší teploty nebo silné osmotické fluktuace, a v neposlední řadě také kutikulu, která původně sloužila jako obrana před trávicími enzymy dekompozičních bakterií, a která nyní výborně plní svůj účel i v trávicí soustavě hostitele (Osche, 1956).

Tématu evoluce parazitismu se ve své práci věnoval i Dillman (2012), který se zaměřil na hlístice parazitující na hmyzu. Za nejpůvodnější způsob života pokládá volně žijící, který se postupně vyvíjel přes způsob forese a nekromenie až k parazitismu jako takovému, případně k entomopatogenicitě, kdy parazit napadeného hostitele velmi rychle usmrtí (viz obr. 1; Dilmann et al, 2012). Z hlediska vývoje parazitizmu je však entomopatogenicitá považována za “slepou uličku” evoluce (Sudhaus, 1993).



Obr. 1: Schéma evoluce vztahů hlístice-hmyz, přepracováno do češtiny podle Dilmann et al, 2012.

Entomopatogenními hlísticemi se intenzivně zabývali zoologové Y. Hao a N. Simoes (2012), kteří na základě analýzy míry exprese transkriptomů pomocí semi-kvantitativní RT-PCR a real-time PCR vytipovali pět kandidátních genů (enolázu, chitinázu, lektin, metalloproteázu a povrchový antigen), které by mohly souviset s parazitickým způsobem života. Dále pak pomocí uvedených metod porovnávali míru exprese těchto genů v různých životních stádiích hlístice *Heterorhabditis bacteriophora*. Konkrétně se jednalo o dvě linie Az 29 (silně virulentní) a Az 36 (velmi slabě virulentní) – obě původem z Azorských ostrovů. Výsledky byly pozoruhodné – míra transkripce zkoumaných genů byla mnohonásobně vyšší právě v infekčním stádiu (invazní larva třetího instaru) než u ostatních životních stádií, přičemž k expresi genu enolázy a metalloproteázy docházelo více u virulentnější linie. Toto zjištění podpořilo hypotézu, že vytipované kandidátní geny

by mohly být klíčové pro širší pochopení parazitického způsobu života entomopatogenních hlístic (Hao *et al.*, 2012).

Všechny tyto geny mají jeden společný znak – účastní se procesu penetrace, při kterém invazní larva proniká do hostitele. V tomto momentě jí právě zvýšená exprese těchto genů usnadňuje infekci například nadměrnou produkcí sekretů, které obsahují enzymy narušující chitinovou kutikulu hostitele, a usnadňující napadení hostitelských tkání či trávení proteinů hostitele (Osman *et al.*, 2004). Konkrétně enoláza se podílí na degradaci hostitelské extracelulární matrix, a napomáhá k migraci infekčních larev do hostitelských tkání (Vassali, 1991). Míra exprese enolázy tedy zcela evidentně souvisí s infekčním vývojovým stádiem entomopatogenních hlístic, a z dostupných výsledků experimentů vyplývá, že je důležitou součástí parazitické fáze jejich života. Ovšem přesné mechanismy dosud nejsou známy. Z výše uvedených informací vyplývá, že k úplnému porozumění parazitického procesu je nejprve zapotřebí identifikovat a charakterizovat geny s ním spojené (Hao *et al.*, 2012), což zahrnuje i studium jejich evoluce.

### **1.1 Enoláza (*enol-1*)**

Enoláza je enzym, který je právem považován za jeden z klíčových enzymů v procesu glykolýzy, potažmo glukoneogeneze. Katalyzuje dehydrataci 2-fosfoglycerátu (2-PG), který se tímto v devátém kroku glykolýzy stává fosfoenolpyruvátem (PEP). Jedná se o metalloenzym (přírodně nejlépe váže magnesium) který se řadí do skupiny lyáz – enzymů, které katalyzují rozpad určitých chemických vazeb v reakcích biochemické povahy.

Běžně se vyskytuje v cytoplasmě buněk, u obratlovců dokonce hned ve třech isoformách – alpha, beta a gama (Pancholi, 2001).

Alpha-enolázu lze lokalizovat ve všech typech tkání. Najdeme ji ale i na povrchu buněk, kde plní funkci buněčného plasminogen-receptoru. Při různých patologických stavech organismu lze sledovat výrazně odlišnou míru exprese – například pacienti s Alzheimerovou chorobou nebo rakovinovými nádory měli výrazně odlišnou hladinu alpha-enolázy, než je standard u zdravého dospělého člověka. Beta-enoláza je specifická pro svalovou tkáň, gama-enoláza se téměř výlučně omezuje na nervovou soustavu (zvláště na samotné neurony).

I přes to, že jde o jeden z nejčastěji a nejvíce exprimovaných genů v buňce, není enoláza považována za „house-keeping“ gen, neboť míra její exprese do značné míry závisí na patofyziologickém stavu buňky, metabolických podmínkách či vývojovém stádiu. Avšak skutečnost, že se tento enzym vyskytuje napříč *Archaeobacteria* až po savce, a to

s konzervovanou nukleotidovou sekvencí naznačuje, že se jedná o enzym svým způsobem esenciální a nepostradatelný (Díaz-Ramoz *et al*, 2012).

## 1.2. Pokusné organismy

V rámci své práce jsem prováděla experimenty s druhy *H. bacteriophora*, *H. indica*, *H. beicherriana*, *S. feltiae* a *S. riobrave*. Tyto druhy patří do dvou skupin, které nejsou fylogeneticky blízce příbuzné (rody *Heterorhabditis* se řadí do kladu V. a rody *Steinernema* do kladu IV.). Avšak konvergentně se u nich vyvinul velmi podobný životní cyklus, který začíná aktivním prohledáváním půdy a infekcí vhodného hmyzího hostitele (Sommer & Streit, 2011). Při procesu infekce se uplatňují také symbiotické bakterie - u *Heterorhabditis* spp. jde o bakterii *Photorhabdus* spp., u *Steinernema* spp. se vyskytuje *Xenorhabdus* spp..

Tyto bakterie jsou nesený již invazními larvami. Krátce po penetraci hostitelských tkání jsou bakterie vypuštěny do systému hostitele, a ve spolupráci s hlísticemi jej usmrtí obvykle během 48 hodin. Po proliferaci se bakterie opět reasociují s novou generací infekčních jedinců, která po vyčerpání zásob živin opouští kadáver, aby mohla infikovat dalšího hostitele. Zajímavostí je, že rod *Steinernema* je schopen usmrtit hostitele i bez symbiotických bakterií, ale rod *Heterorhabditis* tuto schopnost nemá – alespoň to vyplývá z experimentu, který byl proveden v laboratorních podmínkách (Dilmann *et al*, 2012).

Mutualisticko-symbiotický vztah hlístic a bakterií je výborným modelem k širšímu výzkumu koevoluce těchto druhů (Ciche & Sternberg, 2007).

Entomopatogenní hlístice mají obrovský potenciál jakožto biologická ochrana rostlin před hmyzími škůdci. Jejich reálné využití je však zatím stále relativně malé, což lze přisoudit vyšší finanční náročnosti a také jejich náchylnosti k UV záření, kvůli které musejí být aplikovány ve vhodnou denní dobu. Přesto však najdou při ochraně rostlin uplatnění – konkrétně druhy *Heterorhabditis bacteriophora* a *Steinernema feltiae*, kterými jsem se zabývala ve své práci, jsou používány proti škůdcům jako listokaz zahradní nebo lalokonosec rýhovaný (Nermuť *et al*, 2012). Použití těchto hlístic jako biologické ochrany zemědělských plodin před škůdci lze považovat za ekologický a trvale udržitelný způsob hospodaření.

S tím souvisí i virulence jednotlivých druhů, potažmo linií, která se může výrazně lišit, přičemž vliv na patogenicitu hlístic může mít také teplota prostředí. Rozsáhlý experiment této souvislosti provedli ve své práci J. Rosa a N. Simoes (2003), kteří testovali virulenci 28 linií druhu *Heterorhabditis bacteriophora* na nejpočetnějším azorském škůdci *Pseudaletia unipuncta*, a zaznamenali signifikantní rozdíly v mortalitě škůdce mezi jednotlivými liniemi.



Právě z tohoto souboru byly později vybrány 2 linie na analýzu exprese genů souvisejících s parazitismem (viz výše), a proto jsem zařadila tyto testy i do své bakalářské práce.

## 2. Cíle práce

1. U vybraných linií rodu *Heterorhabditis* a *Steinernema* otestovat míru virulence
2. Vyizolovat z vybraných linií rodu *Heterorhabditis* a *Steinernema* gen pro enolázu
3. Vyhledat v genomových databázích relevantní homologní geny v rámci kmene *Nematoda*
4. Na základě zjištěné nukleotidové variability odhadnout možný model evoluce genu pro enolázu

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Materiál

V rámci experimentální části bakalářské práce jsem pracovala celkem s pěti různými druhy hlístic – od druhu *Heterorhabditis bacteriophora* jsem analyzovala celkem 9 linií, po jedné linii od druhů *H. indica* a *H. beicherriana*, 8 linií *Steinernema feltiae* a jednu linii od *S. riobrave*; celkem se tedy jednalo o 20 linií. Vzorky poskytl RNDr. V. Půža Ph.D., z laboratorní kolekce laboratoře Entomopatogenních hlístic (viz tabulka 1).

Tabulka 1: Testované linie hlístic.

