

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

**Molekulární markery pro detekci genetické variability  
přírodních populací forenzně významných druhů  
bzučivkovitých (Calliphoridae, Diptera)**

**Diplomová práce**

**Bc. Martina Klojdová**

**Školitel: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D., Entomologický ústav AV ČR**

**Konzultant: plk. Ing. Hana Šuláková, Ph.D., Kriminologický ústav PČR Praha**

**České Budějovice 2018**

Klojdová, M., 2018: Molekulární markery pro detekci genetické variability přírodních populací forenzně významných druhů bzučivkovitých (Calliphoridae, Diptera). [Molecular markers for detection of genetic variability in natural populations of forensically important flies (Calliphoridae, Diptera). Mgr. Thesis, in Czech.] - 73 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This thesis was focused on suitability of selected molecular markers for detection of genetic variability of four species from the family Calliphoridae important in the forensic entomology. A set of eight markers, both mitochondrial (*COI*, *ND6*, *CytB*, *CR*) and nuclear (*RP S12*, *RP S13*, *RP L12*, *Pβ2*), were applied on samples from natural populations of representative species (*Calliphora vicina*, *Lucilia caesar*, *Lucilia sericata*, *Phormia regina*) most common in the Czech Republic. Level of detected variability was evaluated and compared, both with respect to the particular species as well as their geographic origin.

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 dne .....

.....

Bc. Martina Klojdová

#### Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své školitelce PaedDr. Martině Žurovcové, Ph.D. za její odborné vedení, odpovědi na mé četné dotazy, cenné rady i kritické připomínky, bez kterých by tato práce nikdy nevznikla. Další dík patří plk. Ing. Haně Šulákové, Ph.D. za poskytnutí veškerého analyzovaného materiálu a také za užitečné rady. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Mgr. Petře Kokořové za její pomoc v začátcích práce v nové laboratoři. Velké díky patří i mé rodině a snoubenci za jejich velkou podporu a nekonečnou trpělivost v období vzniku této práce.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	FOREZNÍ ENTOMOLOGIE .....	2
1.1.1	Historie .....	3
1.1.2	Forezně významné skupiny hmyzu a jejich sukcese .....	4
1.1.2.1	Sukcesní vlny .....	5
1.1.3	Studované druhy .....	6
1.1.3.1	<i>Calliphora vicina</i> - bzučivka obecná .....	7
1.1.3.2	<i>Lucilia sericata</i> - bzučivka zelená .....	7
1.1.3.3	<i>Lucilia caesar</i> - bzučivka zlatá .....	8
1.1.3.4	<i>Phormia regina</i> .....	8
1.2	DRUHOVÁ IDENTIFIKACE HMYZU .....	9
1.2.1	Morfologická identifikace .....	9
1.2.2	Identifikace pomocí molekulárních markerů .....	10
1.2.2.1	Proteinové markery .....	10
1.2.2.2	DNA markery .....	11
	Jaderné DNA markery .....	12
	EPIC markery .....	12
	<i>ITS</i> .....	13
	Mitochondriální DNA markery .....	14
	Cytochrom c oxidáza – podjednotka I ( <i>COI</i> ) .....	15
	NADH dehydrogenáza – podjednotka 6 ( <i>ND6</i> ) .....	16
	Cytochrom B ( <i>CytB</i> ) .....	16
	Kontrolní oblast ( <i>CR</i> ) .....	16
	<i>Wolbachia</i> .....	17
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>19</b>
3.1	MATERIÁL .....	19
3.2	METODY .....	20
3.2.1	Extrakce DNA .....	20
3.2.2	Výběr cílových oblastí genomu a příslušných primerů .....	21
3.2.2.1	Mitochondriální DNA markery .....	21

3.2.2.2	Jaderné DNA markery .....	22
3.2.2.3	<i>Wolbachia</i> .....	23
3.2.3	Polymerázová řetězová reakce .....	23
3.2.3.1	PCR profily .....	25
3.2.4	Gelová elektroforéza .....	26
3.2.5	Přečištění vzorků pomocí metody ExoSap .....	28
3.2.6	Sekvenování .....	28
3.2.7	Klonování .....	29
3.2.8	Statistické zpracování sekvencí .....	29
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>31</b>
4.1	TESTOVANÉ MARKERY .....	31
4.2	GENETICKÁ VARIABILITA .....	31
4.2.1	Základní charakteristiky .....	31
4.2.2	Vnitrodruhová variabilita .....	35
4.2.2.1	Celková vnitrodruhová variabilita .....	35
4.2.2.2	Vnitrodruhová variabilita mezi populacemi .....	37
4.2.3	Souhrnné porovnání mitochondriálních a jaderných markerů .....	41
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>65</b>

# 1 ÚVOD

Forenzní entomologie je forenzní vědou, která využívá znalostí o hmyzu a ostatních členovcích k vyšetřování skutečností a ověřování důkazů v rámci občanského a trestního práva. V kriminalistické praxi se nejčastěji jedná o stanovení tzv. post mortem intervalu (PMI) neboli doby, která uplynula od okamžiku smrti do nálezu těla.

Z taxonomického hlediska nejvýznamnější roli ve forenzní entomologii hrají brouci a dvoukřídlí. Pro vytvoření relevantních závěrů je zcela klíčové správné určení jejich druhové příslušnosti, což se dá na základě morfologie spolehlivě provést jen u hmyzích dospělců, a i to vyžaduje zkušeného taxonoma specialistu. U vajíček, larev či kukel je morfologické určování značně problematičtější nebo i nemožné. Tuto překážku lze překonat dochováním těchto stadií na mase, jenže ne vždy je to možné, například pokud jedinci již nejsou životaschopní.

V současnosti se proto stále více používá druhová determinace forenzních dvoukřídých pomocí genetických markerů. Tzv. DNA Barcoding neboli použití standardního úseku DNA (části mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu I) pro druhovou identifikaci je dnes běžným postupem, neboť již byla prokázána jeho vysoká spolehlivost. Naproti tomu však byla zatím jen minimální pozornost věnována markerům, které by umožnily stanovit i případnou geografickou variabilitu forenzního hmyzu – ačkoliv vzhledem k biologii zájmových druhů půjde pravděpodobně o kosmopolitní populace, případná populační struktura by mohla být pro kriminalistickou praxi velmi důležitá.

Hlavním cílem této práce proto bylo navržení nových genetických markerů, které by byly variabilní i v rámci druhů, na základě čehož by bylo možné odlišovat jednotlivé populace. Díky tomu by pak na základě rozdílů ve zvoleném markeru mohla být v praxi rozpoznána například posmrtná manipulace s tělem mezi lokalitami.

## 1.1 Forezní entomologie

Forezní entomologie je speciálním oborem kriminalistiky, který umožňuje především stanovení PMI prostřednictvím znalostí o nekrofágním hmyzu, který je rozkládajícím se tělem velice silně přitahován, a to záhy po smrti. Tělo pro tento hmyz představuje zdroj dostupné a snadno stravitelné potravy, a stává se tak ideálním prostředím pro kladení vajíček. Další druhy hmyzu mohou být následně lákány již přítomnými nekrofágními druhy, jež pro ně představují potravu (Gennard, 2007).

Je uváděno, že po uplynutí 72 hodin od doby smrti jsou entomologické metody pro stanovení PMI jedny z nej přesnějších (Daněk, 1990). Je však nutno si uvědomit, že ne vždy se musí shodovat doba smrti s dobou zpřístupnění těla hmyzu, a může tak dojít k chybným závěrům. Mrtvé tělo může být například zabaleno či pohřbeno, pak se k němu hmyz nedostane hned, a proto sukcese probíhá se zpožděním a vyvíjí se jiným způsobem (Greenberg & Kunich, 2002).

Existují i opačné situace, kdy hmyz kolonizuje tělo ještě živého člověka, který není schopný se bránit. V těchto případech forezní entomolog může přispět například k prokázání zanedbání péče u starých nemohoucích lidí či novorozenců. Mouchy nakladou vajíčka na kůži nebo oděv, ta se postupně vyvíjejí a larvy se krmí na přirozeně přístupných sliznicích těla, ranách či vředech (Šuláková, 2014). Postupně dochází k bakteriální infekci postižených míst, případně mohou být atrakovány další druhy hmyzu (Gennard, 2007).

Podobné případy je samozřejmě možné nalézt i ve veterinární medicíně, kde jsou zvířata z důvodu chovu v nevyhovujících podmínkách napadena hmyzem usazeným a vyvíjejícím se v srsti. Napadená zvířata nejsou sama schopna odstranit vajíčka a larvy ze svého těla, proto následky mohou být až smrtelné. Tyto případy jsou vnímány jako týrání zvířat (Gennard, 2007).

Pro forezní entomologii z hlediska určení PMI jsou samozřejmě také důležité další okolnosti, jako je roční období a s ním související teplota i to, zda se tělo nachází v bytě nebo volně exponované ve venkovním prostředí (Šuláková et al., 2013). Někteří zástupci hmyzu žijí jen v určitých podmínkách a lokalitách, a entomolog tak může určit, zda je místo nálezu i místem úmrtí (Šuláková, 2006).

Prostřednictvím nalezeného hmyzu mohou být také určeny některé skutečnosti týkající se těla. Podmínky mohou svědčit o místech, kde bylo přítomné

poranění, či o sexuálním násilí. Dále je možné zkoumat požití drog, či celkově přítomnost toxických látek v těle, čímž se zabývá obor entomotoxikologie. Tyto látky samozřejmě mohou mít četné důsledky pro vývoj hmyzu na těle, proto je potřeba jejich přítomnost brát v potaz. V neposlední řadě je také možné na základě analýzy nalezeného hmyzu určit místo usmrcení oběti v případě, že tělo bylo později přemístěno, ale larvy, které se na něm krmily, zůstaly přítomny (Campobasso & Introna, 2001).

### 1.1.1 Historie

První případ, kde byla využita forenzní entomologie pro objasnění smrti, se datuje již do 13. století, kdy byla v Číně vyřešena vražda na základě toho, že mouchy preferovaly srp vraha, na kterém cítily neviditelné zbytky krve, před srpy ostatních podezřelých (Giles, 1924).

Velkými pokroky umožňujícími rozvoj oboru byly experimenty prováděné v 17. a 18. století, které popisovaly vývoj hmyzu na tělech různých zvířecích druhů a zavedení systému druhové klasifikace. Na základě detekce druhů, poznání zákonitostí v osidlování těla hmyzem a určení časových intervalů jednotlivých vývojových stadií v životě hmyzu tak mohl být vyvinut systém, který umožňuje stanovení doby smrti (Gennard, 2007).

O další významný bod v historii forenzní entomologie se postaral v 19. století francouzský entomolog a veterinář Mégnin, který popsal 8 stadií rozkladu lidského těla s posloupností hmyzí kolonizace. Poukázal také na odlišnosti rozkladu těla v závislosti na různé okolní teplotě, velikosti těla nebo na tom, zda tělo bylo oblečeno či nikoliv. Podle teorie z jeho knihy *La Faune des Cadavres* na volně exponovaná těla hmyz nalétával ve čtyřech až osmi sukcesních vlnách, kdežto u těl pohřbených bylo možno rozlišit vlny pouze dvě (Benecke, 2001).

Z 20. století je již známa celá řada případů smrti, často dětí, kdy byl hmyz využit k objasnění okolností úmrtí. Nově se také objevilo použití hmyzu k objasnění případu, kdy byly části těla vytaženy z vody (do té doby se vždy jednalo o celá těla, jež se nacházela na souši). Nález larev bzučivky *Calliphora vicina* nasvědčoval tomu, že vajíčka musela být nakladena ještě předtím, než se tělo dostalo do vody. V kombinaci s dalšími důkazy vedla tato informace k usvědčení vraha (Gennard, 2007).



Forenzní entomologie nesporně patří k oborům s dlouhou historií, avšak stále se dynamicky rozvíjí. V jednadvacátém století je již rutinně využívána k objasňování okolností trestných činů a stále na mnoha místech probíhají výzkumy, které nám dovolují objevovat nové skutečnosti a zákonitosti v konkrétních situacích. Podoba výzkumných experimentů se liší napříč státy vzhledem k místním zákonům. V České republice jsou k výzkumu využívána mrtvá prasata domácí (Hrdinová et al., 2013). Naproti tomu v americkém Tennessee k podobným pokusům využívají těla zemřelých dárců na tzv. Farmě těl, která je součástí Antropologického ústavu University of Tennessee (Byrd & Castner, 2009).

### 1.1.2 Forezně významné skupiny hmyzu a jejich sukcese

Nejdůležitějšími řády hmyzu ve forenzní entomologii jsou dvoukřídlí (Diptera) a brouci (Coleoptera). Oba dva řády mají 4 základní vývojová stadia (vajíčko, larva, puparium/kukla, imago), přičemž všechna tato stadia by měla být zajištěna jako entomologické stopy z místa nálezu těla. Vzorky jsou odebírány přímo z těla mrtvého, z lože (tj. z bezprostředního okolí), z širšího okolí mrtvol a následně také při pitvě (Eliášová & Šuláková, 2012).

Z hlediska počtu nalézáných druhů převládají brouci s asi 50 %, dalších zhruba 35 % zabírají dvoukřídlí a ze zbylých 15 % lze jmenovat například motýly, škvory, mravence, prvoky, bakterie či řasy (Šuláková, 2006). Forezně významnými čeleděmi brouků jsou především mrchožroutoví (Silphidae), drabčíkoví (Staphylinidae), mršníkovi (Histeridae), kožojedoví (Dermestidae), střevlíkoví (Carabidae) a další. Na rozdíl od dvoukřídlých u brouků většinou nenalzáme kukly přímo na těle, spíše je možné je odebrat z lože mrtvol (Gennard, 2007).

Ačkoli brouci jsou nejvýznamnějšími zástupci z taxonomického hlediska, co do počtu jedinců přítomných na těle vévodí řád dvoukřídlých. Nejvýznamnější zástupci jsou bzučivkoví (Calliphoridae), masařkoví (Sarcophagidae), mouchoví (Muscidae), či sýrohlodkoví (Piophilidae) (Šuláková, 2014).

Proces osídlování těla hmyzem není náhodný a podléhá přesným zákonitostem. Na základě těchto znalostí je forenzní entomolog schopný určit dobu zpřístupnění těla hmyzu s přesností v řádu dní. Závěry o délce PMI vyplývají z druhového složení hmyzího společenstva nacházejícího se na těle a ze stupňů vývoje nižších vývojových stadií jednotlivých druhů, kterými jsou vajíčka, larvy a

kukly (Šuláková, 2006). V oblasti mírného klimatického pásu za ideálních podmínek rozlišujeme 5 – 8 vývojových vln sukcese. Tato stadia jsou definována stupněm rozkladu těla, na které reagují konkrétní druhy hmyzu (Šuláková, 2014).

### 1.1.2.1 Sukcesní vlny

Následuje popis jednotlivých sukcesních vln podle Šulákové (2006), jejichž základ vychází z již zmíněné Mégninovy práce (1894), ve které bylo poprvé zachyceno 8 stadií rozkladu lidského těla ve spojení se zákonitým sledem hmyzí kolonizace.

První sukcesní vlna přichází bezprostředně po smrti, mrtvolu v tomto stadiu označujeme jako čerstvou. Hmyz může případně nalétávat a následně klást vajíčka na ještě živého člověka, například pokud krvácí a není schopný obrany. Nalétávají především velké nekrofágní mouchy bzučivky.

Druhá vlna začíná tvorbou páchnoucích plyných látek nadýmajících tělo, mrtvolu proto označujeme jako nadmutou. V letních měsících tato fáze může nastat již druhý den po smrti. Přítomny jsou stále bzučivky z první vlny, které i nadále na tělo nalétávají, navíc se připojují masařky. Zápach uvolňujících se plyných látek přitahuje také nekrofágní brouky, například hrobaříky.

Ve třetím a čtvrtém stadiu rozkladu je mrtvola označována jako biochemicky aktivní. Při třetí vlně dochází ke zmydelnění tuků a vznikají těkavé mastné kyseliny. Z nekrofágních brouků jsou typickými zástupci kožojedi a dále se přidávají druhy živící se přítomnými larvami much, lze jmenovat mršníky či drabčíky. Při čtvrté vlně probíhá fermentace bílkovin neboli sýrová fermentace a objevují se především sýrohlodky a octomilky, jež jsou lákány zápachem připomínajícím sýr. Třetí a čtvrtá vlna se mohou na různých částech těla časově překrývat.

Během páté vlny se již mrtvola nachází ve stadiu pokročilého rozkladu, který nastává po dosažení čpavkové fermentace. Z těla jsou uvolňovány amoniakální páry, na něž reagují další druhy, především drobné mušky hrbilky. Celkově se snižuje počet přítomných druhů, jelikož množství potravy v tomto stadiu je již značně omezené.

V šestém stadiu mluvíme o vysychající mrtvole, u níž dochází k vysychání zbytků měkkých tkání. Za příznivých podmínek přichází zhruba po roce od doby

smrti. Nalézáme tu pak různé druhy roztočů, jež se živí zbylými živočišnými proteiny. Dochází k narušení kostní tkáně a úbytku kostní dřevě.

V sedmé a osmé vlně je již tělo úplně skeletováno, pouze místy lze nalézt vysušené zbytky různých tkání, například svalové tkáně, narušené chrupavky, vlasy a další. Podle místa, kde mrtvola leží, se můžeme setkat s roztoči, moly či méně často s některými brouky, například kožojedy nebo rušníky.

Proces osidlování těla nekrofágním hmyzem není vždy stejný a je závislý na mnoha vnějších faktorech. Záleží na stavu těla, například pokud člověk před smrtí utrpěl krvácející poranění, hmyz je k tělu přitahován rychleji. Významnou roli hraje i hmotnost těla, množství podkožního tuku či podoba ošacení (Šuláková, 2006).

Dalším faktorem, který velmi ovlivňuje průběh sukcese, je roční období, během něhož ke smrti došlo. Důležitá je především teplota, která se během roku značně mění a od které se odvíjí nejen enzymatické děje probíhající v rozkládajícím se těle, ale také výskyt a aktivita nekrofágního hmyzu. Různé druhy bzučivek odlišně tolerují nízké teploty, proto pokud rozklad začíná například na konci zimy, jejich poměrné zastoupení je odlišné oproti případu, kdy je rozklad zahájen uprostřed léta. Celkově je také v chladném období přítomno nižší množství bzučivek, měkké tkáně tak ubývají pomaleji a to dává příležitost většímu množství druhů, které se zapojují do rozkladu těla. Naopak pro letní období je typická vyšší teplota i aktivita a početnost hmyzu, a tak především díky velkému množství bzučivek dochází k rozložení většiny měkkých tkání již během pár dní. Dále záleží na množství srážek, vlhkosti i délce světelné části dne (Šuláková, 2014).

Významným faktorem pro vývoj sukcese je také prostředí, ve kterém se tělo nachází. Konkrétní prostory se mohou lišit v zastoupení jednotlivých druhů i v celkové přístupnosti těla pro hmyz. Jako příklad lze uvést otevřenou krajinu, lesní porosty či uzavřené bytové jednotky, kde hmyz někdy musí překonat celou řadu překážek, než se dostane k tělu (Povolný, 1978).

### **1.1.3 Studované druhy**

V této práci byly pro výzkum genetické variability vybrány následující druhy z čeledi bzučivkovitých, které se hojně vyskytují v rámci České republiky a tvoří důležitou část forenzně významného hmyzu (Smith, 1986; Šuláková, 2014).

### 1.1.3.1 *Calliphora vicina* - bzučivka obecná

Bzučivka obecná je velká asi 9 – 11 mm. Hlava je černá s naoranžovělými předními polovinami tváří. Hrud' je tmavě modrá až černě modrá a dorzální část má šedavý lesk. Tato moucha je velmi hojná. Samička klade až 300 vajíček a larvy se v příznivých podmínkách líhnou za 24 hodin. Celý životní cyklus trvá 2 až 3 týdny v závislosti na teplotě (Förstl, 2003).



Obr. 1: *Calliphora vicina* (<https://www.biolib.cz/>).

### 1.1.3.2 *Lucilia sericata* - bzučivka zelená

Tato synantropní bzučivka je velká asi 10 - 14 mm. Má charakteristické modro-zelené či zlato-zelené zbarvení, hlava je černá. Larvy se za dobrých podmínek mohou líhnout již 8 hodin po naklazení vajíček, celý životní cyklus se také pohybuje mezi 2 až 3 týdny v závislosti na okolních podmínkách (Gennard, 2007).



Obr. 2: *Lucilia sericata* (<https://www.biolib.cz/>).

### 1.1.3.3 *Lucilia caesar* - bzučivka zlatá

*Lucilia caesar* je velmi hojná moucha velká 7 – 10 mm s kovově zeleným zbarvením s různými odlesky. Na hlavě má výrazně velké červené oči, které se téměř dotýkají, hrud' je štítovitá a zadeček poměrně široký, krátký a pokrytý černými štětinami (Gennard, 2007).



