

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Aplikace molekulárních markerů EPIC pro
studium genetické variability entomopatogenních
hlístic rodu *Steinernema* (*Steinernematidae*)**

Bakalářská práce

Hana Toušková

Školitel: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.
Školitel specialista: Mgr. Vladimír Půža, PhD.

České Budějovice 2023

Bakalářská práce

Toušková, H., 2023: Aplikace molekulárních markerů EPIC pro studium genetické variability entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* (*Steinernematidae*). [Application of molecular markers for study of genetic variability of entomopathogenic nematodes of genus *Steinernema* (*Steinernematidae*). Bc. Thesis in Czech.] – 50 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The aim of this thesis was to design and use new EPIC markers for genus *Steinernema* and compare their variability with more common markers used in species identification of entomopathogenic nematodes (*ITS*, *COI*, *ND2*). Three EPIC markers were successfully amplified and statistically analyzed. The combination of markers has shown more specific relationships among species within clade Affine and suggested existence of one new species.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své školitelce PaedDr. Martině Žurovcové, Ph.D. za odborné vedení, dohled, trpělivost, cenné rady a informace poskytnuté v průběhu celé mé práce a také RNDr. Vladimíru Půžovi, Ph.D. za poskytnutí analyzovaného materiálu a za veškeré informace o nematodách. Dále bych ráda poděkovala Šárce Hajšmanové za podporu a udržování dobré nálady v nejtěžších laboratorních chvílích. Nemohu zapomenout poděkovat Bc. Nicole Jánové za naučení laboratorních technik. Velké poděkování patří mé rodině, příteli a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu mého studia.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Biologická ochrana	1
1.2	Entomopatogenní hlístice (EPN)	1
1.2.1	Způsob života	2
1.2.2	Studium genetické variability EPN	4
1.3	Molekulární markery	5
1.3.1	DNA barcoding	6
1.3.2	Cytochrom oxidáza I (<i>COI</i>).....	6
1.3.3	<i>ITS</i>	7
1.3.4	Markery EPIC	7
2	Cíle práce.....	9
3	Materiál a metody.....	10
3.1	Materiál.....	10
3.2	Extrakce DNA.....	12
3.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	12
3.3.1	Výběr markerů.....	12
3.3.2	PCR profily	13
3.4	Gelová elektroforéza.....	14
3.4.1	Agarózový gel	15
3.4.2	Velikostní standard.....	15
3.5	Sekvenování PCR produktů.....	15
3.6	Klonování.....	15
3.7	Bioinformatická a biostatistická analýza dat	16
4	Výsledky.....	18
4.1	Souhrnná variabilita markerů.....	19
4.2	Vnitrodruhová variabilita <i>S. affine</i>	22

4.3	Mezidruhová variabilita.....	24
4.3.1	Vhodnost markerů pro identifikaci druhů	24
4.3.2	Fylogenetika rodu <i>Steinernema</i>	27
4.3.3	Fylogenetika kladu Affine.....	32
5	Diskuze.....	33
5.1	Metodika izolace DNA a PCR.....	33
5.2	Markery.....	33
5.2.1	<i>ITS</i>	33
5.2.2	<i>COI</i>	33
5.2.3	<i>ND2</i>	34
5.2.4	<i>EPIC</i>	34
5.3	Využití nových markerů pro fylogenetiku a systematiku skupiny	36
6	Závěr.....	38
7	Seznam literatury.....	39

1 Úvod

Při dnešním trendu neustále se zvyšujícího počtu obyvatel na naší planetě, rostou i nároky na množství potravy, kterou je v rámci uspokojujícího zasycení lidstva nutno vyprodukovat. S tím je spojena čím dál vyšší potřeba zvyšování výnosů zemědělských ploch, které kvůli přeplnění planety již není možné dostatečně rozšiřovat. Jedním ze způsobů, jak tento problém co možná nejšetrněji řešit, je zefektivnění zemědělské výroby, díky čemuž by se mohla zvýšit zemědělská produkce i bez zvětšování zemědělských ploch. Efektivitě zemědělské produkce však stále brání důležitý faktor, a to rostlinní škůdci, kteří znehodnocují zemědělskou úrodu. Před škůdci je možné rostliny chránit pomocí chemicky vyráběných pesticidů. Ty však mají ve větší míře nepříznivý vliv na zdraví člověka i na celý ekosystém. Další možností ochrany plodin je vyvíjení geneticky modifikovaných organismů (GMO), což s sebou nese podobná rizika. Z hlediska zdraví člověka i přírodního prostředí se šetrnou cestou jeví biologická ochrana zemědělských plodin.

1.1 Biologická ochrana

Biologická ochrana představuje využití přirozených nepřátel, jako jsou parazité, predátoři nebo patogeny, k likvidaci rostlinných škůdců (Stock, 2002, A). Jedněmi z mnoha adeptů na biologickou ochranu jsou v půdě žijící hlístice, zejména entomopatogenní, tedy napadající hmyz. Entomopatogenní hlístice (EPN) s pomocí symbiotické bakterie zahubí škůdce bez zatížení životního prostředí a není tedy potřeba používat chemické pesticidy. Účinnost hlístic je ovlivněna několika faktory. Takovými faktory jsou především typ a vlhkost půdy, vystavení UV záření, nebo metoda aplikace hlístovek (Georgis et al., 2006). V přirozených podmínkách totiž EPN mohou hubit jen ta vývojová stadia hmyzu, která se nacházejí v půdě, což může být dost omezující faktor. V poslední době se proto rozvíjí nové aplikační postupy. Hlístice jsou užívány s pomocnými látkami, které rozšiřují pole jejich působnosti i do nadzemní části rostliny, kde mají larvy hlístic obvykle ztížený přístup (Lacey et al., 2015).

1.2 Entomopatogenní hlístice (EPN)

Hlístice, latinsky *Nematoda*, jsou evolučně mimořádně úspěšný kmen volně žijících i parazitických živočichů, kteří se vyskytují téměř ve všech ekosystémech na světě. Popsáno je přes 20 tisíc druhů hlístic, ale odhadovaný počet může šplhat až k několika milionům (Bongers & Ferris, 1999; Curtis & Sloan, 2004; Curtis et al., 2002; Rappe & Giovannoni, 2003; Torsvik et al., 2002).

Hlístice mohou žít ve vodě, ve vlhké půdě, nebo žijí paraziticky. Z popsáných druhů tvoří 60 % živočišných či rostlinných parazitů, ale velká většina hlístic je dosud nepopsaných, a mezi nimi pravděpodobně převládají volně žijící druhy (Půža, konzultace). Tělo hlístice je válcovité a ke konci ztenčené (viz Obrázek 1). Povrch těla je tvořen kutikulou, která jim umožňuje parazitický způsob života. Pro hlístice je typické ústní ústrojí se třemi až šesti pysky a za nimi hltan, umožňující nasávání tělních tekutin od hostitele (Adams et al., 2006, Jelínek & Zicháček, 2014).



Obrázek 1 Samec *S. affine*, foto V.Půža

Entomopatogenní hlístice jsou obligátní parazité hmyzu. Napadají vůbec nejširší spektrum hostitelů, které zahrnuje hmyz mnoha řádů a vzácněji i jiné bezobratlé. Můžeme je nalézt v půdách většiny ekosystémů světa (Nermuť et al., 2012). Jejich velikost se obvykle pohybuje v rozpětí od 0,4 do 12 mm, kdy samička je několikanásobně větší než samec.

Entomopatogenní hlístice se dělí do dvou čeledí, a to *Steinernematidae* a *Heterorhabditidae*. Jejich strategie přežití je založena na symbiotickém vztahu s gramnegativními bakteriemi rodů *Xenorhabdus* (*Steinernematidae*) a *Photorhabdus* (*Heterorhabditidae*) z čeledi *Enterobacteriaceae* (Chaston et al., 2011; Griffin et al., 2005). Symbiotické bakterie jsou umístěny buď přímo ve střevě, což je příklad rodu *Heterorhabditis*, nebo ve speciálním střevním váčku, jak je tomu u rodu *Steinernema* (Boemare et al., 1993; Chaston et al., 2011).

1.2.1 Způsob života

Entomopatogenní hlístice žijí v půdě ve stádiu invazivní larvy (larva třetího instaru). Pro larvy hlístic je velkým problémem sucho, jelikož jim půdní vlhkost pomáhá vytvářet obalovou vrstvu, která jim usnadňuje pohyb (Koppenhöfer et al., 2007). Vhodnou strategií proti suchu může být migrování do nižších půdních vrstev, nebo přečkání nepříznivých podmínek v mrtvém těle hostitele (Půža et al., 2007).

Pro larvy hlístic v půdě je klíčové nalezení hostitele. K tomuto účelu jim slouží citlivé smyslové orgány umístěné v hlavové části (amfidy a hlavové papily), díky kterým zachycují sloučeniny vylučované hostitelem. Takovou sloučeninou je především vydechovaný oxid uhličitý (Banerjee & Hallem, 2020). Jakmile hlístice naleznou vhodnou oběť, pronikne do její tělní dutiny skrze ústní nebo řitní otvor, spirakula vzdušnic, nebo penetrační intersegmentální membrány (Nermuť et al., 2012).

Jakmile dojde k průniku larvy do těla hostitele, hlístice uvolní symbiotické bakterie, které se zmnoží a do 48 hodin usmrtí hostitele septikemií (neboli otravou krve). Na smrti hostitele se podílí i hlístice produkcí toxických proteinů (Dillman et al., 2012). Zmnožené bakterie poté slouží jako potrava pro hlístice. Dochází k vývoji v dospělce, hlístice se páří a kladou vajíčka (Nermuť et al., 2012). Pohlavní rozmnožování se však nachází v první generaci pouze u rodu *Steinernema*. U rodu *Heterorhabditis* jsou dospělci hermafroditičtí a jedinci s odděleným pohlavím vznikají až v další generaci. U starších samic a hermafroditů dochází k nitroděložnímu líhnutí vajec (endotokia matricida), při kterém rodič umírá a stává se potravou pro novou generaci (Askary et al., 2010). Druhá generace se znovu vyvíjí do fáze dospělce a množí se. Vývoj jejich potomků se však zastaví ve fázi třetího instaru a jako invazivní larvy hostitele opouští (Nermuť et al., 2012). Během invaze může vzniknout i více generací, v závislosti na množství živin. Životní cyklus od infekce až po uvolnění nových invazivních larev probíhá 7-15 dní (Askary et al., 2010).

Entomopatogenní hlístice jsou rozšířeny na všech kontinentech kromě Antarktidy a obývají široké spektrum biotopů. Obecně platí, že jejich rozmístění má shlukovitý charakter, přičemž úroveň shlukovitosti se může mezi jednotlivými druhy lišit v závislosti na podmínkách prostředí, ale i na strategii napadání hostitele. Drobná invazivní larva je jediné stádium schopné samostatného pohybu i na delší vzdálenost. A tak převažuje pasivní transport v těle hostitele (Stuart et al., 2015). U jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic se také mohou lišit biotopové preference (Mráček et al., 2005).

Pro výzkum je častěji využívána čeleď *Steinernematidae*, zejména proto, že se u ní vyskytuje větší molekulární diverzita mezi jednotlivými druhy. Příčinou velké mezidruhové diverzity je s největší pravděpodobností stáří této čeledi, jejíž první výskyt je datován dříve, než u čeledi *Heterorhabditidae* (Adams et al., 2002). Tato práce byla zaměřena na druh *Steinernema Affine* jako nejčastěji se vyskytující druh v okolí Českých Budějovic. (Mráček et al., nepublikováno) a klad *Affine*, jelikož zde zůstává nedořešena fylogenetika.

1.2.2 Studium genetické variability EPN

Entomopatogenní hlístice se stávají atraktivním prostředkem k hubení škůdců rostlin. Existuje zde však možnost interakce mezi komerčně dostupnými a původními (přírodními) populacemi. To vyvolává otázky, zda užívání komerčně dostupných hlístic může ohrozit původní populace v krajině. K hodnocení možného rizika ohrožení přírodních populací hlístic komerčními druhy je proto potřeba znát rozšíření a populačně genetickou strukturu druhů původních. Tyto informace jsou důležité, jelikož populace, které jsou vzájemně propojené, nejsou tak náchylné ke krátkodobým změnám v počtu jedinců jako populace, které žijí izolovaně (Stock, 2015). Pro entomopatogenní hlístice však dosud nejsou tyto informace k dispozici.

První studie používající genetická data byly zaměřeny především na zrekonstruování fylogenetických vztahů. V minulosti byla k určování druhů EPN používána srovnávací morfologie, která ovšem není příliš přesná, díky nedostatku morfologické variability (Stock et al., 2002, B). První pokus o druhovou identifikaci *Steinernem* byl založen na analýze genu *18SrRNA* (Liu et al., 1997), ale ukázalo se, že je pro tento rod příliš konzervativní.

Ideálními kandidáty se poté zdály být oblasti *ITS* z ribosomální RNA a *cytochrom oxidáza II* z mitochondriální DNA. Szalanski et al. (2000) analyzoval sedm druhů rodu *Steinernema* pomocí markerů oblasti *ITS1* a *16S* ribosomální RNA a *cytochrom oxidázy II* z mitochondriální DNA. Výsledné fylogenetické stromy korespondovaly s morfologickým rozdělením. Analýza sekvencí z oblastí *ITS1-5,8S-ITS2* získaných z deseti druhů rodu *Steinernema* naznačily existenci několika monofyletických skupin (Nguyen et al., 2001, Nguyen & Duncan, 2002). Stock et al. (2001) poté roztřídil 21 druhů rodu *Steinernema* do pěti základních kladů. Později toto podpořil i Spiridonov et al. (2004) analýzou 24 pojmenovaných druhů a 16 zatím nepojmenovaných druhů pomocí sekvenace několika oblastí *ITS*. Jednotlivé druhy rodu *Steinernema* byly rozděleny do pěti skupin neboli evolučních kladů, zahrnujících nejpříbuznější druhy: na Klad I: *affine/intermedium*, Klad II: *carpocapsae/scapterisci/tami*, Klad III: *feltiae/crauseri/oregonense*, Klad IV: *bicornutum/ceratophorum/riobrave* a Klad V: *arenarium/glaseri/karii/longicaudatum*. Spiridonov & Subbotin (2016) zanalyzovali 85 druhů z rodu *Steinernema* pomocí *ITS* rRNA a rozdělili je do 15 kladů: „Affine“ (7 druhů), „Bicornutum“ (7 druhů), „Caeroonense“ (3 druhy), „Carpocapsae“ (13 druhů), „Costaricense“ (2 druhy), „Feltiae“ (16 druhů), „Glaseri“ (11 druhů), „Karii“ (7 druhů), „Khoisanae“ (4 druhy), „Kushidai“ (2 druhy), „Longicaudatum“ (5 druhů), „Monticolum“ (5 druhů), *S. neocurtillae*, *S. unicornum* a *S.*

rarum. U jednotlivých kladů je možné pozorovat různá specifika (Spiridonov & Subbotin, 2016). Oblast *ITS* byla úspěšná v řešení vztahů uvnitř kladů, ale již méně mezi jednotlivými klady.

Vhodnost mitochondriálních markerů pro studium genetické variability u rodu *Steinernema* analyzovala Faktorová (2014). Její studie porovnávala úspěšnost rozdělení jednotlivých druhů pomocí markerů *ND2* a *ITS*. Z jejích výsledků plyne, že lepšího rozdělení druhů bylo dosaženo pomocí markeru *ND2* a že by tak mohl být také využíván pro druhovou identifikaci. První možnosti použití mikrosatelitů pro populačně genetické studie rodu *Steinernema* provedli Rašková (2015) a Hartmann (2017). Ačkoliv jsou jinak mikrosatelity (krátké tandemově se opakující sekvence DNA) pro podobné studie velmi používaným markerem, pro hlístovky se ukázaly jako ne zcela vhodné zejména kvůli technickým problémům (špatná amplifikace, vyšší výskyt nulových alel a nízká použitelnost napříč druhy).

1.3 Molekulární markery

Molekulární marker je známý gen nebo sekvence DNA, která se využívá k identifikaci jedince, populace, nebo druhu. Jsou proto důležitým nástrojem při řešení otázek v oblasti ekologie, fylogenetiky i evoluce. Výhodami použití molekulárních markerů je možnost použití různých vývojových stadií, ale i fakt, že jejich použití není tak limitováno množstvím použitého materiálu. Lze je tedy využít v případech, kdy jiné metody nejsou možné.

DNA markery se rozdělují z hlediska jejich výskytu na jaderné a mitochondriální. DNA markery se od sebe výrazně odlišují zejména variabilitou, typem dědičnosti, rekombinací nebo rychlostí mutací (Avice, 2004).

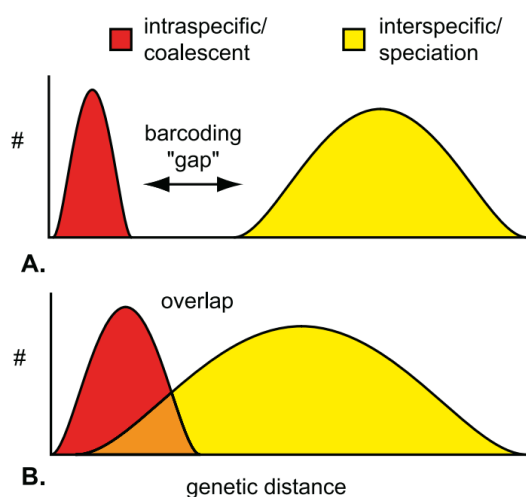
Jaderná (nukleární) DNA je obsažena v jádře všech živých organismů. Jedním z jejích hlavních problémů je rychlá degradace, a proto se se stářím vzorku snižuje její množství. Nekódující variabilní oblast Internal Transcribed Spacer (*ITS*) a kódující oblast Elongační Faktor 1 α (*EF 1 α*) jsou nejčastějšími oblastmi pro tvorbu molekulárních markerů (Loxdale & Lushai, 1998, Caterino et al., 2000).