Linie	Druh	Lokalita	Autor
HB 221	<i>H. bacteriophora</i>	Pouzďřany, ČR	Z. Mráček
HB USA	<i>H. bacteriophora</i>	Virginie, USA	H. Kaya
CAL 3C	<i>H. bacteriophora</i>	Californie, USA	J. Nermuť
NIG	<i>H. bacteriophora</i>	Nigérie	T. M. Mengistu
HB PAL	<i>H. bacteriophora</i>	Palestina	R.U. Ehlers
MG 618	<i>H. bacteriophora</i>	Švýcarsko	R. Campos-Herrera
AZ 36	<i>H. bacteriophora</i>	Azorské ostrovy	H. Simoes
T 9-43	<i>H. bacteriophora</i>	Turecko	S. Hazir
T 9-48	<i>H. bacteriophora</i>	Turecko	S. Hazir
Fruticola	<i>H. indica</i>	Venezuela	E. San-Blas
Cherry	<i>H. beicherriana</i>	Čína, Peking	Q. Liu
ALG 3	<i>S. feltiae</i>	Alžírsko	E. Tarasco
BELF	<i>S. feltiae</i>	Belfast, Irsko	C. Griffin
HOK 36	<i>S. feltiae</i>	Hokkaido, Japonsko	M. Yoshida
Jakutsk	<i>S. feltiae</i>	Jakutsk, Rusko	S. Spiridonov
NB Aus	<i>S. feltiae</i>	Austrálie	R.J. Akhurst
NF Ust	<i>S. feltiae</i>	Iževsk, Rusko	E. Kozodoj
PA	<i>S. feltiae</i>	Picina – Břehov, ČR	V. Půža
S Queb	<i>S. feltiae</i>	Quebec, Kanada	Z. Mráček
RIO	<i>S. riobrave</i>	Venezuela	E. San-Blas

Při práci v laboratoři jsem používala výhradně sterilní mikrozkušavky a aerosolové špičky, abych předešla kontaminaci a případnému zkreslení výsledků.

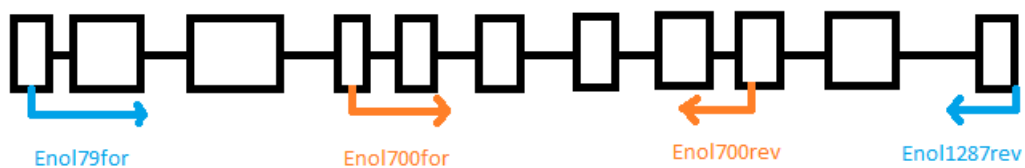
### 3.2. Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí extrakčního pufru, který byl přidán k zamraženým vzorkům v množství 20  $\mu$ l na jednoho dospělého jedince. Složení extrakčního pufru bylo následující: 17,7  $\mu$ l dd H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l Taq PCR buffer (TopBio), 0,2  $\mu$ l Tween (1%) a 0,1  $\mu$ l proteinázy K.

Směs byla následně zvortexována, zcentrifugována a ponechána cca 20 minut v -20 °C. Poté byla na hodinu přemístěna do vodní lázně o teplotě 65°C a následně byl proveden teplotní šok na termobloku Thermomixer comfort (Eppendorf) při 95°C po 8 minut. Takto extrahovaná DNA byla skladována v -20°C.

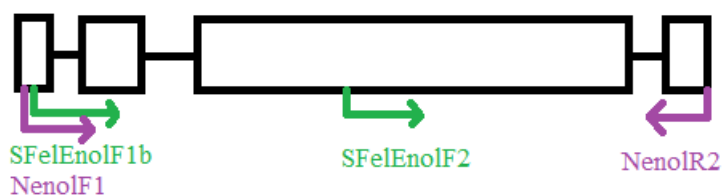
### 3.3. Navrhování primerů

Pro úspěšnou PCR amplifikaci genu *enol-1* bylo nutné navrhnout vlastní primery. V počátcích laboratorní práce jsem testovala univerzální primery, které byly navrženy podle transkriptů enolázy příbuzných organismů dostupných v databázi NCBI GenBank. Ukázalo se však, že tyto primery fungují buď velmi omezeně, nebo vůbec. Po zveřejnění transkriptomu *H. bacteriophora* v databázi Nembase4 se podařilo identifikovat enolázový transkript, a na jeho základě navrhnout primery specifické (viz obr. 2). Jelikož však celková délka genu i s introny přesahovala možnou sekvenovatelnou vzdálenost, později byly z vlastních získaných sekvencí navrženy ještě vnitřní primery pro sekvenování (primer walking).



Obr. 2: Pozice nasedání primerů na genu *enol-1* u *H. bacteriophora*. Čára značí místa, kde leží intron; obdélník značí exon. Celková délka sekvence je cca 2 120 bází.

Pro amplifikaci *enol-1* u *S. feltiae* jsem kromě univerzálních použila i vlastní navržené specifické primery (viz obr. 3). Stejně jako u *H. bacteriophora* byl v průběhu práce navržen jeden vnitřní primer pro získání úplné kontinuální sekvence („contig“).



Obr. 3: Pozice nasedání primerů na genu *enol-1* u *S. feltiae*. Čára značí místa, kde leží intron; obdélník značí exon. Celková délka sekvence je cca 1 350 bází.

Všechny použité primery viz příloha 1.

### 3.4. PCR amplifikace

Směs pro PCR reakci jsem vždy míchala těsně před reakcí, a to zásadně na ledu. Celkový objem PCR směsi byl 12,5  $\mu$ l. Složení PCR směsi na 1 vzorek pro rod *Heterorhabditis* bylo 7,25  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 1,25  $\mu$ l PCR ExTaq pufru (TopBio), 1  $\mu$ l dNTPs ředěných z koncentrovaného zásobního roztoku (Fermentas) v poměru 1:3, 0,75  $\mu$ l “forwadového” (přímého) a 0,75  $\mu$ l “reverzního” (zpětného) primeru ředěného z koncentrovaného roztoku v poměru 1:19 vyrobené na zakázku (Generi biotech), 0,1  $\mu$ l Taq DNA polymerázy Unis (TopBio) a 1  $\mu$ l vyextrahované DNA.

Následně jsem vzorky vložila do přístroje Bioer XP thermocycler na tento profil: počáteční denaturace při teplotě 94°C po 7 minut, 35 cyklů denaturace při 94°C na minutu, nasedání primerů při 63°C na minutu, elongace při 68°C na minutu a závěrečná elongace při 68°C po 8 minut. Hotové PCR produkty byly skladovány při 4°C.

Složení PCR směsi pro rod *Steinernema* na 1 vzorek bylo 7,25  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 1,25  $\mu$ l PCR pufru TaKaRa, 1  $\mu$ l dNTPs ředěných z koncentrovaného roztoku v poměru 1:3 (Fermentas), 0,75  $\mu$ l forwadového a 0,75  $\mu$ l reverzního primeru ředěného z koncentrovaného roztoku v poměru 1:19 (Generi biotech), 0,1  $\mu$ l polymerázy TaKaRa a 1  $\mu$ l vyextrahované genomové DNA. Následně jsem vzorky vložila do cycleru Bioer XP na stejný profil jako u *Heterorhabditis*, ale teplotu pro nasedání primerů jsem snížila na 55°C, tak jak to vyžadovalo složení primerů.

### 3.5. Elektroforetická separace

Ověření velikosti a množství produktu PCR reakce jsem prováděla pomocí elektroforetické separace na 1,5% agarózovém gelu, který jsem barvila etidium bromidem o koncentraci 0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l. Jako pufr jsem používala TAE 1x koncentrovaný (zásobní 50x koncentrovaný roztok TAE obsahuje 121 g TRIS, 28,5 ml ledové kyseliny octové, 50 ml 0,5M EDTA a 421 ml H<sub>2</sub>O)

Separace běžela při napětí 120V při laboratorní teplotě a pro obarvení vzorků jsem používala barvicí pufr MassRuller DNA Loading Dye (Fermentas). Pro odhad velikosti PCR produktů jsem používala Lambda DNA/Eco RI + Hind III velikostní standard. Pomocí UVP transiluminátoru jsem vizualizovala výsledky elektroforézy, a pořídila snímky rozdělených PCR produktů (příloha 2).

### 3.6. Přečištění vzorků a sekvenace

Použita byla metoda přímého sekvenování. Vzorky určené k pozdějšímu sekvenování jsem enzymaticky přečistila, abych odstranila případné volné nukleotidy či jednořetězcovou DNA. Do hotového PCR produktu jsem přidala 0,5  $\mu$ l Exonuclease 1 (Fermentas) a 1  $\mu$ l FastAp (Fermentas), promíchala na vortexu a inkubovala v cycleru Bioer XP nejprve 30 minut při 37°C a 15 minut při 80°C.

Z takto přečištěných vzorků jsem odpipetovala 5  $\mu$ l a smíchala s 5  $\mu$ l ředěného primeru určeného k sekvenaci. Hotové sekvenační směsi jsem odeslala k sekvenování do firmy SeqMe (Dobříš).

### 3.7. Klonování

Klonování jsem prováděla pouze v případě, že obdržená sekvence nebyla jednoznačná – tzn. na jedné nukleotidové pozici nebylo možné rozlišit, o kterou bázi se jedná. Klonovat bylo nutné pouze několik linií druhu *H. bacteriophora*, u ostatních vzorků bylo vždy možné jednotlivé báze bez problémů identifikovat.

Pro přípravu média jsem použila 15g agaru, 10g tryptonu, 5g kvasinkového extraktu a 1l destilované vody. Vše jsem důkladně promíchala a vložila do autoklávu. Po zchladnutí jsem přidala 1 ml ampicilinu a nalila do Petriho misek. Na každou misku jsem pomocí sterilní kličky rozetřela 64  $\mu$ l X-gal (12,5 mg/ml) a 3,5  $\mu$ l IPTG (240 mg/ml). Dále jsem postupovala podle návodu přiloženého u “pGEMR-T Easy Vectors” (Promega).

### 3.8. Zpracování sekvencí a statistické zhodnocení

Získané sekvence jsem nejprve ověřila v databázi NCBI BLAST. Pomocí programu SeqMan II (DNASTAR) jsem vytvořila kontinuální sekvence (soubor několika překrývajících se sekvencí, které vytvoří celistvou konsenzuální sekvenci).

Srovnání (alignment) kontinuálních sekvencí jsem provedla metodou ClustalW v programu MEGA verze 6.06 (Tamura *et al*, 2013), neurčité báze jsem opravila ručně podle chromatogramů v programu BioEdit (Hall, 1999).