Obr. 3: *Lucilia caesar* (<https://www.biolib.cz/>).

### 1.1.3.4 *Phormia regina*

Tato moucha dosahuje velikosti asi 7 - 9 mm a má olivově zelené lesklé zbarvení. Černá hlava je v porovnání s tělem velká. Životní cyklus je velice podobný již zmíněným, doba od naklazení vajíček do líhnutí larev trvá dle podmínek nejčastěji 6 až 11 hodin (Taylor et al., 2007).



Obr. 4: *Phormia regina* (<https://bugguide.net/>).

## 1.2 Druhová identifikace hmyzu

Z těla a jeho bezprostředního okolí jsou v zásadě sbírány 2 druhy vzorků. Dospělci much i brouků jsou usmrceni, naloženi do konzervačního média a následně může být provedena jejich preparace a určení druhové příslušnosti. Dále jsou odebírána nižší vývojová stadia (vejčka, různě velké larvy i kukly) (Šuláková, 2006).

Jak již bylo zmíněno, sukcese hmyzu podléhá jasně daným pravidlům, a pro forenzní entomologii je tak bezpodmínečně nutná přesná druhová identifikace odebraných vzorků. Stanovení PMI se odvíjí především od správného spočítání doby výskytu nedospělých vývojových stadií, které se na těle vyvíjejí (Catts, 1992). K určení druhové příslušnosti můžeme využít 2 různé přístupy, a to identifikaci na základě morfologických znaků nebo pomocí molekulárních markerů.

### 1.2.1 Morfologická identifikace

Zařazení dospělců podle morfologických znaků do konkrétního druhu vyžaduje pohled kvalifikovaného odborníka. Doposud byla publikována řada příruček forenzní entomologie (např. Carvalho & Mello-Patiu, 2008; Szpila, 2012), které pojednávají o klíčovách znacích pro správnou druhovou identifikaci forenzně významného hmyzu.

Určení přítomných juvenilních vývojových stadií do druhu představuje oproti identifikaci dospělců ještě výrazně náročnější úkol. I když existují určovací klíče pro identifikaci třetích larválních stadií dvoukřídlých (např. Wells et al. 1999; Szpila 2009), u nižších vývojových stadií se vyskytuje pouze málo relevantních klíčových znaků, se kterými lze pracovat (Szpila et al., 2013). Pro správnou druhovou identifikaci těchto vývojových stadií čistě na základě morfologických znaků je proto nezbytné umělé dochování v laboratoři (Smith, 1986).

V minulosti mohla být za účelem dochování larev odebrána část tkáně, ve které se larvy nacházely a která byla dostatečně velká na to, aby v ní dokázaly přežít až do dospělého stadia. Tato metoda vzhledem k současným legislativním předpisům dnes již není možná. Namísto toho jsou sesbírána živá juvenilní stadia v laboratoři následně dochována v příznivých podmínkách na syrovém vepřovém mase. Umělé dochovávání juvenilních stadií má samozřejmě své stinné stránky, kterými jsou

například časová a materiální náročnost, navíc nemusí být vždy uskutečnitelné z důvodu snížené či žádné životaschopnosti dochovávaných jedinců (Šuláková, 2006).

## 1.2.2 Identifikace pomocí molekulárních markerů

V posledních desetiletích zaznamenaly velký rozvoj molekulární metody, které mají svou významnou úlohu při studiu fylogenetiky a evoluce či ekologie. Jsou však důležitým nástrojem i ve forezní entomologii v případech, kdy není možné hmyz identifikovat pouze podle morfologických znaků (Smith & Wayne, 1996). Molekulární markery je možné rozdělit podle použitých molekul na proteinové a genetické (DNA), přičemž zavedení analýzy proteinů předcházelo analýze genetických markerů (Awise, 1994).

### 1.2.2.1 Proteinové markery

Nejčastěji využívanými proteiny, které slouží k druhové identifikaci hmyzu, jsou tzv. alozymy. Alozymy jsou enzymy, které jsou kódovány různými alelami téhož lokusu, díky čemuž se vzájemně strukturně liší, avšak jejich funkce je stejná. Mezi oběma přítomnými alelami se projevuje vztah kodominance a u diploidního jedince lze rozlišit homozygotní či heterozygotní konstituci (Richardson et al., 1986).

Na základě strukturních rozdílů dochází při elektroforéze k rozdělení konkrétních forem proteinu v gelu. Toto rozdělení je charakteristické pro dané skupiny a přítomnost jednotlivých forem enzymů můžeme využít jako taxonomický znak. Díky počtu sdílených znaků poté můžeme analyzovat míru příbuznosti jedinců, populací či druhů (Loxdale & den Hollander, 1989).

Hlavními výhodami alozymové analýzy jsou nízká cena, rychlost provedení či dlouhá životnost používaných materiálů v laboratorních podmínkách. Naopak nevýhody představují například potřeba čerstvého či hluboce zamraženého biologického materiálu či skutečnost, že mnoho enzymových lokusů má pouze nízkou detekovatelnou variabilitu (Loxdale & Lushai, 1998).

Jako příklad úspěšného využití alozymové analýzy ve forezní entomologii lze uvést práci Wallman & Adams (2001), ve které byly spolehlivě identifikovány druhy *Calliphora vicina*, *C. stygia*, *C. dubia* a *C. hilli*.

### 1.2.2.2 DNA markery

DNA markery umožňují studium variability na úrovni samotné genetické informace. Podobně jako u proteinových markerů analýza DNA markerů představuje užitečný nástroj nejen pro určení druhu juvenilních stadií, díky čemuž odpadá časová i materiální složka při dochování, ale také je možno určit druh objektů, které by se nikdy dochovat nepodařilo, například části hmyzu nebo prázdná pupária (Mazzanti et al., 2010). Zavedení druhové identifikace forenzně významného hmyzu na základě DNA markerů jako první prosazovali Sperling et al. (1994) a řada dalších je následovala (např. Chen et al., 2004; Wells & Williams, 2007).

První metody zaměřující se na rozdíly ve struktuře DNA byly objeveny v 70. letech 20. století. Jedna z nejstarších metod pracujících s řetězcem DNA, která může být s úspěchem využita pro identifikaci druhů v entomologii, se nazývá polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism). Oproti své původní verzi dosáhla obrovského zjednodušení a tím i posunu ve využití díky objevení polymerázové řetězové reakce (PCR – polymerase chain reaction). V obou verzích tato metoda využívá činnosti restrikčních endonukleáz, které štěpí molekulu DNA na specifických místech, a vznikají tak fragmenty DNA, jež mohou být zviditelněny a charakteristicky rozděleny na gelu (Loxdale & Lushai, 1998). Speciálně ve forenzní entomologii tuto techniku úspěšně použili např. Schroeder et al. (2003), když potvrdili možnost odlišení druhů *Lucilia sericata*, *Calliphora vomitoria* a *C. vicina* nalezených na lidských ostatcích.

Další popsanou možností pro identifikaci hmyzu na základě DNA je náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD, Random Amplification of Polymorphic DNA). Tato metoda skýtá řadu výhod, například není potřeba specifických primerů pro PCR. Naproti tomu je používán krátký nespecifický primer, který hybridizuje k různým místům v genomu zahrnujícím kódující i nekódující sekvence. Dochází k namnožení úseků s amplifikovatelnou délkou do cca 4000 bp. Produkty jsou následně rozděleny podle velikosti pomocí elektroforézy, čímž získáme sadu proužků či páků typickou pro analyzovaný DNA řetězec (Williams et al., 1990). Různé výsledné vzory jsou způsobeny mutací vazebných míst pro primer nebo insercemi či delecemi v amplifikovaných oblastech. Porovnáním se známými vzory poté můžeme určit druhovou příslušnost jedince (Hadrys et al., 1992).



Tato metoda má samozřejmě i své nevýhody, například může být náchylná k používání různých termocyklerů. Navíc bohužel nemáme dostatečnou databázi použitelných primerů a srovnávacích profilů. Aplikaci metody RAPD ve forenzní entomologii publikoval např. Benecke (1998), který testoval 11 různých párů univerzálních primerů pro identifikaci hmyzu z lidského těla a jeho lože.

Nejnovějším ze zmíněných přístupů v identifikaci hmyzu na základě genetické variability je sekvenování specifických úseků DNA. Podle místa původu můžeme tyto markery rozdělit na jaderné a mitochondriální. DNA markery se liší nejen svým umístěním v buňce, ale také typem dědičnosti, rychlostí mutací, variabilitou či rekombinací (Awise, 1994).

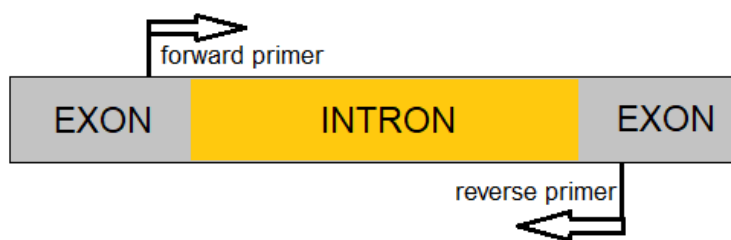
### **Jaderné DNA markery**

Nukleární DNA je přítomná ve dvou kopiích v jádře všech buněk diploidních organismů. Výhodou jaderných DNA markerů je jejich možná vyšší variabilita, která je zajištěna zejména oblastmi intronů. Nevýhodou naopak představuje rychlejší degradace jaderné DNA, díky čemuž s rostoucím stářím vzorku klesá její množství (Loxdale & Lushai, 1998).

Mezi často používané jaderné DNA markery patří především nekódující oblast *ITS* (internal transcribed spacer) či kódující oblast *EF 1 $\alpha$*  (elongační faktor 1  $\alpha$ ) (Caterino et al., 2000). Na základě literatury byly pro tuto práci vytipovány následující jaderné DNA markery.

### EPIC markery

EPIC neboli exon-primed-intron-crossing je technika, která využívá variabilitu v přítomnosti a nepřítomnosti intronů, případně jejich délkovou variabilitu. Vzhledem k relativně snadné detekci homozygotů a heterozygotů (v ideálním případě bez nutnosti sekvenování) má velký potenciál pro analýzu nejen druhů, ale i jejich populací. Příslušné PCR primery jsou umístěny v přilehlých oblastech vysoce konzervovaných exonů jaderných genů (Obr. 5), a během PCR tak dochází k amplifikaci oblasti intronu, aniž by nasedání primerů bylo ovlivněno její případnou variabilitou. Tato variabilita se pak projeví na velikosti amplifikovaného úseku (Palumbi, 1996).



**Obr. 5:** Poloha primerů pro EPIC-PCR.

Lee et al. (2011) se zabývali problematikou variability intronů u forenzně významného druhu *Lucilia cuprina*. Na základě této publikace byly vybrány různé lokusy, na které se moje práce zaměřuje (oblasti beta 2 podjednotky proteazomu a ribozomálních proteinů S12, S13, L7 a L12).

### ITS

*ITS* jsou nekódující úseky umístěné mezi oblastmi kódujícími ribozomální RNA (rRNA), konkrétně 18S a 28S rRNA. Oblasti *ITS* jsou sice transkribovány, avšak během postranskripčních úprav jsou záhy degradovány.

*ITS* oblasti můžeme v zásadě dále rozlišit na dva různé DNA markery, a to *ITS1* a *ITS2*. Strukturně jsou tyto jednotky odděleny kódující oblastí pro 5.8S rRNA (Schlötterer et al., 1994). Struktura *ITS* oblasti je vykreslena na následujícím obrázku 6.

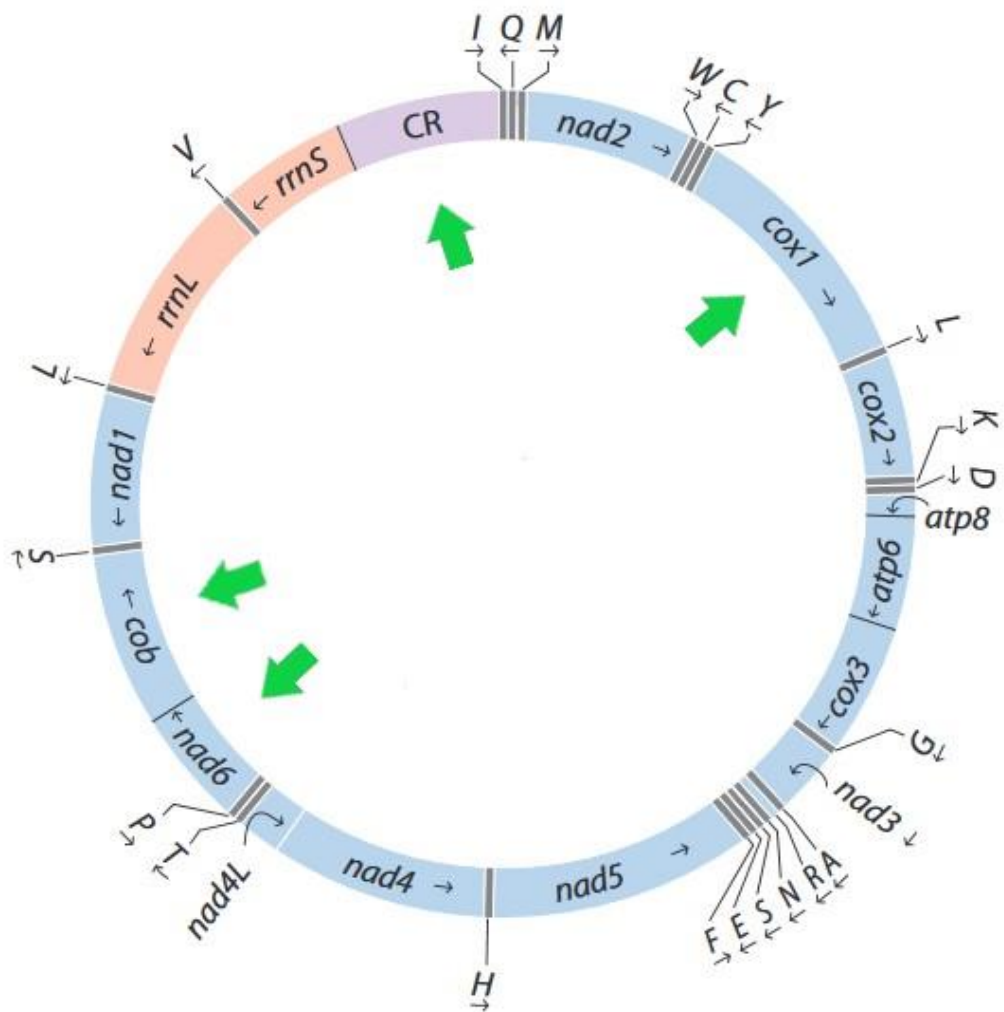


**Obr. 6:** Schéma jaderného markeru *ITS* (upraveno podle <https://www.researchgate.net/>).

Na rozdíl od přilehlých oblastí kódujících rRNA, které jsou vysoce konzervované, se oblasti *ITS* vyznačují poměrně vysokou variabilitou. *ITS2* se jeví jako spolehlivý marker pro odlišení druhů, což bylo ověřeno i pro oblast forenzní entomologie (Song et al., 2008). Naproti tomu *ITS1* se zdá být ještě variabilnější oblastí, a tak může představovat účinný nástroj i pro studium populací (Douglas & Haymer, 2001).

## Mitochondriální DNA markery

Mitochondriální DNA je pro své vlastnosti hojně využívána napříč celou živočišnou říší např. pro druhovou identifikaci, studium populací nebo ve fylogenezi (Wells & Sperling, 2001; Lyra et al., 2005; Moore, 1995). U živočichů se typicky jedná o kruhovou molekulu tvořenou dvěma vlákny o délce 16 – 20 kb. Nejčastěji obsahuje 37 genů, přičemž 13 z nich kóduje proteiny, 22 transferovou RNA (tRNA) a zbylé 2 geny kódují 2 podjednotky ribozomální RNA (Clary & Wolstenholme, 1985). Obecné schéma mitochondriálního genomu hmyzu je znázorněno na obrázku 7.



**Obr. 7:** Kruhová molekula mtDNA hmyzu (upraveno podle Cameron, 2014). Jednotlivá písmena označují oblasti kódující tRNA, modré úseky protein kódující geny, růžové úseky podjednotky rRNA a fialový úsek nekódující kontrolní oblast. Černé šipky vyjadřují směr transkripce genu a zelené šipky označují zkoumané oblasti.

Výhodou mtDNA je například její již zmíněná vyšší odolnost vůči degradaci nebo přítomnost vysokého počtu kopií v jediné buňce, díky čemuž může být oproti jaderné DNA snadněji využita u starších vzorků (Junqueira et al., 2002). Další výhodou mtDNA v roli genetického markeru je hemizygotní konstituce. Ta souvisí s dědičností mtDNA, jež je v naprosté většině maternální, a následně také s mutační rychlostí, která je oproti nDNA asi dvacetkrát vyšší, z čehož vyplývá možnost vyšší mezidruhové variability (Avise et al., 1987).

Na základě práce s literaturou a s databázemi mitochondriálních genomů byly vytipovány následující markery.

### Cytochrom c oxidáza – podjednotka I (COI)

Oblast *COI* kóduje jednu z částí enzymatického komplexu zvaného cytochrom c oxidáza nebo také komplex IV. Tento komplex se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně a ve spolupráci s dalšími enzymatickými komplexy vytváří protonový gradient, jenž je klíčový pro tvorbu energie v procesu oxidativní fosforylace.

Oblast *COI* patří mezi nejvíce konzervované geny kódující proteiny živočišného mitochondriálního genomu (Brown, 1985). Folmer et al. v roce 1994 navrhli univerzální primery pro amplifikaci úseku *COI* a úspěšně je použili u 11 různých kmenů bezobratlých. Bylo zjištěno, že na základě sekvence genu *COI* je možné tyto živočichy spolehlivě zařadit do druhů i vyšších taxonomických úrovní.

Dnes patří oblast *COI* mezi nejčastěji používané DNA markery a je oficiálně označována jako marker vhodný pro rozlišování živočišných druhů nebo také „DNA barcode pro živočišnou říši“ (Hebert et al., 2003). Bylo ale zjištěno, že ne vždy je druhová identifikace na základě *COI* bez problémů, jelikož někdy může vnitrodruhová variabilita převyšovat mezidruhovou variabilitu a některé příbuzné druhy, navzdory svému rozrůznění, mohou mít velice podobnou či dokonce identickou sekvenci *COI* (Meier et al., 2006).

Speciálně pro forezní entomologii nemusí být přístup DNA barcodingu dostačující, i když je markerem nejvíce používaným. Byly publikovány práce, které ukazují, že v čeledi bzučivkovitých nelze na oblast *COI* jednoznačně spoléhat, například z důvodu nedostatečné mezidruhové variability či mezidruhového křížení (Wallman & Donnellan, 2001; McDonagh & Stevens, 2011; Tourle et al., 2009).

### NADH dehydrogenáza – podjednotka 6 (ND6)

Oblast *ND6* kóduje část velkého enzymatického komplexu NADH dehydrogenázy či tzv. komplexu I, který je stejně jako cytochrom c oxidáza zabudován ve vnitřní membráně mitochondrií a má zásadní roli v tvorbě protonového gradientu. Na rozdíl od oblasti *COI*, oblast *ND6* není typicky využívaným genetickým markerem, avšak lze nalézt práce, kde byla aplikována (např. Virgilio et al., 2008).

### Cytochrom B (CytB)

Oblast *CytB* kóduje protein, který je součástí komplexu III. Tento enzymatický komplex je také součástí vnitřní mitochondriální membrány a stejně jako předchozí dva zmíněné komplexy se také podílí na vzniku protonového gradientu.

GilArriortua et al. (2013) publikovali práci, ve které ověřili možnost využití cytochromu B jakožto spolehlivého DNA markeru pro forenzní entomologii. Bylo potvrzeno, že na základě porovnání sekvencí daného úseku mtDNA je možné rozlišit všech 6 zkoumaných druhů náležících 3 rodům v rámci čeledi bzučivkovitých.

### Kontrolní oblast (CR)

Kontrolní oblast (control region, AT-rich region) je hlavní nekódující oblastí mtDNA, která hraje roli v replikaci a transkripci kruhové molekuly mitochondriální DNA (Clayton, 1992). U hmyzu má *CR* dvě různé podoby organizace. Pro tuto práci významnější skupina, která zahrnuje čeleď bzučivkovitých, má kontrolní oblast rozdělenou na 2 domény. Konzervovaná doména ve struktuře mtDNA navazuje na oblasti kódující tRNA (methionin (M), glutamin (Q), izoleucin (I)), zatímco variabilní doména sousedí genem pro 12S rRNA. Druhá skupina, do které spadají například komárovití, nemá konzervovanou a variabilní doménu striktně oddělenou, nýbrž dochází ke střídání jejich částí (Zhang & Hewitt, 1997).

