

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

**Genetické markery pro druhovou identifikaci a studium genetické variability forenzně významných druhů masařek (Sarcophagidae).**

Bakalářská práce

**Nicole Jánová**

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

Školitel specialista: plk. Ing. Hana Šuláková, Ph.D., Kriminologický ústav PČR Praha

České Budějovice 2021

## **Bakalářská práce**

Jánová, N., 2021: Genetické markery pro druhovou identifikaci a studium genetické variability forenzně významných druhů masařek (Sarcophagidae). [Genetic markers for species identification and study of genetic variability of forensically important Flesh flies (Sarcophagidae). Bc. Thesis, in czech.] – 93p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotace**

The aim of this thesis was to select and test molecular markers for species identification and detection of genetic variability of forensically important Flesh flies that are most common in the Czech Republic (*Sarcophaga variegata*, *africa*, *noverca*, *carnaria*, *albiceps*, *incisilobata*, *lehmanni*, *argyrostoma*, *caerulescens*). Both mitochondrial (*COI*) and nuclear (*ITS*, *EPIC*) markers were successfully amplified and sequenced for this purpose. Bacteria *Wolbachia* was detected using the *16S* marker.

## **Prohlášení**

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

V Českých Budějovicích dne 7. prosince 2021

Nicole Jánová

## **Poděkování**

Mé poděkování patří zejména své školitelce PaedDr. Martině Žurovcové, Ph.D. za velkou dávku trpělivosti, odborné vedení a velké množství cenných rad, které mi pomohly při zpracování této práce. Dále plk. Ing. Haně Šulákové, Ph.D. za dodání analyzovaného materiálu a kpt. Ing. Tereze Olekšákové za užitečné rady. Velké poděkování patří také celé mé rodině a kamarádům. V neposlední řadě také Mgr. Janu Hartmanovi za zaučení v začátcích v laboratoři.

# Obsah

1. Úvod .....	1
1.1 Forenzní entomologie .....	1
1.1.1 Sukcese hmyzu .....	2
1.1.2 Čeleď Masařkovití (Sarcophagidae) .....	3
1.2 DNA markery .....	5
1.2.1 Mitochondriální DNA markery .....	5
1.2.2 Jaderné DNA markery .....	7
1.2.3 <i>Wolbachia</i> .....	9
2. Cíle práce .....	11
3. Materiál a metody .....	12
3.1 Materiál .....	12
3.2 Metody .....	13
3.2.1 Extrakce DNA .....	13
3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	13
3.2.3 Gelová elektroforéza .....	16
3.2.4 Přečištění vzorků .....	17
3.2.5 Sekvence .....	18
3.2.6 Klonování .....	18
3.2.7 Statistické vyhodnocení .....	19
4. Výsledky .....	20
4.1. Testované markery .....	20
4.1.1 Mitochondriální markery – <i>COI</i> .....	20
4.1.2 Jaderné markery – <i>ITS</i> .....	27
4.1.3 Porovnání mezidruhové variability <i>COI</i> , <i>ITS1</i> a <i>ITS2</i> .....	34
4.1.4 EPIC .....	35
4.1.5 <i>Wolbachia</i> .....	36

5. Diskuse .....	37
5.1 Metody - Extrakce DNA a PCR .....	37
5.2 Mitochondriální marker <i>COI</i> .....	37
5.3 Jaderný marker <i>ITS</i> .....	38
5.3.1 Sekundární struktury <i>ITS</i> .....	39
5.4 EPIC markery .....	39
5.5 <i>Wolbachia</i> .....	40
6. Závěr.....	41
7. Literatura .....	42
8. Přílohy .....	48

# 1. Úvod

Téma mé bakalářské práce spadá do oboru forenzní entomologie a navazuje na diplomovou práci (Klojďová, 2018), která se zabývala testováním molekulárních markerů pro studium genetické variability významných druhů much čeledi bzučivkovití (Calliphoridae). V mé studii byly obdobným způsobem otestovány další forezně významné druhy, a to z rozmanité čeledi masařkovitých (Sarcophagidae). Stejně jako v předchozí studii byly zpracovány druhy běžně se vyskytující v České republice.

Masařky jsou ve forenzní entomologii důležité zejména pro stanovení doby kolonizace těla hmyzem, která napomáhá k odhadu tzv. post mortem intervalu (PMI), doby mezi smrtí a nálezem těla. Ke správnému určení PMI je třeba přesně stanovit o jaký druh hmyzu, kolonizující mrtvé tělo, se jedná. Druhová identifikace je v tomto případě velmi obtížná, neboť juvenilní stádia dvoukřídlého hmyzu jsou morfologicky velmi těžko rozlišitelná. Z tohoto důvodu stále více roste důležitost molekulárních markerů, které si s tímto problémem poradí. Ve své práci jsem se proto zaměřila na otestování molekulárních markerů pro studium jejich genetické variability.

## 1.1 Forenzní entomologie

Forenzní entomologie je vědní disciplína, která se zabývá studiem členovců, zejména hmyzu, spojeného se zločiny a dalšími aspekty soudního systému. Tato disciplína obvykle zahrnuje identifikaci hmyzu a jiných členovců, nalezených na lidských ostatcích nebo v jejich blízkosti, jako pomoc při určení tzv. post mortem intervalu (PMI), tedy dobou mezi smrtí a nálezem těla (Durden and Mullen, 2002; Amendt *et al.*, 2011).

PMI se stanovuje na základě druhového složení a stupně vývoje hmyzu, nalezeného na kadavérech. K přesnému stanovení PMI je však třeba také zohlednit různé faktory, ovlivňující vývoj hmyzu. Mezi ty nejdůležitější patří zejména teplota, typ a vlhkost prostředí nebo také vliv dalších organismů. Důležitou roli zde hraje mimo jiné i stav mrtvoly, například hmotnost, věk, pohlaví, zdravotní stav, nebo zda jsou na těle nějaká poranění (Šuláková, 2006). Přesnost určení se u krátkodobých PMI (do 3 - 5 týdnů) pohybuje v rozmezí 1 - 5 dní, u kadavérů starších přesnost klesá na určitý týden, měsíc nebo čtvrtletí (Šuláková and Eliášová, 2012).

Forenzní entomologie také může poskytnout další důležité informace, které kriminalistům pomohou vyřešit daný případ, například zda došlo k přesunu ostatků nebo na

kterém místě byly uchovávány. Toxikologickým a molekulárním rozbořem hmyzu se dá odhalit příčina úmrtí. V extrémním případě také totožnost zemřelého, a to, pokud je analýza DNA ze střevního obsahu hmyzu efektivnější než z těla v pokročilém stadiu rozkladu. V neposlední řadě ji lze využít jako velmi účinný nástroj prokázání zanedbání péče u člověka i u zvířat (Amendt *et al.*, 2011; Anderson and Huitson, 2004).