Mitochondriální DNA naproti tomu představuje oblast mimojaderné DNA. Jedná se o kruhovou molekulu s délkou 15–18 kbp, která svou stavbou připomíná více prokaryotní nukleotid než eukaryotický chromozom. Molekula mitochondriální DNA obvykle obsahuje 37 genů, z nichž 22 pro tRNA, 2 pro rRNA a 13 kódujících proteiny (ND 1-6, ND4L, COI-III, ATP6, ATP8 a Cytb). Mitochondriální DNA je u nematod specifická tím, že na rozdíl od

hmyzu se celá přepisuje v jednom směru a obvykle chybí kódující sekvence pro ATP8. Výhodou mitochondriální DNA je především rychlost mutací, která je asi 20x vyšší v porovnání s jadernou DNA. Navíc se mitochondriální DNA vyskytuje ve větším množství než jaderná. Má proto uplatnění i při práci se staršími vzorky, u nichž by mohlo dojít k degradaci jaderné DNA (Clary & Wolstenholme, 1985).

1.3.1 DNA barcoding

Spojení „DNA barcoding“ značí proces, kdy jsou použity krátké standardizované sekvence DNA, jako markery k druhové identifikaci. Pro většinu druhů vyžaduje „DNA barcoding“ sekvenaci krátkého fragmentu mitochondriální DNA – části *cytochrom oxidázy I* (*COI*). Sekvence tohoto markeru z neznámého druhu je poté porovnána s databází sekvencí taxonomicky známých druhů, a na základě podobnosti či shody je zkoumaný jedinec identifikován (Wilson et al., 2019). Výběr uvedeného markeru se odvíjel od velkého počtu studií, které porovnávaly rozsah vnitrodruhové variability a mezidruhové divergence. Rozdíl mezi těmito dvěma intervaly je nazýván „barcoding gap“ (Obrázek 2) a značí přítomnost více druhů. Čím více se však tyto veličiny překrývají, tím méně je „DNA barcoding“ efektivní (Meyer & Paulay, 2005).



Obrázek 2 Schéma odvození "barcoding gap". (Meyer & Paulay, 2005) Vnitrodruhová variabilita je znázorněna červeně, mezidruhová žlutě. (A) Ireální rozdělení druhů, bez překryvu. (B) Signifikantní překryv bez „barcoding gap“.

1.3.2 Cytochrom oxidáza I (*COI*)

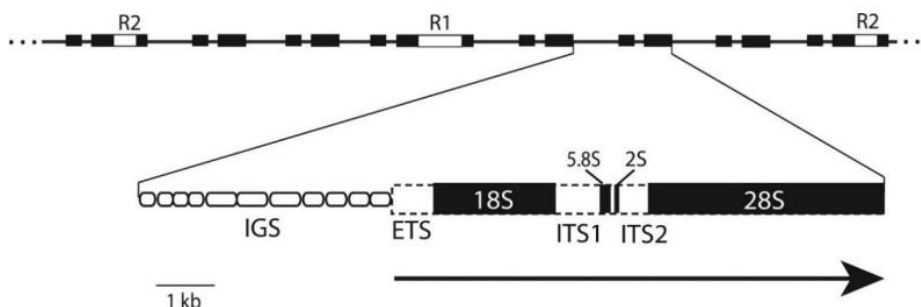
Cytochrom oxidáza I patří mezi konzervované protein kódující geny v živočišném mitogenu (Brown, 1985). Pro tuto oblast byly v roce 1994 úspěšně navrženy univerzální primery LCO1490 a HCO2198 (Folmer et al., 1994), které umožňují amplifikaci tohoto markeru téměř u všech živočichů a hub jako standardu pro „DNA barcoding“. U hlístovek

však *COI* vykazuje vyšší variabilitu, a proto je potenciálním markerem pro studium variability na nižší úrovni, tedy populací.

1.3.3 ITS

U některých organismů se variabilita fragmentu *COI* ukázala jako nevyhovující podmínce „barcoding gap“, a proto byl vybrán alternativní marker z jaderné DNA.

Jde o *ITS*, což znamená „internal transcribed spacer“ a zahrnuje nekódující oblasti, které strukturně oddělují ribozomální RNA. Tyto oblasti jsou umístěny mezi velmi konzervovanými kódujícími oblastmi *18S* a *28S* rRNA (Obrázek 3). Oblast *ITS* je rozdělena na dvě základní podjednotky: oblast *ITS1* mezi *18S* a *5.8S* a oblast *ITS2* mezi *5.8S* a *28S* (Douglas et al., 2001). *ITS* marker je u hlístovek používán pro „DNA barcoding“, jelikož spolehlivě rozlišuje jednotlivé druhy (Bhadury et al., 2006, Zhao et al., 2020). V současné době je tento marker jediným spolehlivým nástrojem delimitace druhu u hlístic rodu *Steinernema*. Pro delimitaci druhu byla původně stanovena hranice 95 % a nižší podobnosti *ITS* sekvence. V pozdější době se za dostačující pro delimitaci druhu považuje rozdíl 3 %. Analýzy sekvence *ITS* naznačují existenci dosud nepopsaných linií s odlišnostmi kolem 3 % a proto jsou velmi potřebné další markery, které by tento výsledek podpořily.

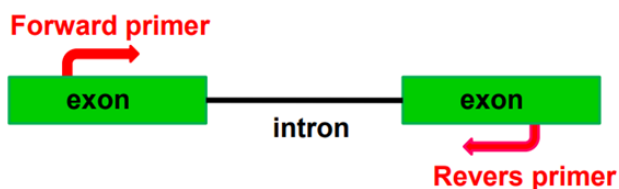


Obrázek 3 Schéma Ribozomálních DNA genů, včetně ITS (<https://genome.cshlp.org/>).

1.3.4 Markery EPIC

ITS marker je vlastně zvláštní případ EPIC markeru, což je zkráceně „exon primed intron crossing“. EPIC markery jsou navrženy k detekci polymorfismu napříč nekódujícími oblastmi (introny). Geny vhodné pro navrhování těchto markerů musí splňovat několik podmínek. Především jsou vybírány geny vyskytující se v jediné kopii, tedy ne v multigenových rodinách, aby nedocházelo ke koamplifikaci během PCR. Dále musí obsahovat intron a vhodné délce, a okolní exony by měly být dostatečně konzervované, aby bylo možné navržení primerů pro PCR amplifikaci (Palumbi, 1996).

Primer „forward“ je umístěn na 3' konci jednoho exonu a primer „reverse“ na 5' konci druhého exonu (Obrázek 4) tak, aby cílový fragment zahrnoval intron. Tyto markery mají trojí potenciál variability – jednak může být v prezenci nebo absenci intronu, v délce intronu anebo variabilitu nukleotidovou, kdy jde o bodové mutace.



Obrázek 4 Schéma EPIC markeru

Při formování RNA molekul jsou introny vystříhovány. Jsou tak oproti exonům funkčně omezené a často vykazují vyšší genetickou variabilitu. EPIC markery ribosomálních proteinů jsou obvykle navrženy s primery umístěnými v translatovaných kódujících oblastech, které jsou evolučně konzervované. Nabízejí tak možnost uplatnění napříč taxonomickou škálou (White et al., 2015). Na podobném principu jsou založeny i EPIC markery genů s rychlejší evolucí, například genů pro tvorbu enzymů (Palumbi, 1996).

Markery EPIC se v genetických studiích používají už téměř třicet let (Slade et al., 1993; Palumbi & Baker, 1994). Již byly uplatněny v populačních studiích u jazyka obecného (platýsovití) (Rolland et al., 2007), chalcidek (blanokřídli) (Lohse et al., 2011) nebo černopásky bavlníkové (můroviti) (Behere et al., 2013). Pomohly také rozluštit fylogeografii u krytosemenných rostlin (Gostel & Weeks, 2014) a mravencovitých (Ströher et al., 2013). Ribosomální EPIC markery byly uplatněny při studiu komárovitých (Endersby et al., 2009, 2011, White et al., 2015).

U nematod rodu *Heterorhabditis* aplikovali EPIC markery Regeai et al. (2009). Navrhli sadu 24 EPIC markerů z oblastí „housekeeping“ a strukturálních genů. Výsledky této studie přinesly informace o mezidruhové nukleotidové a délkové variabilitě a potenciál využití EPIC markerů u dalších nematod. Touto studií se inspiroval Dhakal et al. (2020), který u rodu *Heterorhabditis* kombinoval markery jak mitochondriální (COI) tak jaderné (ITS a EPIC). Pomocí této studie byly upřesněny vztahy mezi různými druhy rodu *Heterorhabditis* a byly odhaleny některé mylné druhové identifikace.

U rodu *Steinernema* poprvé testoval EPIC markery Rolston et al. (2009), konkrétně na druhu *Steinernema feltiae* z irského Bull Islandu pomocí β -tubulinu. Zjistil, že všechny izolované vzorky jsou opravdu zástupci *Steinernema feltiae*, i když některé již tvoří samostatné skupiny. Ovšem z jejich studie nejsou dohledatelné sekvence primerů.

2 Cíle práce

- Na základě rešerše posoudit vhodnost různých molekulárních markerů pro analýzu genetické variability a druhovou identifikaci hlístovek.
- Navrhnout sadu nových markerů typu EPIC a experimentálně ověřit jejich variabilitu u vybraných druhů rodu *Steinernema*.

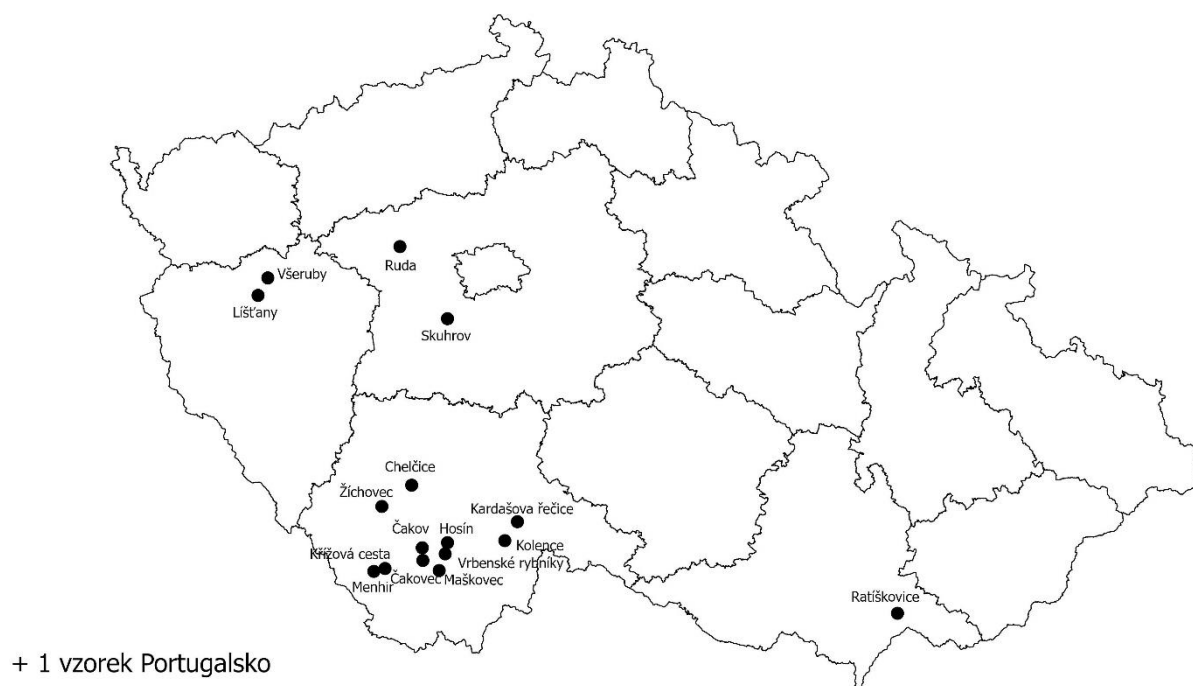
3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Zkoumány byly hlístice rodu *Steinernema*, podrobněji pak *Steinernema affine* a jí příbuzné druhy. Vzorky byly odebrány v terénu, v rámci výzkumu laboratoře entomopatogenních hlístic, Entomologický ústav Biologické centrum AV ČR, v.v.i., pod vedením RNDr. V. Půži.

Pro porovnání byly přidány i hlístice rodu *Oscheius*, který zahrnuje druhy jak volně žijící, tak i podmíněně entomopatogenní a představuje tak ideální model pro studium původu entomopatogenity u hlístic (Jarošová et al., 2015).

Vzorky pocházely z přírodních populací po celém světě. Použité druhy a populace hlístic s počty jedinců jsou uvedeny v Tabulce 1 společně s lokacemi jejich původu. Pro analýzu vnitrodruhové variability byly použity populace *Steinernema affine* z lokalit s malou, střední i velkou vzdáleností (Obrázek 5).



Obrázek 5 Mapa lokací jednotlivých populací *Steinernema affine*, ArcGIS Pro (Redlands, 2011), ArcČR 500

Tabulka 1: Seznam analyzovaných vzorků

Druh	Populace	Počet jedinců	Lokalita
S. affine	1127	1	ČR, Bavorov - Žichovec (Zich)
	1151	3	ČR, Líštany (Lis)
	1309	3	ČR, Maškovec, kraj louky (Mas)
	1338	3	ČR, Všeruby (Vse)
	Cak01	4	ČR, Čakov (Cak)
	Cako01	3	ČR, Čakovec (Cako)
	CB1B	3	ČR, Skuhrov, obilné pole (Sku)
	Hos2	3	ČR, pod Hosínem, vrba (Hos)
	Ch.af	2	ČR, Chelčice, rybíz (Chel)
	Kř7	2	ČR, Kardašova Řečice (KR)
	MB3E	3	ČR, Ruda, živý plot (Rud)
	V. af.	4	ČR, Vrbenské rybníky ČB, vrba (VR)
	16B1	4	ČR, Ratíškovice (Rat)
	af19	2	ČR, Kolence (Kol)
	vol2	2	ČR, Volary, Menhir (VoM)
	vol3	2	ČR, Volary, křížová cesta (VK)
	2B PORT	3	Portugalsko
	KV	10	ČR, Křížová cesta II, Volary (KV)
	VM	2	ČR, Volary, Menhir (VM)
S. sp. 1	Londres	6	Francie
	Paris4	6	Francie
	Rome	1	Francie
	1541	4	ČR, Bzenec-Hodonín, letošní dub
	DU7	3	ČR, Dubňany
	Váp	3	ČR, Bílé Karpaty - Vápenky
S. sp. 2	Kavk	2	Rusko, North Caucassus, Karachayevo
S. sp.	Apul	3	Itálie
S. intermedium	I. USA	3	USA
S. poinari	1187	4	ČR, Holostřevy
	Vol1	2	ČR, Volary, Alej u hřbitova
S. thesami	1293	6	ČR, Bzenec - Přívoz
	I. MÜ	5	Německo, Münster
S. feltiae	af1	2	ČR, Mlýn Podhora
	Jakub SF	3	ČR, Zbudov
S. carpocapsae	EGY4	4	Egypt
	1343	4	ČR, Veselí (Štětí)
S. monticolum	KUMA	2	Japonsko, Kumamoto
S. glaseri	S.GLAS	1	USA
S. beitlechemi	S.GI-197	3	Jižní Afrika
S. bicornutum	1298	2	ČR, Hustopeče
S. ceratophorum	Chin	3	Čína
S. hermaphroditum	CS34	3	Indie
S. huense	Vie2	3	Vietnam, Bach Ma National park
S. riobrave	Pamela	3	Mexiko
S. surkhetense	CS20	3	Indie
S. weiseri	1025W	2	ČR, Výškov
O. chongminensis	CHONG	2	Čína
	TUM	3	Čína
O. citri	WGN	3	Indie
O. myriophilus	1b	2	ČR, Dvorce, Lysá nad Labem
	JU1386	2	Reunion
O. siddiqii	CS42	2	Indie

3.2 Extrakce DNA

Extrakce DNA byla prováděna zpravidla z jednotlivých samic, jelikož jsou několikanásobně větší než samci a obsahují proto větší množství DNA. Extrakce byla prováděna standardním protokolem pomocí extrakčního pufru DEP-25 Extraction Kit (TopBio s.r.o). Hlístovky, uskladněné při -20°C , byly rozmrazeny a bylo k nim přidáno 10 μl DEP-25 START-Blue reagens (množství odpovídající hmotnosti extrahovaného materiálu). Hlístovky musely být zcela ponořeny v reagens a pomocí pipetovací špičky z nich byly uvolněny buňky. Směs byla přenesena na teplotní blok, předehřátý na 95°C , a inkubována po dobu 20 min při otáčkách 300 rpm. Poté byly vzorky ochlazeny na pokojovou teplotu a bylo k nim přidáno 10 μl DEP-25 STOP reagens. Roztok změnil barvu z modré na bezbarvou. Takto připravená DNA byla uchovávána v $5-8^{\circ}\text{C}$ až do dalšího zpracování.

3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce byla míchána na ledu do 0,2 ml zkumavky. Každá reakce se skládala z 7,25 μl ddH₂O, 1,25 μl 10x Unis Taq pufru, 1 μl dNTPs (2,5 mM), 0,75 μl primeru „forward“ (5 μM), 0,75 μl primeru „reverse“ (5 μM) a 0,1 μl Taq DNA polymerázy Unis (TopBio s.r.o, 5 U/ μl) a 1-2 μl DNA extraktu. Pro stabilizaci reakce bylo k některým reakcím přidáno činidlo BSA (Bovine Serum Albumine, 20 mg/ml).

3.3.1 Výběr markerů

Vzhledem k tomu, že EPIC markery dosud nebyly u rodu *Steinernema* použity (jediná publikovaná studie nemá uvedeny primery), bylo nutné provést jejich výběr de novo. Jako podklad pro markery z genů kódujících proteiny byly použity studie Palumbiho (1996) a Regeai et al. (2009) a použity genomové sekvence nejbližších druhů *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae* a *Steinernema glaseri* z GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Pro markery na základě ribozomálních proteinů pak byla použita práce Chow et al. (2015) a databáze Ribosomal Protein Gene Database (RPG, <http://ribosome.med.miyazaki-u.ac.jp/>). Pro ověření existence intronů a návrh primerů pak byly použity homologní sekvence z výše uvedených genomů. Pro návrhy EPIC markerů byly na základě těchto sekvencí vybrány lokusy o přiměřené délce a potenciální variabilitě intronů (Palumbi, 1996, Regeai et al., 2009, Chow et al. 2015).