Bylo potvrzeno, že u bzučivkovitých konzervovaná doména obsahuje 8 konzervovaných sekvenčních bloků. Naproti tomu variabilní doména se mezi jedinci významně různí jak délkou, tak i sekvencí. Součástí variabilní domény jsou tzv. G ostrůvky, které předcházejí konzervované sekvenci 19 bp, jež je u všech doposud zkoumaných bzučivkovitých stejná. U některých zástupců různých druhů

lze v oblasti variabilní domény nalézt duplikované sekvence, nebo jejich části, kódující tRNA (I, Q či M) (Duarte et al., 2008).

### ***Wolbachia***

*Wolbachia* je rod intracelulárních bakterií, které se často vyskytují u členovců a hlístic. Pro hmyz je *Wolbachia* pandemicky rozšířeným parazitem, který se nachází v reprodukčních tkáních a který může v mnoha směrech ovlivňovat svého hostitele. Bakterie indukuje například partenogenezi, vymírání samčího potomstva během embryogeneze, či cytoplazmatickou inkompatibilitu, jež se projevuje neschopností rozmnožování mezi infikovanými a neinfikovanými jedinci. V této inkompatibilitě dále hraje roli, zda je infikovaný samec nebo samice nebo to, jakými bakteriálními liniemi jsou nakaženi (Werren et al., 2008).

V této práci byl rod *Wolbachia* zařazen mezi DNA markery, jelikož existuje možnost určitého rozlišení populací v rámci zkoumaných druhů na základě toho, zda z izolované DNA dvoukřídlého jedince lze amplifikovat úsek DNA náležící rodu *Wolbachia*. Tyto bakterie, kromě ovlivnění vývoje populací již zmíněnými mechanismy zasahujícími do rozmnožování, někdy také mohou poněkud zkreslit výsledky analýz mitochondriálních sekvencí. Pokud například sekvenujeme *COI*, můžeme číst i bakteriální *COI*, která se v reakci PCR namnožila díky použití univerzálních primerů, čímž může docházet k nesprávné interpretaci diverzit mezi populacemi. Bylo ale prokázáno, že tento problém nedosahuje příliš velikých rozměrů a neovlivňuje přesnost „DNA barcodových“ knihoven (Smith et al., 2012).

Dalším z případných efektů, jež *Wolbachia* může u hmyzu způsobovat, je snížení diverzity mtDNA. Nakažení jedinci jsou totiž při rozmnožování upřednostňováni, takže dochází k jejich rychlé pozitivní selekci. Důsledkem je nárůst frekvence jejich mitochondriálních haplotypů, a tedy celkový pokles variability mtDNA v rámci dané populace (Hurst & Jiggins, 2005).

## 2 CÍLE PRÁCE

- Na základě literatury vytipovat molekulární markery vhodné pro detekci geografické variability populací forenzně významného hmyzu z čeledi bzučivkovitých (Calliphoridae).
- V rámci pilotní studie otestovat zvolené genetické markery pro vybrané druhy typické pro Českou republiku.

### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Materiál

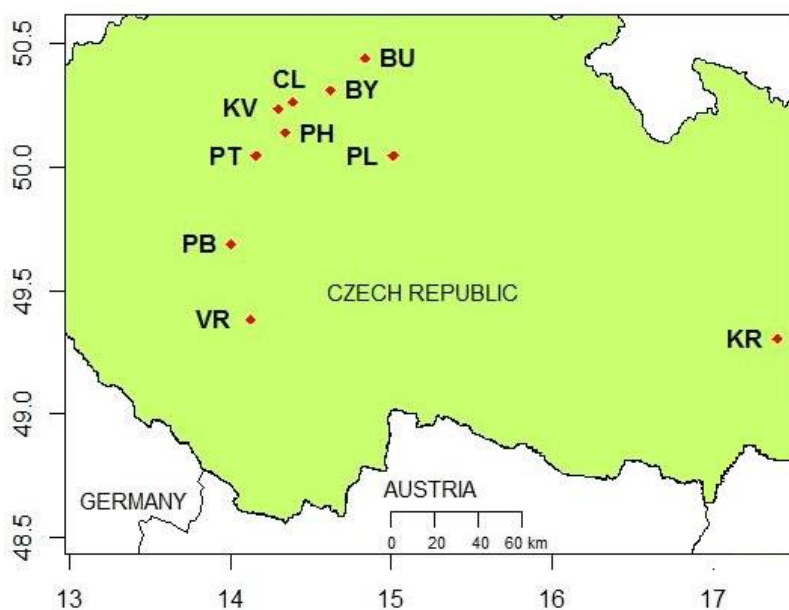
Veškerý analyzovaný materiál pro tuto práci poskytla plk. Ing. Hana Šuláková, Ph.D. (Kriminalistický ústav PČR Praha), která také provedla jejich morfologickou druhovou identifikaci. Vzorky pocházely z 10 různých lokalit na území České republiky, přičemž se jednalo o dospělé 4 různých druhů z čeledi bzučivkovitých (*Calliphora vicina*, *Lucilia caesar*, *L. sericata* a *Phormia regina*). Vzorky byly sbírány v prostředí experimentů, které k imitaci rozkladu lidského těla využívaly prase domácí. Celkem bylo analyzováno 45 jedinců. Následující tabulka I zobrazuje přehled jednotlivých vzorků.

**Tab. I:** Seznam analyzovaných vzorků.

Druh	Lokalita sběru	Počet jedinců
<i>Calliphora vicina</i>	Plaňany (PL)	4
	Praha (PH)	7
	Kralupy nad Vltavou (KV)	5
<i>Lucilia caesar</i>	Kroměříž (KR)	6
	Příbram (PB)	4
	Ptice (PT)	3
	Vráž (VR)	2
<i>Lucilia sericata</i>	Plaňany (PL)	2
	Bukovno (BU)	5
	Byšice (BY)	2
<i>Phormia regina</i>	Byšice (BY)	4
	Červená Lhota (CL)	1

Polohy jednotlivých lokalit sběru vzorků byly vyneseny do mapy pomocí GPS souřadnic a jsou zobrazeny na obrázku 8.





**Obr. 8:** Geografické polohy lokalit sběru vzorků, zkratky viz tabulka I (vytvořeno v programu R 3.4.2 (R Development Core Team, 2008)).

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Extrakce DNA

Všechny vzorky byly po sběru determinovány a ve zkumavkách se 100% ethanolem uchovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Extrakce DNA byla prováděna z končetin hmyzu, pro detekování bakterií *Wolbachia* byla DNA získána ze zadečků. Před samotnou izolací byly vzorky osušeny od ethanolu a izolace byla poté provedena pomocí komerčního kitu Exgene<sup>TM</sup> Tissue (plus) SV mini, 250p (GeneAll). Postup byl proveden dle návodu výrobce (protokol pro hmyz). Poslední bod (eluze) byl pro větší výtěžnost proveden ve dvou krocích, přičemž pokaždé bylo použito  $50\text{ }\mu\text{l}$  elučního pufru. Získaná DNA byla skladována v mrazícím boxu při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  připravena k dalšímu použití jako templát pro PCR.

## 3.2.2 Výběr cílových oblastí genomu a příslušných primerů

### 3.2.2.1 Mitochondriální DNA markery

Z mitochondriálních markerů byla nejprve vybrána oblast kódující cytochrom c oxidázu – podjednotku I. Amplifikací byla jednak ověřována úspěšnost extrakce DNA u všech vzorků a dále byly produkty PCR také využity pro samotné sekvenování a následně pro analýzu oblasti *COI*. Byly použity standardně využívané univerzální primery pro „DNA barcoding“ (Folmer et al., 1994; Pan et al., 2006). Pro vyšší výpovědní hodnotu srovnání vnitrodruhové variability byly také přidány dostupné sekvence z databáze BOLD Systems (<http://www.barcodinglife.org/>), které patřily jedincům těchto druhů z různých evropských států. Seznam všech použitých sekvencí je uveden v příloze 1.

Další výběr vhodných mtDNA markerů byl proveden na základě porovnání variabilit mitochondriálních genů kódujících proteiny v rámci čeledi Calliphoridae. Byly použity sekvence 13 zástupců různých druhů z databáze Metamiga (<http://amiga.cbmeg.unicamp.br/>), jež měly osekvenovaný kompletní mitogenom (detailní přehled je umístěn v příloze 2). Následně byla pro každý gen v programu MEGA 6 (Tamura et al., 2013) určena variabilita prostřednictvím p-distance. Z tabulky II je patrné, že nejvíce variabilním genem mezi druhy byla NADH dehydrogenáza – podjednotka 6, následovaná cytochromem B. Tyto dvě oblasti byly tedy pro tuto práci vybrány jako nejvhodnější mitochondriální DNA markery a byly pro ně zvoleny příslušné primery z přilehlých oblastí mitogenomu (viz tabulka IV).

**Tab. II:** Variabilita mitochondriálních genů kódujících proteiny vyjádřená pomocí p-distance.

<b>Gen</b>	<b>p-distance [%]</b>
<i>ATP6</i>	8,8
<i>ATP8</i>	6,5
<i>COI</i>	8,3
<i>COII</i>	7,3
<i>COIII</i>	8,0
<i>CytB</i>	<b>9,5</b>
<i>ND1</i>	7,7
<i>ND2</i>	9,4
<i>ND3</i>	8,7
<i>ND4</i>	7,3
<i>ND4L</i>	5,4
<i>ND5</i>	8,9
<i>ND6</i>	<b>11,7</b>

Posledním z mitochondriálních DNA markerů, kterými se tato práce zabývá, je kontrolní oblast. Tato oblast byla vybrána na základě literatury, jež poukazuje na přítomnost variabilní domény navazující na oblast *12S*. Variabilita této domény je značná (Simon et al., 1994; Oliveira et al., 2007; Duarte et al., 2008), a mohla by tak mít potenciál pro geografické rozlišení forenzně významného hmyzu. PCR primery použité pro CR byly vybrány ze zmíněných publikací.

### 3.2.2.2 Jaderné DNA markery

Z jaderných markerů byly nejprve na základě literatury (např. Douglas & Haymer, 2001; Zaidi et al., 2011) vytipovány oblasti *ITS*, přičemž předmětem zájmu byla především oblast *ITS1*, která by pro svou variabilitu také mohla být potenciálně využita jako marker vhodný k odlišení jednotlivých populací hmyzu důležitého pro forenzní entomologii. Primery byly zvoleny pro amplifikaci kompletní *ITS* oblasti (Ratcliffe et al., 2003; Sheppard & McPheron, 1991).

Dále byly vybrány oblasti intronů různých genů, jež měly být amplifikovány pomocí techniky EPIC. Nejprve byly na základě publikace Palumbi (1994) vybrány oblasti kódují elongační faktor  $1\alpha$ , aktin a cytochrom C s příslušnými univerzálními primery pro třídu hmyzu.

Specifičtější lokusy pro skrínink pomocí EPIC byly vybrány na základě práce Lee et al. (2011), která analyzovala transkriptom larválních stadií *Lucilia cuprina*

s cílem identifikovat jednotlivé geny a namapovat je na jednotlivé chromosomy. Všech 41 lokusů bylo porovnáno s genomy *L. sericata* (PRJNA268391), *C. vicina* (PRJNA268391) a *P. regina* (PRJNA338752) pro nalezení homologů. Z nich pak bylo vybráno 5 markerů, které měly optimální velikost intronu (zhruba 100 - 250 bp), a primery (viz tabulka V) byly navrženy tak, aby rozdíl mezi lokusem s intronem a bez intronu byl pozorovatelný na standardním agarózovém gelu. Přehled vybraných markerů včetně předpokládaných délek ampliconů i intronů je uveden v tabulce III.

**Tab. III:** Přehled lokusů pro skrínink pomocí EPIC vybraných na základě práce Lee et al. (2011).

Lokus	Celková délka ampliconu (bp)	Délka intronu (bp)
<i>Proteazom - beta 2 podjednotka</i>	513	91
<i>Ribozomální protein S12</i>	403	93
<i>Ribozomální protein S13</i>	374	97
<i>Ribozomální protein L7</i>	570	250
<i>Ribozomální protein L12</i>	407	126

### 3.2.2.3 *Wolbachia*

Bakteriální rod *Wolbachia* byl vybrán jako marker pro možné rozlišení populací zkoumaných druhů na základě dostupné literatury (např. Werren et al, 2008; Mingchay et al., 2014). Primery byly zvoleny pro oblast *16S* (O'Neill et al., 1992).

### 3.2.3 Polymerázová řetězová reakce

Míchání PCR bylo prováděno na ledu, používány byly zkumavky s objemem 0,2 ml. Primárně byla využívána Unis Taq DNA polymeráza a k ní náležící reagentie (Top Bio), přesné složení reakční směsi je uvedeno v tabulce IV. V případech, kdy se nepodařilo provést amplifikaci, bylo do reakce při dalším pokusu přidáno i BSA (Bovine Serum Albumine, 20 mg/ml; Fermentas), jež by mělo účinnost reakce zvyšovat, avšak v této práci požadovaného efektu dosaženo nebylo. Následně proto byla použita citlivější a dražší PrimeSTAR GXL DNA polymeráza s příslušnými reagentiemi (TaKaRa), s níž bylo dosaženo lepších výsledků. Do každé zkumavky bylo přidáváno 1,5 µl konkrétního DNA templátu.

**Tab. IV:** Složení reakčních směsí pro použité polymerázy.

	<b>Unis Taq</b>	<b>PrimeSTAR GXL</b>
ddH <sub>2</sub> O	7,25 µl	6,25 µl
Pufir (10x Unis Taq / 5x PrimeStar GXL)	1,25 µl	2,5 µl
dNTPs (2,5 mM)	1 µl	1 µl
Primer forward (5 µM)	0,75 µl	0,75 µl
Primer revers (5 µM)	0,75 µl	0,75 µl
Polymeráza (Unis Taq – 5 U/µl, PrimeSTAR GXL – 1,25 U/µl)	0,1 µl	0,25 µl
Templátová DNA	1,5 µl	1,5 µl

Následuje tabulka, která zachycuje seznam všech použitých primerů.

**Tab. V:** Přehled všech použitých primerů, žlutou barvou označeny primery úspěšně aplikované k amplifikaci příslušných fragmentů.

Oblast	Primer	Typ	Sekvence 5'→3'	Publikováno
<i>COI</i>	LCO-1490	F	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer et al. 1994
	HCO-2198 L	R	TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA	Pan et al. 2006
<i>ND6</i>	N4L-J-9648	F	ACCTAAAGCTCCCTCACAWAC	Simon et al. 2006
	CB-N-11010	R	TATCTACAGCRAATCCYCCYCA	Simon et al. 2006
	N4-J-8502	F	GTAGGAGGAGCTGCTATATTAG	Simon et al. 1994
	N4-J-8944	F	GGAGCTTCAACATGAGCTTT	Simon et al. 1994
	CB-N-10920	R	CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	Simon et al. 1994
<i>CytB</i>	CB-J-10933	F	TATGTACTACCATGAGGACAAATATC	Simon et al. 1994
	CB-N-11526	R	TTCTACTGGTCGRGCTCCAATYCA	Simon et al. 2006
<i>CR</i>	SR-J-14612	F	AGGGTATCTAATCCTAGTTT	Simon et al. 1994
	TM-N-193	R	GCTACTGGGTTTCATACCCCA	Simon et al. 1994
<i>Pβ2</i>	Pb2-For	F	CTTTTGAGGAATGGATTCCAA	Žurovcová 2017
	Pb2-Rev	R	TTTGTCTGTCGAGCCATG	Žurovcová 2017
<i>RP S12</i>	RpS12-For	F	AATCTTTAATTGCCGATGGTC	Žurovcová 2017
	RpS12-Rev	R	GCTCCTTGACGACATCCAA	Žurovcová 2017
<i>RP S13</i>	RpS13-For	F	TACAGAAGAACCGTTCCCT	Žurovcová 2017
	RpS13-Rev	R	ATCCTTGCGGTTACGTTCC	Žurovcová 2017
<i>RP L7</i>	RpL7-For	F	AAGGTGATCAGCAAGCGTG	Žurovcová 2017
	RpL7-Rev	R	TTCAACTTGATGAAGACACC	Žurovcová 2017
<i>RP L12</i>	RpL12-For	F	GTGATGACATTGCCAAGGC	Žurovcová 2017
	RpL12-Rev	R	TACACTTTGGGCAGTACCC	Žurovcová 2017
<i>EF 1α</i>	EF0-5'	F	TCCGGATGGCAYGGCGAGAAYATG	Villablanca et al. 1998
	EF2-3'b	R	ATGTGAGCAGTGTGGCAATCCAA	Villablanca et al. 1998
<i>ACT</i>	Act-for	F	GCTGTTTTCCCGTCCATTGT	Palumbi 1996
	Act-rev	R	GTCCTTCTGCCCCATACCSACCAG	Palumbi 1996
<i>CytC</i>	CytC-for	F	AAGTGTGCYCARTGCCACAC	Palumbi 1996
	CytC-Rev	R	CATCTTGGTGCCGGGATGTATTTCTT	Palumbi 1996
<i>ITS</i>	1975F	F	TAACAAGGTTTCCGTAGGTG	Sheppard & McPherson 1991
	52R	R	GTTACTTTCTTTTCCTCCCCT	Ratcliffe et al. 2003
	ITSr2	R	ATGTGCGTTCRAAATGTCGATGTTC	Ji et al. 2003
<i>Wolbachia</i>	16Sf	F	TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT	O'Neill et al. 1992
	16Sr	R	GAATAGGTATGATTTTCATGT	O'Neill et al. 1992

### 3.2.3.1 PCR profily

Polymerázová řetězová reakce byla prováděna v termocyklerech TProfessional TRIO Thermocycler (Biometra) a Mastercycler ep gradientS

(Eppendorf) s využitím profilů, jež byly převzaty z příslušných publikací nebo byly navrženy v laboratoři a podle dosahovaných výsledků byly následně optimalizovány. Následuje výčet všech PCR profilů, jež byly úspěšně využity pro amplifikaci zkoumaných oblastí (tabulka VI).

**Tab. VI:** Přehled úspěšně použitých PCR profilů.

	<i>COI</i>	<i>ND6</i>	<i>CytB</i>	<i>CR</i>
<b>1. Predenaturace</b>	94 °C / 1 min	95 °C / 3 min	95 °C / 3 min	94 °C / 3 min
<b>2. Denaturace</b>	94 °C / 10 s	95 °C / 30 s	95 °C / 30 s	94 °C / 1 min
<b>3. Annealing</b>	47 °C / 40 s	46 °C / 30 s	51 °C / 30 s	40 °C / 1 min
<b>4. Elongace</b>	72 °C / 50 s	68 °C / 90 s	68 °C / 1 min	60 °C / 2 min
<b>5. Postelongace</b>	72 °C / 2 min	68 °C / 10 min	68 °C / 10 min	60 °C / 10 min
<b>6. Uchování</b>	4 °C / ∞	4 °C / ∞	4 °C / ∞	4 °C / ∞
<b>Počet cyklů 2 - 4</b>	40	35	35	35
	<i>RP S12</i>	<i>RP S13</i>	<i>RP L12</i>	<i>Pβ2</i>
<b>1. Predenaturace</b>	94 °C / 1 min	94 °C / 1 min	94 °C / 1 min	94 °C / 1 min
<b>2. Denaturace</b>	94 °C / 10 s	94 °C / 10 s	94 °C / 10 s	94 °C / 10 s
<b>3. Annealing</b>	50 °C / 40 s	50 °C / 40 s	50 °C / 40 s	50 °C / 40 s
<b>4. Elongace</b>	72 °C / 45 s	72 °C / 45 s	72 °C / 45 s	72 °C / 45 s
<b>5. Postelongace</b>	72 °C / 2 min	72 °C / 2 min	72 °C / 2 min	72 °C / 2 min
<b>6. Uchování</b>	4 °C / ∞	4 °C / ∞	4 °C / ∞	4 °C / ∞
<b>Počet cyklů 2 - 4</b>	40	40	40	40
	<i>CytC</i>	<i>ITS</i>	<i>Wolbachia</i>	
<b>1. Predenaturace</b>	94 °C / 2 min	95 °C / 3 min	94 °C / 2 min	
<b>2. Denaturace</b>	94 °C / 20 s	95 °C / 30 s	94 °C / 30 s	
<b>3. Annealing</b>	46 °C / 40 s	51 °C / 30 s	52 °C / 30 s	
<b>4. Elongace</b>	72 °C / 50 s	68 °C / 90 s	72 °C / 50 s	
<b>5. Postelongace</b>	72 °C / 2 min	68 °C / 10 min	72 °C / 2 min	
<b>6. Uchování</b>	4 °C / ∞	4 °C / ∞	4 °C / ∞	
<b>Počet cyklů 2 - 4</b>	35	35	35	

### 3.2.4 Gelová elektroforéza

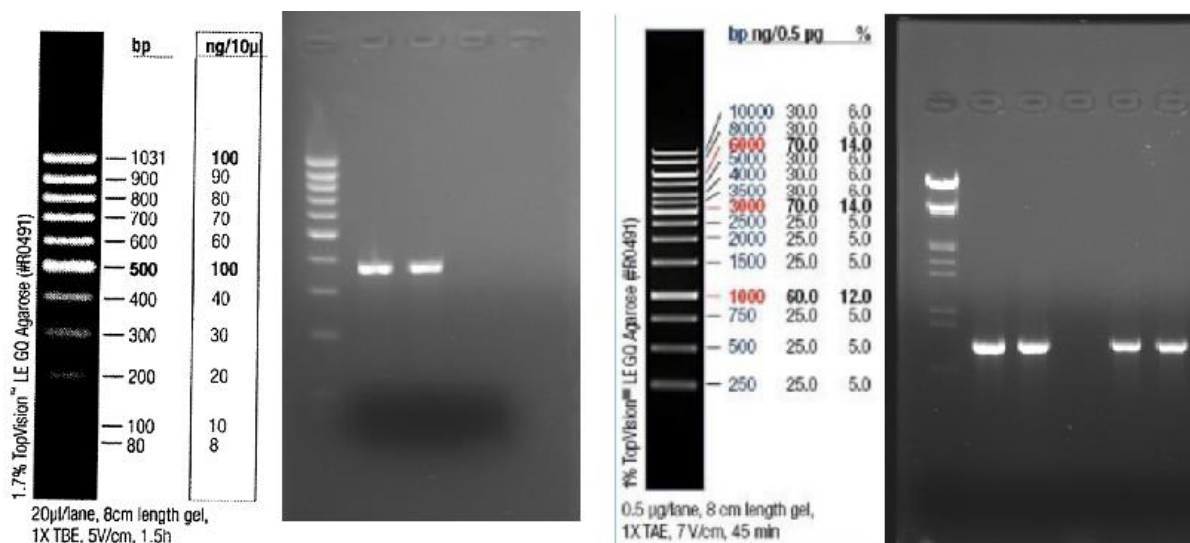
Pro ověření úspěšnosti provedené PCR byla vždy využita elektroforetická separace, která zobrazuje nejen samotnou přítomnost amplifikovaných DNA fragmentů, ale také jejich velikost a množství. Standardně byl využíván 2% agarózový gel, avšak pro rozdělení produktů reakcí, kdy byly množeny lokusy

prostřednictvím EPIC, byla koncentrace agarózy zvýšena na 3 %, což mělo zajistit rozpoznání lokusů s intronem a bez intronu.

