

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

**Multilokusová charakteristika symbiontů entomopatogenních hlístovek  
rodu *Steinernema***

Diplomová práce

**Bc. Lucie Faktorová**

Školitel: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.

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

České Budějovice 2016

## **Diplomová práce**

Faktorová, L., 2016: Multilokusová charakteristika symbiontů entomopatogenních hlístovek rodu *Steinernema* [Multilocus characteristic symbionts of entomopathogenic nematodes from the genus *Steinernema*. Mgr. Thesis, in Czech.] – 85p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Annotation**

During the evolution some groups of organisms have become coevolutionary associated with other groups, as is the case of host – symbiont systems. To explore coevolutionary history of hosts and their associated symbionts, phylogenetic reconstruction of symbionts and phylogenetic reconstruction of hosts are usually compared. Coevolution is described by coevolutionary events (cospeciation, host switch, duplication, failure to diverge events and lineage sorting events). The aim of this work was to test the suitability of MLST method for the complex of entomopathogenic nematodes from the genus *Steinernema* (with detailed analysis of *Steinernema feltiae*) and their symbiotic bacteria *Xenorhabdus bovienii* and subsequently use cophylogenetic comparative analysis to determine their level of cospeciation.

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové 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,

.....

## **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. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Petře Kokořové, Jindřišce Tomáškové 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	Hlístice .....	2
1.2	Entomopatogenní hlístice.....	3
1.2.1	Životní strategie .....	4
1.2.2	Invazní larva .....	4
1.2.3	Detekce hostitele a životní cyklus .....	5
1.3	Hostitelské spektrum.....	6
1.4	Symbioza hlístovek.....	7
1.4.1	Symbiotické bakterie .....	8
1.5	Identifikace bakterií .....	9
1.5.1	Genotypizační metody .....	10
1.5.2	MLST – multilokusová sekvenční typizace .....	10
1.6	Koevoluce .....	12
1.6.1	Studium koevoluce pomocí kofylogenetických metod .....	14
2.	Cíle práce.....	16
3.	Materiál a metody .....	17
3.1	Izolace DNA .....	18
3.1.1	Izolace DNA hlístic .....	18
3.1.2	Příprava bakterií a izolace bakteriální DNA.....	19
3.1.2.1	Izolace DNA pomocí kitu GeneJET Genomic DNA (ThermoScientific) .....	19
3.1.2.2	Izolace DNA pomocí kitu Exgene Tissue (plus) SV mini (GeneAll) .....	20
3.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	20
3.2.1	Primery pro amplifikaci vybraných oblastí genomu .....	21
3.2.2	PCR profily.....	22
3.3	Gelová elektroforéza.....	22
3.4	Purifikace PCR produktů a sekvenování .....	23
3.4.1	Přečišťování pomocí směsi ExoSap-IT® (USB), (Dugan, <i>et al.</i> , 2002) .....	23
3.4.2	Sekvenační reakce .....	24
3.5	Statistické zpracování sekvencí .....	24
3.5.1	Kontrola a seřazení sekvencí .....	24
3.5.2	Fylogenetické stromy .....	24
3.5.3	Kofylogenetické metody.....	25
4.	Výsledky .....	27
4.1	Testované markery .....	27
4.1.1	Fylogenetické vztahy hlístovek – vícedruhový soubor .....	27
4.1.2	Fylogenetické vztahy linií <i>X. bovienii</i> .....	29
4.1.3	Kofylogenetická analýza .....	35
4.1.4	Fylogenetické vztahy hlístovek – <i>S. feltiae</i> .....	40
4.1.5	Fylogenetické vztahy linií <i>X. bovienii</i> u <i>S. feltiae</i> .....	42
4.1.6	Kofylogenetická analýza .....	45
5.	Diskuze .....	48
6.	Závěr.....	53
7.	Literatura .....	54
8.	Přílohy .....	68

# 1. Úvod

Entomopatogenní hlístice (EPN) z čeledi Steinernematidae (Rhabditida, Nematoda) jsou obligátními patogeny hmyzu (Poinar, 1979). Vzhledem k jejich schopnosti infikovat různé druhy hmyzu (Laumond, *et al.*, 1979) se často využívají i v biologické ochraně pro kontrolu hmyzích škůdců (Georgis, 2002). Je známo, že se EPN vyskytují ve zvláštní symbióze s gramnegativními bakteriemi rodu *Xenorhabdus* z čeledi Enterobacteriaceae (Boemare, *et al.*, 1993). Jedná se o tzv. **mutualistický vztah**, který přináší prospěch oběma zúčastněným stranám.

Entomopatogenní hlístice se v půdě vyskytují ve formě invazní larvy, která ve specializované struktuře svého těla nese desítky symbiotických bakterií (Bird a Akhurst, 1983; Snyder, *et al.*, 2007). Po vstupu do těla hmyzího hostitele uvolní hlístice své symbiotické bakterie, které produkují extracelulární toxiny a degradační enzymy. Bakterie se rychle množí ve výživné hmyzí hemolymfě a smrt hostitele nastává následkem bakteriální septikémie asi po 24–48 hodinách (Griffin, *et al.*, 2005). Bakterie dále slouží jako zdroj potravy pro rostoucí a množící se hlístice. Když jsou z těla hmyzího hostitele vyčerpány veškeré živiny, vrací se hlístice zpět do invazního stadia a jejich tělo je osidlováno dalšími bakteriálními buňkami (Ciche, *et al.*, 2008). Následně se hlístice opět uvolní do půdy a hledají nového hmyzího hostitele (Adams a Nguyen, 2002).

Vztah mezi hlísticemi rodu *Steinernema* a jejich symbiotickou bakterií rodu *Xenorhabdus* je v přirozeném prostředí obligátní (Akhurst a Boemare, 1990). Kromě toho, že bakterie slouží jako potrava pro rostoucí a množící se hlístice, chrání také mrtvé tělo hostitele proti dalším mikroorganismům, především produkcí antibiotik, exotoxinů, fungistatik a mnoha dalších antimikrobiálních látek, které jsou potřebné pro potlačení průniku dalších mikroorganismů do těla mrtvého hostitele (Akhurst, 1982; Chen, *et al.*, 1994).

Předpokládá se, že organismy žijící v mutualistickém vztahu často podléhají koevoluci, což může nakonec vést k paralelní speciaci nebo kospeciaci u obou partnerů (Page a Charleston, 1998). Obecně platí, že nejpřímější evidenci paralelismu je možné pozorovat u kofylogenetických studií blízké příbuzných druhů a vnitrodruhových linií (Funk, *et al.*, 2000; Wernegreen, *et al.*, 1999; Peccoud, *et al.*, 2009; Liu, *et al.*, 2013).

*X. bovienii* a jeho hostitelské hlístice představují ideální model pro kofylogenetické studie. *X. bovienii* je nejvíce "promiskuitní" druh z rodu *Xenorhabdus*,

asociovaný nejméně s deseti druhy hlístic rodu *Steinernema* (Campos – Herrera, *et al.*, 2012), které se řadí do dvou z pěti hlavních fylogentických skupin v rámci čeledi Steinernematidae. U komplexu *Steinernema* a *Xenorhabdus* však byla dosud provedena jediná studie (Lee a Stock, 2010), zaměřující se na řešení kospeciace, ve které byla zahrnuta celá čeleď Steinernematidae a všechny druhy rodu *Xenorhabdus*. Tato studie však nepřinesla žádný důkaz o kospeciaci v tomto komplexu. Autoři absenci kospeciace vysvětlili častými přeskoky symbionta mezi hostitelskými druhy („host switch“) nebo nedostatečným množstvím studovaných taxonů.

Podobně pak Murfin, *et al.* (2015) u komplexu *Steinernema* – *Xenorhabdus* porovnali fylogenezi 9 různých kmenů *X. bovienii* odvozenou z celého genomu s fylogenezí hostitelských hlístic, a pozorovali možnou ko-kladogenezi mezi třemi kmeny *X. bovienii* a třemi kmeny *S. feltiae*, což naznačilo možnou specifičnost v rámci tohoto komplexu.

Znalost úrovně kospeciace může osvětlit roli koevoluce v utváření speciace a diverzifikace symbiotických partnerů a probíhajících biologických procesů (Kawakita, *et al.*, 2004). Takové poznání u entomopatogenních hlístic a jejich symbiontů povede k rozvoji našich znalostí o vývoji symbiozy mezi hlísticemi a bakteriemi. Následně může také zvýšit úspěšnost využívání EPN v biologických ochraně. Kromě toho, pochopení specifičnosti vztahu *Steinernema* – *Xenorhabdus* by mohlo přinést další důležité informace o možném riziku používání EPN v biologickém boji proti hmyzím škůdcům, kde teoreticky hrozí, že bakteriální symbiont komerčně aplikované hlístice by mohl nahradit symbionta původní populace hlístic.

## 1.1 Hlístice

Hlístice (Nematoda) představují kmen mnohobuněčných organismů, tvořící nejrozšířenější a nejpočetnější skupinu živočichů na zemi (Bongers a Ferris, 1999; Torsvik, *et al.*, 2002; Curtis, *et al.*, 2002; Rappe a Giovannoni, 2003; Curtis a Sloan, 2004). Je známo obrovské množství druhů (přes 20 tisíc), které se vyskytují v různých ekosystémech. Některé hlístice jsou volně žijící a živí se bakteriemi, jiné patří mezi saprofágní druhy, přežívající na rozkládajících se tkáních. Některé parazitují na bezobratlých či obratlovcích (včetně člověka), jiné na rostlinách, houbách nebo hmyzu.

Tělo těchto hlístic je válcovité a ke konci ztenčené, na jeho povrchu se vyskytuje pevná kutikula, produkovaná jednovrstevnou pokožkou, která zajišťuje pružnost

a především pevnost těla. Tělní dutinu mají vyplněnou tekutinou, která udržuje hydrostatický tlak a umožňuje tak pohyb hlístic. Díky tomu jsou některé druhy schopny „stát“ nebo dokonce skákat, čehož využívají při hledání hostitele (Campbell a Kaya, 1999). Hlístice se také vyznačují ústním ústrojím se 3 až 6 pysky. Trávení je zajištěno trávicí tubicí, procházející pseudocoelem, mající na jedné straně pístovitý hltan, díky kterému může docházet k nasávání potravy (Adams, *et al.*, 2006).

## 1.2 Entomopatogenní hlístice

Hlístice čeledí Steinernematidae a Heterorhabditidae, také nazývané jako hlístovky (Weiser a Mráček, 1988), patří do skupiny entomopatogenních hlístic, které jsou dle Maggentiho (1981) řazeny do kmene hlístic (Nematoda), řádu háďata (Rhabditida). Skupina entomopatogenních hlístovek má v současné době více než 100 druhů, řazených do dvou čeledí. Do čeledi Steinernematidae Chitwood a Chitwood, 1937 se řadí rody *Steinernema* Travassos, 1927 doposud s více než devadesáti popsányými druhy a rod *Neosteinerema* Nguyen a Smart, 1994 s druhem jediným. Čeleď Heterorhabditidae Poinar, 1976 obsahuje jediný rod *Heterorhabditis* Poinar, 1976 s cca 18 dosud známými druhy.

Hlístovky jsou rozšířenou skupinou organismů, které se vyskytují na všech obydlených kontinentech. Jedná se o půdní organismy, žijící na polích, v sadech a zahradách (Nermuť, *et al.*, 2012). Nejvíce druhů se však nachází v oblastech mírného pásu. Pro výzkum je častěji využívána čeleď Steinernematidae, zejména proto, že se jedná o 5x větší skupinu, než je čeleď Heterorhabditidae. S největší pravděpodobností se u čeledi Steinernematidae vyskytuje větší molekulární diverzita mezi jednotlivými druhy. Příčinou velké mezidruhové diverzity je zřejmě stáří čeledi Steinernematidae, jejíž první výskyt je datován dříve, než tomu bylo u čeledi Heterorhabditidae (Adams a Nguyen, 2002). První entomopatogenní hlístice z čeledi Steinernematidae byla popsána v roce 1923 jako *Aplectana kraussei* – nyní *Steinernema kraussei*. V současné době je známo téměř 100 druhů z čeledi Steinernematidae a 18 druhů čeledi Heterorhabditidae. V České Republice je nejrozšířenějším druhem *S. feltiae*, druhým nejrozšířenějším je lesní druh *S. kraussei*. Ve světě je nejrozšířenějším druhem také *S. feltiae*, avšak druhým nejrozšířenějším druhem je *S. carpacapsae*.

Výskyt původních hlístovek je datován před 350 ti 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 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 které 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 (schopnost infikovat, usmrtit a pak využít svého hostitele), symbioza 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.*, 2000, 2015).

### 1.2.1 Životní strategie

Entomopatogenní hlístice parazitují na různých druzích hmyzu včetně larev motýlů, mūr, brouků i much. V laboratorních testech byla dokonce prokázána infekce u pavouků (Poinar a 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). Z toho vyplývá, že tito parazité jsou významní tím, že dokáží žít v symbióze s bakterií (Akhurst a Boemare, 1988). Aby však mohlo dojít v přírodě k nákaze hostitele, musí být splněna důležitá podmínka, a to výskyt alespoň jednoho z vývojových stadií v půdě (Bathon, 1996).

### 1.2.2 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 a 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 a Leutenegger, 1968; Poinar, 1990).



Důležitým mechanismem pro přežití v půdě je agregace, neboli seskupení. Díky tomuto mechanismu hlístovky vytvářejí shluky, přičemž ty při okrajích shluku většinou zahynou, čímž vytvoří ochrannou bariéru (Ishibashi a Kondo, 1990), která zabraňuje vysychání ostatních členů tohoto shluku a chrání je rovněž proti slunečnímu záření (Wallace a Doncaster, 1964). Toto chování je často řízeno citlivostí hlístovek, která může být mechanická nebo dotyková (Croll a Matthews, 1977).

### 1.2.3 Detekce hostitele a životní cyklus

Entomopatogenní hlístice mají specifický životní cyklus, který začíná infekcí hostitele již zmíněnou invazní larvou, která detekuje svého hostitele pomocí různých smyslových orgánů. Jedná se především o sensorické orgány tzv. amphidy a papily, umístěné na hlavě larvy, které zachycují CO<sub>2</sub> a další metabolity uvolňované hostitelem (Griffin, *et al.*, 2005). Invazní larva se poté může pohybovat po chemickém gradientu těchto látek směrem k hostiteli (Ishibashi a Kondo, 1990).

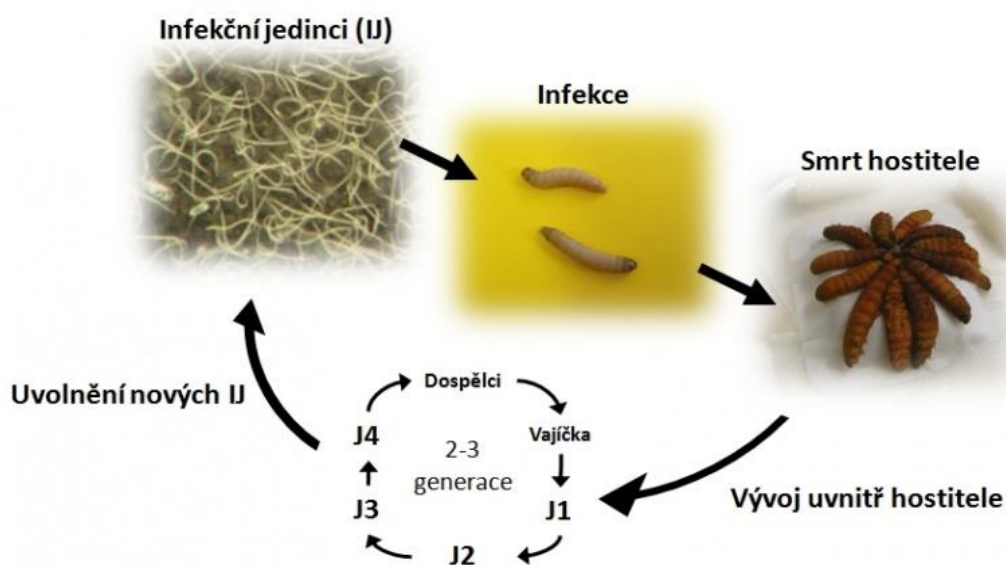
Hlístice mohou pronikat do těla svého hostitele pomocí přirozených tělních otvorů, jako jsou ústní otvor a řiť. Dalším způsobem průniku do hostitele může být průchod přes spirakula (vnější otvor tracheálního systému, obvykle opatřen uzavíracím mechanismem), intersegmentální membránu či skrz kutikulu (Mráček, *et al.*, 1988; Ishibashi a 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 (Eidth a Thurston, 1995). Jedná se především o některé larvy dvoukřídlých (Poinar, 1979), larvy kovaříků (Eidth a Thurston, 1995) či dospělce střevlíků (Georgis, *et al.*, 1991; Ropek a Javorska, 1994).

Pokud se invazní larva dostane do těla hmyzu, uvolní svým ústním otvorem symbiotickou bakterii (*Xenorhabdus* pro čeled' Steinernematidae, *Photorhabdus* pro čeled' Heterorhabditidae), která se rychle množí ve výživné hmyzí hemolymfě. Smrt hostitele nastává následkem bakteriální septikémie asi po 24–48 hodinách (Griffin, *et al.*, 2005). Hlístice tyto bakterie dále využívají jako zdroj potravy (Nermut, *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 desítky tisíc nových infekčních jedinců, velkých 0.4–1.5 mm, kteří hledají nového hostitele. Schematicky je životní cyklus znázorněn na obrázku 1.

U čeledi Steinernematidae se invazní larvy vyskytují jako samci a samice, kdežto u Heterorhabditidae se jedná o hermafrodity. Důležitým znakem u čeledi Steinernematidae je tedy výrazný pohlavní dimorfismus. Samec se 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.



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

### 1.3 Hostitelské spektrum

Hlístovky obecně dokáží napadat velice široké spektrum hostitelů. Čeleď Steinernematidae zahrnuje téměř 100 různých druhů, přičemž každý druh se může vyskytovat v odlišném prostředí a může parazitovat na jiném hostiteli. Hlístovky jsou považovány za druhově nespecifické, protože jsou schopny napadat nejen hmyz, ale i jiné bezobratlé, kterými jsou stejnonožci (Isopoda), stonožkovci (Symphyla), klepítkatci (Chelicerata) a mnohonožky (Diplopoda), (Bathon, 1996). Jelikož se jedná o živočichy

vázané na život v půdě, za přirozených podmínek mohou napadat pouze hostitele, kteří se v půdě vyskytují alespoň určitou dobu. Mezi takové hostitele patří hmyz z řádu brouci (Coleoptera), motýli (Lepidoptera), dvoukřídli (Diptera) a blanokřídli (Hymenoptera), (Peters, 1996), a to především v larválním stádiu.

Někteří půdní živočichové se ale dokáží bránit proti infekci způsobené hlísticemi a to díky různým strategiím, které zahrnují zvýšenou rychlost kálení, jako je tomu například u vrubounovitých, kukly motýlů zase snižují produkci oxidu uhličitého a tak dokáží minimalizovat chemické podněty a snížit možnost infekce. Některé druhy hmyzu se před invazivními larvami ukrývají do kořenů rostlin (Gaugler, 1988), jiné druhy si proti infekci často vytváří morfologickou obranu (např. larvy kovaříků (Elateridae)), (Eidith a Thurston, 1995), kterou mohou být různé bariery ve formě kokonů nebo pevné kutikuly (Gaugler, 1988).

Hlístovky spolu s bakteriemi mohou být vystaveny i silným reakcím hostitele, označovaným jako buněčné či humorální. Mezi tyto reakce se řadí například enkapsulace (Peters a Ehlers, 1994), tedy schopnost hmyzích krevních buněk (hemocytů) shlukovat se kolem parazita a následně ho uzavřít do mnohvrstevné kapsule (Poinar, 1974; Ratcliffe, 1982). Další reakcí může být fagocytóza bakteriálních buněk a jejich zničení pomocí antimikrobiální aktivity hmyzí hemolymfy. Avšak díky tomu, že hlíستovky spolupracují se symbiotickými bakteriemi, mohou imunitu hmyzích hostitelů překonávat (Wang a Gaugler, 1999).

## 1.4 Symbioza hlístovek

Hlístovky se vyskytují ve zvláštní symbioze s gramnegativními bakteriemi rodu *Xenorhabdus* (Steinernematidae) a *Photorhabdus* (Heterorhabditidae), které spadají do čeledi Enterobacteriaceae (Boemare, *et al.*, 1993). Jedná se o tzv. mutualistický vztah, který přináší prospěch oběma zúčastněným. Tento velice těsný vztah potvrzuje fakt, že symbiotické bakterie nejsou schopné žít samostatně ve vnějším prostředí a jsou tedy zcela závislé na přítomnosti hlístovek, které slouží jako vektor, přenášející bakterie z jednoho hostitele do druhého, za použití speciálního střevního váčku nebo přímo ve střevě. Bakterie jsou hlíستovkami přenášeny do hemocoelu hostitele, kde zdolávají imunitní systém a pomocí uvolněných toxinů svého hostitele zabíjejí (Boemare, 2002; Forst a Clarke, 2002) a vytvářejí potravu pro vyvíjející se hlíستovky (Bird a 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 a Clarke, 2002). Je tedy patrné, že se hlístovky v přirozeném prostředí nevyskytují bez svého symbionta, stejně tak jako se bakterie nevyskytují volně bez hlístovek (Fischer-Le Saux, *et al.*, 1999).

Hlístice rodu *Heterorhabditis* se bez přítomnosti své symbiotické bakterie nedostanou ve svém vývojovém cyklu dále než do fáze L1 a nevytváří tak infekční jedince nové generace (Han a Ehlers, 2000). Hlístice rodu *Steinernema* se sice bez přítomnosti svých symbiotických bakterií dokáží vyvíjet i rozmnožovat, ale je výrazně sníženo množství nově vznikajících infekčních jedinců v další generaci (Hurýchová, 2016). Některé hlístovky jsou schopné kromě symbiotických bakterií konzumovat i jiné nesymbiotické bakterie, např. *E. coli* (Sicard, *et al.*, 2003), ale pouze v krátké době a na úkor rychlosti růstu, která je tímto způsobem potravy značně zpomalena (Aguillera a Smart, 1993).

Bakterie se v symbioze mohou vyskytovat ve dvou různých fázích – ve fázi vegetativní nebo ve fázi foretické. Ve vegetativní fázi se symbiotická bakterie vyskytuje v hostiteli a má k dispozici nadbytek živin. Naopak foretická fáze představuje uchovávání symbionta ve střevním váčku invazní larvy, kdy symbiotická bakterie nepřijímá žádné živiny (Bird a Akhurst, 1983).

### 1.4.1 Symbiotické bakterie

Výzkum EPN se zabývá dvěma základními modely nematobakteriálních komplexů, kterými jsou čeledi hlístic Steinernematidae s její asociovanou bakterií *Xenorhabdus* a čeleď Heterorhabditidae s bakterií *Photorhabdus*. Do rodiny *Photorhabdus* se řadí tři druhy bakterií – *P. asymbiotica*, který patří mezi lidské patogeny, vyskytuje se ale i u *H. gerrardi* a některých populací *H. indica*, dále *P. luminescens*, a *P. temperata* (Blackburn, *et al.*, 2016). Bakterie, které patří do rodiny *Xenorhabdus* zahrnují více než desítky druhů a stále jsou objevovány nové.

Bakterie rodu *Xenorhabdus* a *Photorhabdus* jsou řazeny do čeledi Enterobacteriaceae, skupiny  $\gamma$ -Proteobacteria (Akhurst, 1986; Adams, *et al.*, 2006). Jedná se o gramnegativní, heterotrofní a fakultativně anaerobní tyčky, jež mají na svém povrchu fimbrie, které slouží k pohybu a k následnému uchycení ve střevě infekčního jedince (Easom, *et al.*, 2010).

Přestože oba bakteriální rody vykazují mnoho společných rysů, můžeme u nich najít celou řadu rozdílů. Důležitým rozdílným znakem je jejich umístění v těle hostitele.

Zatímco se symbiotické bakterie rodu *Xenorhabdus* vyskytují u rodu *Steinernema* ve speciálních váčcích střeva invazních larev (Bird a Akhurst, 1983; Snyder, *et al.*, 2007), bakterie rodu *Photorhabdus* se u rodu *Heterorhabditis* vyskytují přímo ve střevě a hlitanu těchto larev (Boemare, 2002). Dalším důležitým rozdílným znakem je patogenita symbiotických bakterií. Zástupci rodu *Heterorhabditis* nejsou schopni bez přítomnosti své symbiotické bakterie *Photorhabdus luminiscens* (Han a Ehlers, 2000) usmrtit hmyzího hostitele, naopak některé druhy rodu *Steinernema* (*S. carpocapsae*, *S. feltiae*) produkují toxiny, které k patogenitě jejich symbiotických bakterií přispívají (Burman, 1982; Ehlers, *et al.*, 1997).

U čeledi Steinernematidae je zajímavé, že každý druh hlístice vykazuje přirozenou vazbu pouze vůči jednomu druhu symbiotické bakterie, ale určitý druh bakterie může být vázán s více druhy hlístic. Symbiotická bakterie druhu *Xenorhabdus bovienii*, může mít symbiotickou vazbu s 9 různými hlísticemi rodu *Steinernema*, (např. *S. feltiae*, *S. affine*, *S. kraussei* nebo *S. intermedium*). Proto bývá druh *Xenorhabdus bovienii* velice často volen jako modelový organismus pro experimentální výzkum. U čeledi Heterorhabditidae tento vztah neplatí. *H. bacteriophora* může mít přirozenou vazbu se dvěma různými symbiotickými bakteriemi rodu *Photorhabdus* (*P. luminiscens* a *P. temperata*); bakterie *Photorhabdus temperata*, se navíc může vyskytovat u minimálně třech různých hlístic rodu *Heterorhabditis* (*H. bacteriophora*, *H. megidis* a *H. zealandica*), (Adams, *et al.*, 2006; Lee a Stock, 2010).

## 1.5 Identifikace bakterií

Obecně jsou metody pro identifikaci organismů rozdělovány do 2 skupin – analýza souhrnu fenotypových (zevních) znaků jedince tzv. **fenotypové metody**, a analýza genomu organismu tzv. **genotypové** či **genotypizační metody** (Zaidi, *et al.*, 2003).

V současné době mají stále velký význam fenotypové metody, které jsou založené na sledování biochemických a fyziologických vlastností, určených vzájemným působením genotypu a prostředí. Nedostatky fenotypové identifikace mikroorganismů však vedly k vývoji metod, založených na sekvenci DNA, tedy genotypových metod, které minimalizují problémy typologie a reprodukovatelnosti a v některých případech umožňují vznik databází charakteristických organismů, knihoven klonů či fylogenetických stromů (Olive a Bean, 1999; Amann, *et al.*, 1997).

## 1.5.1 Genotypizační metody

Genotypizační metody jsou využívány zejména ke zjištění míry příbuznosti mezi jednotlivými izoláty daného druhu, získanými z různých zdrojů v různém čase. Pro spolehlivou identifikaci mikroorganismů pomocí genetických metod se velmi často využívá stanovení nukleotidové sekvence jejich genu, kódujícího 16S podjednotku ribosomální RNA (Fox, *et al.*, 1980). První návrh využití sekvence genu pro zjištění fylogenetických vztahů mezi organismy se objevil již v 60. letech (Zuckermandl a Pauling, 1965). Woese a Fox (1977; Woese, 1987) poté k tomuto účelu začali využívat sekvence genů kódujících rRNA. Na základě 16S rRNA se jim podařilo rozdělit živé organismy na 3 hlavní skupiny – archebakterie, eubakterie a eukaryota. Důvodů, proč jsou ribosomální geny široce využívány ke studiu fylogenetických a evolučních vztahů, je hned několik. Ribosomální RNA je nezbytná pro syntézu proteinů a jako taková se nachází ve všech organismech. Molekuly ribosomální RNA (rRNA) jsou důležité zejména pro buněčný růst, funkce a přežití organismu a díky tomu je tato oblast dostatečně sekvenčně konzervativní pro navrhování primerů, amplifikujících DNA širokého spektra bakterií, ale rovněž dostatečně variabilní v rámci určitých skupin bakterií, což je nezbytné pro jejich identifikaci (Olsen, *et al.*, 1986).

Tyto metody mohou být založeny na štěpení DNA restrikčními endonukleázami s následnou amplifikací získaných fragmentů pomocí metody PCR (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism), na amplifikaci úseků ohraničených repetitivními sekvencemi (REP-PCR, ERIC-PCR) nebo na amplifikaci fragmentů náhodnými primery (RADP). Další typem je metoda PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), která využívá makrorestrikční analýzy genomové DNA provedené *in situ*. Získané fragmenty jsou následně analyzovány na základě jejich přítomnosti nebo nepřítomnosti u jednotlivých izolátů a míra jejich shody je mírou příbuznosti. Důležitou metodou je metoda **MLST** (Multi-Locus Sequence Typing), založena na srovnávání sekvencí vybraných konzervativních genů.

## 1.5.2 MLST – multilokusová sekvenční typizace

Metoda MLST, neboli multilokusová sekvenční typizace, byla poprvé popsána v roce 1998 (Maiden, *et al.*, 1998) a aplikována na výzkum bakterie *Neisseria meningitidis*. Dnes se používá ke studiu genetické struktury patogenních i nepatogenních bakterií (Maiden, 2006).

Principem této metody je skládání sekvencí více lokusů. Pro konkrétní bakteriální druh jsou určovány sekvence několika vybraných tzv. „**housekeeping genů**“, které mají základní metabolickou funkci. Jedná se o geny exprimované ve všech typech tkání a buněk, potřebné pro údržbu základních buněčných funkcí (Warrington, *et al.*, 2000). Následná kombinace jejich bodových sekvenčních polymorfismů jednoznačně určí příslušnost určitého izolátu ke konkrétnímu bakteriálnímu kmenu (Almeida, *et al.*, 2010). Charakterizace bakteriálních izolátů pomocí metody MLST je založeno na sekvenování zhruba 450 bp interních fragmentů každého z vybraných genů (Enright a Spratt, 1999; Urwin a Maiden, 2003). Kmeny jsou definovány jako sekvenční typy (ST). Určují se podle zvláštních alel, které jsou přítomny v genu. Průměrně je v každém lokusu přítomno 42 alel. Pokud je změna v izolátech stejná, jsou tyto kmeny považovány za tentýž klon.