### 1.1.1 Sukcese hmyzu

Během procesu dekompozice se jak na mrtvole, tak i v jejím okolí vyskytuje velké množství druhů členovců, zejména hmyzu, které lákají při rozkladu uvolňující se těkavé látky, tzv. apneumony. Ke kolonizaci těla hmyzem dochází během různých stadií rozkladu. Kenneth G.V. Smith (1986) rozdělil hmyz, který lze nalézt na kadavéřech, do 4 různých ekologických kategorií. První kategorii tvoří nekrofágní druhy, živící se mrtvou tkání. Patří sem například zástupci čeledi bzučivkovitých (Calliphoridae) nebo masařkovitých (Sarcophagidae). Do druhé kategorie zařazujeme predátory a parazity nekrofágních druhů hmyzu, například zástupce řádu brouků čeledi drabčikovitých (Staphylinidae). Třetí v pořadí jsou všežravé druhy, mezi které patří například vosy (Vespoidea), mravenci (Formicidae) a někteří brouci (Coleoptera). Tyto druhy nepatří mezi nekrofágy, ale mohou použít mrtvou tkáň jako zdroj potravy, když je k dispozici. Poslední skupinou jsou adventivní druhy, pro něž slouží mrtvé tělo například jako úkryt, jsou to hlavně pavouci (Araneae) nebo zástupci řádu chvostoskoků (Collembola).

V oblastech, které patří do mírného pásu, tedy i Česká republika, rozlišujeme zpravidla 5 stadií rozkladu (sukcesních vln). Pro každou fázi jsou typické různé druhy hmyzu. Počáteční fáze, čerstvé tělo, představuje úplný počátek dekompozice. Probíhá hned po smrti nebo již při umírání. Typickým druhem hmyzu, vyskytující se v této fázi, jsou mouchy z čeledi bzučivkovitých (Calliphoridae). Při následující fázi nadmutého těla vznikají v důsledku bakteriálního rozkladu páchnoucí plynné látky, které přitahují další druhy hmyzu, například mouchy z čeledi masařkovitých (Sarcophagidae). S nimi se setkáváme zejména při nálezech mrtvých těl v bytech. Třetí fázi je biochemicky aktivní rozklad, při němž dochází jednak k fermentaci proteinů a dále ke zmýdelnění tuků se vznikem mastných kyselin. Tyto kyseliny slouží jako lákadlo pro další specifické druhy hmyzu, například zástupce čeledi mouchovitých (Muscidae). Následuje fáze pokročilého rozkladu, kdy dochází k čpavkové fermentaci zbylých měkkých tkání, objevují se zde drobné mušky z čeledi hrbilkovitých (Phoridae). Další fázi je

vysychání měkkých tkání. Po dokončení rozkladu z mrtvého těla zůstanou kosti, ojediněle chrupavky, vazivo, vlasy a tělní ochlupení (Šuláková, 2014).

### 1.1.2 Čeleď Masařkovití (Sarcophagidae)

Z taxonomického hlediska čeleď masařkovitých spadá do říše živočichové (Animalia), kmene členovci (Arthropoda), třídy hmyz (Insecta), řádu dvoukřídlí (Diptera) a nadčeledi Oestroidea. Mnoho zástupců se v juvenilních stádiích živí měkkou tkání zvířecích těl, což dalo této skupině český název masařkovití. Je to druhově bohatá čeleď, která zahrnuje více než 2 600 popsáných druhů, okupujících téměř celý svět. Dospělé jedince (Obr. 1) lze rozeznat podle šedé nebo černé barvy se třemi černými podélnými pruhy na středohrudí (mesothoraxu). Dalším znakem je kostkovaný nebo skvrnitý zadeček (Povolný and Verves, 1997; Pape, 1996; Shewell, 1987). Rozlišení některých druhů či rodů je velmi obtížné, zejména pak identifikace larev nebo dospělých samiček (De Carvalho and De Mello-Patiu, 2008). Z hlediska životního cyklu jsou masařky obvykle vejcoživorodé, místo vajíček kladou živé larvy prvního instaru přímo na mršinu, trus, rozkládající se materiál nebo do otevřených ran savců (Povolný and Verves, 1997). Jejich velikost se pohybuje od několika milimetrů do skoro dvou centimetrů (Povolný, 2005). Nejčastěji se vyskytují v teplých tropických oblastech (Pohjoismäki *et al.*, 2010).



**Obr. 1:** *Sarcophaga carnaria*, představitel rodu masařkovitých, jeden z nejběžněji se vyskytujících druhů v ČR (<https://www.biolib.cz/>).



Sarcophagidae lze rozdělit do 3 podčeledí. První tvoří Miltogramminae, druhy malé až středně velké velikosti s velkýma očima a oválným nebo zužujícím se zadečkem (abdomenem). Velká většina Miltogramminae jsou kleptoparazité solitérních včel a vos. Druhá podčeď Paramacronychiinae, obecně středně velké druhy, zahrnuje predátory nedospělých čmeláků (*Brachicoma*) a také obecné mrchožrouty a hmyzí predátory (*Sarcophila*, *Wohlfahrtia*). Zástupci Sarcophaginae, tvořící poslední podčeď, jsou velké a robustní a také biologicky rozmanité. Do této skupiny se řadí rod *Sarcophaga*. Většina zástupců tohoto rodu jsou mrchožrouti mrtvého hmyzu nebo menších obratlovců a několik druhů se živí většími mršinami obratlovců. Zástupci se také živí exkrementy a rozkládající se rostlinnou hmotou, proto je můžeme nalézt v blízkosti latrín a kompostů (Pape, 1996).

Masařkovití jsou jednou z čeledí hmyzu, které jsou považovány za důležité pro forenzní entomologii. Nejsou převládajícím typem hmyzu, který se vyskytuje ve forenzně významných situacích. Pokud jsou však přítomny, mohou přinést cenný důkaz (Nishida, 1984; Goff, 1991). Samičky kladou živé larvy na zdechlinu, avšak až v druhém sledu po určitém vývoji larev bzučivek v mrtvém těle. Larvy masařek jsou predátoři, kteří se živí mimo jiné také larvami bzučivek. Mohou být kladeny v blízkosti nebo přímo na mrtvé tělo, do kterého následně pronikají sliznicemi (oči, ústa, nos), pomocí tělních otvorů (např. pohlavních) nebo krevním oběhem (krvavé rány).

Masařky jsou důležité také z medicínského hlediska. Řada druhů patří do skupiny dvoukřídlého hmyzu, jehož larvy parazitují v tělech obratlovců, včetně člověka, a způsobují tak onemocnění myiázu (Povolný, 2005). Masařky patří do skupiny fakultativních parazitů. Tento způsob života tak pro ně není nezbytný. Zástupci této skupiny se vyvíjí hlavně na odumřelých tkáních rostlin a živočichů, na živých tkáních parazitují pouze fakultativně (Šuláková, 2014).

Celosvětově nejběžnější druhy, způsobující myiázu, jsou *Wohlfahrtia magnifica*, *S. crassipalpis* a *S. ruficornis*. V našich zeměpisných šířkách se však nevyskytují. V ČR patří mezi běžné druhy masařek, způsobující tuto nemoc, *S. africa* a *S. argyrostoma* (Shang *et al.*, 2019). U lidí se často toto onemocnění objevuje důsledkem zanedbání péče typicky u starších lidí, dětí nebo nemocných. U zvířat se jedná o případy zanedbání péče a týrání (Anderson and Huitson, 2004).

