

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2016

JAN WIJACKI



Druhová identifikace u Lepidopter pomocí jaderných genů
CAD a EF-1 α
Diplomová práce

Vedoucí práce:
prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Vypracoval:
Bc. Jan Wijacki

ZADÁNÍ

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Druhá identifikace u Lepidopter pomocí jaderných genů CAD a EF-1α** vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

podpis

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat Ing. Čeňkovi Horeckému za odborné rady a konzultace v průběhu psaní této diplomové práce, za pomoc a asistenci v laboratoři během praktické části výzkumu a také za ochotný přístup a jednání při řešení všech vzniklých problémů během práce na této diplomové práci. Také bych chtěl poděkovat vedoucímu mé práce panu prof. RNDr. Alešovi Knollovi, PhD. za pomoc při psaní diplomové práce a její kontrolu a poskytnutí odborných konzultací. Na závěr bych poděkoval Ing. Lence Petrákové za rady a informace při vyhodnocování výsledků.

ABSTRAKT

Biologická rozmanitost je důležitý prvek pro zachování života na Zemi. Může se jednat o rozmanitost v rámci genů, druhů nebo celých ekosystémů. Na světě existuje odhadem asi 10 milionu rostlinných a živočišných druhů, ale popsaných jich je asi pouze okolo 1,5 milionů. DNA barcoding je molekulární metoda napomáhající k druhové identifikaci na základě porovnávání sekvencí mitochondriálních nebo jaderných genů. V rámci druhu nočního motýla lišaje lipového (*Mimas tiliae*) by mohly existovat čtyři různé poddruhy. Cílem této práce je ověřit pomocí metody DNA barcodingu, zda jsou pro rozlišení těchto poddruhů vhodné jaderné geny *CAD* a *EF-1 α* a porovnat tyto výsledky s analýzou mitochondriálního genu *COI*.

Klíčová slova: *sphingidae*, DNA barcoding, biodiverzita, lišaj lipový

ABSTRACT

Biodiversity is an important element to conserve life on earth. We can divide it into three main categories: gene diversity, species diversity and the complex ecosystem diversity. In the world there are an estimated 10 million plant and animal species, but only about 1.5 million are described. DNA barcoding is a molecular method which helps to identify species by comparing the sequences of mitochondrial or nuclear genes. Within lime hawk-moth (*Mimas tiliae*) species could exist four different subspecies. The aim of this thesis is to verify usability of the nuclear genes *CAD* and *EF-1 α* by the DNA barcoding method and to compare these results with the analysis of mitochondrial *COI* gene.

Keywords: *sphingidae*, DNA barcoding, biodiversity, lime hawk-moth

OBSAH

1	Úvod	8
2	Cíl práce.....	9
3	Literární přehled	10
3.1	Biodiverzita	10
3.1.1	Ekosystémová biodiverzita	11
3.1.2	Druhová biodiverzita	11
3.1.3	Genetická biodiverzita	12
3.2	Molekulární taxonomie	12
3.2.1	DNA barcoding.....	13
3.3	Jaderná DNA	15
3.3.1	<i>CAD</i> – karbamoyl-fosfát syntetáza	16
3.3.2	<i>EF-1α</i> – elongační faktor 1 α	16
3.3.3	<i>DDC</i> – dopa dekarboxyláza	16
3.3.4	<i>WG</i> – wingless	17
3.4	Mitochondriální DNA	17
3.4.1	<i>COI</i> – cytochrom c oxidáza podjednotka I.....	19
3.5	Genom hmyzu	19
3.6	Řád: Motýli (<i>Lepidoptera</i>)	20
3.6.1	Čeleď: Lišajovití (<i>Sphingidae</i>)	21
3.7	<i>Sphingidae</i> Museum.....	24
4	Materiál a metodika	25
4.1	Izolace DNA z tkání.....	25
4.2	Měření koncentrace DNA	25
4.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	26
4.3.1	Návrh primerů.....	26
4.3.2	Seznam použitých primerů	27

4.3.3	Reakční směs pro PCR	28
4.3.4	Teplotní profily	28
4.4	Gelová elektroforéza	29
4.5	Sekvenace PCR produktů	29
5	Výsledky a diskuze	31
5.1	Izolace DNA z tkání	31
5.2	Měření koncentrace DNA	32
5.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	33
5.3.1	Návrh primerů	33
5.3.2	Seznam použitých primerů	34
5.3.3	Teplotní profily	35
5.4	Gelová elektroforéza	35
5.4.1	<i>CAD</i>	35
5.4.2	<i>EF-1α</i>	36
5.4.3	<i>COI</i>	37
5.5	Sekvenace PCR produktů a vyhodnocení výsledků	37
5.5.1	<i>COI</i>	39
5.5.2	<i>CAD</i>	40
5.5.3	<i>EF-1α</i>	42
6	Závěr	45
	Seznam literatury	47
	Seznam obrázků	51
	Seznam tabulek	52
	Přílohy	53

1 ÚVOD

Biodiverzita je jedním z nejdůležitějších faktorů živé přírody. Má nezpochybnitelný význam pro zachování života na Zemi. Biodiverzita je také nazývána jako biologická rozmanitost a pokud mluvíme o světě hmyzu, je tato rozmanitost opravdu obrovská. Nejedná se pouze o rozmanitost barev, druhů, tvarů nebo velikostí jednotlivých organismů, ale může se jednat také o rozmanitost v rámci toho, jak se jednotlivé druhy hmyzu živí nebo jak škodí nebo prospívají člověku. Konkrétně v případě hmyzu můžeme mluvit o opylovačích, škůdcích kulturních plodin, býložravcích nebo dokonce o druzích hmyzu, které jsou dravé. Hmyzí říše je natolik rozmanitá a bohatá na druhy, že jejich identifikace může být mnohdy velmi obtížná. Pro tyto případy dnes již existují postupy a metody molekulární analýzy, které mají pomoci vědcům a zoologům zjednodušit, zrychlit a zpřesnit určování jednotlivých druhů a případně objevit druhy nové.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zhodnocení významu molekulární taxonomie u hmyzu se zaměřením na motýly (*Lepidoptera*), využití jaderných genů pro karbamoyl-fosfát syntetázu (*CAD*) a elongační faktor 1-alfa (*EF-1 α*) v této metodě a popis jejich struktury. Dále je v této práci zmíněno srovnáním s využitím mitochondriálních genů, především genu pro podjednotku 1 cytochrom c oxidázy (*COI*). Nedílnou součástí této práce je také optimalizace reakčních podmínek a teplotních profilů pro PCR pro detekci vybraných úseků uvedených jaderných genů. Další část této práce je věnována sekvenaci amplifikovaných PCR produktů a softwarové srovnání získaných sekvencí. Hlavním cílem této práce je zjištění, zda jsou uvedené jaderné geny vhodné pro druhovou identifikaci motýlů a srovnání výsledků s výsledky testování mitochondriálního genu *COI*, který je mezinárodně používán pro metodu druhové identifikace tzv. DNA barcoding.

Jako modelový organismus byl použit druh nočního motýla lišaj lipový (*Mimas tiliae*) z čeledi lišajovitých (*Sphingidae*). Veškeré vzorky a biologický materiál pro analýzy poskytlo *Sphingidae Museum* (muzeum lišajů), které je součástí Ekologického centra Orlov o.p.s. Pracovníci muzea se domnívali, že v rámci druhu lišaj lipový mohou existovat 4 různé poddruhy a naším cílem bylo pomocí molekulární analýzy DNA tuto hypotézu potvrdit či vyvrátit.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Biodiverzita

Úmluva o biologické rozmanitosti (CBD) vystavena k podpisu na Konferenci OSN o životním prostředí a rozvoji v Rio de Janeiru 5. června 1992 popisuje biodiverzitu takto: „*Biodiverzita znamená variabilitu všech žijících organismů včetně, mezi jinými, suchozemských, mořských a jiných vodních ekosystémů a ekologických komplexů, jejichž jsou součástí; zahrnuje různorodost v rámci druhů, mezi druhy i mezi ekosystémy.*“ (Úmluva o biologické rozmanitosti 1992).

Biodiverzita je také velmi důležitá z pohledu evoluce organismů, neboť jejím projevem jsou např. mutace (nejen genetické, ale i morfologické), adaptace organismů na změnu podmínek a také genetický drift. V současnosti se o biodiverzitě mluví jako o globálním problému, protože patří k základním podmínkám udržení života na Zemi (Švecová *et al.* 2007).

I když člověk stále objevuje a popisuje nové rostlinné a živočišné druhy, je také jedním z těch, kteří biodiverzitě škodí, a to hlavně intenzivním využíváním krajiny a znečišťováním životního prostředí, čímž připravuje mnoho druhů organismů o svá přirozená stanoviště. Jen za posledních 400 let vyhynulo okolo 300 – 350 druhů obratlovců a asi 400 druhů bezobratlých živočichů (Švecová *et al.* 2007).

Obecně se biodiverzita dělí do tří základních úrovní:

- 1) *ekosystémová*
- 2) *druhová*
- 3) *genetická* (Švecová *et al.* 2007)

Dále se může dělit podle velikosti pozorovaného území:

- 1) *alfa-diverzita* – takto se označuje diverzita na malém území např. v jednom společenstvu, nebo na jednom biotopu. Využívá se např. pro srovnání počtu druhů v různých přírodních společenstvech.
- 2) *beta-diverzita* – pomocí ní se zachycuje změna, která nastává ve složení druhů v určitém společenstvu na základě změn některého gradientu prostředí, např. nadmořské výšky. Beta-diverzita je vysoká,

pokud se s rostoucí nadmořskou výškou výrazně mění druhové složení společenstva.

- 3) *gama-diverzita* – týká se rozmanitosti v rámci určitého rozlehlého území. Vyjadřuje se pomocí ní např. rozdílné druhové složení srovnatelných společenstev v geograficky různých oblastech (Plesník 2005).

3.1.1 Ekosystémová biodiverzita

Určit ekosystémovou biodiverzitu je složitější, než určit biodiverzitu druhovou nebo genetickou. Tento problém je způsoben hlavně tím, že hranice společenstev a ekosystému jsou jen velmi obtížně určitelné. Nenahrává tomu ani fakt, že neexistuje žádná celosvětově uznávaná klasifikace ekosystémů pro jejich třídění. Při hodnocení ekosystémů také hraje velmi výraznou roli prostor a čas, ve kterém je daný ekosystém hodnocen (Plesník 2005).

3.1.2 Druhová biodiverzita

Chápání druhové biodiverzity je možno ve dvou smyslech a to kvalitativním a kvantitativním. Z hlediska kvalitativního je druhová biodiverzita dána počtem různých druhů v určitém společenstvu. Ve smyslu kvantitativním se pak vyjadřuje jako počet jedinců určitého druhu. Dosud bylo na Zemi popsáno kolem 1,6 miliónů druhů rostlin a živočichů a předpokládá se, že větší část ještě nebyla objevena nebo popsána (Švecová *et al.* 2007).

Tab. 1 Počty popsaných a předpokládaných druhů (Švecová *et al.* 2007)

Kategorie	Počet popsaných druhů	Celkový počet druhů
Bakterie	4 000	1 000 000
Živočichové	1 320 000	10 600 000
Rostliny	270 000	300 000

Druhová biodiverzita je značně proměnlivá i v důsledku různých klimatických podmínek. Největší počty různých druhů se nacházejí v oblastech okolo rovníku a směrem k pólům se diverzita snižuje. Tato skutečnost je ovlivněna tím, jaké životní podmínky poskytují různá podnebí z hlediska množství sluneční energie a vody. Největší

druhovou biodiverzitu na souši najdeme v tropických deštných lesích, ve vodě pak na korálových útesech a v oblastech tropických moří (Švecová *et al.* 2007).

3.1.3 Genetická biodiverzita

Genetická biodiverzita vyjadřuje variabilitu genů v rámci populací, nebo v rámci druhů. Zabývá se variabilitou odlišných populací v rámci jednoho druhu a rozdílných jedinců v rámci jedné populace. Ke stanovení genetické diverzity planě rostoucí druhů rostlin a divoce žijících druhů živočichů značně pomáhají moderní metody molekulární biologie a genetiky. Někteří vědci odhadují, že na jeden druh (rostlinný nebo živočišný) může připadat až 220 geneticky různých populací. Genetická diverzita je nepostradatelnou součástí pro udržení evolučních procesů v rámci druhů (Plesník 2005).

3.2 Molekulární taxonomie

Molekulární taxonomie je systém zařazování druhů na základě molekulárních analýz. Ty se opírají především o testování sekvencí jaderné a mitochondriální DNA v případě živočichů, plastidové DNA u rostlin a porovnávání sekvencí jednotlivých genů mezi zkoumanými druhy. Systém molekulární taxonomie je soubor metod využívajících testování sekvencí DNA pro identifikaci nových rostlinných a živočišných druhů, případně pro doplnění, či zpřesnění stávající systematiky a rozdělení jednotlivých druhů a také přispívá k vytvoření standardizovaného postupu k určování a objevování nových druhů (Mayer *et al.* 2007).

Hlavním cílem molekulární taxonomie je objasňování příbuzenských vztahů mezi jednotlivými organismy na molekulární úrovni, zatímco DNA barcoding se zabývá především identifikací neznámých vzorků (Kress *et al.* 2005).

Zavedení metod molekulární taxonomie (jako např. DNA barcoding) vyvolal a stále vyvolává ve vědeckých kruzích vášnivé debaty. Tyto metody mají jak své zastánce, většinou z řad genetiků a molekulárních biologů, tak také své odpůrce, kterými jsou většinou klasičtí taxonomové a systematičtí biologové. Ti tyto molekulární metody nepřijímají s velkým nadšením. Dohady často vznikají na téma uznávání nově objevených druhů. Tyto spory jsou důsledkem absence jednotné standardizované metodiky a charakteristiky pro přijetí nového druhu do systému. Také často vznikají spory kvůli financím, kdy klasičtí systematikové a taxonomové tvrdí, že zavádění

molekulárních metod do jejich oboru způsobuje odliv financí na jiná pracoviště, přičemž tvrdí, že tyto metody nejsou zcela průkazné a spolehlivé (Wikipedia 2016).

3.2.1 DNA barcoding

Odhaduje se, že na planetě Zemi existuje 8-10 milionů rostlinných a živočišných druhů. V roce 2003 však byly známy a popsány asi pouze jeden a půl až dva miliony z nich. DNA barcoding by mohl tento fakt změnit, a pomoci tak popsat druhy nově objevené a lépe taxonomicky zařadit ty již popsané (Hebert *et al.* 2003a). DNA barcoding (DNA čárové kódy) je nástroj molekulární analýzy k určování taxonomických druhů, který využívá standardizované genetické markery. U živočichů se k identifikaci nejčastěji používají fragmenty mitochondriálního genu pro podjednotku 1 *cytochrom c oxidázy* (*COI*) (Krishnamurthy a Francis 2012). U rostlin se však tento gen nepoužívá, protože jeho evoluce probíhá příliš pomalu. Pro barcoding u rostlin se ukázaly vhodnější dvě oblasti genů na chloroplastech označované jako: *matK* a *rbcL* (Barcode of life 2010).

Využití DNA barcodingu má nespornou výhodu a opodstatnění v případech, kdy identifikace daného druhu vyžaduje důkazy pomocí molekulární analýzy. Jedním z takových případů může být situace, kdy je nemožné správně přiřadit dospělce (imago) daného druhu k např. housence pouze na základě vizuální analýzy. Další situace může nastat, když je potřeba určit druh daného živočicha nebo rostliny pouze z části těla, nebo pokud je vzorek poškozen. Molekulární analýza je také využívána v případech, kdy nelze jednoznačně určit druh pouze na základě morfologického pozorování. Tento případ se týká např. řas, komárů, druhů, které jsou špatně pozorovatelné z důvodu jejich malé velikosti, nebo v případech, kdy má daný druh výrazně polymorfní životní cyklus nebo vykazuje značnou fenotypovou plasticitu (Silva-Brandao *et al.* 2009). DNA barcoding může být využit také například k identifikaci rostlin v době, kdy nemají květ ani plod, podle kterého by bylo možno je identifikovat, k identifikaci hmyzu podle larev, ke zkoumání složení potravy zvířat z žaludečního obsahu nebo výkalů (Soininen *et al.* 2009), nebo k rozboru složení produktů na trhu jako jsou rostlinné doplňky stravy, dřevo nebo kůže a další živočišné tkáně v potravinách (Kress *et al.* 2005).

Pro analýzu výsledků sekvencí těchto genů se používají on-line přístupné databáze jako např. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - dostupné na <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). V případě BLASTu stačí příslušnou sekvenci nakopírovat do správného pole a během několika sekund dostaneme výsledky

o analyzovaném vzorku. V tabulce výsledků se nám zobrazí druh organismu, zkoumaný gen, maximální možné skóre, dosažené skóre, překrytí s referenční sekvencí, E hodnotu, shodu a odkaz na příslušnou sekvenci v databázi GenBank.

Vytvoření databází pro barcoding je velmi složitá procedura, a proto se na ní podílí více společností a týmů, které se mohou specializovat na určité skupiny rostlin nebo živočichů. Hlavními partnery zabývajícími se barcodingem ve světě jsou:

- **iBOL** – International Barcode of Life je projekt zastřešující jediný cíl a tým je sestavení knihovny sekvencí a technologií potřebných pro rychlou a levnou identifikaci organismů pomocí DNA barcodingu. Za tímto účelem spojuje další organizace, které se na vytvoření této knihovny podílí (Barcode of life 2010).
- **CBOL** – Consortium for the Barcode of Life je mezinárodní iniciativa věnující se rozšiřování DNA barcodingu jako celosvětově využívaného standardu pro určování biologických druhů. Byla založena v roce 2004 a „šíří“ barcoding do světa pomocí pracovních skupin, workshopů, konferencí, kurzů a školení. CBOL má 200 členských organizací z 50 zemí a hlavní sídlo se nachází ve Washingtonu (Barcode of life 2010).
- **GenBank** – databáze sekvencí a sbírka všech veřejně dostupných sekvencí DNA. GenBank je součástí mezinárodní spolupráce pro databázi nukleotidových sekvencí (International Nucleotide Sequence Database Collaboration), která zahrnuje:
 - DNA DataBank of Japan (DDBJ)
 - European Molecular Biology Laboratory (EMBL)
 - GenBank

Tyto tři organizace si každodenně vyměňují svá data a díky této spolupráci bylo v databázi GenBank na konci roku 2015 přes 189 milionů sekvencí z oblastí klasického sekvenování a přes 317 milionů sekvencí z oblastí celogenomového sekvenování (WGS) (Clark *et al.* 2016).