Program DnaSP verze 5.10 (Rozas *et al*, 2009) jsem použila k výpočtu následujících parametrů:

- nukleotidový polymorfismus  $\theta$  (Nei, 1987) – očekávaný podíl segregujících polymorfních míst v rámci druhu
- nukleotidová diverzita  $\pi$  (Nei, 1987) – průměrný počet rozdílných nukleotidů mezi jednotlivými haplotypy
- nukleotidová divergence  $K$  (Nei, 1987) - průměrný počet rozdílných nukleotidů mezi jednotlivými druhy
- počet haplotypů  $h$  (Nei, 1987) – celkový počet haplotypů v populacích
- haplotypová diverzita  $H_d$  (Nei, 1987) – její hodnota vyjadřuje odlišnost jednotlivých haplotypů. Vysoká hodnota  $H_d$  může naznačovat balancovanou selekci, nízká naopak selekci purifikační
- $F_u$  a  $F_{Li}$   $D^*$  (Fu & Li, 1993) – hodnota zohledňující rozdíl ve výskytu “singletone” mutací (vyskytujících se ojedinele) a v absolutním počtu mutací v rámci druhu
- $F_u$  a  $F_{Li}$   $D$  (Fu & Li, 1993) – test pracuje s outgroupem, srovnává rozdílný počet mutací v rámci druhu a mezi nimi
- Tajimovo  $D$  (Tajima, 1989) – porovnává hodnotu nukleotidového polymorfismu  $\theta$  a nukleotidové diverzity  $\pi$ . Pokud je gen selekčně-neutrální, obě hodnoty jsou si rovné.
- McDonaldův a Kreitmanův test (McDonald & Kreitman, 1991) – srovnává variabilitu vnitrodruhovou a mezidruhovou, a četnost synonymních a nesynonymních mutací v rámci druhu i mezidruhově.
- Analýza rozložení nukleotidového polymorfismu a divergence byla provedena pomocí metody “sliding window” .

Program Selecton (Stern *et al*, 2007) nám umožnil otestovat další model pro detekci selekce. Tento program pracuje s koeficientem Ka/Ks, což je poměr synonymních mutací a mutací nesynonymních – ty by v případě adaptivní selekce měly převažovat. Navíc tento poměr vypočítává pro každý triplet zvlášť, takže z výsledků jsme přesně schopni určit, kde se pravděpodobně dějí evoluční změny.

Pro širší fylogenetickou analýzu jsme použili pouze kódující část genu *enol-1*. Z dostupných databází (GenBank, Wormbase, ParaSite) jsme získali úplné kódující sekvence *enol-1* od 35ti druhů z kmene *Nematoda* (příloha 3), ke kterým jsme přidali 19 vlastních sekvencí (pocházejících od 4 druhů). Výběr sekvencí se řídil jednak identifikováním homologa, jednak šlo o zahrnutí představitelů každého kladu. Ve výběru proto chybí zástupce kladu II, neboť zde ještě nebyl žádný genom ani anotovaný transkriptom publikován.

Konstrukce fylogenetického stromu byla provedena v programu MEGA v 6.06 (Tamura *et al*, 2013). Nejprve byly stanoveny základní genetické vzdálenosti, poté vybrán vhodný model pomocí modulu ModelTest a nakonec zkonstruovány dendrogramy.

### 3.9. Testy virulence

#### 3.9.1. Metodika testů virulence

V rámci své bakalářské práce jsem testovala virulenci celkem 20 linií z rodu *Heterorhabditis* a *Steinernema* (viz tabulka 1).

Testy virulence jednotlivých linií hlístic jsem prováděla infekcí larev zavíječe voskového (*Galleria mellonella*). Nejprve bylo třeba stanovit vhodný počet infekčních jedinců na 10 larev (tzn. na jednu Petriho misku). Pro optimalizaci metody jsem provedla nákazu larev zavíječe pomocí 50, 100, 200 a 500 infekčních jedinců z linie HB 221 ve dvou opakováních pro laboratorní teplotu a pro 19 °C. Výsledky optimalizace jsem zaznamenala do tabulky 2.

Tabulka 2: Úmrtnost larev zavíječe voskového při různých dávkách infekčních jedinců a rozdílných teplotách (hodnoty v %).

<b>Teplota</b>	<b>50 IJ</b>	<b>100 IJ</b>	<b>250 IJ</b>	<b>500 IJ</b>
laboratorní	50	60	80	90
19 °C	70	50	50	80



Na základě optimalizačních testů jsem si zvolila jako nejvhodnější dávku 50 infekčních jedinců na misku. Pro každou linii jsem provedla osm opakování – čtyři v laboratorní teplotě a čtyři v termoboxu v 19 °C. Larvy zavíječe byly po 10 kusech umístěny do Petriho misek o průměru 9 cm a jejich dno bylo vypořádáno filtračním papírem.

Poté jsem ze zásobního roztoku, který obsahoval hlístice, třikrát odebrala vždy po 10  $\mu$ l a pomocí mikroskopu spočítala abundanci jedinců v jednotlivých dávkách. Infekci jsem prováděla vždy pomocí čerstvých hlístic do stáří cca 3 měsíců. Nehybní jedinci, kteří nereagovali na mechanickou stimulaci, byli považováni za mrtvé a tudíž nebráni v potaz. Výsledné číslo jsem zprůměrovala, a následně dopočítala potřebný objem tak, aby obsahoval 50 infekčních jedinců. Pomocí pipety jsem nejprve nanasla na misky sterilní vodu a poté potřebný objem roztoku s infekčními jedinci tak, aby se celkový objem tekutin na misce rovnal 600  $\mu$ l (což byla dávka vypočítaná pro tento průměr Petriho misek tak, aby výsledná vlhkost filtračního papíru zajistila výhodné podmínky pro hlístice). Infikované larvy jsem ponechala ve tmě a po uplynutí 5 dní jsem provedla vyhodnocení mortality.

### **3.11.1 Statistické zhodnocení testů virulence**

Pro statistické účely bylo zapotřebí využít dvoucestnou analýzu variance (Fisher, 1952), protože jsem testovala vliv dvou nezávislých proměnných – teploty a linie. Dále byl použit Tukey-Kramer test (Tukey, 1953 & Kramer, 1956) pro určení signifikance rozdílů vždy mezi dvěma konkrétními liniemi. Tyto analýzy byly provedeny v programu Microsoft Excel 2010.

## 4. Výsledky

Vzhledem k tomu, že v počátku mé práce nebyly známy sekvence genů pro enolázu z genomů, ale jen transkripty, se velikost PCR produktů zahrnující i introny od minimální předpokládané délky lišila. Na vytvoření jedné kontinuální sekvence bylo zapotřebí zhruba 3-5 sekvencí (za použití strategicky umístěných primerů), takže celkový počet vlastních analyzovaných sekvencí přesáhl 80.

### 4.1. Nukleotidový polymorfismus a divergence

V rámci druhu *S. feltiae* jsem porovnáním translatované mRNA sekvence z databáze ParaSite identifikovala ve osekvenovaném úseku genu *enol-1* celkem 4 exony a 3 introny. Komparativní analýzou celkem 8 linií *S. feltiae* jsem našla celkem 20 polymorfních míst, z čehož pouze 5 polymorfismů se nacházelo v místě intronu, zbylých 15 se nacházelo v kódující sekvenci. Také jsem objevila tři singletonové (ojediněle se vyskytující) mutace u linie Jakutsk – na nukleotidových pozicích 327 a 780 šlo o záměnu adeninu za guanin, a na pozici 888 byl cytosin nahrazen guaninem.

Pouze jediná mutace byla tzv. nesynonymní – na nukleotidové pozici 793 byl u linií ALG 3 a HOK 36 zaměněn adenosin za guanin, což způsobilo že kodon GTC kódující aminokyselinu valin byl změněn na ATC, následkem čehož čtecí rámec dekódoval isoleucin. Všechny ostatní mutace byly synonymní, tzn. neměly vliv na výsledné složení proteinu. Počet vyskytujících se haplotypů byl 7, pouze linie ALG 3 a HOK 36 byly indentické.

U druhu *H. bacteriophora* jsem osekvenovala a analyzovala gen kódující enolázu pro celkem 9 linií. Pomocí transkriptomu z databáze Nembase4 (jde o databázi transkriptomů nematod) jsem charakterizovala 11 exonů a 10 intronů. U tohoto druhu byla enoláza mnohem konzervovanější, polymorfismy byly velmi vzácné. Celkem jsem našla 4 polymorfismy – společnou mutaci, tedy záměnu adeninu za thymin, sdílely na 2105. pozici linie Az 36 a CAL 3C. Zbylé 3 mutace byly singletonové: u linie USA na nukleotidové pozici 2046 byl adenin zaměněn na guanin; u linie PAL na nukleotidové pozici 2097 byla záměna thyminu za adenin, a u linie Az 36 na pozici 2107 byl adenin zaměněn za thymin. Všechny mutace se našly v místě posledního (tedy 10.) intronu. Souhrn nalezených polymorfismů a vypočtených parametrů nukleotidové variability je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3: Zjištěné hodnoty týkající se nukleotidové variability v rámci druhů.

druh	délka (bp)	počet mutací	syn/nesyn mutace	počet haplotypů	Hd	$\pi$	$\theta$
<i>H.bacteriophora</i>	2 120	5	4/0	5	0,722	0,00051	0,00071
<i>S.feltiae</i>	1 350	20	19/1	7	0,964	0,00539	0,00514

Hd – haplotypová diverzita,  $\pi$  – pozorovaný polymorfismus,  $\theta$  – očekávaný polymorfismus.

Pro zjištění nukleotidové divergence bylo zapotřebí vybrat vhodný druh jako “outgroup” (tedy druh fylogeneticky nejbližší).