Gel s 2% koncentrací agarózy byl připraven rozpuštěním 4 g agarózy 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). Rozpuštění bylo prováděno v mikrovlnné troubě po dobu 2 – 3 minut. Pod tekoucí vodou byl gel následně zchlazen na teplotu cca 45 °C a bylo přidáno 15 µl ethidium bromidu o koncentraci 0,5 µg/µl. Poté byl gel nalit do připravené formy s umístěnými hřebínky, které zajistily vznik jamek. Tuhnutí gelu trvalo zhruba 45 minut při pokojové teplotě a hotový tuhý gel byl skladován při 4 °C v 1x TAE pufru. Příprava a skladování 3% agarózového gelu byly identické, pouze na začátku bylo ve 200 ml 1x TAE pufru oproti 4 g rozpuštěno 6 g agarózy.

Na připravený gel byly nanášeny 2 µl PCR produktu, které byly smíchány s 2 µl nanášecího pufru (700 µl ddH<sub>2</sub>O, 300 µl 100% glycerolu, 0,5 mg bromfenolové modři). Pro možnost určení množství a velikostí PCR produktů byly do prvních jamek gelu nanášeny velikostní markery, přičemž pro 2% gel byl využíván marker Lambda DNA/EcoRI+Hind III (Fermentas), zatímco pro 3% gel MassRuler™ Low Range DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas). Elektroforéza probíhala zhruba 40 minut při napětí 120 V a při pokojové teplotě. Po jejím proběhnutí byly rozdělené PCR produkty zobrazeny pod UV transluminátorem a byla vždy pořízena fotografie, jejíž příklady jsou uvedeny na obrázku 9.





**Obr. 9:** Vlevo MassRuler™ Low Range DNA Ladder s reálným příkladem fotografie gelu s rozdělenými PCR produkty, vpravo Lambda DNA/EcoRI+Hind III marker s reálným příkladem fotografie gelu s rozdělenými PCR produkty.

### 3.2.5 Přečištění vzorků pomocí metody ExoSap

Po úspěšném ověření amplifikace konkrétního fragmentu DNA bylo potřeba PCR produkt přečistit od zbytků nespotřebovaných dNTPs a primerů. Pro tento účel byla využita metoda ExoSap, jež pracuje se 2 hydrolytickými enzymy (Dugan et al., 2002). Do každé zkumavky s PCR produktem bylo přidáno 0,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 0,5  $\mu$ l Exo (Exonuclease I, 20 U/ $\mu$ l; Fermentas) a 1  $\mu$ l FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, 1 U/ $\mu$ l; Fermentas). Míchání probíhalo na ledu, dále byl vzorek zvortexován a poté probíhala inkubace v termocykléru při 37 °C po dobu 30 minut následovaná inaktivací enzymů při 80 °C po dobu 15 minut. Takto přečištěný produkt byl připraven pro sekvenční reakci.

### 3.2.6 Sekvenování

Směs pro sekvenční reakci byla vždy připravena smícháním 5  $\mu$ l přečištěného PCR produktu a 5  $\mu$ l příslušného primeru (5  $\mu$ M). Velká část vzorků byla sekvenována v laboratoři Kriminálního ústavu Praha PČR, kam byly vzorky připravovány napipetováním do mikrotitračních destiček (96-jamkových). Dále bylo sekvenování prováděno v laboratořích společností SEQme s.r.o. a GATC Biotech AG.

V těchto případech byly používány zkumavky, jejichž typ se lišil podle instrukcí firmy, která sekvenaci prováděla.

### 3.2.7 Klonování

Vzhledem k problémům s přečtením konkrétní *ITS* sekvence u většiny jedinců, jež mohly plynout z jejich heterozygotní konstituce pro daný lokus, bylo provedeno klonování PCR produktů.

Nejprve byl z 15 g agaru, 10 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu a 1 l destilované vody připraven agar, který byl potom klávován po dobu 60 minut. Po zchladnutí byl do agaru přidán 1 ml ampicilinu, takže jeho výsledná koncentrace byla 1 µl / 1 ml agaru a agar byl následně rozlit do Petriho misek. Po ztuhnutí bylo na každou misku pomocí sterilní kličky rozetřeno 60 µl X-gal (20 mg/1 ml DDT) a 3,5 µl IPTG (240 mg/ml). Další postup spočíval v zaklonování daného PCR produktu do kompetentních buněk prostřednictvím pGEM-T Easy Vector Systems™ (Promega™), přičemž byl přesně následován příložený protokol výrobce s výjimkou použití LB (lysogeny broth) media (připraveno z 10 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu, 10 g NaCl a 1 l destilované vody) namísto uvedeného SOC media. Na závěr byla sterilní špičkou odebrána jedna z bílých kolonií a přenesena do 50 µl ddH<sub>2</sub>O. Zkumavka byla následně zahřívána na 95 °C po dobu 10 minut. Tento produkt poté mohl být využit jako templát pro novou PCR.

### 3.2.8 Statistické zpracování sekvencí

Sekvence byly kontrolně identifikovány pomocí databáze NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Kvalita sekvencí byla vizuálně ověřována v programu Chromas 2.6.5 (<https://technelysium.com.au>).

Pokud bylo potřeba, sekvence byly opraveny v programu MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Tento program byl využíván i dále, a to k řazení sekvencí a tvorbě alignmentů pomocí metody ClustalW. U kódujících sekvencí byl dodržen formát čtecího rámce (ORF). Pro potřebu dalšího statistického zpracování sekvencí byly také vytvořeny spojené (konkatenované) soubory tvořené za sebou jdoucími sekvencemi různých markerů (mitochondriálních, jaderných, všech získaných).

V programu MEGA 6 byly určeny základní vlastnosti sekvencí, konkrétně jejich délka, nukleotidové složení, počet variabilních míst a parsimoniální variabilita.

V tomto programu byl dále vybrán vhodný model pro výpočet genetické vzdálenosti a s jeho pomocí byly poté metodou Neighbour-Joining (NJ) vytvořeny dendrogramy sloužící k provedení klastrové analýzy. Statistická podpora stromů byla ověřována metodou Bootstrap (1000 opakování).

Dále byl používán program DnaSP ver. 5 (Librado & Rozas, 2009), ve kterém byly identifikovány haplotypy, na základě čehož byly následně vypočteny standardní genetické indexy jako haplotypová diverzita (HD) a nukleotidová diverzita ( $\pi$ ). Také byly připraveny soubory haplotypů pro další analýzu.

K prozkoumání genetické variability mezi populacemi v rámci jednotlivých druhů byly v programu Arlequin ver. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) zjištěny hodnoty párového  $F_{ST}$ , které je základním koeficientem vypovídajícím o genetické diferenciaci populací (Wright, 1965). V tomto programu byly také vypočteny testy neutrality, konkrétně Tajimův a  $F_u$  test, za účelem prozkoumání demografické historie nebo působení selekce (Tajima, 1989; Fu, 1997).

Haplotypové sítě byly vytvořeny v programu PopART ver. 1.7.2 (<http://popart.otago.ac.nz/>) pomocí metody Median-Joining (MJ) (Bandelt et al., 1999).

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Testované markery

Pro zjištění geografické variability populací forenzně významných druhů z čeledi bzučivkovitých v rámci České republiky byla testována řada DNA markerů jak jaderných, tak i mitochondriálních.

Vytipované mitochondriální markery (*COI*, *ND6*, *CytB* a *CR*) byly s úspěchem amplifikovány i sekvenovány s výjimkou kontrolní oblasti, u níž se vzhledem k přítomnosti A/T řetězků podařilo přečíst pouze část ampliconu. Další výjimku tvořil marker *CytB*, který se nepodařilo amplifikovat pro druh *P. regina*.

Z jaderných markerů byly vybrány oblasti *ITS* a oblasti intronů různých genů, jejichž sekvence měly být základem pro skřínink pomocí EPIC. U markeru *ITS*, ačkoliv byl vhodně optimalizován profil PCR, sekvence nedosahovaly požadované kvality, a to ani po zaklonování PCR produktu.

Z EPIC markerů byly úspěšně amplifikovány a následně sekvenovány introny genů pro ribozomální proteiny L12, S12 a S13 a intron oblasti beta 2 podjednotky proteazomu. Naopak introny oblastí RP L7, elongačního faktoru 1 $\alpha$  a aktinu se amplifikovat nepodařilo. Pro oblast cytochromu C byla amplifikace úspěšná, avšak při zpracování sekvencí se ukázalo, že intron není přítomen.

Přítomnost rodu *Wolbachia* v testovaných vzorcích se potvrdit nepodařilo. Vhodné nastavení PCR bylo ověřováno pomocí pozitivní kontroly s již dříve detekovanými bakteriemi, přičemž tato kontrola byla jediným úspěšně amplifikovaným vzorkem.

### 4.2 Genetická variabilita

#### 4.2.1 Základní charakteristiky

##### Mitochondriální markery

Jak již bylo zmíněno, z mitochondriálního genomu byly analyzovány oblasti *COI*, *ND6*, *CytB* a *CR*. Při analýze genu *COI* bylo k 45 úspěšně získaným sekvencím

přidáno 99 dostupných sekvencí z různých evropských států z databáze BOLD Systems (<http://www.barcodinglife.org>).

Sekvence byly vždy upraveny na jednotnou délku v rámci druhů. Získané údaje jsou podrobně rozepsány v tabulce VII, která zachycuje přesné délky alignmentů pro jednotlivé markery a druhy spolu s příslušnými obsahy variabilních a parsimoniálně informativních míst. Dále tabulka obsahuje také průměrné procentuální zastoupení nukleotidů daných oblastí.

Obsah variabilních a parsimoniálně informativních pozic však zde nemůže být vnímán jako definitivní ukazatel genetické variability druhů, jelikož hodnoty mají charakter absolutních hodnot, a mohou tak být zásadně ovlivněny počtem analyzovaných sekvencí i délkou alignmentů, které v této práci nejsou jednotné. Proto mají tyto parametry jen informativní hodnotu.

**Tab. VII:** Druhovú genetická variabilita mitochondriálních markerů, N = délka sekvence, V = počet variabilních míst, Pi = počet parsimoniálně informativních míst.

Marker	Druh	Počet jedinců	Průměrná frekvence nukleotidů (%)				N (bp)	V	Pi
			T(U)	C	A	G			
COI	<i>C. vicina</i>	41	37,3	16,5	30,5	15,7	622	13	6
	<i>L. caesar</i>	50	37,9	16,1	30,5	15,5	636	26	16
	<i>L. sericata</i>	39	38,3	15,6	30,3	15,7	660	7	2
	<i>P. regina</i>	14	36,7	17,3	29,4	16,6	646	3	0
ND6	<i>C. vicina</i>	16	44,5	11,1	38,7	5,8	525	5	3
	<i>L. caesar</i>	15	44,6	11,6	37,9	5,9	525	10	5
	<i>L. sericata</i>	9	45,3	10,7	38,3	5,7	525	1	0
CytB	<i>C. vicina</i>	16	41,9	15,0	31,8	11,3	566	6	2
	<i>L. caesar</i>	15	42,0	15,0	30,7	12,3	545	12	6
	<i>L. sericata</i>	9	41,0	16,2	31,5	11,3	572	3	2
	<i>P. regina</i>	5	40,5	16,4	31,3	11,8	510	18	18
CR	<i>C. vicina</i>	14	41,1	8,0	48,6	2,3	323	16	5
	<i>L. caesar</i>	14	40,5	8,9	47,1	3,5	679	15	8
	<i>L. sericata</i>	8	42,8	6,4	48,2	2,6	437	8	2
	<i>P. regina</i>	5	37,1	10,7	46,0	6,2	533	10	10

Pro marker *COI* obsahoval nejvíce variabilních míst druh *L. ceasar*, a to 26 (tedy 4 % z celkové délky sekvence), z nichž 16 bylo zároveň parsimoniálně informativních. Naopak nejméně variabilních míst bylo nalezeno u druhu *P. regina*, pouze 3 variabilní pozice (tedy 0,5% zastoupení), z nichž žádná nebyla parsimoniálně informativní.

Oblast genu *ND6* se nepodařilo amplifikovat u druhu *P. regina*, avšak pro zbylé 3 druhy byly amplifikace i sekvenování úspěšné. Sekvence byly upraveny na jednotnou délku 525 bp. Nejvíce variabilních a parsimoniálně informativních míst bylo přítomno u druhu *L. ceasar* (10 / 5), naopak nejméně u *L. sericata* (1 / 0).

Sekvence genu *CytB* byly získány pro všech 45 jedinců. Alignmenty sekvencí dosahovaly délek 510 – 572 bp podle druhu. Nejvíce variabilním druhem pro tento lokus byl *P. regina* s obsahem 18 variabilních míst (3,53 %), z nichž všechna byla zároveň parsimoniálně informativní. Naopak sekvence patřící *L. sericata* byly variabilní nejméně a obsahovaly pouze 3 variabilní a 2 parsimoniálně informativní místa.

Sekvence kontrolních oblastí byly získány pro 41 jedinců. Ačkoli se nepodařilo přečíst pořadí nukleotidů v celé délce amplikonu, byly získány sekvence fragmentů variabilní domény *CR* a přilehlé oblasti *I2S*.

U druhů *C. vicina* a *L. sericata* v oblasti *I2S* nebyla zjištěna žádná variabilita, proto dané alignmenty byly vytvořeny pouze z oblasti *CR*. Jako variabilnější se jevil druh *C. vicina*, který oproti *L. sericata* s 8 variabilními pozicemi (1,8 %) obsahoval 16 variabilních pozic (4,8 %). Navíc u dvou jedinců tohoto druhu byla pozorována délková variabilita. Sekvence těchto inzertovaných lokusů byly identifikovány jako duplikované fragmenty genu kódujícího tRNA pro izoleucin.

Naopak pro druhy *L. ceasar* a *P. regina* byla zjištěna variabilní místa i v sekvenci oblasti *I2S*, ta proto byla pro analýzu zachována. Výsledné alignmenty byly dlouhé 679 bp (*L. ceasar*) a 533 bp (*P. regina*) a v témže pořadí obsahovaly 15 a 10 variabilních míst.

### **Jaderné markery**

Stejně jako u mitochondriálního genomu byly analyzovány 4 úspěšně sekvenované jaderné markery, a to introny oblastí *RP L12*, *S12*, *S13* a *Pβ2*. Všechny údaje popisující základní charakter sekvencí těchto jaderných markerů pro jednotlivé

druhy jsou včetně jejich nukleotidového složení detailně uvedeny v tabulce VIII, oproti mitochondriálním markerům je navíc uvedena délka přítomného intronu.

**Tab. VIII:** Druhová genetická variabilita jaderných markerů, N = délka sekvence, I = délka intronu, V = počet variabilních míst, Pi = počet parsimoniálně informativních míst.

Marker	Druh	Počet jedinců	Průměrná frekvence nukleotidů (%)				N (bp)	I (bp)	V	Pi
			T(U)	C	A	G				
L12	<i>C. vicina</i>	15	35,1	20,7	27,1	17,1	251	98	0	0
	<i>L. caesar</i>	15	30,7	22,4	31,0	15,8	335	130	0	0
	<i>L. sericata</i>	9	34,4	18,3	31,5	15,8	279	125	0	0
	<i>P. regina</i>	5	33,9	20,6	29,9	15,6	224	86	0	0
Pb2	<i>C. vicina</i>	16	31,8	17,5	29,9	20,9	422	90	0	0
	<i>L. sericata</i>	9	32,9	18,4	28,8	19,9	419	79	5	2
	<i>P. regina</i>	5	32,3	15,0	31,0	21,6	393	83	0	0
S12	<i>C. vicina</i>	16	30,9	22,4	25,0	21,7	282	78	1	0
	<i>L. caesar</i>	14	32,3	23,8	23,8	20,1	294	80	2	2
	<i>L. sericata</i>	9	34,3	22,3	24,0	19,4	283	79	0	0
	<i>P. regina</i>	5	31,1	20,3	26,8	21,8	325	76	0	0
S13	<i>C. vicina</i>	14	32,8	19,5	27,9	19,9	287	92	0	0
	<i>L. caesar</i>	14	36,0	17,3	26,7	20,0	225	100	0	0
	<i>L. sericata</i>	8	32,1	16,8	30,0	21,0	275	95	3	3
	<i>P. regina</i>	5	33,0	16,2	31,0	19,8	303	85	0	0

Z tabulky je patrné, že zvolené jaderné markery obsahovaly výrazně méně variabilních míst než mitochondriální markery. Ve většině případů nebyla objevena žádná variabilní místa. Sekvence oblasti intronu genu ribozomálního proteinu L12 byly všechny téměř identické, pouze u jednoho jedince druhu *P. regina* byla přítomna délková variabilita ve formě delece jednoho trinukleotidu.

Intron proteazomální beta 2 podjednotky se nepodařilo amplifikovat pro druh *L. caesar*, ovšem u zbývajících 3 druhů byly sekvence úspěšně získány pro všechny zkoumané jedince. Pro druhy *C. vicina* a *P. regina* nebyla pozorována žádná

variabilita. U *L. sericata* byl alignment dlouhý 419 bp, intron 79 bp a přítomno bylo 5 variabilních míst, z nichž 2 byla parsimoniálně informativní.

Intron genu *RP S12* byl získán pro 44 jedinců pocházejících ze všech 4 druhů. Sekvence byly upraveny na jednotnou délku v rozmezí 282 - 325 bp. U *L. sericata* i u *P. regina* byly amplifikované oblasti monomorfní. Nejvyšší variabilita byla prokázána pro *L. caesar*, avšak i zde se jednalo pouze o 2 variabilní místa.

Poslední z EPIC markerů – oblast intronu genu *RP S13* byla s úspěchem získána pro 41 jedinců náležících všem 4 druhům. Délky alignmentů byly upraveny na 225 - 303 bp, přičemž sekvence obsažených intronů pro jednotlivé druhy byly dlouhé 85 – 100 nukleotidů. Variabilní místa byla nalezena pouze u druhu *L. sericata*. Konkrétně se jednalo o 3 variabilní pozice, z nichž všechny byly zároveň parsimoniálně informativní.

## 4.2.2 Vnitrodruhová variabilita

### 4.2.2.1 Celková vnitrodruhová variabilita

#### Mitochondriální markery

Pro zvolené mitochondriální markery byly v programu DNAsp ver. 5 dále vypočteny charakteristiky popisující diverzitu haplotypů jednotlivých druhů a také jejich nukleotidové diverzity. Získané hodnoty pro konkrétní markery a druhy jsou včetně jejich směrodatných odchylek uvedeny na následující stránce v tabulce IX.