Nakonec bylo vybráno pro testování pět markerů z oblastí genů pro ribosomální proteiny (*rEPIC*) a pět markerů z jaderných lokusů (*gEPIC*).

Tabulka 2 obsahuje přehled markerů a k nim příslušné primery. Z mitochondriálních markerů byla pro srovnání použita COI a ND2 oblast. Z jaderných markerů byly testovány ITS a navrhované EPIC markery. U EPIC markerů však není možné zveřejnit sekvence primerů, jelikož ještě nebyly publikovány.

Tabulka 2: Přehled markerů a použitých primerů

Marker	Lokus	Primer	Směr	Sekvence 5´-3´	Autor
mtDNA	COI	LCO-1490	F	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer et al., 1994
		HCO-2198	R	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer et al., 1994
	ND2	ND2for1	F	AATATTCTTGTGGATGGAGTGGT	Žurovcová et al. 2012
		ND2rev1	R	AAAAAGTAAAAGTAAAAGGTAT	Žurovcová et al. 2012
nDNA	ITS	18S	F	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT	Vrain et al., 1992
		26S	R	TTTCACTCGCCGTTACTAAGG	Vrain et al., 1992
	EPIC	<i>gEPIC1for</i>	F	TGAAGATCCTCACTGAGCG	Žurovcová, nepublikováno
		<i>gEPIC1rev</i>	R	TCCACATCTGTTGGAAGGTG	Žurovcová, nepublikováno
		<i>gEPIC2for</i>	F	GMATCAAGGTCGACAAGGG	Žurovcová, nepublikováno
		<i>gEPIC2rev</i>	R	CATRTTGGGCTTGAGGAG	Žurovcová, nepublikováno
		<i>gEPIC3for</i>	F	CTGAGTCWTACAAGACCTTC	Žurovcová, nepublikováno
		<i>gEPIC3rev</i>	R	AGACGAGCCTTGTTSGAGA	Žurovcová, nepublikováno
		<i>gEPIC4for</i>	F	ATGGCCGAYCAGTTBACYG	Žurovcová, nepublikováno
		<i>gEPIC4rev</i>	R	TCAGCCTCCCTGATCATYTC	Žurovcová, nepublikováno
		<i>gEPIC5for</i>	F	TSTACGCTCTTGAGAACKC	Žurovcová, nepublikováno
		<i>gEPIC5rev</i>	R	GCCAWGCGAACTTCTGGC	Žurovcová, nepublikováno
		<i>rEPIC1for</i>	F	CGCTACATCAAGAATAAGCC	Žurovcová, nepublikováno
		<i>rEPIC1rev</i>	R	TTATTGACCCACTTGSTGAG	Žurovcová, nepublikováno
		<i>rEPIC2for</i>	F	ATGTCTAAGCGCGGACGTG	Žurovcová, nepublikováno
		<i>rEPIC2rev</i>	R	CCTTCATTTACCCCTTGTG	Žurovcová, nepublikováno
		<i>rEPIC3for</i>	F	TGCACAATCCCGAAAGGG	Žurovcová, nepublikováno
		<i>rEPIC3rev</i>	R	CCGACTCGTACTTCCAGGT	Žurovcová, nepublikováno
		<i>rEPIC4for</i>	F	GTTTCARCACATCCATCGTGT	Žurovcová, nepublikováno
		<i>rEPIC4rev</i>	R	TTCTTCTGGAGACTCCGAC	Žurovcová, nepublikováno
		<i>rEPIC5for</i>	F	ATGGTTTCGTATGGGCGTGTT	Žurovcová, nepublikováno
		<i>rEPIC5rev</i>	R	ACTGGCGAGAAGGAAGGAG	Žurovcová, nepublikováno

3.3.2 PCR profily

PCR byla nejčastěji prováděna v termocykleru TProfessional TRIO Thermocycler (Biometra), popřípadě v gradientovém termocykleru Mastercycler ep gradientS (Eppendorf SE). Profily byly buď navrženy dle složení primerů a odhadované délky ampliconu, anebo převzaty z publikací. V obou případech musely být profily dále optimalizovány. Tabulka 3 zobrazuje úspěšné PCR profily.

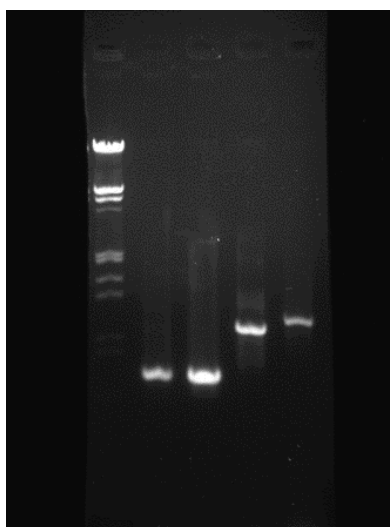
Tabulka 3: Seznam úspěšných PCR profilů

Marker	Predenaturace		Denaturace		Annealing		Elongace		Postelongace		Uchování	
	Teplota [°C]	Čas [s]	Teplota [°C]	Čas [s]	Teplota [°C]	Čas [s]	Teplota [°C]	Čas [s]	Teplota [°C]	Čas [s]	Teplota [°C]	Čas [s]
<i>ITS</i>	94	420	94	60	50	60	72	60	72	600	4	∞
<i>COI</i>	94	120	94	30	45, 47	35	72	90	72	120	12	∞
<i>ND2</i>	94	120	94	60	48, 51	30	68	60	68	120	4	∞
<i>gEPIC1</i>	94	120	94	30	55, 57	30	72	50	72	600	4	∞
<i>gEPIC2</i>	94	120	94	30	51, 53, 59	30	72	50	72	600	4	∞
<i>gEPIC3</i>	94	120	94	30	57	30	72	50	72	600	4	∞
<i>gEPIC4</i>	94	120	94	30	53, 55, 57, 59	30	72	50	72	600	4	∞
<i>gEPIC5</i>	94	120	94	30	51, 53, 55	30	72	50	72	600	4	∞
<i>rEPIC1</i>	94	120	94	30	53, 55, 57, 59	30	72	50	72	600	4	∞
<i>rEPIC2</i>	94	120	94	30	55, 57	30	72	50	72	600	4	∞
<i>rEPIC3</i>	94	120	94	30	51, 53, 55	30	72	50	72	600	4	∞
<i>rEPIC4</i>	94	120	94	30	55, 57	30	72	50	72	600	4	∞
<i>rEPIC5</i>	94	120	94	30	53, 55, 57	30	72	50	72	600	4	∞

Pozn.: Fáze Denaturace, Annealing a Elongace se po sobě opakovaly 35×.

3.4 Gelová elektroforéza

Po každé PCR byla provedena separace DNA fragmentů pomocí gelové elektroforézy kvůli ověření správného průběhu amplifikační reakce a výsledného množství DNA v reakci (Obrázek 6). Na gel byly vždy naneseny 3 μ l PCR produktu a 1 μ l nanášecího pufru „Loading Dye“ (LD). LD byl připravován do 1,5 mililitrové zkumavky. K 700 μ l ddH₂O



Obrázek 6 Fotografie agarózového gelu. 1. jamka – velikostní standard (*LambdaDNA/EcoRI+Hind III*), 2.-3. jamka – marker *ITS* a 4.-5. jamka – marker *COI* u druhů *S. sp.* a *S. affine*

bylo přidáno 300 μ l glycerolu a nepatrné množství bromfenolové modři (nesmělo být přidáno moc, aby výsledná barva na gelu nebyla příliš sytá). Následně byla tato směs zvortexována a uskladněna v chladničce při 4°C. Výsledný produkt na gelu kontrolován pod UV světlem a zachycen digitální kamerou (Obrázek 6).

3.4.1 Agarózový gel

Pro separaci byl připravován 1,5% agarózový gel. Do skleněné nádoby byly naváženy 3 g agarózy (SERVA Agarose) a 1x TAE pufrem (40 mM TRIS-Acetate, 1 mM EDTA, pH = 8) bylo doplněno na 200 ml roztoku. Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza nerozpustila. Po rozpuštění byl roztok ochlazován pod proudem studené vody na přibližně 56°C. Poté bylo do směsi přidáno 15 μ l ethidium bromidu (0,5 μ g/ μ l). Gel byl nalit do připravené vaničky, tak aby neobsahoval žádné vzduchové bubliny, a poté do něj byly zasazeny hřebínky. Zatuhlý gel byl buď použit přímo, nebo uskladněn v chladničce při 4°C v 1x TAE pufre.

3.4.2 Velikostní standard

Pro kontrolu velikosti PCR produktu byl připravován velikostní standard restrikčním štípáním DNA plazmidu Lambda. Do 0,5 ml zkumavky bylo smícháno 125 μ l deionizované H₂O, 50 μ l λ DNA (0,3 μ g/ μ l), 20 μ l 10xTango Bufferu, 2,5 μ l Hind III (10 U/ μ l) a 2,5 μ l EcoR I (10 U/ μ l). Tato směs byla inkubována při 37°C 1-2 hodiny a poté 10 minut při 65°C. Takto připravený velikostní standard byl opět uskladněn v chladničce při 4°C nebo pro pozdější použití v mrazáku při -20°C.

3.5 Sekvenování PCR produktů

Aby mohl být výsledný produkt PCR odeslán k sekvenaci, musel být nejprve přečištěn pomocí enzymů exonukleázy I (ExoI) a termosenzitivní alkalické fosfatázy (FastAP). Tyto enzymy jsou přidány k produktu PCR v poměru 0,5 μ l Exo I (20 U/ μ l) a 1 μ l FastAP (1 U/ μ l) na jeden vzorek. Výsledná směs je vložena do termocykleru a produkt je přečišťován 30 minut při 37°C a poté 15 minut při 80°C. K 5 μ l takto přečištěného produktu je přidáno 5 μ l primeru z dané PCR reakce (zpravidla „forward“ primeru) a směs je poslána na sekvenaci do firmy Eurofins Genomics.

3.6 Klonování

Jelikož produkty markeru *gEPIC1* vykazovali na gelu více proužků, i po opakované optimalizaci profilu, byly příslušné PCR produkty zaklonovány do vektoru. Prováděná PCR předcházející klonování byla prodloužena závěrečnou elongací na 10 minut.

Na klonování bylo nejprve připraveno tekuté LB medium a Petriho misky s agarovým gelem. Tekuté LB medium bylo připraveno do nádoby (1 litr), kam bylo přidáno 10 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu, 10 g NaCl a 1 litr destilované vody. Směs pro agarový gel měla stejné složení, obohacené o 15 g agaru. Směs na agarový gel byla následně klávkována po dobu 60 minut a poté chlazená proudem studené vody. Do ochlazené směsi byl přidán 1000 μ l ampicilinu a takto připravený roztok byl rozlit do cca 38 Petriho misek. Na ztuhlý gel bylo rozetřeno 64 μ l X-galu (12,5 mg/ml) a 3,5 μ l IPTG (240 mg/ml) pomocí klíčky sterilizované 96% ethanolem a plamenem.

Ligace PCR produktů do vektoru a transformace do bakteriálních buněk byla prováděna podle protokolu od firmy pGEM – T Easy Vector SystemsTM(PromegaTM), přičemž uvedené SOC médium bylo substituováno za připravené LB médium.

Buňky byly na miskách inkubovány přes noc při 37° C. Následující den bylo možné na miskách pozorovat bílé a modré bakteriální kolonie, přičemž pouze bílé kolonie obsahovaly vektor s insertem. Oddělené bílé kolonie byly sterilní špičkou přeneseny do 0,2 μ l zkumavky a povařeny v 10 μ l dH₂O po dobu 10 minut na termobloku vyhřátém na 95° C. Získaná DNA poté byla použita pro PCR, při které byly použity stejné primery, jako při PCR prováděné před klonováním.

3.7 Bioinformatická a biostatistická analýza dat

Získaná data byla analyzována v několika programech. Primární kontrola sekvencí byla prováděna pomocí programu Chromas 2.6.6 (www.technelysium.com.au), kde byly odříznuty primery a nečitelné oblasti. U jedinců, u kterých byly získány sekvence „forward“ i „reverse“, byly tyto sekvence sestaveny do jedné kontinuální (tzv. „contig“) v programu SeqMan z programového balíčku DNASTAR Lasergene (DNASTAR, Inc.).

Pro ověření druhu byla použita databáze NCBI BlastSearch (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). V programu MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 (Tamura, Stecher, & Kumar 2021). byly sekvence uspořádány a u markerů kódujících proteiny byl zkontrolován jejich čtecí rámeček (ORF – open reading frame). Následně byl metodou „Muscle“ vytvořen „alignment“ (seřazení). Tento program byl dále použit k základnímu vyhodnocení nukleotidového složení a vyhodnocení přítomnosti a délky intronů. Ze sekvencí byla poté vytvořena tabulka genetických vzdáleností podle modelu Kimura2-parametr (K2p) nebo p-distance k následnému využití

v programu GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Tabulky genetických vzdáleností byly také využity pro tvorbu histogramů.

Webový server Automatic Barcoding Gap Discovery (ABGD) (Puillandre et al., 2011) s nastavením: $P_{\min} = 0,001$, $P_{\max} = 0,15$, Steps = 20, X (relative gap width) = 1,0, Bins = 30, distace = Simple distance, byl využit pro posouzení vhodnosti markerů pro druhovou identifikaci.

Párové geografické vzdálenosti mezi lokalitami byly spočítány v programu GeoDist (Geographic Distance Matrix Generator) (Ersts, 2006) s použitím souřadnic GPS. V programu GenAlEx 6.5 byla na základě korelace geografických a genetických vzdáleností testována hypotéza o izolaci vzdáleností (Mantelův test).

V programu DnaSP 6 (Rozas et al., 2017) byly provedeny výpočty nukleotidové (π) a haplotypové (Hd) variability. Pomocí programu DnaSP byly také vytvořeny vstupní soubory pro program PopArt 1.7 (Leigh & Bryant, 2015).

V programu PopArt byly vytvořeny haplotypové sítě metodou Median-Joining (Bandelt, Forster & Röhl, 1999).

Pro konstrukci fylogramů byl použit program PhyML (Guindon et al., 2010) v on-line prostředí (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>). Substituční model byl vybrán automaticky v modulu SMS (Lefort et al., 2017). Podpora větví byla vyhodnocena pomocí neparametrického testu aLRT-SH (neparametrický „approximate likelihood-ratio“ test podle Shimodaira–Hasegawy). Vygenerované fylogramy byly následně graficky upraveny v programu FigTree (Rambaut, 2009).

4 Výsledky

Celkově bylo analyzováno 160 jedinců reprezentujících 23 druhů, z nichž se pomocí různých markerů podařilo získat celkem 300 sekvencí. V Tabulce 4 je uvedena sumarizace získaných sekvencí od jednotlivých markerů. V příloze se poté nachází podrobná tabulka (Příloha 1). Marker *ITS* byl považován jako standard pro porovnání s ostatními markery.

Tabulka 4: Počet získaných sekvencí od jednotlivých markerů

Marker	<i>ITS</i>	<i>COI</i>	<i>ND2</i>	<i>gEPIC1</i>	<i>gEPIC2</i>	<i>gEPIC3</i>	<i>gEPIC4</i>	<i>gEPIC5</i>	<i>rEPIC1</i>	<i>rEPIC2</i>	<i>rEPIC3</i>	<i>rEPIC4</i>	<i>rEPIC5</i>
Počet jedinců	47	58	33	6	4	3	65	4	17	6	50	4	7
Zastoupení populací	43	38	27	5	4	3	40	4	14	5	42	4	4

V Tabulce 5 je možné vidět úspěšné amplifikace markerů pro jednotlivé druhy. V rámci druhů, byly nejlépe amplifikovány druhy *Steinernema affine*, *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema monticolum* a *Steinernema glasseri*. Z markerů poté byly nejúspěšnější *ITS*, *COI*, *ND2*, *gEPIC4*, *rEPIC1* a *rEPIC3*, které byly dále statisticky vyhodnocovány. Ostatní EPIC markery kvůli malému počtu získaných sekvencí nebyly do následných analýz zařazeny.