Využití techniky MLST je založeno na porovnávání sekvence sedmi různých provozních genů, lokalizovaných na prvním a druhém chromozomu: *atpD* (ATP syntáza,  $\beta$  řetězec), *gltB* (glutamát syntáza, velká podjednotka), *lepA* (GTP vazebný protein), *phaC* (acetoacetyl-CoA reduktáza), *trpB* (tryptofan syntáza, podjednotka B), *recA* (rekombináza A) a *gyrB* (DNA gyráza B). Na základě těchto sekvencí je tak možné pro každý bakteriální izolát vytvořit unikátní profil pro identifikaci druhů a kmenů.

Údaje o alelách a sekvenčních typech jsou uloženy v databázích, které jsou veřejně přístupné na internetu. Databáze zaručují správnost a přesnost prezentovaných dat. Hlavní databázi pro MLST je databáze Imperial College v Londýně ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)). Použitím software BURST je možné izoláty seskupovat do klonálních skupin (CC), určených podle metody MLST za účelem studia evolučního vývoje a evoluční příbuznosti kmenů. Jako výsledek jsou poskytovány DNA sekvence, které umožňují mezilaboratorní standardizaci. Standardizace MLST je ideální pro globální epidemiologii, protože umožňuje rozlišení obrovského počtu genotypů za využívání genetické variability, která vzniká relativně pomalu, a získané údaje jsou jednoznačné. Bylo prokázáno, že i když tato metoda zpravidla zkoumá pouze 7 lokusů, což je asi 0.1% z celého jaderného genomu, klonální přiřazení získána touto metodou jsou následně potvrzena analýzou kompletních genomových sekvencí (Feil, 2004). Tato data jsou poté analyzována pomocí programů dostupných na internetových stránkách (Chan, *et al.*, 2001; Jolley, *et al.*, 2004; Jolley, *et al.*, 2001).

Stejně jako všechny ostatní metody má i tato své nevýhody. Jednou z nich je, že ne všechny organismy je možné analyzovat pomocí metody MLST. Rozsáhlé studie potvrdily, že některé patogeny jako jsou *Mycobacterium tuberculosis* (Sreevatsan, *et al.*, 1997)

a *Yersinia pestis* (Achtman, *et al.*, 1999) mají velmi malou diverzitu v celém genomu. To je s největší pravděpodobností následkem toho, že představují jediné rody, které si vyvinuly patogenní životní styl teprve v nedávné době, a proto ještě nedošlo ke vzniku dostatečné variability mezi jejich „housekeeping geny“. Metoda MLST by tedy v tomto případě nebyla schopna poskytnout dostatečné rozlišení. Jiné bakterie mohou být zase natolik odlišné, že by genotypizace pomocí metody MLST neposkytla již žádné užitečné informace.

Další nevýhodou může být technická náročnost. Pokud je MLST prováděna ručně, potom je velice časově náročná. Nicméně řešením jak docílit vysoké účinnosti je automatizace (Clarke, *et al.*, 2001; Clarke, 2002; Jefferies, *et al.*, 2003), která umožňuje zpracovávat velké množství vzorků současně. To vede rovněž ke zvýšení spolehlivosti a správnosti výsledků, protože se snižuje riziko chyby, která by mohla být způsobena člověkem.

## 1.6 Koevoluce

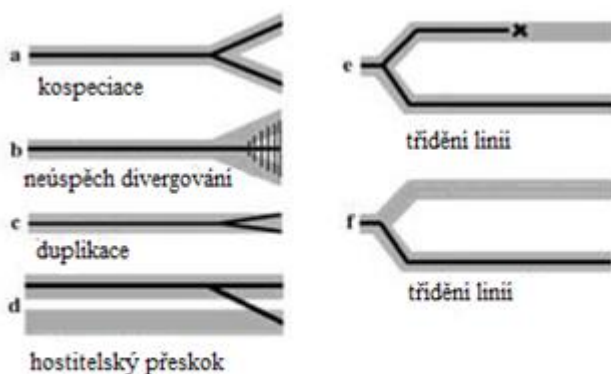
V průběhu evoluce dochází k přizpůsobování biotického (neživého) i biotického (živého) prostředí. Biotická složka se mění rychleji než abiotická. Na rozdíl od víceméně stálé abiotické složky se biotické prostředí nechová pasivně. Pokud jsou vedle sebe ekologicky vázané organismy, při evoluci jednoho druhu dochází k evoluci druhu druhého. Dochází tedy ke **koevoluci**.

Koevoluce znamená, že v důsledku vzájemné interakce podstupují dva druhy genetickou změnu (Thompson, 1989). Těmito druhy mohou být například hostitel a symbiont, hostitel a parazit nebo kořist a predátor. Jedná se tedy o společný evoluční vývoj dvou či více druhů, během kterého dochází ke vzájemnému přizpůsobování. Vztahy mezi organismy musí být víceméně v rovnováze, protože při úhynu hostitele zahyne i jeho parazit, při úhynu kořisti může uhynout její predátor apod. Kofylogenetické studie zkoumají vztah mezi evolucí takovýchto druhů (Banks a Paterson, 2005) a jejich kongruence (shoda) byla dlouho považována za důkaz kospeciace (Paterson a Banks, 2001). Kospeciace nastává v situaci, kdy jsou na sebe dva taxony silně ekologicky vázány a speciace jednoho z nich může vyvolat speciaci druhého, tedy že divergence hostitelů jsou doprovázeny divergencí jejich parazitů či symbiontů. Takovýto jev bývá označován jako **kospeciace** (Brooks, 1979), **kodivergence** nebo, pokud k němu dochází dlouhodobě, jako **kofylogeneze**.



Na základě moderních fylogenetických metod můžeme zjistit rozsah koevolučních vzorů, které se zabývají spojením hostitel – parazit popř. hostitel – symbiont od velmi těsného vztahu až po zcela oddělenou fylogenezi (Clayton, *et al.*, 2004). Koevoluce mezi parazity a jejich hostiteli je již dlouhou dobu považována za základní hnací sílu makroevolučních procesů (Page, 2003). Nicméně společná diferenciacce může být často zkreslena geografickým rozmístěním hostitelské distribuce (Nieberding, *et al.*, 2008).

Jsou-li známy pravděpodobné fylogenetické rekonstrukce parazitů a hostitelů, nebo symbiontů a hostitelů, lze srovnáním dvou fylogenetických stromů stanovit pravděpodobný průběh jejich koevoluce. Ten popisuje soubor koevolučních událostí, do kterého patří **kospeciace**, **duplikace**, **hostitelský přeskok** („host switch“), **třídění linií** („sorting lineage event“) a **neúspěch divergování** („failure to diverge“) znázorněné na obrázku 2. Kospeciace je proces, kdy vznik nového druhu u jedné skupiny organismů je doprovázen vznikem nového druhu u druhé skupiny organismů. Hostitelský přeskok nastává tehdy, pokud parazit přeskóčí na nový druh hostitele, na kterém doposud neparazitoval a je schopen se na něm uchytit. Duplikace popisuje vznik dvou nových parazitických druhů u jednoho hostitele. V neposlední řadě se jedná o třídění linií nebo neúspěch divergování. Třídění linií může být vysvětleno tak, že pokud je objeven druh hostitele, na němž se nevyskytuje určitý druh parazita, který je u příbuzných druhů hostitelů běžný, s největší pravděpodobností to znamená, že buď někdy v minulosti tento hostitelský druh tohoto parazita měl, ale následně u této linie vyhynul, nebo ještě nebyl objeven. Neúspěch divergování naopak popisuje případy, kdy diverzifikace u hostitele nevyvolala odpovídající diverzifikaci u jeho parazita.



**Obr. 2: Koevoluční události (Mendlová, 2013 – upraveno z Johnson, *et al.*, 2003).**

**Vysvětlivky viz předchozí text.**

### 1.6.1. Studium koevoluce pomocí kofylogenetických metod

Metody pro posuzování interakce hostitele a symbionta jsou založeny především na porovnávání fylogenezí zúčastněných druhů. Jsou proto nazývány “kofylogenetické”, a jejich podstatou je hypotéza, že pokud evoluce hostitelů a symbiontů probíhala kospeciací, pak budou jejich fylogeneze zcela kongruentní (shodné), tedy jejich dendrogramy budou mít stejnou topologii.

V současnosti existuje celá řada kofylogenetických metod; v zásadě je však můžeme rozdělit na dva typy. Metody v první skupině testují celkovou kongruenci (tzv. „global fit“). Někdy jsou také označovány za metody **distanční**, neboť je jejich podstatou porovnávání matic vzdáleností hostitele a symbionta, vypočtených z matic vzdáleností fylogenetických. Vysoká úroveň kongruence je brána jako důkaz o časté kospeciaci. Jsou tedy metodami obecnějšími, neboť jen detekují určitý „signál“ o probíhající koevoluci, ovšem možné koevoluční události neposuzují. Tyto testy jsou umožněny např. v programech **ParaFit** (Legendre, *et al.*, 2002) a **PACo** (Balbuena, *et al.*, 2013), které se odlišují v použitém matematickém modelu. ParaFit zkoumá, zda jsou asociace hostitele a symbionta náhodné, a umožňuje také kromě celkové kongruence vyhodnotit i jednotlivé asociované dvojice. PACo k porovnání topologií používá tzv. Prokrustovu analýzu – nejdříve provede transformaci genetických distancí hostitele a symbionta na matice hlavních komponent, které jsou následně „přizpůsobovány“ jedna druhé tak, aby se optimalizovaly vzdálenosti dvojic hostitel – symbiont. Toto je vyhodnoceno jako součet čtverců (druhých mocnin) reziduí, parametr nepřímo úměrný kongruenci topologií.

Druhou skupinu tvoří metody, které se snaží o rekonstrukci evoluční historie hostitelů a symbiontů, přičemž jsou do porovnávání fylogenezí začleňovány evoluční události (kospeciace, hostitelský přeskok, duplikace, neúspěch divergování a třídění linií) s různou relativní evoluční nákladností („cost“). Přitom aplikují parsimoniální kritérium – tedy preferují nejjednodušší a nejméně nákladné řešení. Programů s tímto přístupem je opět celá řada; k nejvíce používaným patří **TreeMap** (Page, 1994), **TreeFitter** (Ronquist, 1995) nebo **Jane** (Conow, *et al.*, 2010). Program Jane odstraňuje některé nedostatky předchozích metod. Podle autorů je Jane efektivnější pro větší soubory dat než metoda TreeMap.

Tyto dva různé přístupy se však vzájemně doplňují, proto je vhodné je ve vlastních analýzách kombinovat. U obou metodických přístupů je však nutno mít na paměti, že ke kongruenci fylogenezí nemusí dojít jen kospeciací, ale že další evoluční

události mohou kongruenci jak posílit, tak i narušit. Např. odhad „nákladnosti“ či pravděpodobnosti určitých evolučních událostí je velmi náročný; pro přesnou rekonstrukci kofylogeneze jsou také nutná další data, jako časování větvení v dendrogramech (tedy použití geologického či paleontologického datování), fylogeografie hostitelského druhu, případně experimentální evidence (Balbuena, *et al.*, 2013).

Koevoluce entomopatogenních hlístic a jejich symbiotických bakterií byla důkladněji, pomocí MLST a kofylogenetických metod, studována teprve nedávno. Práce Maneesakorn, *et al.*, 2011 se zabývá vztahem *Heterorhabdus* a *Photorhabdus*, přičemž jako markery byly použity *ITS* a *gyrB*. V tomto případě se pomocí kofylogenetických metod jak distančních, tak i mapováním evolučních událostí podařilo prokázat možnou koevoluci mezi hlísticemi rodu *Heterorhabdus* a jejich symbiotickými bakteriemi rodu *Photorhabdus*.

U komplexu *Steinernema* – *Xenorhabdus* je naproti tomu výzkum v začátcích. Tailliez, *et al.*, 2010 provedl fylogenetickou studii bakterií rodů *Photorhabdus* a *Xenorhabdus*, v níž vlastně vytvořil metodu MLST pro tyto druhy – vytipoval soubor markerů a následně ověřil jejich použitelnost pro daný účel, včetně vyšetření možnosti výskytu laterálního genového transferu (**LGT**) u jednotlivých lokusů. Na základě svých výsledků také stanovil, že pokud jedinci v rámci rodu sdílejí méně než 97% nukleotidové identity (NI), nejedená se o tentýž druh. Zřejmě paralelně s touto prací probíhala studie (Lee a Stock, 2010), v níž lze bohužel vysledovat řadu nedostatků – jednak při výběru markerů (pro MLST byly použity lokusy, u nichž dochází k LGT), jednak v několika případech došlo pravděpodobně k chybě při taxonomickém určení zkoumaných hlístic.

## 2. Cíle práce

1. Na základě osekvenování vybraných genů (MLST) charakterizovat symbiotické bakterie druhu *X. bovienii* u vybraných druhů hlístovek rodu *Steinernema*.
2. Pomocí srovnávací kofylogenetické analýzy zjistit úroveň koevoluce tohoto entomopatogenního komplexu.

### 3. Materiál a metody

Ve své práci jsem analyzovala vybrané druhy hlístic rodu *Steinernema* a jejich symbiotické bakterie rodu *Xenorhabdus*. Pro hlístice jsem použila kombinaci markerů, běžně používaných v molekulární taxonomii hlístic. Pro charakterizování bakterií jsem aplikovala nově používanou metodu MLST, tedy sekvenování standardizovaného setu markerů. Všechny laboratorní molekulární metody byly prováděny s použitím aerosolových pipetových špiček, aby bylo zabráněno kontaminaci nebo kroskontaminaci vzorků. Získaná data byla zpracována biostatickými metodami.

Vybrané druhy a kmeny hlístovek rodu *Steinernema* 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 – jednotlivé druhy jsou rozlišené barevně. Celkem bylo použito 45 kmenů pocházejících z 15 ti určených druhů hlístic a z každého kmene byl analyzován jeho bakteriální symbiont.

**Tab. 1: Přehled analyzovaných vzorků hlístic a jejich symbiotických bakterií. Druhy jsou barevně rozlišeny.**

Kmen	Druh	Místo sběru
GAR	<i>S. cholashanense</i>	Čína
JOL	<i>S. jollieti</i>	USA
181	<i>S. feltiae</i>	Česká Republika
899	<i>S. feltiae</i>	ČR
37Ca	<i>S. feltiae</i>	Kanada
ALG3	<i>S. feltiae</i>	Alžír
Be	<i>S. feltiae</i>	Irsko
EPN	<i>S. feltiae</i>	Česká Republika
IFR	<i>S. feltiae</i>	Maroko
Jakutsk	<i>S. feltiae</i>	Rusko
Pt	<i>S. feltiae</i>	Polsko
Te	<i>S. feltiae</i>	?
Tojc	<i>S. feltiae</i>	Finsko
Zm	<i>S. feltiae</i>	Kanada
SAR	<i>S. ichnusae</i>	Itálie
4Ca	<i>S. kraussei</i>	Kanada
Dca	<i>S. kraussei</i>	Kanada
Hok22	<i>S. kraussei</i>	Japonsko
KR	<i>S. kraussei</i>	Česká Republika

**Tab. 1: Pokračování.**

Kmen	Druh	Místo sběru
VA6.1	<i>S. kraussei</i>	Bulharsko
Ibar	<i>S. litorale</i>	Japonsko
Aichi	<i>S. litorale</i>	Japonsko
ORE	<i>S. oregonense</i>	Kanada
S11	<i>S. silvaticum</i>	Česká Republika
Deq	<i>S. xueshanense</i>	Čína
NAG	<i>S. xinbinense</i>	Japonsko
HOK35	<i>S. xinbinense</i>	Japonsko
1025	<i>S. weiseri</i>	Česká Republika
1128	<i>S. weiseri</i>	Česká Republika
1158	<i>S. weiseri</i>	Česká Republika
Dub04	<i>S. weiseri</i>	Česká Republika
TUR	<i>S. weiseri</i>	Turecko
CAK	<i>S. affine</i>	Česká Republika
CB1B	<i>S. affine</i>	Česká Republika
HOS	<i>S. affine</i>	Česká Republika
Chaff	<i>S. affine</i>	Česká Republika
OG656	<i>S. affine</i>	Švýcarsko
OG667	<i>S. affine</i>	Švýcarsko
IntUSA	<i>S. intermedium</i>	USA
1160	<i>S. poinari</i>	Česká Republika
IntMu	<i>S. sp.</i>	Německo
Londres	<i>S. sp.</i>	Francie
KAV	<i>S. sp.</i>	Rusko
SAKH	<i>S. sp.</i>	Rusko
Tama	<i>S. sp.</i>	Japonsko

### 3.1 Izolace DNA

#### 3.1.1 Izolace DNA hlístic

Získané vzorky byly zamrazeny při -80 °C a dále byly skladovány v mrazicím boxu až do jejich dalšího použití. Extrakce DNA byla u všech vzorků (vždy z jedné samice) provedena pomocí extrakčního pufu. K izolaci DNA byly použity výhradně samice hlístic, neboť jsou několikrát větší než samci, a proto obsahují větší množství DNA.

### **3.1.1.1 Extrakce pomocí extrakční pufru (Cox and Hebert, 2001; Frati, et al., 2001)**

Ke každému vzorku bylo přidáno pipetou s aerosolovou špičkou 20 µl extrakčního pufru (885 µl ddH<sub>2</sub>O; 100 µl 10x PCR pufr s MgCl<sub>2</sub> (TopBio); 10 µl 1% Tween 20; 5 µl proteinázy K o koncentraci 100 µg/ ml). Poté byly vzorky uloženy do mrazicího 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, zahřátím na 95 °C po 8 minut. Takto vzniklá směs byla ponechána v mrazicím boxu při teplotě -20 °C a připravena na další použití jako templát pro PCR.

### **3.1.2 Příprava bakterií a izolace bakteriální DNA**

Nakažená housenka (cca 24 hodin od infekce) byla povrchově sterilizována po dobu 5 minut v 99% etanolu. Poté byla ve flowboxu odstřižena panožka a odebrána hemolymfa, která byla sterilní kličkou rozetřena na NBTA agarovou plotnu (skládající se z 37 g standardního výživného agaru (Merck), 25 mg bronthymolové modři (Sigma), 1 l destilované vody, 4 ml 2,3,5 – Triphenyl – tetracolumchloridového roztoku (1%, sterilní, filtrovaný), (Akhurst, 1980)). Jednotlivé kolonie vykazující znaky bakterií rodu *Xenorhabdus* byly následně přeneseny do tekutého YS (yeast solution) media a inkubovány na třepačce (180 rpm) při teplotě 22 °C po dobu 48 hodin. Po proběhlé inkubaci bylo vizuálně zkontrolováno zbarvení media, které mělo být tmavě žluté, popř. byl zkontrolován tvar a pohyb bakterií pod mikroskopem. Poté mohlo dojít ke „sklizení“ bakterií, kdy byl přepipetován 1 ml media s bakteriemi do 1.5ml zkumavky a centrifugován 2 min při 10 000 x g, následně byl zbylý supernatant odstraněn. Tento krok byl opakován 3x, tedy do té doby, než bylo získáno požadované množství peletu (cca 200 µl).

Vzhledem k tomu, že vzorky byly čerstvé, či v pozdější fázi mražené, bylo možné provést rovnou izolaci DNA. Pro izolaci DNA byly vyzkoušeny dva komerční kity.

#### **3.1.2.1 Izolace DNA pomocí kitu GeneJET Genomic DNA (ThermoScientific)**

Izolace DNA probíhala dle návodu výrobce, podle protokolu pro gramnegativní bakterie. Pro větší výtěžnost byla závěrečná eluce provedena ve dvou krocích. Nejprve bylo použito 200 µl elučního pufru, následně bylo odpipetováno 50 µl pro okamžité

použití, které byly uchovávány při 4 °C, zbytek vzorku byl zmražen při -20 °C. Při druhém kroku bylo přidáno pouze 100 µl, tato frakce byla ihned zamražena pro pozdější použití.

### 3.1.2.2 Izolace DNA pomocí kitu Exgene Tissue (plus) SV mini (GeneAll)

Izolace pomocí tohoto kitu probíhala opět dle návodu výrobce, podle protokolu pro gramnegativní bakterie. Závěrečná eluce byla opět provedena ve dvou krocích, jako u předchozího kitu. S rozdílem v druhém kroku eluce, kdy nebylo přidáno 100 µl elučního pufru, ale pouze 50 µl. I v tomto případě byla část první frakce (50 µl) ponechána při 4 °C pro okamžité použití. Zbytek frakce byl spolu s druhou frakcí opět zamražen při -20 °C.

## 3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR reakce byla vždy míchaná na ledu, do 0.2ml zkumavky. Každá reakce se skládala z množství uvedeném v tabulce 2. Celkový objem reakce byl 11.1–11.5 µl v závislosti na použitém systému DNA polymerázy. Následně byl ke každému vzorku přidán 1.0 µl templátové DNA.

U vzorků, u kterých se nepodařilo provést PCR reakci za použití běžné polymerázy, byly použity citlivější ale i finančně náročnější polymerázy, např. 5x HOT FIREPol Blend Master Mix (Solis BioDyne), TaKaRa LA Taq, PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) a TaKaRa Ex Taq. Poslední dva uvedené typy polymeráz se ukázaly jako nejspolehlivější, protože umožnily amplifikaci všech problematických vzorků, u kterých se ostatní typy polymeráz neosvědčily.

**Tab. 2: Složení reakční směsi pro úspěšně použité DNA polymerázy.**

	UNIS	ExTaq	PrimeStar GXL
ddH <sub>2</sub> O	7.25 µl	7.75 µl	6.25 µl
Pufr 10x Unis/ 10x ExTaq/ 5x PrimeStar GXL	1.25 µl	1.25 µl	2.5 µl
dNTPs (2.5 mM)	1 µl	1 µl	1 µl
Primer forward (5 µM)	0.75 µl	0.75 µl	0.75 µl
Primer revers (5 µM)	0.75 µl	0.75 µl	0.75 µl
Taq polymeráza UNIS Taq (5U/µl)/ Ex Taq (5 U/µl)/ PrimeSTAR GXL (1.25 U/µl)	0.1 µl	0.05 µl	0.25 µl
DNA	1 µl	1 µl	1 µl



### 3.2.1 Primery pro amplifikaci vybraných oblastí genomu

#### 3.2.1.1 Primery pro hlístice

Pro rekonstrukci fylogenetických vztahů hlístic jsme na základě literatury vybrali standardní nukleární marker *ITS*. Pro ilustraci vnitrodruhových vztahů různých kmenů *S. feltiae* pak byly použity markery mitochondriální *ND2*, *12S* a *COX I*.

U marker *ITS* byla amplifikace provedena pomocí primerů 18S a 28S (Vrain, *et al.*, 1992). Pro oblast mitochondriálního genu *ND2* jsme navrhli v naší laboratoři primery *ND2For1* a *ND2Rev1* (Faktorová, 2014). Pro další mitochondriální markery byly primery převzaty ze studie Nadler, *et al.*, 2006, a to dvojice 505 a 506 pro oblast 12S a dvojice 507 a 508 pro oblast *COX I*. Všechny použité primery jsou blíže popsány v Příloze 1.

#### 3.2.1.2 Primery pro bakterie – MLST

Jako základní marker, používaný pro standardní identifikaci všech bakterií, jsem použila část genu 16S (amplifikace a sekvenování pomocí páru univerzálních primerů 10F a 1507R). Tento gen však není dost specifický pro rozlišení jednotlivých linií *X. bovienii* a navíc může podléhat tzv. laterálnímu transferu, kdy při směsné infekci (2 komplexy – hlístice + bakterie) dojde k převládnutí jednoho z komplexů a druhý z nich zahyne. Živé bakterie mohou následně pohltit DNA z uhynulých bakterií, což je problém, při rozlišování mezi druhy bakterií. Ačkoli je pravděpodobnost tohoto jevu nízká, několikrát byl již potvrzen (např. Yap, *et al.*, 1999). Z tohoto důvodu byly pro studii vybrány ještě další a specifitější oblasti genů, které tomuto transferu nepodléhají (metoda MLST).

Pro multilokusovou charakteristiku bakterií jsem aplikovala dva markery, které již dříve byly pro tento účel testovány ve studii zabývající se molekulární fylogenetikou rodu *Xenorhabdus* (Tailliez, *et al.*, 2010; Lee a Stock, 2010). Pro oblast *recA* byl použit jeden pár primerů (*recA1F* a *recA2R*). Pro oblast *gyrB* byla zvolena dvojice primerů 1200F a 1200R, se kterou byla provedena úspěšná amplifikace ve většině případů. Pokud amplifikace neproběhla, byla aplikována druhá dvojice primerů 8Sf a 9Rev, případně kombinace „forward“ a „revers“ primerů z obou dvojic. Jednotlivé aplikované primery a jejich sekvence jsou uvedeny v Příloze 2.

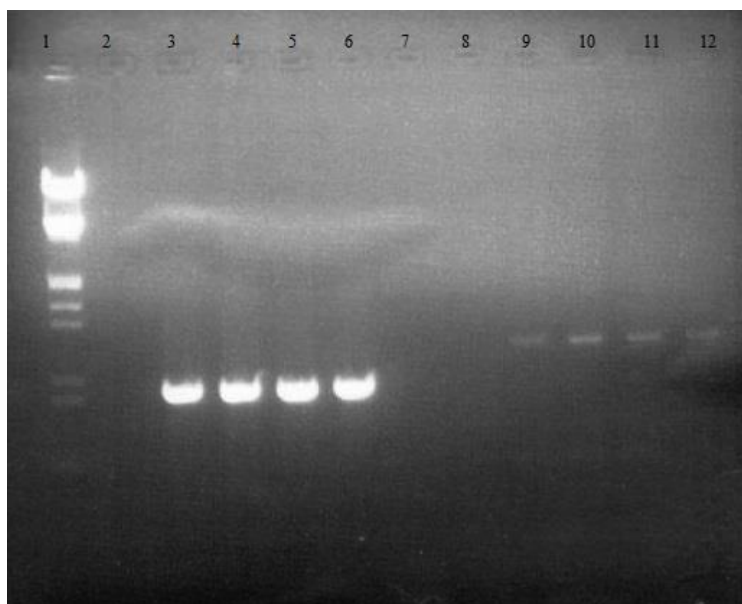
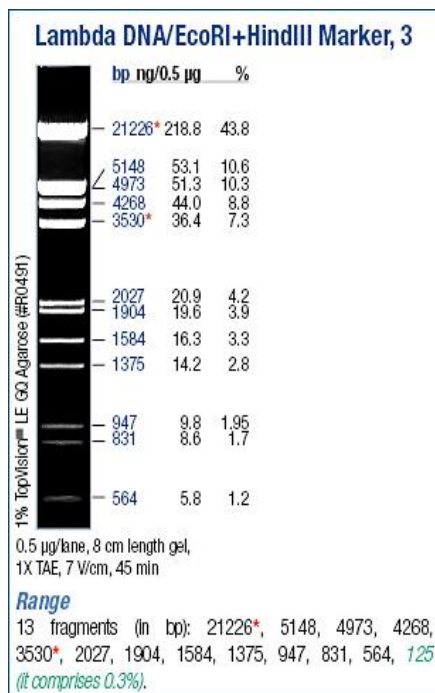
### 3.2.2 PCR profily

PCR reakce probíhaly na termocyklerech Mastercycler ep gradientS (Eppendorf) a TC-XP Cyler (Bioer) podle běžných programů, zahrnujících tyto kroky: predenaturaci, denaturaci, annealing, elongaci a závěrečnou elongaci. Protokoly pro jednotlivé primery jsou v Příloze 3–6.

### 3.3 Gelová elektroforéza

Po proběhnuté PCR reakci bylo nutné ověřit její úspěšnost. K tomu byla využita elektroforetická verifikace, pomocí které byla rovněž zjištěna velikost a množství DNA fragmentu. Ověřování probíhalo na 2% agarozovém gelu, který byl připraven rozpuštěním 4 g agarozy ve 200 ml 1x TAE pufru (zásobní roztok 50x TAE pufr: 121 g TRIS; 28.55 ml kyseliny octové; 50 ml 0.5M EDTA pH 8.0; 421.45 ml H<sub>2</sub>O) a následným rozpuštěním v mikrovlnné troubě po dobu cca 2–3 minuty. Poté byl gel zchlazen pod proudem tekoucí vody na 45 °C. Do zchlazeného gelu bylo přidáno 15 µl ethidium bromidu o koncentraci 0.5 µg/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 pufrem a vložen do lednice, kde byl při 4 °C uchováván pro další použití.

Na připravený gel byly nanесeny 2 µl PCR produktu smíchaného se 2 µl nanášecího pufru (700 µl ddH<sub>2</sub>O, 300 µl 100% glycerolu, 0.5 mg bromfenolové modři). Elektroforéza běžela při pokojové teplotě, při napětí 120 V 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 obrázku 3.



**Obr. 3:** Vlevo Lambda DNA/EcoRI+Hind III marker, vpravo výsledná fotografie rozdělených PCR produktů – 1: Lambda DNA/EcoRI+Hind III marker, 2: negativní kontrola PCR reakce bez DNA, 3–6: úspěšně amplifikované testované vzorky marker *recA*, 7: mezera, oddělující vzorky dvou různých markerů, 8: negativní kontrola PCR reakce bez DNA, 9–12: úspěšně amplifikované testované vzorky marker *gyrB*.

### 3.4 Purifikace PCR produktů a sekvenování

Po ověření úspěšnosti amplifikace daného fragmentu musel být PCR produkt přečištěn. Přečištění sloužilo k odstranění přesahujících jednořetězců DNA popř. i k odstranění volných nukleotidů.

#### 3.4.1 Přečišťování pomocí směsi ExoSap-IT® (USB), (Dugan, *et al.*, 2002)

Ke každému PCR produktu (cca 9 µl) bylo přidáno 0.5 µl ddH<sub>2</sub>O, 0.5 µl Exo (Exonuclease I (20 U/ µl, Fermentas)) a 1 µl FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/ µl, Fermentas)). Míchání probíhalo na ledu, vzorek byl po přidání činidel zvortexován a inkubován v Bioer XP termocykléru při 37 °C 30 minut. Následovala inaktivace enzymů při 80 °C 15 minut. Takto vzniklý produkt byl použit na sekvenační reakci.

### 3.4.2 Sekvenační reakce

Směs pro sekvenační reakci byla míchána na ledu do zkumavky o objemu 1.5 ml. Na jednu reakci bylo napipetováno 5  $\mu$ l primeru (5 $\mu$ M) a 5  $\mu$ l přečištěného PCR produktu. Takto připravené vzorky byly odeslány do firmy GATC Biotech.