Pro druh *S. feltiae* jsem zvolila *S. monticolum*, a to z důvodu že její sekvence je dostupná v databázi ParaSite a lze u ní určit polohu intronů. V rámci těchto dvou druhů jsem našla 151 variabilních míst, z toho 125 mutací bylo synonymních a 26 nesynonymních

Pro druh *H. bacteriophora* jsem jako “outgroup” zvolila *H. beicherriana*, u které se nám podařilo určit strukturu intronů a exonů pouze za pomoci vlastních sekvencí. Tento druh je fylogeneticky bližší než *H. indica*, se kterou jsme také pracovali. Nalezeno bylo 19 variabilních míst, z toho pouze 6 mutací bylo nesynonymních, tzn. znamenalo změnu proteinového složení. Přehled hodnot souvisejících s divergencí u obou druhů je uveden v tabulce 4.

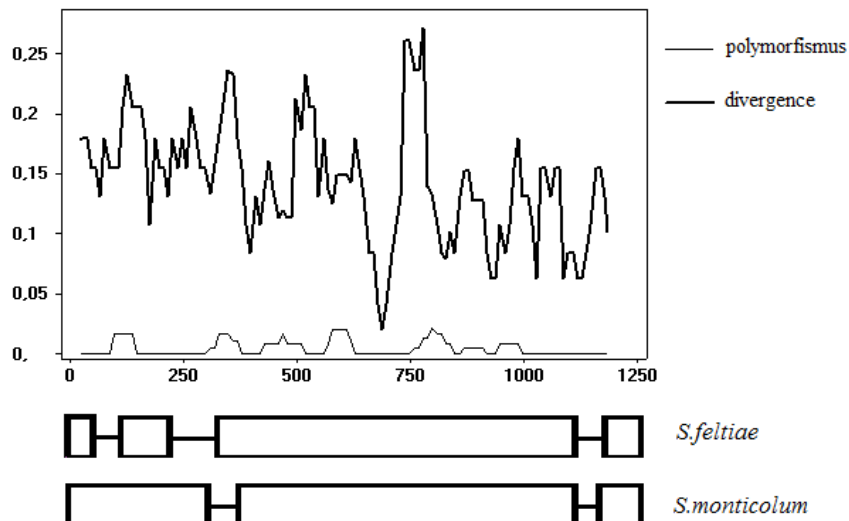
Tabulka 4: Zjištěné hodnoty týkající se divergence mezi druhy.

druh/outgroup	počet mutací	synonymní/nesynonymní	K
<i>H. bacteriophora</i> / <i>H. beicherriana</i>	19	13/6	0,0146
<i>S. feltiae</i> / <i>S. monticolum</i>	151	125/26	0,44889

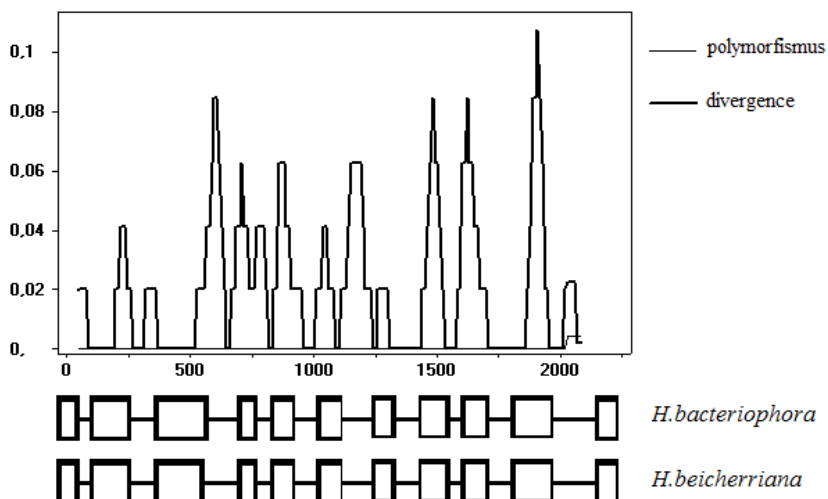
K – nukleotidová divergence.

## 4.2. Distribuce variability

V programu DnaSP jsem vytvořila schéma distribuce nukleotidové variability po délce genu *enol-1* (Obr. 4 a 5). Z grafů tak lze snadno vyčíst, kde se jednotlivé polymorfismy či divergence nacházejí (jestli v intronu nebo v exonu), a zda mají tendenci se shlukovat. U obou druhů je rozmístění detekované divergence poměrně vyrovnané.



Obr. 4: Nukleotidový polymorfismus a divergence *S. feltiae* za použití outgroupu *S. monticolum* a schéma intron/exon distribuce mutací (čára značí intron, obdélník exon).



Obr. 5: Nukleotidový polymorfismus a divergence genu *enol-1* u *H. bacteriophora* za použití outgroupu *H. beicherriana* a schéma intron/exon distribuce mutací (čára značí intron, obdélník exon).

### 4.3. Testy neutrality a selekční koeficient $Ka/Ks$

Testy neutrality používáme k detekci případného selekčního tlaku, který může na daný gen působit. Pomocí těchto testů lze zjistit, zda se evoluce enolázy ubírala cestou neutrální, nebo na ni naopak působila selekce určitého typu – každý test reaguje citlivěji na jeden konkrétní typ selekce (viz tabulka 5).

Pro *H. bacteriophora* jsem opět jako outgroup použila *H. beicherriana*, stejně jako pro *S. feltiae* jsem použila *S. monticolum*. Vzhledem k tomu, že introny nebylo možné pro potřeby programu DNAsp vhodně seřadit, všechny testy byly prováděny pouze na kódujících úsecích sekvencí.

Tabulka 5: Výsledky testů neutrality. Chybějící hodnota znamená, že nebylo možno test použít kvůli monomorfismu exonů.

Druh	Tajimovo D	Fu & Li D*	Fu & Li D	McDonald & Kreitman
<i>H. bacteriophora</i>	-	-	-1,74763	-
<i>S. feltiae</i>	0,31072	0,78198	0,90923	0,401

Ani jeden test neutrality neprokázal signifikantní odchýlení od neutrální evoluce genu.

Za použití programu Selecton jsme u *S. feltiae* detekovali částečně neutrální, a částečně purifikační selekci různé intenzity (viz obr. 6). Jelikož program pracuje se synonymními a nesynonymními mutacemi, byla pro tuto analýzu použita jen kódující část sekvence.

```

1          11          21          31          41
GIFR123VPSG4ASTG5THEALE6LR7QDKTIHH8GKG9VEKAVAN10IIEKIAPALI11
51         61         71         81         91
AK12FDVT13Q14AIDK15FMI16LDLD17G18TENK19SSLGA20NAI21LGVSL22V23AK24GA25VHKGV26
101        111        121        131        141
PI27YKHI28ADIA29G30IKQVILP31VP32AF33NVINGGSH34AG35NKLA36MQEF37MILP38YGA39KSF40
151        161        171        181        191
RE41MRMGSEI42YHHLKTEIKK43RYGLDATAVG44DEGGFAPNIQ45DNKEGLDLLN46
201        211        221        231        241
TA47GLAGYTG48KVSI49LAMDVAA50SEFYKENEKK51Y52L53E54FK55NP56S57PSKWITGDQ58
251        261        271        281        291
LSEL59YQSFIK60DYPVISIEDA61FDQDDWENWT62KLKA63ASSIQL64VGD65DLT66VTNP67
301        311        321        331        341
KR68QMA69EKK70SCNCLLLKVN71QIGSVTESIE72AKLSRANGW73GVMVSHRSGE74
351        361        371        381        391
TE75TF76ADLV77VGLATGQ78IKT79GAPCRSERLA80KVN81QILR82EE83ELGADATYAG84
E85

```

LEGENDA: 1 2 3 4 5 6 7  
pozitivní selekce      purifikační selekce

Obr. 6: Intenzita a druh selekce na jednotlivých kodonech enolázy *S. feltiae*.

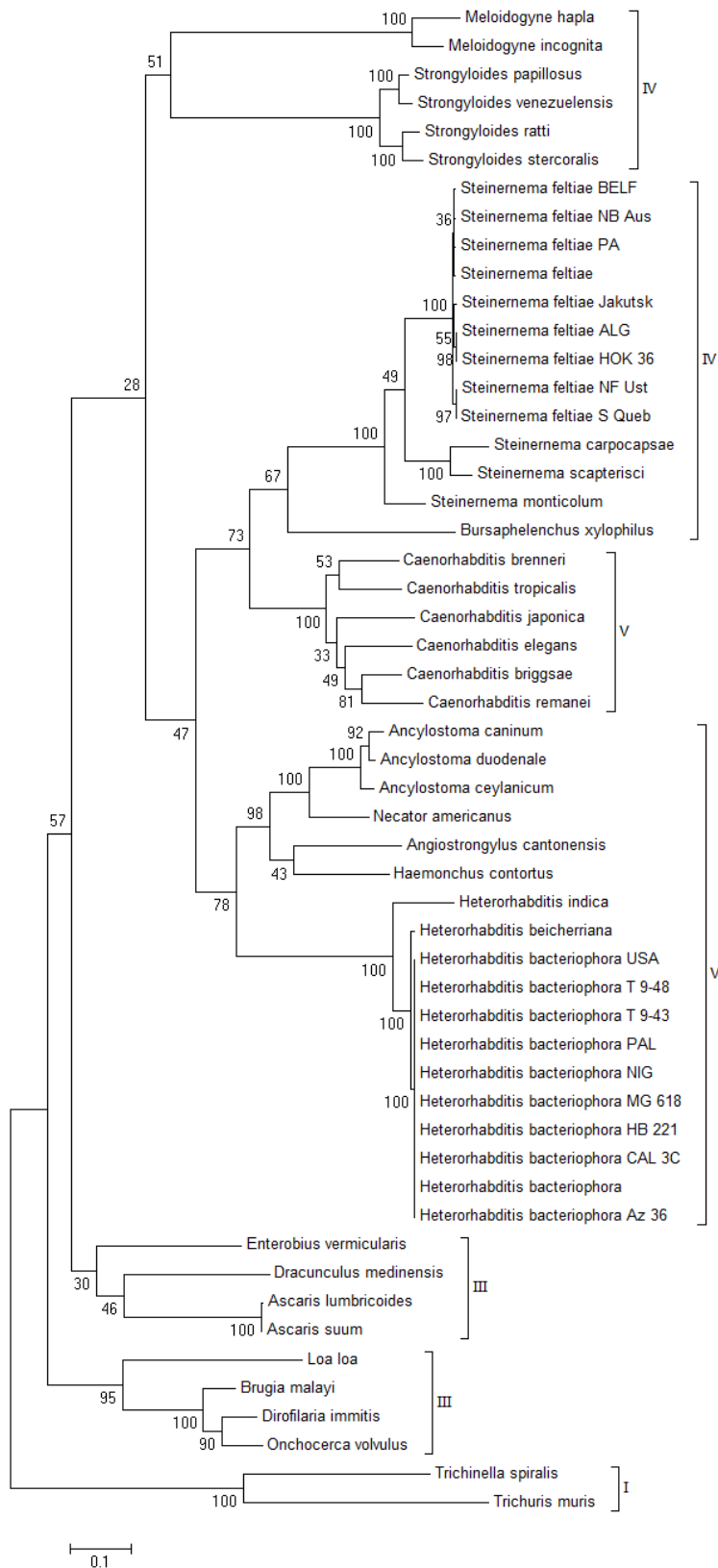
Pro druh *H. bacteriophora* bohužel nebylo možné tento test provést kvůli monomorfismu exonů.