- **BOLD** – Barcode of Life Data Systems je online pracovní prostředí, které pomáhá shromažďovat, spravovat, analyzovat a využívat DNA čárové kódy. Skládá se ze tří složek, kdy každá z nich řeší potřeby různých skupin využívajících barcoding (<http://www.boldsystems.org>).

3.3 Jaderná DNA

Jadernou DNA chápeme soubor veškeré DNA v jádře buňky. V živočišných buňkách je převážná většina molekul DNA ve formě dvoušroubovice, která je vinuta podél histonové kostry a při spiralizaci tvoří chromozomy. Podle funkce rozlišujeme několik základních druhů DNA:

- 1) Molekuly DNA kódující pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Kódující DNA tvoří strukturní geny.
- 2) Molekuly DNA, které kódují tvorbu transferových a ribosomálních RNA (tRNA a rRNA).
- 3) DNA, která má funkci kontrolní a řídicí, také nazývána jako regulační oblast genu. Jedná se o promotor, enhancer (zesilovač), TATA box, terminační oblast a další.
- 4) DNA, která má specifickou funkci. Například repetitivní sekvence v oblasti centromery nebo telomer. Funkce těchto sekvencí souvisí se strukturou chromozomů.
- 5) DNA, která nemá zatím známou funkci jako např. pseudogeny (Otová a Mihalová 2012).

V případě lidského genomu, pouze asi 1,5-2 % sekvencí kóduje proteiny. Ostatní sekvence jsou regulační a řídicí, nebo se jedná o introny, které mohou být vystřiženy (Otová a Mihalová 2012).

Jaderné geny s nízkým počtem kopií (low-copy nuclear genes) by mohly fungovat jako alternativní markery pro DNA barcoding. Při použití těchto genů se však očekávají problémy z hlediska návrhu univerzálních primerů, genových duplikací, rekombinací, allopolyploidie a heterozygotnosti těchto genů. Ačkoliv jsou sekvence těchto genů relativně krátké, obecně vykazují větší variabilitu než geny plastidové nebo mitochondriální (Pillon *et al.* 2013).

3.3.1 CAD – karbamoyl-fosfát syntetáza

Gen, který zajišťuje *de novo* syntézu pyrimidinových nukleotidů (tymin a cytosin). Tento gen kóduje trifunkční protein, který je asociován s enzymatickou aktivitou prvních tří enzymů v celkově šestikrokové kaskádě biosyntézy pyrimidinů. Konkrétně se jedná o karbamoyl-fosfát syntetázu (CPS II), aspartát transkarbamoylázu a dihydroorotázu. Tento protein je regulován kaskádou mitogen-aktivované protein kinázy (MAPK), která dokazuje přímou vazbu mezi aktivační kaskádou MAPK a *de novo* biosyntézou pyrimidinových nukleotidů. Tento gen je u člověka (*Homo sapiens*) lokalizován na druhém chromozomu a obsahuje 45 exonů. U myši (*Mus musculus*) byl gen *CAD* našel na chromozomu pět a u psa (*Canis lupus familiaris*) na chromozomu sedmáct. Pro analýzu u lišaje lipového (*Mimas tiliae*) se vychází ze sekvence čítající 2 929 bp. Díky alternativnímu sestřihu 45 exonů vznikají různé transkripční varianty kódující odlišné izoformy (Gene 2016a).

3.3.2 EF-1 α – elongační faktor 1 α

Elongační faktor-1 α (*EF-1 α*) je protein kódovaný jaderným genem, který může sloužit jako marker pro druhovou identifikaci. Protein *EF-1 α* je zapojen do GTP-dependentní vazby aktivovaných molekul transferové RNA k vazebným místům na ribozomu v průběhu translace. U octomilky (*Drosophila melanogaster*) byly zjištěny dvě formy tohoto proteinu (*EF-1 α F1* a *EF-1 α F2*), které jsou exprimovány v různý čas během vývoje. Geny pro *EF-1 α* byly popsány také u jiných organismů jako např. u žábřonožky solné (*Artemia salina*), myši (*Mus musculus*), člověka (*Homo sapiens*) nebo včely medonosné (*Apis mellifera*). Díky konzervativní povaze sekvence aminokyselin těchto rozdílných organismů byl *EF-1 α* označen jako potenciálně využitelný gen pro určování fylogenetických vztahů na vyšší úrovni, především u hmyzu (Parvizi a Assmar 2007).

Gen *EF-1 α* se u octomilky nachází na chromozomu 2R a obsahuje 4 exony (Gene 2016b).

3.3.3 DDC – dopa dekarboxyláza

Obecně byla dopa dekarboxyláza (*DDC*) považována za enzym způsobující tmavnutí epidermálních vrstev a ukládání melaninu v těchto vrstvách pokožky. Nedávné

studie prováděné na bourci morušovém (*Bombyx mori*) (Wang *et al.* 2013) však ukazují, že *DDC* je jedním z klíčových enzymů v procesu svlékání kůže, který úzce souvisí s regulací ekdysonu (prohormon hmyzu řídící proces svlékání kůže) v průběhu biologického procesu svlékání kůže. Data z této studie prokázala, že hladina exprese *DDC* u housenek bource morušového je vyšší během svlékání kůže a po svlečení postupně klesá. Pokud u housenky bource morušového hladina exprese *DDC* klesne, způsobí to, že se housenka nezakuklí, nebo dojde k nedokončenému zakuklení. *DDC* je primárně exprimována a skladována v oblasti periferní plazmy blízko jádra buněk. *DDC* katalyzuje dopa na dopamin, podílí se na syntéze melaninu a hraje klíčovou roli v procesu vyztužování exoskeletu hmyzu (Wang *et al.* 2013).

3.3.4 *WG* – wingless

WG je gen, který patří do tzv. rodiny *Wnt* genů. Jedná se o skupinu 19 genů kódujících signální molekuly regulující procesy během vývoje živočichů (Nusse 2005). Geny z této rodiny kódují proteiny bohaté na cystein, které hrají klíčovou roli jako intercelulární signální molekuly během vývoje jedince. Genetické studie prováděné na octomilce (*Drosophila melanogaster*) a háďátku (*Caenorhabditis elegans*), umělá genová exprese u drápatky (*Xenopus laevis*) a genový knockout u myši (*Mus musculus*) prokázaly podíl *Wnt* genů na procesech tak odlišných jako jsou segmentace, utváření centrální nervové soustavy nebo řízení asymetrického buněčného dělení. Přenos *Wnt* signálů mezi buňkami je prováděn komplexní dráhou, včetně post-translačních modifikací a sekrece *Wnt* proteinů, vazbou na transmembránové receptory, aktivací cytoplazmatických efektorů a nakonec také regulací transkripce cílových genů (Wodarz a Nusse 1998).

3.4 Mitochondriální DNA

Mitochondriální genom je tvořen veškerou DNA lokalizovanou v mitochondriích. Velikost genomu je napříč druhy velmi variabilní a množství mitochondriální DNA (mtDNA) je závislé také na tom, z jaké buňky je mtDNA izolována. Například u parazita druhu *Plasmodium* je velikost molekul mtDNA asi 6 kb, kdežto u některých vyšších rostlin obsahují mitochondrie molekuly DNA o velikosti až 2 500 kb. Počet molekul mtDNA v mitochondriích je také velmi variabilní, a může se pohybovat v rozmezí od méně než 1 000 molekul (somatická buňka) až po 10^8 molekul mtDNA (oocyt obratlovců)

(Snustad a Simmons 2009). Například kvasinky mají mtDNA o velikosti přes 75 kb a meloun až 2,4 Mb (Lesk 2012). Na rozdíl od jádra jsou v mitochondriích cirkulární molekuly DNA, které se také skládají ze dvou antiparalelních řetězců. Tyto řetězce mají však natolik odlišné složení z hlediska zastoupení purinů a pyrimidinů, že je označujeme jako těžký (H) a lehký (L) řetězec. Jednotlivé řetězce můžeme od sebe snadno oddělit například centrifugací (Rubinoff 2006). Od jaderné DNA se liší také tím, že mitochondriální DNA není nesena histonovou kostrou. Dalším rozdílem je, že mitochondriální DNA neobsahuje introny a více než 90 % sekvence kóduje určité geny. Těch se v mitochondriích nachází 37 a jsou převážně soustředěny na těžkém řetězci (Brdička 2001).

Mitochondriální DNA kóduje 37 genů z toho:

- a) 22 genů pro tRNA,
- b) 2 geny pro rRNA (*12S* a *16S*-RNA),
- c) 13 různých proteinů (Rosypal *et al.* 1989).

Mezi nejdůležitější proteiny kódované mtDNA patří:

- a) protomery cytochrom-c-oxidázy (*COI*, *COII*, *COIII*),
- b) cytochrom b a jedna podjednotka ubichinocytochrom-b-reduktázy,
- c) protomery komplexu ATP-syntetázy (Rosypal *et al.* 1989).

Tab. 2 Rozmístění jednotlivých genů na řetězcích mtDNA (Brdička 2001)

Těžký řetězec (H)	Lehký řetězec (L)
<i>ND1</i> , 2, 3, 4, <i>4L</i> ,5 (NADH dehydrogenáza)	<i>ND6</i>
<i>ATP6</i> , 8 (ATPáza)	
Cytochrom b	
<i>COI</i> , <i>II</i> , <i>III</i> (cytochrom-c-oxidáza)	
<i>12S</i> rRNA, <i>16S</i> rRNA	
tRNA pro Arg, Asp, Met, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Ser, Thr, Trp, Val	tRNA pro Ala, Asn, Cys, Gln, Glu, Pro, Ser, Tyr

Co se týče dědičnosti, jsou mitochondriální geny děděny po maternální linii (po matce) a otec svou mtDNA na potomky nepřenáší. Fungování tohoto principu je předmětem mnoha vědeckých sporů a zkoumání (Brdička 2001).

Mitochondriální DNA je vhodnější pro druhovou identifikaci pomocí DNA barcodingu, protože na rozdíl od jaderné DNA mají mitochondriální geny vyšší rychlost evoluce, jsou méně vystaveny rekombinaci, neobsahují téměř žádné introny a nachází se v buňkách v mnoha kopiích. Tyto znaky mitochondriální DNA jsou důležité pro rutinní amplifikaci fragmentů pomocí PCR a tvorbu univerzální metodiky (Luo *et al.* 2011).

3.4.1 *COI* – cytochrom c oxidáza podjednotka I

Mitochondriální gen kódující podjednotku I enzymu cytochrom c oxidázy (*COI*) se globálně využívá pro DNA barcoding. Důvodem, proč se používá právě gen pro *COI* jsou výsledky studií, které dokazují, že rozdíly v sekvencích kódujících *COI* umožňují odlišení úzce spřízněných druhů všech živočišných kmenů kromě žahavců (*Cnidaria*), pravděpodobně proto, že u tohoto kmene je nízká míra evoluce v tomto genu (Hebert *et al.* 2003b).

Cytochrom c oxidáza (*CO*) je konečný enzym mitochondriálního respiračního řetězce. V tomto řetězci dochází k přesunu volných elektronů na molekulární kyslík, který je konečným příjemcem těchto elektronů a výsledným produktem tohoto děje je voda. *CO* hraje významnou roli v řízení aerobní produkce energie (Mandelker 2009).

Tab. 3 Srovnání používaných genů

Gen	Velikost kódující oblasti	Počet exonů	Lokalizace
<i>CAD</i>	2 929 bp	45	jádro
<i>EF-1α</i>	1 228 bp	8	jádro
<i>DDC</i>	1 437 bp	4	jádro
<i>WG</i>	1 179 bp	5	jádro
<i>COI</i>	1 554 bp	1	mitochondrie

3.5 Genom hmyzu

Pravděpodobně nejprobádanějším organismem hmyzí říše, co se genetiky týče, je octomilka (*Drosophila melanogaster*). Tento druh mušky je považován za jeden z modelových organismů genetiky. Kompletní sekvence genomu octomilky byla zveřejněna již v roce 2000, tedy rok předtím, než byly zveřejněny první dvě verze

lidského genomu. V říši hmyzu existuje velká variabilita v genomech jednotlivých druhů jak ve velikosti genomu, tak také v počtu a hustotě genů (Snustad a Simmons 2009).

Tab. 4 Porovnání genomů komára, včely, octomilky a bouřce (Snustad a Simmons 2009)

Druh	Latinský název	Velikost genomu [bp]	Předpokládaný počet genů	Hustota genů [bp/gen]
komár	<i>Anopheles gambiae</i>	278 253 050	14 707	18 900
včela	<i>Apis mellifera</i>	197 657 892	29 832	6 600
octomilka	<i>Drosophila melanogaster</i>	131 000 899	13 792	9 500
bouřec	<i>Bombyx mori</i>	397 687 000	21 128	18 820

Pozn.: Údaje jsou převzaty z webových stránky NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), Ensembl (<http://www.ensembl.org>) nebo CBS Genome Atlas Database (<http://www.cbs.dtu.dk/sefices/GenomeAtlas>) k 15. květnu 2008.

Podle databáze *Genome* dostupné na stránkách NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/47>) obsahuje genom octomilky 148 504 Mb. Celkem kóduje 30 044 proteinů a procentuální zastoupení bází G a C tvoří 41,9402 %.

3.6 Řád: Motýli (*Lepidoptera*)

Motýli (*Lepidoptera*) patří do třídy hmyzu (*Insecta*), což je nejpočetnější třída v živočišné říši, co se týká počtu jednotlivých druhů. Samotných motýlů je v současné době známo asi 170 tisíc druhů. Na území Evropy se jedná o zhruba 100 tisíc druhů a v České republice se můžeme setkat s 30 tisíci druhy těchto živočichů. Motýli se řadí mezi řád hmyzu s proměnou dokonalou (*Holometabola*), což znamená, že jejich vývoj je uskutečněn ve čtyřech fázích: vajíčko, larva (houseska), kukla a dospělý jedinec (imago) (Beneš a Čížek 2002).

Zástupci řádu motýlů se vyznačují dvěma páry velkými blanitými křídly, která jsou pokryta drobnými šupinkami. Tyto šupinky jsou taškovitě uspořádány jedna přes druhou a dodávají tak díky své pigmentaci, světlorozkladné struktuře, případně kombinaci těchto dvou vlastností, motýlům jejich charakteristické pestré zbarvení. Obecně se motýli dělí na denní a noční, přičemž noční motýli jsou také často nazýváni jako můry. Na první pohled jsou denní motýli rozpoznatelní od nočních právě svým pestrým zbarvením na křídlech a těle. Noční motýli jsou většinou méně nápadní. Další znak používaný pro rozlišení denních a nočních motýlů je např. postavení křídla v klidové poloze. Noční

motýli mají křídla buď střechovitě složená, obtočená kolem těla nebo naplocho přitisknutá k opoře, které se přidrží, kdežto denní motýli mají křídla v klidu složená svisle nad tělem (Reichholfová-Riehmová 2005).

Dospělci většiny druhů mají sací ústní ústrojí. To je v klidové poloze spirálovitě stočené pod hlavou. V případě potřeby ho mohou rozvinout v dlouhou trubici zvanou sosák, která jim umožňuje výživu v podobě sání nektaru z květů, mízy stromů nebo šťávy z kvasícího ovoce (Gerstmeier 2013).

Většina motýlů jsou důležitými opylovači mnoha rostlin. Existují však druhy nočních motýlů, které mají vyvinuto kousací ústrojí, pomocí kterého požírají pyl. Larvy motýlů (housenky) jsou ve většině případů býložravé a mají vyvinuté mocné kousací ústní ústrojí. Často se živí pouze jedním druhem rostliny, a proto jsou považovány za škůdce. Motýlí kukla (chrysalis) bývá uložena v tvrdém pouzdře, které je nejčastěji připevněno na rostlině, kterou se housenka živila nebo někde poblíž. Na rozdíl od kukel nočních motýlů, které bývají buď uloženy v hedvábném zámotku upředěném samotnou housenkou a připevněném k nějaké opoře, ukryté v komůrkách uvnitř stonků rostlin či pod zemí, nebo zahrabané pod vrstvou tlejícího listí (Imes 1997).

Motýli se vyznačují výrazným pohlavním dimorfismem, který se projevuje například rozdílným zbarvením nebo vzorováním samečků a samic. Rozlišování pohlaví u těchto druhů se pak převážně provádí na základě vizuálního efektu. Výrazné zbarvení má také důležitý vliv při ochraně proti predátorům a jejich zastrasování. To je také důvod, proč jsou většinou denní motýli barevnější. Délka období dospělosti je velmi variabilní a může trvat od jednoho týdne až do osmi měsíců, v závislosti na druhu. Průměrná délka dospělosti se však pohybuje okolo dvou až tří týdnů (Imes 1997).