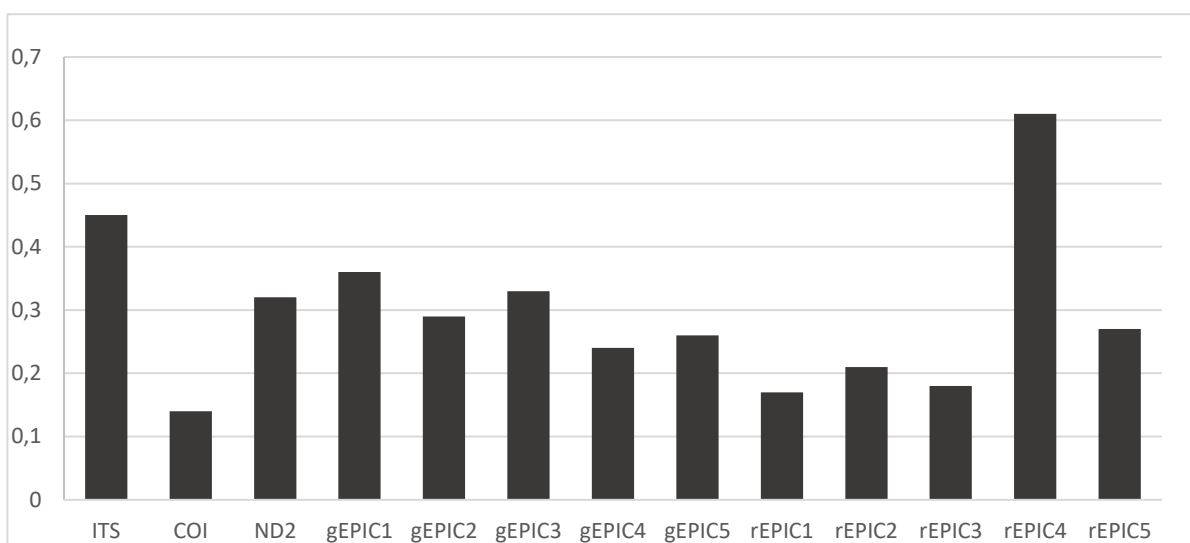
Tabulka 5: Úspěšnost markerů u jednotlivých druhů

Marker	<i>ITS</i>	<i>COI</i>	<i>ND2</i>	<i>gEPIC1</i>	<i>gEPIC2</i>	<i>gEPIC3</i>	<i>gEPIC4</i>	<i>gEPIC5</i>	<i>rEPIC1</i>	<i>rEPIC2</i>	<i>rEPIC3</i>	<i>rEPIC4</i>	<i>rEPIC5</i>	AM
<i>S. affine</i>	✓	✓	✓	✓			✓		✓	✓	✓		✓	9
<i>S. sp. 1</i>	✓	✓	✓				✓				✓			5
<i>S. sp. 2</i>	✓	✓	✓				✓				✓			5
<i>S. sp.</i>	✓		✓				✓		✓		✓			5
<i>S. intermedium</i>	✓	✓	✓				✓				✓			5
<i>S. poinari</i>	✓	✓	✓				✓				✓	✓		6
<i>S. thesami</i>	✓	✓	✓				✓				✓			5
<i>S. feltiae</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	13
<i>S. carpocapsae</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	13
<i>S. monticolum</i>	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓			9
<i>S. glaseri</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓			9
<i>S. beitlechemi</i>	✓	✓	✓				✓		✓		✓			6
<i>S. bicornutum</i>	✓	✓	✓				✓		✓		✓			6
<i>S. ceratophorum</i>	✓	✓	✓				✓		✓		✓			6
<i>S. hermaphroditum</i>	✓	✓	✓				✓		✓		✓			6
<i>S. huense</i>	✓	✓					✓		✓		✓			5
<i>S. riobrave</i>	✓		✓				✓		✓		✓			5
<i>S. surkhetense</i>	✓	✓	✓						✓		✓			5
<i>S. weiseri</i>	✓		✓								✓			3
<i>O. chongminensis</i>	✓	✓	✓				✓				✓			5
<i>O. citri</i>	✓	✓					✓				✓			4
<i>O. myriophilus</i>	✓	✓									✓			3
<i>O. siddiqii</i>	✓	✓									✓			3
AD	23	20	19	5	4	3	19	4	12	3	23	3	3	

Pozn.:AD – celkový počet úspěšně amplifikovaných druhů, AM – celkový počet amplifikovaných markerů pro daný druh

4.1 Souhrnná variabilita markerů

Na Obrázku 7 je znázorněna mezidruhová diverzita jednotlivých markerů pomocí histogramů. Diverzita byla počítána pouze z dominantních haplotypů, aby bylo zamezeno případnému zkreslení u markerů, které obsahovaly více sekvencí ze stejného druhu. Analyzovány byly markery *ITS* (32 jedinců), *COI* (29 jedinců), *ND2* (27 jedinců), *gEPIC1* (6 jedinců), *gEPIC2* (4 jedinci), *gEPIC3* (3 jedinci), *gEPIC4* (30 jedinců), *gEPIC5* (4 jedinci), *rEPIC1* (15 jedinců), *rEPIC2* (6 jedinců), *rEPIC3* (29 jedinců), *rEPIC4* (4 jedinci), *rEPIC5* (7 jedinců). Zastoupení druhů odpovídalo úspěšnosti uvedené v Tabulce 5.



Obrázek 7 Mezidruhová diverzita jednotlivých markerů z haplotypů na modelu *p*-distance

Z grafu je možné vyčíst, že variabilita markerů je dle očekávání rozdílná. Vysoká variabilita u markeru *rEPIC4* mohla být způsobena malým počtem sekvencí, které zastupovali čtyři různé druhy.

V Tabulce 6 se nachází přehled mezidruhových nukleotidových variabilit pro jednotlivé markery, haplotypové diverzity a vnitrodruhové nukleotidové variability u druhů *Steinernema affine* a *Steinernema sp.1*, u kterých byly získány více než dvě sekvence na druh. Vnitrodruhová variabilita pro druh *Steinernema sp.1* nebyla vyhodnocena pro marker *rEPIC1*, jelikož u něj nebyly získány sekvence. Hodnoty zaznamenané v tabulce byly získány pomocí programu DnaSP.

Tabulka 6: Mezidruhová nukleotidová variabilita, haplotypová diverzita a vnitrodruhová nukleotidová variabilita pro jednotlivé markery

Marker	d	HD	$\Pi_{S. affine}$	$\Pi_{S. sp1}$
<i>ITS</i>	0,12263	0,803	0,00881	0,00101

COI	0,09164	0,923	0,03568	0,01752
ND2	0,22258	0,985	0,01426	0,01426
gEPIC4	0,13557	0,899	0,02578	0,00216
rEPIC1	0,12929	0,985	0,00115	
rEPIC3	0,12216	0,921	0,00207	0,00086

Tabulky 7-9 obsahují přehled délek fragmentů a intronů pro markery *gEPIC4*, *rEPIC1* a *rEPIC3*. Pro méně úspěšné markery jsou tabulky s přehledem délky fragmentů a intronů umístěny v Příloze 2.

Tabulka 7: Přehled délky fragmentů a intronů u jednotlivých druhů pro marker *gEPIC4*

gEPIC4	Délka fragmentu [bp]	Délka intronu 1 [bp]	Délka intronu 2 [bp]
<i>S. affine</i>	468	44	46
<i>S. sp1</i>	446	44	44
<i>S. sp2</i>	449	44	46
<i>S. sp</i>	459	47	54
<i>S. intermedium</i>	401	44	0
<i>S. poinari</i>	441	44	45
<i>S. thesami</i>	447	44	45
<i>S. feltiae</i>	448	45	45
<i>S. carpocapsae</i>	405	48	0
<i>S. monticolum</i>	449	50	41
<i>S. glaseri</i>	456	46	52
<i>S. beitlechemi</i>	448	44	46
<i>S. bicornutum</i>	404	47	0
<i>S. ceratophorum</i>	403	46	0
<i>S. hermaphroditum</i>	471	44	69
<i>S. huense</i>	404	47	0
<i>S. riobrave</i>	403	46	0
<i>O. chongmingensis</i>	534	42	135
<i>O. citri</i>	531	43	131

U markeru *gEPIC4* se u intronu 1 vyskytuje délková variabilita v rozmezí 43-50 bp. U intronu 2 je pak variabilita v prezenci i absenci intronu, kdy intron chyběl druhům *S. intermedium*, *S. carpocapsae*, *S. bicornutum*, *S. ceratophorum*, *S. huense* a *S. riobrave*. Délka intronu 2 se poté pohybovala od 41 do 135 bp.

Tabulka 8: Přehled délky fragmentů a intronů u jednotlivých druhů pro marker *rEPIC1*

<i>rEPIC1</i>	Délka fragmentu [bp]	Délka intronu [bp]
<i>S. affine</i>	582	52
<i>S. sp</i>	576	46
<i>S. feltiae</i>	572	42
<i>S. carpocapsae</i>	573	43
<i>S. beitlechemi</i>	578	48
<i>S. bicornutum</i>	574	44
<i>S. ceratophorum</i>	574	44
<i>S. hermaphroditum</i>	576	46
<i>S. huense</i>	573	43
<i>S. riobrave</i>	572	42
<i>S. surkhetense</i>	575	45

Marker *rEPIC1* obsahoval jeden intron, který vykazoval délkovou variabilitu intronu. Délka intronu se pohybovala od 42 do 52 bp.

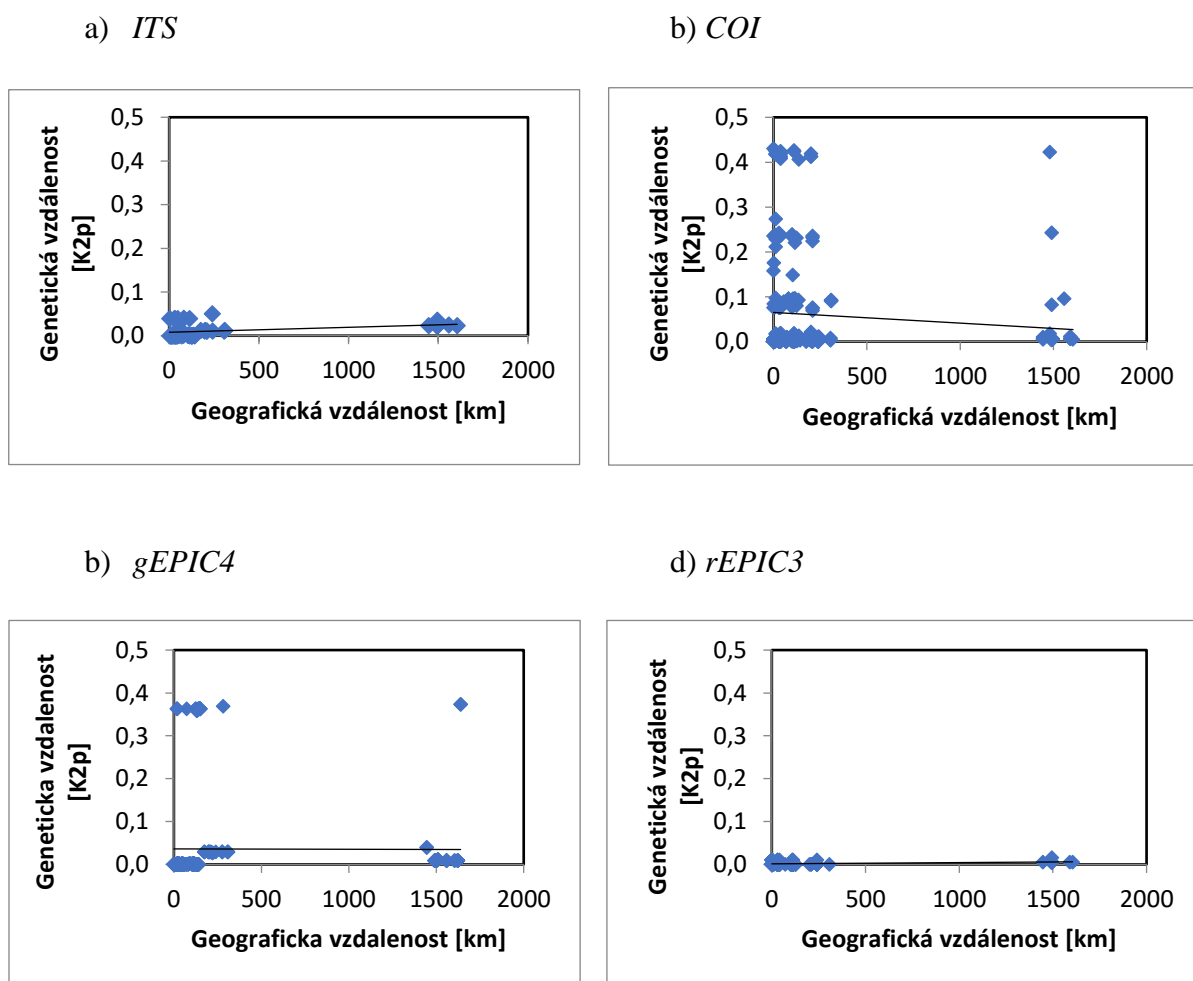
Tabulka 9: Přehled délky fragmentů a intronů u jednotlivých druhů pro marker *rEPIC3*

<i>rEPIC3</i>	Délka fragmentu [bp]	Délka intronu [bp]
<i>S. affine</i>	389	48
<i>S. sp1</i>	389	48
<i>S. sp2</i>	389	48
<i>S. sp</i>	386	45
<i>S. intermedium</i>	387	46
<i>S. poinari</i>	389	48
<i>S. thesami</i>	387	46
<i>S. feltiae</i>	385	44
<i>S. carpocapsae</i>	388	47
<i>S. monticolum</i>	384	43
<i>S. glaseri</i>	390	49
<i>S. beitlechemi</i>	388	47
<i>S. bicornutum</i>	377	36
<i>S. ceratophorum</i>	377	36
<i>S. hermaphroditum</i>	373	32
<i>S. huense</i>	378	37
<i>S. riobrave</i>	377	36
<i>S. surkhetense</i>	378	37
<i>S. weiseri</i>	375	34
<i>O. chongmingensis</i>	503	41
<i>O. citri</i>	503	42
<i>O. myriophilus</i>	548	62
<i>O. siddiqii</i>	584	88

Délková variabilita intronu se prokázala i u markeru *rEPIC3*, u kterého se délka intronu pohybovala v rozmezí od 32 do 88 bp.

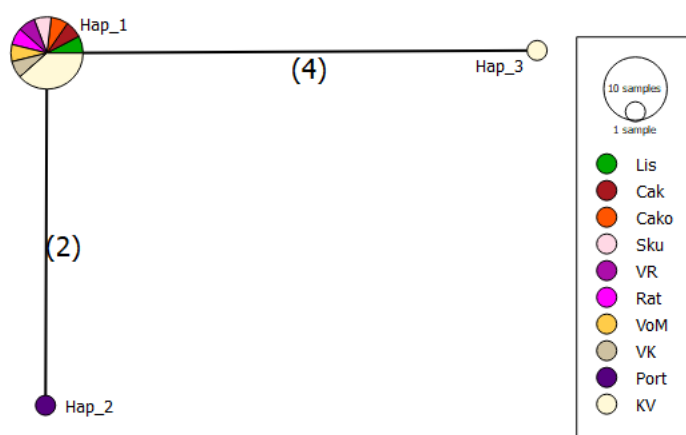
4.2 Vnitrodruhová variabilita *S. affine*

Vnitrodruhová variabilita byla vyhodnocena pouze u populací druhu *Steinernema affine*. Vzhledem k menšímu počtu získaných sekvencí byly provedeny jen předběžné testy IBD a haplotypové sítě. Vyhodnocení vnitrodruhové variability bylo provedeno pro markery *ITS* (11 jedinců z 11 populací), *COI* (27 jedinců z 11 populací), *gEPIC4* (23 jedinců ze 13 populací) a *rEPIC3* (15 jedinců z 10 populací). U těchto markerů byl proveden test hypotézy o izolaci populací na základě geografické vzdálenosti – Mantelův test (Obrázek 8). Mantelův test nevyšel signifikantní pro žádný z markerů. U markeru *ITS* vyšla hodnota signifikance 0,08 a u markeru *rEPIC3* 0,19. Je u nich tedy možná částečná korelace mezi genetickou a geografickou vzdáleností. U markerů *COI* a *gEPIC4* byly hodnoty signifikance 0,3 a 0,86, což neprokazuje korelaci.



Obrázek 8 Grafy korelací mezi genetickými [K2p] a geografickými [km] vzdálenostmi u jednotlivých markerů a) *ITS* – korelační koeficient = 0,429 ($p=0,08$) b) *COI* – korelační koeficient = -0,079 ($p=0,3$) c) *gEPIC4* – korelační koeficient = -0,005 ($p=0,86$) d) *rEPIC3* – korelační koeficient = 0,37 ($p=0,19$)

Na Obrázku 11 se nachází haplotypová síť markeru *rEPIC3*, v níž jsou populace zastoupeny ve 3 haplotypech. Všechny české populace jsou zastoupeny v Haplotypu 1.



Obrázek 11 *rEPIC3* haplotypová síť Steinernema affine

4.3 Mezidruhová variabilita

4.3.1 Vhodnost markerů pro identifikaci druhů

Mezidruhová variabilita byla vyhodnocena z dominantních haplotypů pro markery *ITS* (32 jedinců z 23 druhů), *COI* (29 jedinců z 20 druhů), *ND2* (28 jedinců z 19 druhů), *gEPIC4* (30 jedinců z 19 druhů), *rEPIC1* (15 jedinců z 11 druhů) a *rEPIC3* (29 jedinců z 23 druhů).

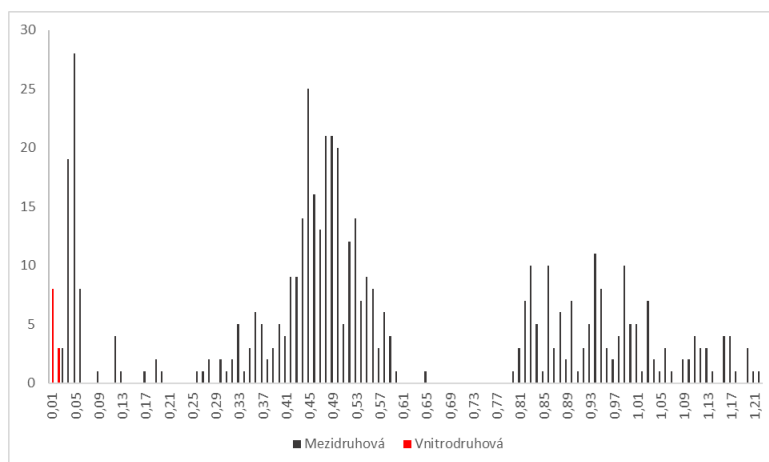
V Tabulce 10 se nachází počet analyzovaných druhů, které byly porovnány s odhadovaným počtem druhů podle webového severu ABGD (nastavení).

Tabulka 10: Počet analyzovaných druhů ve srovnání s odhadovaným počtem podle ABGD u jednotlivých markerů

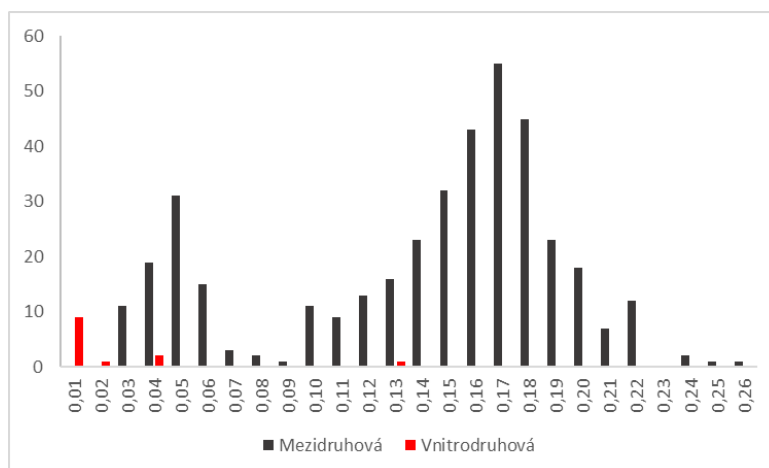
Marker	<i>ITS</i>	<i>COI</i>	<i>ND2</i>	<i>gEPIC4</i>	<i>rEPIC1</i>	<i>rEPIC3</i>
Počet analyzovaných druhů	23	20	19	19	11	23
Odhadovaný počet druhů podle ABGD	12	14	14	20	12	14

Z tabulky je možné vyčíst, že podle ABGD jsou druhy většinou podhodnoceny, s výjimkou markerů *gEPIC4* a *rEPIC1*, kde ABGD rozdělilo o jeden druh navíc oproti skutečnému počtu.