Dalším způsobem zpracování přečištěných vzorků bylo jejich odeslání do firmy SEQme. Vzorky musely být před odesláním namíchaný opět ve stejném poměru, tedy 5  $\mu$ l přečištěného PCR produktu a 5  $\mu$ l primeru, do zkumavky o objemu 0.6 ml. Nicméně sekvence zhotovené touto firmou nebyly dostatečně kvalitní, jako tomu bylo u předchozí firmy.

## 3.5 Statistické zpracování sekvencí

### 3.5.1 Kontrola a seřazení sekvencí

Kontrolní identifikace obdržených sekvencí byla realizována pomocí programu BLAST v databázi NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sekvence byly dále vizuálně zkontrolovány a v případě potřeby manuálně opraveny v programu MEGA6 (Tamura, *et al.*, 2013). Tento program byl následně použit také pro seřazení sekvencí – tvorbu alignmentů, které byly vytvořeny metodou ClustalW, u kódujících sekvencí se zohledněním čtecího rámce (ORF).

Fylogenetické analýzy byly konstruovány se dvěma soubory – první (vícedruhový) zahrnoval 37 kmenů různých druhů rodu *Steinernema*, zatímco, druhý (vnitrodruhový) sestával z jedenácti kmenů *S. feltiae*. Tři kmeny (181, ALG3 a EPN) byly analyzovány v obou souborech, kmen Jakutsk je zahrnut pouze do velkého souboru, protože se u něj nepodařilo získat všechny potřebné sekvence k zahrnutí do vnitrodruhového souboru.

### 3.5.2 Fylogenetické stromy

Pro kofylogenetickou analýzu bylo nejdříve nutné ověřit, zda je možné při multilokusové charakteristice získané sekvence spojit do tzv. „**konkatenovaného**“ souboru. To znamená tedy nejprve vytvořit fylogenetické stromy (fylogramy) pro jednotlivé geny a zjistit, zda jsou jejich topologie stejné (kongruentní) či nikoliv.

Pro konstrukce fylogramů byl opět využit program MEGA6 (Tamura, *et al.*, 2013). Nejprve byl v modulu Modeltest vybrán nejvhodnější model pro výpočet genetické vzdálenosti („genetic distance“), a to na základě Akaike a BIC kritérií. Vybraná distance pak byla aplikována při konstrukcích fylogramů metodami „Neighbor – Joining“ (NJ),

a „Maximum Likelihood“ (ML). K těmto dvěma metodám byla ještě přidána „Maximum Parsimony“ (MP), jako alternativní metoda pro srovnání vytvořené topologie. Statistická podpora stromů byla testována metodou „bootstrap“ (1000 opakování). U markerů 16S, *recA* a *gyrB* byla použita volba „Complete deletion“. U markeru *ITS* byly mezery v alignmentu (gapy) brány jako variabilita, nikoliv jako chybějící data, proto byla zvolena volba „Pairwise deletion“.

Následně byl proveden test kongruence dendrogramů z jednotlivých genů, pomocí metody CADM, tedy „Congruence Among Distance Matrices“ (Campbell, *et al.*, 2009), v jazyce R a jeho softwarovém prostředí (<https://www.r-project.org/>). Na základě zjištěných výsledků byly spojeny do „konkatenovaného“ alignmentu pro vytvoření společného fylogenetického stromu. Pro zakořenění byly použity jako „outgroup“ adekvátní sekvence *C. elegans* pro hlístice a *X. indica* pro jejich symbiotické bakterie.

### 3.5.3 Kofylogenetické metody

Zkonstruované fylogenetické stromy pro hlístovky (hostitele) a bakterie (symbionta) byly dále využity pro analýzu možné koevoluce, a to jak metodami distančními, tak i metodou topologickou.

Fylogenetické stromy jsou pro kofylogenetickou analýzu obvykle redukovány, a to nahrazením taxonomických jednotek detekovanými haplotypy. Je to ze dvou důvodů – jednak se tím snižuje zkreslování analýz vlivem velkých nerozlišených skupin, jednak se redukcí zkracuje časová náročnost výpočtu. Haplotypová analýza byla provedena v programu DNAsp (Librado a Rozas, 2009) a následně na jejím základě pak byly zrekonstruovány nové fylogeneze.

Celková shoda (**kongruence**) byla testována dvěma metodami, a to v programech ParaFit a PACo. Oba byly provedeny v jazyce R a jeho softwarovém prostředí. Nezbytné distanční matice, které představují fylogenetické vzdálenosti mezi hostiteli, resp. symbionty, byly pro tento účel vypočteny na základě ML stromů. Třetí matice popisující asociace hostitelů a symbiontů byla vytvořena na základě haplotypové analýzy v programu Excel.

Kromě testu celkové kongruence (parameter ParaFitGlobal) byly v programu ParaFit také testovány vazby jednotlivých dvojic hostitel – symbiont. Tyto jsou považovány za signifikantní, pokud je alespoň jedna hodnota pravděpodobnosti **P** z testů ParaFit 1 nebo ParaFit 2 menší než **0.05**. Pro stanovení spolehlivosti výsledků bylo nastaveno 999 permutací.

Vzhledem k tomu, že ParaFit je považován za „liberální“ test, použili jsme také nově vyvinutý program implementující do kofylogenetiky tzv. Prokrustovu analýzu (PACo). Během výpočtu je použita Prokrustova superimpozice, tzn. matice symbiontů je rotována a škálována tak, aby bylo dosaženo co největší shody s maticí hostitelů. To v podstatě znamená, že je explicitně testována závislost fylogeneze symbionta na fylogenezi hostitele. Celková shoda je pak statistikou, založenou na testu dobré shody sumy reziduálních čtverců výsledné superimpozice. Pro stanovení spolehlivosti bylo provedeno 10.000 permutací.

Dále jsme zvolili metodu “mapování událostí” implementovanou v programu Jane, s cílem zjistit co nejpravděpodobnější koevoluční scénář pro asociované hostitele a symbionty. Opět byly použity ML stromy hostitelů a symbiontů. V tomto případě jsme ponechali základní nastavení doporučené tvůrci programu, tedy pět evolučním událostem byly přisouzeny různé hodnoty nákladnosti (0 pro kospeciaci, 1 pro duplikaci symbionta, 2 pro duplikaci a změnu hostitele, 1 pro ztrátu symbionta a 1 pro neúspěch divergence), a výpočet byl nastaven pro 100 generací s populační velikostí 100 jedinců. Pro stanovení hodnoty pravděpodobnosti byla zvolena randomizace s velikostí vzorku 10 jedinců.

## 4. Výsledky

### 4.1 Testované markery

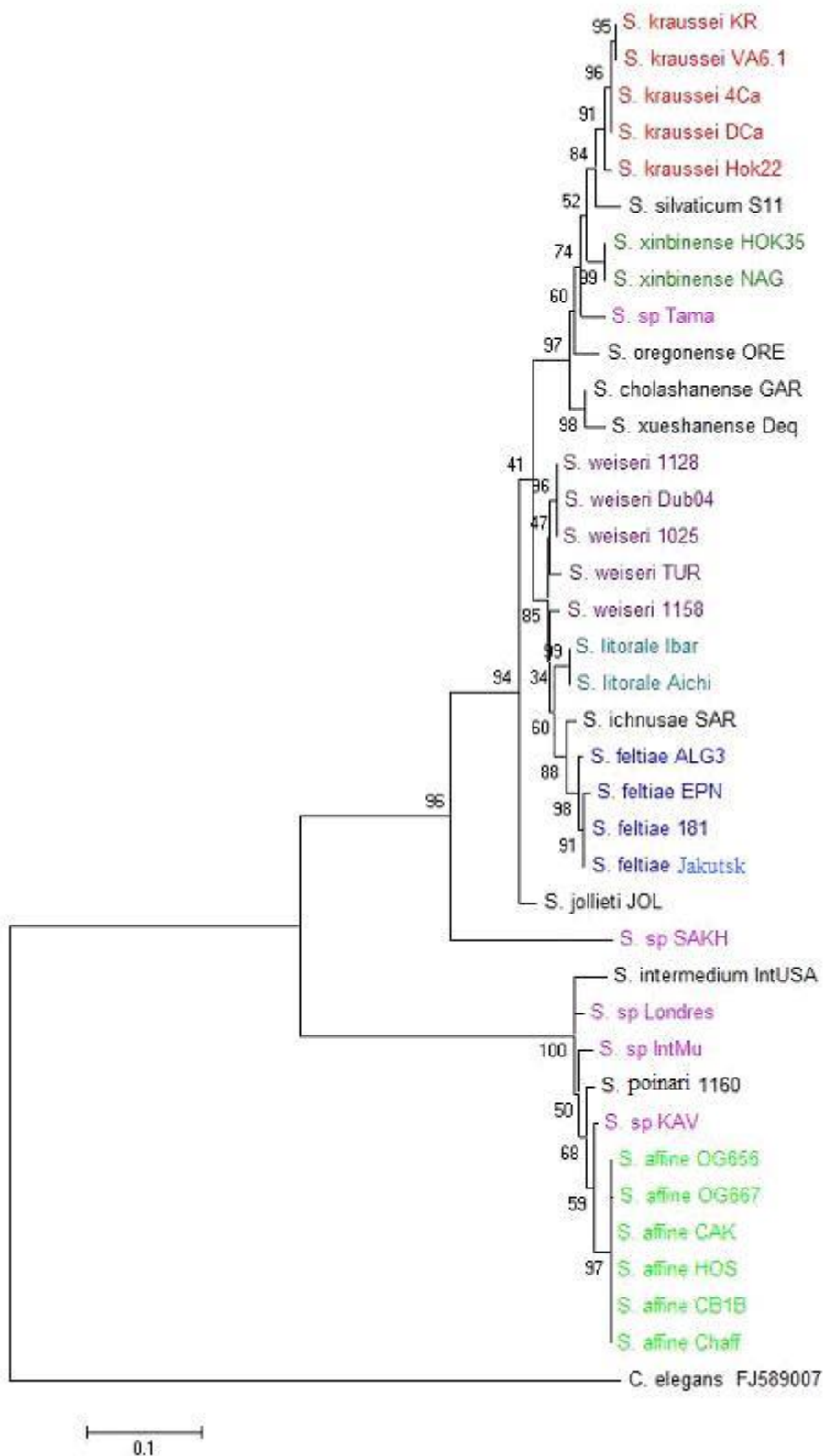
Pro tuto práci byly vybrány 4 markery pro hlístice a 3 markery pro jejich symbiotické bakterie. U hlístic se jednalo o 1 jaderný marker (*ITS*) a 3 markery mitochondriální (*12S*, *COX I* a *ND2*). Mitochondriální markery jsem aplikovala pouze u druhu *S. feltiae*. Ve své bakalářské práci jsem totiž zjistila, že marker *ITS* není pro tento druh vhodný (vyskytuje se zde vyšší variabilita uvnitř jedinců v rámci jednotlivých tandemových kopií *ITS*), naopak marker *ND2* se jevil při rozlišování jednotlivých linií jako vhodnější. Pro bakterie byly v obou částech studie vybrány 3 markery – jeden ribozomální gen (*16S*) a dva „housekeeping“ geny (*recA* a *gyrB*), kdy jsme vycházeli především z předchozích studií (Lee a Stock, 2010; Tailliez, *et al.*, 2010). U všech zvolených markerů se mi podařilo provést úspěšnou amplifikaci a následnou sekvenaci.

Marker *16S* byl vybrán především pro ověření druhu zkoumaných symbiotických bakterií. Po otestování získaných sekvencí v programu BLAST bylo potvrzeno, že se u všech vzorků jedná o *X. bovienii*, jelikož shoda se sekvencemi tohoto druhu byla vždy vyšší než hraniční hodnota pro rozlišení druhů 97%.

#### 4.1.1 Fylogenetické vztahy hlístovek – vícedruhový soubor

##### Jaderný marker *ITS*

U oblasti genu *ITS* bylo analyzováno 37 sekvencí z 37 různých kmenů, z 15 ti druhů. *De novo* bylo získáno 31 sekvencí, zbylých 6 sekvencí pro kmeny Jakutsk (KM016419), JOL (AY171565), HOK35 (JN171593), Deq (FJ666052), GAR (EF431959), SAR (EU421129) bylo převzatých z databáze GenBank – [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Všechny sekvence byly vizuálně zkontrolovány a následně upraveny v programu MEGA6 na jednotnou délku 1092 bp (včetně mezer). V tomto programu byly následně vytvořeny fylogenetické stromy „Neighbor – Joining“ (NJ), „Maximum Likelihood“, (ML) a „Maximum Parsimony“ (MP), za použití distančního modelu Tamura – Nei. Topologie těchto stromů je víceméně stejná, proto je prezentován na obrázku 4 jen fylogram ML, (fylogramy NJ a MP jsou uvedeny v Příloze 7 a 8), který byl dále použit i pro kofylogenetickou analýzu.



Obr. 4: Fylogram hlístic s použitím markeru *ITS* (Maximum Likelihood, Tamura – Nei model, Use all sites, Bootstrap 1000), zakořeněný *C. elegans*. Jednotlivé druhy jsou odděleny barevně. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.

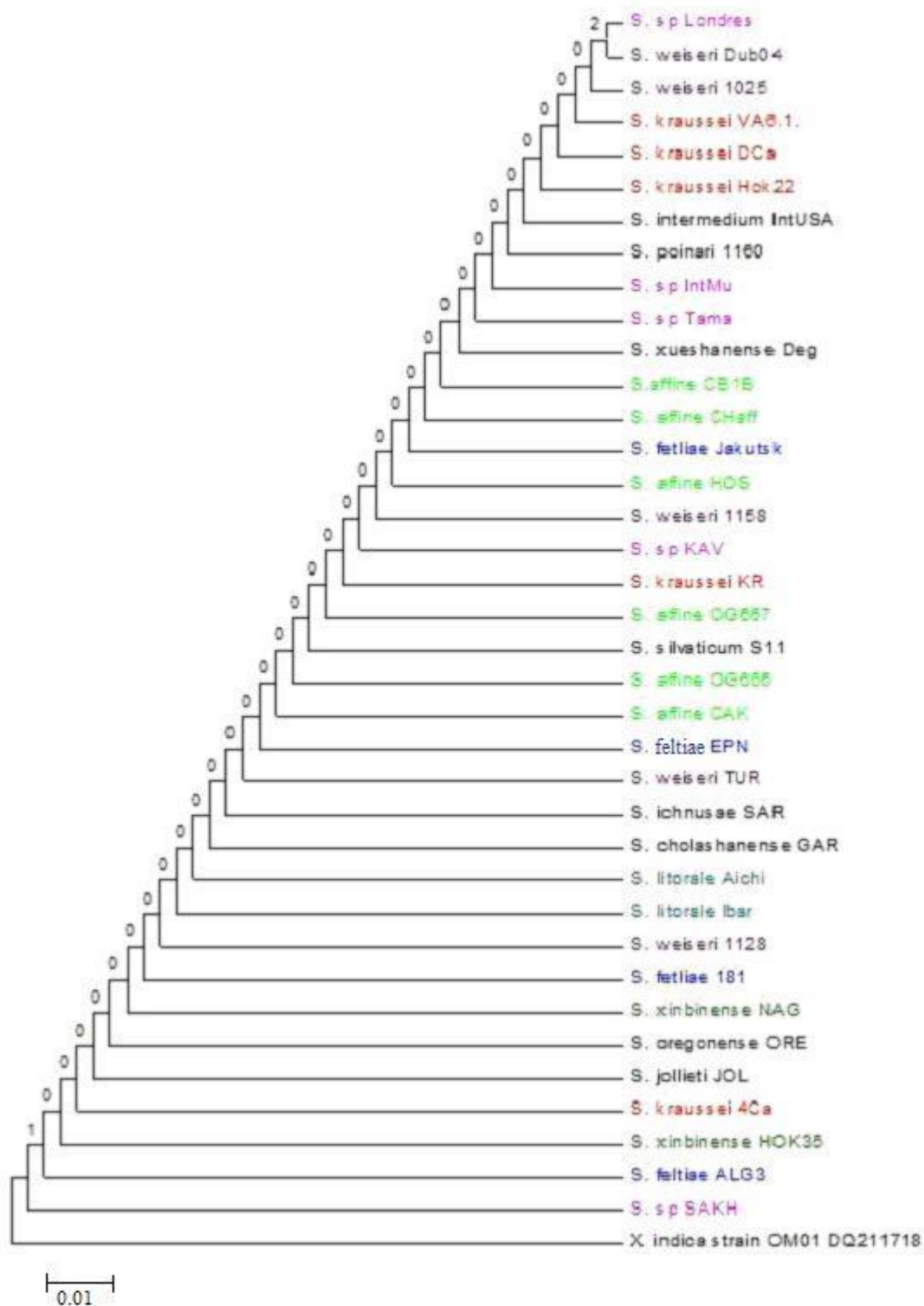


#### 4.1.2 Fylogenetické vztahy linií *X. bovienii*

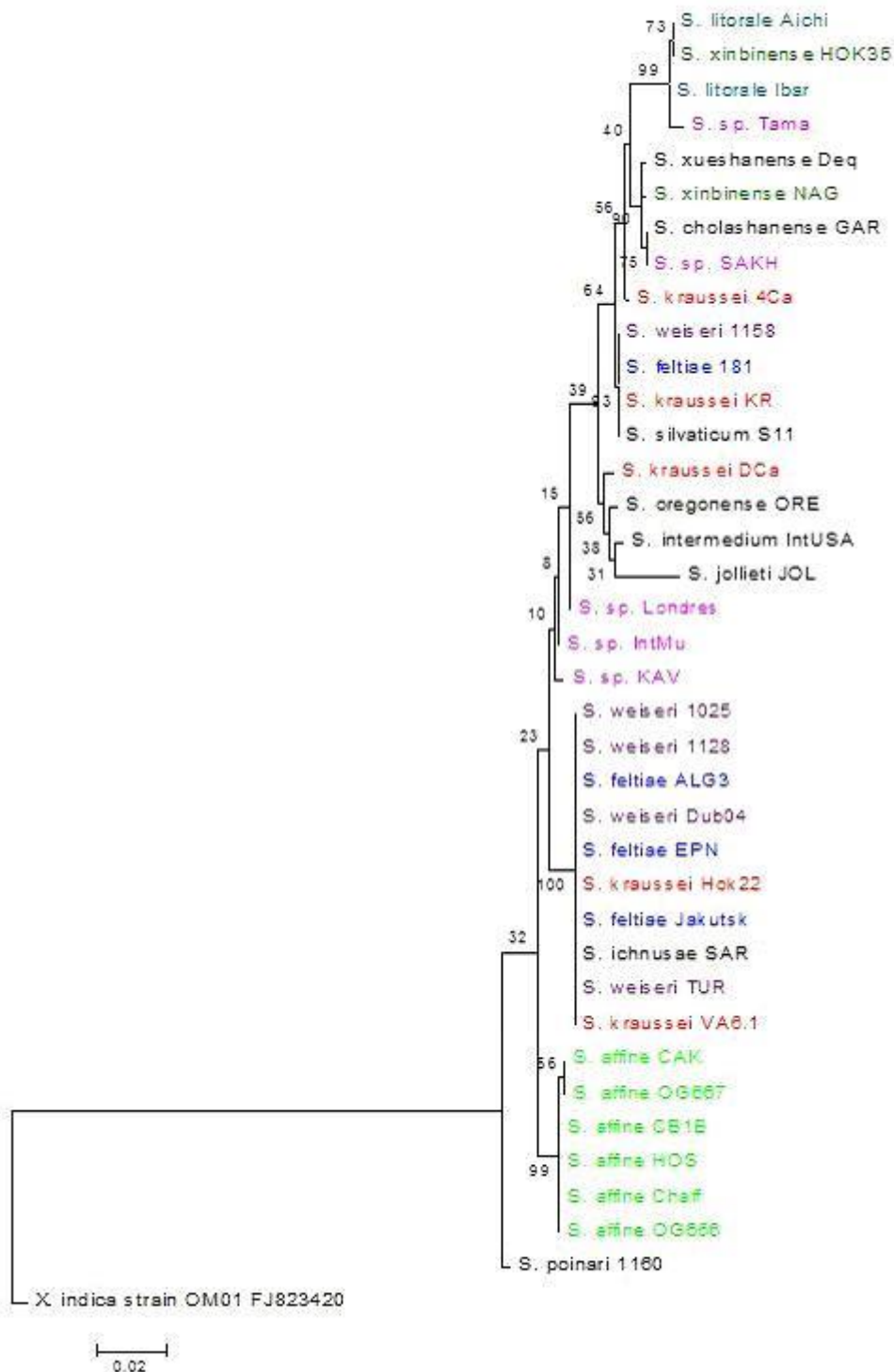
Prvním testovaným genem byl standardizovaný gen, kódující 16S podjednotku ribosomální RNA, který se běžně využívá pro identifikaci bakteriálních druhů. Sekvence byly získány ze všech 37mi izolovaných linií.

Dalšími testovanými geny byly gen *recA* a gen *gyrB*. U všech zvolených oblastí bylo opět analyzováno 37 sekvencí, tedy ze všech analyzovaných kmenů hlístovek rodu *Steinernema*. Sekvence byly vizuálně zkontrolovány a následně upraveny v programu MEGA6 na jednotnou délku 1466 bp pro 16S, 856 bp pro *recA* a 1121 bp pro *gyrB*.

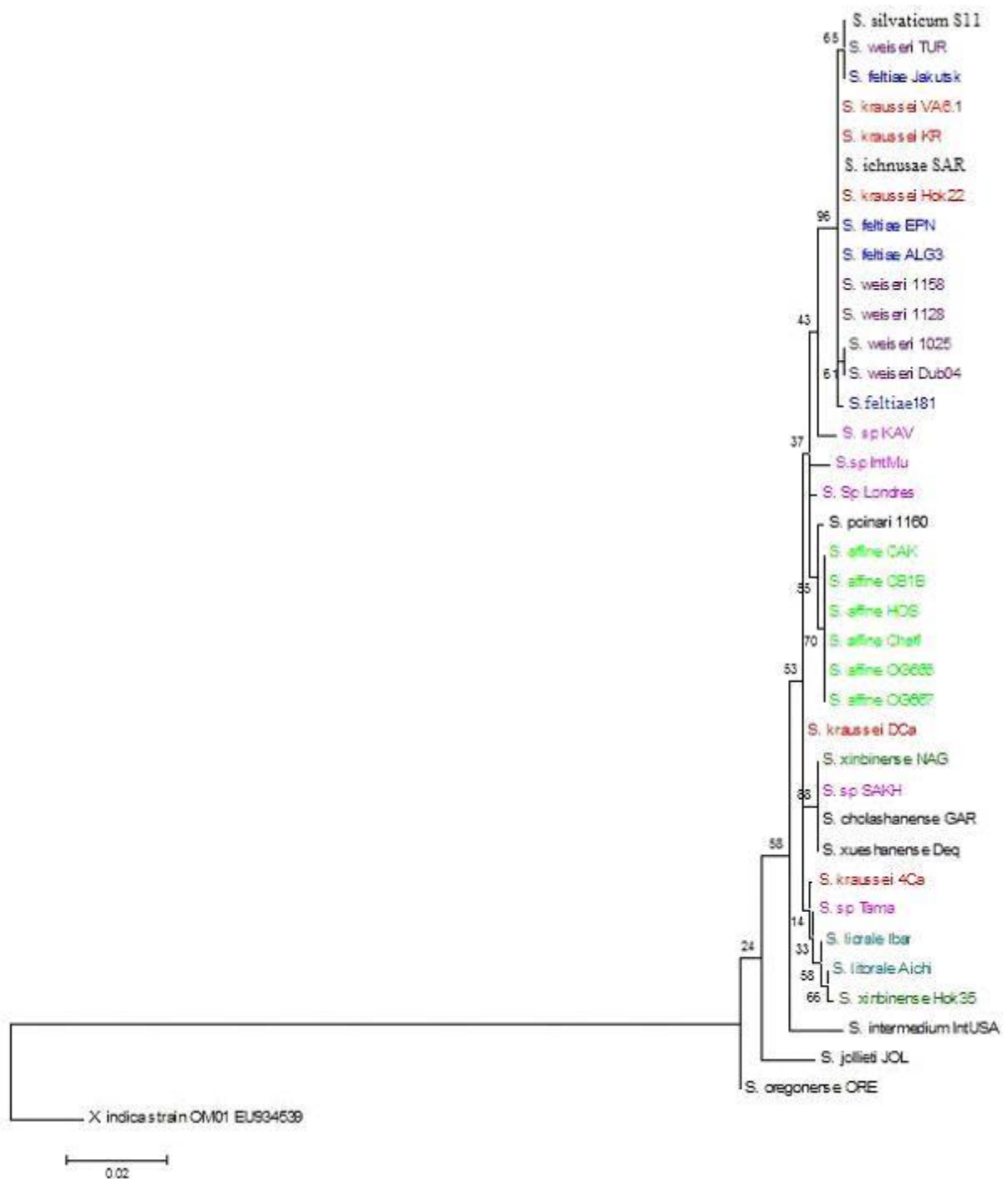
Pro všechny uvedené markery byly rovněž zkonstruovány fylogramy „Neighbor – Joining“ (NJ), „Maximum Likelihood“ (ML) a „Maximum Parsimony“ (MP), s výjimkou markeru 16S, pro který nebylo možné vytvořit fylogram MP. Pro marker 16S byl pro konstrukci stromů použit distanční model Jukes – Cantor, a pro zbylé dva markery *recA* a *gyrB* distanční model Kimura 2 – parameter. Topologie těchto stromů je také víceméně stejná, proto jsou prezentovány na obrázcích 5, 6 a 7 pouze stromy ML, (NJ a MP v Příloze 9–13), které byly dále použity i pro kofylogenetickou analýzu, jako tomu bylo u předchozího markeru. U všech stromů, které byly zkonstruovány pro symbiotické bakterie, se jedná o bakterie linií *X. bovienii*. Pro větší přehlednost však bylo zachováno označení hostitelů.



Obr. 5: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 37mi kmenů rodu *Steinernema* s použitím markeru 16S (Maximum Likelihood, Jukes – Cantor, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů; jednotlivé hostitelské druhy jsou odděleny barevně. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.



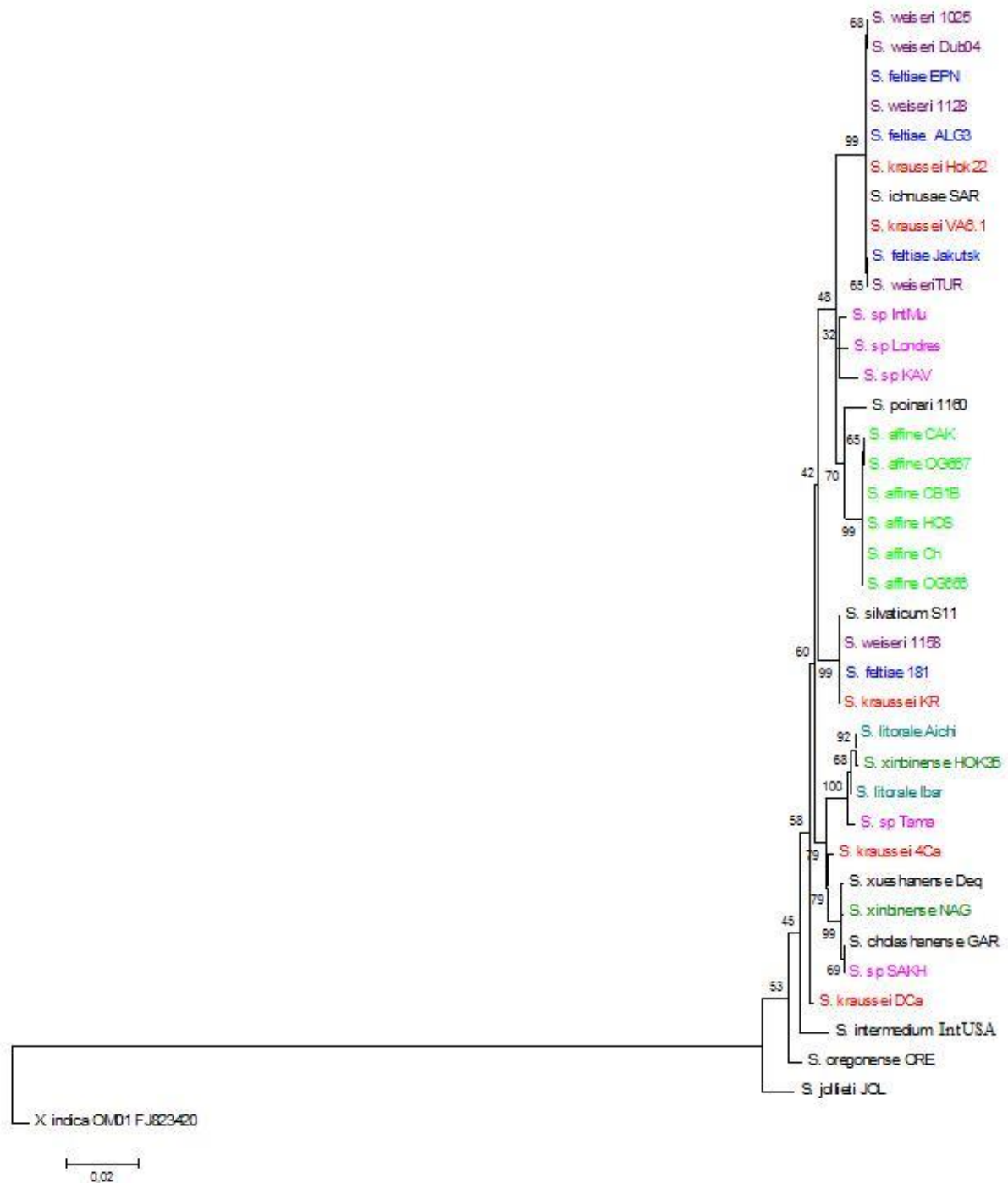
Obr. 6: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 37mi kmenů rodu *Steinernema* s použitím markeru *recA* (Maximum Likelihood, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů; jednotlivé hostitelské druhy jsou odděleny barevně. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.



**Obr. 7: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 37mi kmenů rodu *Steinerinema* s použitím markeru *gyrB* (Maximum Likelihood, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů; jednotlivé hostitelské druhy jsou odděleny barevně. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**

Po provedení testu kongruence, kdy byly vzájemně porovnány ML fylogramy ze všech tří markerů, bylo zjištěno, že marker 16S není kongruentní s ostatními, a proto byl z dalších analýz vyřazen. Naopak při vzájemném porovnání fylogramů pro oblast *recA* a *gyrB* byla kongruence (podle očekávání) potvrzena (**P = 0.001**).