3.6.1 Čeleď: Lišajovití (*Sphingidae*)

Čeleď lišajovití (*Sphingidae*) se řadí mezi středně velké čeledi a patří do ní velcí až obrovití motýli. Křídla těchto jedinců běžně dosahují rozpětí 35 až 150 mm. Tělo mají mohutné, torpédovitého tvaru. Přední křídla jsou charakteristická úzkým a robustním tvarem a na předním okraji mají pevné žilky. Naproti tomu zadní křídla jsou malá a okrouhlá. Všeobecně jsou motýli charakterističtí pro své pestré zbarvení a není tomu jinak ani u lišajovitých, i když kresba na jejich křídlech není příliš složitá. Na vrcholu hlavy mají krátká, tlustá tykadla zakončená ostrým hrotem a u samců porostlá dvěma řadami štětiček, velké složené oči a mohutně vyvinutý sosák, který může dorůstat délky

až 10 cm. V klidu je sosák spirálovitě stočený na spodu hlavy. Existuje však také skupina tzv. zubokřídleců, kteří mají krátký sosák, nebo zakrnělé ústní ústrojí. Mohutně vyvinutá prsní hrudní svalovina jim umožňuje migrovat na velké vzdálenosti (Novák a Pokorný 2003). Anatomie jejich křídel jim také umožňuje velmi rychlý let. Z této čeledi pochází nejrychleji létající motýl, který je schopen dosáhnout rychlosti letu až 53 kilometrů za hodinu (Landman 2013).

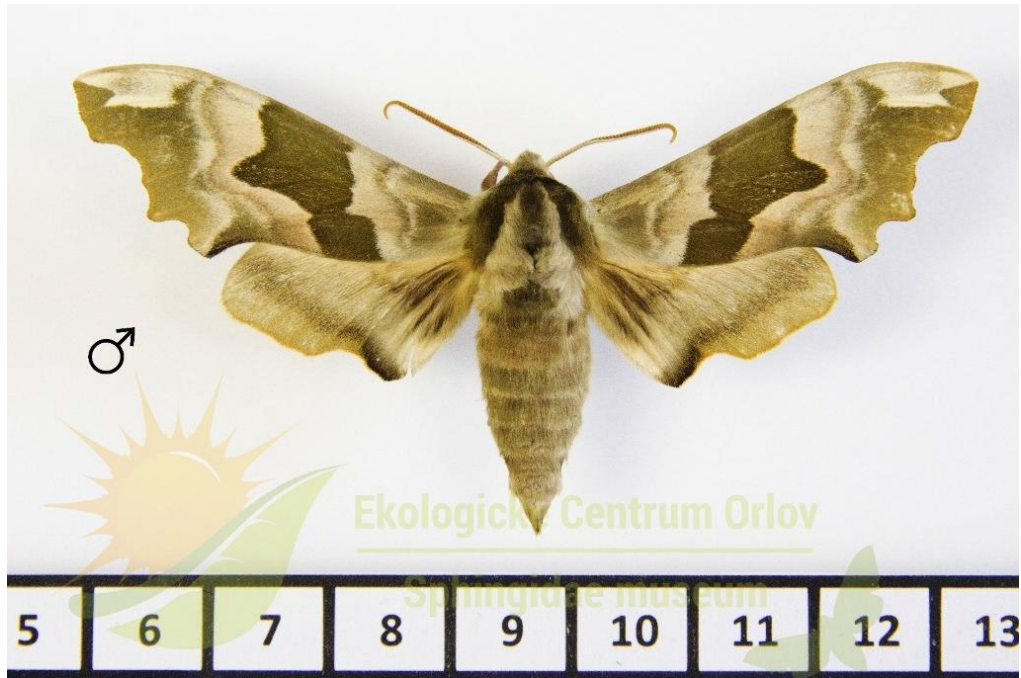
Housenky této čeledi jsou tlusté, válcovité, s hustě příčně rýhovanými tělními články. Na hřbetě osmého článku se většinou nachází prohnutý trnovitý výběžek. Kuklení housenek některých druhů probíhá v zemi v pevné hliněné komůrce. Tato komůrka může být uložena i velmi hluboko. Jiné druhy se naopak vyznačují tím, že jejich kukla leží na povrchu ve volném zářevku v drnu nebo hrabance (Novák a Pokorný 2003).

Na světě je známo přes 3 000 druhů patřících do této čeledi, nacházejících se převážně v tropických oblastech všech kontinentů. Na území Evropy bylo pozorováno 33 druhů a v České republice 20. Některé druhy však pouze jako migranti a jejich výskyt není spolehlivě doložen (Bělín 2013).

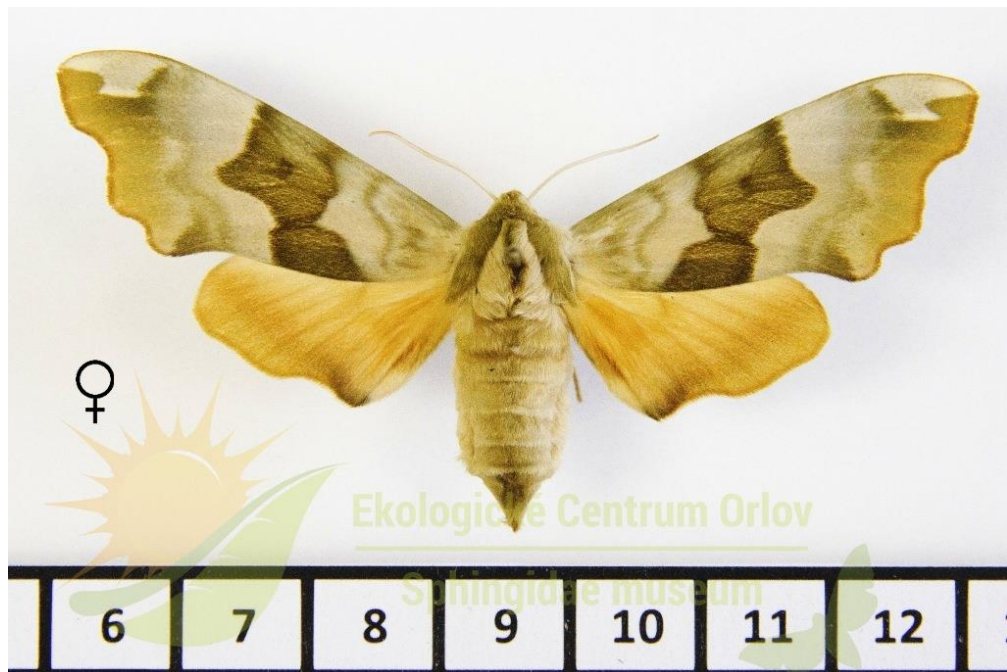
3.6.1.1 Lišaj lipový (*Mimas tiliae*)

Lišaj lipový (*Mimas tiliae*) je druh motýla s převážně noční aktivitou. Jedná se o větší motýly a rozpětí jejich křídel se obvykle pohybuje mezi 60-75 mm. Housenky těchto motýlů jsou zelené se žlutavě bílými tečkami a podélnými žlutými pruhy na bocích (Carter 2006). U dospělých motýlů je zbarvení i kresba předních křídel velmi variabilní. Téměř vždy je však svrchní strana křídel zelená s růžovým nádechem a olivově černým páskem. Vnější i zadní okraj křídel je nepravidelně prolamovaný. Nejčastěji se lišaj lipový nachází v parcích, lipových alejích, na polích a loukách. Je to však velmi nestálý motýl a každý rok osidluje jiná stanoviště (Gerstmeier a Zepf 1995).

První jedinci se začínají líhnout už během prvních teplých májových dnů. Pokud se však počasí zhorší, vyčkávají v klidu, než nastanou teplé dny a noci. Samičky obvykle kladou vajíčka jednotlivě nebo po dvojicích, nejčastěji na spodní stranu listů lip. Housenky si před kuklením a přezimováním vytváří v zemi oválnou komůrku. Stěny této komůrky zpevňují vlákny a slinami. Lišaj lipový je motýl, který se hojně vyskytuje v celé Evropě až po severní Skandinávii a jižní Finsko. Žije však také ve velké části Asie např. na Sibiři, v Rusku, v Japonsku a dalších zemích (Reichholfová-Riehmová 2005).



Obr. 1 Lišaj lipový (*Mimas tiliae*) samec (foto: Sphingidae Museum)



Obr. 2 Lišaj lipový (*Mimas tiliae*) samice (foto: Sphingidae Museum)

3.7 Sphingidae Museum

Veškeré vzorky pro laboratorní analýzy byly poskytnuty ze sbírek muzea lišajovitých (*Sphingidae Museum*) nacházejícím se v obci Orlov v okrese Příbram. Toto muzeum je součástí Ekologického centra Orlov o. p. s. a je majitelem druhé největší a nejucelenější sbírky lišajů na světě. V současné době je v muzeu k vidění více než 200 000 exemplářů, které zahrnují 1 325 druhů. Na světě existuje pouze jedna sbírka větší než tato, a ta se nachází v Muzeu přírodních věd v Londýně. Samotný tým muzea se podílel na objevení a popsání dvaceti šesti nových druhů lišajů. Odborný tým muzea svou prací přispívá k celosvětovému vědeckému monitorování výskytu hmyzu, snaží se objevovat dosud nepopsané druhy a předávat své poznatky širší veřejnosti. Důkazem jejich kvalit a vědeckého přínosu v oblasti entomologie mohou být projekty realizované na zakázku Ministerstva zemědělství Kapverd, kdy byl v roce 2002 proveden průzkum biodiverzity lišajů na Kapverdských ostrovech. Tým muzea také prováděl průzkum biodiverzity lišajů v roce 2004 v národních parcích Senegal a Guinei a také se pravidelně účastní entomologických expedic po celém světě. *Sphingidae Museum* se věnuje také ediční činnosti a to především formou vydávání odborného časopisu „The European Entomologist“ (evropský entomolog), ve kterém popisují nové druhy nejen z čeledi lišajovitých, ale také se věnují případovým studiím týkajících se revize taxonomie a výsledným zprávám z expedic (*Sphingidae Museum* 2011).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Izolace DNA z tkání

Veškeré vzorky pro analýzy nám poskytli pracovníci muzea *Sphingidae Museum*. Jednalo se o končetiny motýlů, dodané s přesným označením druhu, čísla vzorku a místa odchytu daného motýla, jemuž končetina patřila. Izolaci jsme prováděli pomocí komerčně dodávaného *Genomic DNA Mini Kitu* od společnosti Geneaid, určenému k izolaci DNA z tkání, a postupovali jsme podle přiloženého návodu. Do zkumavky jsme vložili vzorek (končetinu motýla), přidali jsme 200 μ l GT pufru a vzorek homogenizovali. Poté jsme přidali 15 μ l proteinázy K, vzorek jsme promíchali s použitím vortexu a nechali inkubovat v termostatu přes noc na 60°C. Druhý den, po vytažení zkumavek z termostatu, jsme vzorky cca 10 až 15 sekund centrifugovali. Centrifugaci jsme prováděli kvůli možné kondenzaci pufru na víčku zkumavky a také abychom předešli kontaminaci z důvodu prudkého otevření zkumavky způsobeného zvýšeným tlakem uvnitř zkumavky. Dále jsme přidali 200 μ l GBT pufru a nechali opět inkubovat v termostatu na 60°C po dobu 30 minut. Opět jsme vzorek 10 až 15 sekund centrifugovali a poté přidali 200 μ l ethanolu. Směs jsme napipetovali na silikátovou kolonu a nechali centrifugovat 1 minutu při 8 200 otáčkách. Odpad z kolony jsme vylili a přidali 400 μ l pufru W1 a nechali opět centrifugovat za stejných podmínek. Znovu jsme odpad vylili a přidali 600 μ l promývacího pufru (WASH BUFFER) a opět nechali centrifugovat. Odpad z centrifugace jsme vylili a nechali jsme centrifugovat samotnou kolonu při 13 000 otáčkách po dobu tří minut, abychom se zbavili i posledních zbytků promývacího pufru a na koloně nám zůstala navázána pouze DNA. Nakonec jsme kolonu vložili do sterilní zkumavky o objemu 1,5 ml a přidali jsme 50 μ l elučního pufru. Takto jsme zkumavku nechali stát cca 5 minut při pokojové teplotě a poté stočili na centrifuze na 8 200 otáček na 1 minutu. Takto jsme dostali zkumavku s izolátem DNA, kterou jsme uchovali při teplotě -20°C pro další analýzu. Úspěšnost izolace jsme ověřili pomocí gelové agaróзовé elektroforézy v 3% gelu a změřili koncentrace jednotlivých vzorků.

4.2 Měření koncentrace DNA

Koncentraci izolované DNA jsme měřili pomocí spektrofotometru *NanoDrop 2 000* od společnosti Thermo Scientific, který měří absorbanci světelného

záření o vlnové délce 260 nm. Čistota DNA je vyjádřena podílem absorbancí záření o 260 nm a 280 nm. Optimální hodnoty A260/A280 se pohybují v rozmezí 1,8-2,0 a pokud jsou naměřené hodnoty v tomto rozpětí, můžeme hovořit o čisté DNA. Koncentrace DNA je udávána v ng/μl. Jako pozadí pro měření (blank) jsme použili eluční pufr z kitu, který jsme používali pro izolaci. Koncentraci jsme měřili z objemu 2 μl.

4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí internetové databáze GENE volně dostupné na stránkách Národního centra pro biotechnologické informace (National Center for Biotechnology Information – NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) jsme si vyhledali sekvence požadovaných genů a exportovali je do „fasta“ formátu pro další použití při navrhování primerů.

4.3.1 Návrh primerů

Primery jsme navrhovali pomocí programu *OLIGO v4.0*, který je k tomuto účelu určen. Při navrhování primerů jsme se snažili dodržet obecná zásady pro design primerů:

- 1) *Délka primeru* – optimální délka primeru se pohybuje mezi 18 a 25 bp.
- 2) *Teplota tání dvouřetězce primer-templát (T_m)* – optimální teplota je okolo 50°C. Teploty obou primerů by měly být podobné a neměly by se lišit o více než 1°C.
- 3) *Teplota annealingu (T_a)* – měla by se pohybovat v rozpětí 55 až 75°C. Nejčastěji však T_a jednotlivých primerů dosahuje 55 až 60°C.
- 4) *Specifita primeru* – pokud je to možné, snažíme se o co největší komplementaritu na 3' konci. Sekvence primeru by také neměla obsahovat repetitivní sekvence aby nedocházelo k nasedání primeru na více místech a netvořily se tak nespecifity.
- 5) *Obsah G+C bází* – optimálně by se měl pohybovat v rozpětí 55-56 %.
- 6) *Konce primeru* – začátek i konec by měl obsahovat 1 až 2 purinové báze (A,G). Na 3' konci primeru by pokud možno měl být G nebo C, což dodá primeru pevnější vazbu na templát.

4.3.2 Seznam použitých primerů

Tab. 5 Seznam použitých primerů pro PCR

Gen	Primer	Sekvence primeru 5' - 3'	Velikost [bp]	GC [%]	Velikost PCR [bp]
CAD	CAD_F1	TGG AAG TTC TAT GAA RAG TGT CG	23	43,5	708
	CAD_R1	AAG TAC AAT CTG TCR CTC ATG TC	23	43,5	
	CAD-man-f	GCC GAG TTT GGA TTA TTG TGT TGT C	25	44,0	
	CAD-man-r	ATC GAT AGT ATG ACC CCG CTA GGG CG	26	57,5	
EF-1 α	Oscar-6143	GGC CCA GGA AAT GGG CAA GGG	21	66,7	846
	Bosie-6144	CCG GCG ACG TAA CCA CGA CGC	21	71,4	
	EF-1 α _F2	CTC CTG GAC ACA GAG ATT TCA TCA A	25	44,0	602
	EF-1 α _R2	CAC AGA CTT GAC TTC AGT GGT GAT G	25	48,0	
DDC	DDC_F1	AGG CTG GTG GTG TTA TTC AGG	21	52,4	531
	DDC_R1	GCC ACA TAG CTG AGC AAT CAA	21	47,6	
	DDC_F2	CGC TTG TAG CAC TTC TTG GTG	21	52,4	528
	DDC_R2	CAT TAA ATG CGT CAA CGA TCC	21	42,9	
WG	wgL	GCA GTT CCG GAA CCG GMG NTG GAA YTG	27	66,7	
	wgR	GGA CAT GCC GTG GCA CTT RCA YTC YTG	27	62,9	
COI	Lep_F1	ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA TTG G	25	28,0	658
	Lep_R1	TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAT CA	26	30,8	
	MLep_F1	GCT TTC CCA CGA ATA AAT AAT A	22	31,8	
	MLep_R1	CCT GTT CCA GCT CCA TTT TC	20	50,0	

Pozn.: CAD-man-f, CAD-man-r, Oscar-6143 a Bosie-6144 převzato z (Rubinoff et al. 2012); wgL a wgR převzato z (Bonacum et al. 2001); Lep_F1 a Lep_R1 převzato z (Hebert et al. 2004); MLep_F1 a MLep_R2 převzato z (Hajibabaei et al. 2006).

Kombinaci primerů MLep_F1 a MLep_R1 jsme nepoužívali, protože při této kombinaci vznikají fragmenty pouze o velikosti cca 60 bp.