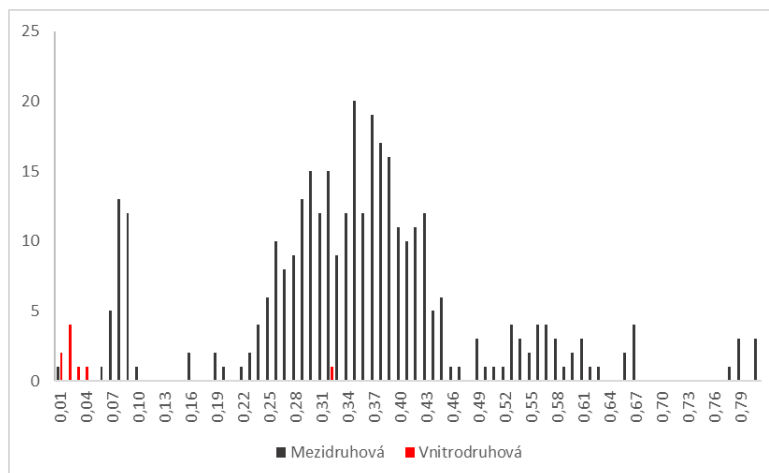
Pomocí programu MEGA 11 byly vytvořeny tabulky vnitrodruhové a mezidruhové variability, ze kterých byly v Excelu sestrojeny histogramy pro jednotlivé markery. Histogramy jsou uvedeny na obrázcích 12-17.



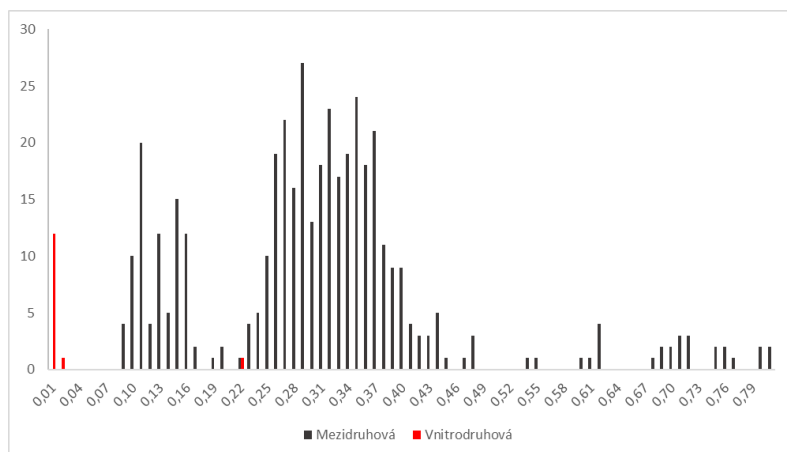
Obrázek 12 Histogram vnitrodruhové a mezidruhové variability u markeru ITS



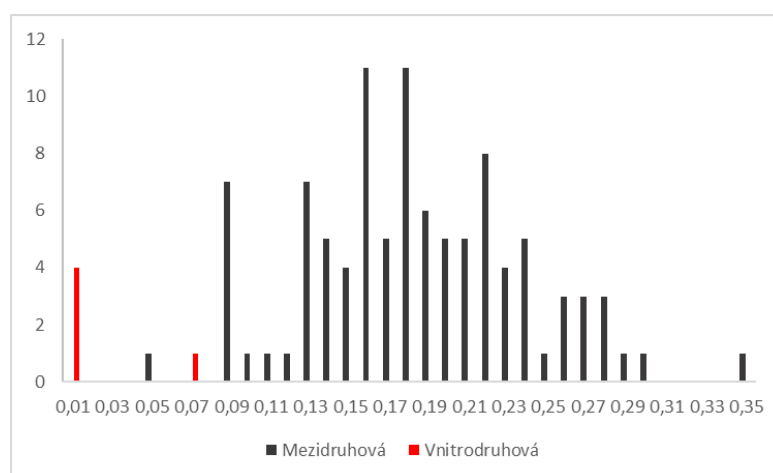
Obrázek 13 Histogram vnitrodruhové a mezidruhové variability u markeru COI



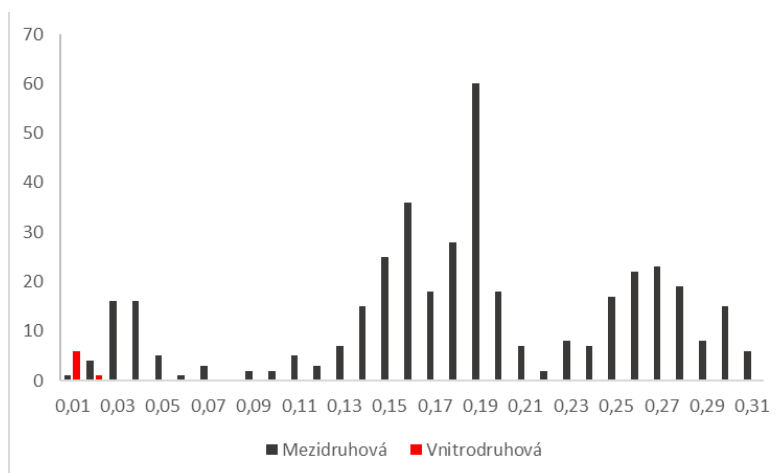
Obrázek 14 Histogram vnitrodruhové a mezidruhové variability u markeru ND2



Obrázek 15 Histogram vnitrodruhové a mezidruhové variability u markeru gEPIC4



Obrázek 16 Histogram vnitrodruhové a mezidruhové variability u markeru rEPIC1



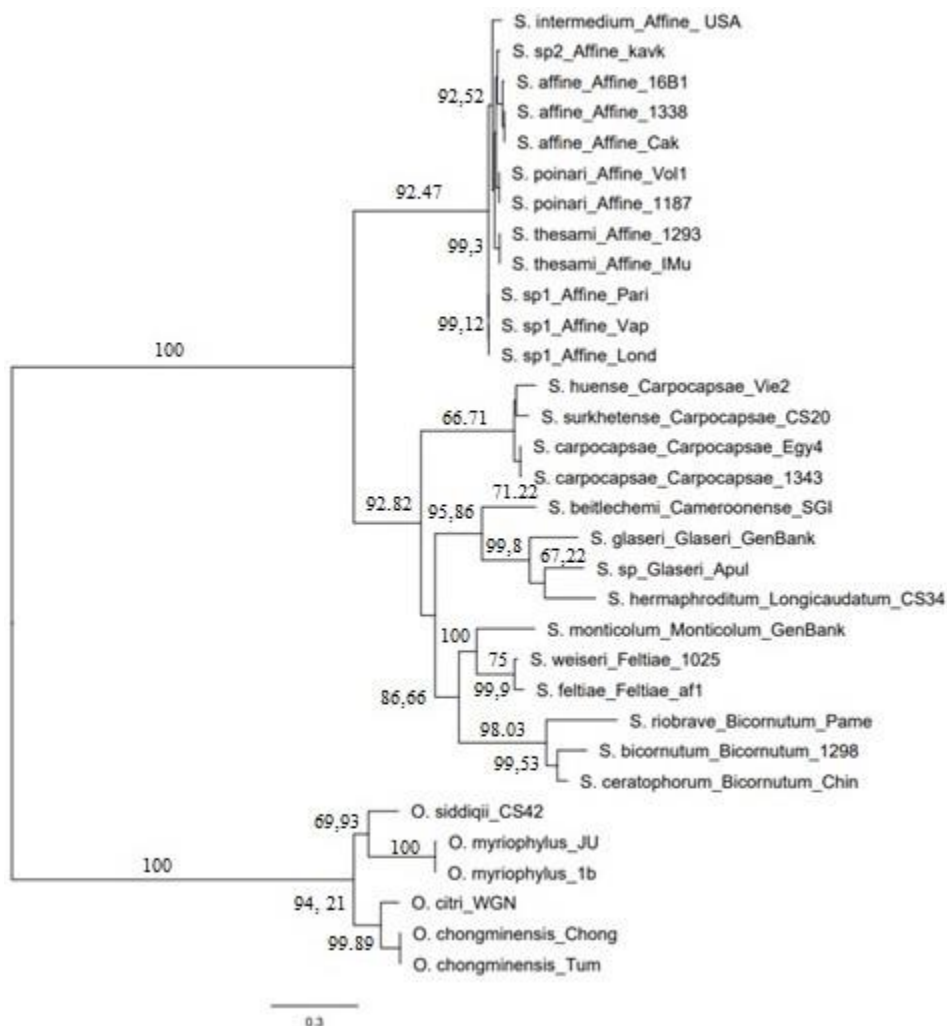
Obrázek 17 Histogram vnitrodruhové a mezidruhové variability u markeru rEPIC3

Z histogramů plyne, že žádný z markerů použitý samostatně neodděluje vnitrodruhovou variabilitu od mezidruhové. Není u nich prokazatelný „barcoding gap“. Marker *ITS* standartně používaný pro druhovou identifikaci se v této analýze nejeví jako ideální, jelikož i u něj se vnitrodruhová a mezidruhová variabilita překrývá.

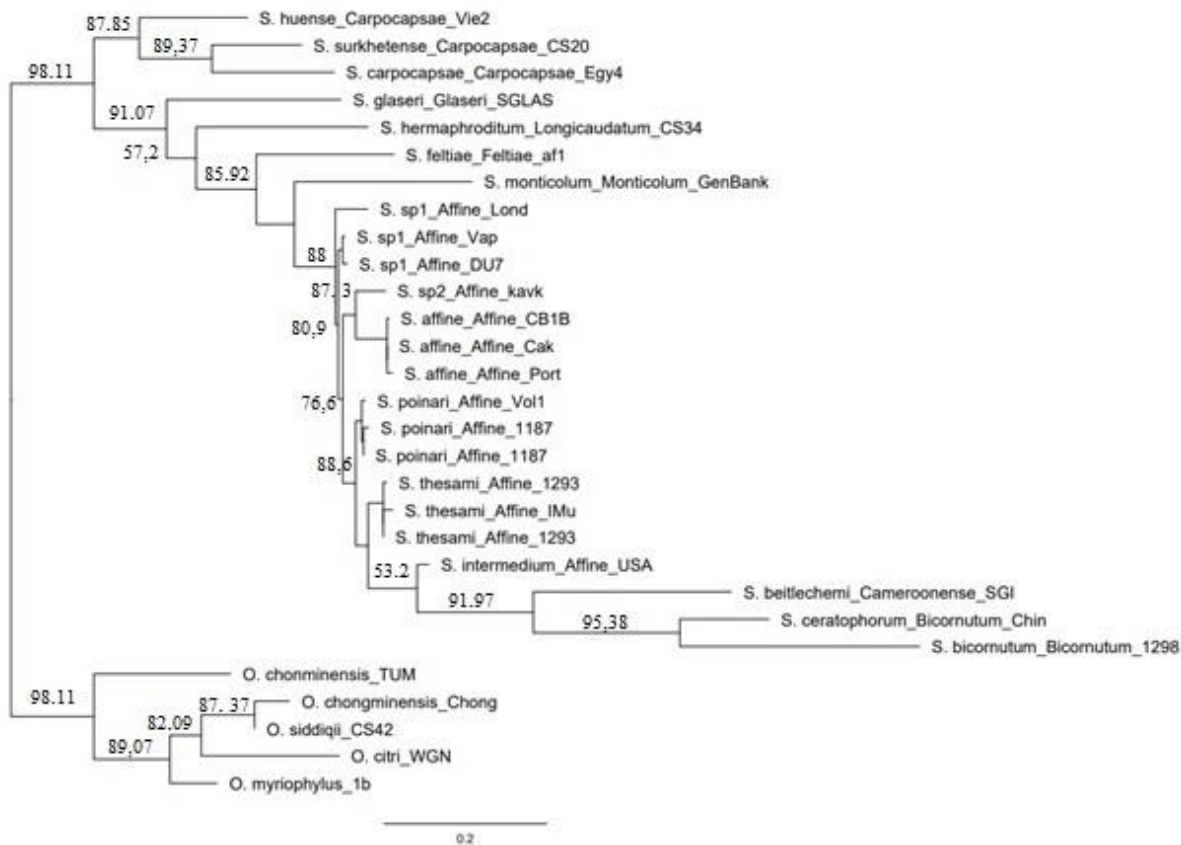
4.3.2 Fylogenetika rodu *Steinernema*

Fylogenetické vztahy vybraných druhů rodu *Steinernema* byly opět vyhodnoceny z dominantních haplotypů pro markery *ITS* (32 jedinců z 23 druhů), *COI* (29 jedinců z 20 druhů), *ND2* (28 jedinců z 19 druhů), *gEPIC4* (30 jedinců z 19 druhů), *rEPIC1* (15 jedinců z 11 druhů) a *rEPIC3* (29 jedinců z 23 druhů).

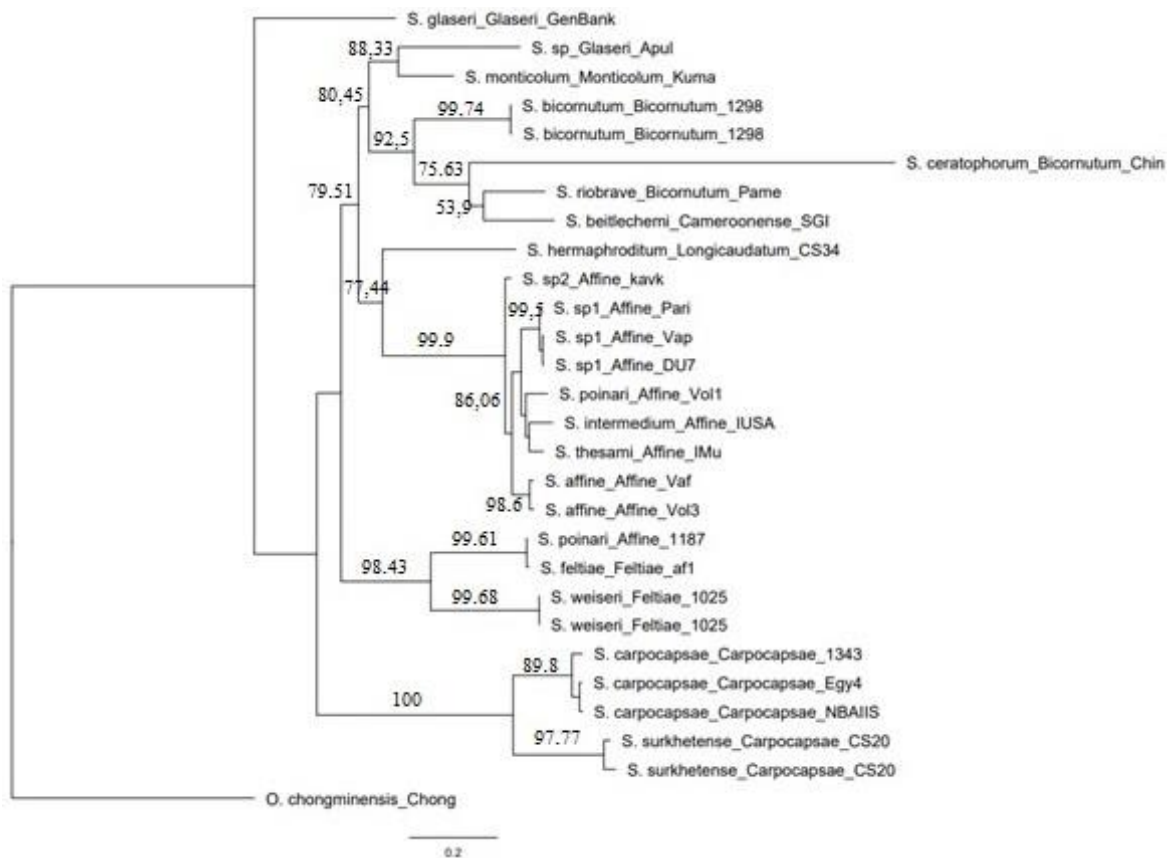
Pomocí webového serveru PhyML byly u těchto markerů vytvořeny fylogenetické stromy (fylogramy). Na obrázcích 18-23 se nachází fylogramy jednotlivých markerů vytvořené z haplotypů daných sekvencí. Tam, kde byla získána sekvence z rodu *Oscheius*, byla tato skupina vybrána jako „outgroup“. U markeru *rEPIC1* byla jako „outgroup“ vybrána *Steinernema hermaphroditum*. Jednotlivé klady byly dle fylogramů zachovány.