## 1.2 DNA markery

Velkou část forenzně významných druhů dvoukřídlého hmyzu lze velice těžko morfologicky rozlišit. Zejména u vajíček a larev prvního instaru je to zcela nemožné. Přitom pro odhad PMI je správné určení druhů nezbytné. Metody založené na DNA markerech mohou tyto problémy vyřešit (Zehner *et al.*, 2004; Harvey, Dadour and Gaudieri, 2003). Za genetický marker se považuje gen nebo sekvence DNA, pomocí kterého lze identifikovat jedince, populace nebo druhy. Sperling, Anderson and Hickey (1994) jako první navrhli test na bázi DNA pro tento účel. Velkou výhodou DNA markerů je bezesporu jejich aplikovatelnost na všechny životní stádia hmyzu a také na staré nebo poškozené vzorky (Wells and Stevens, 2008).

V současné době je pro entomologické výzkumy k dispozici velká škála DNA markerů. K nejstarším patří polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP-restriction fragment length polymorphism). Při této metodě dochází prostřednictvím restričních endonukleáz, rozeznávající specifická místa na DNA temlátu, k rozštěpení molekuly DNA na malé fragmenty. Ty jsou poté detekovány pomocí gelové elektroforézy (Loxdale and Lushai, 1998). V práci (Ratcliffe *et al.*, 2003) bylo RFLP použito k identifikaci larev u masařek a dalších forenzně významných čeledí hmyzu bzučivkovitých (Calliphoridae) a mouchovitých (Muscidae).

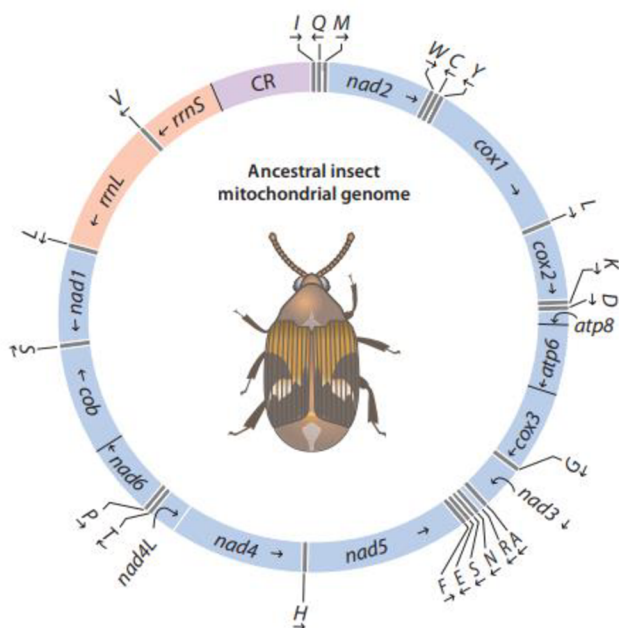
V současnosti nejpoužívanější metodou, která se uplatňuje k detekci genetické variability je sekvenace specifických DNA fragmentů, tedy určení variability v nukleotidové sekvenci vybraných lokusů. Markery se zde rozdělují podle původu na mitochondriální a jaderné (Awise, 1994).

### 1.2.1 Mitochondriální DNA markery

Předpokládá se, že mitochondrie se vyvinuly před více než miliardou let, usídlením volně žijící eubakterie v jiné buňce (Margulis, 1970). Typická hmyzí mitochondriální DNA (mtDNA) je zhruba 16 - 20 kb dlouhá, kruhová dvouvláknová molekula, která postrádá introny (Hoy, 2003). Obsahuje dohromady 37 genů (13 genů kódujících proteiny, 2 geny pro podjednotky ribozomální RNA [rRNA] a 22 genů kódujících transferovou RNA [tRNA]) a také hlavní nekódující oblast bohatou na AT nukleotidy, zvanou kontrolní oblast - CR (Obr. 2). Produkty těchto genů se společně s jadernými proteiny a s RNA podílejí na

mitochondriální replikaci, transkripci, zpracování mRNA a v neposlední řadě na translaci (Clary and Wolstenholme, 1985; Boore, 1999).

Každá buňka může obsahovat až tisíce mitochondrií a v každé z nich se objevuje vysoký počet kruhových molekul DNA. Mitochondrie tak tvoří snadno dostupný zdroj DNA, i u starších a degradovaných vzorků. Malá velikost, relativně vysoká rychlost evolučních změn, hemizigotní konstituce, u které není problém s rozlišením homozygotů a heterozygotů, a také maternální dědičnost, jsou dalšími výhodami, které mtDNA poskytuje (Hoy, 2003; Avise, 1994). Mitochondriální DNA se používá v řadě evolučních studií, jako je například fylogenetika (Moore, 1995; Waugh, 2007), anebo velmi často také k identifikaci druhů i studiu populací (Wells and Sperling, 2001; Waugh, 2007). Všech 13 genů, kódující proteiny, může být použito jako molekulární marker. Stejně tak jako nekódující CR oblast, která se může jevit jako vysoce variabilní. U forenzně významného hmyzu byla CR oblast charakterizována v práci, zabývající se čeledí bzučivkovitých (Calliphoridae) (Duarte, De Azeredo-Espin and Junqueira, 2008).



**Obr. 2:** Diagram ancestrálního mitochondriálního genomu hmyzu (Cameron, 2014). Jednotlivá velká písmena značí kódující oblasti tRNA, modře jsou vyznačeny geny, kódující proteiny; oranžově podjednotky rRNA a fialově nekódující kontrolní oblast. Šipky udávají směr transkripce.

### 1.2.1.1 Cytochrom c oxidáza I (*COI*)

Cytochrom c oxidáza I tvoří hlavní podjednotku enzymatického komplexu IV, který je posledním článkem v elektronovém transportním řetězci v procesu oxidativní fosforylace. U eukaryot se *COI* nachází na vnitřní mitochondriální membráně. Komplex oxiduje cytochrom c a výsledná energie se poté použije pro tvorbu protonového gradientu napříč membránou. (Michel, 2013).

Gen kódující tento komplex je zároveň nejčastěji využívaným „DNA barcode“ markerem, který se používá k identifikaci druhů zvířat. K amplifikaci přibližně 650 bp dlouhého fragmentu jsou používány univerzální primery LCO - 1490 a HCO - 2198 (Folmer *et al.*, 1994). Od roku 2003, kdy byl *COI* gen navržen jako univerzální marker pro druhovou identifikaci, prudce vzrostl počet jednotlivých *COI* sekvencí dostupných ve veřejných datových úložištích. V databázi BOLD (Barcoding of life database, <http://www.boldsystems.org/>) se nachází více než 9 milionů *COI* barcode sekvencí. Z hlediska této informace je *COI* nejrozšířenější sekvenční genovou oblastí živočišné říše (Hebert *et al.*, 2003; Pentinsaari *et al.*, 2016).