Po vyhodnocení výsledků testu kongruence byl vytvořen společný tzv. „konkatenovaný“ alignment pro markery *gyrB* a *recA* a následně byly zkonstruovány společné fylogramy „Neighbor – Joining“ (NJ), „Maximum Likelihood“ (ML) a „Maximum Parsimony“ (MP) za použití modelu Tamura 3 – parameter. Protože topologie zhotovených stromů se rovněž jevila téměř shodná, je prezentován na obrázku 8 opět jen strom ML (NJ a MP v příloze 14 a 15), který byl dále použit i pro kofylogenetickou analýzu.



**Obr. 8:** Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 37mi kmenů rodu *Steinernema* s použitím „konkatenovaných“ markerů *gyrB* a *recA* (Maximum Likelihood, Tamura 3 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů; jednotlivé hostitelské druhy jsou odděleny barevně. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.

### 4.1.3 Kofylogenetická analýza

Celkově bylo detekováno 35 unikátních haplotypů pro 37 hostitelů a 24 haplotypů pro symbionta (v tabulce 3). Vzhledem k tomu, že se stejný haplotyp symbionta vyskytoval u více hostitelských kmenů, nebyl fylogram hlístic redukován. Počet haplotypů detekovaných u symbiontů byl naproti tomu výrazně nižší, a proto byl pro kofylogenetickou analýzu zkonstruován nový ML strom na základě redukováného souboru (distanční model Tamura 3 – parameter).

**Tab. 3: Asociace symbiontních haplotypů a odpovídajících kmenů hlístic.**

Haplotyp	Počet kmenů	Kmeny (zkratky)
Shap 1	2	<i>S. weiseri</i> 1025 (Sweis1025), <i>S. weiseri</i> Dub04 (SweisDub04)
Shap 2	6	<i>S. weiseri</i> 1128 (Sweis1128), <i>S. feltiae</i> ALG3 (SfeltALG3), <i>S. feltiae</i> EPN (SfeltEPN), <i>S. kraussei</i> Hok22 (SkrausHok22), <i>S. ichnusae</i> SAR (SichnuSAR), <i>S. kraussei</i> VA6.1 (SkrausVA6.1)
Shap 3	2	<i>S. weiseri</i> 1158 (Sweis1158), <i>S. kraussei</i> KR (SkrausKR)
Shap 4	1	<i>S. poinari</i> 1160 (Spoin1160)
Shap 5	1	<i>S. feltiae</i> 181 (Sfelt181)
Shap 6	1	<i>S. kraussei</i> 4Ca (Skraus4Ca)
Shap 7	1	<i>S. litorale</i> Aichi (SlitoAichi)
Shap 8	2	<i>S. affine</i> CAK (SaffiCAK), <i>S. affine</i> OG667 (SaffiOG667)
Shap 9	4	<i>S. affine</i> CB1B (SaffiCB1B), <i>S. affine</i> HOS (SaffiHOS), <i>S. affine</i> Chaff (SaffiChaff), <i>S. affine</i> OG656 (SaffiOG656)
Shap 10	1	<i>S. kraussei</i> Dca (SkrausDca)
Shap 11	1	<i>S. xueshanense</i> Deq (SxuesDeq)
Shap 12	2	<i>S. cholashanense</i> GAR (ScholaGAR), <i>S. sp</i> SAKH (SspSAKH)
Shap 13	1	<i>S. xinbinense</i> HOK35 (SxinbiHOK35)
Shap 14	1	<i>S. litorale</i> Ibar (SlitoIbar)
Shap 15	1	<i>S. sp</i> IntMu (SspIntMu)
Shap 16	1	<i>S. intermedium</i> IntUSA (SinterIntUSA)
Shap 17	2	<i>S. feltiae</i> Jakutsk (SfeltJakutsk), <i>S. weiseri</i> TUR (SweisTUR)
Shap 18	1	<i>S. jollieti</i> JOL (SjollJOL)
Shap 19	1	<i>S. sp</i> KAV (SspKAV)
Shap 20	1	<i>S. sp</i> Londres (SspLondres)
Shap 21	1	<i>S. xinbinense</i> NAG (SxinbiNAG)
Shap 22	1	<i>S. oregonense</i> ORE (SoregORE)
Shap 23	1	<i>S. silvaticum</i> S11 (SsilvS11)
Shap 24	1	<i>S. sp</i> Tama (SspTama)

#### 4.1.3.1 Parafit a PACo

V programu ParaFit je celková kongruence dle parametru ParaFitGlobal = 0.0034 signifikantní (**P = 0.003**). V celém souboru pak bylo detekováno 14 signifikantních individuálních vazeb (tabulka 4), a to především u druhu *S. affine*.

**Tab. 4: Výsledky testu ParaFit1 a ParaFit2 pro jednotlivé asociace hostitel – symbiont (hodnota P je založena 999 permutacích). Zkratky druhů viz tabulka 3.**

Symbiont	Hostitel	ParaF1	P	ParaF2	P
Shap1	Sweis1025	-6.0028	0.787	-1.1693	0,787
Shap1	SweisDub04	-6.0370	0.771	-1.1760	0.771
Shap2	Sweis1128	-5.6617	0.753	-1.1029	0.753
Shap2	SfeltALG3	-5.9213	0.767	-1.1535	0.768
Shap2	SfeltEPN	-6.0183	0.781	-1.1724	0.781
Shap2	SkrausHok22	-9.7273	0.858	-1.8949	0.858
Shap2	SichnuSAR	-5.8979	0.756	-1.1489	0.756
Shap2	SkrausVA6.1	-1.0013	0.855	-1.9507	0.855
Shap3	Sweis1158	6.2616	0.101	1.2197	0.101
Shap3	SkrausKR	8.6547	0.046	1.6859	0.046
Shap4	Spoin1160	4.9317	0.002	9.6073	0.002
Shap5	Sfelt181	6.6516	0.094	1.2957	0.094
Shap6	Skraus4Ca	8.1812	0.039	1.5937	0.039
Shap7	SlitoAichi	1.4732	0.112	2.8699	0.112
Shap8	SaffiCAK	6.8848	0.001	1.3419	0.001
Shap8	SaffiOG667	6.9326	0.001	1.3505	0.001
Shap9	SaffiCB1B	6.5039	0.001	1.2669	0.001
Shap9	SaffiHOS	6.5039	0.001	1.2669	0.001
Shap9	SaffiChaff	6.5039	0.001	1.2669	0.001
Shap9	SaffiOG656	6.5266	0.001	1.2714	0.001
Shap10	SkrauDCa	1.0540	0.415	2.0533	0.415
Shap11	SxuesDeq	1.1849	0.047	2.3083	0.047
Shap12	ScholaGAR	1.1068	0.064	2.1561	0.064
Shap12	SspSAKH	8.7080	0.092	1.6963	0.092
Shap13	SxinbHOK35	1.9210	0.069	3.7422	0.069
Shap14	SlitoIbar	1.3135	0.088	2.5587	0.088
Shap15	SspIntMu	3.0358	0.004	5.9139	0.004
Shap16	SinteIntUSA	-3.7131	0.898	-7.2332	0.898
Shap17	SfeltJakutsk	-6.3084	0.786	-1.2289	0.786
Shap17	SweisTUR	-6.1377	0.800	-1.1956	0.800
Shap18	SjollJOL	4.9980	0.527	9.7363	0.527
Shap19	SspKAV	3.1537	0.002	6.1436	0.002
Shap20	SspLondres	1.8315	0.003	3.5678	0.003
Shap21	SxinbNAG	1.1969	0.054	2.3316	0.054
Shap22	SoregORE	3.3937	0.414	6.6110	0.414
Shap23	SsilvS11	8.7231	0.049	1.6992	0.049
Shap24	SspTama	1.6984	0.049	3.3086	0.049

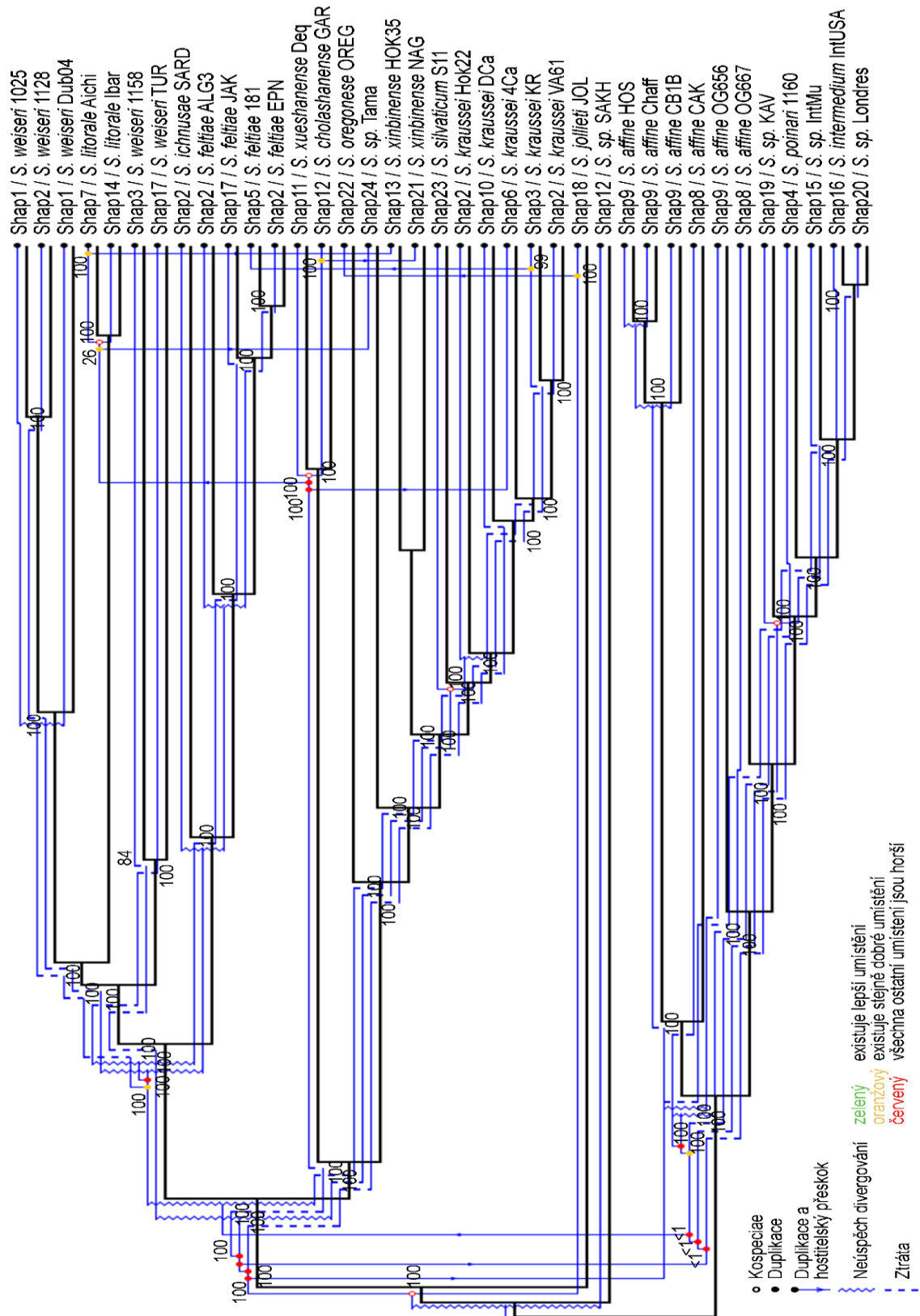
Signifikantní hodnoty jsou zvýrazněny červeně.



V programu PACo byla hodnota celkové shody  $m_{xy}^2 = 1.712343$  na základě 10.000 permutací **signifikantní (P = 0.0004)**. Oba distanční testy tedy vyšly obdobně, potvrdily možnou koevoluci zkoumaných hostitelů a symbiontů.

#### **4.1.3.2 Jane**

V programu Jane bylo ponecháno základní nastavení jako výchozí hodnoty, které byly navýšeny o jednotku. Pro výpočty byl tedy použit následující rozsah hodnot: kospeciace 0–1, duplikace 1–2, hostitelský přeskok 2–3, ztráty 1–2, chyby v divergování 1–2. Hodnoty celkové nákladnosti („cost“) se pak ve výsledku pohybovaly v rozmezí 114–218, kdy nejnižší hodnota byla zaznamenána při základním nastavení. Toto optimální řešení obsahuje: 5 kospeciací, 8 duplikací, 10 hostitelských přeskoků, 73 ztrátových událostí, 13 neúspěchů divergování. Jejich rozmístění na rekonciliovaných (souladných) dendrogramech je na obrázku 9. Počet koevolučních událostí pro jednotlivé symbionty a jejich hostitele je uveden v tabulce 5. Celková kongruence je **signifikantní (P ≤ 0.01)** a potvrzuje tak předchozí výsledky programů PACo a ParaFit.



Obr. 9: Rekonciliované dendrogramy hliště rodu *Steineria* (strom ITS) a jejich symbiotických bakterií rodu *Xenorhabdus* (strom z konkatenovaných markerů *gyrB*, *recA*).

**Tab. 5: Počet koevolučních událostí u jednotlivých symbiontů a jejich hostitelů.**

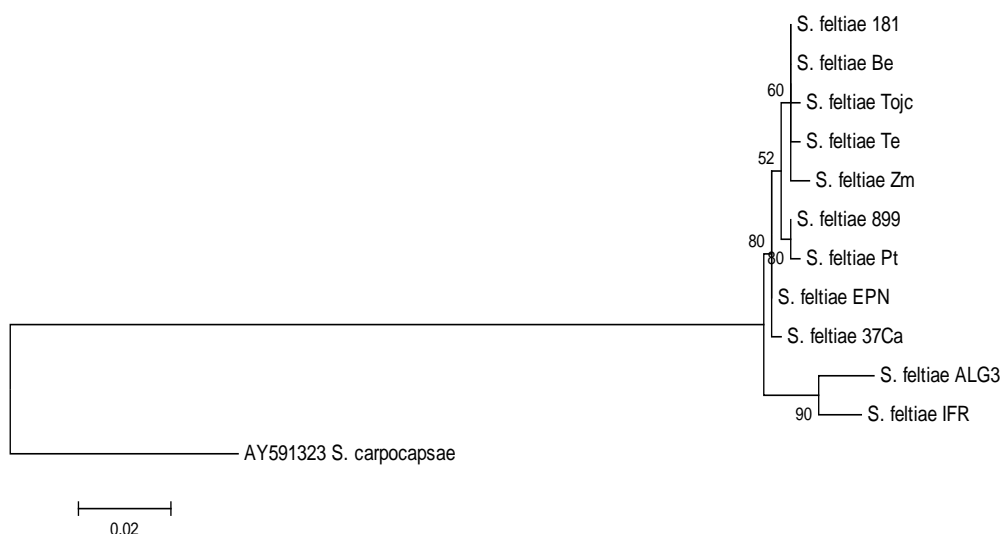
Symbiont	Hostitel	Počet koevolučních událostí
Shap1	<i>S. weiseri</i> 1025 (Sweis1025)	9
Shap1	<i>S. weiseri</i> Dub04 (SweisDub04)	9
Shap2	<i>S. weiseri</i> 1128 (Sweis1128)	8
Shap2	<i>S. feltiae</i> ALG3 (SfeltALG3)	9
Shap2	<i>S. feltiae</i> EPN (SfeltEPN)	5
Shap2	<i>S. kraussei</i> Hok22 (SkrausHok22)	4
Shap2	<i>S. ichnusae</i> SAR (SichnuSAR)	9
Shap2	<i>S. kraussei</i> VA61 (SkrausVA6.1)	5
Shap3	<i>S. weiseri</i> 1158 (Sweis1158)	6
Shap3	<i>S. kraussei</i> KR (SkrausKR)	5
Shap4	<i>S. poinari</i> 1160 (Spoin1160)	5
Shap5	<i>S. feltiae</i> 181 (Sfelt181)	5
Shap6	<i>S. kraussei</i> 4Ca (Skraus4Ca)	4
Shap7	<i>S. litorale</i> Aichi (SlitoAichi)	5
Shap8	<i>S. affine</i> CAK (SaffiCAK)	7
Shap8	<i>S. affine</i> OG667 (SaffiOG667)	7
Shap9	<i>S. affine</i> CB1B (SaffiCB1B)	3
Shap9	<i>S. affine</i> HOS (SaffiHOS)	10
Shap9	<i>S. affine</i> Chaff (SaffiChaff)	9
Shap9	<i>S. affine</i> OG656 (SaffiOG656)	3
Shap10	<i>S. kraussei</i> DCa (SkrauDCa)	1
Shap11	<i>S. xueshanense</i> Deq (SxuesDeq)	4
Shap12	<i>S. cholashanense</i> GAR (ScholaGAR)	4
Shap12	<i>S. sp</i> SAKH (SspSAKH)	0
Shap13	<i>S. xinbinense</i> HOK35 (SxinbHOK35)	6
Shap14	<i>S. litorale</i> Ibar (SlitoIbar)	5
Shap15	<i>S. sp</i> IntMu (SspIntMu)	5
Shap16	<i>S. intermedium</i> IntUSA (SinteIntUSA)	2
Shap17	<i>S. feltiae</i> Jakutsk (SfeltJakutsk)	9
Shap17	<i>S. weiseri</i> TUR (SweisTUR)	9
Shap18	<i>S. jolietti</i> JOL (SjollJOL)	1
Shap19	<i>S. sp</i> KAV (SspKAV)	5
Shap20	<i>S. sp</i> Londres (SspLondres)	3
Shap21	<i>S. xinbinense</i> NAG (SxinbNAG)	4
Shap22	<i>S. oregonense</i> ORE (SoregORE)	2
Shap23	<i>S. silvaticum</i> S11 (SsilvS11)	5
Shap24	<i>S. sp</i> Tama (SspTama)	5

Asociace signifikantní dle výsledků ParaFitu jsou zvýrazněny červeně.

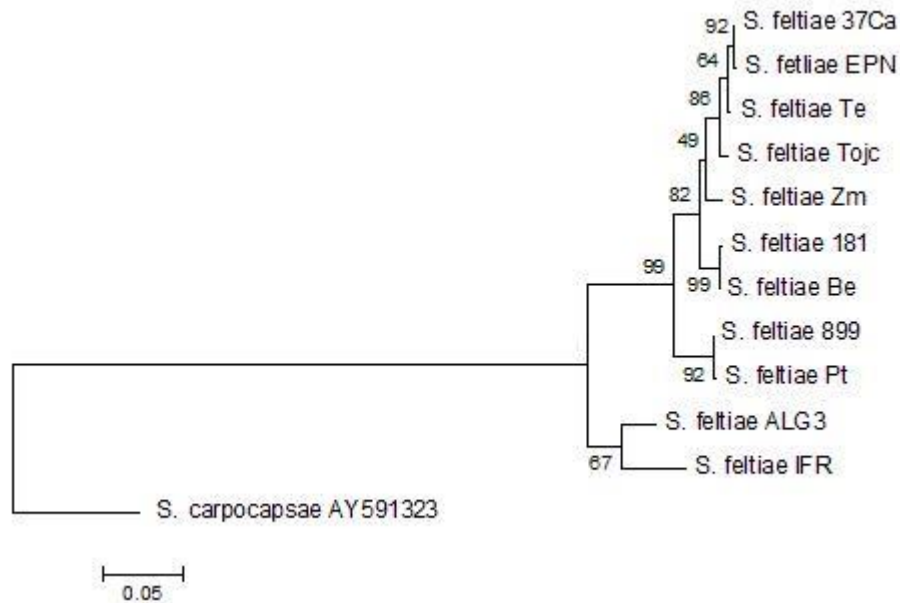
#### 4.1.4 Fylogenetické vztahy hlístovek – *S. feltiae*

##### Mitochondriální markery 12S, *ND2* a *COX I*

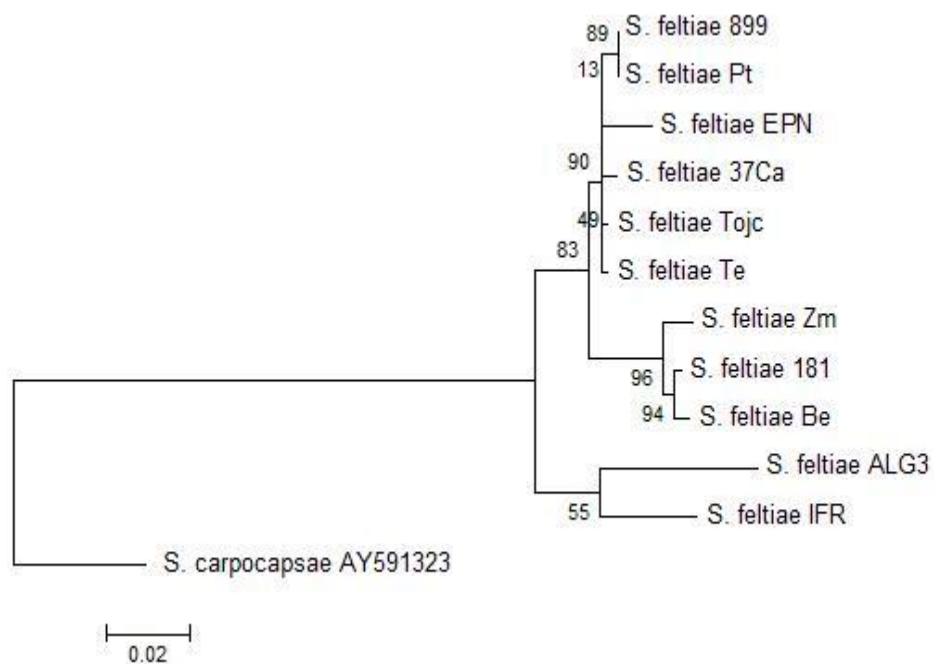
V druhé části práce jsem testovala mitochondriální markery 12S, *ND2* a *COX I*, u kterých jsem na základě dřívějších poznatků předpokládala větší úspěšnost a přesnost v rozdělování jednotlivých druhů. U všech testovaných markerů bylo analyzováno 12 sekvencí z 12 ti různých kmenů druhu *S. feltiae*. Všechny sekvence byly opět vizuálně zkontrolovány a následně upraveny v programu MEGA6 na jednotnou délku 498 bp pro 12S, 569 bp pro *ND2* a 645 bp pro *COX I*. V tomto programu byly následně zhotoveny fylogenetické stromy „Neighbor – Joining“ (NJ), „Maximum Likelihood“ (ML) a „Maximum Parsimony“ (MP), za použití distančního modelu Tamura 3 – parameter u 12S, a modelu Tamura – Nei u markerů *ND2* a *COX I*. Topologie těchto stromů je víceméně stejná, proto jsou prezentovány pouze fylogramy ML, znázorněné na obrázcích 10–12 (fylogramy NJ a MP jsou znázorněny v Příloze 16–21), které byly dále aplikovány i pro kofylogenetickou analýzu.



**Obr. 10:** Fylogram hlístic s použitím markeru 12S (Maximum Likelihood, Tamura 3 – parameter, Use all sites, Bootstrap 1000), zakořeněný *S. carpocapsae*. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.

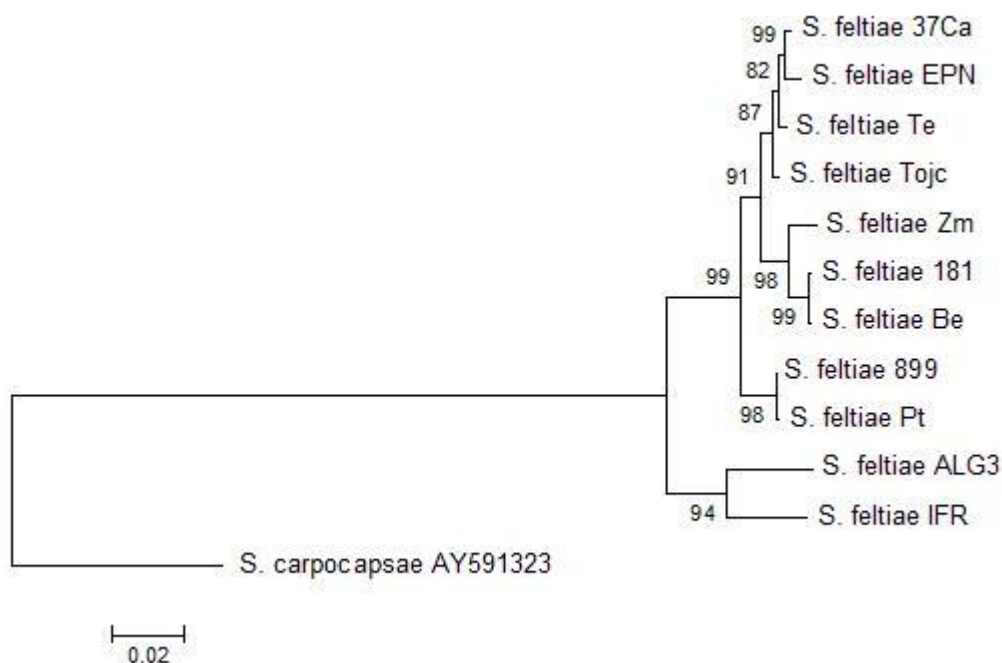


**Obr. 11: Fylogram hlístic s použitím markeru *ND2* (Maximum Likelihood, Tamura – Nei model, Use all sites, Bootstrap 1000), zakořeněný *S. carpocapsae*. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



**Obr. 12: Fylogram hlístic s použitím markeru *COX I* (Maximum Likelihood, Tamura – Nei model, Use all sites, Bootstrap 1000), zakořeněný *S. carpocapsae*. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**

Po provedení testu kongruence, kdy byly vzájemně porovnány ML fylogramy ze všech tří markerů, bylo zjištěno, že všechny markery jsou vzájemně kongruentní (12S x *ND2*: **P = 0.001**; 12S x *COX I*: **P = 0.002**; *ND2* x *COX I*: **P = 0.001**), a proto mohl být vytvořen „konkatenovaný“ alignment pro všechny 3 zvolené markery. Následně byly zkonstruovány společné fylogramy „Neighbor – Joining“ (NJ), „Maximum Likelihood“ (ML) a „Maximum Parsimony“ (MP) za použití modelu Tamura – Nei. Protože topologie zhotovených stromů se rovněž jevila téměř shodná, je prezentován na obrázku 13 pouze strom ML (NJ a MP v Příloze 22 a 23), který byl dále zvolen i pro kofylogenetickou analýzu.



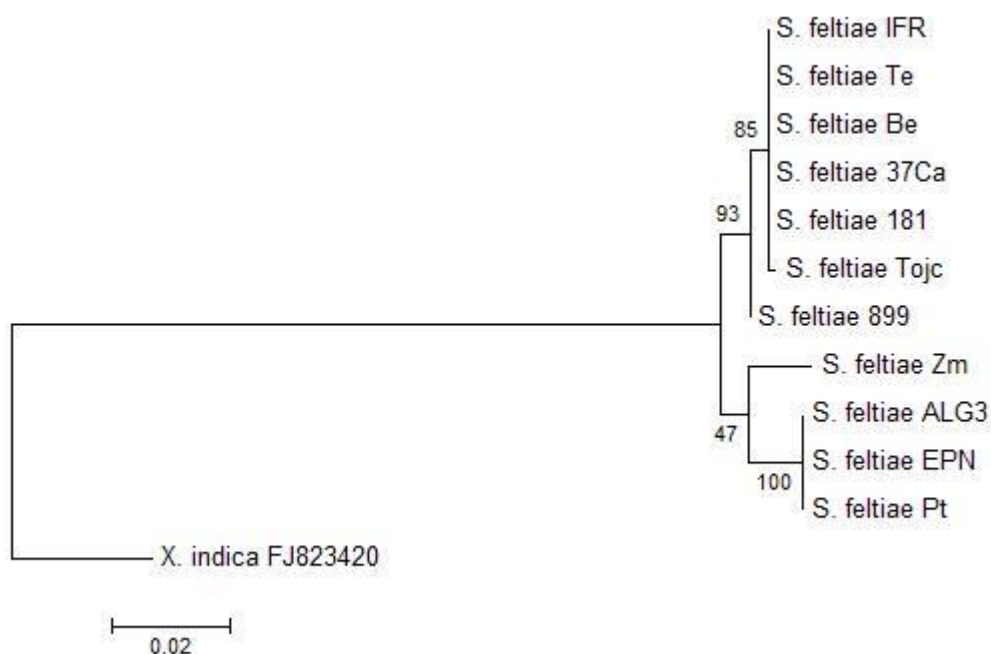
**Obr. 13: Fylogram hlístic s použitím „konkatenovaných“ markerů 12S, *ND2* a *COX I* (Maximum Likelihood, Tamura – Nei model, Use all sites, Bootstrap 1000), zakořeněný *S. carpocapsae*. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**

#### 4.1.5 Fylogenetické vztahy linií *X. bovienii* u *S. feltiae*

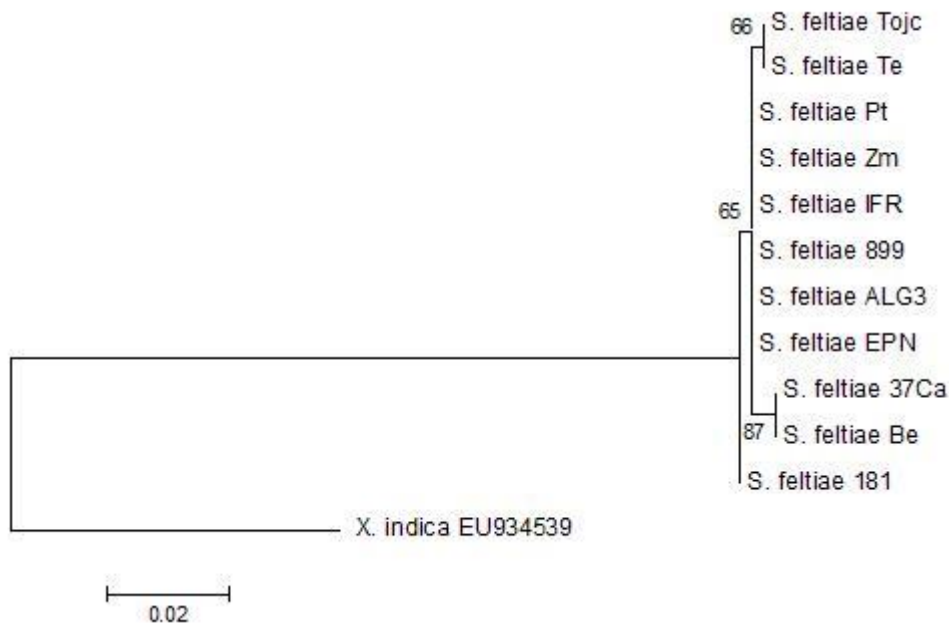
V této části jsem testovala pouze dva markery pro symbiotické bakterie, tedy *recA* a *gyrB*. Marker 16S byl použit pouze pro kontrolní identifikaci bakteriálních druhů, z celkové studie byl však vyřazen, protože se v první části práce ukázal jako nepříliš vhodný. U obou zvolených oblastí bylo analyzováno 12 sekvencí z 12 ti různých kmenů

druhu *S. feltiae*. Sekvence byly vizuálně zkontrolovány a následně upraveny v programu MEGA6 na jednotnou délku 851 bp pro *recA* a 966 bp pro *gyrB*.