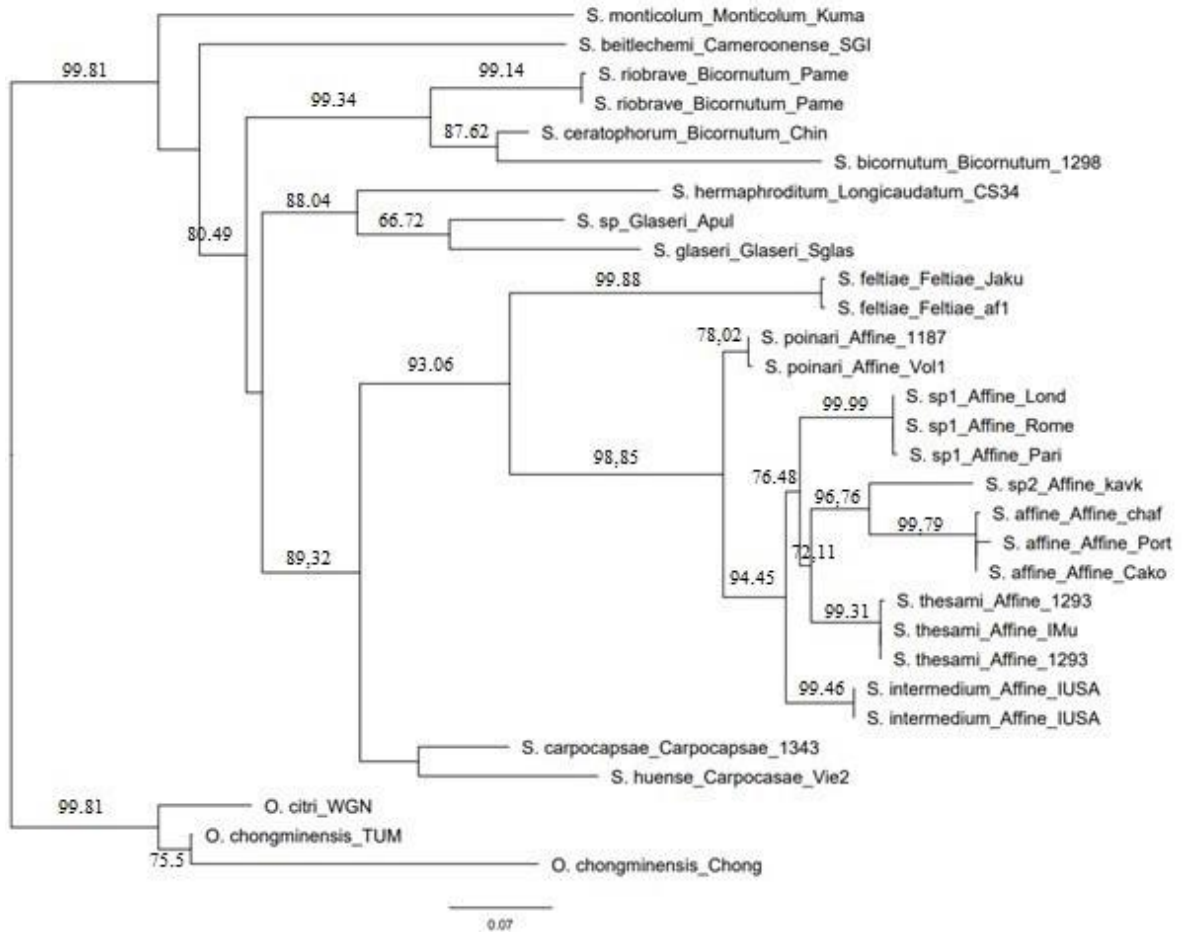
Obrázek 18 Fylogram z haplotypů hliště rodu *Steinernema* na základě markeru *ITS* (Maximum Likelihood, model GTR+G, podpora větví stanovena aLRT-SH testem, zaznamenány pouze hodnoty nad 50), kořen rod *Oscheius*



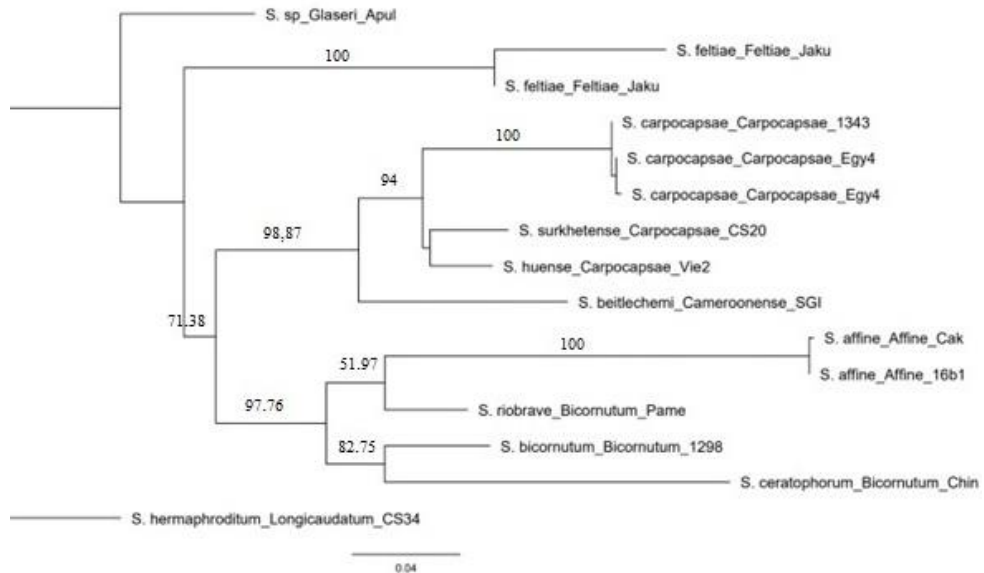
Obrázek 19 Fylogram z haplotypů hliestic rodu *Steinernema* na základě markeru COI (Maximum Likelihood, model HKY85+G+I, podpora větví stanovena aLRT-SH testem, zaznamenány pouze hodnoty nad 50), kořen rod *Oscheius*



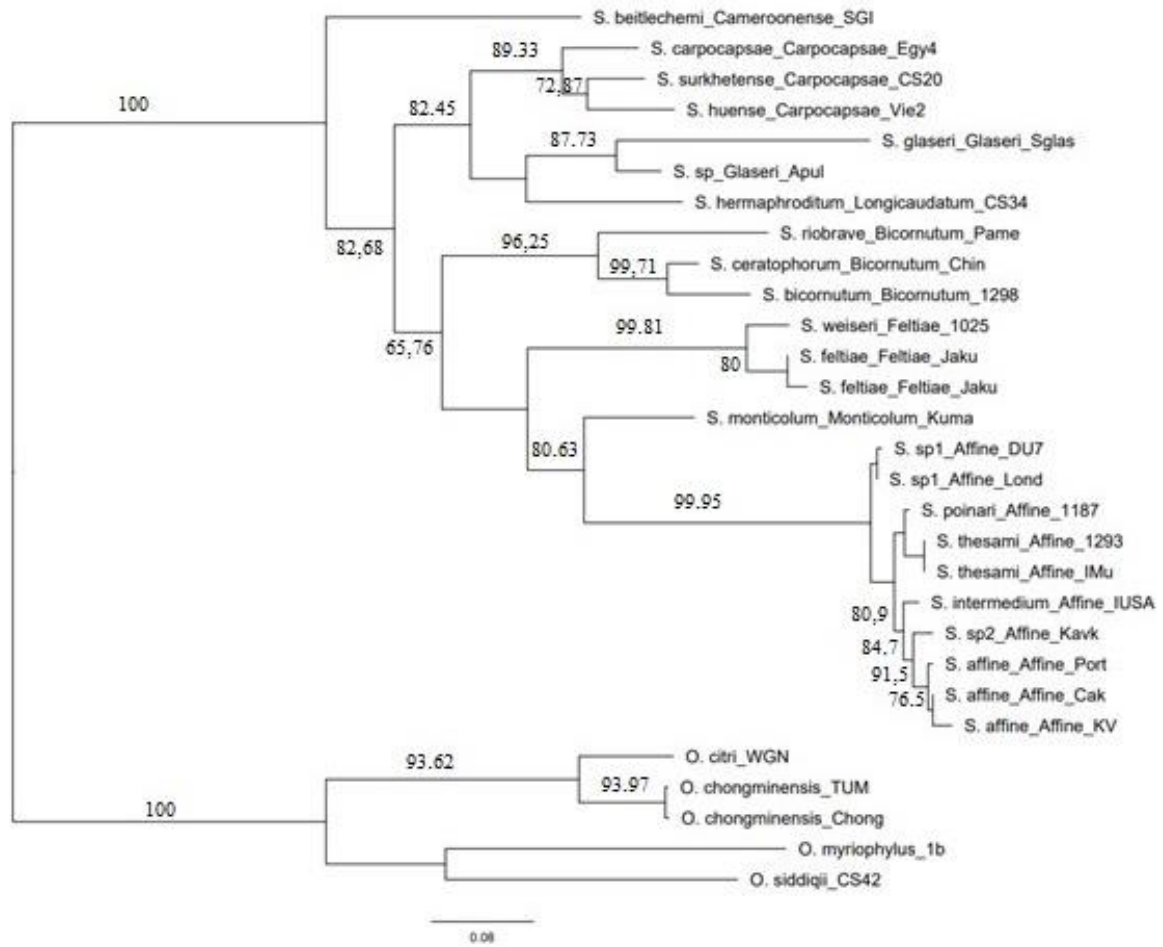
Obrázek 20 Fylogram z haplotypů hliestic rodu *Steinernema* na základě markeru ND2 (Maximum Likelihood, model TN93+G, podpora větví stanovena aLRT-SH testem, zaznamenány pouze hodnoty nad 50), kořen *Oscheius chongminensis*



Obrázek 21 Fylogram z haplotypů hlístic rodu *Steinernema* na základě markeru *gEPIC4* (Maximum Likelihood, model TN93+G, podpora větví stanovena aLRT-SH testem, zaznamenány pouze hodnoty nad 50), kořen rod *Oscieus*

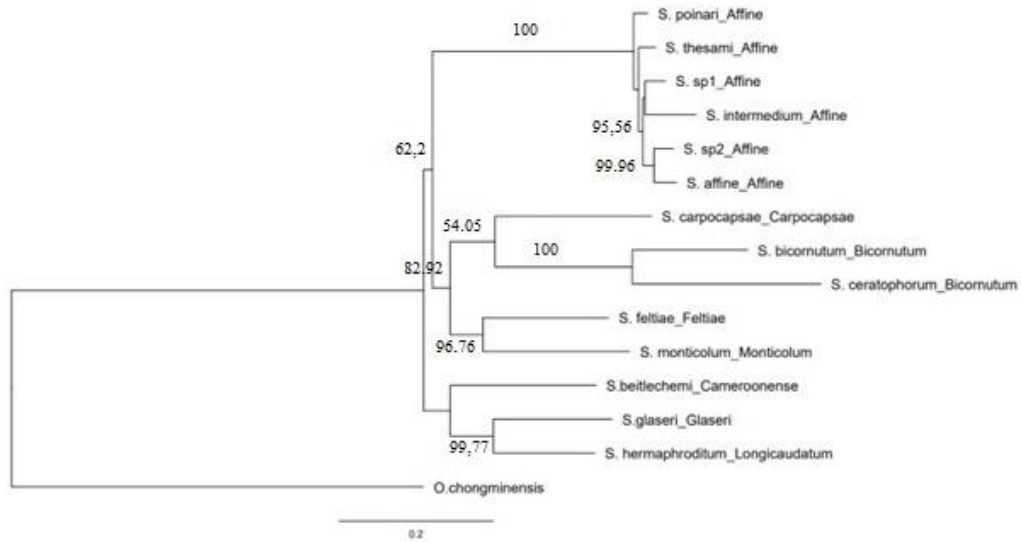


Obrázek 22 Fylogram z haplotypů hlístic rodu *Steinernema* na základě markeru *rEPIC1* (Maximum Likelihood, model GTR+G, podpora větví stanovena aLRT-SH testem, zaznamenány pouze hodnoty nad 50), kořen *S. hermaphroditum*

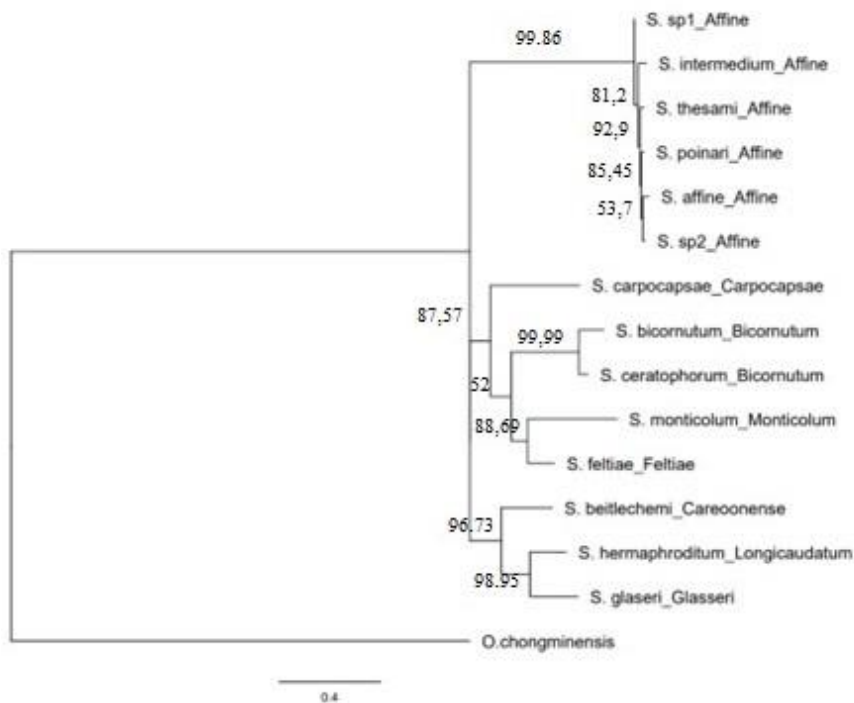


Obrázek 23 Fylogram z haplotypů hliptic rodu *Steinernema* na základě markeru *rEPIC3* (Maximum Likelihood, model $TN93+G+I$, podpora větví stanovena aLRT-SH testem, zaznamenány pouze hodnoty nad 50), kořen rod *Oscheius*

Obrázek 24 obsahuje fylogenetický strom konkatovaný z markerů *COI+ND2+gEPIC4+rEPIC3*. Rozdělení druhů v tomto fylogramu bylo porovnáno s fylogenetickým stromem markeru *ITS* (Obrázek 25). Pro oba tyto stromy byl vybrán soubor patnácti druhů, které byly amplifikovány u všech čtyřech markerů.



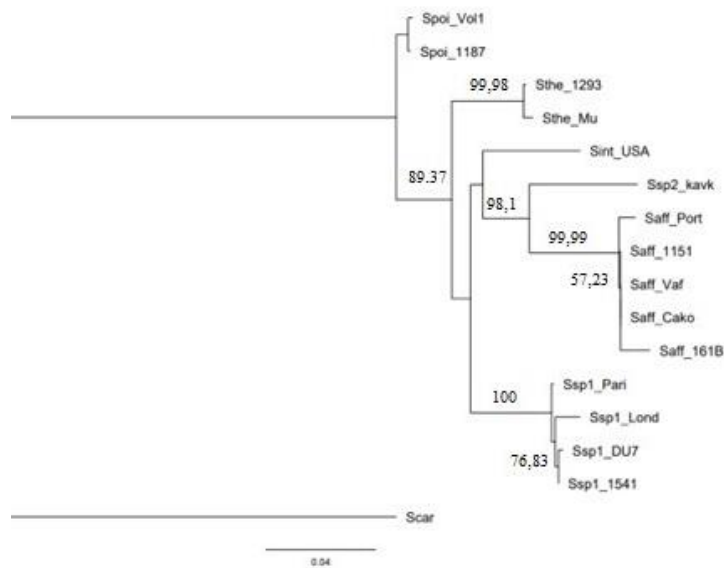
Obrázek 24 Konkatovaný fylogram z 15 druhů hliptic rodu *Steinernema* na základě markerů *COI+ND2+gEPIC4+rEPIC3* (Maximum Likelihood, model GTR+G, podpora větví stanovena aLRT-SH testem, zaznamenány pouze hodnoty nad 50), kořen *Oscheius chongminensis*



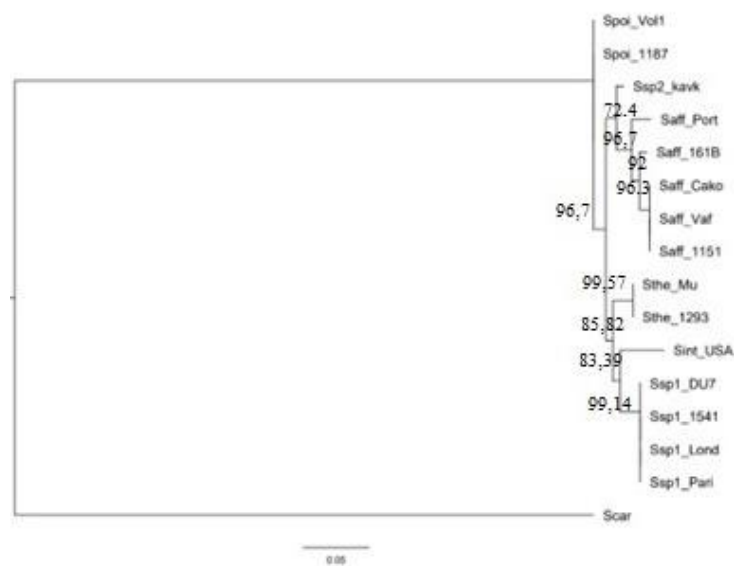
Obrázek 25 Konkatovaný fylogram z 15 druhů hliptic rodu *Steinernema* na základě markerů *COI+ND2+gEPIC4+rEPIC3* (Maximum Likelihood, model GTR+G, podpora větví stanovena aLRT-SH testem, zaznamenány pouze hodnoty nad 50), kořen *Oscheius chongminensis*

4.3.3 Fylogenetika kladu Affine

Na obrázcích 26 a 27 byly porovnány fylogenetické stromy různých druhů kladu Affine. Obrázek 26 obsahuje rozdělení druhů z kladu Affine podle konkatenovaných markerů *COI+gEPIC4+rEPIC3* (16 sekvencí ze 7 populací). Vzhledem k nerovnoměrnému zastoupení získaných sekvencí byly vytvořeny „referenční“ sekvence, tj. do konkatenovaného haplotypu byly spojeny sekvence z různých jedinců daného druhu. Na obrázku 27 je možné vidět jednotlivé rozdělení druhů z kladu Affine podle markeru *ITS* (16 sekvencí ze 7 populací).