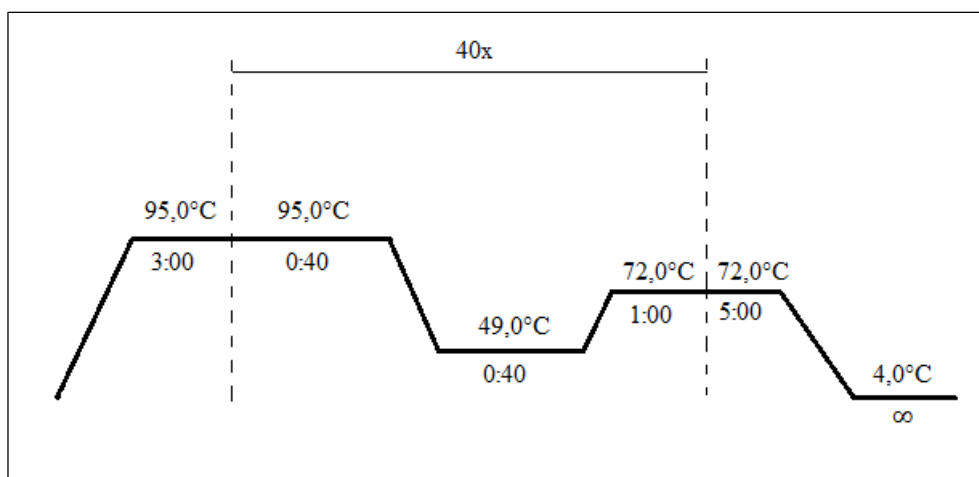
4.3.3 Reakční směs pro PCR

Tab. 6 Složení reakční směsi pro PCR

dH ₂ O	PPP mix	Primer F	Primer R	DNA	Celkem
3,6 μl	5,0 μl	0,2 μl	0,2 μl	1,0 μl	10,0 μl

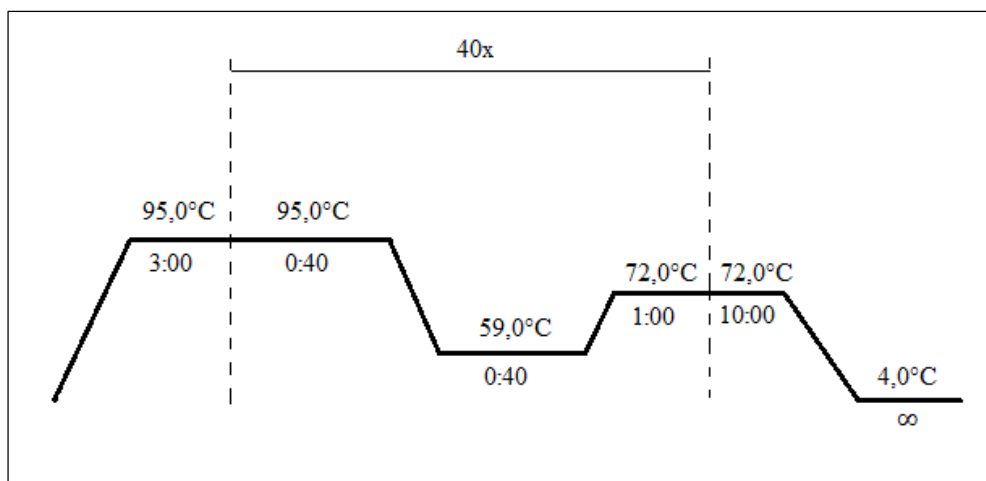
Reakční směs pro PCR jsme míchali v PCR zkumavkách o objemu 0,2 ml. Z důvodu úspory času a zjednodušení postupu jsme se rozhodli použít komerčně dodávaný PPP mix, který již obsahuje PCR pufr, směs nukleotidů, Mg²⁺ ionty, polymerázu a nanášecí marker. Výhoda tohoto PPP mixu také spočívá v tom, že před nanášením vzorků na gel již není potřeba každý vzorek smíchat s nanášecím markerem (např. sacharózou).

4.3.4 Teplotní profily



Obr. 3 Teplotní profil pro PCR mitochondriálního genu COI

Teplotní profil, který jsme použili pro amplifikaci jaderných genů, se liší v teplotě nasedání primerů o 10,0°C.



Obr. 4 Teplotní profil pro PCR jaderných genů

4.4 Gelová elektroforéza

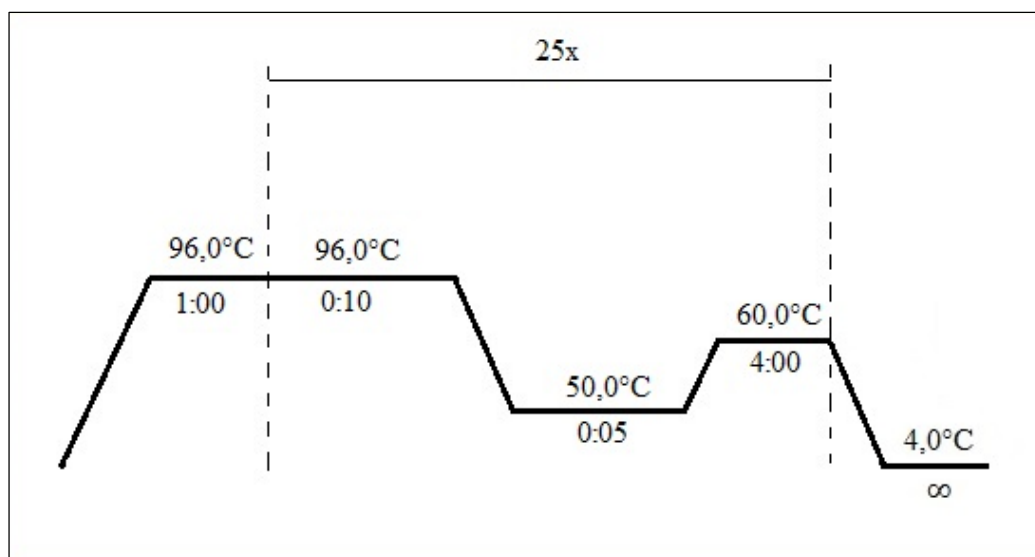
Pro gelovou elektroforézu jsme používali 3% agarózový gel v trisborátovém (TBE) elektroforetickém pufru a fragmenty byly vizualizovány pomocí ethidium bromidu (EtBr) a ultrafialového záření. Gel jsme připravovali rozvařením 1,8 g práškové agarózy v 60 ml TBE pufru a do gelu jsme přidávali 12 μ l EtBr. Do jamek jsme vždy nanášeli vzorek v objemu 4 μ l. Nanášecí pufr jsme nepoužívali, protože ten již byl obsažen v PPP mixu v PCR reakční směsi. Jako hmotnostní standard jsme používali komerčně dodávaný marker M100, který obsahuje fragmenty o velikostech 100, 200, 300, 400, ..., 1000 bp. Elektroforézu jsme nechali probíhat po dobu 20-30 minut při napětí 120 V.

4.5 Sekvence PCR produktů

Sekvenační reakční směs jsme míchali pomocí komerčně dodávaného kitu *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* od společnosti Applied Biosystems a směs jsme míchali na objem 10 μ l. Pro amplifikaci řetězce DNA jsme použili termální cykler *Veriti Thermal Cycler* také od společnosti Applied Biosystems. Amplifikace probíhala podle níže uvedeného teplotního profilu. Poté jsme DNA purifikovali pomocí *BigDye® XTerminator™ Purification Kitu* od Applied Biosystems dle návodu od výrobce. Samotnou sekvenaci jsme prováděli klasickou Sangerovou metodou pomocí analyzátoru *3 500 Genetic Analyzer*, který také vyrábí společnost Applied Biosystems. K vyhodnocování sekvencí jsme používali programy *SeqScape Software v2.7*, který je součástí softwarového vybavení analyzátoru a *MEGA7*, který je volně dostupný na internetu (dostupné na <http://www.megasoftware.net/>).

Tab. 7 Složení sekvenační reakční směsi

dH₂O	Pufr	Mix nukleotidů	Primer	DNA	Celkem
7,39 μl	1,75 μl	0,5 μl	0,16 μl	0,2 μl	10,0 μl

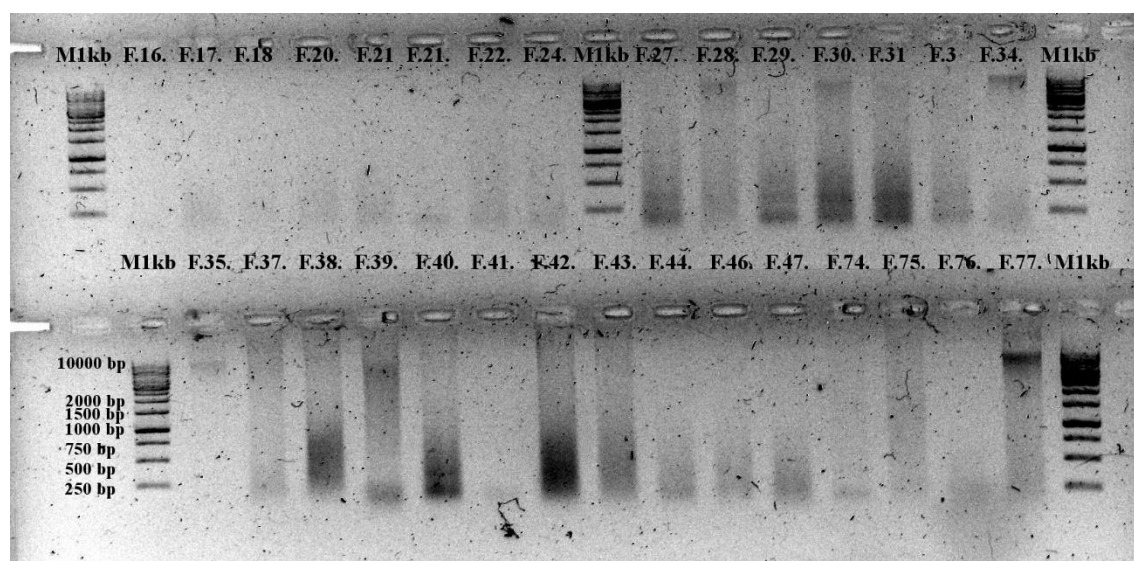


Obr. 5 Schéma teplotního profilu pro sekvenační reakci

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Izolace DNA z tkání

Izolovanou genomovou DNA z motýlích končetin jsme ověřili pomocí gelové elektroforézy na 1% agarózovém gelu s vizualizací fragmentů pomocí EtBr a UV záření. 1% agarózový gel jsme zvolili proto, že fragmenty genomové DNA jsou velmi velké a v 3% gelu by se obtížně separovaly.



Obr. 6 Foto gelu izolované genomové DNA

Jako velikostní standard jsme použili marker M1kb, který má nižší rozlišovací schopnost, než marker M100, ale má větší rozsah velikostí a zobrazuje fragmenty o velikostech od 250 bp až po 10 000 bp. U některých vzorků (např. F.16.-F.24.) je intenzita fragmentů na agarózovém gelu podstatně slabší. Tento fakt může být způsobený stářím vzorků, ze kterých byla genomová DNA izolovaná. Stáří se projevilo na nižší koncentraci izolované DNA, a proto jsou fragmenty slabší. Vznik smírů u některých vzorků může dokazovat degradaci DNA. Ta mohla být způsobená např. mechanickým poškozením biologického materiálu, ze kterého byla DNA izolována, poškozením DNA během preparace motýlů např. nadměrným působením UV záření, nedokonalým uskladněním jednotlivých exemplářů motýlů, kdy mohlo dojít k zaplísnění apod.

5.2 Měření koncentrace DNA

Tab. 8 Naměřené koncentrace jednotlivých vzorků a jejich čistota

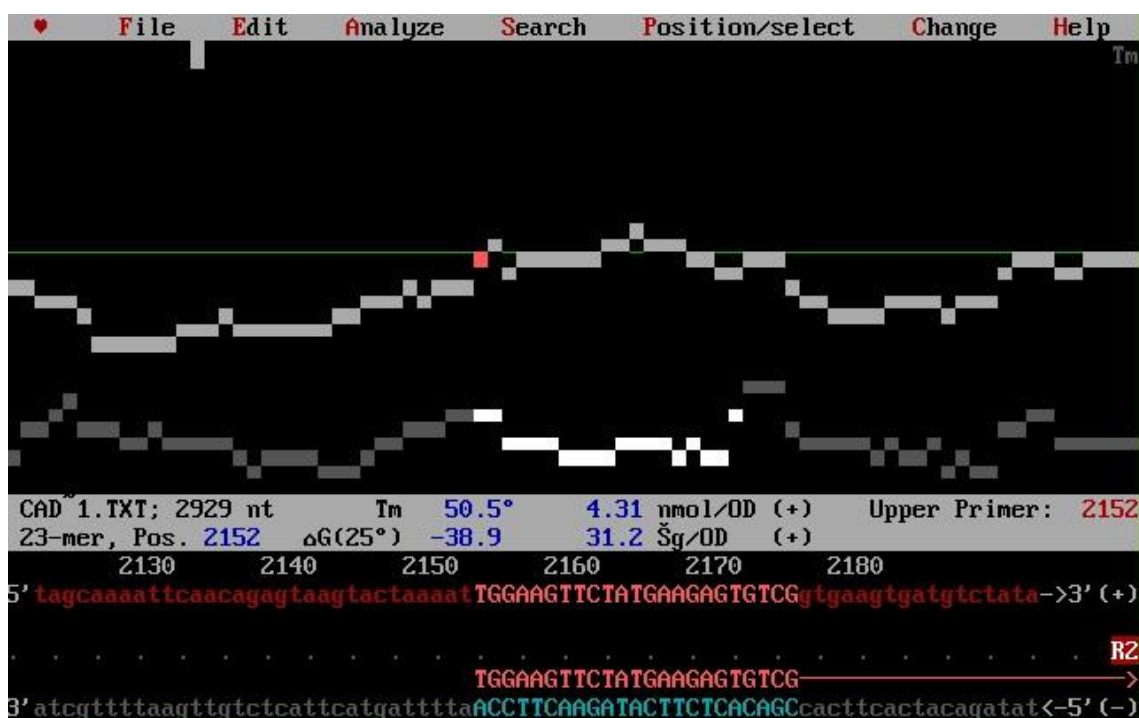
Vzorek	Koncentrace DNA	A260	A280	A260/A280
F.16.	46,90 ng/μl	0,939	0,481	1,95
F.17.	9,30 ng/μl	0,187	0,107	1,74
F.21.	8,00 ng/μl	0,161	0,099	1,63
F.22.	5,80 ng/μl	0,117	0,065	1,80
F.28.	10,00 ng/μl	0,200	0,104	1,93
F.47.	8,30 ng/μl	0,165	0,083	1,99
F.29.	4,70 ng/μl	0,094	0,048	1,98
F.30.	8,70 ng/μl	0,173	0,086	2,02
F.31.	7,50 ng/μl	0,150	0,081	1,85
F.33.	3,30 ng/μl	0,066	0,040	1,64
F.35.	10,50 ng/μl	0,209	0,109	1,92
F.38.	5,60 ng/μl	0,112	0,062	1,82
F.40.	5,10 ng/μl	0,103	0,059	1,75
F.41.	4,90 ng/μl	0,097	0,060	1,62
F.43.	4,30 ng/μl	0,087	0,039	2,24
F.18.	9,00 ng/μl	0,180	0,087	2,07
F.27.	11,00 ng/μl	0,220	0,103	2,15
F.37.	8,60 ng/μl	0,172	0,078	2,20
F.46.	8,70 ng/μl	0,175	0,081	2,16
F.34.	7,20 ng/μl	0,144	0,072	2,01
F.23.	9,40 ng/μl	0,188	0,085	2,21
F.25.	12,90 ng/μl	0,259	0,130	1,99
F.26.	5,10 ng/μl	0,103	0,037	2,81
F.49.	13,10 ng/μl	0,261	0,108	2,42
F.50.	7,20 ng/μl	0,145	0,062	2,34
F.51.	7,80 ng/μl	0,155	0,074	2,09
Průměr	9,34	0,19	0,09	2,01
Sm. Odch.	7,9105	0,1583	0,0809	0,2629
Median	8,15	0,16	0,08	1,99

Naměřené koncentrace DNA u jednotlivých vzorků nebyly vysoké, ale pro naše další analýzy byly však dostačující. Důvodem vyšší koncentrace u vzorku F.16. mohla být lepší homogenizace tkáně při izolaci nebo se mohlo jednat o novější či větší vzorek. Čistota DNA ve vzorcích se pohybovala téměř v optimálních hodnotách, a pokud nabývala vyšších nebo nižších hodnot, mohl být vzorek kontaminován zbytky etanolu z izolace nebo mohl obsahovat další proteiny.

5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

5.3.1 Návrh primerů

Primery jsme navrhovali pomocí softwaru *OLIGO v4.0*. Tento program je sice vyvinut pro operační systém MS DOS, ale pomocí emulátoru prostředí operačního systému *DOSBox 0.74* je možné ho spustit na jakémkoliv počítači. Software je sice už poněkud starší, ale pro účely navrhování primerů je vyhovující.



Obr. 7 Ukázka návrhu primeru CAD_F1 pomocí softwaru *OLIGO v4.0*

Na obrázku 7 je znázorněn průběh návrhu primeru CAD_F1 (označen velkými písmeny). Orientace tohoto primeru je 5'-3'. Dále je znázorněna teplota tání primeru (T_m 50,5°C), počet nukleotidů (23-mer), celkový počet nukleotidů sekvence daného genu (v tomto případě 2 929 nukleotidů – záleží však na použitém datovém souboru), sekvenci samotného primeru (TGGAAGTTCTATGAAGAGTGTCG) a komplementární sekvenci. Také vidíme, že primer začíná na pozici 2 152.

V praxi se osvědčila varianta, kdy na pozici 16 je guanin (G) nahrazen směsnou bází R (A+G). Tato varianta vykazovala lepší výsledky PCR, proto jsme používali právě ji. Výsledná sekvence primeru je TGGAAGTTCTATGAARAGTGTCCT.