Pro uvedené markery byly rovněž zrekonstruovány fylogramy „Neighbor – Joining“ (NJ), „Maximum Likelihood“ (ML) a „Maximum Parsimony“ (MP), za použití distančního modelu Kimura 2 – parameter. Topologie těchto stromů je opět také víceméně stejná, proto jsou prezentovány pouze stromy ML, viz obrázek 14 a 15 (NJ a MP v Příloze 24–27), které byly dále použity i pro kofylogenetickou analýzu. U všech stromů, které byly zkonstruovány pro symbiotické bakterie, se jedná o bakterie linií *X. bovienii*. Pro větší přehlednost však bylo zachováno označení hostitelů.



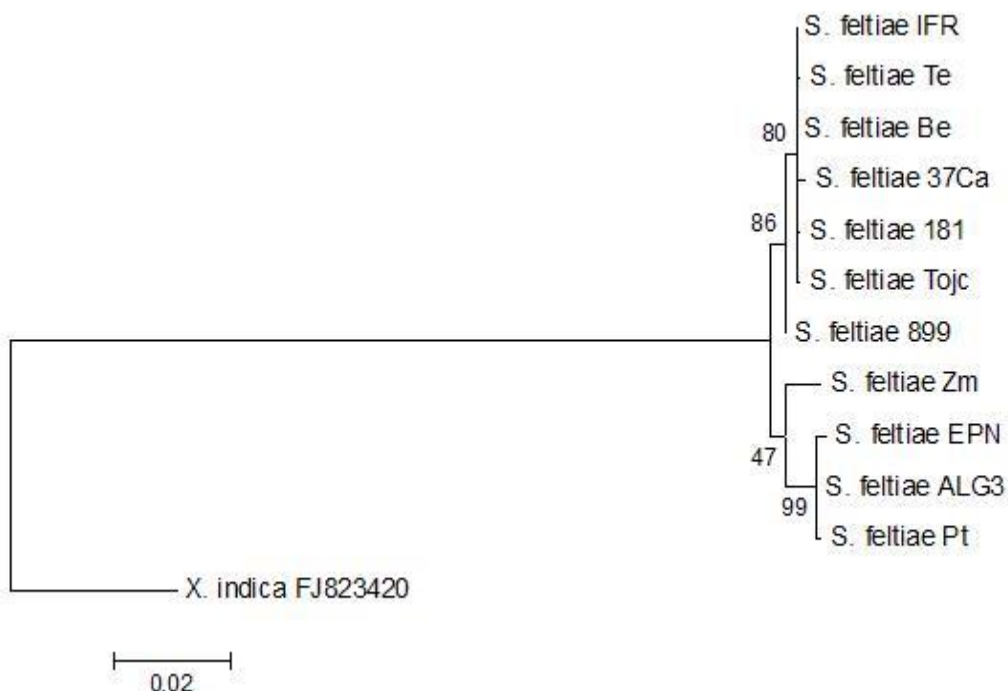
**Obr. 14:** Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 12 ti kmenů rodu *Steinernema* s použitím markeru *recA* (Maximum Likelihood, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.



**Obr. 15: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 12 ti kmenů rodu *Steinernema* s použitím markeru *gyrB* (Maximum Likelihood, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**

Po provedení testu kongruence kdy byly vzájemně porovnány ML fylogramy z obou markerů bylo zjištěno, že tyto markery nejsou vzájemně kongruentní ( $P = 0.061$ ), což mohl mít za následek marker *gyrB*, u kterého byly během sekvenování některých vzorků získány pouze krátké sekvence. I přesto byl vytvořen „konkatenovaný“ soubor a následně byly zkonstruovány společné fylogramy „Neighbor – Joining“ (NJ), „Maximum Likelihood“ (ML) a „Maximum Parsimony“ (MP) za použití modelu Kimura 2 – parameter. Protože topologie zhotovených stromů se rovněž jevila téměř shodná, je prezentován na obrázku 16 opět pouze strom ML (NJ a MP v Příloze 28 a 29), který byl dále použit i pro kofylogenetickou analýzu.





**Obr. 16:** Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 12 tí kmenů rodu *Steinernema* s použitím konkatenovaných markerů *gyrB* a *recA* (Maximum Likelihood, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.

#### 4.1.6 Kofylogenetická analýza

Analýza haplotypů detekovala, že počet unikátních haplotypů *S. feltiae* se shoduje s počtem vyšetřených linií. U symbiontů byly dvě linie shodné (označení Shap6, u hlístovek *S. feltiae* Be a *S. feltiae* IFR), a proto byl „konkatenovaný“ soubor redukován a vytvořen nový ML strom.

##### 4.1.6.1 ParaFit a PACo

V programu ParaFit celková kongruence dle parametru ParaFitGlobal = 7.0913 **nebyla signifikantní (P = 0.573)**, a signifikantní nebyla také ani jedna z individuálních asociací (tabulka 6).

**Tab. 6: Výsledky testu ParaFit1 a ParaFit2 pro jednotlivé asociace hostitel – symbiont (hodnota P je založena 999 permutacích).**

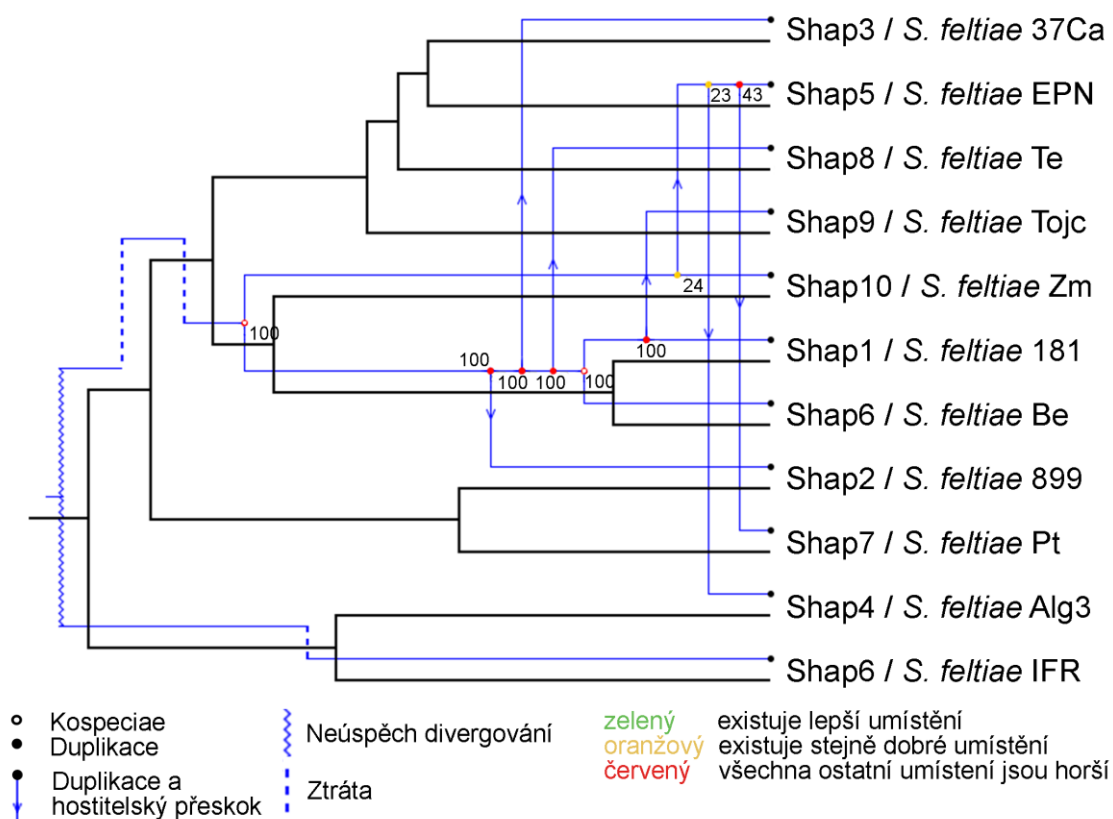
Symbiont	Hostitel	ParaF1	P	ParaF2	P
Shap1	<i>S. feltiae</i> 181 (Sfelt181)	1.3450	0.279	3.1742	0.281
Shap2	<i>S. feltiae</i> 899 (Sfelt899)	5.7063	0.514	1.3466	0.514
Shap3	<i>S. feltiae</i> 37Ca (Sfelt37Ca)	9.0862	0.401	2.1442	0.402
Shap4	<i>S. feltiae</i> ALG3 (SfeltALG3)	4.5334	0.133	1.0698	0.134
Shap5	<i>S. feltiae</i> EPN (SfeltEPN)	-3.1561	0.891	-7.4482	0.891
Shap6	<i>S. feltiae</i> Be (SfeltBe)	1.2274	0.269	2.8966	0.269
Shap6	<i>S. feltiae</i> IFR (SfeltIFR)	-4.6839	0.966	-1.1053	0.966
Shap7	<i>S. feltiae</i> Pt (SfeltPt)	-7.0622	0.722	-1.6666	0.722
Shap8	<i>S. feltiae</i> Te (SfeltTe)	8.2060	0.403	1.9365	0.403
Shap9	<i>S. feltiae</i> Tojc (SfeltTojc)	7.4650	0.362	1.7616	0.362
Shap10	<i>S. feltiae</i> Zm (SfeltZm)	2.7697	0.737	6.5364	0.737

Analýza pomocí programu PACo rovněž ukázala, že v tomto případě kongruence mezi hlísticemi a jejich symbiotickými bakteriemi není potvrzena, neboť hodnota parametru  $m_{xy}^2 = 0.0218152$  na základě 10.000 permutací **není signifikantní (P = 0.7498)**.

#### 4.1.6.2 Jane

Obdobně jako v první analýze bylo v programu Jane ponecháno základní nastavení jako výchozí hodnoty, které byly navýšeny o jednotku. Pro výpočty byl tedy použit následující rozsah hodnot: kospeciace 0–1, duplikace 1–2, hostitelský přeskok 2–3, ztráty 1–2, chyby v divergování 1–2. Hodnoty celkové nákladnosti („cost“) se pak ve výsledku pohybovaly v rozmezí 18–29, kdy nejnižší hodnota byla opět zaznamenána při základním nastavení. Toto optimální řešení obsahuje: 2 kospeciace, 0 duplikací, 7 hostitelských přeskoků, 3 ztrátové události, 1 neúspěch divergování. Jejich rozmístění na topologii je na obrázku 17. Počet jednotlivých koevolučních událostí je uveden v tabulce 7.

Celková kongruence má pravděpodobnost **P = 0.9** což znamená, že **není signifikantní** a potvrzuje tak předchozí výsledky programů PACo a ParaFit.



**Obr. 17:** Rekonciliované dendrogramy hlic *S. feltiae* (strom z konkatenovaných markerů 12S, ND2, COX I) a jejich symbiotických bakterií rodu *Xenorhabdus* (strom z konkatenovaných markerů *gyrB*, *recA*).

**Tab. 7:** Počet koevolučních událostí u jednotlivých symbiontů a jejich hostitelů.

Symbiont	Hostitel	Počet koevolučních událostí
Shap1	<i>S. feltiae</i> 181 (Sfelt181)	2
Shap2	<i>S. feltiae</i> 899 (Sfelt899)	2
Shap3	<i>S. feltiae</i> 37Ca (Sfelt37Ca)	2
Shap4	<i>S. feltiae</i> ALG3 (SfeltALG3)	3
Shap5	<i>S. feltiae</i> EPN (SfeltEPN)	2
Shap6	<i>S. feltiae</i> Be (SfeltBe)	2
Shap6	<i>S. feltiae</i> IFR (SfeltIFR)	0
Shap7	<i>S. feltiae</i> Pt (SfeltPt)	3
Shap8	<i>S. feltiae</i> Te (SfeltTe)	2
Shap9	<i>S. feltiae</i> Tojc (SfeltTojc)	3
Shap10	<i>S. feltiae</i> Zm (SfeltZm)	1

## 5. Diskuze

Cílem mé práce bylo otestovat vhodnost metody MLST u entomopatogenního symbiotického komplexu hlístice – bakterie, rodu *Steinernema* (s detailnější analýzou *S. feltiae*) a *Xenorhabdus bovienii*. Následně pomocí srovnávací kofylogenetické analýzy zjistit úroveň jejich kospeciace.

Při výběru markerů pro MLST jsme vycházeli z předchozích studií, zejména ze studie Tailliez, *et al.*, (2010), ve které byla studována fylogeneze dvou bakteriálních rodů *Photorhabdus* a *Xenorhabdus* pomocí markerů 16S rRNA, *recA*, *gyrB*, *dnaN*, *gltX* a *rplB*, které byly testovány již dříve v několika dalších studiích bakteriální fylogeneze (Akhurst, *et al.*, 2004; Eisen, 1995; Hannula a Hänninen, 2007; Parkinson, *et al.*, 2007; Thompson, *et al.*, 2004; Wang, *et al.*, 2007). Dále jsme čerpali ze studie Lee a Stock, (2010), která se zabývala studiem koevoluce mezi hlístovkami rodu *Steinernema* a jejich symbiotickými bakteriemi rodu *Xenorhabdus*, s použitím markerů 28S, 12S a *COX I* pro rod *Steinernema* a 16S, *recA* a *serC* pro *Xenorhabdus*. Třetí zvažovanou studií pak byla práce Maneesakorn, *et al.*, (2011), v níž byly pro podobnou kofylogenetickou analýzu EPN komplexu *Heterorhabditis* – *Photorhabdus* úspěšně použity markery *ITS* (pro hlístice) a *gyrB* (pro bakterie). Po posouzení vhodnosti jednotlivých markerů v uvedených studiích jsme vybrali markery 16S, *recA* a *gyrB* pro symbiotické bakterie a *ITS* pro hostitele. Marker *ITS* u entomopatogenních hlístic byl odhalen jako nevhodný pro ilustraci vnitrodruhové variability (Půža, *et al.*, 2015). V druhé části práce zaměřené na druh *S. feltiae* jsme proto marker *ITS* nahradili třemi mitochondriálními geny (12S, *COX I* a *ND2*). *ND2* marker byl zvolena na základě zjištění, kterého jsem dosáhla v mé bakalářské práci (Faktorová, 2014), konkrétně faktu, že vykazuje nejvyšší nukleotidovou variabilitu a jeví se tak pro rozlišování jednotlivých linií jako nejvhodnější. Markery 12S a *COX I* byly zahrnuty na základě předchozí studie Lee a Stock, (2010).

Marker 16S byl použit především jako identifikační marker pro ověření správnosti určení bakteriálního druhu. V tomto případě jsme se odchýlili od práce Lee a Stock, (2010), ve které byl tento marker zahrnut a přidán rovněž do konkatenovaného alignmentu a použit pro další analýzu. Podle našich výsledků to však není správné (jak kvůli nízké variabilitě, tak i nekongruenci s ostatními markery), v čemž se shodujeme i s výsledky ze studie Tailliez, *et al.*, (2010).

Nekongruentní topologie mohou být výsledkem různých evolučních tlaků, působících na porovnávané geny. Nicméně bylo také pozorováno, že 16S v některých případech

podléhá laterálnímu genovému transferu (LGT). Přestože laterální přenos genů rRNA byl dříve považován za nepravděpodobný (Jain, *et al.*, 1999), četné příklady laterálního transferu genových segmentů rRNA a celých rRNA genů a operonů byly objeveny v několika bakteriálních skupinách, např. laterální transfer genových segmentů byl prokázán u *Aktinomyces* (Wang a Zhang, 2000) a přenos celého genu 16S rRNA byl potvrzen u rodu *Helicobacter* (Dewhirst, *et al.*, 2005)

U bakteriálních symbiontů entomopatogenních hlístic je pravděpodobnost laterálního transferu genů zvýšena faktem, že patrně často dochází ke koinfekci jednoho hostitele dvěma nemato – bakteriálními komplexy (Půža a Mráček, 2010), z nichž jeden často zahyne (Půža a Mráček, 2009). Části bakteriální DNA pak mohou být začleněny do genomu „vítězné“ bakterie. Mezi faktory usnadňující laterální transfer genu 16S patří i podstatná podobnost sekvencí tohoto genu u blízkých příbuzných bakterií. Sergeant, *et al.*, (2006) provedl multilokusovou sekvenční analýzu včetně čtyř „housekeeping“ genů a navrhl, že *serC* oblast, kódující fosfoserin aminotransferázy, rovněž často podléhá u bakterií rodu *Xenorhabdus* laterálnímu transferu.

Proto jsme markery *recA* a *gyrB* vybrali především na základě toho, že ve studii (Tailliez, *et al.*, 2010) byly označeny za lokusy, u kterých k laterálnímu transferu nedochází. Pro kontrolu byl ještě proveden test kongruence výpočtem pomocí metody CADM, který nejenže prokázal kongruenci mezi těmito lokusy, ale rovněž potvrzuje i předpoklad, že v tomto případě opravdu nedochází k LGT. Naopak u markeru 16S byla pravděpodobnost LGT potvrzena.

Po vyhodnocení výsledků jsem došla k závěru, že fylogenetické vztahy mezi druhy odpovídají očekávání, tedy že se ve všech případech jednalo o symbiotickou bakterii *X. bovienii*.

Dosud byla bakterie *X. bovienii* pozorována u 10 ti druhů rodu *Steinernema*. V rámci této práce byl *X. bovienii* nově nalezen u druhů *S. litorale*, *S. poinari*, *S. xinbinense* a *S. xueshanense*, u kterých dosud nebyla identita bakteriálního symbionta známá.

Zajímavé je i zjištění přítomnosti *X. bovienii* u druhu *Steinernema sp.* SAKH. Tento dosud nepopsaný druh patří mezi druhy příbuzné *S. monticolum*, které se vyskytují na bázi skupiny „*feltiae*“, a které obsahují bakterii *X. hominickii* (Tailliez, *et al.*, 2006, Spiridonov, *et al.*, 2010). Nález *X. bovienii* u hlístice z této skupiny by tak mohl naznačovat, že tato

bakterie může být původním symbiontem celé skupiny „*feltiae*“. Pro další závěry by však bylo nutno analyzovat symbionty i u dalších druhů z této skupiny.

Získaný fylogenetický strom hlístic nesoucích *X. bovienii* víceméně odpovídá publikovaným studiím. Jako bazálnější vychází tzv. skupina „*affine*“ která je bazální v rámci celé čeledi Steinernematidae (Spiridonov, *et al.*, 2004). Jediný druh hlístice, který netvoří monofyletickou skupinu je *S. weiseri*, kde kmeny TUR a 1158 vycházejí jako sesterské ke skupně dalších tří kmenů *S. weiseri* a druhů *S. ichnusae* a *S. feltiae*. Příslušnost kmenů TUR a 1158 k druhu *S. weiseri* však byla potvrzena analýzou sekvence genu 28S rDNA (Půža, nepublikovaná data).

Fylogenetická analýza kmenů *X. bovienii* z různých druhů a kmenů druhu *Steinernema* ukázala, že počet haplotypů bakterií je nižší než počet hlístic, a tedy, že některé hlístice sdílí stejný haplotyp symbionta. U těchto hlístic však nebyla potvrzena výrazná spojitost. Většinou se nejednalo o stejné druhy, ani o druhy vyskytující se na stejném území. Takováto spojitost byla pozorována pouze u haplotypu 1, který sdílely 2 kmeny (1025, Dub04) druhu *S. weisseri*, lokalizovány v ČR. Dále byla obdobná shoda u haplotypu 3, který sdílely dva kmeny (1158 a KR) rozdílných druhů *S. weisseri* a *S. kraussei*, ale ze stejné lokality (ČR). U haplotypu 8 se vyskytovaly dva kmeny druhu *S. affine* (CAK, OG667), avšak z různých lokalit; ČR a Švýcarsko. Haplotyp 9 sdílely 4 kmeny (Chaff, HOS, OG665, CB1B) druhu *S. affine*, kdy 3 byly z ČR a jeden ze Švýcarska. Haplotyp 12 sdílely 2 kmeny (GAR a SAKH) z různých druhů *S. cholashanense* a *S. sp* a různých lokalit; z Číny a druhý z Ruska. Poslední společný haplotyp 17 zahrnoval dva kmeny (Jakutsk a TUR) ze dvou druhů *S. feltiae* a *S. weiseri*, lokalizovány v Rusku a Turecku.

Programy testující koevoluční události (PACo, ParaFit a Jane) shodně ukázaly signifikantní celkovou kongruenci mezi fylogenezí hlístic a bakterií. Jednotlivé vztahy však byly průkazné pouze z menší části. Na první pohled je zjevné, že se v jednotlivých, dobře podpořených klastrech v rámci fylogeneze *X. bovienii* často vyskytují symbionti izolovaní z různých druhů hlístic, a naopak, symbionti jednotlivých druhů hlístic vesměs netvoří monofyletické skupiny. Nejmarkantější je situace u *S. kraussei*, jejíž symbionti se nacházejí ve čtyřech různých pozicích. Linie *X. bovienii* z různých kmenů hlístice *S. feltiae* se vyskytují ve dvou různých skupinách. Tato data naznačují, že u některých linií *X. bovienii* docházelo v minulosti poměrně často k přeskoku na jinou hostitelskou hlístici. Tento fakt je v rozporu s prací Murfin *et al.*, 2015, která naznačila specifičnost *S. feltiae* a

jejich symbiotických bakterií. Zdá se však, že příčinou tohoto rozdílu mohl být malý počet studovaných kmenů *X. bovienii* (9, a pouze 3 z *S. feltiae*).

Naopak, symbionti *S. affine* a sesterského druhu *S. poinari* tvoří monofyletickou skupinu, a koevoluční vztahy těchto asociací jsou vysoce průkazné. Příčinou specifity u těchto hlístic může být jejich speciální životní strategie. Tento komplex se pravděpodobně specializuje na konkurenci s jinými EPN a symbiont produkuje toxiny proti jiným bakteriím *X. bovienii* (Bashey, *et al.*, 2012) i proti jiným hlístovkám (Půža, *et al.*, 2013). Tyto skutečnosti tak patrně zvyšují těsnost vazby hlístovky na symbionta a brání také přeskoku symbionta na jinou hlístovku.

Pro vnitrodruhovou analýzu byla vybrána *S. feltiae*. Tato hlístovka má v rámci čeledi největší rozšíření, zahrnující všechny kontinenty kromě Antarktidy (Adams, *et al.*, 2006), a je považována za nejčastěji nalézáný druh. Bylo by tedy možné očekávat, že u tohoto druhu bude nejspíše možné pozorovat vnitrodruhovou fylogenetickou strukturu. Topologie stromů, vytvořených na základě tří mitochondriálních genů byly konsistentní, což ukazuje, že tyto geny je možné úspěšně použít k ilustraci vnitrodruhové variability u entomopatogenních hlístic.

U markerů pro hlístice 12S, *ND2* a *COX I* se vždy oddělovaly dva kmeny *S. feltiae* ALG3 a IFR. Bootstrap tohoto klastru byl kolem 55-90%, po vytvoření společného fylogramu byl 94%. Skutečnost, že tyto dva kmeny pocházející ze severovýchodní Afriky tvoří monofyletickou skupinu, představuje poměrně vzácný příklad fylogeografické shody u entomopatogenních hlístic. U těchto organismů je fylogenetická diverzita druhu a geografické rozšíření silně ovlivněno lidskou činností (Půža, *et al.*, 2016).

I když u markerů *gyrB* a *recA* nebyla potvrzena kongruence, přesto jsme je zahrnuli do další analýzy. Falešně negativní výsledek byl zřejmě způsoben nedostatečnou kvalitou sekvencí, získaných pomocí markeru *gyrB*. Jak již bylo výše zmíněno, tyto dva markery s největší pravděpodobností nepodléhají LGT, a proto byly spojeny v „konkatenovaný“ alignment, ze kterého byly rovněž zkonstruovány fylogramy. V nich se odděloval jeden klastř zahrnující symbionty *S. feltiae* EPN, ALG3 a Pt, s podporou bootstrap 99%. V tomto případě nebyla prokázána kongruence mezi fylogenezí hlístic a bakterií, a průkazný vztah nebyl nalezen ani u jediného páru *S. feltiae* – *X. bovienii*. Tento fakt dále potvrzuje výskyt přeskoků *X. bovienii* mezi různými hostiteli.

Sicard, *et al.*, (2004, 2006) v laboratorních pokusech zkoumali růst a rozmnožování entomopatogenních hlístic na symbiontech jiných druhů či kmenů hlístovek. Pokusy ukázaly, že v některých nepůvodních kombinacích dochází k růstu hlístic i rozmnožení, a tedy, že k přeskoku symbiontů rodu *Xenorhabdus* na nepříbuzné hostitele rodu *Steinernema* mohlo teoreticky docházet. Navíc se zdá, že i fylogenetická vzdálenost mezi původními a nepůvodními symbionty hraje klíčovou roli ve výsledné fitness. Tato skutečnost může vysvětlovat, proč nebyla v naší vnitrodruhové analýze nalezena žádná kongruence mezi liniemi *S. feltiae* a jejich symbiontů. Lze totiž předpokládat, že mezi blízkými příbuznými, vnitrodruhovými liniemi dochází k přeskokům častěji, než mezi jednotlivými druhy.

V současnosti jsou entomopatogenní hlístice hojně využívány jako biokontrolní pesticidy v zemědělství a zahradnictví, což může významně přispět k šíření těchto organismů na různá území. To zároveň zvyšuje pravděpodobnost výskytu hostitelských přeskoků („host switch“), který může nastat mezi hlísticemi a symbiotickou bakterií, pokud se vyskytují ve stejné oblasti.

Velice důležité je uvědomit si fakt, že výrazným faktorem, který může ovlivňovat výskyt kongruence ve fylogenetických studiích je kvalita a velikost taxonů zahrnutých do studie. Když budeme uvažovat omezený počet taxonů, může být kospeciace navržena pouze na základě rozložení zástupců z daného komplexu. Statistika kongruence může být falešně vyhodnocena při analýze více zástupců z daného komplexu. Naopak může dojít i k opačnému jevu, kdy pravděpodobnost vzniku kospeciace je velmi nízká z toho důvodu, že byly přidány další taxony do analýzy a to zejména v případech, kdy se objevuje hostitelský přeskok u taxonů, které jsou fylogeneticky vzdálené (Refregier, *et al.*, 2008). Chybné údaje mohou vznikat i na základě toho, že je v analýze zahrnuto příliš mnoho různých linií (Clark, *et al.*, 2000). Proto jsme se v této studii zaměřili především na použití multigenních datových souborů, jež by vedly ke zkvalitnění vytvořených fylogenetických stromů, které jsou nezbytné pro použití v kofylogenetické analýze.



## 6. Závěr

Cílem této práce bylo přispět k objasnění vztahů mezi entomopatogenními hlísticemi *Steinernema spp* a jejich symbiotickou bakterií rodu *Xenorhabdus*, pro jejíž fylogenetickou analýzu jsem otestovala dva markery (metoda MLST). Kofylogenetickou analýzu jsem provedla na dvou souborech, jednak větším (mezidruhovém) zahrnujícím 15 druhů rodu *Steinernema* (celkově 37 linií), jednak pak menším (vnitrodruhovém) zaměřeným na 12 geografických linií *S. feltiae*. Ve vícedruhovém souboru byla koevoluce celkově signifikantní, ale vazba mezi hlístovkou a symbiontem je silná pouze u některých hlístic ze skupiny „*affine*“. U ostatních druhů docházelo patrně často k přeskokům symbionta mezi hlísticemi. U vnitrodruhového souboru byla kospeciace neprůkazná, což dále potvrdilo výskyt přeskoků *X. bovienii* mezi různými hlísticemi.

Budoucí práce, týkající se kospeciace v komplexu *Steinernema – Xenorhabdus*, by se měla zaměřit na zlepšení a rozšíření fylogenezí použitých v analýze, zohlednění geografických údajů, a zjištění příčin interakcí mezi hostitelem a jeho symbiontem a míru specifičnosti v tomto komplexu.

## 7. Literatura

- 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., FODOR, A., KOPPENHÖFER, H. S., STACKEBRANDT, E., STOCK, S. P., KLEIN, M. G. (2006). Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biol. Control*. 37, 32–49.
- AGUILLERA, M. M., SMART, G. C. (1993). Development, Reproduction, and Pathogenicity of *Steinernema scapterisci* in Monoxenic Culture with Different Species of bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* 62, 289–294.
- ACHTMAN, M., ZURTH, K., MORELLI, G., TORREA, G., GUIYOULE, A., CARNIEL, E. (1999). *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96, 14043–14048.
- AKHURST, R. J. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.* 121, 303–309.
- AKHURST, R., J. (1982). Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *J. Gen. Microbiol.* 128, 3061–3065.
- AKHURST, R. J. (1986). *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *poinarii*: ITS interaction with insect pathogenic nematodes. *Syst. Appl. Mikrobiol.* 8, 142–147.
- AKHURST, R. J., BOEMARE, N. E. (1988). A numerical taxonomy study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. Nematophilus* to species. *J. Gen. Microbiol.* 134, 1835.
- AKHURST, R., J., BOEMARE, N., E. (1990). Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler R., Kaya H. K. (Eds.), *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 75–90.
- AKHURST, R. J., BOEMARE, N. E., JANSSEN, P. H., PEEL, M. M., ALFREDSON, D. A., BEARD, C. E. (2004). Taxonomy of Australian clinical isolates of the genus *Photorhabdus* and proposal of subspecies *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *asymbiotica* subsp. nov. and *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *australis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54,1301–1310.