Obrázek 26 Fylogram z referenčních populací kladu Affine na základě markerů *COI+gEPIC4+rEPIC3* (Maximum Likelihood, model GTR+G, podpora větví stanovena aLRT-SH testem, zaznamenány pouze hodnoty nad 50), kořen *S. carpocapsae*



Obrázek 27 Fylogram z referenčních populací kladu Affine na základě markeru *ITS* (Maximum Likelihood, model HKY85+G, podpora větví stanovena aLRT-SH testem, zaznamenány pouze hodnoty nad 50), kořen *S. carpocapsae*

5 Diskuze

5.1 Metodika izolace DNA a PCR

Dříve byl pro izolaci využíván extrakční pufr s proteázou K (Cox a Hebert, 2001), avšak komerční kit (DEP-25 Extraction Kit) dosahoval snadnější přípravou stejných výsledků, a tak bylo nadále pracováno s tímto standardizovaným způsobem.

PCR reakce byla připravována standartním způsobem popsaným v metodách. Pro stabilizaci reakce bylo k některým reakcím přidáno činidlo BSA (Bovine Serum Albumine, 20 mg/ml), ani to ovšem neovlivnilo výsledek reakce. Optimalizace PCR pro jednotlivé markery se proto odehrávala především změnami v PCR profilech, a to jednak variacemi teploty a délkou fáze nasedání primerů (annealing).

5.2 Markery

Všechny analyzované markery byly porovnávány s markerem *ITS*, který je standartně používán.

5.2.1 *ITS*

U markeru *ITS* byla úspěšná amplifikace u všech 23 testovaných druhů.

V analýze vnitrodruhové variability sice test izolace vzdáleností nevyšel signifikantní, ovšem vzhledem k nízké hodnotě $p=0,08$, se zde může jednat o částečnou korelaci mezi genetickou a geografickou vzdáleností.

Při porovnání s ostatními markery vykazoval marker *ITS* překvapivě vysokou variabilitu. Z tohoto důvodu je však *ITS* používán pro „DNA barcoding“. To může být podpořeno i tím, že se u markeru *ITS*, jako u jediného z testovaných markerů, na histogramu neprolíná vnitrodruhová variabilita s mezidruhovou a vzniká tak „barcoding gap“. Na fylogenetickém stromu jsou tak přehledně rozděleny jednotlivé druhy do kladů (Spiridonov & Subbotin, 2016).

ITS marker byl poté použit pro porovnání s konkatenovanými fylogenetickými stromy ostatních markerů.

5.2.2 *COI*

U markeru *COI* byly získány sekvence od 20 druhů z celkových 23 testovaných.

Při vyhodnocení vnitrodruhové variability, u markeru *COI* nevyšel signifikantní Mantelův test, tudíž se u něj nedá potvrdit korelace mezi genetickou a geografickou

vzdáleností. Haplotypová síť rozdělila populace do 17 haplotypů. Překvapivě vzdáleny byly i haplotypy populací ze stejného kraje s malou vzdáleností. Populace Port (Portugalsko) měla svůj vlastní haplotyp, i když nepříliš geneticky vzdálený od haplotypu 6, který byl nejvíce zastoupen.

Tento marker není příliš vhodný pro rozlišení druhů, kvůli jeho nízké variabilitě. Byl však použit pro konkatenované fylogenetické stromy. Na histogramu srovnání vnitrodruhové a mezidruhové variability nebyl signifikantní „barcoding gap“. Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita se překrývaly. V posledních letech je pro molekulární charakterizaci některých nových druhů rodu *Steinernema* kromě sekvence *ITS* použita i sekvence *COI* (např. Machado et al., 2022). Databáze však zatím neobsahují dostatek srovnávacích sekvencí od ostatních druhů a populací rodu *Steinernema*. Navíc, jak je zmíněno výše, tato práce ukázala nízkou variabilitu *COI* sekvencí mezi blízce příbuznými druhy.

Na fylogenetickém stromu se jednotlivé druhy rozdělily do kladů podle Spiridonov & Subbotin (2016). *Steinernema monticolum* byla převzata z databáze GenBank, jelikož se jí nepodařilo získat amplifikaci.

5.2.3 ND2

Marker *ND2* byl úspěšný při amplifikaci celkem 19 testovaných druhů.

Pro tento marker nemohla být vyhodnocena vnitrodruhová variabilita, jelikož z něj nebyl získán dostatečný počet sekvencí druhu *Steinernema affine*.

Při vyhodnocení mezidruhové variability vykazoval marker *ND2* průměrně vysokou variabilitu ve srovnání s ostatními analyzovanými markery. U tohoto markeru se také na histogramu překrývala vnitrodruhová variabilita s mezidruhovou.

Na fylogenetickém stromu se druhy rozdělily do jednotlivých kladů (Spiridonov & Subbotin, 2016), kromě druhu *S. poinari*, u kterého došlo pravděpodobně k záměně sekvence a nejspíše se také jedná o *S. feltiae*, ke které se tato sekvence připojila. Marker *ND2* byl také použit do konkatenovaného fylogenetického stromu metodou MLST.

5.2.4 EPIC

Tato práce byla pilotní studií, která testovala možné využití EPIC markerů u rodu *Steinernema*. Z celkového počtu deseti EPIC markerů se jeví úspěšné tři (*gEPIC4*, *rEPIC1* a *rEPIC3*). U ostatních sedmi se podařila amplifikace maximálně u pěti druhů z rodu *Steinernema*. Amplifikace nebyla úspěšná u všech druhů nejspíše proto, že byly markery

navrhovány jen z druhů nejpříbuznějších *S. affine*, takže primery nemusí optimálně nasedat. Cesta k úspěšné amplifikaci by zahrnovala delší optimalizaci, nebo pro problematické druhy navržení alternativních primerů.

Všechny testované EPIC markery obsahovaly 1-2 introny o různých délkách. U různých druhů je pak prokazatelná variabilita v presenci i absenci intronu, v délce intronu i nukleotidová.

Z markeru *gEPIC4* bylo celkem amplifikováno 19 druhů. Při analýze vnitrodruhové variability Mantelův test neprokázal korelaci genetické a geografické vzdálenosti. Haplotypová síť rozdělila jednotlivé populace do pěti haplotypů, přičemž nejvíce zastoupený je Haplotyp 2. Překvapivě vzdálený je Haplotyp 1, který byl určen pro populaci Zich (Žíchovec), která pochází, jako většina ostatních populací, z Jižních Čech. Při mezidruhovém srovnání se na histogramu opět překrývá vnitrodruhová variabilita s mezidruhovou. Fylogenetický strom roztřídil jednotlivé druhy do kladů (Spiridonov & Subbotin, 2016). Marker *gEPIC4* byl také použit do konkatenovaného fylogenetického stromu.

Pro marker *rEPIC1* byly celkem získány sekvence od 12 druhů. Jelikož se u něj nepodařilo amplifikovat dostatečný počet sekvencí z druhu *Steinernema affine*, nemohla u něj být analyzována vnitrodruhová variabilita. V mezidruhovém porovnání se na histogramu opět prolínala vnitrodruhová variabilita s mezidruhovou. Pro tento marker nebyly získány sekvence rodu *Oscheius*, byla proto na fylogenetickém stromu vybrána jako „outgroup“ *Steinernema beitlechemi*. Ostatní druhy se na stromu rozdělily do jednotlivých kladů (Spiridonov & Subbotin, 2016).

U markeru *rEPIC3* byly získány sekvence ze všech zkoumaných druhů. Z markerů EPIC byl tedy mezidruhově nejúspěšnější. U analýzy vnitrodruhové variability vyšla u Mantelova testu hodnota signifikance $p=0,19$, což by mohlo poukazovat na částečnou korelaci mezi genetickou a geografickou vzdáleností. V Haplotypové síti jsou jednotlivé populace zastoupeny ve třech haplotypech, z nichž je nejvíce zastoupen Haplotyp 1. Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita se na histogramu neoddělila ani u markeru *rEPIC3*. Jednotlivé druhy se ale na fylogenetickém stromu rozdělily do kladů podle Spiridonov & Subbotin (2016). Tento marker byl také použit do konkatenovaného fylogenetického stromu.

5.3 Využití nových markerů pro fylogenetiku a systematiku skupiny

Systematika i fylogenetika rodu *Steinernema* byla založena především na markeru *ITS*. Ten však neřeší všechny otázky, a tak je potřebné užití alternativních markerů. Konkatenováním více markerů je možné docílit podpory signifikantnosti při druhové identifikaci.

Nejprve byl konkatenován fylogram patnácti druhů, jenž byly amplifikovány u markerů *COI+ND2+gEPIC4+rEPIC3*. Tento strom byl porovnán s fylogramem markeru *ITS* ze stejných patnácti druhů. Oba stromy rozdělily jednotlivé druhy do kladů podle Spiridonov & Subbotin (2016).

Druhý konkatenovaný strom obsahoval pouze markery *COI+gEPIC4+rEPIC3*, u kterých byl amplifikován dostatečný počet populací kladu *Affine*. Tento strom se již však lišil od fylogenetického stromu markeru *ITS* z kladu *Affine*. Konkatenovaný strom totiž vytvořil oddělené klastry pro druhy *S.sp1* a *S.sp2*. Existence těchto dvou druhů byla naznačena analýzami sekvencí *ITS* (Půža, ústní sdělení). Nové EPIC markery tak jednoznačně podporují vymezení těchto dvou druhů. Nové EPIC markery mají velký význam pro systematiku skupiny, jelikož umožňují přesnější delimitaci druhu. Jak bylo zmíněno výše, molekulární delimitace druhu u *Steinernema* je doposud založena pouze na sekvenci *ITS* a status některých taxonů byl tak nejasný.

Nové EPIC markery zlepšují i porozumění fylogenetickým vztahům mezi blízkými příbuznými druhy rodu *Steinernema*. Tyto markery tak mohou být dále využity ke studiu kofylogeneze mezi hlísticemi rodu *Steinernema* a jejich bakteriálními symbionty rodu *Xenorhabdus*. Doposud provedené studie pracovaly pouze s markery *ITS* a 28S rDNA (např. Lee & Stock, 2010; Bhat et al. 2019) které nejsou dost variabilní pro studium vztahů blízkých příbuzných druhů.

Tato práce navazuje na studie předchozích kolegů v laboratoři – Lucie Faktorové (Faktorová, 2014), která studovala vhodnost mitochondriálních markerů u rodu *Steinernema*, a Jana Hartmanna (Hartmann, 2017), který studoval mikrosatelity u *Steinernema affine*. Mikrosatelity jsou tandemově se opakující sekvence, které se ovšem prokázaly jako nevhodné, kvůli špatné amplifikaci a vyššímu výskytu nulových alel a nízkým předpokladům pro použití napříč druhy.

Studie Dhakal et al. (2020) úspěšně amplifikovala EPIC markery u rodu *Heterorhabditis*. Ovšem na základě získaných sekvencí vyhodnotila pouze variabilitu markerů, ale již neuvedli význam pro fylogenetiku daného rodu.

Studium EPIC markerů se u rodu *Steinernema* zatím jeví nadějně. Na rozdíl od studie Rolston et al. (2009), který testoval pouze jeden EPIC marker, se nám podařilo najít pravděpodobné kandidáty pro druhovou identifikaci. Naše markery nevykazují dostatečnou variabilitu pro studium populační genetiky, ale mají velký potenciál pro systematiku a fylogenetiku skupiny. Výsledky této práce naznačují, že nové EPIC markery lze amplifikovat i u hlístic rodu *Oscheius* a jejich potenciál bude patrně širší.

6 Závěr

Výsledkem pilotní studie použití EPIC markerů u rodu *Steinernema*, bylo navržení pěti ribosomálních a pěti genomových EPIC markerů. Po jejich testování je možné říct, že u všech proběhla úspěšná amplifikace. Nejvíce nadějně se jeví markery *gEPIC4*, *rEPIC1* a *rEPIC3*, u kterých byla amplifikace úspěšná i na širším spektru druhů. Analyzované markery rozdělily testované druhy, ale ještě specifičtěji fungují jako konkatenované pomocí metody MLST. Konkatenovaný marker oddělil i dva nové druhy – *S.sp1* a *S.sp2*. Nové EPIC markery mají velký potenciál pro studium systematiky a fylogenetických vztahů u hlístic rodu *Steinernema* a potažmo dalších skupin hlístic.

7 Seznam literatury

Adams, B. J., Fodor, A., Koppenhöfer, H. S., Stackebrandt, E., Patricia Stock, S., & Klein, M. G. (2006). Reprint of “Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens”. *Biological Control*, 38(1), 4–21. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(06\)00126-5](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(06)00126-5)

Adams B.J., Nguyen K.B. (2002). Taxonomy and systematics. In: Gaugler, R., Kaya, H.K., (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in Biol. Control. CRC Press, Boca Raton, Florida*, pp. 357–372

Askary, Tarique. (2010). Nematodes as Biocontrol Agents. 10.1007/978-90-481-3333-8_13

Avise J.C. (2004). Molecular markers, natural history and evolution. *Sinauer, Sunderland, MA*. (684 pp.)

Bandelt, H. J., Forster, P. and Röhl, A. (1999) ‘Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies’, *Molecular biology and evolution*, 16(1), pp. 37–48. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036.

Banerjee, N., & Hallem, E. A. (2020). The role of carbon dioxide in nematode behaviour and physiology. *Parasitology*, 147(8), 841–854. <https://doi.org/10.1017/S0031182019001422>

Behere, G.T., Tay, W.T., Russell, D.A., Kranthi, K.R. and Batterham, P. (2013) Population genetic structure of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hubner) (*Lepidoptera: Noctuidae*) in India as inferred from EPIC-PCR DNA markers. *PLoS ONE*, 8(1), e53448.

Bhadury, P., Austen, M. C., Bilton, D. T., Lamshead, P. J. D., Rogers, A. D., & Smerdon, G. R. (2006). Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. *Marine Ecology Progress Series*, 320, 1–9. <https://doi.org/10.3354/meps320001>

Bhat, A.H., Chaubey, A.K., & Půža, V. (2019). The first report of *Xenorhabdus indica* from *Steinernema pakistanense*: co-phylogenetic study suggests co-speciation between *X. indica* and its steinernematid nematodes. *Journal of Helminthology*, 93(1), 81-90.

Boemare, N. E., Akhurst, R. J., & Mourant, R. G. (1993). DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(2), 249-255.

Bongers a Ferris, (1999). Curtis a Sloan, 2004; Curtis a kol., 2002; Rappe a Giovannoni, 2003; Torsvik et al., 2002. Reprint of „Biodiversity and systematice of nematode-bacterium entomopathogens“ *Biol. Control* 37 (2006), 32-49

Brown, W. M., (1985). The Mitochondrial Genome of Animals. *Molecular Evolutionary Genetics*, 95-130

Caterino M. S., Cho S., Sperling F. A. H., (2000). The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of Babel. *Annu. Rev. Entomol.*, 45, 1-54

Clary, D. O., Wolstenholme, D.R. (1985). The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nukleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, Vol. 22, No. 3, s. 252-271

Cox A. J., Hebert P. D. N. (2001). Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in freshwater crustacean, *Molecular Ecology* 10, 371-386.

Dhakal, M., Nguyen, K. B., Hunt, D. J., Ehlers, R. U., Spiridonov, S. E., & Subbotin, S. A. (2020). Molecular identification, phylogeny and phylogeography of the entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* Poinar, 1976: A multigene approach. *Nematology*, 23(4), 451–466. <https://doi.org/10.1163/15685411-bja10052>

Dillman AR, Chaston JM, Adams BJ, Ciche TA, Goodrich-Blair H, et al. (2012). An Entomopathogenic Nematode by Any Other Name. *PLOS Pathogens* 8(3): e1002527. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002527>

Douglas, L. J., Haymer, D. S., (2001). Ribosomal *ITS1* polymorphisms in *Ceratitits capitata* and *Ceratitits rosa* (Diptera: Tephritidae). *Entomological Society of America*, 94, 726-731

Endersby, N.M., Hoffmann, A.A., White, V.L., Lowenstein, S., Ritchie, S., Johnson, P.H., Rapley, L.P., Ryan, P.A., Nam, V.S., Yen, N.T., Kittiyapong, P. and Weeks, A.R. (2009) Genetic structure of *Aedes aegypti* in Australia and Vietnam revealed

by microsatellite and Exon-Primed Intron-Crossing markers suggests feasibility of local control options. *Journal of Medical Entomology*, 46, 1074–1083.

Endersby, N.M., Hoffmann, A.A., White, V.L., Ritchie, S.A., Johnson, P.H. and Weeks, A.R. (2011) Changes in the genetic structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations in Queensland, Australia, across two seasons: Implications for potential mosquito releases. *Journal of Medical Entomology*, 48, 999–1007.

Ersts, P. J. (2006) Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). Available at: https://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg/ (Accessed: 7 March 2023)

Faktorová, L. (2014). Molekulární markery pro druhovou identifikaci entomopatogenních hlístic (Nematoda: Steinernematidae). Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Přírodovědecká fakulta

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

Georgis R., Koppenhöfer A.M., Lacey L. A., Bélair G., Duncan L. W., Grewal P. S., Samish M., Tan L., Torr P., van Tol R. W. H. M. (2006). Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biological control* 32, 203-123.

Gostel, M.R. and Weeks, A. (2014) Development of novel, Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC) markers from EST databases and evaluation of their phylogenetic utility in Commiphora (Burseraceae). *Applications in Plant Sciences*, 2(4), e1300098.

Griffin C. T., Boemare N. E., Lewis E. E. (2005). Biology and behaviour. In: Grewal P. S., Ehlers R.-U., Shapiro-Ilan D. I. Nematodes as biocontrol agents. *CABI Publishing, US*. 47-64.

Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. (2010) "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." *Systematic Biology*, 59(3):307-21.

Hartmann, J. (2017). Genetická variabilita přírodních populací entomopatogenní hlístice *Steinernema affine* (Steinernematidae) v zemědělské krajině. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Přírodovědecká fakulta

Chaston J.M., Suen G., Tucker S. L., Andersen A. W., Bhasin A., et al. (2011). The Entomopathogenic Bacterial Endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Convergent Lifestyles from Divergent Genomes. *PLoS ONE* 6

Chow, S., Yanagimoto, T. & Nakamura, (2015) Y. Universal primers for exon-priming intron-crossing (EPIC) PCR on ribosomal protein genes in marine animals. *Int Aquat Res* 7, 245–250. <https://doi.org/10.1007/s40071-015-0109-7>

Jarošová, A., Půža, V., & Žurovcová, M. (2016). The complete mitochondrial genome of the facultative entomopathogenic nematode *Oscheius chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *Mitochondrial DNA*, 27(5), 3109–3110. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1007288>

Jelínek, J., Zicháček, V. (2014). *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 11. vydání, 102 - 104. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, ISBN 80-7182-159-4.