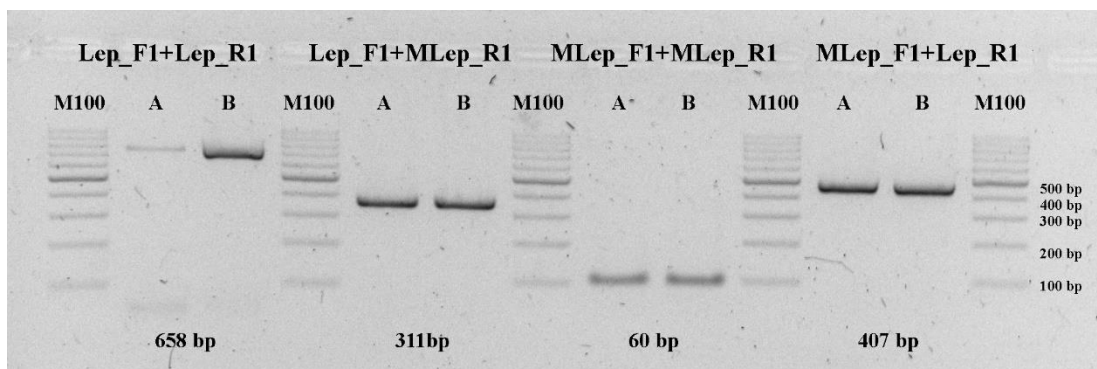
Některé primery jsme převzali z dostupné literatury (zmněno v kapitole 4.3.2 Seznam použitých primerů). Nami navrhované primery jsou zobrazeny v tabulce 9. V této tabulce jsou zaznamenány také hodnoty pro teplotu tání (T_m) a optimální teplotu annealingu pro PCR, které jsme získali z programu OLIGO.

Tab. 9 Navrhované primery pomocí programu OLIGO

Primer	Sekvence primeru 5' - 3'	Velikost [bp]	T_m [°C]	Teplota annealingu [°C]
CAD_F1	TGG AAG TTC TAT GAA RAG TGT CG	23	50,5	51,5
CAD_R1	AAG TAC AAT CTG TCR CTC ATG TC	23	50,4	
EF-1 α _F2	CTC CTG GAC ACA GAG ATT TCA TCA A	25	56,2	58,5
EF-1 α _R2	CAC AGA CTT GAC TTC AGT GGT GAT G	25	55,3	
DDC_F1	AGG CTG GTG GTG TTA TTC AGG	21	53,1	55,1
DDC_R1	GCC ACA TAG CTG AGC AAT CAA	21	53,0	
DDC_F2	CGC TTG TAG CAC TTC TTG GTG	21	53,1	54,7
DDC_R2	CAT TAA ATG CGT CAA CGA TCC	21	52,3	

5.3.2 Seznam použitých primerů

Pro amplifikaci úseku genu *CAD* se nejlépe osvědčila kombinace primerů CAD_F1 + CAD_R1. Při této kombinaci primerů se amplifikovaly fragmenty o velikosti 708 bp. V případě genu *EF-1 α* se ukázala jako nejvhodnější kombinace primerů EF-1 α _F2 + EF-1 α _R2, kdy se amplifikovaly fragmenty o velikosti 602 bp. U genu *COI* jsme využívali kombinace jednotlivých primerů. Nejdříve jsme míchali PCR s použitím primerů Lep_F1 + Lep_R1. Při této kombinaci vznikaly fragmenty o velikosti 658 bp. U některých vzorků však tato kombinace vycházela negativně. U takových jsme pak používali kombinace MLep_F1 + Lep_R1 nebo Lep_F1 + MLep_R1. V těchto případech už PCR vycházela pozitivně a pomocí kombinací dvou menších fragmentů jsme pokryli stejný úsek genu. Kombinaci MLep_F1 + MLep_R1 jsme nepoužívali, protože při této kombinaci vznikal fragment pouze o velikosti 60 bp, což bylo pro nás nepoužitelné (viz Obr. 8).



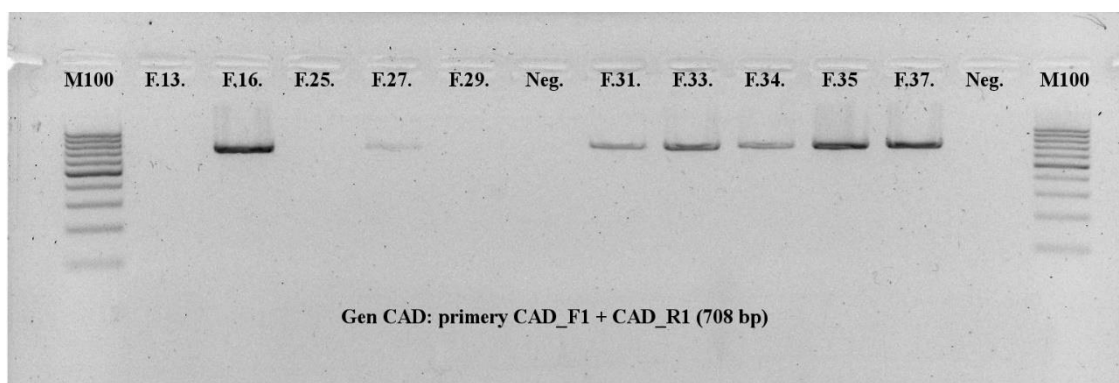
Obr. 8 Jednotlivé kombinace mitochondriálních primerů zobrazené pomocí elektroforézy (A, B – demonstrační vzorky)

5.3.3 Teplotní profily

V případě námi navrhovaných primerů jsme pro optimalizaci metodiky prováděli gradientovou PCR, kdy jsme zjišťovali optimální teplotu pro nasedání primerů. Teploty gradientu se lišily vždy o 1 - 2°C a nabývaly hodnot 56°C, 58°C, 59°C a 60°C. Jako optimální se nakonec ukázala teplota 59°C, při které byly výsledky PCR nejlepší. Zvolili jsme tedy teplotní profily dle Obr. 3 a 4.

5.4 Gelová elektroforéza

5.4.1 CAD

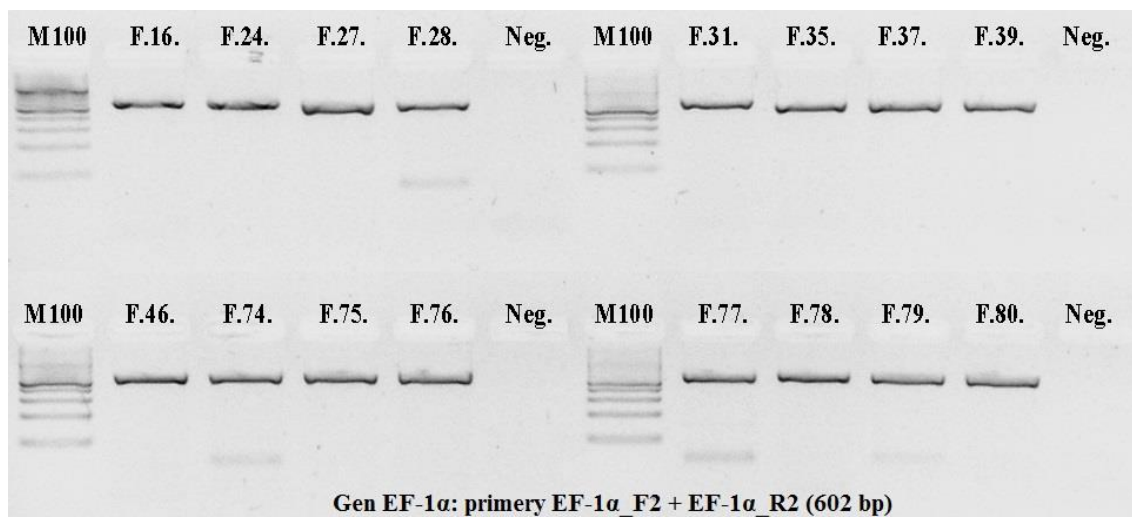


Obr. 9 Výsledky PCR genu CAD ověřené pomocí elektroforézy

V případě vzorků F.13., F.25. a F.29. se nám nepodařilo amplifikovat požadovaný fragment. To mohlo být způsobeno chybou při míchání reakční směsi, nedostatečnou kvalitou izolované DNA, nebo chybou v pracovním postupu (např. při pipetování).

U vzorku F.27. se nám vizualizoval pouze slabý fragment, ale pro sekvenaci bylo množství amplifikované DNA dostačující. Negativní kontroly (Neg.) nám dokazují, že jsme pracovali bez kontaminace.

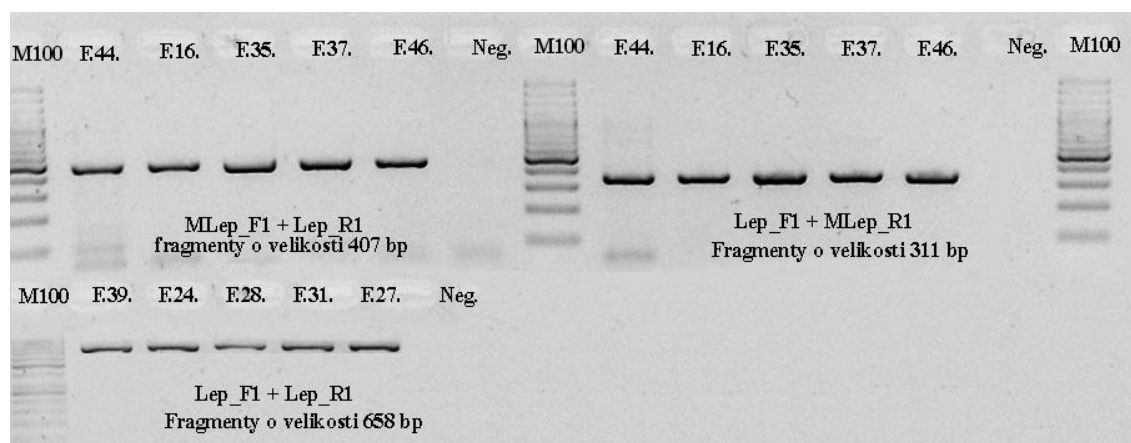
5.4.2 *EF-1 α*



Obr. 10 Výsledky PCR genu *EF-1 α* ověřené pomocí elektroforézy

V tomto případě byly použity primery EF-1 α _F2 a EF-1 α _R2 a výsledky PCR ověřené pomocí elektroforézy byly bez problémů. Slabě viditelné fragmenty u vzorků F.28., F.74., F.77. a F.79. o velikosti méně než 100 bp jsou zbytky primerů z reakční směsi, které mohou tvořit dimery a jsou viditelné na gelu. Negativní kontroly (Neg.) opět potvrzují, že jsme pracovali bez kontaminace.

5.4.3 COI

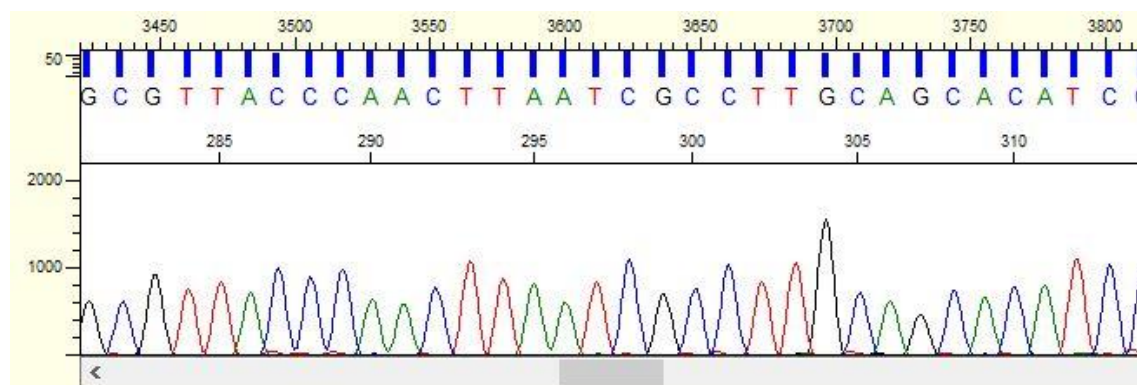


Obr. 11 Výsledky PCR genu COI ověřené pomocí elektroforézy

V případě genu *COI* jsme prováděli PCR se třemi kombinacemi primerů. Všechny tyto kombinace fungovaly bez problémů a nám se podařilo amplifikovat potřebné fragmenty. Kombinace MLep_F1 + Lep_R1 a Lep_F1 + MLep_R1 jsme volili pouze v případě, že kombinace Lep_F1 + Lep_R1 vycházela na gelu negativně. Opět negativní kontroly dokazují, že jsme pracovali bez kontaminace.

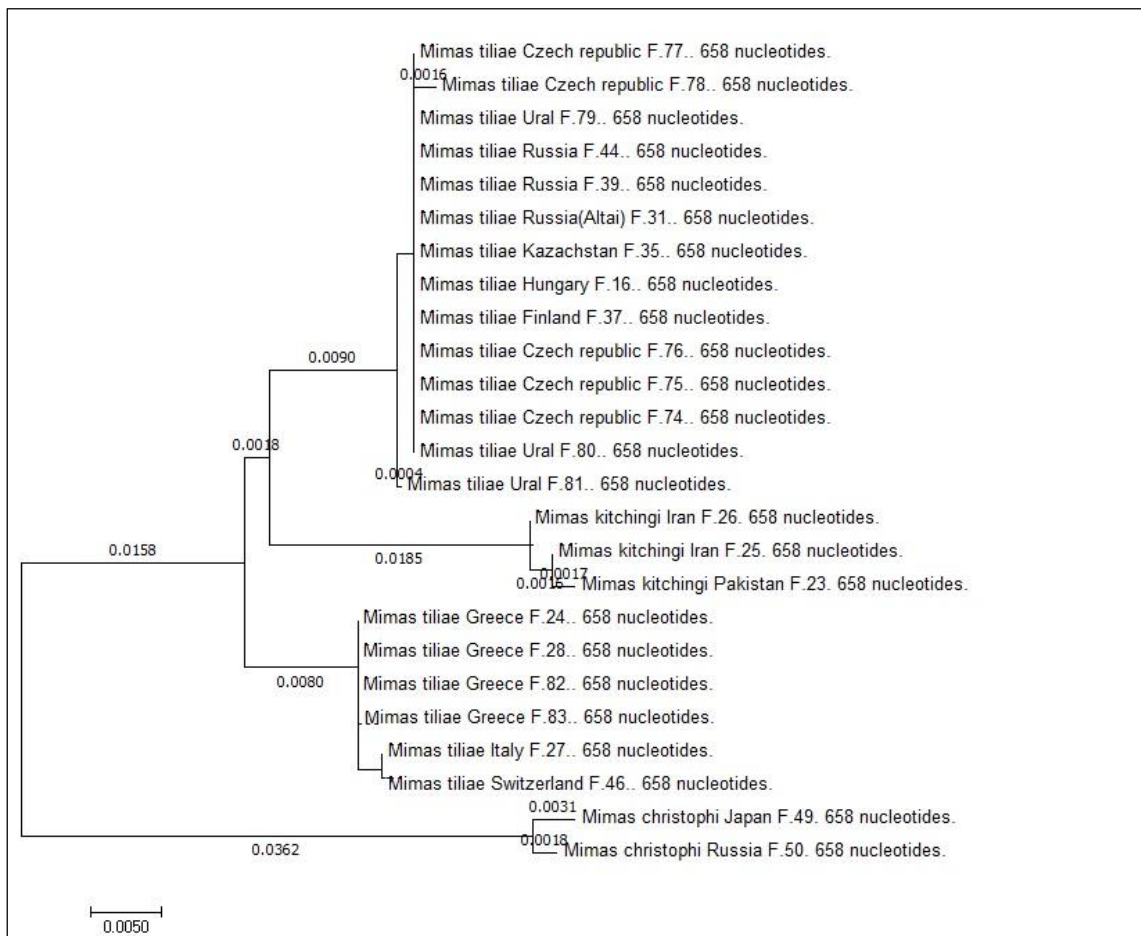
5.5 Sekvence PCR produktů a vyhodnocení výsledků

Úpravu dat ze sekvenátoru (srovnání sekvencí na stejný počet nukleotidů) jsme prováděli v programu *SeqScape Software v2.7*, který je součástí softwarového vybavení analyzátoru a není volně dostupný na internetu. Pro další zpracování sekvencí (porovnání odlišných bází a tvorbu fylogenetických stromů) jsme používali program *MEGA7*.



Obr. 12 Ukázka analýzy dat ze sekvenátoru pomocí programu *SeqScape Software v2.7*

5.5.1 COI



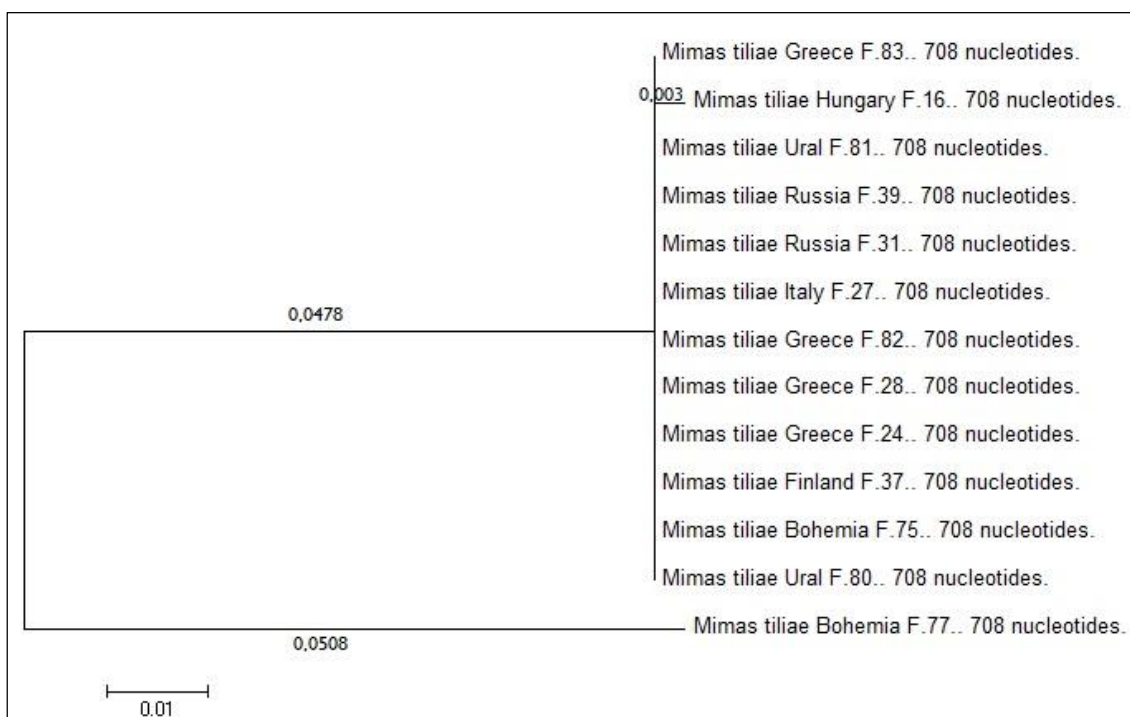
Obr. 14 Rozdělení poddruhů pomocí genu COI

Pomocí mitochondriálního genu pro podjednotku 1 cytochrom c oxidázy se nám podařilo potvrdit rozdělení vzorků lišaje lipového do čtyř skupin. Číselné hodnoty uvedené na jednotlivých větvích nám vyjadřují, o kolik se jednotlivé skupiny liší od referenční sekvence pro tento druh. Zároveň po sečtení těchto hodnot můžeme zjistit, o kolik procent se liší jednotlivé skupiny navzájem. Procentuální rozdíl mezi skupinami dostaneme tak, že sečteme všechny hodnoty na horizontálních větvích mezi danými skupinami a výsledek vynásobíme stem (např. rozdíl mezi vzorkem F.77. a F.50. je $(0,009 + 0,002 + 0,016 + 0,036 + 0,002) \cdot 100 = 6,5 \%$).