#### 4.4. Fylogenetická analýza

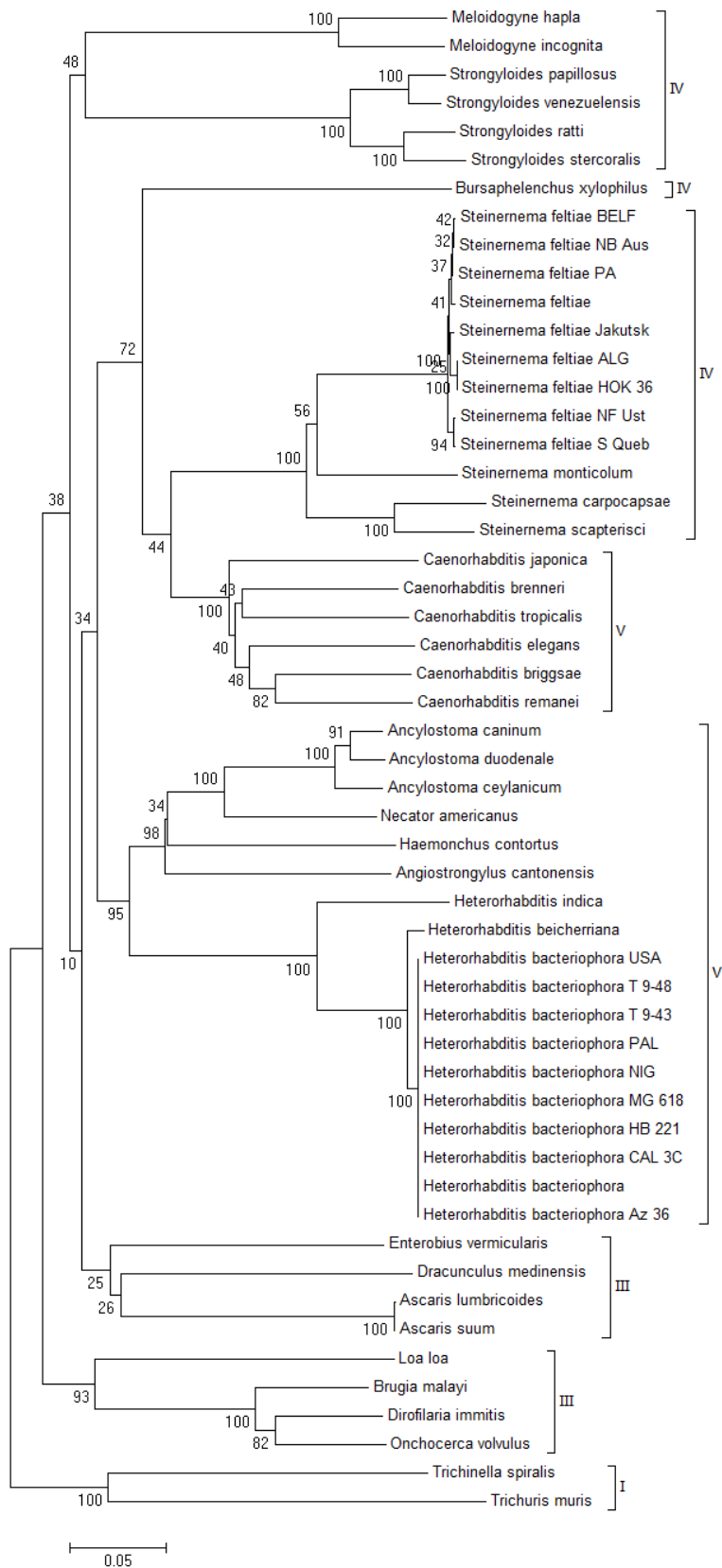
Fylogenetická analýza byla provedena v programu MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

K samotné konstrukci dendrogramů (obr. 7-8) jsem použila metodu “Neighbor-joining” (sdružuje postupně do klastrů nejpříbuznější druhy až po nejméně příbuzné; Saitou & Nei, 1987) a metodu “Maximum Likelihood” (založené navyhodnocování pravděpodobnosti zadaných dat; Tamura, 1992).

Nejprve však byly vybrány vhodné modely – u metody “Neighbor-joining” šlo o T92 Tamura tříparametrový model (Tamura, 1992), u metody “Maximum Likelihood” byl vybrán “General Time Reversible Model G+I” (Waddel & Steel, 1997).



Obr. 7: Dendrogram *enol-1* (Maximum Likelihood, General Time Reversible G+I Model, Bootstrap 1000x)  
Zakořeněno kladem I.



Obr. 8: Dendrogram *enol-1* (Neighbor-joining, T92 Tamura tříparametrový model, Bootstrap 1000x) Zakořeno kladem I.



Topologie obou dendrogramů se od sebe nijak zásadně neliší, nadefinované klady se k sobě víceméně sdružují dle současně uznávané fylogenetiky hlístic (Blaxter & Koutsovoulos, 2014).

Vyšší podporu mají především koncové klastry zahrnující rody, vzdálenější uzly jsou však již méně rozlišené. Nejvýraznější rozdíl oproti standardní fylogenezi je umístění kladu rodu *Caenorhabditis*. Ačkoliv náleží do kladu V, na obou stromech je v kladu s druhy kladu IV, a to s poměrně vysokou podporou.

Po nadefinování kladů podle obecně uznávaného systému byly vypočítány základní vzájemné genetické vzdálenosti (Kimura, 1980). Tyto hodnoty vyjadřují variabilitu genu *enol-1* jak v rámci těchto kladů, tak i mezi nimi (Tabulka 6-7).

Tabulka 6: Genetické vzdálenosti (Kimura, 1980) genu *enol-1* mezi jednotlivými klady.

	Klad I	Klad III	Klad IV
Klad I			
Klad III	0,314		
Klad IV	0,308	0,340	
Klad V	0,374	0,386	0,377

Tabulka 7: Genetické vzdálenosti (Kimura, 1980) genu *enol-1* v rámci kladů.

Klad V	0,204518964
Klad IV	0,237416309
Klad III	0,259369891
Klad I	0,298157273

Z obou tabulek je patrné, že genetické vzdálenosti v rámci kladů i mezi nimi dosahují velmi podobných hodnot.

## 4.5. Testy virulence

Testy virulence jsem prováděla na larvách zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) Rozdíly mezi liniemi byly otestovány dvoucestnou anovou s opakováním.

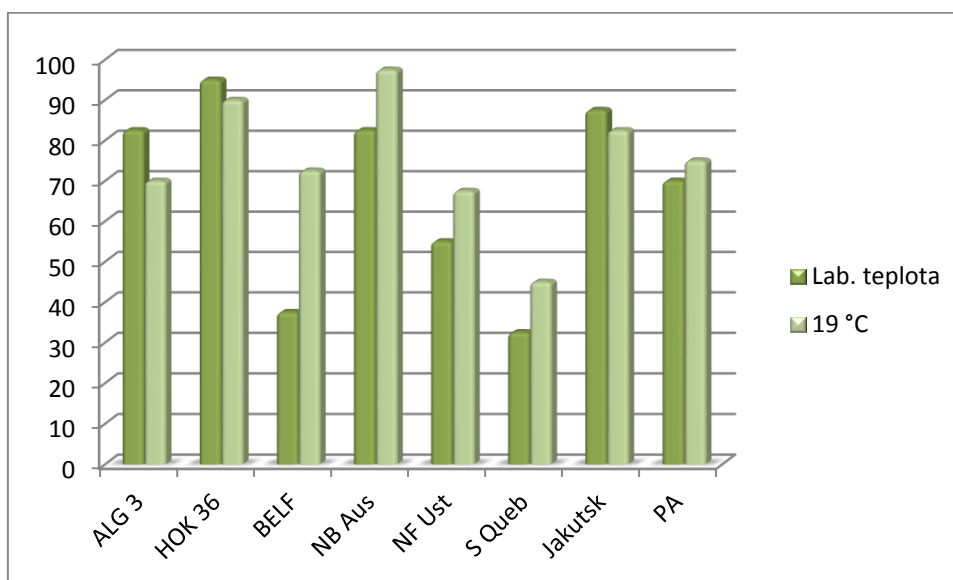
Výsledky pro druh *S. feltiae* ukázaly, že signifikantní vliv mají jednotlivé linie, u teploty se bohužel signifikance neprokázala. Hodnoty signifikance a F-testu jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Hodnoty F-testu (F) a signifikance (p) pro vliv linií a teplot u *S. feltiae*.