U masařek byl tento marker k identifikaci druhů úspěšně aplikován v řadě prací (např. Jordaens *et al.*, 2013; Fuentes-López *et al.*, 2020). Studiím na úrovni populací se však u masařek doposud nikdo systematicky nevěnoval.

Častým problémem, který u *COI* markeru může nastat, je kontaminace bakteriálním endosymbiontem, jehož gen pro *COI* se koamplifikuje společně s barcode markerem. Může tak dojít ke znesnadnění správného čtení sekvence, a tedy ke zkreslení výsledků. Většinou je tímto endosymbiontem rod *Wolbachia* (Hurst and Jiggins, 2005). Tento problém je u masařek opomíjený, i když u čeledi bzučivkovitých (Calliphoridae) se jím několik studií zabývalo (např. Whitworth *et al.*, 2007).

### 1.2.2 Jaderné DNA markery

V jádře bývá zpravidla největší zastoupení genetické informace buňky. Nukleární genomy jsou mnohem větší než mitochondriální. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí od  $10^6$  nukleotidových bází (= 1000 kb) u některých bakterií do  $10^{11}$  u některých rostlin (Parker *et al.*, 1998).

Diploidní organismy obsahují v jádře 2 kopie každého genu. Kódující oblasti (exony) jsou zde na rozdíl od mitochondriálních lokusů proloženy nekódujícími oblastmi (introny) (Parker *et al.*, 1998). Nevýhodou jaderné DNA může být menší množství kopií než u mt DNA a rychlejší degradace. Kódující oblasti jsou obvykle méně variabilní vlivem selekce, naopak nekódující mohou být až hypervariabilní. Jako marker lze využít kteroukoliv část nukleárního genomu v závislosti na tom, jakým problémem se výzkum zabývá, a jak vysoká variabilita je tomuto problému odpovídající (Loxdale and Lushai, 1998).

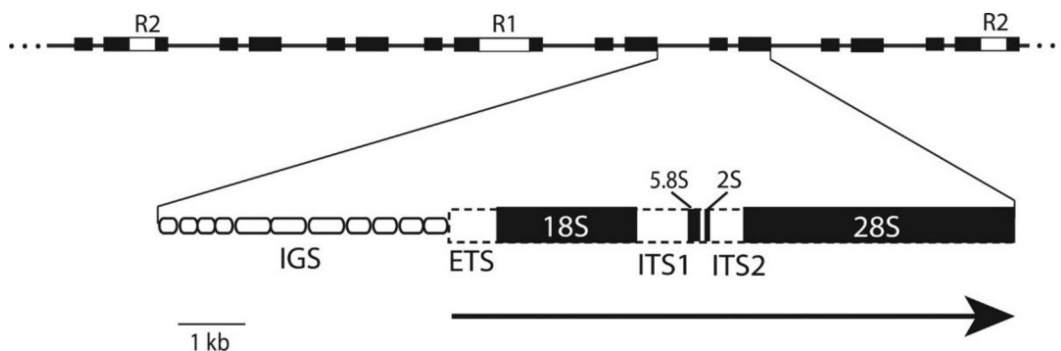
### **1.2.2.1 EPIC (= Exon - primed intron - crossing)**

Tato metoda je založená na variabilitě intronů, a to buď na jejich přítomnosti a nepřítomnosti, jejich délce, anebo nukleotidové variabilitě jejich DNA sekvencí. Pro PCR amplifikaci markerů typu EPIC jsou primery navrhovány v konzervovaných, respektive méně variabilních oblastech exonů, obklopujících sledovaný intron. Odtud tedy pochází zkratka Exon - Prime, Intron - Crossing (EPIC) (Palumbi, 1996).

EPIC markery byly u Dipter úspěšně použity v mnoha populačně-genetických studiích, především u komárů (např. Lessa, 1992; Daguin and Borsa, 1999; Villablanca, Roderick and Palumbi, 1998). K využití těchto markerů u hmyzu byl navržen i soubor univerzálních primerů, umožňující amplifikaci 5ti lokusů napříč taxonomickými skupinami (Palumbi, 1996). U masařek pro tento účel prozatím použity nebyly.

### **1.2.2.2 ITS (= internal transcribed spacer)**

Marker *ITS* lze považovat za specifický případ EPIC, neboť jde rovněž o fragment, který je vložen mezi kódující oblasti. Nejde však o introny a exony, ale dva transkribované úseky, oddělující okolní ribozomální geny. Ribozomální DNA geny (rDNA) jsou uspořádány do jednotlivých klastrů, které se tandemově opakují (Obr. 3). Každý klastr obsahuje geny pro *18S*, *5.8S*, *28S* a u rodu *Sarcophaga* také *2S* ribozomální RNA (rRNA), což je typické pro dvoukřídý hmyz. *ITS* se nachází mezi *18S* a *28S* kódujícími oblastmi a dále může být rozdělen na *ITS1*, ležící mezi *18S* a *5.8S* geny a *ITS2*, který se nachází mezi *2S* a *28S* geny. Celá jednotka je transkribována RNA polymerázou I, v postranskripčních úpravách poté dochází k její degradaci (Gerbi, 1985).



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

*ITS2* oblast představuje více konzervativní strukturu, vhodnou pro identifikaci druhů. Naproti tomu *ITS1* fragment se jeví jako více variabilní, mohl by proto být použit pro studium populací (Douglas and Haymer, 2001). Porovnávání *ITS* sekvencí se stává populárním nástrojem pro fylogenetickou analýzu blízkých příbuzných skupin, druhů a kmenů, což dokazuje velké množství publikovaných prací na toto téma. K identifikaci dipter pomocí metody RFLP, *ITS* marker poprvé použila ve své studii Susan T. Ratcliffe a kolektiv (Ratcliffe *et al.*, 2003). Druhové identifikaci masařek pomocí *ITS2* fragmentu se věnovalo několik studií. U vzorků z Číny to byla práce Song, Wang and Liang (2008), u korejských jedinců byl lokus *ITS2* otestován v publikaci Park *et al.* (2018). Genetickou variabilitou markeru *ITS* se u masařek z Malajsie zabývala práce Roziah and Tan (2015).

*ITS* má kromě nukleotidové variability další zajímavou vlastnost, a sice že vytváří typické sekundární struktury, které umožňují zviditelnit konzervativní oblasti (smyčky – domény) a případně tak usnadnit „alignment“ sekvencí. Užitečnost sekundárních struktur pro fylogenetiku dvoukřídlých prokázali ve své práci Schlötterer *et al.* (1994) nebo Young and Coleman (2004). U rodu *Sarcophaga* se sekundárními strukturami zatím nikdo nezabýval. Nejbližší čeledí, u které byly predikovány jsou muchničkovití (Simuliidae), v práci LaRue *et al.* (2009).