- AMANN R., GLÖCKNER F-O., NEEF, A. (1997). Modern methods in surface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *Microbiol. Rev.* 20, 191–200.
- ALMEIDA, N. F., YAN, S., CAI, R., CLARKE, C. R., MORRI, C. E., SCHAAD, N. W., SCHUENZEL, E. L., LACY, G. H., SUN, X., JONES, J. B., CASTILLO, J. A., BULL, C. T., LEMAN, S., GUTTMAN, D. S., SETUBAL, J. C., VINATZER, B. A. (2010). PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*. 100, 208–215.
- BALBUENA, J. A, MÍGUEZ-LOZANO, R, BLASCO-COSTA, I. (2013). PACo: A Novel Procrustes Application to Cophylogenetic Analysis. *PLoS ONE* 8(4).
- BANKS, J. C., PATERSON, A. M. (2005). Multi-host parasite species in cophylogenetic studies. *Int. J. Parasitol.* 35, pp. 741–746.
- BASHEY, F., YOUNG, S. K., HAWLENA, H., LIVELY, C. M. (2012). Spiteful interactions between sympatric natural isolates of *Xenorhabdus bovienii* benefit kin and reduce virulence. *J. Evol. Biol.* 25, 431–437.
- BATHON, H. (1996). Impact of entomopathogenic nematodes on non-target hosts. *Biocontrol. Sci. Techn.* 6, 421–434.
- 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.
- BLACKBURN, D., WOOD, P. L. Jr., BURK, T. J., CRAWFORD, B., WRIGHT, S. M., ADAMS, B. J. (2016). Evolution of virulence in *Photorhabdus* spp., entomopathogenic nematode symbionts. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 173–179.
- BLAXTER, M. L., DE, LEY, P., GAREY, J. R., LIU, L. X., SCHELDEMAN, P., VIERSTRAETE, A., VANFLETEREN, J. R., MACKKEY, 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.
- BLAXTER, M., KOUTSOVOULOS, G. (2015). The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*, 142 (S1), 26–39.

- BOEMARE, 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.
- BOEMARE, N. E. (2002). Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In R. Gaugler, ed. *Entomopathogenic Nematology*. pp. 35–56.
- BONGERS, T., FERRIS, H. (1999). Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Tree*. 14, 224–228.
- BROOKS, D. R. (1979). "Testing the context and extent of host-parasite coevolution." *Syst. Biol.* 28. 3. 299–307.
- BURMAN, M. (1982). *Neoplectana carpocapsae*: Toxin production by axenic insect parasitic nematodes. *Nematologica*. 28, 62–70.
- CAMPBELL, J. F., KAYA, H. K. (1999). Mechanism, kinematic performance, and fitness consequences of jumping behavior in entomopathogenic nematodes (*Steinernema spp.*). *Can. J. Zool.* 77, 1947–1955.
- CAMPBELL, V., LEGENDRE, P., LAPOINTE F. J. (2009). Assessing Congruence Among Ultrametric Distance Matrices. *J. Classif.* 26, 103–117.
- CAMPOS-HERRERA, R., BARBERCHEC, M., HOY, C., W., STOCK, S., P. (2012). Entomopathogenic nematodes as a model system for advancing the frontiers of ecology. *J. Nematol.* 44, 162–176.
- CICHE, T., A., KIM, K., S., KAUFMANN-DASZCZU, B., NGUYEN, K., C., HALL, D., H. (2008). Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *Appl. Environ. Mikrob.* 74, 2275–2287.
- CLAYTON, D. H., BUSH S. E., JOHNSON, K. P. (2004). Ecology of congruence: Past meets present. *Syst. Biol.* 53, 165–173.
- CLARK, M. A., MORAN, N. A., BAUMANN, P., WERNEGREN, J. J. (2000). Cospeciation between bacterial endosymbionts (*Buchnera*) and a recent radiation of aphids (*Uroleucon*) and pitfalls of testing for phylogenetic congruence. *Evolution.* 54, 517–525.
- CLARKE, S. C., DIGGLE, M. A., EDWARDS, G. F. (2001). Semiautomation of multilocus sequence typing for the characterization of clinical isolates of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3066–3071.

- CLARKE, S. C. (2002). Nucleotide sequence-based Typing of bacteria and the impact of automation. *Bioessays*. 24, 858–862.
- CONOW, C., FIELDER, D., OVADIA, Y., LIBESKIND-HADAS, R. (2010). Jane: a new tool for the cophylogeny reconstruction problem. *Algorithms for Molecular Biology*. 5, 16.
- COX, A. J., HEBERT, P. D. N. (2001). Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Mol. Ecol.* 10, 331–386.
- CROLL, N. A., MATTHEWS, B. E. (1977). *Biology of Nematodes*. Blackie, Glasgow, chap.4.
- CURTIS, T. P., SLOAN, W. T., SCANNELL, J. W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and ITS limITS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99, 10494–10499.
- CURTIS, T. P., SLOAN, W. T. (2004). Prokaryotic diversity and ITS limITS: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 221–226.
- DEWHIRST, F. E., SHEN, Z., SCIMECA, M. S., STOKES, L. N., BOUMWUNNA, T., CHEN, T., PASTER, B. J., FOX, J. G. (2005). Discordant 16S and 23S rRNA gene phylogenies for the genus *Helicobacter*: implications for phylogenetic inference and systematics. *J. Bacteriol.* 187, 6106–6118.
- 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. *J. Forensic. Sci.* 47 (4), 811–818.
- EASOM, C. A., JOYCE, S. A., CLARKE, D. J. (2010). Identification of genes involved in the mutualistic colonization of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* by the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *BMC Microbiology*. 10 (45).
- EHLERS, R. U., WULFF, A., PETER, A. (1997). Pathogenicity of axenic *S. feltiae*, *X. biovienii*, and the bacto-helminthic complex to larvae of *Tipula oleraceae* and *G. mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 69, 212–217.
- EIDTH, 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.
- EISEN, J. A. (1995). The *recA* protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of *recAs* and 16S rRNAs from the same species. *J. Mol. Evol.* 41, 1105–1123.

- ENRIGHT, M. C., SPRATT, B. G. (1999). Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* 7, 482–487.
- FAKTOROVÁ, L. (2014). Molekulární markery pro druhovou identifikaci entomopatogenních hlístic (Nematoda: *Steinernematidae*). Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita. pp 58.
- FEIL, E. J. (2004). Small change: keeping pace with microevolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 483–495.
- FISCHER-LE SAUX, M., VIALARD, V., BRUNEL, B., NORMAND, P., BOEMARE, N. E. (1999). Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens sub sp. luminescens sub sp. nov.*, *P. luminescens sub sp. akhurstii sub sp. nov.*, *P. luminescens sub sp. laumondii sub sp. nov.*, *P. temperata sp. nov.*, *P. temperata sub sp. temperata sub sp. nov.*, and *P. asymbiotica sp. nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1645–1656.
- FORST, S., CLARKE, D. (2002). Bacteria – nematode symbiosis. In: R. Gaugler (Ed), *Entomopathogenic nematology*, CABI publishing, Wallingford, Oxon, UK. p. 57–77.
- FOX, G. E., STACKEBRANDT, E., HESPELL, R. B., GIBSON, J., MANILOFF, J., DYER, T. A., WOLFE, R. S., BALCH, W. E., TANNER, R. S., MAGRUM, L. J., ZABLEN, L. B., BLAKEMORE, R., GUPTA, R., BONEN, L., LEWIS, B. J., STAHL, D. A., LUE-HRSEN K. R., CHEN, K. N., WOESE, C. R. (1980). *Science.* 209, 457.
- FRATI, 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.
- FUNK, D., J., HELBLING, L., WERNEGREN, J., J., MORAN, N., A. (2000). Intraspecific phylogenetic congruence among multiple symbiont genomes. *Proceedings of the Royal Society Series B. Biological Science.* 267, 2517–2521.
- GAUGLER, R. (1988). Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agr. Ecosyst. Environ.* 24, 351–360.
- 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.

- GEORGIS, R. (2002). The biosys experiment: an insider's perspective. In: R. Gaugler (Ed), *Entomopathogenic nematology*. CABI publishing, Wallingford, Oxon, UK. pp. 357–372.
- GRIFFIN, C. T., BOEMARE, N. E., LEWIS, E. E. (2005). Biology and Behaviour. In: GREWAL, P. S., EHLERS, R. -U., SHAPIRO-ILAN, D. I. (Eds), *Nematodes as Biocontrol Agents*, CAB International, Wallingford, UK. pp. 47–64.
- HAN, R. C., EHLERS, R. -U. (2000). Pathogenicity, development and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic in vivo conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 55–58.
- HANNULA, M. a HANNINEN, M-L. (2007). Phylogenetic analysis of *Helicobacter* species based on partial *gyrB* gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 444–449.
- HURYCHOVÁ, J. (2016). Studium patogenity entomopatogenních hlístic. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita. pp 54.
- HYRŠL, P. (2012). Biologická ochrana rostlin pomocí entomopatogenních hlístic a testování její účinnosti. Dostupné na <http://www.chempoint.cz/biologicka-ochrana-rostlin-pomoci-entomopatogennich-hlistic-a-testovani-jeji-ucinnosti>.
- CHAN, M. S., MAIDEN, M. C., SPRATT, B. G. (2001). Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics.* 17, 1077–1083.
- CHEN, G., DUNPHY, G., B., WEBSTER, J., M. (1994). Antimycotic activity of two *Xenorhadus* species and *Photorhabdus luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabditis megidis*. *Biol. Control.* 4, 339–348.
- CHITWOOD, B. G., (1937). A revised classification of the Nematoda. In Papers on helminthology, 30 year jubileum K. J. Skrjabin, edited by Anon. Moscow: *All-Union Lenin Academy of Agricultural Sciences*. pp. 67–79.
- ISHIBASHI, N., KONDO, E. (1990). Behavior of infective Juveniles. In: GAUGLER, R., KAYA, H. K. (Eds), *Entomopathogenic nematodes in Biol. Control*. CRC Press, Inc., Boca Raton. Florida, p. 139–150.
- JAIN, R., RIVERA, M. C., LAKE, J. A. (1999). Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 3801–3806.
- JEFFERIES, J., CLARKE, S. C., DIGGLE, M. A., SMITH, A., DOWSON, C., MITCHELL, T. (2003). Automated pneumococcal MLST using liquid- handling robotice and a capillary DNA sequencer. *Mol. Biotechnol.* 24, 303–308.

- JOHNSON, K. P., ADAMS, R. J., PAGE, R. D. M., CLAYTON, D. H. (2003). When do parasites fail to speciate in response to host speciation? *Syst. Biol.* 52, 37–47.
- JOLLEY, K. A., FEIL, E. J., CHAN, M. S., MAIDEN, M. C. (2001). Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics.* 17, 1230–1231.
- JOLLEY, K. A., CHAN, M. S., MAIDEN, M. C. (2004). mlstDbNet-distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics.* 5, 86.
- KAWAKITA, A., TAKIMURA, A., TERACHI, T., SOTA, T., KATO, M. (2004). Cospeciation analysis of an obligate pollination mutualism: have Glochidion trees (Euphorbiaceae) and pollinating *Epicephala* moths (Gracillariidae) diversified in parallel? *Evolution.* 58, 2201–2214.
- LAUMOND, C., MAULEON, H., KERMARREC, A. (1979). Données nouvelles sur le spectre d'hotes et le parasitisme du nématode entomophage *Neoplectana carpocapsae*. *Entomophaga.* 24, 13–27.
- LEE, M. M., STOCK, S. P. (2010). A multilocus approach to assessing co-evolutionary relationships between *Steinernema spp.* (Nematoda: Steinernematidae) and their bacterial symbionts *Xenorhabdus spp.* (c-Proteobacteria: Enterobacteriaceae). *Syst. Parasitol.* 77, 1–12.
- LEGENDRE, P., DESDEVISES, Y., BAZIN, E. (2002). A statistical test for host-parasite coevolution. *Syst. Biol.* 51, 217–234.
- LIBRADO, P., ROZAS, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25, 1451–1452.
- LIU, L., HUANG, X., ZHANG, R., JIANG, L., QIAO, G. (2013). Phylogenetic congruence between *Mollitrichosiphum* (Aphididae: Greenideinae) and *Buchnera* indicates insect – bacteria parallel evolution. *Syst. Entomol.* 38, 81–92.
- MAGGENTI, A. R. (1981). *General nematology*. Springer-Verlag. New York, 372 pp.
- MAIDEN, M. C., BYGRAVES, J. A., FEIL, E., MORELLI, G., RUSSELL, J. E., URWIN, R., ZHANG, Q., ZHOU, J., ZURTH, K., CAUGANT, D. A., FEAVERS, I. M., ACHTMAN, M., SPRATT, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 3140–3145.
- MAIDEN, M. C. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 60, 561–588.



- MANEESAKORN, P., AN, R., DANESHVAR, H., TAYLOR, K., BAI, X., ADAMS, B. J., GREWAL, P. S., CHANDRAPATYA, A. (2011). Phylogenetic and cophylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis*: Rhabditida) and their symbiotic bacteria (*Photorhabdus*: Enterobacteriaceae) *Mol. Phylogenet. Evol.* 59, 271–280.
- MENDLOVÁ, M. (2013). Koevoluce a kodiverzifikace hostitelsko-parazitického systému Cichlidae- Monogenea (Doctoral thesis). Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Masaryk university. Faculty of Science.
- MRÁČEK, Z., HANZAL, R., KODRÍK, D. (1988). Sites of penetration of juvenile Steinernematids and Heterorhabditids (Nematoda) into larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol.* 52, 477–478.
- MURFIN, K. E., LEE, M. M., KLASSEN, J. L., MCDONALD B. R., LARGET, B., FORST, S., STOCK, S. P., CURRIE, C. R., GOODRICH-BLAIR, H. (2015). *Xenorhabdus bovienii* strain diversity impacts coevolution and symbiotic maintenance with *Steinernema* spp. nematode hosts. *MBio*, 6, e00076–15.
- NADLER, S. A., BOLOTIN, E., STOCK, S. P. (2006). Phylogenetic relationships of *Steinernema Travassos*, 1927 (Nematoda: Cephalobina: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data. *Syst. Parasitol.* 63 (3), 159–179.
- NERMUŤ, J., PŮŽA, V., MRÁČEK, Z. (2012). Entomopathogenic and molluscoparasitic nematodes – the Invisible Soil Killers. *Živa* 1/2012, 10.
- NGUYEN, K. B., SMART, G. C. (1994). *Neosteinerinema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). *J. Nematol.* 26, 162–174.
- NIEBERDING, C. M., DURATTE-DESSET, M. C., VANDERPOORTEN, A., CASANOVA, J. C., RIBAS, A., DEFFONTAINE, V., FELIU, C., MORAND, S., LIBOIS, R., MICHAUX, J. R. (2008). Geography and host biogeography matter for understanding the phylogeography of a parasite. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 538–554.
- OLIVE, M. D., BEAN, P. (1999). Minireview: Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organism. *J. Clin. Mikrobiol.* 37 (6), 1661–1669.
- OLSEN, G. J., LANE, D. J., GIOVANNONI, S. J., PACE, N. R., STALH, D. A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.* 40, 337–365.

- PAGE, R. D. M., (1994). Parallel Phylogenies: Reconstructing the History of Host-Parasite Assemblages. *Cladistics*. 10, 155–173.
- PAGE, R., D., M., CHARLESTON, M., A. (1998). Trees within trees: phylogeny and historical associations. *Trends. Ecol. Evol.* 13, 356–359.
- PAGE, R. D. M. (2003). Tangled Trees: Phylogeny, Cospeciation, and Coevolution. University of Chicago Press.
- PARKINSON, N., ARITUA, V., HEENEY, J., COWIE, C., BEW, J. a STEAD, D. (2007). Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2881–2887.
- PATERSON, A. M., BANKS, J. (2001). Analytical approaches to measuring cospeciation of host and parasites: through a glass, darkly. *Int. J. Parasitol.* 31, 1012–1022.
- PECCOUD, J., SIMON, J., C., MCLAUGHLIN, H., J., MORAN, N., A. (2009). Post-Pleistocene radiation of the pea aphid complex revealed by rapidly evolving endosymbionts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 106, 16315–16320.
- PETERS, A., EHLERS, R. -U. (1994). Susceptibility of leather jackets (*Tipula paludosa* and *Tipula oleracea*; Tipulidae: Nematocera) to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *J. Invertebr. Pathol.* 63, 163–171.
- 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. (1974). Insect immunity to parasitic nematodes. In: COOPER, E. L. (Ed.) Contemporary topics in immunobiology. 4, 167–178.
- POINAR, G. O., JR. (1976). Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. fam.). *Nematologica*. 21, 463–470.
- POINAR, G. O., JR., (1979). Nematodes for Biol. 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.
- PŮŽA, V., MRÁČEK, Z. (2009). Mixed infection of *Galleria mellonella* with two entomopathogenic nematode (Nematoda: Rhabditida) species: *Steinernema affine* benefits from the presence of *Steinernema kraussei*. *J. Invertebr. Pathol.* 102, 40–43.
- PŮŽA, V., MRÁČEK, Z. (2010). Does scavenging extend the host range of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae)? *J. Invertebr. Pathol.* 104, 1–3.
- PŮŽA, V., NERMUŤ, J., MRÁČEK, Z. (2013). The role of bacterial symbionts in the competition of entomopathogenic nematode species, IOBC-WPRS *Bulletin.* 90, 273–276.
- PŮŽA, V., CHUNDELOVÁ, D., NERMUŤ, J., ŽUROVCOVÁ, M., MRÁČEK, Z. (2015). Intraindividual variability of *ITS* region in entomopathogenic nematodes (Steinernematidae: Nematoda): implications for their taxonomy. *Biocontrol.* 60, 547–554.
- PŮŽA, V., MRÁČEK, Z., NERMUŤ, J. (2016). Novelty in Pest Control by Entomopathogenic and Mollusc-Parasitic Nematodes. In: Dr. Harsimran Gill (Ed.), Integrated Pest Management (IPM): *Environmentally Sound Pest Management. In Tech.* 71–102.
- RAPPE, M. S., GIOVANNONI, S. J. (2003). The uncultured majority. *Annul. Rev. Microbiol.* 57, 369–394.
- RATCLIFFE, N. O. (1982). Cellular defense reactions of insects. In: Immune reactions to parasites. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York. p. 223–244.
- REFREGIER, G., LE GAC, M., JABBOUR, F., WIDMER, A., SHYKOFF, J. A., YOCKTENG, R., HOOD, M., GIRAUD, T. (2008). Cophylogeny of the anther smut fungi and their Caryophyllaceae hosts: prevalence of host shifts and importance of delimiting parasite species for inferring cospeciation. *BMC Evol. Biol.* 8, 100.
- RONQUIST, F. (1995). Reconstructing the history of host-parasite associations using generalised parsimony. *Cladistics.* 11, 73–89.

- 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 für Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz*. 67, 97–100.
- SANDSTRÖM, J. P., RUSSEL, J. A., WHITE, J. P., MORAN, N. A. (2001). Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Mol. Ecol.* 10, 217–228.
- SERGEANT, M., BAXTER, L., JARRETT, P., SHAW, E., OUSLEY, M., WINSTANLEY, C., MORGAN, J. A. W. (2006). Identification, typing, and insecticidal activity of *Xenorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in United Kingdom soil and characterization of the xpt toxin loci. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5895–5907.
- SICARD, M., LE BRUN, N., PAGÉS, S., GODELLE, B., BOEMARE, N., MOULIA, C. (2003). Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interaction. *Parasitol. Res.* 91, 520–524.
- SICARD, M., FERDY, J. B., PAGE, S., LE BURN, N., GODELLE, B., BOEMARE, N., MOULIA, C. (2004). When mutualists are pathogens: an experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria). *J. Evol. Biol.* 17, 985–993.
- SICARD, M., HINSINGER, J., LE BURN, N., PAGE, S., BOEMARE, N., MOULIA, C. (2006). Interspecific competition between entomopathogenic nematodes (*Steinernema*) is modified by their bacterial symbionts (*Xenorhabdus*). *BMC Evol. Biol.* 6, 68–78.
- SNYDER, H., STOCK, S. P., KIM, S. K., FLORES-LARA, Y., FORST, S. (2007). New insights into the colonization and release processes of *Xenorhabdus nematophila* and the morphology and ultrastructure of the bacterial receptacle of ITS nematode host, *Steinernema carpocapsae*. *Applied Environmental Mikrobiology*. 73, 5338–5346.
- SPIRIDONOV, S. E., KRASOMIL-OSTERFELD, K., MOENS, M. (2004). *Steinernema jollieti* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from the American Midwest. *Russ. J. Nematol.* 12, 85–95.

- SPIRIDONOV, S. E., WAEYENBERGE, L., MOENS, M. (2010). *Steinernema schliemanni* sp. n. (Steinernematidae; Rhabditida) - New species of steinernematids of the „monticolum“ group from Europe. *Russ. J. Nematol.* 18 (2), 175.
- SREEVATSAN, S., PAN, X., STOCKBAUER, K. E., CONNELL, N. D., KREISWIRTH, B. N., WHITTAM, T. S., MUSSER, J. M. (1997). Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 9869–9874.
- TAILLIEZ, P., PAGES, S., GINIBRE, N., BOEMARE, N. (2006). New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 56(12), 2805–2818.
- TAILLIEZ, P., LAROUI, C., GINIBRE, N., PAULE, A., PAGES, S., BOEMARE, N. (2010). Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 60, 1921–1937.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- THOMPSON, J. N. (1989). Concepts of coevolution. *Trends Ecol. Evol.* 4, 179-183.
- THOMPSON, C. C., THOMPSON, F. L., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., DAWYNDT, P., SWINGS, J. (2004). Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 919–924.
- 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.
- TORSVIK, V., OVREAS, L., THINGSTAD, T. F. (2002). Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science.* 296, 1064–1066.

- TRAVASSOS, L. (1927). Sobre o Genera Oxystomatium. Biletim Biologico. Trabalho do Laboratorio de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Sao Paulo. Brasil. 5 (28), 20–21.
- URWIN, R., MAIDEN, M. C. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 11, 479–487.
- VRAIN, T. C., WAKARCHUK, D. A., LEVESQUE, A. C., HAMILTON, R. I. (1992). Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fund. Appl. Nematol.* 15, 563–573.
- WALLACE, H. R., DONCASTER, C. C. (1964). A comparative study of the movement of some microphagous, plant parasitic and animal parasitic nematodes. *Parasitology.* 54, 313.
- WANG, Y. I., GAUGLER, R. (1999). *Steinernema glaseri* surface coat protein suppress immune response of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *Biolog. Control.* 14, 45–50.
- WANG, Y., ZHANG, Z. (2000). Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. *Microbiology.* 146, 2845–2854.
- WANG, L-T., LEE, F-L., TAI, C-J., KASAI, H. (2007). Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1846–1850.
- WARRINGTON, J. A., NAIR, A., MAHADEVAPPA, M., TSYGANSKAYA, M. (2000). Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol. Genomics.* 2, 143–7.
- WEISER, J., MRÁČEK, Z. (1988). Parazitické hlístice hmyzu. *Academia.* Praha. 258 pp.
- WERNEGREEN, J., J., RILEY, M., A. (1999). Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16, 98–113.
- WOESE, C. R., Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5088–5090.
- WOESE, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221–271.
- YAP, W. H., ZHANG, Z., WANG, Y. (1999). Distinct Types of rRNA Operons Exist in the Genome of the Actinomycete *Thermomonospora chromogena* and Evidence for Horizontal Transfer of an Entire rRNA Operon. *J. Bacteriol.* 181 (17), 5201–5209.

- ZAIDI, N., KONSTANTINOU, K., ZERVOS, M. (2003). The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Molecular Methods in Human Infections*. 127, 1098–1105.
- 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.
- ZUCKERKANDL, E., PAULING, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8, 357–366.

**Internetové zdroje:**

<http://www.chempoint.cz>

<http://www.mlst.net>

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

<https://www.r-project.org>

## 8. Přílohy

**Příloha 1: Přehled všech aplikovaných primerů pro hlístice.**

Gen	Primer	Typ	Sekvence primeru 5' -> 3'	Publikováno
<b>12S rDNA</b>	505	F	GTTCCAGAATAATCGGCTAGAC	Nadler, <i>et al.</i> , 2006
	506	R	TCTACTTTACTACAACCTACTCCCC	Nadler, <i>et al.</i> , 2006
<b>COX I</b>	507	F	AGTTCTAATCATAA(A/G)GATAT(C/T)GG *	Nadler, <i>et al.</i> , 2006
	588	R	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Nadler, <i>et al.</i> , 2006
<b>ND2</b>	ND2For1	F	AAT ATT CTT GTT TGA TGG AGT GGT	Žurovcová, <i>et al.</i> , 2012
	ND2Rev1	R	AAA AAG TAA AAG TAA AAG GTA T	Žurovcová, <i>et al.</i> , 2012
	ATP6F	F	ATYCAAAGTTATATTTTTTCYCG	Žurovcová, <i>et al.</i> , 2016
<b>ITS</b>	18S	F	TTGATTACGTCCTGCCCTTT	Vrain, <i>et al.</i> , 1992
	28S	R	TTTCACTCGCCGTTACTAAGG	Vrain, <i>et al.</i> , 1992

\*AGTTCTAATCATAA**R**GATAT**Y**GG

**Příloha 2: Přehled všech aplikovaných primerů pro symbiotické bakterie.**

Gen	Primer	Typ	Sekvence primeru 5' -> 3'	Publikováno
<b>16S</b>	10f	F	AGTTTGATCATGGCTCAGATTG	Sandström, <i>et al.</i> , 2001
	1507r	R	TACCTTGTTACGACTTCACCCAG	Sandström, <i>et al.</i> , 2001
<b>recA</b>	recA1F	F	GCTATTGATGAAAATAAACA	Tailliez, <i>et al.</i> , 2010
	recA2R	R	RATTTTRTCWCCRTTRTAGCT	Tailliez, <i>et al.</i> , 2010
<b>gyrB</b>	1200F <i>gyrB</i>	F	GATAACTCTTATAAAGTTTCCG	Tailliez, <i>et al.</i> , 2010
	1200R <i>gyrB</i>	R	CGGGTTGTATTTCGTCACGGCC	Tailliez, <i>et al.</i> , 2010
	8SF <i>gyrB</i>	F	TACACGAAGAAGAAGGTGTTTCAG	Tailliez, <i>et al.</i> , 2010
	9Rev <i>gyrB</i>	R	TACTCATCCATTGCTTCATCATCT	Tailliez, <i>et al.</i> , 2010

**Příloha 3: PCR profily pro hlístice.**

	<b>12S rDNA 505/506</b>		<b>COX I 507/588</b>		<b>ITS 18S/28S</b>	
	Teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)
1. predenaturace	94	180	94	180	94	420
2. denaturace	94	30	94	60	94	60
3. annealing	50	30	40	60	50	60
4. elongace	72	45	72	60	72	60
5. závěrečná elongace	72	420	72	420	72	600
6. uchovávání	4	∞	4	∞	4	∞
Opakování kroků 2-4	37x		36x		35x	



**Příloha 4: PCR profily pro hlístice.**

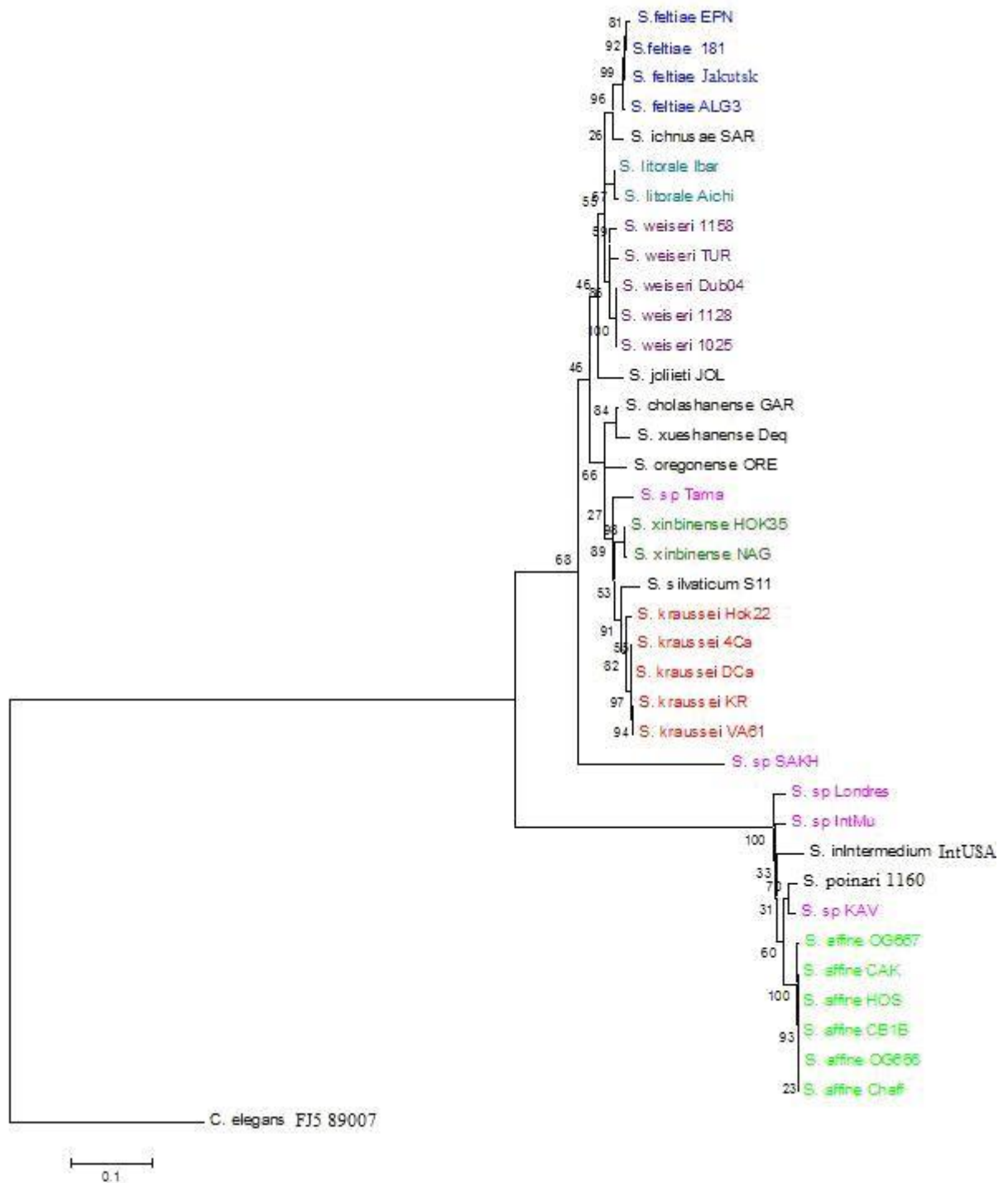
	<b>ND2 For1/Rev1</b>	
	teplota (°C)	doba (s)
1. predenaturace	94	120
2. denaturace	94	60
3. annealing	54	30
4. elongace	68	45
5. závěrečná elongace	68	120
6. uchovávání	4	∞
Opakování kroků 2-4	35x	