Z těchto výsledků byly dále vypočítány průměrné hodnoty pro každý marker, na základě čehož mohla být porovnávána variabilita jednotlivých markerů, jelikož zde se již nejedná o absolutní hodnoty ovlivněné počtem jedinců a délkou sekvencí, nýbrž o hodnoty relativní.

Nejnižší průměrná haplotypová diverzita byla zjištěna u oblasti *COI*, a to 0,466. Průměrná nukleotidová diverzita byla 0,0027. Pro oblast *ND6* byla celková haplotypová diverzita 0,611, nukleotidová diverzita 0,0026. U cytochromu B byla přítomna vyšší haplotypová diverzita – 0,804 i nukleotidová diverzita – 0,008. Oblast *CR* byla prokazatelně nejvíce variabilní, její průměrná haplotypová diverzita byla 0,903 a nukleotidová diverzita 0,0084.



**Tab. IX:** Druhová haplotypová a nukleotidová diverzita mitochondriálních markerů,  
 $h$  = počet přítomných haplotypů,  $HD$  = haplotypová diverzita,  
 $\pi$  = nukleotidová diverzita.

Marker	Druh	$h$	$HD$	$\pi$
<i>COI</i>	<i>C. vicina</i>	9	$0,526 \pm 0,091$	$0,0024 \pm 0,0005$
	<i>L. caesar</i>	12	$0,793 \pm 0,039$	$0,0074 \pm 0,0007$
	<i>L. sericata</i>	4	$0,150 \pm 0,077$	$0,0004 \pm 0,0002$
	<i>P. regina</i>	4	$0,396 \pm 0,159$	$0,0007 \pm 0,0003$
<i>ND6</i>	<i>C. vicina</i>	5	$0,717 \pm 0,095$	$0,0027 \pm 0,0006$
	<i>L. caesar</i>	10	$0,895 \pm 0,070$	$0,0047 \pm 0,0058$
	<i>L. sericata</i>	2	$0,222 \pm 0,166$	$0,0004 \pm 0,0003$
<i>CytB</i>	<i>C. vicina</i>	6	$0,617 \pm 0,135$	$0,0020 \pm 0,0005$
	<i>L. caesar</i>	10	$0,933 \pm 0,045$	$0,0061 \pm 0,0006$
	<i>L. sericata</i>	3	$0,667 \pm 0,105$	$0,0023 \pm 0,0004$
	<i>P. regina</i>	5	$1,000 \pm 0,126$	$0,0212 \pm 0,0045$
<i>CR</i>	<i>C. vicina</i>	9	$0,923 \pm 0,050$	$0,0087 \pm 0,0016$
	<i>L. caesar</i>	9	$0,923 \pm 0,050$	$0,0066 \pm 0,0069$
	<i>L. sericata</i>	7	$0,964 \pm 0,077$	$0,0071 \pm 0,0013$
	<i>P. regina</i>	3	$0,800 \pm 0,164$	$0,0113 \pm 0,0030$

### Jaderné markery

U jaderných markerů byly stejně jako u těch mitochondriálních pomocí programu DNAsp ver. 5 určeny údaje jako haplotypová a nukleotidová diverzita. Přehled získaných hodnot pro jednotlivé markery a druhy je uveden v tabulce X. Následně byly na základě této tabulky také vypočteny průměrné hodnoty pro každou oblast.

Jak již bylo zmíněno, sekvence *RP L12* u žádného z druhů neobsahovaly variabilní místa, haplotypová i nukleotidová diverzita tak byly nulové. Z dalších 3 jaderných markerů byla nejvíce variabilní oblast *Pβ2* s průměrnou haplotypovou diverzitou 0,287 a nukleotidovou diverzitou 0,001. Těchto hodnot však bylo dosaženo díky vysoké variabilitě v rámci druhu *L. sericata*, sekvence druhů *C. vicina* a *P. regina* byly uniformní a pro *L. caesar* se oblast nepodařilo amplifikovat. Ačkoliv oblast *RP S12* byla úspěšně sekvenována pro všechny druhy, variabilita byla zjištěna pouze u druhů *C. vicina* a *L. caesar*. Průměrná haplotypová diverzita byla 0,188, nukleotidová diverzita 0,001. Marker *RP S13* zahrnoval variabilní pozice pouze u

*L. sericata*, přičemž následná průměrná haplotypová diverzita byla 0,197 a průměrná nukleotidová diverzita 0,0015.

**Tab. X:** Druhová haplotypová a nukleotidová diverzita jaderných markerů, h = počet přítomných haplotypů, HD = haplotypová diverzita,  $\pi$  = nukleotidová diverzita.

marker	druh	h	HD	$\pi$
L12	<i>C. vicina</i>	1	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000
	<i>L. caesar</i>	1	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000
	<i>L. sericata</i>	1	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000
	<i>P. regina</i>	1	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000
Pb2	<i>C. vicina</i>	1	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000
	<i>L. sericata</i>	5	0,861 ± 0,087	0,0041 ± 0,0012
	<i>P. regina</i>	1	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000
S12	<i>C. vicina</i>	2	0,125 ± 0,106	0,0005 ± 0,0004
	<i>L. caesar</i>	4	0,626 ± 0,110	0,0034 ± 0,0005
	<i>L. sericata</i>	1	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000
	<i>P. regina</i>	1	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000
S13	<i>C. vicina</i>	1	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000
	<i>L. caesar</i>	1	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000
	<i>L. sericata</i>	4	0,786 ± 0,113	0,0060 ± 0,0009
	<i>P. regina</i>	1	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000

#### 4.2.2.2 Vnitrodruhová variabilita mezi populacemi

Pro ověření možnosti odlišení populací v rámci jednotlivých druhů na základě genetické variability byla nejprve vybrána oblast *COI*, která byla zastoupena největším množstvím sekvencí pocházejících z různých evropských států. V první řadě byly vypočteny hodnoty párového  $F_{ST}$ , které jsou zachyceny v následující tabulce.

**Tab XI:** Hodnoty párového  $F_{ST}$  pro oblast *COI* (pod diagonálou) a jejich hodnoty pravděpodobnosti (nad diagonálou,  $p < 0,05$  označeno modře). Zkratky zemí podle mezinárodních třípísmenných kódů dle ISO.

	CZE	DEU	BEL	PRT	ESP	GBR	FRA	POL
<i>L. caesar</i>								
<b>CZE</b>	-	0,306	0,000	0,234	0,991	0,027	0,640	0,739
<b>DEU</b>	0,038	-	0,135	0,748	0,450	0,018	0,162	0,477
<b>BEL</b>	0,487	0,273	-	0,072	0,036	0,045	0,027	0,009
<b>PRT</b>	0,03782	-0,100	0,442	-	0,658	0,018	0,477	0,505
<b>ESP</b>	-0,134	-0,063	0,485	-0,051	-	0,243	0,748	0,991
<b>GBR</b>	0,275	0,587	0,824	0,650	0,423	-	0,027	0,387
<b>FRA</b>	-0,050	0,087	0,494	0,052	-0,090	0,367	-	0,730
<b>POL</b>	-0,094	0,043	0,519	0,066	-0,176	0,227	-0,047	-
<i>L. sericata</i>								
<b>CZE</b>	-	0,991	0,333	0,378	0,450	0,991	0,991	x
<b>DEU</b>	0,000	-	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	x
<b>BEL</b>	0,126	0,000	-	0,991	0,991	0,991	0,991	x
<b>PRT</b>	0,126	0,000	0,000	-	0,991	0,991	0,991	x
<b>ESP</b>	0,126	0,000	0,000	0,000	-	0,991	0,991	x
<b>GBR</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	0,991	x
<b>FRA</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	x
<i>C. vicina</i>								
<b>CZE</b>	-	0,126	0,757	0,739	0,189	0,000	x	x
<b>DEU</b>	0,113	-	0,405	0,459	0,568	0,009	x	x
<b>BEL</b>	-0,041	0,100	-	0,991	0,405	0,000	x	x
<b>PRT</b>	-0,049	0,018	0,000	-	0,712	0,009	x	x
<b>ESP</b>	0,098	0,698	0,125	-0,023	-	0,000	x	x
<b>GBR</b>	0,756	0,700	1,000	0,900	0,650	-	x	x
<i>P. regina</i>								
<b>CZE</b>	-	0,261	x	x	x	x	x	x
<b>DEU</b>	0,063	-	x	x	x	x	x	x

Z výsledných hodnot  $F_{ST}$  lze vyvodit, že oblast *COI* není dostatečně variabilní pro geografické odlišení populací v rámci Evropy. Pouze u druhů *L. caesar* a *C. vicina* se jako odlišná jevila populace z Velké Británie (GBR). Pro druh *L. caesar* byla dále prokázána statisticky významná odlišnost sekvencí z Belgie.

Z důvodu nedostatečné variability oblasti *COI* pro geografické odlišení populací v rámci Evropy byly dále testovány pouze markery, které vykazovaly vyšší

variabilitu, tedy oblasti mitochondriálního genomu *ND6*, *CytB* a *CR*. Pro každý marker a druh byly také spočteny hodnoty  $F_{ST}$  a vytvořeny tabulky, které jsou uvedeny v přílohách 3 – 6. U žádné z lokalit nebyla prokázána statisticky významná diferenciaci.

Pro nukleární markery nebyly z důvodů nízké variability i krátkých délek sekvencí hodnoty párového  $F_{ST}$  určovány jednotlivě, nýbrž byl vytvořen konkatenovaný soubor všech jaderných oblastí. Výsledné hodnoty jsou zobrazeny v příloze 7, avšak žádná z nich nepotvrdila možnost geografického odlišení populací.

Dále byly z nástrojů populační genetiky využity testy neutrality, konkrétně Tajimův a Fuův test, jejichž účelem je rozlišení náhodné (neutrální) a nenáhodné molekulární evoluce nebo demografie vyšetřovaných populací. Nejprve byly otestovány oblasti *COI*, získané hodnoty pro jednotlivé druhy a lokality jsou uvedeny v tabulce XII. Žádný z výsledků nebyl signifikantní.

**Tab. XII:** Testy neutrality markeru *COI* pro jednotlivé druhy a lokality, S = počet segregujících míst, MNPD = průměrná párová diverzita (mean number of pairwise differences). Zkratky zemí podle mezinárodních třípísmenných kódů dle ISO.

Druh	Lokalita	Počet vzorků	S	MNPD	Počet alel	Tajimův test		Fuův test	
						Tajimovo D	p hodnota	Fuovo Fs	p hodnota
<i>C. vicina</i>	CZE	16	5	1,133	3	-0,817	0,561	1,279	0,749
	DEU	5	6	2,800	3	-0,191	0,456	1,220	0,729
	BEL	5	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
	PRT	5	2	0,800	2	-0,973	0,888	1,040	0,604
	ESP	5	5	2,400	3	0,000	1,000	0,952	0,632
	GBR	5	0	0,000	1	0,000	0,228	0,000	N.A.
<i>L. caesar</i>	CZE	15	12	4,133	4	0,467	0,739	3,674	0,946
	DEU	5	12	5,000	3	-0,954	0,198	2,306	0,870
	BEL	5	8	3,400	3	-0,807	0,297	1,569	0,769
	PRT	5	6	2,800	3	-0,191	0,441	1,220	0,717
	ESP	5	6	3,600	3	1,718	0,980	0,801	1,674
	GBR	5	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
	FRA	5	8	3,800	4	-0,073	0,526	0,051	0,416
POL	5	7	4,000	3	1,328	0,879	1,872	0,834	
<i>L. sericata</i>	CZE	9	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
	DEU	5	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
	BEL	5	1	0,400	2	-0,817	0,315	0,090	0,325
	PRT	5	1	0,400	2	-0,817	0,292	0,090	0,305
	ESP	5	1	0,400	2	-0,816	0,310	0,090	0,293
	GBR	5	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
	FRA	5	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
<i>P. regina</i>	CZE	5	2	0,800	3	-0,973	0,110	-0,829	0,091
	DEU	9	1	0,222	2	-1,088	0,203	-0,263	0,191

Stejně jako u určování párového  $F_{ST}$  byly testy neutrality dále vypočteny pro zbylé jednotlivé mitochondriální markery a pro konkatenované jaderné markery. Tabulky s výsledky jsou uvedeny v přílohách 8 a 9. Ani zde nebyl získán žádný statisticky významný výsledek, který by potvrzoval genetickou diferenciaci lokalit či upozorňoval na možnou selekci.

Pro oblast *COI* byl následně metodou Neighbor-Joining s využitím modelu Tamura 3 - parametr vytvořen dendrogram, který je vzhledem k jeho rozměrům umístěn v příloze 10. Z dendrogramu je patrné, že jednotlivé klastry jsou tvořeny druhy, přičemž jejich bootstrap byl nejméně 94 %. Avšak v rámci druhů nedošlo

k rozdělení populací podle geografického původu, výjimku tvoří pouze druh *C. vicina*, u kterého došlo k oddělení populace z Velké Británie s 86% bootstrapem. Pro další vzniklé klastry u jednotlivých druhů, ačkoli byla v několika případech přítomna bootstrapová podpora vysoko nad 50 %, byly k sobě řazeni jedinci nezávisle na lokalitách.

#### 4.2.3 Souhrnné porovnání mitochondriálních a jaderných markerů

Pro srovnání rozdílů mezi celkovými genetickými variabilitami mitochondriálních a jaderných markerů byl dále vytvořen spojený marker všech získaných mitochondriálních sekvencí (*COI*, *ND6*, *CytB*, *CR*). Konkatenovaný marker pro jaderné oblasti byl již vytvořený pro testování genetické variability mezi populacemi v předchozím oddíle. Následuje tabulka XIII, jež zachycuje charakteristiky genetických variabilit obou konkatenovaných markerů.

**Tab. XIII:** Srovnání genetické variability mtDNA a nDNA markerů, N = délka sekvence, V = počet variabilních míst, Pi = počet parsimoniálně informativních míst, h = počet přítomných haplotypů, HD = haplotypová diverzita,  $\pi$  = nukleotidová diverzita.

	druh	N	V	Pi	h	HD	$\pi$
mtDNA marker	<i>C. vicina</i>	2036	30	13	11	0,933 ± 0,048	0,0020 ± 0,0003
	<i>L. caesar</i>	2386	48	27	14	0,990 ± 0,028	0,0056 ± 0,0004
	<i>L. sericata</i>	2479	12	5	5	0,833 ± 0,098	0,0010 ± 0,0002
	<i>P. regina</i>	1689	30	28	5	1,000 ± 0,126	0,0104 ± 0,0023
nDNA marker	<i>C. vicina</i>	1242	1	0	2	0,125 ± 0,106	0,0002 ± 0,0001
	<i>L. caesar</i>	854	2	2	1	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000
	<i>L. sericata</i>	1256	8	5	5	0,861 ± 0,087	0,0018 ± 0,0005
	<i>P. regina</i>	1245	0	0	1	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000

Z tabulky je patrné, že pro vybrané mitochondriální markery byla ve srovnání s jadernými markery zjištěna výrazně vyšší variabilita. Při průměrné délce výsledného alignmentu 2148 bp vycházelo průměrně 30 variabilních míst, tedy 1,4% zastoupení. Naopak u jaderných markerů, pakliže byla brána průměrná délka výsledného alignmentu 1149 bp, byly přítomny průměrně 3 variabilní pozice (0,2 %) Průměrný počet parsimoniálně informativních míst byl 18 (0,85 %) pro mtDNA a 2 (0,15 %) pro nDNA markery.

Průměrná haplotypová diverzita pro mitochondriální konkatenované markery byla 0,939, nukleotidová diverzita 0,0048. V porovnání se spojenými jadernými markery jsou tyto hodnoty opět vyšší, jelikož průměrná hodnota u nDNA oblastí byla stanovena na 0,247 pro haplotypovou diverzitu a 0,0005 pro nukleotidovou diverzitu.

Pro získání co nejvyšších haplotypových diverzit byl na závěr pro každý druh vytvořen společný konkatenovaný marker, který využívá všechny získané sekvence. Hodnoty charakterizující genetickou variabilitu těchto spojených markerů jsou uvedeny v tabulce XIV.

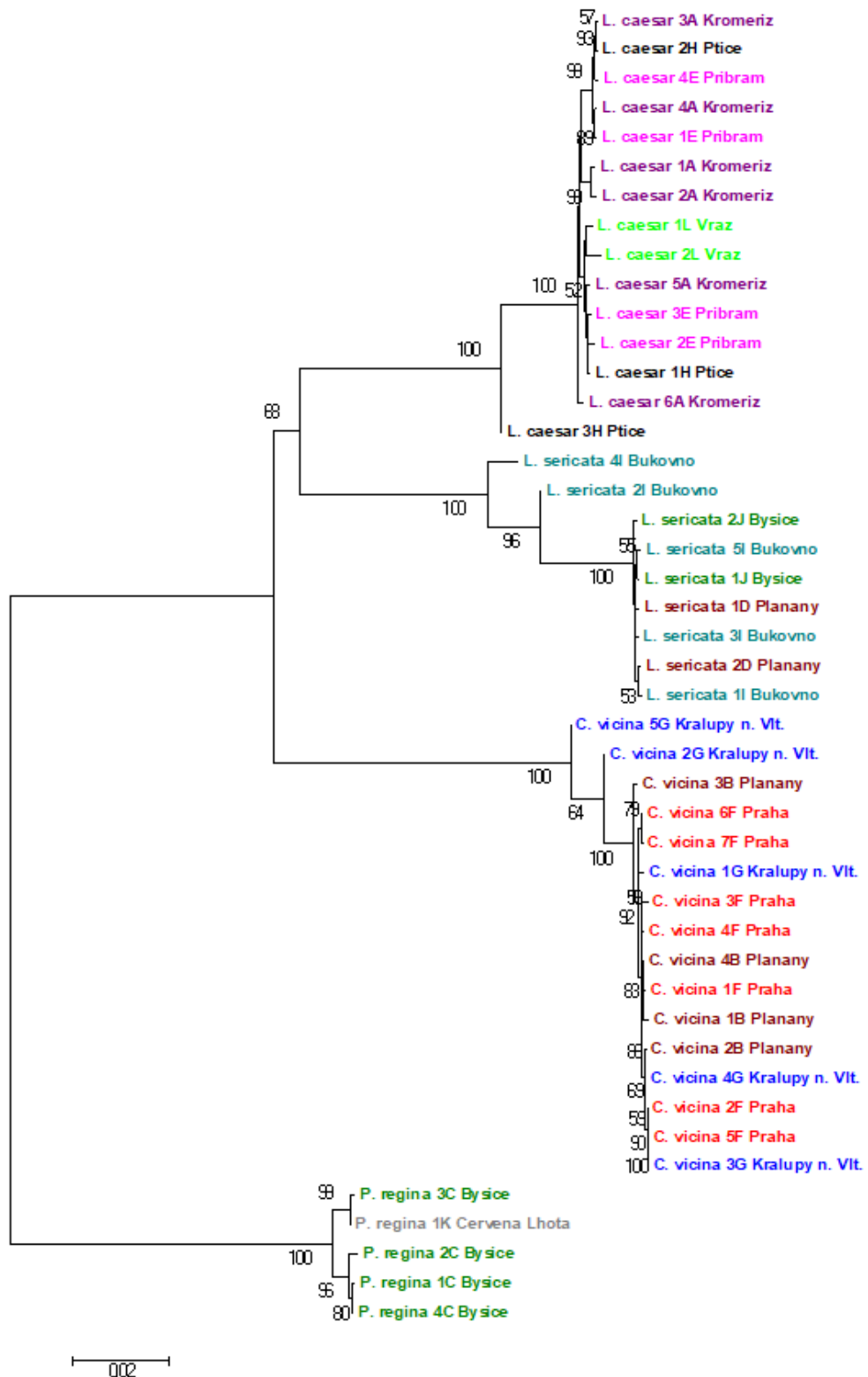
**Tab. XIV:** Genetická variabilita konkatenovaných markerů, N = délka sekvence, V = počet variabilních míst, Pi = počet parsimoniálně informativních míst, h = počet přítomných haplotypů, HD = haplotypová diverzita,  $\pi$  = nukleotidová diverzita.

druh	N	V	Pi	h	HD	$\pi$
<i>C. vicina</i>	3278	31	13	12	0,942 ± 0,048	0,0015 ± 0,0002
<i>L. caesar</i>	3240	50	29	14	0,990 ± 0,028	0,0047 ± 0,0004
<i>L. sericata</i>	3735	20	10	9	1,000 ± 0,052	0,0013 ± 0,0002
<i>P. regina</i>	2934	30	28	5	1,000 ± 0,126	0,0060 ± 0,0014

Z výsledků je patrné, že pro všechny druhy bylo dosaženo vysokých hodnot haplotypových diverzit. U *L. sericata* a *P. regina* byla HD rovna 1, čili pro každého zkoumaného jedince byl zjištěn unikátní haplotyp. Pro *L. caesar* byla vypočtená hodnota HD rovna 0,99 a pro *C. vicina* 0,942. Nejvyšší nukleotidová diverzita byla přítomna u *P. regina*, naopak nejnižší u *L. sericata*.