	F	p
Vliv linie	10,7246	< 0,0001
Vliv teploty	3,1803	0,0808

Tukey-Kramerův test odhalil signifikantní rozdíly mezi některými liniemi navzájem (příloha 4.1). Při laboratorní teplotě měl nejvyšší virulenci japonský kmen HOK 36, nejnižší kanadský kmen S Queb. Při teplotě 19°C byl nejvirulentnější australský kmen NB Aus, nejméně virulentní byl opět S Queb (viz obr. 9).

Při sloučení výsledků pro obě teploty je opět nejvirulentnější HOK 36, a nejméně virulentní S Queb. Průměrné hodnoty při obou teplotách a celkový průměr pro jednotlivé linie byl zaznamenán do tabulky (příloha 5.1).



Obr. 9: Průměrná mortalita zavíječů při nákaze jednotlivými liniemi *S. feltiae* při dvou různých teplotách (hodnoty v %).

Výsledky pro druh *H. bacteriophora* prokázaly signifikantní vliv jak u linie, tak u teploty. Hodnoty signifikance a F-testu jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Hodnoty F-testu (F) a signifikance (p) pro vliv linií a teplot u *H. bacteriophora*.

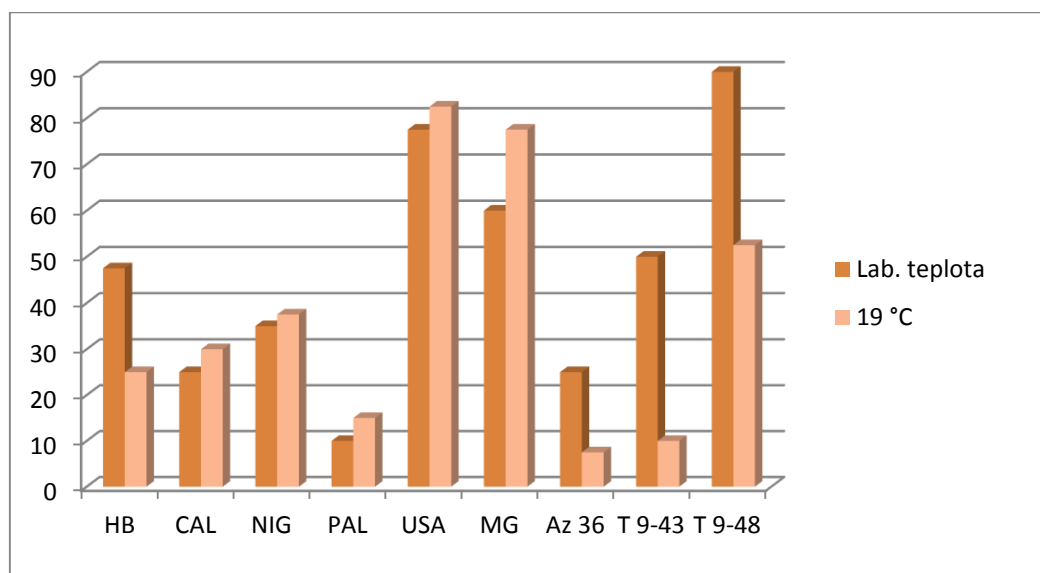
	F	p
Vliv linie	21,2525	< 0,0001
Vliv teploty	6,4693	0,0139

Tukey-Kramerův test opět odhalil signifikantní rozdíly i mezi některými liniemi navzájem (příloha 4.2).

Při laboratorní teplotě měl nejvyšší virulenci turecký kmen T 9-48, nejnižší palestinský kmen PAL. Při teplotě 19°C byl nejvirulentnější americký kmen USA, nejméně virulentní byl azorský kmen Az 36 (viz obr. 10).

Pokud zanedbáme teplotu a budeme na výsledky testů pro jednotlivé linie pohlížet jen jako na 8 nezávislých opakování, pak nejvyšší virulenci má opět USA a nejnižší opět PAL.

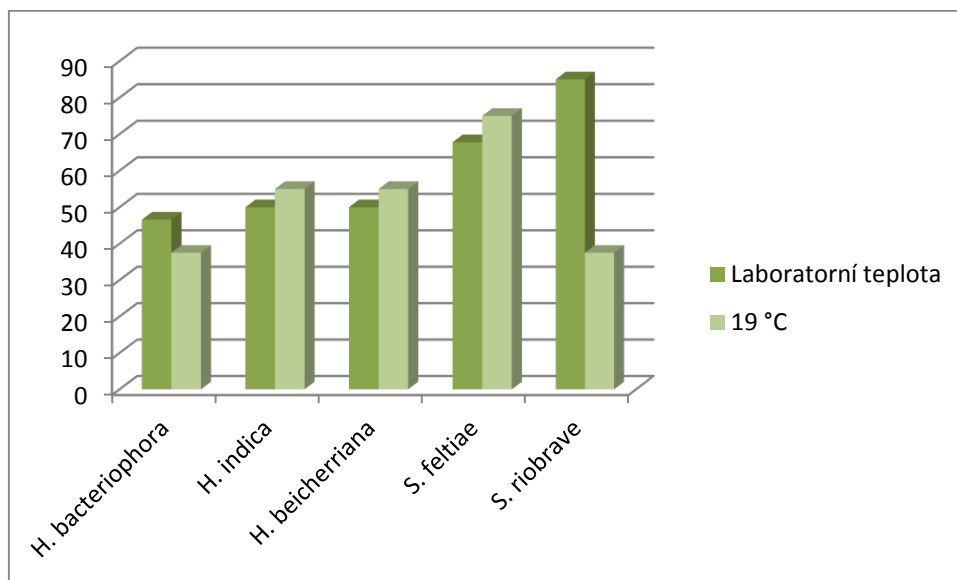
Průměrné hodnoty pro obě teploty a celkový průměr pro každou linii jsem zaznamenala do tabulky (příloha 5.2).



Obr. 10: Průměrná mortalita zaviječů při nákaze jednotlivými liniemi *H. bacteriophora* při dvou různých teplotách (hodnoty v %).

Dále jsem testovala virulenci druhů *H. indica*, *H. beicherriana* a *S. riobrave*. Jelikož od každého druhu jsem měla k dispozici pouze jednu linii, provedla jsem tedy standardně 4

opakování pro laboratorní teplotu a 4 při 19 °C. V následujícím grafu (obr. 11) jsem zohlednila i předešlé výsledky *H. bacteriophora* a *S. feltiae* a to tak, že ze všech dostupných výsledků pro všechny testované linie jsem vypočítala aritmetický průměr (příloha 5.3).



Obr. 11: Srovnání průměrné virulence u testovaných druhů hlístic (hodnoty v %).

Jak lze na první pohled vyčíst z grafu, druhy *H. indica* a *H. beicherriana* mají stejnou virulenci. Výsledky jsou však pravděpodobně zkreslené malým počtem opakování. Nejnížší virulenci při obou teplotách vykazuje *H. bacteriophora*, nejvyšší *S. feltiae*. Při laboratorní teplotě je sice nejvirulentnější *S. riobrave*, její aktivita však výrazně klesá s nižší teplotou.

Tukey-Kramerův test odhalil, že všechny druhy (kromě *H. indica* a *H. beicherriana*) se od sebe navzájem signifikatně odlišují (příloha 4.3).

## 5. Diskuze

### 5.1. Molekulárně-fylogenetická analýza

Zjištěné hodnoty nukleotidové variability u *S. feltiae* naznačují, že by zde mohl probíhat jistý druh selekce. Provedené testy neutrality sice neprokázaly signifikantní výsledky, ovšem celkově se přiklání spíše k selekci balancované, udržující variabilitu. Tyto testy však zanedbávají pohled na jednotlivé kodony. Proto jsme použili i program Selecton, který naopak kalkuluje míru selekce pro každý kodon zvlášť. Z výstupu tohoto programu by se dalo soudit, že na gen enolázy působí naopak selekce neutrální, a na některých místech dokonce až purifikační, která zřejmě v testech obecnějších (vztažených na gen jako celek) slabou balancovanou selekci vyrovnává. Jednoznačně tedy nejde určit, o jaký typ selekce se zde jedná, a proto bude třeba analyzovat větší množství vzorků a porovnat variabilitu u různých populací, resp. linií s rozdílnými virulencemi.

Na rozdíl od *S. feltiae*, u *H. bacteriophora* lze typ selekce poměrně dobře odhadnout na základě velice nízké nukleotidové variability. Skutečnost, že variabilia exonů je nulová, a že všech pět mutací se nachází ve stejném kodonu, nahrává hypotéze o purifikační selekci. Díky monomorfismu exonů nebylo možné většinu testů provést – kromě Fu & Liho D-testu, který ačkoliv nevyšel signifikantně, se zápornou hodnotou také přiklání spíše k purifikační selekci. Počet nalezených haplotypů je sice relativně vysoký (5), ale tyto haplotypy se od sebe odlišují pouze jedinou mutací v místě posledního intronu. S jistotou tedy lze říci pouze to, že enoláza u *H. bacteriophora* je ve srovnání s enolázou u *S. feltiae* vysoce konzervovaná, a navíc obsahuje několikanásobně větší počet intronů. Dalším možným vysvětlením pozorovaného monomorfismu je skutečnost, že rod *Heterorhabditis* je evolučně mladší, a tudíž ještě nedošlo k nahromadění mutací, které podmiňují haplotypovou variabilitu (Nguynen & Hunt, 2007).