### 1.2.3 *Wolbachia*

*Wolbachia* je gramnegativní intracelulární bakterie, která se řadí do rodu Rickettsia (De Oliveira *et al.*, 2015). Vyskytuje se především u členovců a v menší míře i u filariálních hlístic. U hmyzu se objevuje v samčích i samičích zárodečných liniích, přenos ale probíhá výhradně

vertikálně přes samičí zárodečnou linii (Pietri, DeBruhl and Sullivan, 2016). Průzkumy uvádí, že přibližně 16 % veškerého hmyzu může být infikováno právě tímto mikroorganismem. *Wolbachia* tak patří mezi vůbec nejčastěji se vyskytující popsané endosymbionty (Braig *et al.*, 1998).

Infekce je spojená především s reprodukčními abnormalitami u hostitelského organismu. Nejčastěji se vyskytující abnormalitou je cytoplazmatická inkompatibilita (CI), kde dochází při páření infikovaného samce s neinfikovanou samičkou ke smrti potomstva. Zabíjení a feminizace samců a indukce partenogeneze jsou dalšími abnormalitami, které *Wolbachia* způsobuje (Braig *et al.*, 1998).

*Wolbachia* má také schopnost poskytovat odolnost proti mnoha parazitárním a bakteriálním patogenům. Tato vlastnost umožňuje hostitelům, infikovanými patogeny, přežít a dále se rozmnožovat v situacích, kdy by neinfikovaní hostitelé nepřežili. Například u komárů poskytuje *Wolbachia* rezistenci proti parazitu *Plasmodium*, způsobující závažné onemocnění malárie (Pietri, DeBruhl and Sullivan, 2016). Podobná výhoda by se dala předpokládat i u forezních dipter. Zatím však toto nebylo systematicky studováno. V předchozích studiích také bylo zjištěno, že kmen *Wolbachia* (wMelPop), izolovaný z *D. melanogaster*, může mít u komárů i negativní vliv, který se projevuje snižováním délky jejich života (Kambris *et al.*, 2009).

V Práci (Mingchay *et al.*, 2014) se tomuto endosymbiontovi podrobně věnují u thajských jedinců čeledí Muscidae, Calliphoridae a Sarcophagidae. Z celkového počtu 51 jedinců byla *Wolbachia* detekována u 7 individuí, druhů *H. pulchra*, *M. sorbens*, *S. dux*, *C. megacephala*, *S. scopariiformis*, *M. domestica*, *C. megacephala*.

## **2. Cíle práce**

- Na základě publikací vybrat molekulární markery pro detekci genetické variability u forenzně významných druhů hmyzu z čeledi masařkovitých (Sarcophagidae).
- Otestovat vybrané markery u zvolených druhů typických pro Českou republiku.



### 3. Materiál a metody

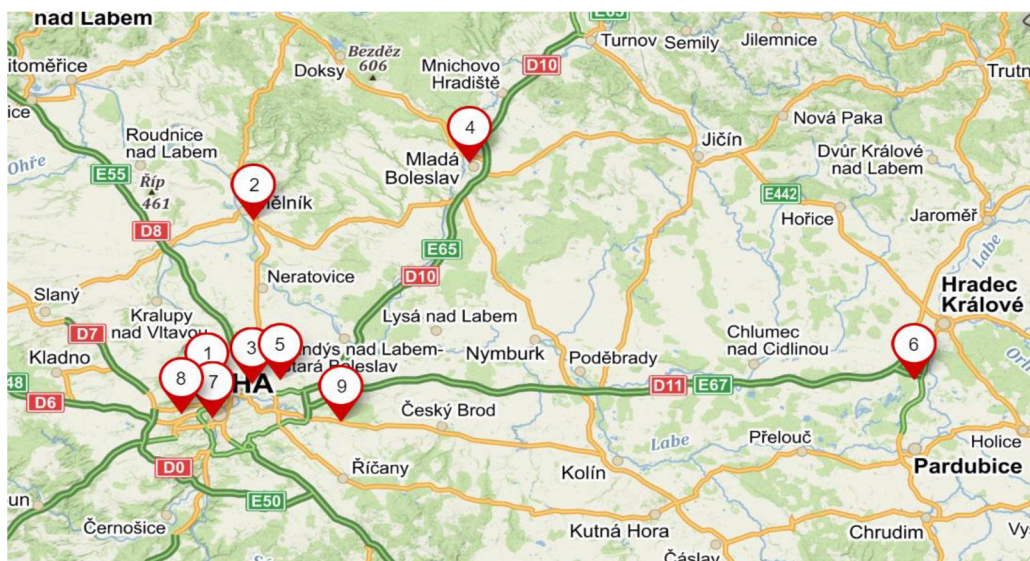
#### 3.1 Materiál

Vzorky studované v této práci pochází z 9 různých míst České republiky a jsou součástí experimentů s prasečími kadavéry. Sběr a druhovou identifikaci jedinců provedla plk. Ing. Hana Šuláková, Ph.D. z kriminalistického ústavu PČR Praha. Celkem bylo analyzováno 72 jedinců z čeledi masařkovitých, reprezentujících 9 druhů (*Sarcophaga variegata*, *africa*, *noverca*, *carnaria*, *albiceps*, *incisilobata*, *lehmanni*, *argyrostoma* a *caerulescens*), které jsou v ČR nejběžnější. Pro statistickou analýzu pomocí markeru *COI* byly přidány veřejně dostupné sekvence z databází GenBank a BOLD s dohledatelným určením místa sběru, které obsahovaly alespoň 550 bp (přílohy 1 - 9). Materiál byl skladován v etanolu nebo jako usušený při teplotě -18°C. Tabulka I zachycuje přehled vzorků a jejich lokalit.

**Tab. I:** Přehled vzorků a jejich lokalit.

<b>Druh</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Počet</b>	<b>Souřadnice</b>
<i>Sarcophaga variegata</i> (Svar)	Čeperka (Čep)	5 ind	50.133 S, 15.773 V
	Praha - Petřín (Pet)	2 ind	50.085 S, 14.386 V
<i>Sarcophaga africa</i> (Safr)	Praha - Petřín (Pet)	1 ind	50.085 S, 14.386 V
	Praha - Troja (PT)	5 ind	50.121 S, 14.398 V
<i>Sarcophaga noverca</i> (Snov)	Praha - Petřín (Pet)	1 ind	50.085 S, 14.386 V
	Praha - Troja (PT)	3 ind	50.121 S, 14.398 V
<i>Sarcophaga carnaria</i> (Scar)	Čeperka (Čep)	2 ind	50.133 S, 15.773 V
	Praha - Petřín (Pet)	2 ind	50.085 S, 14.386 V
	Praha - Troja (PT)	3 ind	50.121 S, 14.398 V
<i>Sarcophaga albiceps</i> (Salb)	Praha - Petřín (Pet)	1 ind	50.085 S, 14.386 V
	Praha - Troja (PT)	6 ind	50.121 S, 14.398 V
<i>Sarcophaga incisilobata</i> (Sinc)	Čeperka (Čep)	2 ind	50.133 S, 15.773 V
	Praha - Petřín (Pet)	2 ind	50.085 S, 14.386 V
<i>Sarcophaga lehmanni</i> (Sleh)	Čeperka (Čep)	15 ind	50.133 S, 15.773 V
	Praha - Petřín (Pet)	2 ind	50.085 S, 14.386 V
<i>Sarcophaga argyrostoma</i> (Sarg)	Praha - Veleslavín (Vel)	2 ind	50.087 S, 14.347 V
	Praha - Újezd n. Lesy (Únl)	1 ind	50.076 S, 14.659 V
	Mělník (M)	2 ind	50.346 S, 14.489 V
	Praha - Střížkov (PS)	3 ind	50.125 S, 14.498 V
	Mladá Boleslav (MB)	2 ind	50,425 S, 14.909 V
	Praha - Letňany (PL)	1 ind	50.134 S, 14.514 V
	Čeperka (Čep)	9 ind	50.133 S, 15.773 V

Lokality analyzovaných vzorků byly pomocí souřadnic vyneseny do mapy, která je zobrazena na následujícím obrázku.