K ověření, zda se zjištěná variabilita konkatenovaných markerů promítne v segregaci jedinců do populací, které by se lišily geografickou polohou, byly sestrojeny dendrogramy a haplotypové sítě.

Dendrogramy byly sestrojeny metodou Neighbor-Joining s využitím modelů Tamura 3 – parametr a Tamura – Nei. Model Tamura 3 – parametr byl použit pro konkatenované jaderné markery a finální konkatenované markery obsahující sekvence všech oblastí. Naopak pro spojené mitochondriální markery byl použit model Tamura – Nei. Následující obrázek zachycuje dendrogram sestrojený ze sekvencí finálních konkatenovaných markerů. Dendrogramy pro konkatenované jaderné a mitochondriální markery jsou uvedeny v přílohách 11 a 12.



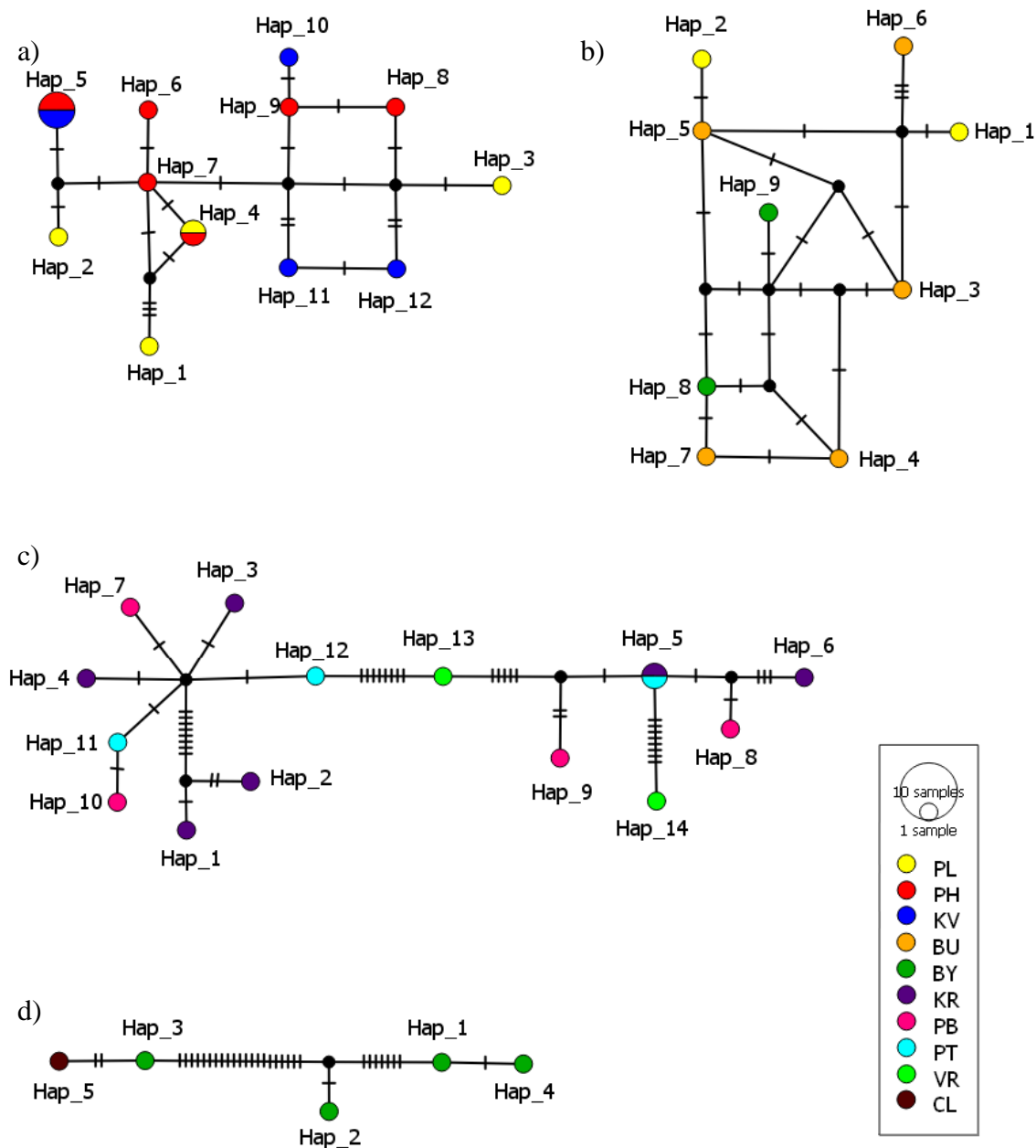
**Obr. 10:** Společný dendrogram oblastí *COI*, *ND6*, *CytB*, *CR*, *RP S12*, *RP S13*, *RP L12* a *Pβ2* (Neighbor-Joining, Tamura 3 - parametr, Pairwise deletion, Bootstrap 1000). Strom zakořeněn pomocí druhu *P. regina*. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně.



Stejně jako u dendrogramu pro sekvence oblastí *COI* došlo u dendrogramu pro konkatenované markery všech sekvencí k rozdělení do klastrů podle druhové příslušnosti s vysokými hodnotami bootstrapů (100 % pro klastry jednotlivých druhů, 68 % pro klastr zahrnující příbuzné druhy rodu *Lucilia*), ovšem ani zde se neprojevovalo další rozdělení jedinců v rámci druhů, jež by korespondovalo s jejich geografickým původem.

U dendrogramů pro konkatenované markery mitochondriálních i jaderných oblastí byla situace obdobná, druhy byly rozlišeny s vysokou podporou bootstrapů, avšak k rozdělení do klastrů, které by souviselo s polohou lokalit sběru jedinců, nedošlo. Odlišností od dendrogramů pro *COI* a finální konkatenované markery byla zobrazovaná vyšší příbuznost *L. caesar* s *C. vicina* než s *L. sericata* v obou případech.

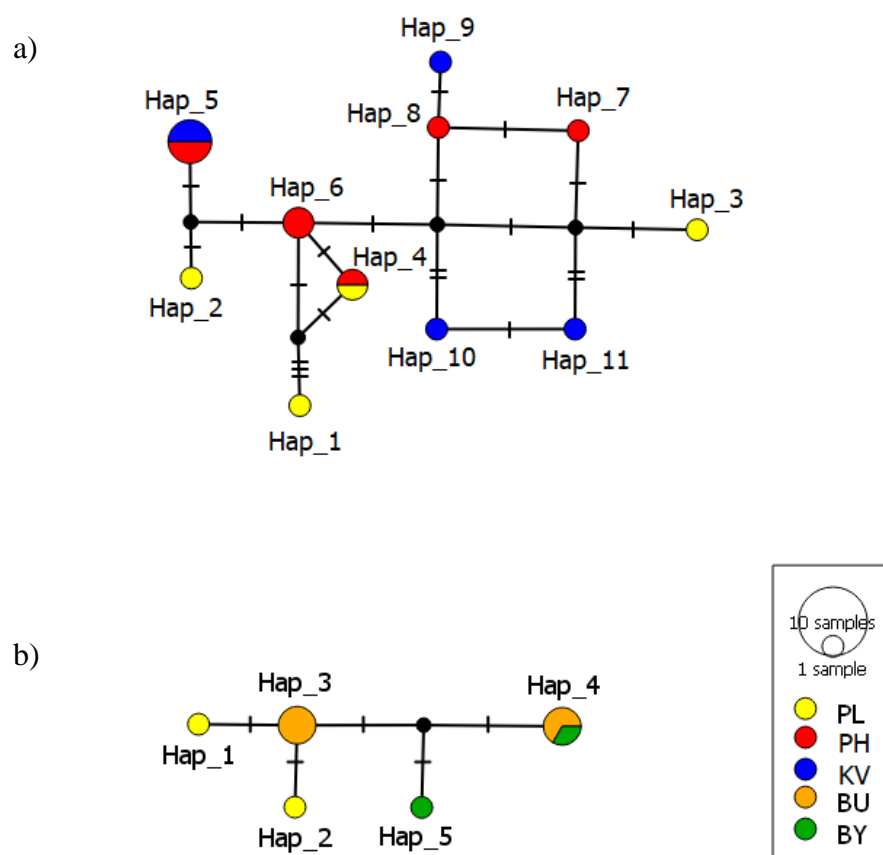
Dále byly pomocí metody Median-Joining v programu PopART ver. 1.7.2. sestrojeny haplotypové sítě. Následující obrázek zobrazuje výsledné haplotypové sítě, které jsou tvořeny haplotypy pro spojené markery všech analyzovaných oblastí. Každá ze sítí náleží jednomu druhu.



**Obr. 11:** Grafické znázornění haplotypů pro konkatované markery oblastí *COI*, *ND6*, *CytB*, *CR*, *RP S12*, *RP S13*, *RP L12* a *Pβ2* (a – *C. vicina*, b – *L. sericata*, c – *L. caesar*, d - *P. regina*). Každý kruh reprezentuje 1 haplotyp, velikost a rozdělení kruhu odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem, mutace jsou znázorněny příčnými čárkami na spojnicích. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně, zkratky lokalit viz tabulka I.

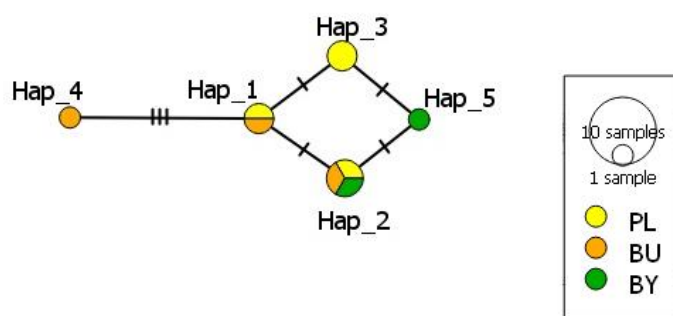
Haplotypové sítě byly také vytvořeny i pro spojené markery mitochondriálních oblastí. Pro druhy *L. caesar* a *P. regina* byly však identické s dříve

uvedenými, jelikož sekvence nukleárních oblastí neobsahovaly žádné variabilní pozice. Sítě druhů *L. sericata* a *C. vicina* jsou uvedeny na obrázku 12.



**Obr. 12:** Grafické znázornění haplotypů pro konkatované markery oblastí *COI*, *ND6*, *CytB* a *CR* (a – *C. vicina*, b – *L. sericata*). Každý kruh reprezentuje 1 haplotyp, velikost a rozdělení kruhu odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem, mutace jsou znázorněny příčnými čárkami na spojnicích. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně, zkratky lokalit viz tabulka I.

Grafické znázornění haplotypů pro konkatované jaderné markery bylo vytvořeno pouze pro druh *L. sericata* (viz obrázek 13), protože u všech ostatních druhů byl počet haplotypů vždy nižší než 3, což je minimální počet, ze kterého je možné haplotypovou síť konstruovat.



**Obr. 13:** Grafické znázornění haplotypů pro konkatenované markery oblastí *RP S12*, *RP S13*, *RP L12* a *Pβ2* druhu *L. sericata*. Každý kruh reprezentuje 1 haplotyp, velikost a rozdělení kruhu odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem, mutace jsou znázorněny příčnými čárkami na spojnicích. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně, zkratky lokalit viz tabulka I.

Ze všech uvedených haplotypových sítí je patrné, že stejně jako u vytvořených dendrogramů nedošlo k oddělení populací, jež se liší svým geografickým původem, čili zjištěné haplotypy se vyskytují nezávisle na lokalitě.

## 5 DISKUZE

Cílem této práce bylo pro účely forenzní entomologie ověřit vhodnost běžně používaného markeru *COI* a především vytipovat další DNA markery, které by byly více variabilní, a umožnily tak detekovat jednotlivé populace hmyzu z různých lokalit. Možnost určení populační struktury by mohla být pro kriminalistickou praxi velmi cenná. Následně byly tyto vybrané markery v rámci pilotní studie otestovány u 4 forezně významných druhů typických pro Českou republiku (*C. vicina*, *L. caesar*, *L. sericata* a *P. regina*).

### Výběr markerů

Při výběru markerů jsme vycházeli z dříve publikovaných prací a také z provedeného porovnání variabilit genů kódujících proteiny z mitochondriálního genomu v rámci čeledi bzučivkovitých. Z tohoto porovnání byly vybrány 2 nejvíce variabilní geny, a to *ND6* a *CytB*, přičemž tento výběr byl v souladu s obdobnou prací Nelson et al. (2012).

Z mitochondriálních oblastí byla dále vybrána kontrolní oblast. Obsahuje totiž variabilní doménu, která je podle literatury u dvoukřídlých i samotné čeledi bzučivkovitých velmi různorodá (Oliveira et al., 2006; Duarte et al., 2008). Využití *CR* pro identifikaci nižších taxonomických úrovní než druhu bylo studováno pro různé živočichy, např. korýše (McMillen-Jackson & Bert, 2004; Diniz et al., 2005), avšak jeho úspěšnost pro odlišení geografických populací nebyla v těchto pracích potvrzena.

Z jaderných markerů byla nejprve vybrána oblast *ITS1*, a to na základě literatury, jež poukazuje na její značnou variabilitu (Douglas & Haymer, 2001; Zaidi et al., 2011). Z prací zabývajících se řádem dvoukřídlých lze uvést práci Sutton et al. (2015), ve které byla potvrzena souvislost vnitrodruhové variability oblasti *ITS1* s geografickou polohou.

Další z jaderných markerů, jež byly také vybrány na základě literatury, především prací Palumbi (1994) a Lee et al. (2011), představovaly oblasti intronů různých jaderných genů. Introny jakožto nekódující oblasti poskytují větší prostor pro případnou variabilitu než exony a mohou být podkladem pro EPIC markery.

Posledním z vybraných ukazatelů, který by mohl mít význam pro geografické odlišení populací, bylo zkoumání přítomnosti bakteriálního rodu *Wolbachia* u vyšetřovaných jedinců. Tento rod byl vybrán vzhledem k literatuře, která upozorňuje na jeho schopnost výrazně ovlivňovat jednotlivé populace (Werren et al., 2008). Dalším důvodem pro skrínink byla i možnost ovlivnění sekvencí *COI*, a to jak jejich kvality, tak i variability.

### **Izolace DNA, metodika PCR a získávání sekvencí**

Izolace DNA byla prováděna jedinou metodou (pomocí komerčního kitu Exgene™ Tissue (plus) SV mini, 250p (GeneAll)). Tento přístup byl úspěšný pro všechny analyzované vzorky, proto nebylo potřeba zkoušet jiné varianty.

Pro PCR byly využívány 2 různé polymerázy a k nim náležící reagenty, jelikož v některých případech nebyla amplifikace primárně využívanou Unis Taq DNA polymerázou (TopBio) dostatečně úspěšná. Následně tak byla testována citlivější PrimeSTAR GXL DNA polymeráza (TaKaRa), s níž bylo dosaženo lepších výsledků. Zajímavé je, že s postupujícím časem bylo potřeba tuto polymerázu využívat i pro markery, u kterých byla původně amplifikace pomocí Unis Taq DNA polymerázy naprosto dostačující. Tato skutečnost by pravděpodobně mohla souviset s degradací a tím nižší dostupností extrahované DNA uchovávané po delší dobu.

U některých zvolených markerů (*RP L7*, *EF 1a*, *ACT*) nebyla amplifikace úspěšná ani po několika pokusech o optimalizaci PCR profilu, změně použité polymerázy či přidání BSA. Tyto markery tak nebyly, vzhledem k přítomnosti řady dalších úspěšně amplifikovaných i sekvenovaných markerů, dále zkoumány.

Pro bakteriální rod *Wolbachia* nebyly detekovány žádné infikované jedinci, ovšem toto zjištění nelze považovat za zcela definitivní. Na vhodnou optimalizaci PCR profilu ukazovala úspěšná amplifikace pozitivní kontroly, avšak je zvláštní, že z 45 zkoumaných jedinců nebyl nakažen ani jeden, i když literatura uvádí až 70% infekci u různých druhů hmyzu (Hilgenboecker et al, 2008). Existují i práce dokumentující přítomnost rodu *Wolbachia* u příbuzných druhů z čeledi bzučivkovitých, např. Mingchay et al. (2014). V dalším výzkumu by bylo možné otestovat například jinou metodu izolace DNA nebo využít jiné primery pro amplifikaci odlišného úseku bakteriálního genomu než *16S*, který byl předmětem zájmu v této práci.

Marker *ITS1* se přes svou potenciální variabilitu využitelnou pro geografickou diferenciaci také neosvědčil vzhledem k problémům se získáním jeho sekvencí u většiny jedinců. Nejprve bylo předpokládáno, že problémy s nízkou kvalitou výsledných sekvencí souvisejí s heterozygotním stavem této jaderné oblasti, avšak kvalita sekvenačních chromatogramů nebyla výrazně zlepšena ani po zaklonování PCR produktů. Proto od oblasti *ITS1* bylo v rámci této pilotní studie upuštěno, jelikož pro případnou rutinní analýzu v kriminalistické praxi je potřeba najít méně problematický marker.

### Úspěšně testované markery

Sekvence většiny jedinců byly úspěšně získány pro 4 mitochondriální oblasti (*COI*, *ND6*, *CytB*, *CR*) a 4 jaderné oblasti (*RP L12*, *RP S12*, *RP S13* a *Pβ2*).

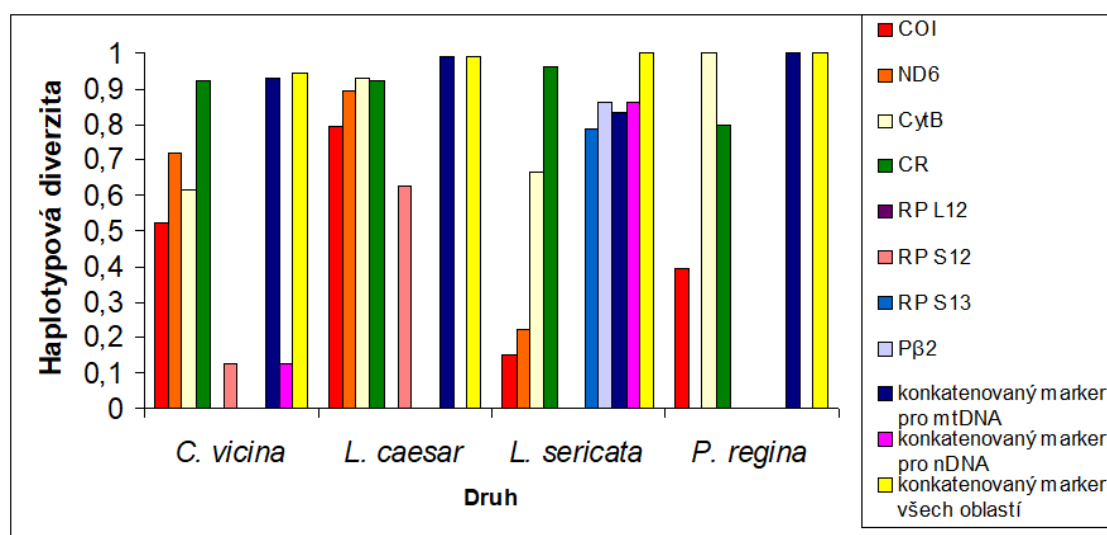
Marker *COI* je často využívaným markerem pro druhovou identifikaci nejen ve forenzní entomologii, ale také napříč celou živočišnou říší (Hebert et al. 2003), a proto je u něj velmi dobře zvládnutá metodika amplifikace a sekvenování. Z tohoto důvodu byla oblast *COI* využívána pro ověření získaného množství vyizolované DNA.

Marker *COI* byl ale také využit pro samotné posouzení mezidruhové a vnitrodruhové variability u zkoumaných druhů. Jelikož v této práci byly získávány sekvence jedinců pouze z území České republiky a u markeru *COI* se v různých databázích vyskytuje velké množství jeho sekvencí prakticky z celého světa, byly k získaným sekvencím přidány další dostupné z různých evropských států. Ačkoliv existují práce, které poukazují na možné problémy přístupu DNA barcoding u některých druhů v čeledi bzučivkovitých (např. (Wallman & Donnellan, 2001; Tourle et al., 2009; McDonagh & Stevens, 2011), v této práci byla vhodnost markeru pro spolehlivé odlišení analyzovaných druhů potvrzena.

V oblasti zkoumání vnitrodruhové variability se marker *COI* dle očekávání ukázal být nepříliš vhodným. Tento fakt naznačovalo i provedené srovnání p-distancí mitochondriálních genů kódujících proteiny pocházejících z 13 různých druhů z čeledi bzučivkovitých, kde se marker *COI* jevil jako nepříliš variabilní. V analyzovaném souboru sekvencí v rámci Evropy se při provedených testováních pouze u druhu *C. vicina* jevila jako odlišná populace z Velké Británie (GBR), což by mohlo souviset s geografickou polohou oddělenou od kontinentální Evropy. U druhu *L. caesar* bylo při určování párového  $F_{ST}$  pro GBR dosaženo podobných výsledků

jako u *C. vicina*, ovšem zde se navíc odlišně jevila i populace z Belgie. Pro *L. caesar* se ale tato zjištění neprojevila ve výsledné podobě dendrogramu. Hypotézu odlišnosti GBR navíc nepotvrzuje skutečnost, že sekvence druhu *L. sericata* z této země oproti ostatním žádné významné rozrůznění nevykazovaly.