Tab. 11 Hodnoty vzájemných rozdílů mezi jednotlivými populacemi

Poddruh	1.	2.	3.	4.
1. východní populace				
2. západní populace	0,019			
3. <i>Mimas kitchingi</i>	0,027	0,028		
4. <i>Mimas christophi</i>	0,065	0,060	0,072	

5.5.2 CAD



Obr. 15 Rozdělení poddruhů na západní a východní populaci pomocí genu CAD

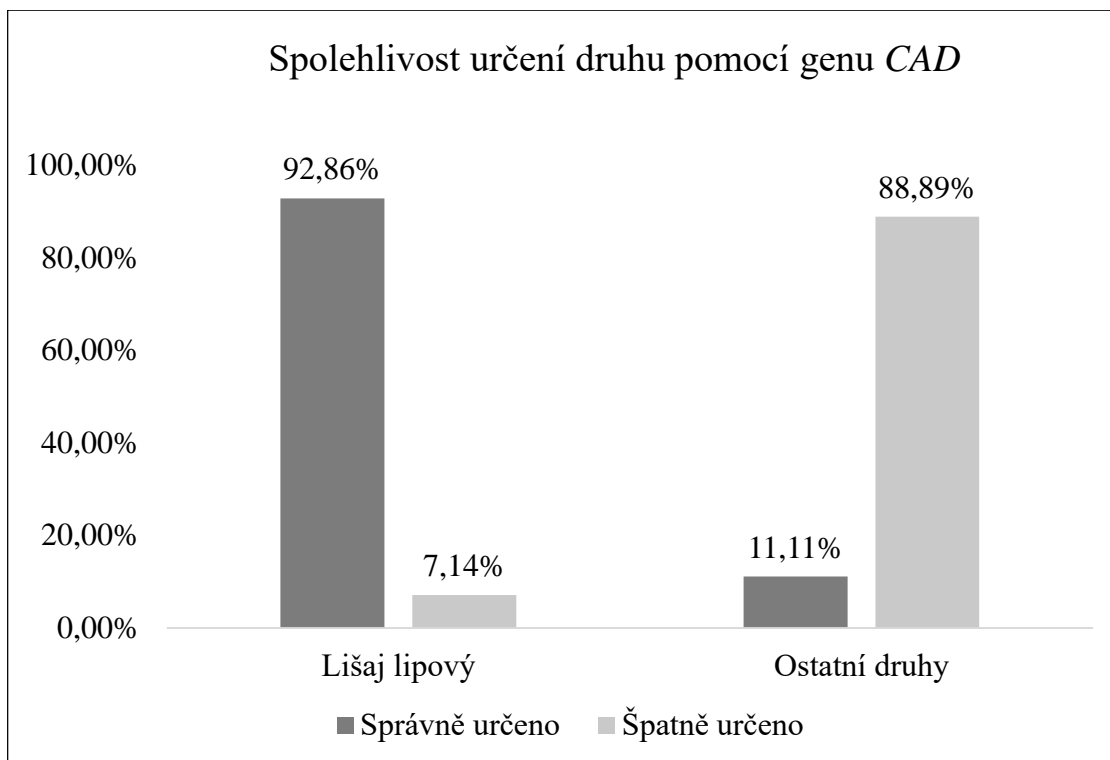
V případě jaderného genu *CAD* se nepodařilo prokazatelně rozdělit vzorky na zástupce západní a východní populace, protože zástupci jak východní tak i západní populace byli zařazeni do jedné skupiny. Vzorek F.77., patřící do východní populace, byl navíc zařazen do zcela jiné větve a lišil se od ostatních vzorků o 10,16 %. Při kontrole sekvence pomocí databáze *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) bylo zjištěno, že se pravděpodobně jedná o jiný druh (viz příloha 5). To že by se jednalo o jiný druh však můžeme vyvrátit, protože při identifikaci vzorku F.77. pomocí genů *COI* a *EF-1α* se to nepotvrdilo a vzorek byl určen správně. Tato chyba mohla pravděpodobně vzniknout během práce se vzorkem, kdy mohlo dojít ke kontaminaci, nebo při neočekávané chybě

během sekvenace. V příloze 6 je znázorněno porovnání sekvence vzorku F.77. s referenční sekvencí pro jaderný gen *CAD* pomocí programu *Clustal Omega*. Z porovnání také můžeme vidět, že špatné zařazení není způsobeno neúplnou sekvenací, nebo směsnými bázemi.

Z tohoto můžeme předpokládat, že jaderný gen *CAD* není vhodný k rozlišování zástupců druhu lišaj lipový (*Mimas tiliae*) na příslušníky východní a západní populace. Bohužel k rozdělení do dalších dvou skupin (*kitchingi* a *christophi*) a případné porovnání jednotlivých skupin jsme v době laboratorní analýzy neměli data o rozdělení vzorků, proto v této analýze chybí. Vzorky byly vybírány náhodně a výběr neobsahoval zástupce těchto dvou skupin.

Zároveň jsme pomocí ověřování sekvencí v databázi *BLAST* zjistili, že pomocí sekvence jaderného genu *CAD* lze identifikovat jedince druhu lišaj lipový (*Mimas tiliae*) s přesností 92,86 % (viz obr. 16). Nižší procentuální úspěšnost byla způsobena zařazením chybného vzorku F.77, který byl nesprávně identifikován (viz příloha 5). Pro identifikaci jiných druhů z čeledi lišajovitých (*Sphingidae*) se však tento gen jeví jako nevhodný, protože pouze u 11,11 % vzorků byl určen správný druh.

Pro jednoznačné určení, zda gen *CAD* je nebo není vhodný k druhové identifikaci, by bylo potřeba provést rozsáhlejší studii, která by zahrnovala více druhů z více čeledí a doplnění o druhy *kitchingi* a *christophi*, což je námětem pro další práci.

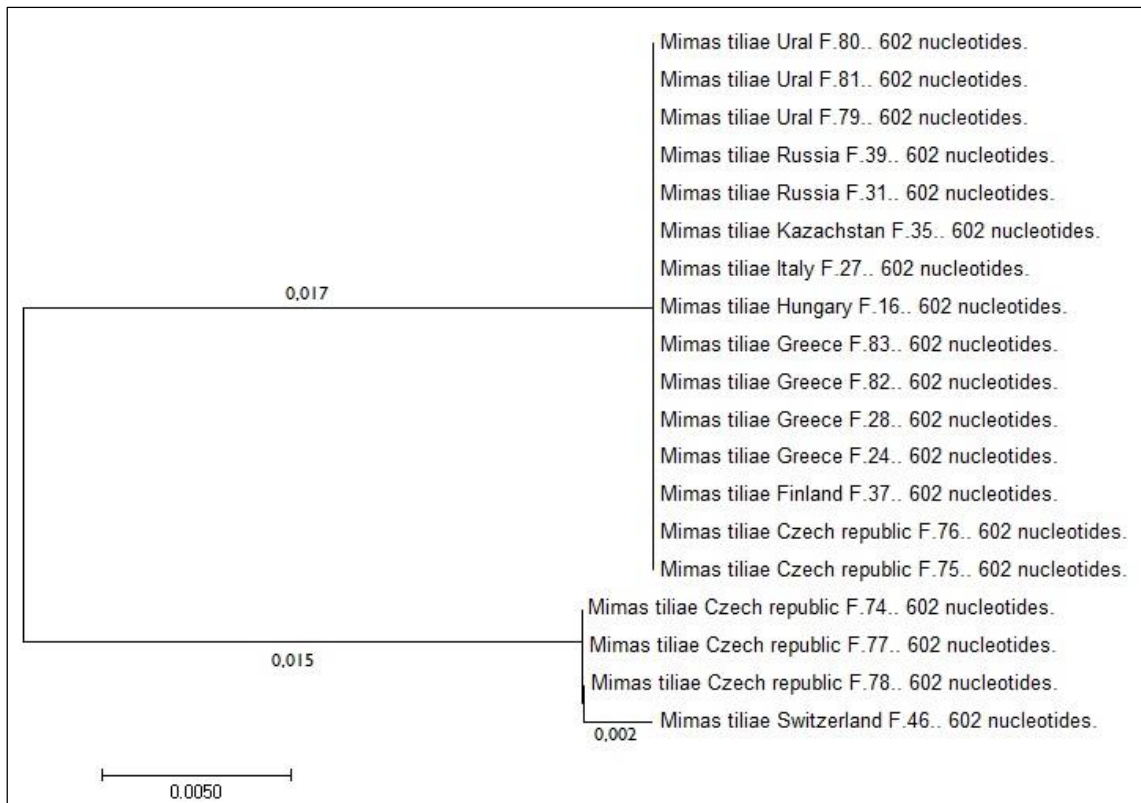


Obr. 16 Graf spolehlivosti pro druhovou identifikaci pomocí jaderného genu *CAD*

5.5.3 *EF-1α*

Ani pomocí jaderného genu *EF-1α* se nám nepodařilo rozdělit poddruhy lišaje lipového na jednotlivé populace (východní a západní). Na obrázku 17 je znázorněno, že se sice jednotlivé vzorky rozdělily do dvou skupin s rozdílem sekvencí 3,2 %, ale v obou skupinách byly zastoupeny vzorky jak z východní, tak i západní populace. Navíc se zvláště do obou skupin oddělily vzorky se stejným původem (Česká republika), u kterých bychom předpokládali, že budou příbuzné a budou tak patřit do stejné skupiny. Z těchto výsledků usuzujeme, že gen *EF-1α* není pro identifikaci jedinců východní a západní populace vhodný.

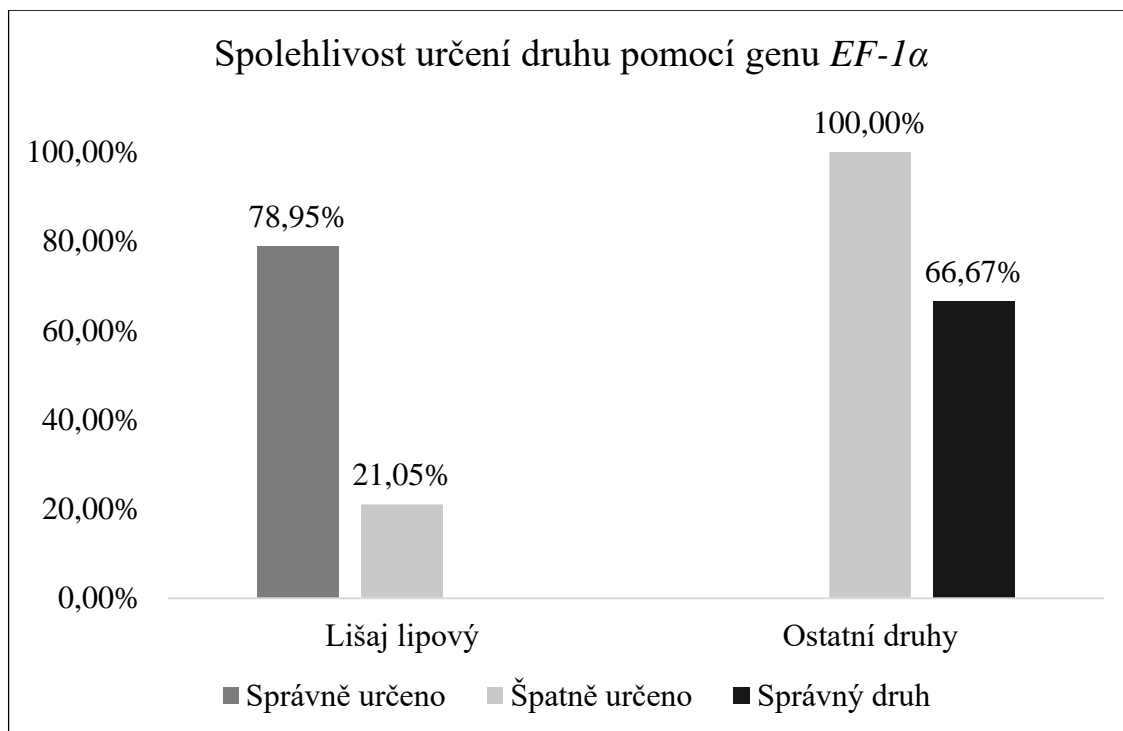
Bohužel stejně jako v případě genu *CAD* nebylo možno porovnat další dvě populace (*kitchingi* a *christophi*). Tato chyba byla také způsobená náhodným výběrem vzorků pro analýzu z důvodu absence rozdělení vzorků v době laboratorní analýzy. Pro jednoznačné určení vhodnosti použití genu *EF-1α* by bylo potřeba provést další testování se zástupci populací *kitchingi* a *christophi*.



Obr. 17 Rozdělení poddruhů na západní a východní populaci pomocí genu *EF-1α*

Pomocí databáze *BLAST* jsme testovali, zda je sekvence jaderného genu *EF-1α* vhodná pro druhovou identifikaci. Zjistili jsme (viz obr. 18), že v případě identifikace jedinců lišaje lipového (*Mimas tiliae*) byl v 78,95 % případů určen správný druh. V 21,05 % však byl druh identifikován špatně. Z těchto údajů opět nelze jednoznačně určit, zda je gen *EF-1α* vhodný pro druhovou identifikaci, protože procento úspěšnosti správné identifikace je relativně nízké. Bylo by však potřeba otestovat více vzorků a porovnat, zda by byla úspěšnost vyšší nebo nikoliv.

Při identifikaci jiných druhů z čeledi lišajovitých bylo 100 % vzorků identifikováno špatně. V 66,67 % byl sice správně určen druh jedince, rodová specifikace však byla určena chybně.



*Obr. 18 Graf spolehlivosti pro druhovou identifikaci pomocí jaderného genu *EF-1α**

6 ZÁVĚR

V této diplomové práci jsme se zabývali ověřováním, zda jsou jaderné geny *CAD* a *EF-1a* vhodné pro druhovou identifikaci u motýlů (*Lepidoptera*). Od pracovníků muzea lišajů (*Sphingidae Museum*) jsme obdrželi jak jednotlivé vzorky pro izolaci DNA, tak také jejich rozdělení druhu lišaje lipového (*Mimas tiliae*) do čtyř poddruhů (toto rozdělení jsme však obdrželi na poslední chvíli, což se projevilo zkreslenými výsledky). Rozdělení jedinců probíhalo na základě morfologické stavby genitálu a také geografického původu. Naším úkolem bylo pomocí výše zmíněných genů toto rozdělení potvrdit nebo vyvrátit, a případně určit vhodnost těchto genů pro druhovou identifikaci. Pomocí výsledků analýzy sekvence mitochondriálního genu *COI* se nám povedlo toto rozdělení do čtyř různých populací potvrdit. Někteří vědci a entomologové však pouhou analýzu mitochondriálního genomu neuznávají, protože zastávají teorii, že mitochondrie je v organismu parazitárního původu s vlastním genomem a tento genom prodělává vlastní evoluci bez ohledu na evoluci studovaného organismu. Proto bylo nutno provést analýzu jaderných genů, v našem případě *CAD* a *EF-1a*.

V případě jaderného genu *CAD* jsme dospěli k závěru, že pomocí něj nelze jednoznačně rozdělit jednotlivé jedince lišaje lipového do subpopulací (východní a západní). Bohužel z důvodu absence rozřazení vzorků do jednotlivých populací v době provádění molekulární analýzy, nebylo možno provést výběr tak, aby v analyzovaných vzorcích byli zástupci všech čtyř skupin (východní a západní populace, *kitchingi* a *christophi*). Rozdělení vzorků jsme obdrželi až po analýze vybraných vzorků a zjistili jsme, že v náhodně vybraném souboru vzorků nebyli zástupci těchto dvou populací. V důsledku toho nebylo možno ověřit, zda je tento gen vhodný pro rozdělení lišaje lipového do zbývajících dvou populací (*kitchingi* a *christophi*). Pro ověření zda je gen *CAD* vhodný pro rozdělení do těchto dvou populací by bylo potřeba provést další testování. Pomocí databáze *BLAST* jsme zjistili, že pomocí genu *CAD* jsme schopni s 92,86% spolehlivostí identifikovat druh lišaj lipový (*Mimas tiliae*). V případě jiných druhů z čeledi lišajovitých (*Sphingidae*) jsme však zjistili, že tato spolehlivost je pouhých 11,11 %. Z tohoto může vyplývat, že gen *CAD* není zcela vhodný pro druhovou identifikaci motýlů z čeledi lišajovitých. Abychom toto však mohli tvrdit s jistotou, bylo by potřeba otestovat více vzorků více různých druhů, aby byl výsledek průkazný.