**Příloha 5: PRC profily pro bakterie.**

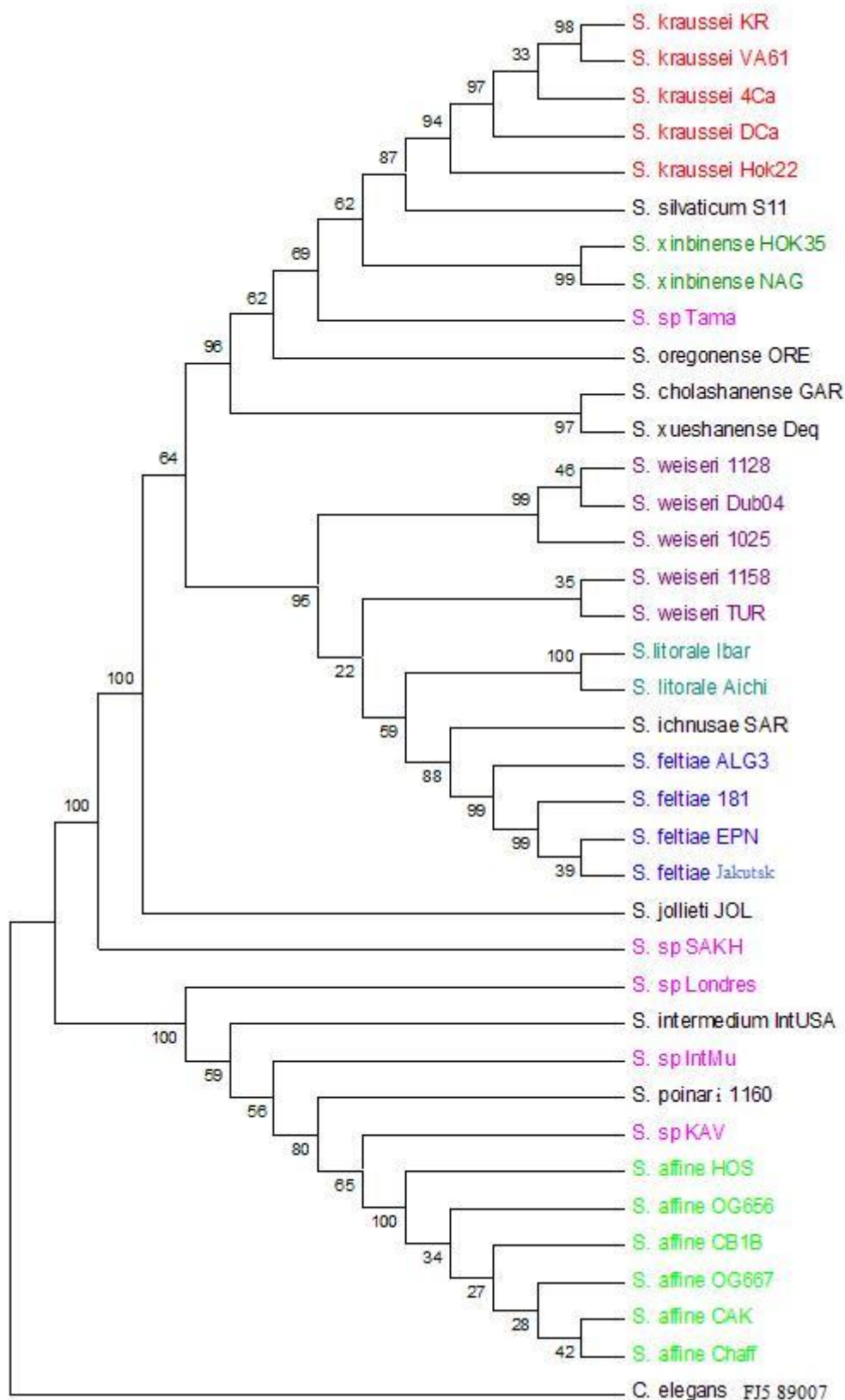
	<b>16S 10f/1507r</b>		<b>recA recA1F/recA2R</b>		<b>gyrB 1200F/1200R</b>	
	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	Doba (s)	teplota (°C)	doba (s)
1. predenaturace	94	60	94	120	94	120
2. denaturace	94	60	94	30	94	30
3. annealing	55	60	49,5	35	56,5	35
4. elongace	72	120	72	60	72	60
5. závěrečná elongace	72	180	72	120	72	120
6. uchovávání	4	∞	4	∞	4	∞
Opakování kroků 2-4	35x		35x		35x	

**Příloha 6: PRC profily pro bakterie.**

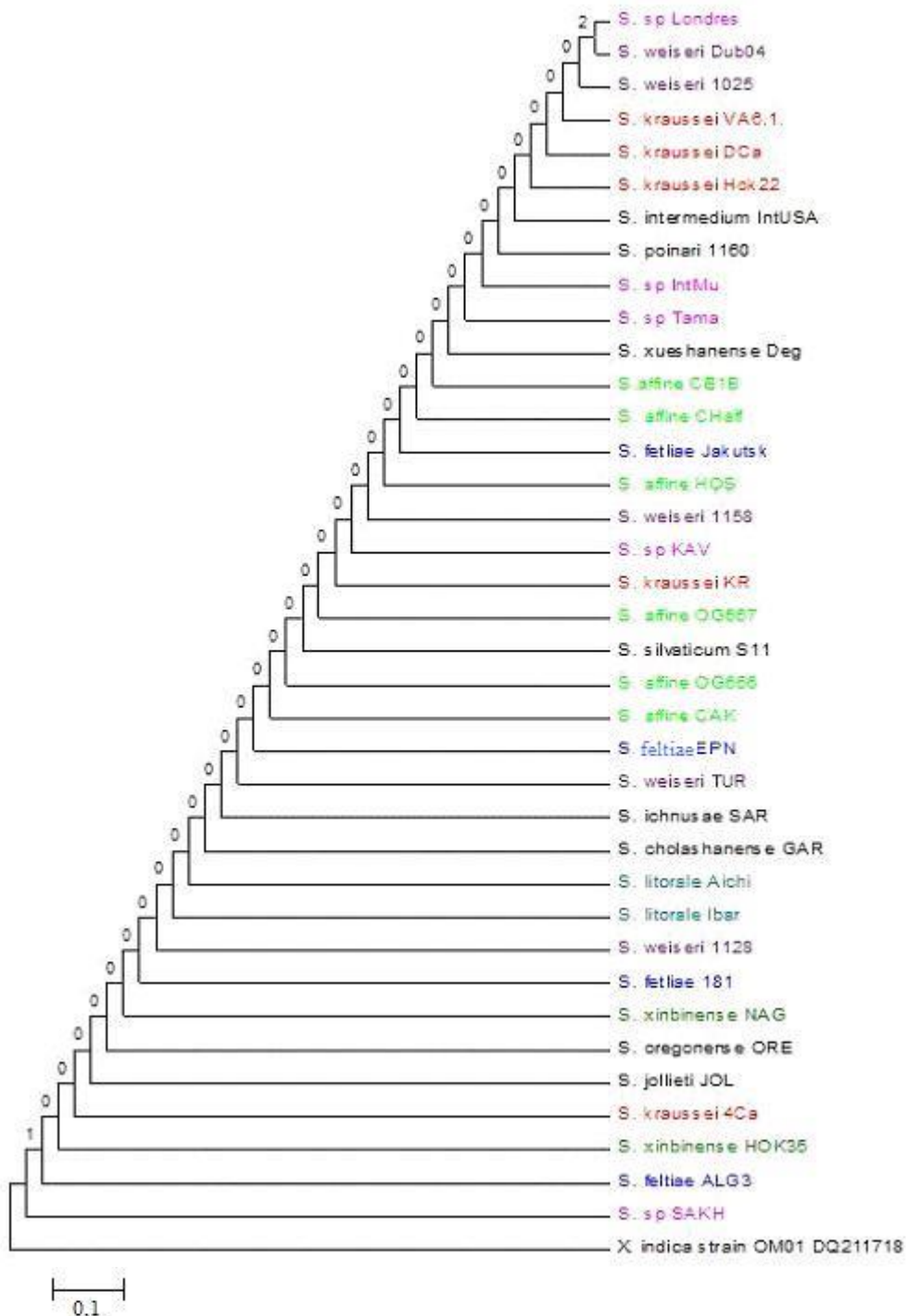
	<b>gyrB 8SF/9rev</b>	
	teplota (°C)	doba (s)
1. predenaturace	94	120
2. denaturace	94	30
3. annealing	66	35
4. elongace	72	60
5. závěrečná elongace	72	120
6. uchovávání	4	∞
opakování kroků 2-4	35x	



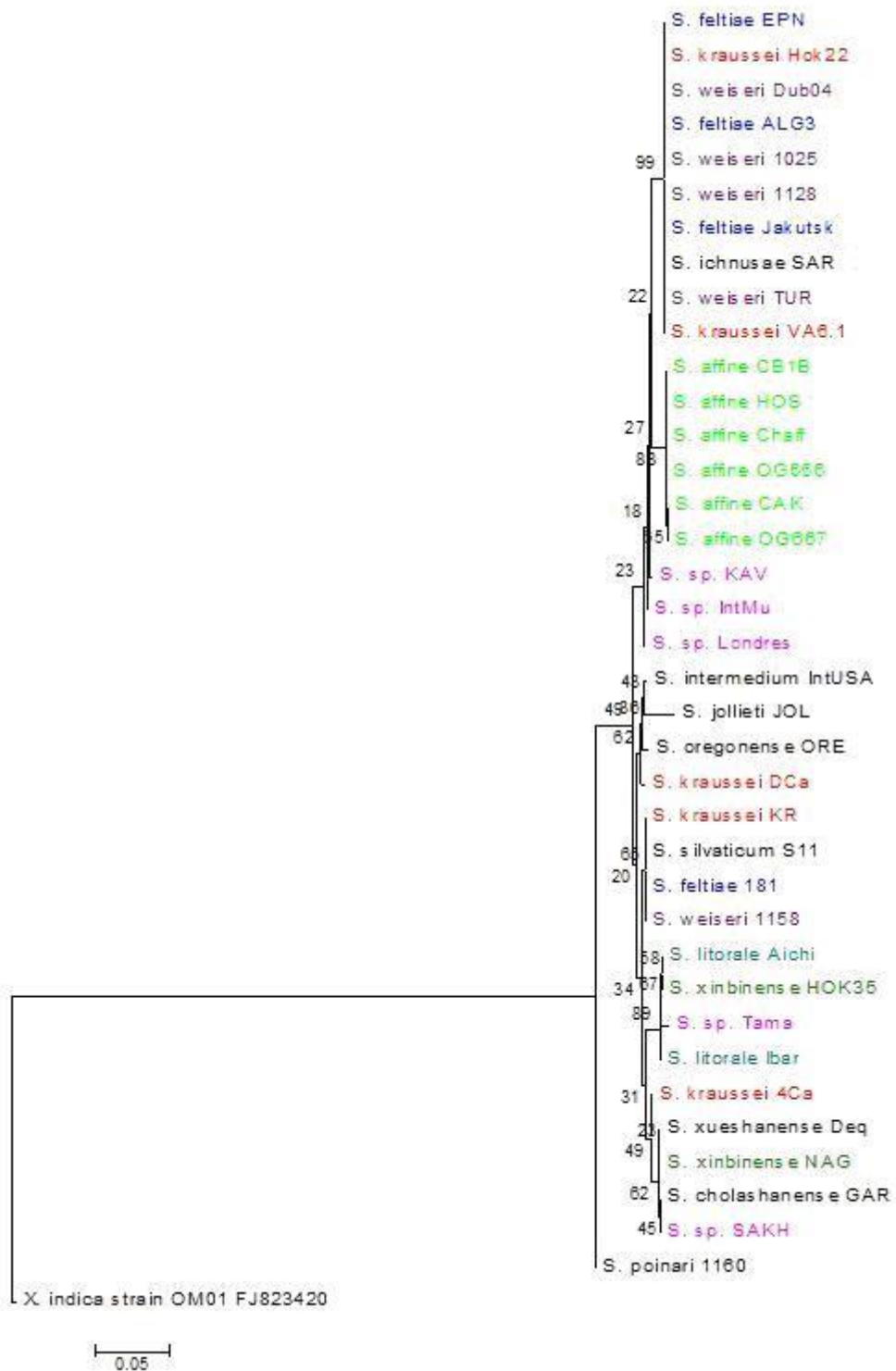
**Příloha 7: Fylogram *ITS* (Neighbor – Joining, Tamura – Nei model, Pairwise deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *C. elegans*. Jednotlivé druhy jsou odděleny barevně. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



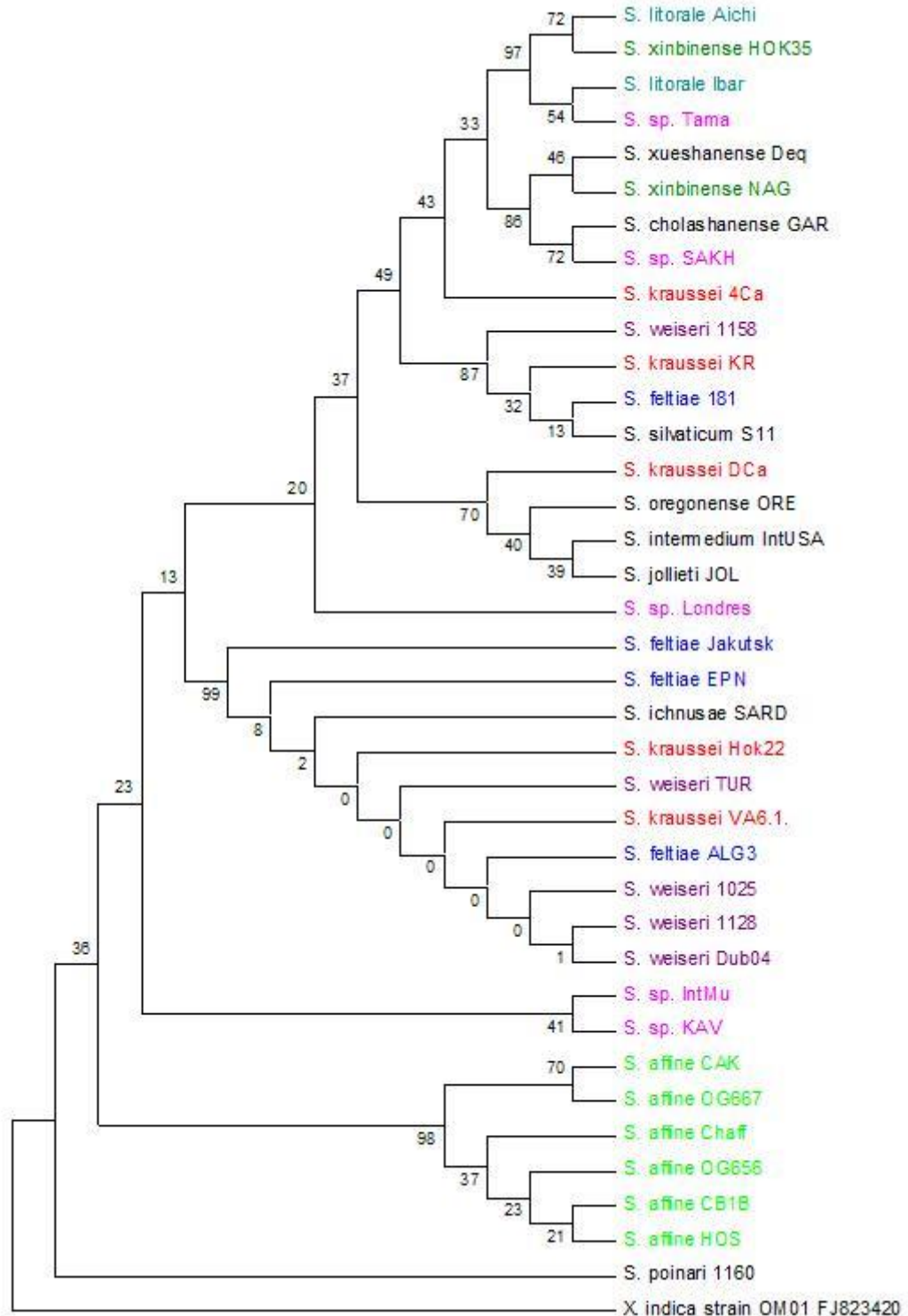
**Příloha 8: Fylogram *ITS* (Maximum Parsimony, Tamura – Nei model, Use all sites, Bootstrap 1000), zakořeněný *C. elegans*. Jednotlivé druhy jsou odděleny barevně. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



**Příloha 9: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 37mi kmenů rodu *Steinernema* s použitím markeru 16S (Neighbor – Joining, Jukes – Cantor, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů; jednotlivé hostitelské druhy jsou odděleny barevně. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



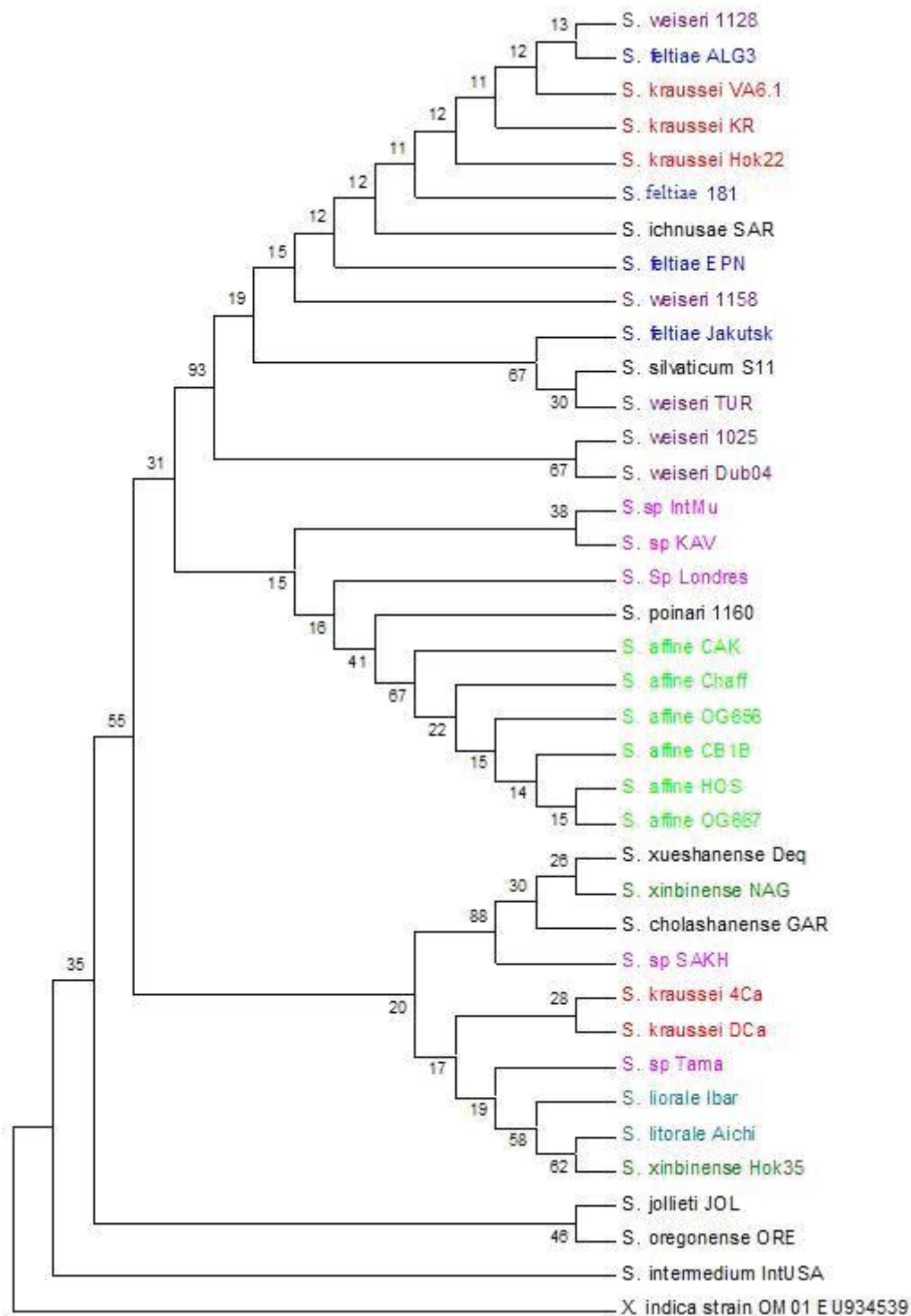
**Příloha 10: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 37mi kmenů rodu *Steinernema* s použitím markeru *recA* (Neighbor – Joining, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů; jednotlivé hostitelské druhy jsou odděleny barevně. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



**Příloha 11: Fylogram symbiotických bakterií - linií *X. bovienii*, izolovaných ze 37mi kmenů rodu *Steinernema* s použitím markeru *recA* (Maximum Parsimony, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů; jednotlivé hostitelské druhy jsou odděleny barevně. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**

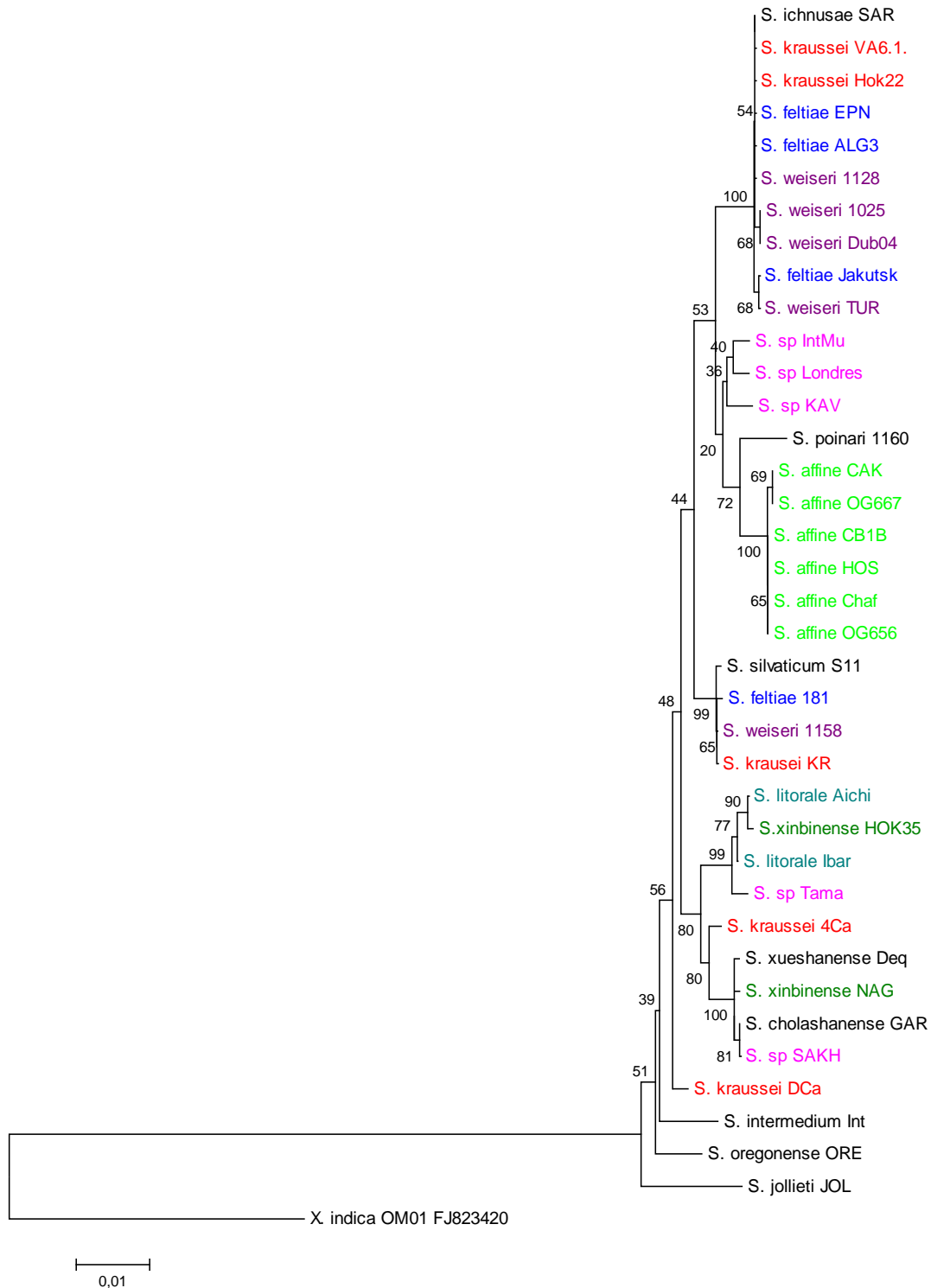


**Příloha 12: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 37mi kmenů rodu *Steinernema* s použitím markeru *gyrB* (Neighbor – Joining, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů; jednotlivé hostitelské druhy jsou odděleny barevně. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**

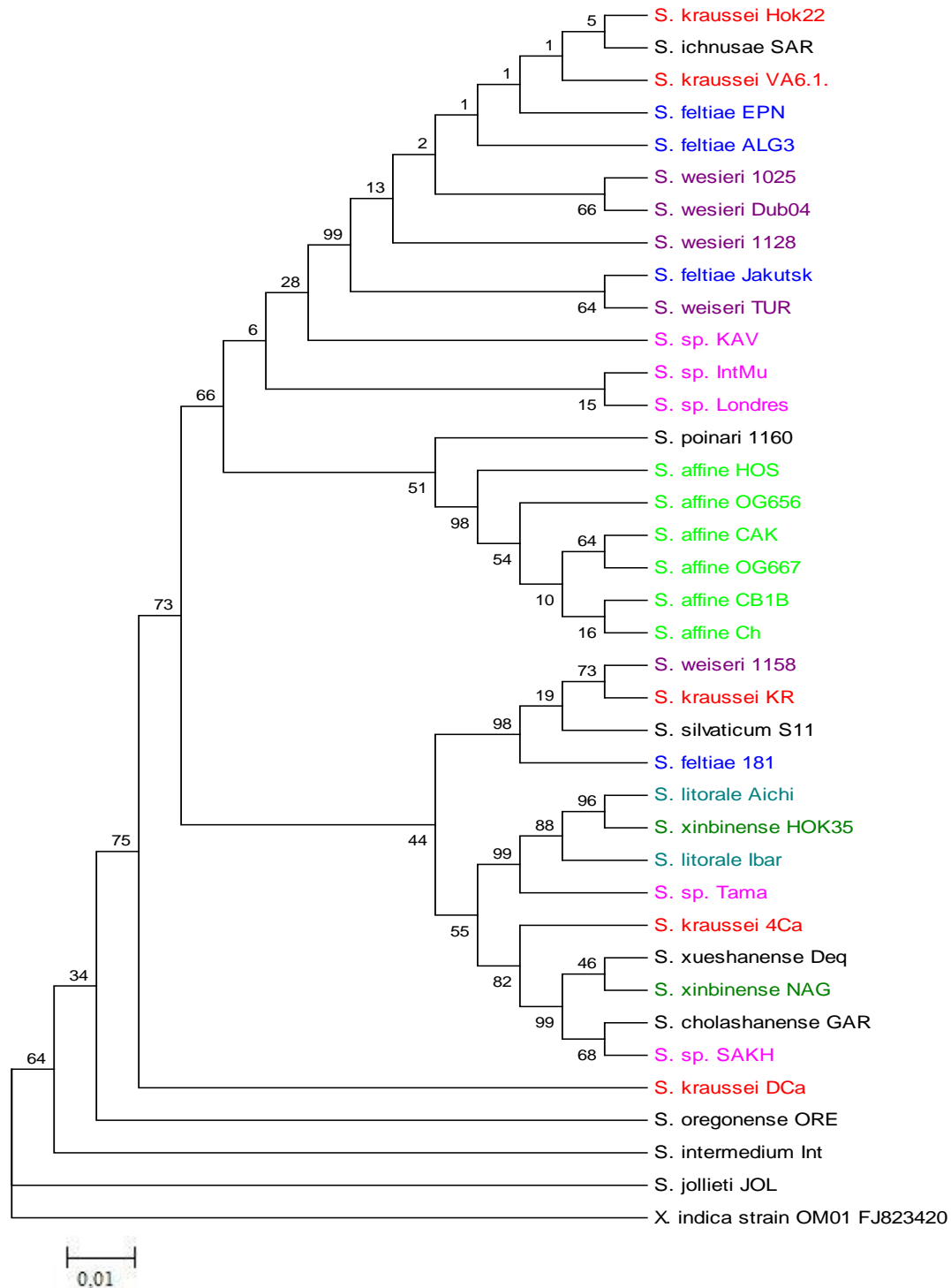


**Příloha 13: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 37mi kmenů rodu *Steinernema* s použitím markeru *gyrB* (Maximum Parsimony, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů; jednotlivé hostitelské druhy jsou odděleny barevně. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**