Lze tedy říci že oblast *COI* není podle předpokladu až na výjimky celkově dostatečně variabilní pro odlišení populací, a to i pokud bereme v úvahu populace v rámci celé Evropy. Z tohoto důvodu byl marker *COI* v této práci brán jako hranice, podle které byla posuzována smysluplnost zkoumání vnitrodruhové variability u dalších úspěšně získaných markerů, čili dále byly testovány pouze markery, které vykazovaly vyšší variabilitu než *COI*. Následující obrázek zachycuje porovnání variabilit všech získaných markerů včetně jejich spojených verzí pro jednotlivé druhy, přičemž jako reprezentativní ukazatel variability byla vybrána haplotypová diverzita.



**Obr. 14:** Histogram znázorňující porovnání haplotypových diverzit analyzovaných markerů.

Pro všechny druhy byly v porovnání s oblastí *COI* variabilnější všechny vytipované mitochondriální oblasti (*ND6*, *CytB* i *CR*) i konkatenované markery mitochondriálních a všech oblastí. Pro *L. sericata* to byly navíc jaderné markery *RPS13*, *Pβ2* a konkatenovaný marker jaderných oblastí. Jak již bylo zmíněno, marker *ND6* se nepodařilo amplifikovat pro druh *P. regina*, podobně amplifikace markeru *Pβ2* nebyla úspěšná pro druh *L. caesar*.



Přestože se oblasti *ND6* a *CytB* shodně jeví jako více variabilní oproti oblasti *COI*, ukázaly se jako nedostatečně variabilní pro odlišení jednotlivých populací v rámci ČR. Tento výsledek ale nebylo možné dále porovnat, jelikož nebyly dosud publikovány práce, které by se zabývaly podobnou problematikou.

Sekvence kontrolních oblastí se v této práci nepodařilo přečíst v celé délce, a to pravděpodobně kvůli přítomnosti velkého množství A/T bází, které pokud jsou uspořádány do řetízků, mohou způsobovat různé problémy (např. sklouzávání DNA polymerázy, vytváření sekundárních struktur bránících amplifikaci či sekvenaci). Ačkoliv byla tedy přečtena pouze část amplikonu, bylo zjištěno, že se jedná o část variabilní domény, jež má pro vnitrodruhovou variabilitu lepší potenciál. Z publikovaných prací zabývajících se oblastí *CR* a jejím využitím pro populační genetiku lze jmenovat práci Lyra et al. (2005), jež se pokusila s využitím techniky RFLP objasnit populační strukturu některých bzučivkovitých. Závěr této práce je v souladu s naším, tedy že oblast *CR* se neprojeví jako dostatečně variabilní pro geografické odlišení populací.

Získané markery jaderných oblastí *RP L12*, *RP S12*, *RP S13* a *Pβ2* byly shodně podstatně méně variabilní než oblast *COI* (s výjimkou *RP S13* a *Pβ2* u *L. sericata*). Za zvážení stojí skutečnost, že pro žádný marker ani u jednoho jedince ze všech zkoumaných druhů nebyl objeven heterozygotní stav lokusu s intronem a bez intronu, který by byl patrný na agarózovém gelu, tak jak tomu bylo v práci Lee et al. (2011), podle které byly markery vybírány. Introny byly přítomny u všech analyzovaných jedinců a jejich sekvence byly v rámci druhu většinou buď zcela monomorfní nebo obsahovaly jen minimální variabilitu. Vzhledem ke zjištěným hodnotám nebyly testy pro diferenciaci populací pro jednotlivé EPIC markery vůbec prováděny. Pravděpodobně by bylo vhodné rozšířit studii na vyšší počet jedinců, aby tak byla zvýšena pravděpodobnost výskytu jedinců s heterozygotní konstitucí pro dané lokusy.

### **Konkatenované markery**

Spojené markery byly vytvořeny odděleně z mitochondriálních a jaderných oblastí a byly mezi sebou dále vzájemně srovnávány. Ačkoli byl konkatenovaný marker mitochondriálních oblastí prokazatelně více variabilní oproti konkatenovanému markeru jaderných oblastí, ani v jednom případě nedošlo při vytvoření dendrogramů či haplotypových sítí ke grafickému rozdělení jedinců do

populací, jež by se lišily geografickou polohou. Zjištěné haplotypy buď byly unikátní pro dané jedince, nebo se vyskytovaly sice u více jedinců, ale ve více lokalitách zároveň. Ve srovnání konkatenovaných markerů byl zajímavý zejména druh *L. sericata*, který se pro mitochondriální oblasti jevil jako nejméně variabilní, avšak v oblastech jaderných byl variabilní zdaleka nejvíce.

Na závěr byl vytvořen společný konkatenovaný marker všech úspěšně sekvenovaných oblastí, čímž bylo dosaženo nejvyššího možného počtu haplotypů. Ovšem ani tento způsob se neukázal jako účinný pro odlišení jednotlivých populací, jelikož podobně jako v předchozích případech konkatenovaných markerů pro mitochondriální oblasti byla sice přítomna velmi vysoká haplotypová diverzita (zde ještě o něco vyšší), ale ta už dosahovala takových hodnot, že prakticky každý jedinec byl charakterizován svou unikátní sekvencí (haplotypem). Souvislost mezi konkrétními změnami ve struktuře DNA a místem původu nebyla pozorována.

Jedním z důvodů, které mohly způsobit neprůkazné výsledky pro genetickou diferenci populací, by mohlo být nedostatečné množství analyzovaných jedinců. Jelikož se jednalo pouze o pilotní studii, nebyl dále kladen velký důraz na výběr lokalit a rovnoměrné zastoupení počtu jedinců zkoumaných druhů. Další výzkum by proto měl tuto práci rozšířit o větší počet analyzovaných vzorků, které by konkrétní druhy zastupovaly ve stejném poměru a také by především měly být vybrány vzdálenější lokality, nejlépe i mimo území ČR.

Otázkou stále zůstává, zda hledaný univerzální marker pro detekci geografických populací různých forenzně významných druhů z čeledi bzučivkovitých vůbec existuje. Lze uvažovat také o možnosti, že by hledaný marker byl představován odlišnými lokusy pro různé druhy, jelikož v této práci se variability zkoumaných markerů mezi jednotlivými druhy různily. Případně by také mohl být představován konkatenovanými markery různých lokusů, jelikož byl potvrzen nárůst haplotypových diverzit v těchto případech.

Jako poměrně pravděpodobná se však jeví možnost, že případné nalezení markeru vhodného pro zkoumání populační struktury bude velice obtížné nebo dokonce i nemožné. Tomu nasvědčuje to, že i když byly některé z analyzovaných oblastí poměrně výrazně variabilní a bylo dosaženo vysokých haplotypových diverzit, nedošlo k rozdělení geografických populací, naopak jednotlivé haplotypy se mezi lokalitami prolínaly. Navíc pro tuto možnost svědčí i biologie zájmových druhů,

pravděpodobně se totiž jedná o kosmopolitní populace, které se od sebe nijak výrazně neodlišují.

## 6 ZÁVĚR

Na základě literatury a práce s databázemi sekvencí genů zájmových druhů byl vytipován soubor DNA markerů, které by mohly být použitelné pro identifikaci forenzně významného hmyzu na úrovni populací. Následně se podařilo získat sekvence 4 oblastí mitochondriálního genomu (*COI*, *ND6*, *CytB* a část variabilní domény *CR*) a 4 oblastí jaderného genomu (introny genů *RP L12*, *RP S12*, *RP S13* a *Pβ2*).

Pro marker *COI* byla ověřena úspěšnost druhové identifikace, avšak pro identifikaci nižších úrovní se dle předpokladu variabilita této oblasti ukázala jako nedostatečná. Ostatní oblasti mitochondriálního genomu byly v rámci jednotlivých druhů více variabilní, ani tato variabilita však nezajistila spolehlivé odlišení jednotlivých populací.

Analyzované jaderné markery se naproti tomu ukázaly jako výrazně konzervované, ve většině případů dokonce zcela monomorfní, proto rozdělení jedinců do populací podle místa jejich výskytu nebylo možné.

Lepší výsledky nepřineslo ani spojování jednotlivých markerů do konkatenovaných souborů. Ačkoli bylo tímto způsobem dosaženo vyšších počtů haplotypů pro jednotlivé druhy, tyto haplotypy se vyskytovaly nezávisle na lokalitách.

Zjištěné výsledky tak naznačují, že zájmové druhy jsou tvořeny velkými kosmopolitními populacemi, které se ve struktuře DNA nikterak výrazně neodlišují. Toto tvrzení by však bylo vhodné ověřit další rozsáhlejší studií, která by pracovala s vyšším počtem jedinců a vzdálenějšími lokalitami s pokud možno rovnoměrně zastoupenými druhy.

## 7 LITERATURA

- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Saunders, N. C.** (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1), 489-522.
- Avise, J. C.** (1994). Molecular tools. In *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Springer, Boston, MA, 44-91.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A.** (1999). Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Benecke, M.** (2001). A brief history of forensic entomology. *Forensic Science International*, 120(1-2), 2-14.
- Benecke, M.** (1998). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophagous insects (diptera, coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice. *Forensic Science International*, 98(3), 157-168.
- Brown, W. M.** (1985). The mitochondrial genome of animals. " *Molecular Evolutionary Genetics*", 95-130.
- Byrd, J. H., & Castner, J. L.** (2009). *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. CRC press.
- Cameron, S. L.** (2014). Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. *Annual review of entomology*, 59, 95-117.
- Campobasso, C. P., & Introna, F.** (2001). The forensic entomologist in the context of the forensic pathologist's role. *Forensic Science International*, 120(1-2), 132-139.
- Carvalho, C. J. B. D., & Mello-Patiu, C. A. D.** (2008). Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia*, 52(3), 390-406.
- Caterino, M. S., Cho, S., & Sperling, F. A.** (2000). The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual review of entomology*, 45(1), 1-54.

- Catts, E. P.** (1992). Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. *Journal of Agricultural Entomology*, 9(4), 245-255.
- Clary, D. O., & Wolstenholme, D. R.** (1985). The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 22(3), 252-271.
- Clayton, D. A.** (1992). Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *International review of cytology*, Academic Press, Vol. 141, 217-232.
- Daněk, L.** (1990). Možnosti využití entomologie v kriminalistice. Kriminalistický ústav. Čs. kriminalistika. č. 1, 47-49.
- Diniz, F. M., Maclean, N., Ogawa, M., Cintra, I. H., & Bentzen, P.** (2005). The hypervariable domain of the mitochondrial control region in Atlantic spiny lobsters and its potential as a marker for investigating phylogeographic structuring. *Marine Biotechnology*, 7(5), 462-473.
- Douglas, L. J., & Haymer, D. S.** (2001). Ribosomal ITS1 polymorphisms in *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94(5), 726-731.
- Duarte, G. T., De Azeredo-Espin, A. M. L., & Junqueira, A. C. M.** (2008). The mitochondrial control region of blowflies (Diptera: Calliphoridae): a hot spot for mitochondrial genome rearrangements. *Journal of medical entomology*, 45(4), 667-676.
- Dugan, K. A., Lawrence, H. S., Hares, D. R., Fisher, C. L., & Budowle, B.** (2002). An improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis. *Journal of Forensic Science*, 47(4), 1-8.
- Eliášová, H., & Šuláková, H.** (2012). Forenzní biologie. Štefan, J., Hladik, J. a kol. *Soudní lékařství a jeho moderní trendy*.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E.** (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564-567.
- Folmer, O., Hoeh, W. R., Black, M. B., & Vrijenhoek, R. C.** (1994). Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-299.

- Förstl, M.** (2003). *Praktický atlas lékařské parazitologie*. Nucleus HK.
- Fu, Y. X.** (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925.
- Gennard, D.** (2007). *Forensic entomology: an introduction*. John Wiley & Sons.
- GilArriortua, M., Bordas, M. I. S., Caine, L. M., Pinheiro, F., & de Pancorbo, M. M.** (2013). Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera, Calliphoridae). *Forensic science international*, 228(1-3), 132-136.
- Giles, H. A.** (1924). The “Hsi Yüan Lu” or “Instructions to Coroners.”, *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 17, 59-107.
- Greenberg, B., & Kunich, J. C.** (2002). *Entomology and the law: flies as forensic indicators*. Cambridge University Press.
- Hadrys, H., Balick, M., & Schierwater, B.** (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular ecology*, 1(1), 55-63.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., & Ball, S. L.** (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., & Werren, J. H.** (2008). How many species are infected with *Wolbachia*?—a statistical analysis of current data. *FEMS microbiology letters*, 281(2), 215-220.
- Hrdinová, M., Šuláková, H., Barták, M.** (2013). Využití čeledi Piophilidae (Diptera) ve forenzní praxi.
- Hurst, G. D., & Jiggins, F. M.** (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 272(1572), 1525-1534.
- Chen, W. Y., Hung, T. H., & Shiao, S. F.** (2004). Molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. *Journal of Medical Entomology*, 41(1), 47-57.

- Ji, Y. J., Zhang, D. X., & He, L. J.** (2003). Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Resources*, 3(4), 581-585.
- Junqueira, A. C. M., Lessinger, A. C., & Azeredo-Espin, A. M. L.** (2002). Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. *Medical and veterinary entomology*, 16(1), 39-45.
- Lee, S. F., Chen, Z., McGrath, A., Good, R. T., & Batterham, P.** (2011). Identification, analysis, and linkage mapping of expressed sequence tags from the Australian sheep blowfly. *BMC genomics*, 12(1), 406.
- Librado, P., & Rozas, J.** (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- Loxdale, H. D., & Den Hollander, J. (Eds.).** (1989). *Electrophoretic studies on agricultural pests* (No. 04; SB950. 76. E44, L6 1988.). Clarendon Press.
- Loxdale, H. D., & Lushai, G.** (1998). Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 88(6), 577-600.
- Lyra, M. L., Fresia, P., Gama, S., Cristina, J., Klaczko, L. B., & de Azeredo-Espin, A. M. L.** (2005). Analysis of mitochondrial DNA variability and genetic structure in populations of New World screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *Journal of medical entomology*, 42(4), 589-595.
- Mazzanti, M., Alessandrini, F., Tagliabracci, A., Wells, J. D., & Campobasso, C. P.** (2010). DNA degradation and genetic analysis of empty puparia: genetic identification limits in forensic entomology. *Forensic Science International*, 195(1-3), 99-102.
- McMillen-Jackson, A. L., & Bert, T. M.** (2004). Genetic diversity in the mtDNA control region and population structure in the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*. *Journal of Crustacean Biology*, 24(1), 101-109.
- McDonagh, L. M., & Stevens, J. R.** (2011). The molecular systematics of blowflies and screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) using 28S rRNA, COX1 and EF-1 $\alpha$ : insights into the evolution of dipteran parasitism. *Parasitology*, 138(13), 1760-1777.



- Méglin, P.** (1894). *La faune des cadavres: Application de l'entomologie a la médecine légale* (Vol. 101). Masson & Gauthier-Villars.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., & Ng, P. K.** (2006). DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic biology*, 55(5), 715-728.
- Mingchay, P., Sai-Ngam, A., Phumee, A., Bhakdeenuan, P., Lorlerthum, K., Thavara, U., ... & Siriyasatien, P.** (2014). *Wolbachia* supergroups A and B in natural populations of medically important filth flies (Diptera: Muscidae, Calliphoridae, and Sarcophagidae) in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 45(2), 309.
- Moore, W. S.** (1995). Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 49(4), 718-726.
- Nelson, L. A., Lambkin, C. L., Batterham, P., Wallman, J. F., Dowton, M., Whiting, M. F., ... & Cameron, S. L.** (2012). Beyond barcoding: A mitochondrial genomics approach to molecular phylogenetics and diagnostics of blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Gene*, 511(2), 131-142.
- Oliveira, M. T., Azeredo-Espin, A. M., & Lessinger, A. C.** (2007). The mitochondrial DNA control region of Muscidae flies: evolution and structural conservation in a dipteran context. *Journal of molecular evolution*, 64(5), 519-527.
- O'Neill, S. L., Giordano, R., Colbert, A. M., Karr, T. L., & Robertson, H. M.** (1992). 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(7), 2699-2702.
- Palumbi, S. R.** (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *Molecular systematics*, 205-247.
- Pan, C. Y., Hu, J., Zhang, X., & Huang, Y.** (2006). The DNA Barcoding Application of mtDNA COI Genes in Seven Species of Catantopidae (Orthoptera)[J]. *Entomotaxonomia*, 2, 005.
- Povolný, D.** (1978). Hmyz v kriminologii. *Vesmír*, 57, 205-208.

- Ratcliffe, S. T., Webb, D. W., Weinziel, R. A., & Robertson, H. M.** (2003). PCR-RFLP identification of Diptera (Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae)-a generally applicable method. *Journal of forensic sciences*, 48(4), 783-785.
- R Development Core Team** (2008). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. URL <http://www.R-project.org>.
- Richardson, B. J., Baverstock, P. R., & Adams, M.** (1986). *Allozyme electrophoresis: a handbook for animal systematics and population studies*. Academic Press.
- Sheppard, W. S., & McPheron, B. A.** (1991). Ribosomal DNA diversity in Apidae. *Diversity in the genus Apis*, 89-102.
- Schlötterer, C., Hauser, M. T., von Haeseler, A., & Tautz, D.** (1994). Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in Drosophila. *Molecular biology and evolution*, 11(3), 513-522.
- Schroeder, H., Klotzbach, H., Elias, S., Augustin, C., & Pueschel, K.** (2003). Use of PCR–RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. *Forensic Science International*, 132(1), 76-81.
- Simon, C., Buckley, T. R., Frati, F., Stewart, J. B., & Beckenbach, A. T.** (2006). Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37, 545-579.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P.** (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the entomological Society of America*, 87(6), 651-701.
- Smith, K. G. V.**(1986) A Manual of Forensic Entomology. *British Museum (Natural History), London, and Cornell University Press, Ithaca, NY*.
- Smith, M. A., Bertrand, C., Crosby, K., Eveleigh, E. S., Fernandez-Triana, J., Fisher, B. L., ... & Hreck, J.** (2012). *Wolbachia* and DNA barcoding insects: patterns, potential, and problems. *PloS one*, 7(5), e36514

- Smith, T. B., & Wayne, R. K. (Eds.).** (1996). *Molecular genetic approaches in conservation*. Oxford University Press.
- Song, Z., Wang, X., & Liang, G.** (2008). Species identification of some common necrophagous flies in Guangdong province, southern China based on the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). *Forensic Science International*, 175(1), 17-22.
- Sperling, F. A., Anderson, G. S., & Hickey, D. A.** (1994). A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *Journal of Forensic Science*, 39(2), 418-427.
- Sutton, B. D., Steck, G. J., Norrbom, A. L., Rodriguez, E. J., Srivastava, P., Alvarado, N. N., ... & Peñaranda, E. A.** (2015). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) variation in the *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex (Diptera, Tephritidae) of the Andean region. *ZooKeys*, (540), 175.
- Szpila, K., Hall, M. J. R., Pape, T., & Grzywacz, A.** (2013). Morphology and identification of first instars of the European and Mediterranean blowflies of forensic importance. Part II. Luciliinae. *Medical and veterinary entomology*, 27(4), 349-366.
- Szpila, K.** (2009). Key for the identification of third instars of European blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance. In *Current concepts in forensic entomology* (pp. 43-56). Springer Netherlands.
- Szpila, K.** (2012). Key for identification of European and Mediterranean blowflies (Diptera, Calliphoridae) of medical and veterinary importance—adult flies. *Forensic entomology, an introduction, II edition*. Willey-Blackwell, 77-81.
- Šuláková, H.** (2014). Forenzní entomologie – když smrt je začátek. *Živa*, 5, 250.
- Šuláková, H.** (2006). Speciální biologie: využití hmyzu při stanovení post mortem intervalu. *Kriminalistický sborník*, 3, 36-37.
- Šuláková, H., Markvartová, J., Beran, M.** (2013). Hmyz a mrtvý muž v bytě. *Soudní lékařství*, 4, 2-5.
- Tajima, F.** (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S.** (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L.** (2007). *Veterinary parasitology*. UK: Blackwell, 341.
- Tourle, R., Downie, D. A., & Villet, M. H.** (2009). Flies in the ointment: a morphological and molecular comparison of *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(1), 6-14.
- Villablanca, F. X., Roderick, G. K., & Palumbi, S. R.** (1998). Invasion genetics of the Mediterranean fruit fly: variation in multiple nuclear introns. *Molecular Ecology*, 7(5), 547-560.
- Virgilio, M., Backeljau, T., Barr, N., & De Meyer, M.** (2008). Molecular evaluation of nominal species in the *Ceratitis fasciventris*, *C. anonae*, *C. rosa* complex (Diptera: Tephritidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(1), 270-280.
- Wallman, J. F., & Adams, M.** (2001). The forensic application of allozyme electrophoresis to the identification of blowfly larvae (Diptera: Calliphoridae) in southern Australia. *Journal of Forensic Science*, 46(3), 681-684.
- Wallman, J. F., & Donnellan, S. C.** (2001). The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *Forensic Science International*, 120(1-2), 60-67.
- Wells, J. D., Byrd, J. H., & Tantawi, T. I.** (1999). Key to third-instar Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) from carrion in the continental United States. *Journal of Medical Entomology*, 36(5), 638-641.
- Wells, J. D., & Sperling, F. A.** (2001). DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 120(1-2), 110-115.