Také u jaderného genu *EF-1a* jsme dospěli k závěru, že není zcela vhodný pro rozdělení jedinců lišaje lipového na východní a západní populaci. Zda je, nebo není

vhodný pro rozdělení do zbylých dvou populací, jsme nemohli zcela určit opět v důsledku metodické chyby vzniklé špatným výběrem vzorků. K určení vhodnosti tohoto genu pro rozdělení druhu lišaje lipového by bylo potřeba dalšího testování. Ověřováním pomocí databáze *BLAST* jsme dospěli k závěru, že pro druhovou identifikaci druhu lišaj lipový není tento gen zcela vhodný, protože dokáže tento druh identifikovat pouze se spolehlivostí 78,95 %. Co se týče identifikace druhů v této čeledi, ani pro tento účel není jaderný gen *EF-1α* vhodný, protože ani v jednom z testovaných případů nebyl správně určen druh a rod. V 66,67 % byl správně určen druh daného motýla, rodová specifikace však byla chybná.

V rámci řešení této problematiky jsme také převzali další jaderné geny *DDC* (Fang *et al.* 1997) a *WG* (Brower a DeSalle 1998), které by mohly být pro druhovou identifikaci testovány. Bohužel z časových důvodů nebylo možno zcela optimalizovat metodiku pro analýzu těchto genů a další testování by mohlo být předmětem rozšíření tohoto výzkumu.

SEZNAM LITERATURY

BĚLÍN V. (2013): *Noční motýli České a Slovenské republiky*. Vyd. 2. opr. Zlín: Kabourek Ltd., 2013. ISBN 80-86447-16-2.

BENEŠ J. a ČÍŽEK O. (2002): *Motýli České republiky: rozšíření a ochrana*. Praha: Společnost pro ochranu motýlů, 2002. ISBN 9788090321205.

BONACUM J., DESALLE R., O'GRADY P., OLIVERA D., WINTERMUTE J. a ZILVERSMIT M. (2001): "New nuclear and mitochondrial primers for systematics and comparative genomics in Drosophilidae". *Drosophila Information Service*. ročník 84: 201-204 ISSN 0070-7333.

BRDIČKA R. (2001): *Lidský genom na rozhraní tisíciletí*. Praha: Grada, 2001. ISBN 80-247-0118-9.

BROWER A. V. Z. a DESALLE R. (1998): "Patterns of mitochondrial versus nuclear DNA sequence divergence among nymphalid butterflies: the utility of wingless as a source of characters for phylogenetic inference". *Insect Molecular Biology*. ročník 7(1): 73-82 ISSN 0962-1075.

CARTER D. J. (2006): *Motýli*. Vyd. 2. (v Euromedia Group 1.). Praha: Knižní klub, 2006. ISBN 80-242-1536-5.

CLARK K., KARSCH-MIZRACHI I., LIPMAN D. J., OSTELL J. a SAYERS E. W. (2016): "GenBank". *Nucleic Acids Research*. ročník 44(D1): D67-D72 ISSN 0305-1048.

FANG Q. Q., CHO S., REGIER J. C., MITTER C., MATTHEWS M., POOLE R. W., FRIEDLANDER T. P. a ZHAO S. W. (1997): "A new nuclear gene for insect phylogenetics: Dopa decarboxylase is informative of relationships within heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae)". *Systematic Biology*. ročník 46(2): 269-283 ISSN 1063-5157.

GERSTMEIER R. (2013): *Motýli: Nejznámější denní a noční druhy*. Plzeň: Jiří Ševčík nakladatelství, 2013. ISBN 978-80-7291-228-5.

GERSTMEIER R. a ZEPF W. (1995): *Motýli: Denní a noční motýli: Včetně: Housenky a jejich živné rostliny*. Praha: Nakladatelství Svoboda, 1995. ISBN 80-205-0495-8.

HAJIBABAEI M., JANZEN D. H., BURNS J. M., HALLWACHS W. a HEBERT P. D. N. (2006): "DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. ročník 103(4): 968-971 ISSN 0027-8424.

HEBERT P. D. N., CYWINSKA A., BALL S. L. a DEWAARD J. R. (2003a): "Biological identifications through DNA barcodes". *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. ročník 270(1512): 313-321 ISSN 0962-8452.

HEBERT P. D. N., PENTON E. H., BURNS J. M., JANZEN D. H. a HALLWACHS W. (2004): "Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical

skipper butterfly *Astrartes fulgerator*". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. ročník 101(41): 14812-14817 ISSN 0027-8424.

HEBERT P. D. N., RATNASINGHAM S. a DEWAARD J. R. (2003b): "Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species". Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences. ročník 270: S96-S99 ISSN 0962-8452.

IMES R. (1997): *Svět hmyzu: praktický průvodce entomologií*. Praha: Svojtka a Vašut, 1997. ISBN 80-7180-253-0.

KRESS W. J., WURDACK K. J., ZIMMER E. A., WEIGT L. A. a JANZEN D. H. (2005): "Use of DNA barcodes to identify flowering plants". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. ročník 102(23): 8369-8374 ISSN 0027-8424.

KRISHNAMURTHY P. K. a FRANCIS R. A. (2012): "A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation". Biodiversity and Conservation. ročník 21(8): 1901-1919 ISSN 0960-3115.

LANDMAN W. (2013): *Praktická encyklopedie MOTÝLI*. Vyd. 2. Zlín: Graspo CZ, a.s., 2013. ISBN 978-80-255-0720-9.

LESK A. M. (2012): *Introduction to genomics*. Vyd. 2. Oxford: Oxford University Press, 2012. ISBN 978-0-19-956435-4.

LUO A. R., ZHANG A. B., HO S. Y. W., XU W. J., ZHANG Y. Z., SHI W. F., CAMERON S. L. a ZHU C. D. (2011): "Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals". BMC Genomics. ročník 12: 13 ISSN 1471-2164.

MANDELKER L. (2009): *Oxidační stres: role mitochondrií, volných radikálů a antioxidantů*. Praha: Pierot, 2009. ISBN 978-80-7353-135-5.

MAYER F., DIETZ C. a KIEFER A. (2007): "Molecular species identification boosts bat diversity". Frontiers in Zoology. ročník 4: 5 ISSN 1742-9994.

NOVÁK I. a POKORNÝ V. (2003): *Atlas motýlů*. Praha: Paseka, 2003. ISBN 80-718-5569-3.

NUSSE R. (2005): "Wnt signaling in disease and in development". Cell Res. ročník 15(1): 28-32 ISSN 1001-0602 (Print) 1001-0602.

OTOVÁ B. a MIHALOVÁ R. (2012): *Základy biologie a genetiky člověka*. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2109-8.

PARVIZI P. a ASSMAR M. (2007): "Nuclear elongation factor-1 alpha gene a molecular marker for Iranian sandfly identification". Iranian Journal of Public Health. ročník 36(2): 25-37 ISSN 0304-4556.

PILLON Y., JOHANSEN J., SAKISHIMA T., CHAMALA S., BARBAZUK W. B., ROALSON E. H., PRICE D. K. a STACY E. A. (2013): "Potential use of low-copy nuclear genes in DNA barcoding: a comparison with plastid genes in two Hawaiian plant radiations". *Bmc Evolutionary Biology*. ročník 13: 10 ISSN 1471-2148.

PLESNÍK J. (2005): Biologická rozmanitost: trivialita nebo záhada? In: VAČKÁŘ D. (ed.). *Ukazatele změn biodiverzity*. Praha: Academia, s. 17-23, 2005. ISBN 80-200-1386-5.

REICHHOLFOVÁ-RIEHMOVÁ H. (2005): *Motýli*. Vyd. 3. Praha: Euromedia Group, k.s. - Knižní klub v Praze, 2005. ISBN 80-242-1366-4.

ROSYPAL S., ROSYPALOVÁ A. a VONDREJS V. (1989): *Molekulární genetika*. Vyd. 2. přeprac. a dopl. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989. ISBN 80-04-23117-9.

RUBINOFF D. (2006): "Utility of Mitochondrial DNA Barcodes in Species Conservation Utilidad de los Códigos de Barras de AND Mitochondrial en la Conservación de Especies". *Conservation Biology*. ročník 20(4): 1026-1033 ISSN 1523-1739.

RUBINOFF D., SAN JOSE M. a KAWAHARA A. Y. (2012): "Phylogenetics and Species Status of Hawai'i's Endangered Blackburn's Sphinx Moth, *Manduca blackburni* (Lepidoptera: Sphingidae)". *Pacific Science*. ročník 66(1): 31-41 ISSN 0030-8870.

SILVA-BRANDAO K. L., LYRA M. L. a FREITAS A. V. L. (2009): "Barcoding Lepidoptera: Current Situation and Perspectives on the Usefulness of a Contentious Technique". *Neotropical Entomology*. ročník 38(4): 441-451 ISSN 1519-566X.

SNUSTAD P. D. a SIMMONS M. J. (2009): *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita, Nakladatelství, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.

SOININEN E. M., VALENTINI A., COISSAC E., MIQUEL C., GIELLY L., BROCHMANN C., BRYSTING A. K., SONSTEBO J. H., IMS R. A., YOCCOZ N. G. a TABERLET P. (2009): "Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixtures". *Frontiers in Zoology*. ročník 6: 9 ISSN 1742-9994.

ŠVECOVÁ M., SMRŽ J. a PETR J. (2007): *Biodiverzita a udržitelný rozvoj: průřezové téma*. Praha: Klub ekologické výchovy, 2007. ISBN 978-80-254-4390-3.

WANG M. X., CAI Z. Z., LU Y., XIN H. H., CHEN R. T., LIANG S., SINGH C. O., KIM J. N., NIU Y. S. a MIAO Y. G. (2013): "Expression and functions of dopa decarboxylase in the silkworm, *Bombyx mori* was regulated by molting hormone". *Molecular Biology Reports*. ročník 40(6): 4115-4122 ISSN 0301-4851.

WODARZ A. a NUSSE R. (1998): "Mechanisms of Wnt signaling in development". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. ročník 14: 59-88 ISSN 1081-0706.

INTERNETOVÉ ZDROJE

BARCODE OF LIFE (2010). Identifying Species with DNA Barcoding. *What Is DNA Barcoding?* [online]. Washington, DC: National Museum of Natural History, 2010 [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding>

BLAST (2016). *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool* [online]. Bethesda MD, USA: National Center for Biotechnology Information [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

BOLDSYSTEMS (2014). *BOLD Systems v3* [online]. BOLD Systems, 2014 [cit. 2016-03-21]. Dostupné z: <http://www.boldsystems.org>

GENE (2016a). *CAD carbamoyl-phosphate synthetase 2* [online]. Bethesda MD, USA: National Center for Biotechnology Information, 2016 [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/790>

GENE (2016b). *Ef1alpha48D Elongation factor 1alpha48D [Drosophila melanogaster (fruit fly)]* [online]. Bethesda MD, USA: National Center for Biotechnology Information, 2016 [cit. 2016-04-16]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/36271>

GENOME (2016). *Drosophila melanogaster (ID 47) - Genome - NCBI* [online]. Bethesda MD, USA: National Center for Biotechnology Information, 2016 [cit. 2016-04-20]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/47>

INFORMAČNÍ SYSTÉM ÚMLUVY O BIOLOGICKÉ ROZMANITOSTI (2004). *Text úmluvy* [online]. Česká republika, 2004 [cit. 2016-02-18]. Dostupné z: <http://chm.nature.cz/umluva-o-biologicke-rozmanitosti-cbd/o-umluve-cbd/>

SPHINGIDAE MUSEUM (2011). *Sphingidae museum druhá největší sbírka lišajů na světě* [online]. Czech republic, 2011 [cit. 2016-03-30]. Dostupné z: <http://www.sphingidae-museum.com/>

WIKIPEDIA (2016). *DNA barcoding*. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_barcoding#cite_note-Kress-2

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Lišaj lipový (<i>Mimas tiliae</i>) samec (foto: Sphingidae Museum)	23
Obr. 2 Lišaj lipový (<i>Mimas tiliae</i>) samice (foto: Sphingidae Museum).....	23
Obr. 3 Teplotní profil pro PCR mitochondriálního genu COI.....	28
Obr. 4 Teplotní profil pro PCR jaderných genů	29
Obr. 5 Schéma teplotního profilu pro sekvenační reakci.....	30
Obr. 6 Foto gelu izolované genomové DNA	31
Obr. 7 Ukázka návrhu primeru CAD_F1 pomocí softwaru OLIGO v4.0	33
Obr. 8 Jednotlivé kombinace mitochondriálních primerů zobrazené pomocí elektroforézy (A, B – demonstrační vzorky)	35
Obr. 9 Výsledky PCR genu CAD ověřené pomocí elektroforézy	35
Obr. 10 Výsledky PCR genu EF-1 α ověřené pomocí elektroforézy	36
Obr. 11 Výsledky PCR genu COI ověřené pomocí elektroforézy.....	37
Obr. 12 Ukázka analýzy dat ze sekvenátoru pomocí programu SeqScape Software v2.7	37
Obr. 13 Ukázka porovnání sekvencí v programu MEGA7	38
Obr. 14 Rozdělení poddruhů pomocí genu COI.....	39
Obr. 15 Rozdělení poddruhů na západní a východní populaci pomocí genu CAD.....	40
Obr. 16 Graf spolehlivosti pro druhovou identifikaci pomocí jaderného genu CAD.....	42
Obr. 17 Rozdělení poddruhů na západní a východní populaci pomocí genu EF-1 α	43
Obr. 18 Graf spolehlivosti pro druhovou identifikaci pomocí jaderného genu EF-1 α ...	44

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Počty popsanych a předpokládaných druhů (Švecová et al. 2007)	11
Tab. 2 Rozmístění jednotlivých genů na řetězcích mtDNA (Brdička 2001).....	18
Tab. 3 Srovnání používaných genů.....	19
Tab. 4 Porovnání genomů komára, včely, octomilky a bource (Snustad a Simmons 2009)	20
Tab. 5 Seznam použitých primerů pro PCR	27
Tab. 6 Složení reakční směsi pro PCR	28
Tab. 7 Složení sekvenační reakční směsi.....	30
Tab. 8 Naměřené koncentrace jednotlivých vzorků a jejich čistota	32
Tab. 9 Navrhované primery pomocí programu OLIGO	34
Tab. 10 Čísla vzorků podle předpokládaného rozdělení do poddruhů	38
Tab. 11 Hodnoty vzájemných rozdílů mezi jednotlivými populacemi.....	40

PŘÍLOHY

Příloha 1 – Seznam vzorků a původ jednotlivých vzorků

Číslo vzorku	Název vzorku	Číslo vzorku	Název vzorku
F.12.	Mimas tiliae, Germany	F.38.	Mimas tiliae, Kazakhstan
F.13.	Mimas tiliae, Austria	F.39.	Mimas tiliae, Russia
F.14.	Mimas tiliae, Austria	F.40.	Mimas tiliae, Kazakhstan
F.16.	Mimas tiliae, Hungary	F.41.	Mimas tiliae, Kazakhstan
F.17.	Mimas tiliae, Hungary	F.42.	Mimas tiliae, Lithuania
F.18.	Mimas tiliae, France	F.43.	Mimas tiliae, Kazakhstan
F.19.	Mimas tiliae, Czech republic	F.44.	Mimas tiliae, Russia
F.20.	Mimas tiliae, Czech republic	F.45.	Mimas tiliae, Lithuania
F.21.	Mimas tiliae, Romania	F.46.	Mimas tiliae, Switzerland
F.22.	Mimas tiliae, Georgia	F.47.	Mimas tiliae, Bulgaria
F.23.	Mimas tiliae, Pakistan	F.48.	Mimas tiliae, England
F.24.	Mimas tiliae, Greece	F.49.	Mimas christophi, Japan
F.25.	Mimas tiliae, Iran	F.50.	Mimas christophi, Russia
F.26.	Mimas tiliae, Iran	F.51.	Mimas christophi, Russia
F.27.	Mimas tiliae, Italy		Mimas tiliae, Czech republic
F.28.	Mimas tiliae, Greece	F.74.	(2000)
F.29.	Mimas tiliae, Kazakhstan		Mimas tiliae, Czech republic
F.30.	Mimas tiliae, Kazakhstan	F.75.	(2014)
F.31.	Mimas tiliae, Russia (Altai)		Mimas tiliae, Czech republic
F.32.	Mimas tiliae, Turkey	F.76.	(2000)
F.33.	Mimas tiliae, Kazakhstan		Mimas tiliae, Czech republic
F.34.	Mimas tiliae, Germany	F.77.	(2000)
F.35.	Mimas tiliae, Kazakhstan		Mimas tiliae, Czech republic
F.36.	Mimas tiliae, Russia	F.78.	(1997)
F.37.	Mimas tiliae, Finland	F.79.	Mimas tiliae, Northern Ural (2004)
		F.80.	Mimas tiliae, Northern Ural (2004)
		F.81.	Mimas tiliae, Northern Ural (2004)
		F.82.	Mimas tiliae, Greece (2010)
		F.83.	Mimas tiliae, Greece (2010)

Příloha 2 – Sekvence jaderného genu CAD s vyznačeným přímým primerem CAD_F1 (žlutý) a zpětným primerem CAD_R1 (šedý)