Z fylogenetické analýzy vyplynulo, že evoluce enolázy zcela nekopíruje evoluci druhů, což se projevilo umístěním rodu *Caenorhabditis* z kladu V do kladu s rody kladu IV. Ačkoliv podpora tohoto uspořádání byla hraniční, přeci jen naznačuje, že zde může jít o určitou konvergenci. Zajímavý je i fakt, že by se jednalo o konvergenci u druhů s rozdílným způsobem života, neboť *Caenorhabditis* není druh parazitický. Při fylogenetické analýze jsem se setkala s velmi rozdílnou velikostí a četností intronů u enolázy v rámci kmene *Nematoda*. Obecně nejpřijímanější teorie, která se snaží objasnit častou ztrátu intronů v průběhu evoluce, zahrnuje proces homologní rekombinace mezi kopií genomové DNA a kopií cDNA, která je

bez intronů (Long & Langley, 1993) a vzniká procesem reverzní transkripce pomocí retrotranspozonů (Esnault *et al.*, 2000). Další příčinou ztráty intronů může být obyčejná delece, způsobená nedokonalou rekombinací (Robertson, 1998). Získání intronů může naopak být výsledek inserce mobilního genetického elementu (Giroux *et al.*, 1994), nebo mohou být introny vytvořeny aktivací nového sestřihového místa v degenerovaném kódujícím regionu. (Wang *et al.*, 2004).

Nedávné studie ukazují, že ztráta intronů se v evoluci objevuje mnohonásobně častěji než získání – dokonce se zdá, že evolučně starší skupiny mají tendenci mít méně kratších intronů, narozdíl od těch relativně mladých, kde se introny vyskytují v hojném počtu. (Cho *et al.*, 2004). Na našich vlastních datech se tato teorie dobře shoduje s pozorovanou praxí – u fylogeneticky poměrně mladého rodu *Heterorhabditis* jsem našla celkem 10 intronů, což je téměř trojnásobné množství než u fylogeneticky starších rodů jako *Steinernema* (3-4 introny) nebo *Caenorhabditis* (2-3 introny). U všech třech skupin jde o introny poměrně malé, pohybující se okolo 100 bazí. Jejich rozmístění se může lišit i v rámci velmi blízké příbuzných druhů, ovšem většinou se jedná o zanedbatelný posun.

## 5.2. Testy virulence

Vzhledem k velmi konzervované sekvenci u *H. bacteriophora* bylo zajímavé sledovat rozdílné výsledky testů virulence. Vlivy linií i jednotlivých teplot byly signifikantní – a do určité míry bylo možno pozorovat i závislost virulence při různých teplotách na geografickém původu. Při laboratorní teplotě byla nejvirulentnější linie T 9-48 (původem z Turecka), jakmile se ale teplota snížila na 19°C tak měla nejvyšší virulenci linie USA (původem z Virginie). Naopak celkově velmi malou virulenci vykazovala linie Az 36 (původem z Azorských ostrovů), kterou jsme získali od N. Simoes, a který jí ve své práci (Rosa & Simoes, 2003) také shledává velmi slabě virulentní.

U druhu *S. feltiae* byla také prokázána signifikantní odlišnost mezi liniemi, u teploty se signifikantní vliv sice prokázat nepodařilo, ale potřebný schodek v hodnotě p byl téměř nepatrný. Celkově nejvirulentnější byla linie HOK 36 (ačkoliv při 19°C ji převýšila linie NB Aus), která sdílela stejný haplotyp jako linie ALG 3, a zároveň nesla jedinou nesynonymní mutaci nalezenou v rámci druhu. Po provedení Tukey-Kramerova testu vyšlo najevo, že virulence linií HOK 36 a ALG 3 se od sebe signifikantně neodlišuje. Výsledky tedy mohou naznačovat, že tyto dvě linie mohou nést mutaci, která pozitivně ovlivňuje virulenci. Pro ověření této skutečnosti však bude třeba širšího výzkumu a většího počtu vzorků.

## 6. Závěr

V rámci této bakalářské práce se mi podařilo amplifikovat a osekvenovat převážnou část genu *enol-1* u druhů *H. bacteriophora*, *H. beicherriana*, *H. indica*, *S. feltiae* a *S. riobrave*. Dále jsem pracovala s druhy *H. bacteriophora* a *S. feltiae*, u nichž jsem analyzovala nukleotidovou variabilitu – u druhu *H. bacteriophora* byl zjištěn monomorfismus exonů a pouze 4 polymorfní místa na pozici 10. intronu; u druhu *S. feltiae* bylo nalezeno celkem 20 polymorfismů po celé délce sekvence, z toho jedna mutace byla nesynonymní a znamenala záměnu valinu za isoleucin. Tuto mutaci sdílely linie ALG 3 a HOK 36, které měly i stejný haplotyp. Míra divergence byla určena s použitím vhodného “outgroupu”. Provedeny byly testy neutrality, které neprokázaly žádnou signifikantní odchylku od neutrálního chování genu, i když je míra variability u zkoumaných druhů zásadně odlišná.

V druhé části své práce jsem testovala virulenci jednotlivých linií a druhů na larvách *Galleria mellonella*. U *H. bacteriophora* byl prokázán vliv jak linie, tak teploty; u *S. feltiae* se podařilo prokázat pouze vliv teploty. S použitím Tukey-Kramerova testu byly prokázány i vzájemné rozdíly mezi některými liniemi. Porovnáním nukleotidové variability a virulence lze říci, že zatímco u *S. feltiae* mohou různé haplotypy s mírou virulence souviset, u *H. bacteriophora* je tomu naopak, neboť i signifikantně rozdílná virulence byla detekována u stejného haplotypu.

## 7. Použitá literatura

Blaxter, M., Koutsovoulos, G. (2014) The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*, 142: 26-39.

Blaxter, M., Ley, P., Garey, J., Liu, L., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J., Mackey, L., Dorris, M., Frisse, L., Vida, J.T., Thomas, W.K. (1998): A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Letters to nature* 392, 72-75.

Cho, S., Jin, S.W., Cohen, A., Ellis, R. (2004) Phylogeny of Caenorhabditis Reveals Frequent Loss of Introns During Nematode Evolution. *Genome Research* 1207-1220.

Ciche, T., Sternberg, P.W. (2007) Postembryonic RNAi in Heterorhabditis bacteriophora: a nematode insect parasite and host for insect pathogenic symbionts. *BMC Developmental Biology* 7:101.

Díaz-Ramos, A., Roig-Borrellas, A., García-Melero, A., (2012) Alpha-Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, ID 156795.

Dillmann, A., Chaston, J.M., Adams, B.J., Ciche, T.A., Goodrich-Blair, H., Stock, S.P., Sternberg, P.W. (2012) An Entomopathogenic Nematode by Any Other Name. *PLoS Pathog* 8 (3): e1002527.

Esnault, C., Maestre, J., and Heidmann, T. (2000) Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat. Genet.* 24: 363–367.

Fisher, R.A. (1952) Two-way ANOVA. *Statistical Methods for Research Workers* ch. 7 - 8.

Fu, Y.X., Li, W.H., (1993) Statistical test of neutrality of mutations. *Genetics* 133, 693-709.

Giroux, M.J., Clancy, M., Baier, J., Ingham, L., McCarty, D., Hannah, L.C. (1994) De novo synthesis of an intron by the maize transposable element Dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*



91: 12150–12154.

Hao, Y., Montiel, R., Lucena, M.A., Costa, M., Simoes, N. (2012) Genetic diversity and comparative analysis of gene expression between *Heterorhabditis bacteriophora* Az29 and Az36 isolates: Uncovering candidate genes involved in insect pathogenicity. *Experimental Parasitology* 130, 116-125.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Kramer, C. Y., (1956) Extension of multiple range tests to group means with unequal number of replications. *Biometrics* 12, 307-310.

Long, M., Langley, C.H. (1993). Natural selection and the origin of jingwei, a chimeric processed functional gene in *Drosophila*. *Science* 260(5104): 91-95.

McDonald, J.H., Kreitman, M. (1991) Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature* 351, 652-654.

Nei, M. (1987) Molecular evolutionary genetics. *Columbia university press*, New York.

Nermet J., Půža, V., Mráček, Z., (2012) Entomopathogenic and molluscoparasitic nematodes – the Invisible Soil Killers. *Živa* 1/2012, 10.

Nguyen, K.B., Hunt, D.J. (2007) Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts: 701-723.

Osche, G., (1956) Die Preadaptation freilebender Nematoden an den Parasitismus. *Verh. dtsh. zool. Ges., Erlangen* (1955) (Zool. Anz., Suppl. 19): 391-396.

Osman, M.A., (2004) Changes in sorghum enzyme inhibitors, phytic acid, tannins, and in vitro protein digestibility occurring during Khamir (local bread) fermentation. *Food Chem.*, 88, pp. 129–134.

Pancholi, V., (2001) Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 902-920.

Robertson, H.M. (1998) Two large families of chemoreceptor genes in the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae* reveal extensive gene duplication, diversification, movement, and intron loss. *Genome Res.* 8: 449–463.

Rosa, J.S., Simoes, N. (2003) Evaluation of 28 strains of *Heterorhabditis bacteriophora* isolated in Azores for biocontrol of the armyworm *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera, Noctuidae) *Biological Control* 29, 409-417.

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

Saitou, N., Nei, M., (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* Jul;4(4):406-25.

Sommer, R., Streit, A. (2011) Comparative Genetics and Genomics of Nematodes: Genome Structure, Development and Lifestyle. *Annual Review of Genetics.* 2011. 45:1-20.

Stern, A., Doron-Faigenboim, A., Erez, E., Martz, E., Bacharach, E., Pupko, T. (2007) Selecton 2007: advanced models for detecting positive and purifying selection using a Bayesian inference approach. *Nucleic Acids Research.* 35: W506-W511.

Sudhaus, W. (1993) The nematode genera *Heterorhabditis* and *Steinernema*, both entomopatogenic by means of symbiotic bacteria, are not sister taxa. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesseschaft* 86, 146.

Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.

Tamura, K. (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G C content biases. *Mol. Biol. Evol* 10, 512-526.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Tukey, J. W., (1953) The problem of multiple comparisons. *Unpublished manuscript*. Princeton University.