**Obr. 4:** Lokality analyzovaných vzorků, 1 – Praha - Troja, 2 - Mělník, 3 – Praha - Střížkov, 4 - Mladá Boleslav, 5 - Praha - Letňany, 6 - Čeperka, 7 - Praha - Petřín, 8 – Praha - Veveřín, 9 - Praha - Újezd nad Lesy.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Extrakce DNA

Izolace DNA byla prováděna z nohou masařek. Pro zjišťování přítomnosti bakterie *Wolbachia* bylo zapotřebí provést extrakci také ze zadeček. U vzorků skladovaných v etanolu bylo nutné ho nejdříve odpařit, a to inkubací tkáň vložené do 1,5 ml zkumavky na termobloku (Thermomixer comfort, Eppendorf), zahřátém na 40 °C. K extrakci DNA u obou typů tkání byly využívány 2 komerční kity, DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) a DEP - 25 Extraction Kit (Top - Bio). Bylo postupováno přesně podle příložených protokolů. Po izolaci byla DNA skladována při -18 °C.

### 3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Míchání reakční směsi probíhalo v 0,2 ml zkumavkách na ledu. K PCR bylo standardně využíváno pěti komponent: ultračistá voda ddH<sub>2</sub>O, 10x zředěný reakční pufr, mix deoxyribonukleotidů dNTPs, dále „forward“ a „revers“ primery a DNA polymeráza. Většina reakcí byla míchána s Unis Taq (Top - Bio) polymerázou. V případě, kdy se daný lokus nedařilo amplifikovat, byla využita TaKaRa ExTaq polymeráza (TaKaRa Bio). Nakonec bylo

do zkumavky přidáno 1,5 µl templátové DNA. Reakční směsi obou používaných polymeráz jsou zobrazeny v tabulce II.

**Tab. II:** Reakční směsi.

	<b>Unis Taq</b>	<b>TaKaRa ExTaq</b>
ddH <sub>2</sub> O	7,25 µl	7,75 µl
10x Unis Taq pufr/10x Ex Taq pufr	1,25 µl	1,25 µl
dNTPs (2,5 mM)	1 µl	1 µl
Primer - forward (5µM)	0,75 µl	0,75 µl
Primer-revers (5µM)	0,75 µl	0,75 µl
Unis Taq polymeráza (5U/µl) nebo TaKaRa ExTaq polymeráza (5U/µl)	0,1 µl	0,05 µl
Templátová DNA	1,5 µl	1,5 µl

Následující tabulka III zahrnuje přehled markerů a zároveň všech k nim použitých primerů. Z mitochondriálních markerů byly otestovány lokusy *COI* - Cytochrom c oxidáza I a *CR* - kontrolní oblast, z jaderných lokusů *ITS* - internal transcribed spacer i EPIC markery (fragmenty ribozomálních proteinů - *RPS12*, *RPS13*, *RPL*, oblast beta 2 podjednotky proteazomu (*Pβ2*), *EF1α* - elongační faktor 1α a *Wg* - Wingless). Pro detekci bakterie rodu *Wolbachia* byly vybrány lokusy *16S* rRNA a *Wsp* - *Wolbachia* Surface Protein. Jako pozitivní kontrola byl použit chvostoskok *Folsomia candida* z laboratorního chovu, u kterého máme ověřeno, že je touto bakterií infikován.

Primery pro PCR amplifikaci byly přejaty z literatury. U všech byla předem ověřena kvalita nasedání (tzv. „annealingu“) pomocí adekvátních sekvencí z jediných dostupných genomů rodu *Sarcophaga*, tedy *S. bullata* a *S. peregrina*.

**Tab. III:** Přehled markerů a použitých primerů. Žlutě označeny úspěšně použité markery k amplifikaci daného lokusu.

Marker	Lokus	Primery	Směr	Sekvence 5'→3'	Autor	
mtDNA	COI	LCO-1490	F	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer <i>et al.</i> , 1994	
		HCO-2198	R	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer <i>et al.</i> , 1994	
	CR	SR-J-14612	F	AGGGTATCTAATCCTAGTTT	Simon <i>et al.</i> , 1994	
		TM-N-193	R	GCTACTGGGTTCATACCCCA	Simon <i>et al.</i> , 1994	
nDNA	ITS	ITSf1	F	TACACACCGCCCGTCGCTACTA	Ji, Zhang and He, 2003	
		ITSr1	R	CTTTTCCTCCSCTTAYTRATATGC	Ji, Zhang and He, 2003	
		1975F	F	TAACAAGGTTTCCGTAGGTG	Ratcliffe <i>et al.</i> , 2003	
		52R	R	GTTACTTTCTTTTCCCTCCCCT	Ratcliffe <i>et al.</i> , 2003	
	ITS18S	18Sa3.5F	F	TGGTGCATGGCCGYTCTTAGT	Whiting, 2002	
		18S9R	R	GATCCTTCCGCAGGTTACCTAC	Whiting, 2002	
	ITS28S	28SRd1.2a	F	CCCSSGTAATTTAAGCATATTA	Whiting, 2002	
		28SRd3.2b	R	TGAACGGTTTCACGTACTMTTGA	Whiting, 2002	
		28SRd4.2b	R	CCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGG	Whiting, 2002	
	Wg	Wg5F	F	ATGCGTCAAGAATGTAAATG	Federico <i>et al.</i> , 2018	
Wg8R		R	TTACAGACACGTGTGTAT	Federico <i>et al.</i> , 2018		
EPIC	RP S12	RPS12F	F	AATCTTTAATTGCCGATGGTC	Klojdová, 2018	
		RPS12R	R	GCTCCTTGACGACATCCAA	Klojdová, 2018	
	RP S13	RPS13F	F	TACAGAAGAACCGTTCCCT	Klojdová, 2018	
		RPS13R	R	ATCCTTGCGGTTACGTTCC	Klojdová, 2018	
	RP L7	RPL7F	F	AAGGTGATCAGCAAGCGTG	Klojdová, 2018	
		RPL7R	R	TTCAACTTGATGAAGACACC	Klojdová, 2018	
	RP L12	RPL12F	F	GTGATGACATTGCCAAGGC	Klojdová, 2018	
		RPL12R	R	TACACTTTGGGCAGTACCC	Klojdová, 2018	
	Pβ2	Pβ2F	F	CTTTTGAGGAATGGATTCCAA	Klojdová, 2018	
		Pβ2R	R	TTGTCTGTGCGAGCCATG	Klojdová, 2018	
		EF1α	EFO-5'	F	TCCGGATGGCAYGGCGAGAAYATG	Villablanca, Roderick and Palumbi, 1998
			EF2-3' b	R	ATGTGAGCAGTGTGGCAATCCAA	Villablanca, Roderick and Palumbi, 1998
Wolbachia	16S	16Sf	F	TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT	O'Neill <i>et al.</i> , 1992	
		16Sr	R	GAATAGGTATGATTTTCATGT	O'Neill <i>et al.</i> , 1992	
	Wsp	Wspf1	F	GTCCAATARSTGATGARGAAAC	Zhou, Rousset and O'Neil, 1998	
		Wspr1	R	CYGCACCAAYAGYRCTRATAA	Zhou, Rousset and O'Neil, 1998	