5'GGGATATCCAGAATCATTGACGGATCCATCGTACCACGCACAACCTTTGGTACTGACTTACCCATTGG
TTGGTAATTACGGTGTGCCAGACGAAACGGAACGTGACAAACATGGACTTCCAAGGTGGTTCGAATCT
GAGCGCATATGGGCATCTGCATTGATAGTGGGTGAAGTTAGCACACGTGCTTGTCACTGGCGTGCTAAG
CGTTCCTTGGAGCATGGTTATCTGCAAACGGTATTCCAGGATTGTGTGACGTAGACACCAGAGCTCTT
ACACATCGTCTTCGAGAGGGTGTACTTTAGGAAGAATCGTACAGGGTGTACCGCCATCTGATCCTTTA
CCACCTTTAGCAGATCCTAACTCTAGGAATTTAGTTGCCGAAGTATCCACTAAAGAAACCAAAATATTT
AATCCTAACGGTGAGATAACGATAGTGGCAGTTGATTGTGGTTTTGAAGTATAATCAAATTAGGTGTTG
ATAAAGAGAAACGCCAAGGTGATTCTTGTACCCTGGAACCATAAATTAGACCAAGTCAATACGACGG
ACTTTTCATAAGTAACGGCCCAGGTGATCCAGAAGTGTGCAAAAATATTGTAGATAACTTAAAAACAGT
TCTTCAAAAATAAAAGCAACCCAAAACCCATATTTGGCATCTGTCTCGGACATCAGTTATTATCGACTGC
AGCGGGTTGCAAAACTTATAAAACGAAGTATGGTAATCGTGGCCATAAATTGCCGTGTACCCACAGCG
GTACTGGTAGATGCTTCATGACATCACAAAATCATGGTTTTGCTGTAGACACAGACACGCTACCCGAAG
ATTGGAAAATTCTATTCACGAATGAAAATGATAAAACCAATGAAGGAATTATCACAAATCTGGACCA
TTTTTCAGTGTACAATTCATCCTGAACATACAGCTGGTCTACGGATCTAGAATGTCTTTTTGATATAT
TTATAGATGCGGTAATAATCTTACAAAAACAATATGTCTTGTGTAATCGATGATATGATTACTGAAAAAT
TAAAGTTTGTGCCAACAAATCCAGGAAAGACCCAAAAGGTATTGATTCTTGATCTGGCGGCCTATCTA
TCGGTCAGGCCGGTGAATTTGATTATTCAGGATCACAAAGGAGTAAAAGCGATGCAAGAAGAAAAAATT
CAAACAGTACTGATAAATCCCAACATTGCAACTGTTCAAACATCTAAAGGATTAGCAGATAAAGTTTAT
TTTCTACCTATTACCCAGAAATACGTTGAGCAGGTCATCAAAGCAGAAAGACCAACCGGAATCTTGCTT
ACATTTGGTGGTCAGACAGCACTTAACTGTGGAGTGGAGTTACAAAAATCTAAAATATTTGAAAAATAT
AATGTTAATGTGTTGGGTACTCCGATTCAATCTATAGTGGATACCGAAGACAGAAAAATATTTGCTGAG
AAAATTAATGCTATAGGTGAAAAAGTAGCACCTAGTGCAGCAGTGACATCCGTTGATGAAGCTCTGGC
AGCAGCAGTACAAATTGGATATCCTGTAATGGCACGTTTCAGCGTTTTCTTTAGGTGGTATGGGTTTCAGG
TTTTGCAAACAATGAGGAAGAGCTTAGATCATTAGCTCATCAAGCGTTATCACATTCAGATCAACTCAT
AATAGATAAGTCGCTTAAAGGATGGAAAGAAGTTGAGTACGAAGTCGTGAGAGATGCATATGATAATT
GCATAACTGTTTGAATATGGAGAATGTTGATCCCTTAGGTATCCATACAGGTGAATCTATTGTTGTTGC
GCCGAGCCAAACATTATCCAATCGAGAATACTACATGCTACGTAATACCGCTATAAAAAGTCATAAGAC
ATTTGGTATAGTTGGCGAATGCAATATCCAATACGCTCTTAATCCATATTCAGAAGAATTTTACATCAT
AGAAGTAAATGCACGGCTTTCGAGAAGTTCTGCACTAGCTAGCAAAGCGACGGGATATCCACTCGCAT
ATGTTGCTGCAAAATTGGCACTTGAATATCTTTACCCATTATTA AAAACTCCGTTACCGGCGTAACCA
CTGCGTGCTTTGAGCCAAGTCTGGATTATTGTGTTGTTAAAATACTTAGATGGGACTTAGCAAAATTCA
ACAGAGTAAGTACTAAAAT **TGGAAGTTCTATGAAGAGTGTCTG**GTGAAGTGATGTCTATAGGAAGAAGT
TTGAAGAAGCATTTCAAAAAGCATTACGTATGGTAGACGAAAAATGTTAACGGCTTTGATCCGAATATA
AAAAAAGTAAATGAAAATGATTTACGAGAACCAACTGATAAGCGTATGTTTGTATTAGCTGCTGCCCTC
AAAGAGGRGTACTGTTGAAAAATTATACGAACTGACCCAAATAGATCGGTGGTTTTTGGAAAAATTC
AAAAACATCATAGACTATTATAAAACCCTCGATACATACGATTTTGGATCTGTTACTTTTGATATATTGA
AAAGAGCTAAAAAGATTGGATTTTCTGATAAACAAATTGCAGCTGCTATAAAGAGTACTGAACTGGCT
GTAAGAAAATTGAGGGAAGAGTACAAAATAATTCCTTTTGTCAAACAAATAGATACAGTTGCTGCAGA
ATGGCCGGCTTCGACTAATTATCTCTATTTAACTTACAATGGCAGCACCCACGATCTCGATTTTCTGGA
GAATATGTCATGGTACTGGGTTTCAGGTGTGTACCGAATTGGGAGTCTGTAGAATTTGATTGGTGTGCG
GTAGGTTGTTTAAAGGGAACCTTCGAAATCAAGGGAAAAATACTATAATGATAAATTACAATCCAGAAAC

TGTCAGTACTGATTATGACATGAGCGACAGATTGTACTTCGAAGAAATTTCAATTTGAAGTGGTTATGGA
TATTTATAATATTGAACGGCCTAGCGGAGTCATATTATCA 3'

Priloha 3 – Sekvence jaderného genu *EF-1 α* s vyznačeným přímým primerem EF-1 α _F2
(žlutý) a zpětným primerem EF-1 α _R2 (šedý)

5'ACACGTCGACTCCGGCAAGTCCACCACAACCGGCCACTTGATCTACAAATGCGGTGGTATCGACAAA
CGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGAGGCCAGGAAATGGGTAAGGGTTCCTTCAAATACGCTGGGT
GTTGGACAAACTGAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTGTGGAAGTTCGAAA
CAGCCAAATACTATGTCACCATCATCGACGCTCCTGGACACAGAGATTTCAATCAA GAACATGATCACCG
GAACGTCGCAGGCCGATTGCGCCGTGCTGATCGTCGCCGCCGGTACTGGTGAGTTTGAAGCTGGTATCT
CTAAGAACGGCCAGACCCGTGAGCACGCCCTGCTCGCCTTACACTCGGAGTCAAGCAATTGATCGTCG
GTGTCAACAAAATGGACTCCACTGAGCCCCATACAGTGAGCCTCGTTTTGAGGAAATCAAGAAGGAA
GTCTCCTCTTATATCAAGAAGATCGGTTATAACCCCTGCCGCTGTCGCTTTCGTACCCATTTCTGGCTGGC
ACGGAGACAACATGTTGGAAGCCTTACCAAATGCCCTGGTTCAAGGGATGGCTTGTGGAGCGCAAG
GAGGGTAAGGCTGAAGGCAAGTGCCTCATCGAGGCCCTCGACGCCATCTTGCCCCCTGCTCGTCCCACC
GACAAAGCCCTGCGTCTTCCCCTGCAGGACGTATACAAAATCGGCGGTATTGGAACAGTGCCCCGTTGGC
AGAGTTGAGACTGGTATCCTGAAACCCGGTACCGTCGTCGATTTCGCGCCCCGCAAACATCACCACCTGAA
GTCAAGTCTGTGGAGATGCACCACGAGGCTCTCCAGGAGGCTGTGCCTGGTGACAATGTTGGTTTCAAC
GTAAAGAACGTGTCAGTCAAGGAATTGCGTCGTGGCTACGTCGCCGGTGATTCCAAGAACAACCCCC
CAGGGGCGCTGCAGACTTCACAGCTCAGGTCATCGTGTCAACCACCCCTGGACAAATCTCAAACGGTTA
CACGCCTGTACTGGATTGYCACACAGCTCACATTGCCTGCAAATTCGCCGAAATCAAAGAGAAGGTTG
ACCGTCGTAAGTAAATCCACTGAAGACAACCCTAAATCTATCAAATCAGGTGATGCTGCCATYGTCA
ACCTAGTTCCCTCAAACCCATGTGCGTAGAATCCTTCCAGGAGTCCCACCCCTCGGTCGT 3'

Priloha 4 – Sekvence mitochondriálního genu *COI*

5'GTGACTTTCATCAACCGATGACTATTCTCAACTAACCAAAAGACATTGGCACTCTGTACCTAATCTT
CGGAGCATGAGCCGGAATAGTAGGTACCGCCCTAAGCCTCCTCATCCGAGCAGAACTAGGCCAACCAG
GTGCTCTGCTAGGAGACGACCAAATCTACAATGTAATCGTTACAGCCCATGCTTTCGTATAATTTTCTT
TATAGTAATGCCAATCATAATCGGAGGATTTGGAACTGACTAGTTCCTCTAATAATTGGTGCCCCAGA
TATAGCATTCCCACGAATAAACATAAAGCTTCTGACTCCTCCCACCCTCATTCCTCCTCCTTCTAGCT
TCTTCAACAGTAGAGGCAGGAGCAGGAACAGGATGAACTGTGTACCCACCACTAGCTGGTAACCTAGC
TCATGCTGGAGCCTCAGTCGACCTAGCCATCTTCTCACTTACCTAGCAGGTATTTCCTCCATCCTAGGG
GCAATTAACCTCATTACCACAGCAATCAACATGAAACCTCCAGCCCTATCACAATACCAAACCCCTCTG
TCGTATGATCCGTAATAATTACCGCAGTACTACTCCTTCTCTCTTACCCGTAATGCTGCAGGAATCA
CTATGCTCCTAACAGACCGAAACCTCAATACCACATTTCTTTGATCCAGCCGGAGGAGATCCAGTAC
TATACCAACATCTATTCTGATTCTTCGGACACCCAGAAGTTTATATCCTAATCCTACCAGGATTCGGCAT
CATCTCTCATGTAGTAGCATACTACGCAGGAAAAAAGAACCATTTGGCTACATAGGAATAGTATGAG

CTATGCTATCCATTGGGTTCTAGGTTTCATCGTTTGAGCACACCACATGTTTACAGTCGGAATGGACGT
 AGACACTCGAGCATACTTCACATCCGCCACCATAATCATTGCCATCCCCACCCGAATCAAAGTATTCAG
 CTGACTAGCAACTCTACACGGAGGAACAATCAAATGAGACCCACCAATGCTGTGAGCCCTAGGATTCA
 TCTTCTATTACTATTGGTGGACTGACAGGAATTGTCTAGCAAACCTCTCTAGATATTGCCCTACA
 CGATACCTACTATGTAGTAGCTCATTTCCACTACGTAATCCATAGGTGCAGTATTTGCAATCCTAGCA
 GGATTCACCCACTGATTCCCGCTATTACCCGGATACACCCTACACTCTACATGAGCTAAAATCCACTTC
 GGAGTAATATTCGTGGGAGTAAACCTCACCTTCTCCCCAACACTTCCTTGGACTAGCCGGCATGCCA
 CGACGATACTCAGACTACCCAGACGCCTACACCCTATGAAACACTATCTCATCAGTAGGCTCACTAATC
 TCCCTAACTGCCGTAATCATGCTAATGTTTCATCATCTGAGAAGCTTTCGCATCCAAACGCAAAGCCCTA
 CAACCAGAACTTATTAGCACAAACGTTGAATGAATCCACGGCTGCCACCCCCATTCCACACATTTGAA
 GAACCAGCCTTCGTTCAAGTACAAGAAAGG 3'

Příloha 5 – Ukázka identifikace vzorku F.77. pomocí databáze BLAST

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Parum colligata isolate ATol-Lep-ID AYK-04-0182 carbamoylphosphate synthetase/aspartate trans	891	891	100%	0.0	91%	EU479092.1
<input type="checkbox"/>	Pachysphinx occidentalis isolate ATol-Lep-ID JPT-02-1528 carbamoylphosphate synthetase/aspar	883	883	100%	0.0	90%	EU479090.1
<input type="checkbox"/>	Smerinthus ocellata voucher DNA/AZ188 carbamoylphosphate synthetase (CAD) gene, partial cds	881	881	96%	0.0	91%	EF654645.1
<input type="checkbox"/>	Coequosa triangularis voucher Coqu carbamoylphosphate synthetase/aspartate transcarbamylase	872	872	100%	0.0	90%	JQ784408.1
<input type="checkbox"/>	Paonias myops voucher Pmyo putative CAD trifunctional protein mRNA, partial cds	863	863	100%	0.0	90%	EU032735.1
<input type="checkbox"/>	Mimas tiliiae isolate ATol-Lep-ID IJK-02-5836 carbamoylphosphate synthetase/aspartate transcarb	861	861	100%	0.0	90%	EU479079.1
<input type="checkbox"/>	Laothoe populi voucher MM00976 CAD (CAD) gene, partial cds	857	857	100%	0.0	90%	GU828147.1
<input type="checkbox"/>	Laothoe populi isolate ATol-Lep-ID IJK-02-0012 carbamoylphosphate synthetase/aspartate transc	856	856	100%	0.0	90%	EU479070.1
<input type="checkbox"/>	Protambulyx euryalus isolate ATol-Lep-ID WJK-03-1945 carbamoylphosphate synthetase/aspartat	850	850	100%	0.0	90%	EU479099.1
<input type="checkbox"/>	Ambulyx schaufelbergeri isolate ATol-Lep-ID AYK-04-2568 carbamoylphosphate synthetase/aspa	850	850	100%	0.0	90%	EU479020.1
<input type="checkbox"/>	Callambulyx tatarinovii isolate ATol-Lep-ID AYK-04-2581 carbamoylphosphate synthetase/asparta	839	839	100%	0.0	89%	EU479030.1
<input type="checkbox"/>	Smerinthus saliceti isolate ATol-Lep-ID JBW-02-1511 carbamoylphosphate synthetase/aspartate ti	837	837	100%	0.0	89%	EU479105.1

Příloha 6 – Srovnání sekvence jaderného genu CAD u vzorku F.77. s referenční sekvencí pomocí programu Clustal Omega

```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

DP_Lepidoptera.      ggtgaagtgatgtctataggaagaagttttgaagaagcattttcaaaaagcattacgtatg
Mimas_tiliae_Bohemia_F.77.. GGTGAAGTGATGTCTATTGGTAGAAGTTTGGAGGAAGCGTTTCAAAAAGCATTGCGTATG
***** ** ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** *

DP_Lepidoptera.      gtagacgaaaaatgtaacggctttgatccgaatataaaaaaagtaaatgaaaatgattta
Mimas_tiliae_Bohemia_F.77.. GTAGACGAAAATGTTAACGGCTTTGATCCCTAACATTAAAAAAGTTAACGAAAATGACTTA
***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** *

DP_Lepidoptera.      cgagaaccaactgataagcgtatgtttgtattagctgctgccctcaaagaggrgtatact
Mimas_tiliae_Bohemia_F.77.. CGGGAACCAACTGATAACGTATGTTTGTATTAGCTGCTGCCCTCAGAAAAGGATATACT
** ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** *

DP_Lepidoptera.      gttgaaaaattatacgaactgacccaaatagatcggtggtttttggaaaaattcaaaaac
Mimas_tiliae_Bohemia_F.77.. ATTGAAACAATTATACGAACTAACCCAAATTGATCAATGGTTTTTGGAAAAATTCAAAAAC
**** ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** *

DP_Lepidoptera.      atcatagactattataaaaccctcgatacatagcttttggatctgttacttttgatata
Mimas_tiliae_Bohemia_F.77.. ATTATAGACTATTACAAAACACTCGATGCGTATGATTCGGATCTGTACTTTTGATGTA
** ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** *

DP_Lepidoptera.      ttgaaaagagctaaaaagattggattttctgataaacaattgcagctgctataaagagt
Mimas_tiliae_Bohemia_F.77.. TTA AAAAGAGCCAAAAAGATTGGTTTTCTGATAAACAATTGCAGCTGCTATAAAAAGC
** ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** *

DP_Lepidoptera.      actgaactggctgtaagaaaattgaggaagagtaaaaaataattccttttgtaacaaca
Mimas_tiliae_Bohemia_F.77.. ACTGAACTAGCTGTAGAAAATTAGGGAAGAGTATAAATAACGCCATTTGYCAACAACA
***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** *

DP_Lepidoptera.      atagatacagttgctgcagaatggccggcttcgactaattatctctatttaacttacaat
Mimas_tiliae_Bohemia_F.77.. ATAGATACAGTTGCTGCAGAATGACCAGCTACGACAAATTATCTCTATTTGACTTATAAT
***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** *

DP_Lepidoptera.      ggcagcaccacgatctcgattttcctggagaatatgcatggtactgggttcaggtgtg
Mimas_tiliae_Bohemia_F.77.. GGCATCACACAGCCTTGATTTTCTGGAGAATATGTTATGGTACTGGGTTCGGGTGTT
**** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** *

DP_Lepidoptera.      tacggaattgggagttctgtagaatttgattgggtgtaggttaggttttaagggaactt
Mimas_tiliae_Bohemia_F.77.. TACCGAATCGGAAGTTCTGTAGAATTTGATTGGTGTGCGGTAGGTGTTTTCGAGAAGTT
***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** *

DP_Lepidoptera.      cgaaatcaagggaaaaaatactataatgataaattacaatccagaaactgtcagtagctgat
Mimas_tiliae_Bohemia_F.77.. CGAAATCAAGGGAAAAATACTATAATGGTCAATTACAATCCTGAAACAGTTAGTACTGAT
***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** *

DP_Lepidoptera.      tatgacatg
Mimas_tiliae_Bohemia_F.77.. TATGACATG
*****

```