Koppenhöfer A. M., Fuzy E. M. (2007). Soil moisture effects on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *S. glaseri*, *Heterorhabditis zelandica*, and *H. bacteriophora*. *Applied Soil Ecology* 35, 128-139.

Lacey L. A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D. I., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M. S. (2015). Insect pathogens as biocontrol agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132, 1-41.

Lee, M.M. & Stock, S.P. (2010). A multilocus approach to assessing co-evolutionary relationships between *Steinernema* spp. (Nematoda: Steinernematidae) and their bacterial symbionts *Xenorhabdus* spp. (γ -Proteobacteria: Enterobacteriaceae). *Systematic parasitology*. 77. 1-12.

Lefort, V., Longueville, J.E., Gascuel, O. (2017). SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution*, msx149.

Leigh, J. and Bryant, D. (2015) ‘PopART: Full-Feature Software for Haplotype Network Construction’, *Methods in Ecology and Evolution*, 6. doi: 10.1111/2041-210X.12410.

Liu, J., Berry, R.E. & Moldenke, A.F. (1997). Phylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditidae* and *Steinernematidae*) inferred from partial 18S rRNA gene sequences. *Journal of Invertebrate Pathology* 69, 246-252.

Lohse, K., Sharanowski, B., Blaxter, M., Nicholls, J.A. and Stone, G.N. (2011) Developing EPIC markers for chalcidoid Hymenoptera from EST and genomic data. *Molecular Ecology Resources*, 11, 521–529.

Loxdale, H. D. & Lushai, G., (1998). Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 88, 577-600

Machado, R. A. R., Bhat, A. H., Abolafia, J., Shokoohi, E., Fallet, P., Turlings, T. C. J., Tarasco, E., Půža, V., Kajuga, J., Yan, X., & Toepfer, S. (2022). *Steinernema Africanum* n. Sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a New Entomopathogenic Nematode Species Isolated in the Republic of Rwanda. *Journal of nematology*, 54(1), 20220049. <https://doi.org/10.2478/jofnem-2022-0049>

Meyer, C.P, Paulay, G. (2005) DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol* 3(12): e422

Mráček Z., Bečvář S., Kindlmann P., Jersáková J. (2005). Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic. *Biological Control* 34, 27-37.

Nermuť J., Půža V., Mráček Z. (2012). Entomopatogenní a moluskoparazitické hlístice – neviditelní půdní zabijáci. *Živa* 1, 10-13.

Nguyen, K.B., Maruniak, J., Adams, B.J. (2001). Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. *J. Nematol.* 33, 73–82

Nguyen, K.B. & Duncan, L.W. (2002). *Steinernema diaprepesi* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the citrus root weevil *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Nematology* 34, 159-170.

Palumbi, S.R. and Baker, C.S. (1994). Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution*, 11, 426–435

Palumbi, S. (1996) Nucleic Acids II: Polymerase Chain Reaction. In: Hillis D, Moritz C, Mable B, editors. *Molecular Systematics*. 2nd ed. *Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.* pp. 205-247

Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.

Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. and Achaz, G. (2011) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation, *Mol Ecol*.

Půža V., Mráček Z. (2007). Natural population dynamics of entomopathogenic nematode *Steinernema affine* (*Steinernematidae*) under dry conditions: Possible nematode perzistence within host cadavers? *Journal of invertebrae Pathology* 96, 89 -92.

Rambaut, A. (2009) ‘FigTree v1.4.4’, *Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology*.

Rašková, M. (2015). Použití mikrosatelitních markerů u populací entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema*. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Přírodovědecká fakulta

Redlands, C. E. S. R. I. (2011). *ArcGIS Desktop: Release 10*.

Regeai, S. O., Dolan, K. M., Fitzpatrick, D. A., Browne, J. A., Jones, J. T., & Burnell, A. M. (2009). Novel primers for the amplification of nuclear DNA introns in the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and their cross-amplification in seven other *Heterorhabditis* species. *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 421–424. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02431.x>

Rolland, J., Bonhomme, F., Lagardere, F., Hassan, M. and Guinand, B. (2007) Population structure of the common sole (*Solea solea*) in the northeastern Atlantic and the Mediterranean sea: revisiting the divide with EPIC markers. *Marine Biology*, 151, 327–341.

Rolston, A., Meade, C., Boyle, S., Kakouli-Duarte, T., & Downes, M. (2009). Intraspecific variation among isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* from Bull Island, Ireland. *Nematology*, 11(3), 439–451. <https://doi.org/10.1163/156854109X447015>

Rozas, J. et al. (2017) ‘DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets.’, *Molecular biology and evolution*, 34(12), pp. 3299–3302. doi: 10.1093/molbev/msx248.

Slade, R.W., Moritz, C., Heideman, A. and Hale, P.T. (1993). Rapid assessment of single-copy nuclear DNA variation in diverse species. *Molecular Ecology*, 2, 359–373.

Spiridonov, S. E. & Subbotin, S. A. (2016) Phylogeny and phylogeography of *Heterorhabditis* and *Steinernema*, in *Nematology Monographs & Perspectives*, Vol. 12, 413-427

Stock, S. P., Campbell, J. F., & Nadler, S. A. (2001). Phylogeny of *Steinernema travassos*, 1927 (*Cephalobina: Steinernematidae*) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*, 87(4), 877–889. <https://doi.org/10.2307/3285148>

Stock, P. (2002), A. New Trends in Entomopathogenic Nematode Systematics: Impact of Molecular Biology and Phylogenetic Reconstruction. *Proceedings of the International Conference on Parasitology*, 1–8.

Stock, S.P. (2002), B. Glossary of terms used in insect nematology. *The Society of Nematology News letter 2002*, Issue No. 3, p. 17.

Stock, S.P. (2015). Diversity, Biology and Evolutionary Relationships. In: Campos-Herrera, R. (eds) *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests. Sustainability in Plant and Crop Protection*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-18266-7_1

Ströher, P.R., Li, C. and Pie, M.R. (2013) Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC) markers as a tool for ant phylogeography. *Revista Brasileira de Entomologia*, 57(4), 427–430.

Stuart, R. J., Barbercheck, M. E., & Grewal, P. S. (2015). Entomopathogenic nematodes in the soil environment: Distributions, interactions and the influence of biotic and abiotic factors. In *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection* (pp. 97-137). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-18266-7_4

Szalanski, A.P., Taylor, D.B. & Mullin, P.G. (2000). Assessing nuclear and mitochondrial DNA sequence variation within *Steinernema* (*Rhabditida: Steinernematidae*). *Journal of Nematology* 32, 229-233.

Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027

Technelysium Pty Ltd (2018) <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>

Toušková H., Žurovcová M., Půža V. (2022) Search for new genetic markers for evolutionary genetics of EPN *Steinernema*. 18th meeting of the IOBC/WPRS working group Microbial and nematode control of invertebrate pests: Microbial control agents in the age of global change. České Budějovice, Czech Republic 19-22 June

Vrain, T.C., Wakarchuk, D.A., Levesque, A.C. and Hamilton, R.I. (1992) Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphisms in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology* 15, 563–574.

White, V. L., Endersby, N. M., Chan, J., Hoffmann, A. A., & Weeks, A. R. (2015). Developing Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC) markers for population genetic studies in three *Aedes* disease vectors. *Insect Science*, 22(3), 409–423. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12145>

Wilson, J. J., Sing, K. W., & Jaturas, N. (2019). DNA barcoding: Bioinformatics workflows for beginners. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*, 1–3, 985–995. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20468-8>

Zhao, Y., Zhang, W. Y., Wang, R. L., & Niu, D. L. (2020). Divergent domains of 28S ribosomal RNA gene: DNA barcodes for molecular classification and identification of mites. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04124-z>

Internetové zdroje:

<https://genome.cshlp.org/>

Příloha 1: Podrobná tabulka získaných sekvencí

Druh	Populace	ITS	COI	gEPIC4	rEPIC3	ND2	rEPIC1	gEPIC1	gEPIC2	gEPIC3	gEPIC5	rEPIC2	rEPIC4	rEPIC5
<i>S. affine</i>	1127 (01)			✓										
<i>S. affine</i>	1151 (01)	✓	✓		✓									
	1151 (02)			✓										
<i>S. affine</i>	1309 (01)		✓											
	1309 (02)		✓											
	1309 (03)		✓											
<i>S. affine</i>	1338 (01)	✓												
	1338 (02)			✓										
	1338 (03)			✓										
<i>S. affine</i>	Cak01 (01)	✓												
	Cak01 (02)		✓		✓									✓
	Cak01 (03)		✓				✓	✓				✓		
	Cak01 (04)		✓											
<i>S. affine</i>	Cako01 (01)	✓	✓		✓									
	Cako01 (02)			✓										
	Cako01 (03)			✓										
<i>S. affine</i>	CB1B (01)		✓		✓		✓							
	CB1B (02)		✓											
	CB1B (03)		✓											
<i>S. affine</i>	Hos2 (01)	✓												
	Hos2 (02)			✓										
	Hos2 (03)			✓										
<i>S. affine</i>	Ch.af (01)			✓										
	Ch.af (02)			✓										
<i>S. affine</i>	Kf7 (01)			✓										
	Kf7 (02)			✓										
<i>S. affine</i>	MB3E (01)			✓										
	MB3E (02)			✓										
	MB3E (03)			✓										
<i>S. affine</i>	V. af. (01)	✓			✓	✓								
	V. af. (02)		✓	✓										
	V. af. (03)			✓										
	V. af. (04)			✓										
<i>S. affine</i>	16B1 (01)	✓												
	16B1 (02)		✓	✓	✓		✓					✓		
	16B1 (03)		✓											
	16B1 (04)		✓											
<i>S. affine</i>	af19 (01)	✓	✓											
	af19 (02)			✓										
<i>S. affine</i>	vol2 (01)	✓												
	vol2 (02)				✓									
<i>S. affine</i>	vol3 (01)	✓												
	vol3 (02)			✓	✓	✓								
<i>S. affine</i>	2B PORT (01)	✓	✓		✓									
	2B PORT (02)			✓										
	2B PORT (03)			✓										
<i>S. affine</i>	KV (01)		✓		✓									
	KV (02)		✓		✓									
	KV (03)		✓											
	KV (04)		✓		✓									
	KV (05)		✓											
	KV (06)		✓		✓									
	KV (07)		✓											
	KV (08)		✓		✓									
	KV (09)				✓									
	KV (10)				✓									
<i>S. affine</i>	VM (01)		✓											
	VM (02)		✓											
<i>S. sp. 1</i>	Londres (01)	✓			✓	✓								
	Londres (02)	✓				✓								
	Londres (03)	✓												
	Londres (04)		✓	✓										
	Londres (05)			✓										
	Londres (06)			✓										
<i>S. sp. 1</i>	Paris4 (01)	✓				✓								
	Paris4 (02)		✓		✓									
	Paris4 (03)		✓											
	Paris4 (04)			✓										
	Paris4 (05)			✓										
	Paris4 (06)			✓										
<i>S. sp. 1</i>	Rome (01)	✓		✓	✓	✓								
<i>S. sp. 1</i>	1541 (01)	✓	✓		✓									
	1541 (02)			✓										
	1541 (03)			✓										
	1541 (04)			✓		✓								
<i>S. sp. 1</i>	DU7 (01)	✓	✓	✓										
	DU7 (02)				✓									
	DU7 (03)					✓								
<i>S. sp. 1</i>	Váp (01)	✓	✓		✓	✓								
	Váp (02)			✓										
	Váp (03)			✓										

<i>S. sp. 2</i>	Kavk (01)	✓	✓	✓	✓	✓													
	Kavk (02)	✓																	
<i>S. sp.</i>	Apul (01)	✓																	
	Apul (02)			✓	✓	✓	✓												
	Apul (03)			✓	✓	✓	✓												
<i>S. intermedium</i>	I. USA (01)	✓	✓		✓	✓													
	I. USA (02)			✓															
	I. USA (03)			✓															
<i>S. poinari</i>	1187 (01)	✓				✓													
	1187 (02)		✓																✓
	1187 (03)		✓																
	1187 (04)			✓	✓														
<i>S. poinari</i>	Vo11 (01)	✓	✓		✓	✓													
	Vo11 (02)			✓															
<i>S. thesami</i>	1293 (01)	✓				✓													
	1293 (02)		✓																
	1293 (03)		✓	✓															
	1293 (04)			✓															
	1293 (05)			✓															
	1293 (06)			✓															
<i>S. thesami</i>	I. MÜ (01)	✓	✓			✓	✓												
	I. MÜ (02)	✓																	
	I. MÜ (03)			✓															
	I. MÜ (04)			✓															
	I. MÜ (05)			✓															
<i>S. feltiae</i>	af1 (01)	✓	✓				✓												
	af1 (02)			✓															
<i>S.feltiae</i>	Jakub SF (01)			✓	✓		✓	✓		✓	✓		✓	✓					✓
	Jakub SF (02)				✓		✓			✓	✓		✓	✓					✓
	Jakub SF (03)																	✓	✓
<i>S.carpocapsae</i>	EGY4 (01)	✓	✓			✓													
	EGY4 (02)				✓		✓												✓
	EGY4 (03)						✓							✓					
	EGY4 (04)																	✓	✓
<i>S. carpocapsae</i>	1343 (01)	✓				✓													
	1343 (02)			✓				✓	✓			✓	✓						
	1343 (03)				✓					✓				✓					✓
	1343 (04)						✓	✓										✓	✓
<i>S. monticolum</i>	KUMA (01)			✓	✓			✓	✓			✓							
	KUMA (02)					✓													
	GenBank	✓	✓																
<i>S. glaseri</i>	S.GLAS (01)		✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓							
	GenBank	✓				✓													
<i>S. beitlechemi</i>	SGL-197 (01)	✓				✓													
	SGL-197 (02)		✓		✓		✓												
	SGL-197 (03)			✓															
<i>S. bicornutum</i>	1298 (01)	✓				✓													
	1298 (02)		✓	✓	✓	✓	✓												
<i>S. ceratophorum</i>	Chin (01)	✓																	
	Chin (02)		✓		✓		✓												
	Chin (03)		✓	✓		✓													
<i>S. hermaphroditum</i>	CS34 (01)	✓																	
	CS34 (02)		✓		✓	✓	✓												
	CS34 (03)			✓		✓													
<i>S. huense</i>	Vie2 (01)	✓																	
	Vie2 (02)		✓																
	Vie2 (03)			✓	✓		✓												
<i>S. riobrave</i>	Pamela (01)	✓																	
	Pamela (02)			✓															
	Pamela (03)			✓	✓	✓	✓												
<i>S. surkhetense</i>	CS20 (01)	✓	✓			✓	✓	✓											
	CS20 (02)					✓	✓	✓											
	CS20 (03)						✓												
<i>S. weiseri</i>	1025W (01)	✓					✓												
	1025W (02)					✓	✓												
<i>O. chongminensis</i>	CHONG (01)	✓	✓	✓		✓													
	CHONG (02)					✓													
<i>O. chongminensis</i>	TUM (01)	✓	✓																
	TUM (02)					✓													
	TUM (03)			✓															
<i>O. citri</i>	WGN (01)	✓	✓																
	WGN (02)					✓													
	WGN (03)			✓															
<i>O. myriophilus</i>	1b (01)	✓	✓																
	1b (02)					✓													
<i>O. myriophilus</i>	JU1386 (01)	✓	✓																
	JU1386 (02)					✓													
<i>O. siddiqii</i>	CS42 (01)	✓	✓																
	CS42 (02)					✓													

Příloha 2: Přehled délky fragmentů a intronů u jednotlivých druhů pro markery *gEPIC1*, *gEPIC2*, *gEPIC3*, *gEPIC5*, *rEPIC2*, *rEPIC4* a *rEPIC5*

<i>gEPIC1</i>	Délka fragmentu (bp)	Délka intronu 1 (bp)	Délka intronu 2 (bp)
<i>S. affine</i>	324	49	0
<i>S. feltiae</i>	441	0	0
<i>S. carpocapsae</i>	>248	46 (0)	44 (0)
<i>S. monticolum</i>	>269	0	0
<i>S. glaseri</i>	>264	0	0

<i>gEPIC2</i>	Délka fragmentu (bp)	Délka intronu 1 (bp)	Délka intronu 2 (bp)
<i>S. feltiae</i>	360	13	13
<i>S. carpocapsae</i>	535	81	98
<i>S. monticolum</i>	479	17	34
<i>S. glaseri</i>	459	7	109

<i>gEPIC3</i>	Délka fragmentu (bp)	Délka intronu 1 (bp)	Délka intronu 2 (bp)
<i>S. feltiae</i>	786	50	47
<i>S. carpocapsae</i>	783	50	46
<i>S. monticolum</i>	780	43	50

<i>gEPIC5</i>	Délka fragmentu (bp)	Délka intronu 1 (bp)	Délka intronu 2 (bp)
<i>S. feltiae</i>	763	45	44
<i>S. carpocapsae</i>	764	46	45
<i>S. monticolum</i>	750	45	42
<i>S. glaseri</i>	760	44	43

<i>rEPIC2</i>	Délka fragmentu (bp)	Délka intronu (bp)
<i>S. affine</i>	291	50
<i>S. feltiae</i>	290	49
<i>S. carpocapsae</i>	292	51

<i>rEPIC4</i>	Délka fragmentu (bp)	Délka intronu 1 (bp)	Délka intronu 2 (bp)
<i>S. poinari</i>	439	52	27
<i>S. feltiae</i>	379	42	0
<i>S. carpocapsae</i>	>438	56	54

<i>rEPIC5</i>	Délka fragmentu (bp)	Délka intronu (bp)
<i>S. affine</i>	314	109
<i>S. feltiae</i>	311	108
<i>S. carpocapsae</i>	421	274