### 3.2.2.1 PCR profily

PCR byla prováděna primárně v termocykleru TProfessional TRIO Thermocycler (Biometra) a v menší míře v gradientovém termocykleru Mastercycler ep gradientS (Eppendorf). Profily byly buď přímo navrženy dle složení primerů a odhadované délky amplikonu, anebo převzaty z publikací. V obou případech musely být dále optimalizovány. Tabulka IV zobrazuje všechny úspěšné PCR profily.

**Tab. IV:** Seznam úspěšně použitých PCR profilů.

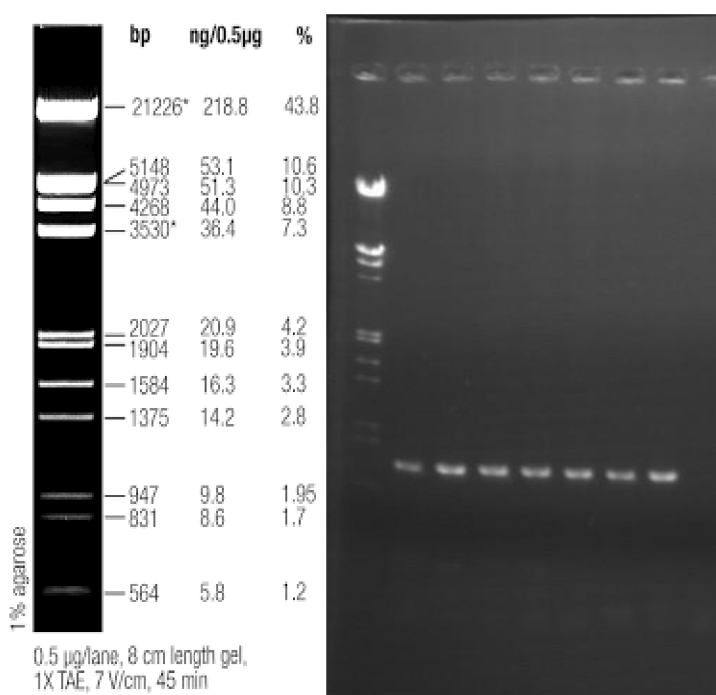
	<i>COI</i>	<i>ITS</i>	<i>ITS 18S</i>	<i>ITS 28S</i>	<i>RPS12</i>
1. Predenaturace	94 °C/2 min	95 °C/3 min	94 °C/2 min	94 °C/2 min	94 °C/1 min
2. Denaturace	94 °C/30 s	95 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s
3. Annealing	45 °C/45 s	64 °C/30 s	55 °C/40 s	50 °C/40 s	50 °C/40 s
4. Elongace	72 °C/1 min	68 °C/3 min	72 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/45 s
5. Postelongace	72 °C/2 min	68 °C/10 min	72 °C/2 min	72 °C/2 min	72 °C/2 min
6. Uchování	4 °C/∞	4 °C/∞	4 °C/∞	4 °C/∞	4 °C/∞
Počet cyklů 2 - 4	35	35	35	35	
	<i>RPS13</i>	<i>RPL12</i>	<i>EF1α</i>	<i>16S</i>	
1. Predenaturace	94 °C/1 min	94 °C/1 min	94 °C/2 min	94 °C/2 min	
2. Denaturace	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s	
3. Annealing	50 °C/40 s	52 °C/40 s	55 °C/45 s	52 °C/40 s	
4. Elongace	72 °C/45 s	72 °C/45 s	72 °C/1 min	72 °C/1.5 min	
5. Postelongace	72 °C/2 min	72 °C/2 min	72 °C/2 min	72 °C/10 min	
6. Uchování	4 °C/∞	4 °C/∞	4 °C/∞	4 °C/∞	
Počet cyklů 2 - 4	40	40	35	35	

### 3.2.3 Gelová elektroforéza

Gelovou elektroforézou byla ověřena úspěšnost PCR reakce a také byla přibližně zjištěna velikost a koncentrace DNA fragmentů. Pro přípravu 2 % agarózového gelu byly nejprve 4 g agarózy rozpuštěny ve 200 ml 1x TAE pufru (50x TAE pufr: 2M TRIS, 1M kyseliny octové, 0,05M EDTA). Rozpuštění probíhalo v mikrovlnné troubě do doby, než byl roztok zcela čirý (bez krystalků agarózy). Následně byl gel zchlazen na teplotu přibližně 50°C, a to za stálého míchání pod proudem tekoucí vody. Poté bylo přidáno 15 µl interkalačního barviva - ethidium bromidu. Zchlazený roztok byl nalit do formy. Nakonec byly přidány

hřebínky pro tvorbu jamek a pomocí pipetovací špičky odstraněny bubliny. Gel se nechal po dobu 30 - 40 minut ve tmě tuhnout, následně byl skladován v 1x TAE pufru při teplotě 4 °C.

Na hotový gel byly nanášeny 3 µl PCR produktu, které byly pipetováním smíchány s 1 µl nanášecího pufru (700 µl ddH<sub>2</sub>O, 300 µl glycerolu, 0,5 mg bromfenolové modři). Vedle jednotlivých produktů byl na gel nanesen také velikostní marker (ladder), který sloužil k určení velikosti daného fragmentu. Pro 2 % gel byl využit marker Lambda DNA/EcoRI+Hind III (Thermo Fischer Scientific). Samotná elektroforéza probíhala 30 - 40 minut při napětí 120 V. Separované fragmenty byly vyobrazeny pod UV světlem. Nakonec byla pořízena pomocí CCD kamery fotografie, jejíž příklad se nachází na obrázku 5.



**Obr. 5:** Nalevo velikostní marker Lambda DNA/EcoRI+Hind III, napravo skutečná fotografie agarózového gelu se separovanými fragmenty DNA (*COI* marker), 1. jamka - velikostní marker (ladder), 2. - 8. jamka – amplifikované fragmenty *COI* u druhu *S. caerulea*, 9. jamka - negativní kontrola.