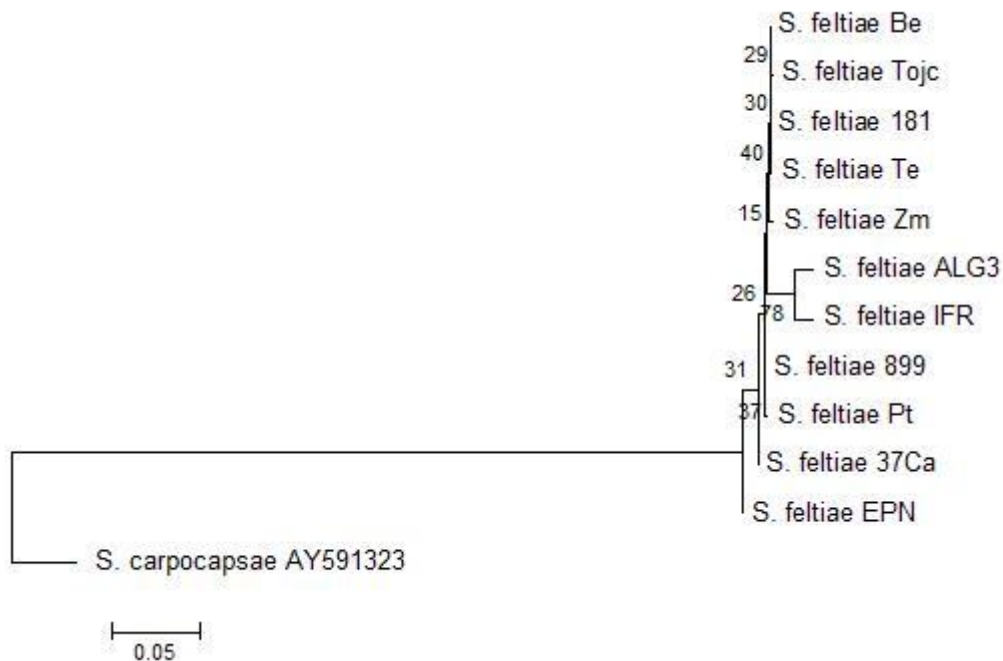




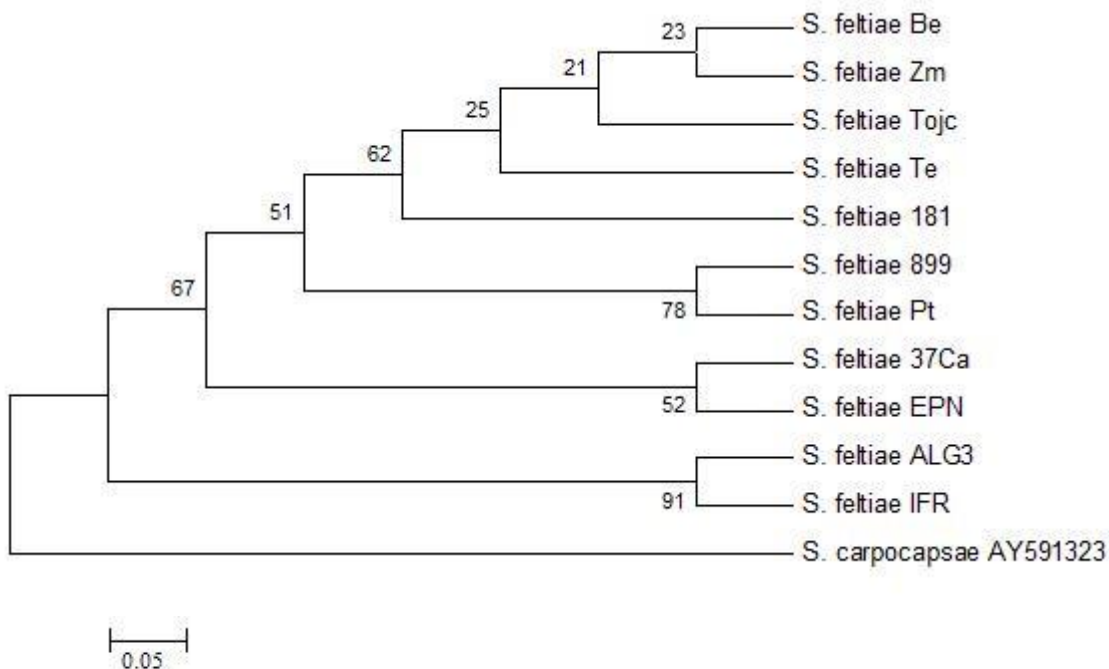
**Příloha 14: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 37mi kmenů rodu *Steinernema* s použitím „konkatenovaných“ markerů *gyrB* a *recA* (Neighbor – Joining, Tamura 3 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů; jednotlivé hostitelské druhy jsou odděleny barevně. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



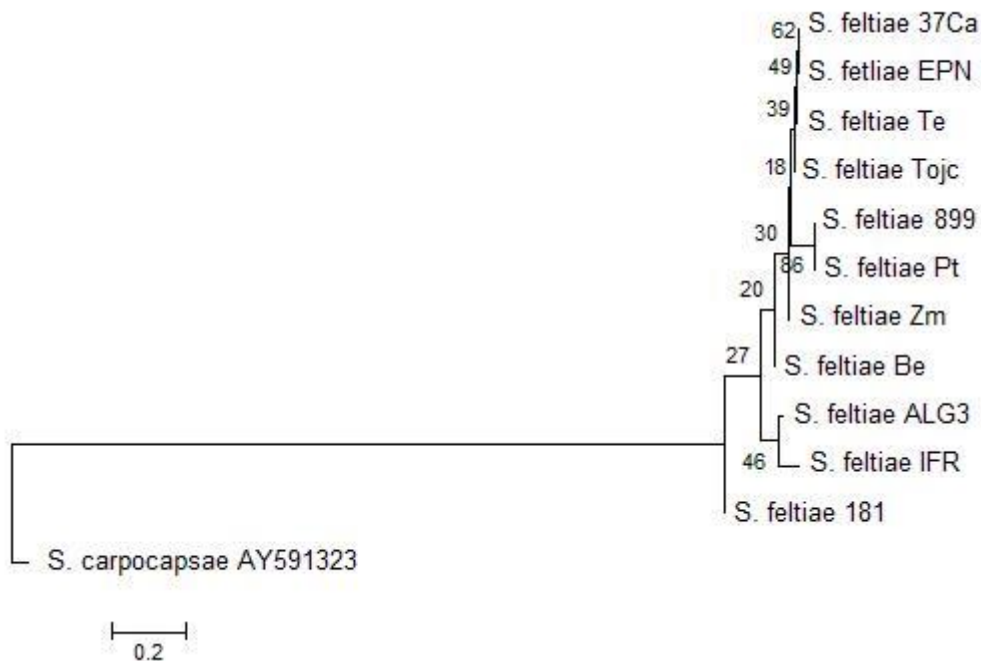
**Příloha 15: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 37mi kmenů rodu *Steinernema* s použitím „konkatenaných“ markerů *gyrB* a *recA* (Maximum Parsimony, Tamura 3 – parameter model, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů; jednotlivé hostitelské druhy jsou odděleny barevně. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



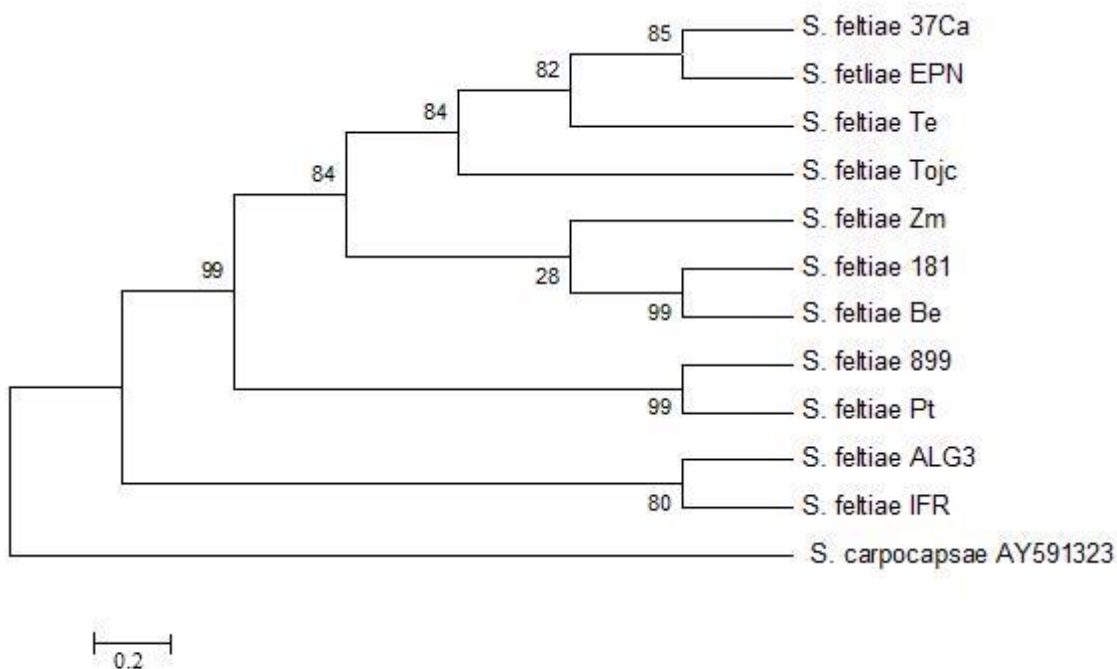
**Příloha 16: Fylogram hlístic s použitím markeru 12S (Neighbor – Joining, Tamura 3 – parameter, Use all sites, Bootstrap 1000), zakořeněný *S. carpocapsae*. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



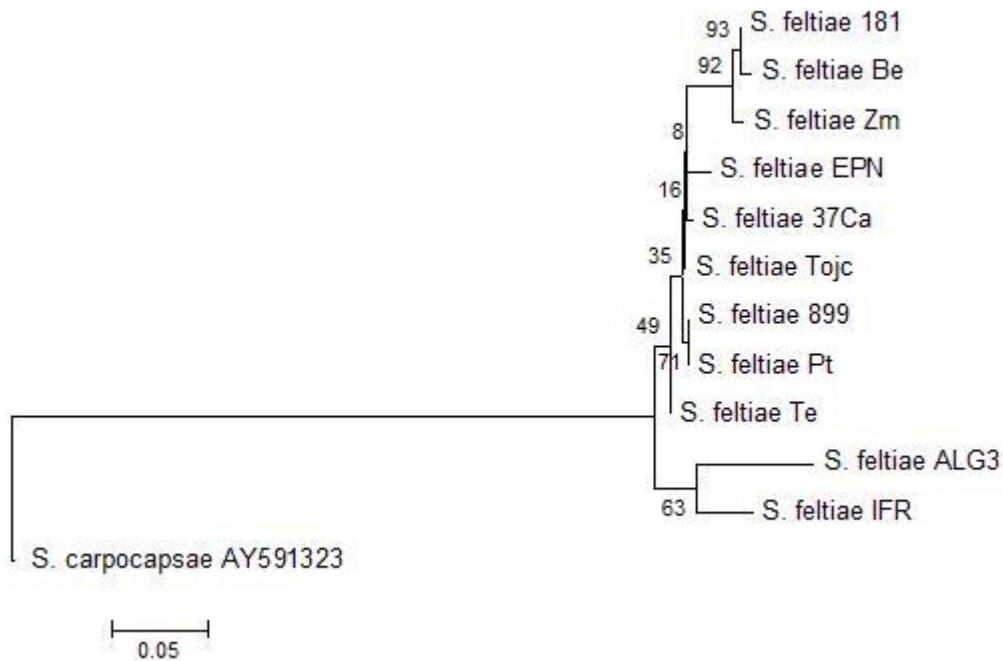
**Příloha 17: Fylogram hlístic s použitím markeru 12S (Maximum Parsimony, Tamura 3 – parameter, Use all sites, Bootstrap 1000), zakořeněný *S. carpocapsae*. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



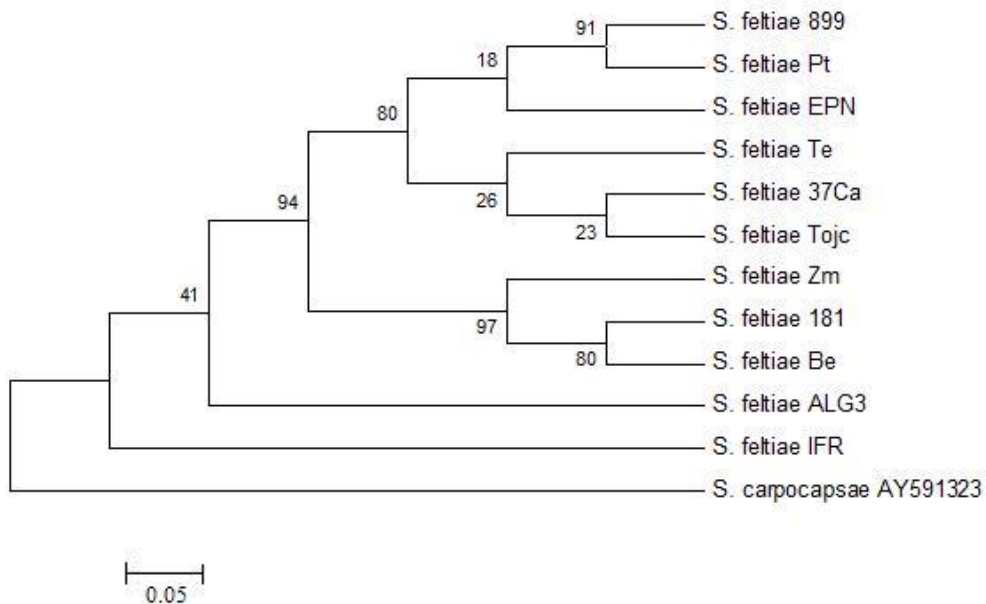
**Příloha 18:** Fylogram hlístic s použitím markeru *ND2* (Neighbor – Joining, Tamura – Nei model, Use all sites, Bootstrap 1000), zakořeněný *S. carpocapsae*. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.



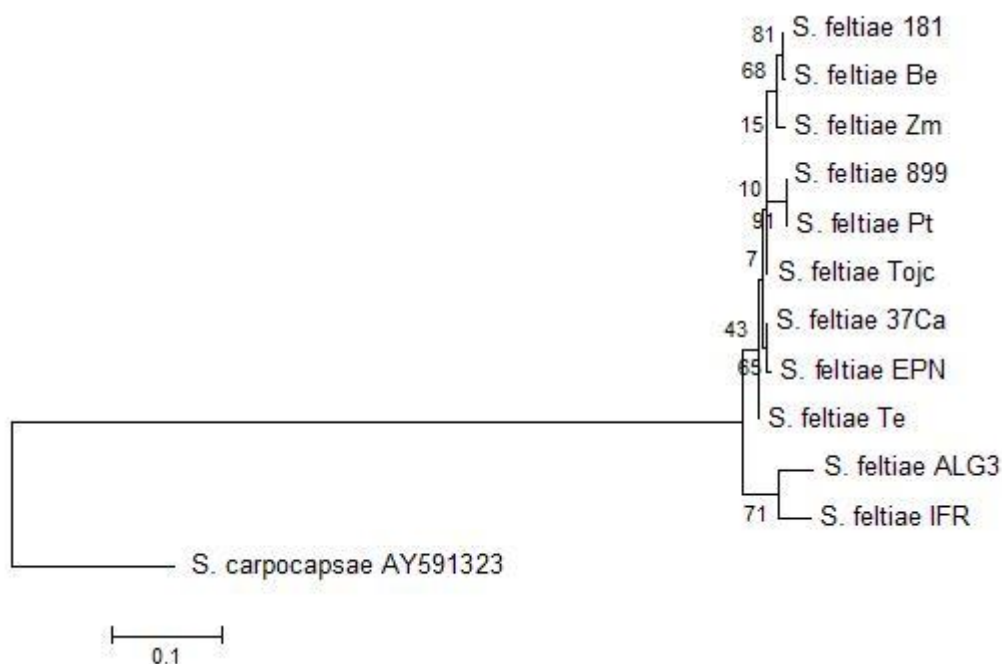
**Příloha 19:** Fylogram hlístic s použitím markeru *ND2* (Maximum Parsimony, Tamura – Nei model, Use all sites, Bootstrap 1000), zakořeněný *S. carpocapsae*. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.



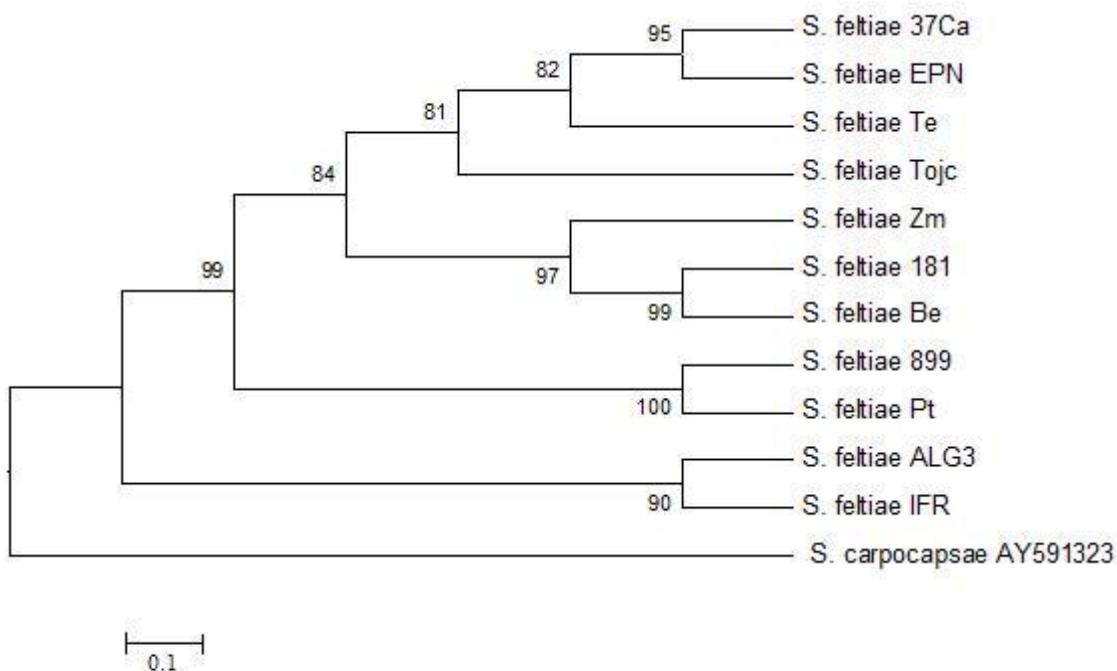
**Příloha 20: Fylogram hlístic s použitím markeru *COX I* (Neighbor – Joining, Tamura – Nei model, Use all sites, Bootstrap 1000), zakořeněný *S. carpocapsae*. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



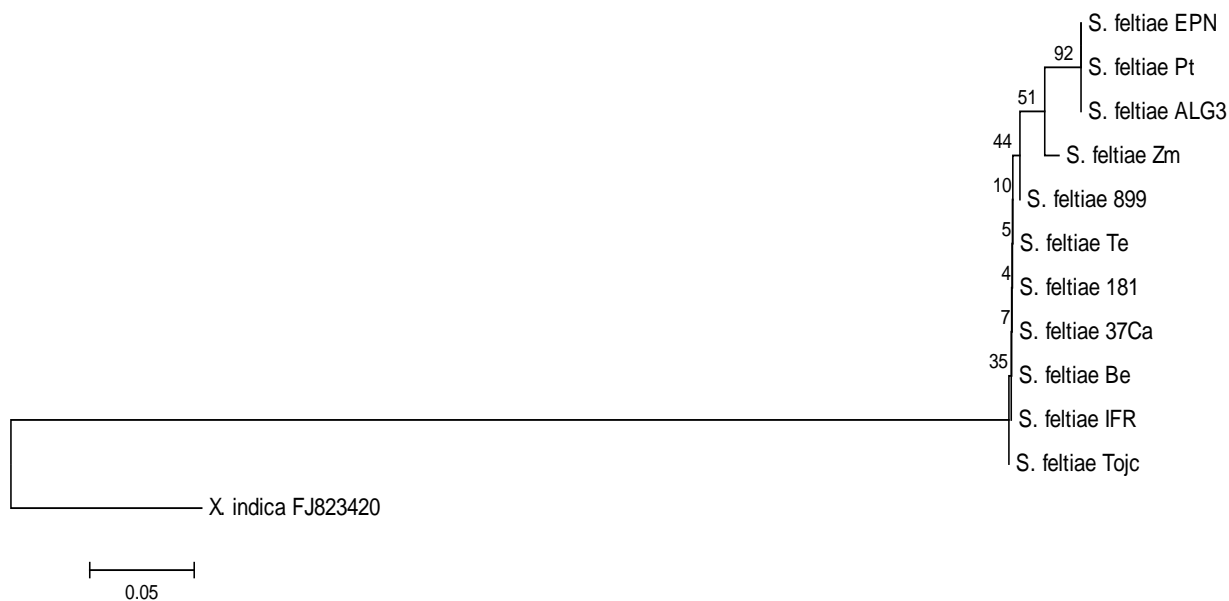
**Příloha 21: Fylogram hlístic s použitím markeru *COX I* (Maximum Parsimony, Tamura – Nei model, Use all sites, Bootstrap 1000), zakořeněný *S. carpocapsae*. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



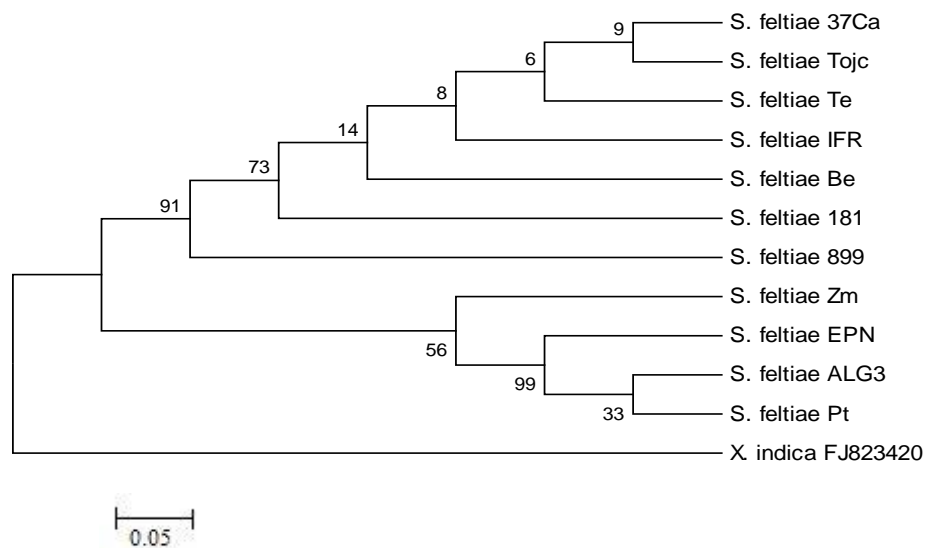
**Příloha 22: Fylogram hlístic s použitím „konkatenovaných“ markerů 12S, ND2 a COX I (Neighbor – Joining, Tamura – Nei model, Use all sites, Bootstrap 1000), zakořeněný *S. carpocapsae*. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



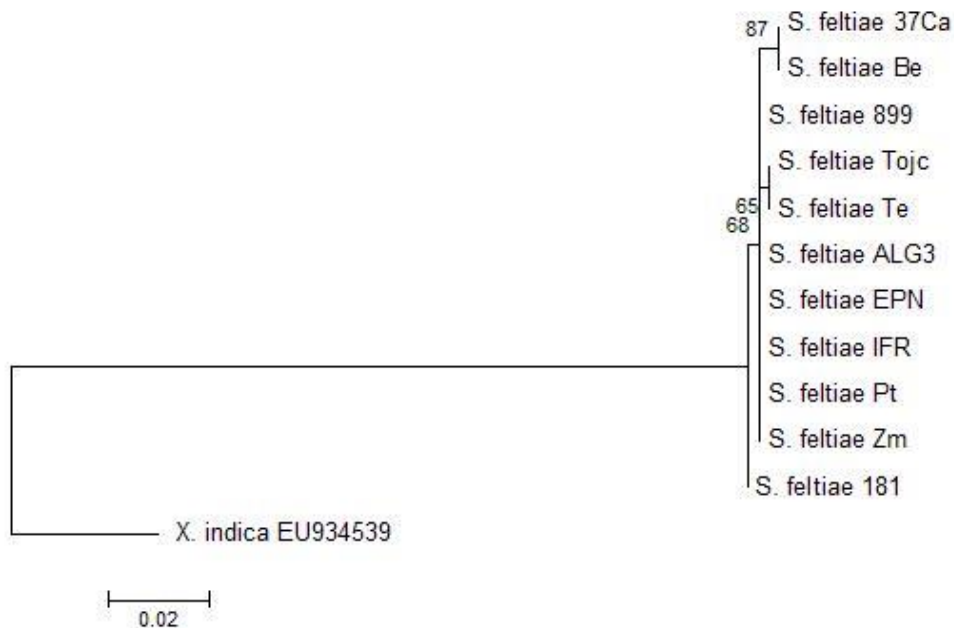
**Příloha 23: Fylogram hlístic s použitím „konkatenovaných“ markerů 12S, ND2 a COX I (Maximum Parsimony, Tamura – Nei model, Use all sites, Bootstrap 1000), zakořeněný *S. carpocapsae*. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



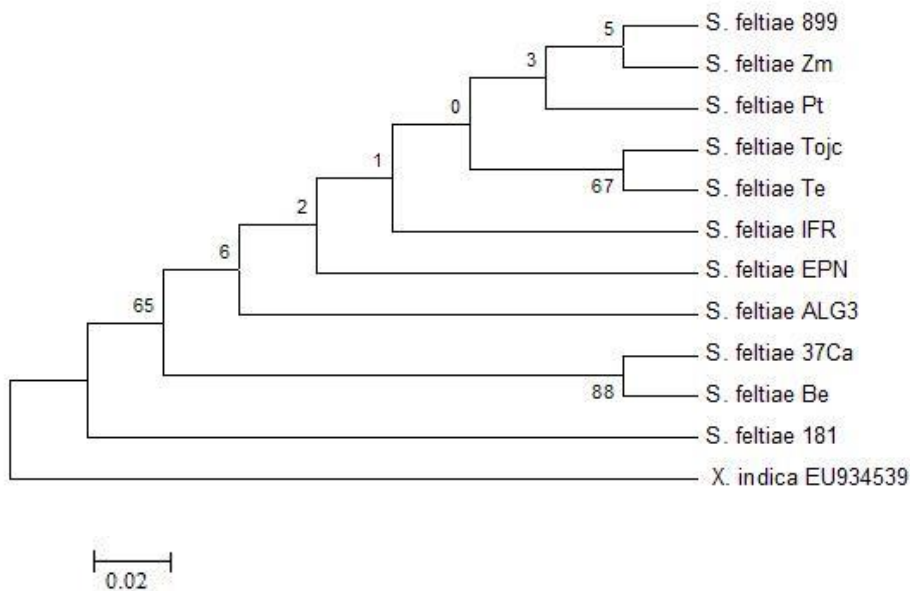
**Příloha 24: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 12 ti kmenů rodu *Steinernema* s použitím markeru *recA* (Neighbor – Joining, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



**Příloha 25: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 12 ti kmenů rodu *Steinernema* s použitím markeru *recA* (Maximum Parsimony, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**

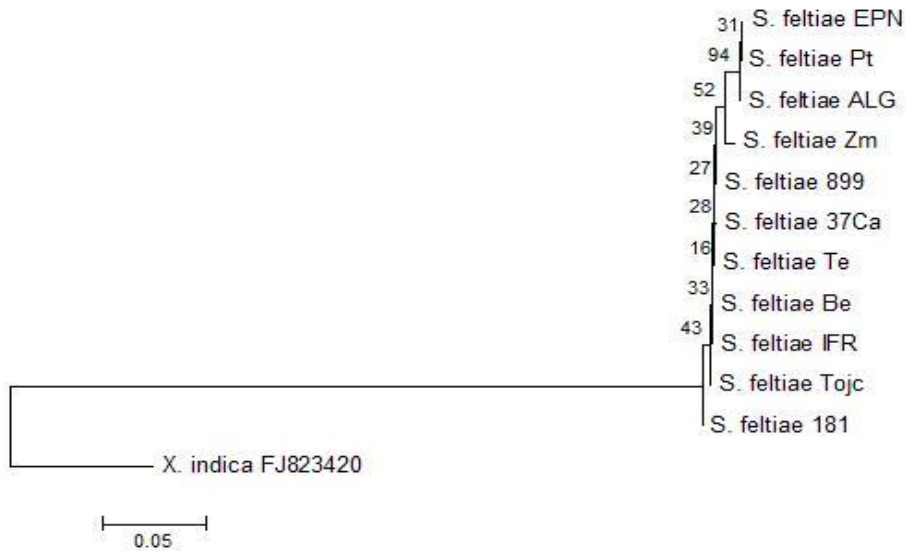


**Příloha 26: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 12 ti kmenů rodu *Steinernema* s použitím markeru *gyrB* (Neighbor – Joining, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**

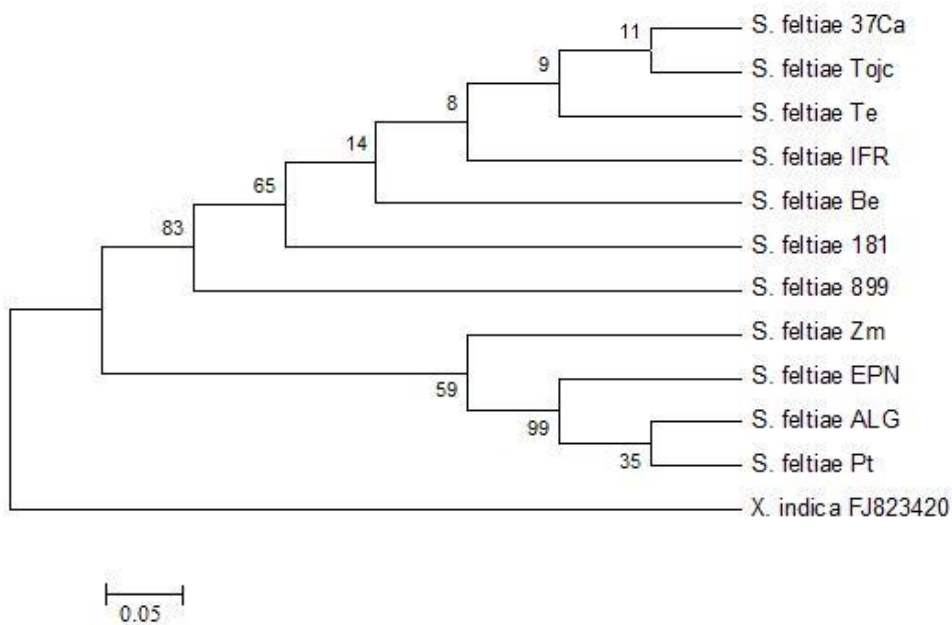


**Příloha 27: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 12 ti kmenů rodu *Steinernema* s použitím markeru *gyrB* (Maximum Parsimony, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**





**Příloha 28: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 12 ti kmenů rodu *Steinernema* s použitím „konkatenovaných“ markerů *gyrB* a *recA* (Neighbor – Joining, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**



**Příloha 29: Fylogram symbiotických bakterií – linií *X. bovienii*, izolovaných ze 12 ti kmenů rodu *Steinernema* s použitím „konkatenovaných“ markerů *gyrB* a *recA* (Maximum Parsimony, Kimura 2 – parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000), zakořeněný *X. indica*. Bakteriální linie jsou označeny jmény hostitelských druhů. Délky větví odpovídají počtu substitucí na bázi.**