Vassali, J., Sappino, A., Belin, D., (1991) The Plasminogen activator/Plasmin System. *Invest*, 1067-1072.

Waddel, P.J., Steel, M.A. (1997) General time-reversible distances with unequal rates across sites: mixing gamma and inverse Gaussian distributions with invariant sites. *Mol. Phylogenet. Evol* 8(3): 398-414.

Wang, W., Yu, H., and Long, M. (2004) Duplication-degeneration as a mechanism of gene fission and the origin of new genes in *Drosophila* species. *Nat. Genet.* 36: 523–527.

### **Internetové zdroje:**

NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)

NemBase4 (<http://www.nematodes.org/nembase4>)

ParaSite (<http://parasite.wormbase.org>)

Wormbase (<http://www.wormbase.org>)

## Příloha 1

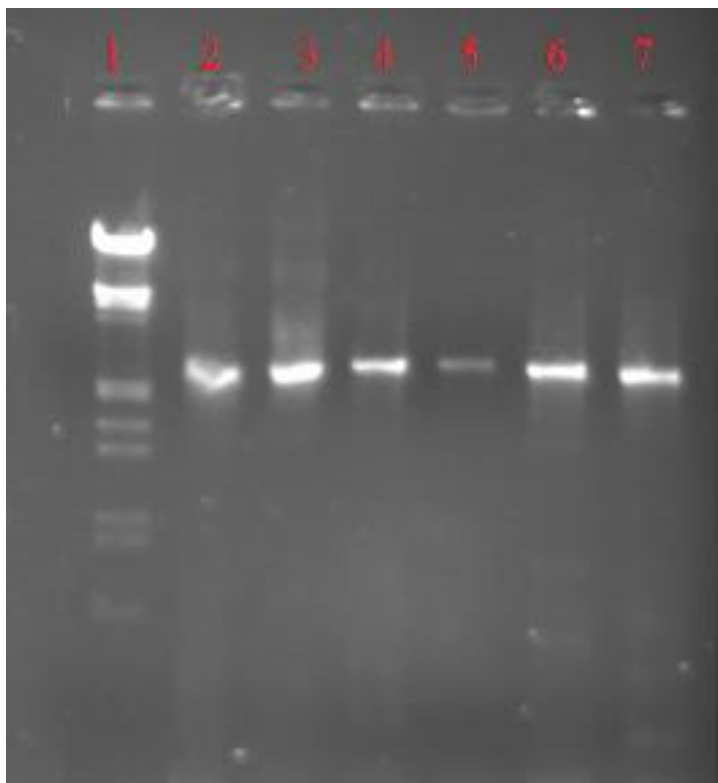
Tabulka použitých primerů, jejich sekvencí, orientace a jejich autorů.

Název	Sekvence ve směru 5'– 3'	Orientace	Autor
NenolF1	CTCGCATCCACGCTCGTCAG	forward	D.Chundelová
NenolR2	GGGTTGGTGACCTTCTCTCCG	reverz	D.Chundelová
Enol79for	TTGATTCACGTGGTAACCCG	forward	M.Žurovcová
Enol1287rev	CAATGCGCAAAAGCTGGTTGTAC	reverz	M.Žurovcová
Enol700for	TTCAATGTAATTAACGGAGG	forward	M.Žurovcová
Enol700rev	GGATTTGTCACAGTCAAATC	reverz	M.Žurovcová
SfelEnolF1b	ATCTACGATTCTCGTGGAAATCC	forward	M.Žurovcová
SfelEnolF2	ATCTGAGATCTACCACCACC	forward	M.Žurovcová

Příloha 1: Seznam použitých primerů. (forward – přímý primer ve směru transkripce, reverz – zpětný primer proti směru transkripce).

## Příloha 2

Vizualizace amplifikovaného genu *enol-1* u rodu *Heterorhabditis* na agarózovém gelu (seznam linií viz tabulka 1).



Příloha 2: Typický výsledek elektroforézy na agarózovém gelu (jamka č.1 – velikostní standard Lambda DNA/Eco RI + Hind III, č. 2,3 – HB 221, č.4 – NIG, č.5 – PAL, č.6 – USA, č.7 – *H. indica*).

### Příloha 3

<b>Druh</b>	<b>ID</b>	<b>Zdroj</b>
<i>Ancylostoma canicum</i>	ANCCAN_17324	ParaSite
<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	53326:Accey_s0389.g531.t1	Wormbase
<i>Ancylostoma duodenale</i>	ANCDUO_09450	ParaSite
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	ACAC_0000355401	ParaSite
<i>Ascaris lumbricoides</i>	ALUE_0001430001	ParaSite
<i>Ascaris suum</i>	6253:GS_19426	Wormbase
<i>Brugia malayi</i>	Bm13965	Wormbase
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	6326:BUX.s01281.470	Wormbase
<i>Caenorhabditis brenneri</i>	CBN18669	Wormbase
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XM_002631326.1	GenBank
<i>Caenorhabditis elegans</i>	T21B10.2a	Wormbase
<i>Caenorhabditis japonica</i>	CJA09944	Wormbase
<i>Caenorhabditis remanei</i>	CRE01886	Wormbase
<i>Caenorhabditis tropicalis</i>	Csp11.Scaffold630.g20703	Wormbase
<i>Dirofilaria immitis</i>	nDi.2.2.2.g05723	ParaSite
<i>Dracunculus medinensis</i>	DME_0001026501	ParaSite
<i>Enterobius vermicularis</i>	EVEC_0000331901	ParaSite
<i>Haemonchus contortus</i>	HM138086.1	GenBank
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	17016	Nembase4
<i>Heterorhabditis indica</i>	HM067750.1	GenBank
<i>Loa Loa</i>	LOAG_05708	ParaSite
<i>Meloidogyne hapla</i>	MhA1_Contig290.frz3.gene7	Wormbase
<i>Meloidogyne incognita</i>	Minc04285	Wormbase
<i>Necator americanus</i>	NECAME_00001	ParaSite
<i>Onchocerca volvulus</i>	OVOC9778	Wormbase
<i>Steinernema carpocapse</i>	HM067752.1	GenBank
<i>Steinernema feltiae</i>	L889_g1	ParaSite
<i>Steinernema glaseri</i>	HQ696924.1	GenBank
<i>Steinernema monticolum</i>	L898_g1	ParaSite
<i>Steinernema scapterisci</i>	L892_g13537	ParaSite
<i>Strongyloides papillosus</i>	SPAL_0000750800	ParaSite
<i>Strongyloides ratti</i>	Sra_g180	Wormbase
<i>Strongyloides stercoralis</i>	SSTP_0000718800	ParaSite
<i>Strongyloides venezuelensis</i>	SVE_0965700	ParaSite
<i>Trichinella spiralis</i>	Tsp_09466	Wormbase
<i>Trichuris muris</i>	TMUE_s0102000900	ParaSite

Příloha 3: Seznam druhů, jejichž sekvence byla získána z internetových databází.

## Příloha 4

Výsledky Tukey-Kramerova testu pro jednotlivé linie testovaných druhů (seznam linií viz tabulka 1) a testované druhy.

	ALG 3	BELF	HOK 36	Jakutsk	NB Aus	NF Ust	PA
ALG 3							
BELF	-						
HOK 36	-	*					
Jakutsk	-	*	-				
NB Aus	-	*	-	-			
NF Ust	-	-	*	-	*		
PA	-	-	-	-	-	-	
S Queb	*	-	*	*	*	-	*

Příloha 4.1: Výsledky Tukey-Kramerova testu pro *S. feltiae* (\* signifikantní odlišnost, - nesignifikantní odlišnost).

	Az 36	CAL 3C	HB 221	MG 618	NIG	PAL	T 9-43	T 9-48
Az 36								
CAL 3C	-							
HB 221	-	-						
MG 618	*	*	*					
NIG	-	-	-	*				
PAL	-	-	-	*	-			
T 9-43	-	-	-	*	-	-		
T 9-48	*	*	*	-	*	*	*	
USA	*	*	*	-	*		*	-

Příloha 4.2: Výsledky Tukey-Kramerova testu pro *H. bacteriophora* (\* signifikantní odlišnost, - nesignifikantní odlišnost).

## Příloha 4 – pokračování

	<i>H. bacteriophora</i>	<i>H. indica</i>	<i>H. beicherriana</i>	<i>S. feltiae</i>
<i>H. bacteriophora</i>				
<i>H. indica</i>	*			
<i>H. beicherriana</i>	*	-		
<i>S. feltiae</i>	*	*	*	
<i>S. riobrave</i>	*	*	*	*

Příloha 4.3: Výsledky Tukey-Kramerova testu pro testované druhy hlístic (\* signifikantní odlišnost, - nesignifikantní odlišnost).



## Příloha 5

Průměrné hodnoty mortality larev *Galleria mellonella* při infekci jednotlivými liniemi druhů *S. feltiae* a *H. bacteriophora* a pro testované druhy hlístic (v %). Seznam linií viz tabulka 1.

	ALG 3	HOK 36	BELF	NB Aus	NF Ust	S Queb	Jakutsk	PA
Lab. teplota	82,5	95	37,5	82,5	55	32,5	87,5	70
19 °C	70	90	72,5	97,5	67,5	45	82,5	75

Příloha 5.1: Průměrné hodnoty pro linie *S. feltiae*.

	HB	CAL	NIG	PAL	USA	MG	Az 36	T 9-43	T 9-48
Lab. teplota	47,5	25	35	10	77,5	60	25	50	90
19 °C	25	30	37,5	15	82,5	77,5	7,5	10	52,5

Příloha 5.2: Průměrné hodnoty pro linie *H. bacteriophora*.

	<i>H. bacteriophora</i>	<i>H. beicherriana</i>	<i>H. indica</i>	<i>S. feltiae</i>	<i>S. riobrave</i>
Lab. teplota	46,6	50	50	67,8	85
19 °C	37,5	55	55	75	37,5

Příloha č. 5.3: Průměrné hodnoty pro testované druhy hlístic.