- Wells, J. D., & Williams, D. W.** (2007). Validation of a DNA-based method for identifying Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) used in a death investigation. *International Journal of Legal Medicine*, 121(1), 1.
- Werren, J. H., Baldo, L., & Clark, M. E.** (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 741.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
- Wright, S.** (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19(3), 395-420.
- Zaidi, F., Wei, S. J., Shi, M., & Chen, X. X.** (2011). Utility of multi-gene loci for forensic species diagnosis of blowflies. *Journal of Insect Science*, 11(1), 59.
- Zhang, D. X., & Hewitt, G. M.** (1997). Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25(2), 99-120.

#### **Internetové zdroje**

<https://amiga.cbmeg.unicamp.br>

<https://popart.otago.ac.nz>

<https://technelysium.com.au>

<https://www.barcodinglife.org>

<https://www.biolib.cz>

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

<https://www.researchgate.net>

## 8 PŘÍLOHY

**Příloha 1:** Seznam použitých sekvencí *COI* z databáze BOLD Systems (<http://www.barcodinglife.org/>). Zkratky zemí podle mezinárodních třípísmenných kódů dle ISO.

	<b>DEU</b>	<b>BEL</b>	<b>PRT</b>	<b>ESP</b>	<b>GBR</b>	<b>FRA</b>	<b>POL</b>
<i>L. caesar</i>	GBDP15207-14	LUCIL079-12	DWF045-13	GBDP16424-15	GBDP0976-06	GBDP16417-15	LUCIL030-12
	GBDP15208-14	LUCIL078-12	DWF046-13	GBDP16425-15	GBDP0977-06	GBDP16418-15	LUCIL031-12
	GBDP15209-14	LUCIL081-12	DWF049-13	GBDP16428-15	GBDP0978-06	LUCIL014-12	LUCIL032-12
	LUCIL004-12	LUCIL089-12	DWF057-13	GBDP16444-15	GBDP0979-06	LUCIL015-12	LUCIL033-12
	LUCIL011-12	LUCIL094-12	DWF087-13	GBDP16475-15	GBDP0980-06	LUCIL016-12	LUCIL034-12
<i>L. sericata</i>	GMGMD224-14	LUCIL064-12	GBDP16585-15	GBDP0717-06	GBDP0715-06	LUCIL066-12	
	GMGML1396-14	LUCIL068-12	GBDP16587-15	GBDP16607-15	GBDP1010-06	LUCIL073-12	
	GMGMM240-14	LUCIL069-12	GBDP16590-15	GBDP16608-15	GBDP1011-06	LUCIL074-12	
	GMGMN210-14	LUCIL070-12	GBDP16598-15	GBDP16614-15	GBDP1013-06	LUCIL076-12	
	GMGRE079-13	LUCIL071-12	GBDP16599-15	GBDP16619-15	GBDP1009-06	LUCIL075-12	
<i>C. vicina</i>	GBDP15167-14	NICC001-13	CDFD001-12	GBDP16032-15	GBDP0997-06		
	GBDP15179-14	NICC003-13	DWF002-13	GBDP16038-15	GBDP0998-06		
	GBDP15179-14	NICC004-13	DWF006-13	GBDP16079-15	GBDP0999-06		
	GBDP15179-14	NICC005-13	DWF012-13	GBDP16090-15	GBDP1000-06		
	GMGMG020-14	NICC008-13	DWF015-13	GBDP16114-15	GBDP1001-06		
<i>P. regina</i>	GBDP15212-14						
	GBDP15213-14						
	GBDP15214-14						
	GBDP15215-14						
	GBDP15216-14						
	GBDP15217-14						
	GBDP15218-14						
	GBDP15219-14						
	GBDP15220-14						

**Příloha 2:** Přehled použitých mitogenomů z databáze Metamiga (<http://amiga.cbmeg.unicamp.br/>) pro určení mezidruhové variability mitochondriálních genů kódujících proteiny.

<b>Druh</b>	<b>Kód genomu</b>
<i>Lucilia porphyrina</i>	NC 019637
<i>Chrysomya albiceps</i>	NC 019631
<i>Hemipyrellia ligurriens</i>	NC 019638
<i>Chrysomya bezziana</i>	NC 019632
<i>Protophormia terraenovae</i>	NC 019636
<i>Lucilia cuprina</i>	NC 019573
<i>Chrysomya saffranaea</i>	NC 019635
<i>Chrysomya rufifacies</i>	NC 019634
<i>Calliphora vicina</i>	NC 019639
<i>Chrysomya megacephala</i>	NC 019633
<i>Lucilia sericata</i>	NC 009733
<i>Chrysomya putoria</i>	NC 002697
<i>Cochliomyia hominivorax</i>	NC 002660

**Příloha 3:** Hodnoty párových  $F_{ST}$  jednotlivých mitochondriálních markerů pro druh *C. vicina* (pod diagonálami) a jejich hodnoty pravděpodobnosti (nad diagonálami).

	<b>Plaňany</b>	<b>Praha</b>	<b>Kralupy n. Vlt.</b>
	<b><i>CytB</i></b>		
<b>Plaňany</b>	-	0,991	0,414
<b>Praha</b>	-0,075	-	0,279
<b>Kralupy n. Vlt.</b>	-0,013	0,086	-
	<b><i>ND6</i></b>		
<b>Plaňany</b>	-	0,514	0,847
<b>Praha</b>	-0,004	-	0,991
<b>Kralupy n. Vlt.</b>	-0,087	-0,186	-
	<b><i>CR</i></b>		
<b>Plaňany</b>	-	0,477	0,991
<b>Praha</b>	0,007	-	0,820
<b>Kralupy n. Vlt.</b>	-0,094	-0,107	-

**Příloha 4:** Hodnoty párových  $F_{ST}$  jednotlivých mitochondriálních markerů pro druh *L. caesar* (pod diagonálami) a jejich hodnoty pravděpodobnosti (nad diagonálami).

	<b>Kroměříž</b>	<b>Příbram</b>	<b>Ptice</b>	<b>Vráž</b>
	<b><i>CytB</i></b>			
<b>Kroměříž</b>	-	0,613	0,649	0,477
<b>Příbram</b>	-0,071	-	0,991	0,649
<b>Ptice</b>	-0,092	-0,216	-	0,559
<b>Vráž</b>	-0,031	-0,162	-0,012	-
	<b><i>ND6</i></b>			
<b>Kroměříž</b>	-	0,414	0,748	0,279
<b>Příbram</b>	-0,036	-	0,991	0,838
<b>Ptice</b>	-0,085	-0,254	-	0,198
<b>Vráž</b>	0,087	-0,114	0,250	-
	<b><i>CR</i></b>			
<b>Kroměříž</b>	-	0,603	0,937	0,252
<b>Příbram</b>	-0,060	-	0,991	0,261
<b>Ptice</b>	-0,241	-0,379	-	0,991
<b>Vráž</b>	0,164	0,065	-0,111	-

**Příloha 5:** Hodnoty párových  $F_{ST}$  jednotlivých mitochondriálních markerů pro druh *L. sericata* (pod diagonálami) a jejich hodnoty pravděpodobnosti (nad diagonálami).

	<b>Plaňany</b>	<b>Bukovno</b>	<b>Byšice</b>
	<b><i>CytB</i></b>		
<b>Plaňany</b>	-	0,468	0,468
<b>Bukovno</b>	0,286	-	0,728
<b>Byšice</b>	0,500	-0,043	-
	<b><i>ND6</i></b>		
<b>Plaňany</b>	-	0,297	0,991
<b>Bukovno</b>	0,474	-	0,991
<b>Byšice</b>	0,000	0,000	-
	<b><i>CR</i></b>		
<b>Plaňany</b>	-	0,649	0,991
<b>Bukovno</b>	-0,036	-	0,991
<b>Byšice</b>	0,000	-0,263	-



**Příloha 6:** Hodnoty párových  $F_{ST}$  jednotlivých mitochondriálních markerů pro druh *P. regina* (pod diagonálami) a jejich hodnoty pravděpodobnosti (nad diagonálami).

	<b>Byšice</b>	<b>Červená Lhota</b>
<i>CytB</i>		
<b>Byšice</b>	-	0,991
<b>Červená Lhota</b>	0,135	-
<i>CR</i>		
<b>Byšice</b>	-	0,991
<b>Červená Lhota</b>	0,287	-

**Příloha 7:** Hodnoty párových  $F_{ST}$  jaderných konkatenovaných markerů pro jednotlivé druhy (pod diagonálami) a jejich hodnoty pravděpodobnosti (nad diagonálami).

<i>C. vicina</i>				
	<b>Plaňany</b>	<b>Praha</b>	<b>Kralupy n. Vlt.</b>	<b>x</b>
<b>Plaňany</b>	-	0,991	0,991	x
<b>Praha</b>	-0,098	-	0,991	x
<b>Kralupy n. Vlt.</b>	0,000	-0,055	-	x
<i>L. caesar</i>				
	<b>Kroměříž</b>	<b>Příbram</b>	<b>Ptice</b>	<b>Vráž</b>
<b>Kroměříž</b>	-	0,991	0,991	0,991
<b>Příbram</b>	0,000	-	0,991	0,991
<b>Ptice</b>	0,000	0,000	-	0,991
<b>Vráž</b>	0,000	0,000	0,000	-
<i>L. sericata</i>				
	<b>Plaňany</b>	<b>Bukovno</b>	<b>Byšice</b>	<b>x</b>
<b>Plaňany</b>	-	0,829	0,991	x
<b>Bukovno</b>	-0,192	-	0,378	x
<b>Byšice</b>	0,000	0,041	-	x
<i>P. regina</i>				
	<b>Byšice</b>	<b>Červená Lhota</b>	<b>x</b>	<b>x</b>
<b>Byšice</b>	-	0,991	x	x
<b>Červená Lhota</b>	0,000	-	x	x

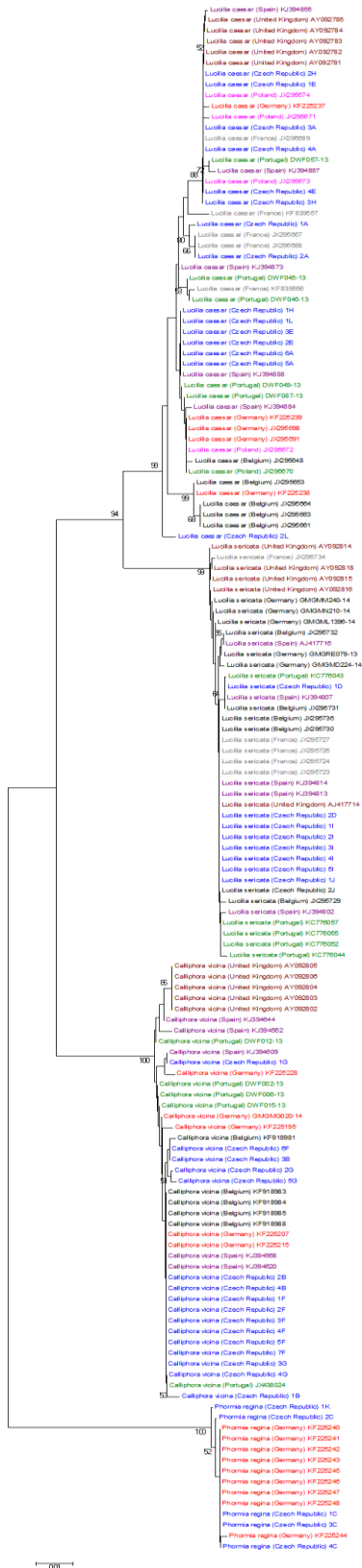
**Příloha 8:** Testy neutrality mitochondriálních markerů pro jednotlivé druhy a lokality, S = počet segregujících míst, MNPD = průměrná párová diverzita (mean number of pairwise differences), zkratky lokalit viz tabulka I.

Druh	Lokalita	Počet vzorků	S	MNPD	Počet alel	Tajimův test		Fuův test	
						Tajimovo D	p hodnota	Fuovo Fs	p hodnota
<b>ND6</b>									
<i>C. vicina</i>	PL	4	4	2,333	4	0,650	0,803	-1,622	0,053
	PH	7	3	1,238	3	0,050	0,576	0,406	0,538
	KV	5	3	1,200	3	-1,048	0,076	-0,186	0,272
<i>L. caesar</i>	KR	6	6	2,600	5	-0,060	0,485	-1,565	0,084
	PB	4	6	3,333	4	0,180	0,700	-1,082	0,100
	PT	3	3	2,000	3	0,000	1,000	-0,693	0,115
	VR	2	1	1,000	2	0,000	1,000	0,000	0,262
<i>L. sericata</i>	PL	2	1	1,000	2	0,000	1,000	0,000	0,251
	BU	5	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
	BY	2	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
<b>CytB</b>									
<i>C. vicina</i>	PL	4	2	1,000	2	-0,710	0,291	1,098	0,597
	PH	7	3	0,857	3	-1,358	0,092	-0,237	0,269
	KV	5	3	1,600	3	0,699	0,766	0,276	0,492
<i>L. caesar</i>	KR	6	7	3,133	5	0,128	0,588	-1,200	0,142
	PB	4	8	4,667	4	0,687	0,779	-0,615	0,203
	PT	3	5	3,333	3	0,000	1,000	-0,077	0,225
	VR	2	3	3,000	2	0,000	1,000	1,099	0,410
<i>L. sericata</i>	PL	2	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
	BU	5	2	1,200	2	1,459	0,965	1,688	0,747
	BY	2	2	2,000	2	0,000	1,000	0,693	0,389
<i>P. regina</i>	BY	4	18	10,167	4	0,363	0,718	0,353	0,357
	CL	1	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
<b>CR</b>									
<i>C. vicina</i>	PL	4	5	15,500	3	-0,797	0,171	3,377	0,902
	PH	7	10	8,095	6	-0,357	0,360	-0,222	0,369
	KV	3	5	4,667	3	0,000	1,000	0,308	0,388
<i>L. caesar</i>	KR	6	12	6,000	5	0,476	0,650	-0,036	0,380
	PB	4	6	4,667	4	1,168	0,837	-0,615	0,184
	PT	2	5	6,000	2	0,000	1,000	1,792	0,502
	VR	2	2	4,000	2	0,000	1,000	1,387	0,460
<i>L. sericata</i>	PL	2	1	1,000	2	0,000	1,000	0,000	0,261
	BU	4	6	3,833	4	-0,314	0,545	-0,884	0,141
	BY	2	2	3,000	2	0,000	1,000	1,099	0,437
<i>P. regina</i>	BY	4	10	5,166	3	-0,528	0,440	1,557	0,706
	CL	1	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.

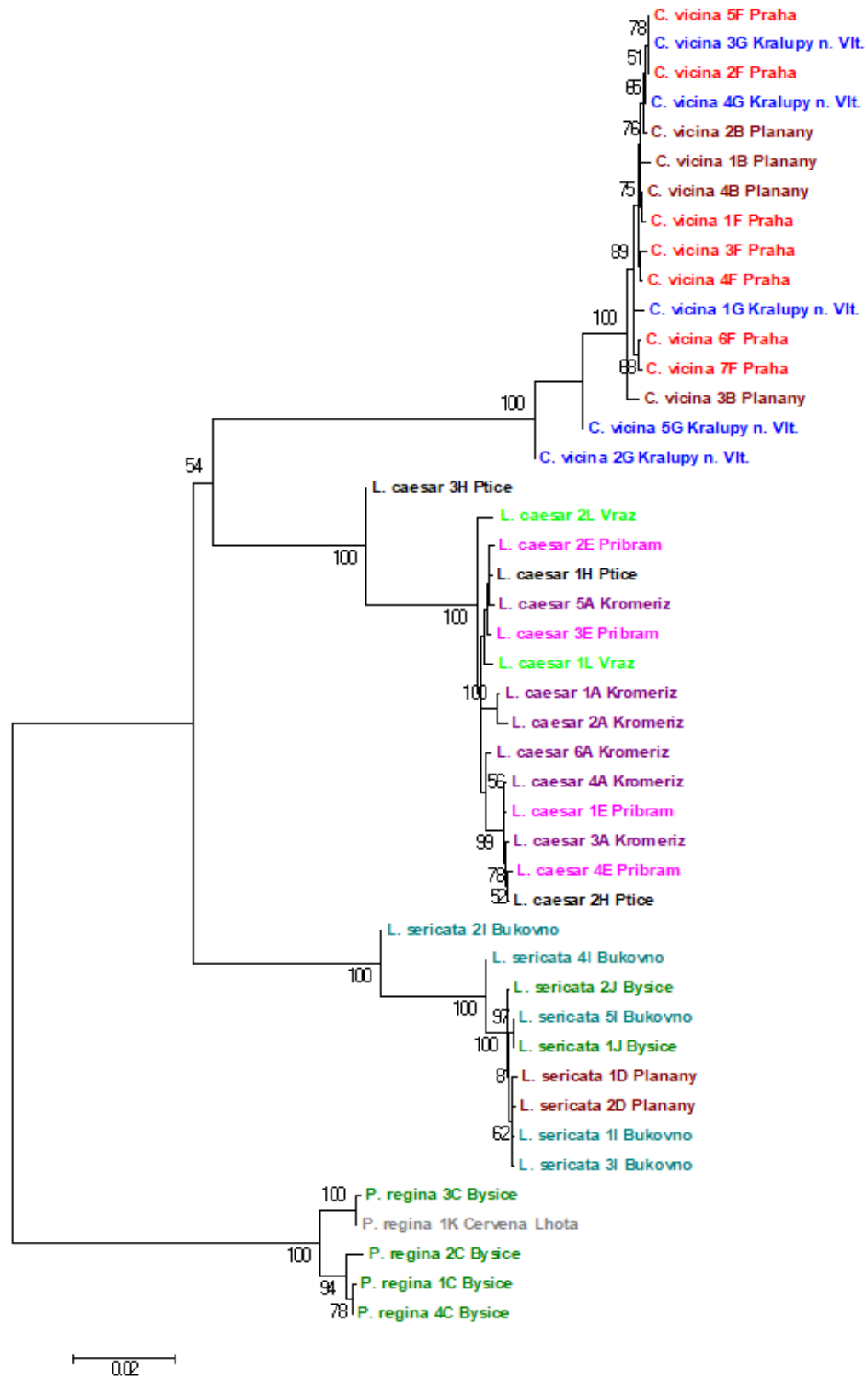
**Příloha 9:** Testy neutrality konkaténovaných jaderných markerů pro jednotlivé druhy a lokality, S = počet segregujících míst, MNPD = průměrná párová diverzita (mean number of pairwise differences), zkratky lokalit viz tabulka I.

Druh	Lokalita	Počet vzorků	S	MNPD	Počet alel	Tajimův test		Fuův test	
						Tajimovo D	p hodnota	Fuovo Fs	p hodnota
<i>C. vicina</i>	PL	4	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
	PH	7	1	0,286	2	-1,006	0,229	-0,095	0,214
	KV	5	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
<i>L. caesar</i>	KR	6	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
	PB	4	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
	PT	3	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
	VR	2	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
<i>L. sericata</i>	PL	2	4	4,000	2	0,000	1,000	1,386	0,473
	BU	5	5	2,200	4	-0,562	0,384	-0,848	0,131
	BY	2	3	3,000	2	0,000	1,000	1,099	0,428
<i>P. regina</i>	BY	4	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.
	CL	1	0	0,000	1	0,000	1,000	0,000	N.A.

**Příloha 10:** Dendrogram oblasti *COI* (Neighbor-Joining, Tamura 3 - parametr, Pairwise deletion, Bootstrap 1000). Strom zakořeněn pomocí druhu *P. regina*. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně.



**Příloha 11:** Společný dendrogram oblastí *COI*, *ND6*, *CytB* a *CR* (Neighbor-Joining, Tamura - Nei, Pairwise deletion, Bootstrap 1000). Strom zakořeněn pomocí druhu *P. regina*. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně.



**Příloha 12:** Společný dendrogram oblastí *RP S12*, *RP S13*, *RP L12* a *Pβ2* (Neighbor-Joining, Tamura 3 - parametr, Pairwise deletion, Bootstrap 1000). Strom zakořeněn pomocí druhu *P. regina*. Jednotlivé lokality jsou odlišeny barevně.