### 3.2.4 Přečištění vzorků

Aby mohly být vzorky poslány k sekvenaci, musely být nejdříve přečištěny od zbytků primerů a dNTPs. K tomuto účelu byl využit kit ExoFastAP, který se skládá ze dvou druhů hydroláz, Exonukleázy I (20 U/ µl, ThermoFisher Scientific) a Termosenzitivní alkalické fosfatázy (FastAP, 1 U/ µl, ThermoFisher Scientific). Do zkumavky s PCR produktem bylo

přidáno vždy 0,5 µl Exonukleázy I a 1 µl FastAP. Jelikož bylo pracováno s enzymy, míchání probíhalo na ledu. Následně byl vzorek inkubován v termobloku po dobu 30 minut při 37 °C a 15 minut při 80 °C.

### 3.2.5 Sekvenace

Sekvenační směs byla připravena smícháním 5 µl přečištěného PCR produktu s 5 µl příslušného PCR primeru. Sekvenování probíhalo v laboratořích ve firmě Eurofins Genomics. Vzorky byly do této firmy poslány v 1,5 ml zkumavkách.

### 3.2.6 Klonování

Chromatogramy z přímého sekvenování PCR produktů markeru *ITS* měly velmi nízkou kvalitu, a proto bylo nutné pro získání čitelných sekvencí z jednotlivých druhů PCR produkt zaklonovat následujícím postupem.

#### a) Příprava agarových misek pro kultivaci bakterií:

Agarová směs byla připravena smícháním 15 g agaru, 10 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu, 10 g NaCl a 1 l destilované vody. Následně byla 60 minut klávkována. Po zchlazení byl přidán ampicilin (1 µl amp/1 ml média). Poté byl agar nalit do Petriho misek. Po ztuhnutí bylo dále na každou misku přidáno, a pomocí sterilní kličky rozetřeno, 64 µl X - galu (12,5mg/ml) a 3,5 µl IPTG (240mg/ml).

#### b) Ligace PCR produktu do vektoru a transformace do bakteriálních buněk:

Obě tyto fáze byly provedeny přesně podle protokolu od výrobce pGEM - T Easy Vector Systems<sup>TM</sup> (Promega<sup>TM</sup>). Jedinou výjimkou bylo přidání LB média (10g tryptonu, 5g kvasinkového extraktu, 10g NaCl a 1l destilované vody), namísto uvedeného SOC media.

#### c) Inkubace bakterií - tzv. modro - bílá selekce:

Selekce klonů bílé barvy obsahovaly klonovací vektor s insertem, zatímco klony modré barvy nikoliv. Klony bílé barvy byly sterilní špičkou přeneseny do 50 µl ddH<sub>2</sub>O a v termobloku, zahřátém na 95°C, byly 10 minut povařeny. Výsledný DNA templát mohl být použit pro novou PCR.

### 3.2.7 Statistické vyhodnocení

U všech získaných sekvencí byla nejprve pomocí databáze NCBI BlastSearch (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) zkontrolována jejich příslušnost k danému lokusu či druhu. Následovala manuální úprava v programu Chromas 2.6.6, kde byly od sekvencí odstříženy primery a úvodní nečitelné píky (zhruba 30nt na 5' konci). V programu Mega 6 (Kumar *et al.*, 2018) byly sekvence uspořádány a u markerů kódujících proteiny byl zkontrolován čtecí rámeček (ORF – open reading frame). Následně bylo metodou „Muscle“ vytvořeno seřazení – „alignment“. Tento program byl dále použit k základnímu vyhodnocení nukleotidového složení a stanovení počtu konzervovaných, variabilních a parsimoniálně informativních míst.

Dále byly sestrojeny předběžné fylogenetické stromy metodou standardní pro DNA barcoding, tedy pomocí genetické vzdálenosti Kimura2 - parametru (K2P) (Kimura, 1980) a Neighbour - Joining (NJ) algoritmu. Statistická významnost byla stanovena metodou bootstrap (1000x). Přesnější fylogramy byly sestrojeny metodou Maximum Likelihood pomocí programu IQ tree (Nguyen *et al.*, 2015) v on - line režimu (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>). Na tomto serveru byl nejdříve vybrán nejvhodnější model genetické vzdálenosti v modulu ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017), a poté vytvořeny fylogramy s bootstrapem „ultrafast“ (1000x) (Hoang *et al.*, 2017). Vizuální úprava a zakořenění dendrogramů bylo provedeno v programu FigTree (Rambaut, 2009). Dendrogramy u všech druhů *Sarcophaga* byly zakořeněny pomocí modelové *S. bullata*, jejíž sekvence byla získána z databáze GenBank (kód: KFO30488.1).

Program DnaSP 6 (Rozas *et al.*, 2017) byl použit pro analýzu haplotypů - jejich identifikaci a stanovení haplotypové (Hd) a nukleotidové ( $\pi$ ) diverzity, a dále jejich naformátování pro zpracování v programu Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010). V tomto programu byly provedeny testy neutrality - Fuův a Tajimův test.

Program PopArt 1.7 (Leigh and Bryant, 2015) byl uplatněn pro sestrojení haplotypových sítí metodou Median - Joining (Bandelt, Forster and Röhl, 1999) a jejich následné vizualizaci.

Izolace vzdáleností, tedy možná korelace mezi geografickou a genetickou vzdáleností populací, byla vyhodnocena Mantelovým testem v programu GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012), stejně jako v něm byla provedena klastrová analýza PCoA (Principal Coordinate Analysis). Geografické vzdálenosti byly vypočteny z geografických souřadnic jednotlivých lokalit v programu GeoDist (Geographic Distance Matrix Generator) (Ersts, 2006).



Pro vyhodnocení variability u *ITS* markeru byly nejprve sekvence forward a revers sestaveny do kontinuální sekvence (tzv. „contig“) v programu SeqMan z programového balíčku DNASTAR Lasergene (DNASTAR, Inc.). Metodou klouzavého okénka („sliding window“) v programu DNAsp bylo stanoveno rozložení variabilních míst po celé délce fragmentů. V tomto programu byla taktéž vyhodnocena nukleotidová variabilita.

Sekundární struktura ITS fragmentů byla predikována v modulu RNAfold (Lorenz *et al.*, 2011) na webovém serveru TheViennaRNA Web Services (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>). Vizualizace byla provedena v modulu Forna (Kerpedjiev, Hammer and Hofacker, 2015) na stejném serveru.

## 4. Výsledky

### 4.1. Testované markery

V rámci této práce bylo vybráno a otestováno celkem 12 molekulárních markerů. Mitochondriální oblast *COI* se podařilo amplifikovat i osekvenovat u většiny jedinců Sarcophagidae. Problém nastal u kontrolní oblasti, kde se i přes opakovanou optimalizaci PCR profilu amplifikace nepovedla u žádného vzorku.

U jaderného markeru *ITS* byla amplifikace úspěšná, avšak z důvodu nekvalitních chromatogramů z přímého sekvenování bylo nutné klonování. To se podařilo u všech 9 druhů.

Z EPIC markerů se úspěšně podařilo namnožit oblasti *RP S12*, *RP S13* a *RP L12*. Další vybrané oblasti, *RP L7* a *Pβ2*, se naopak přechíst nezdařilo. Lokus *EF1α* se sice amplifikovat podařilo, ale nebyl zde nalezen žádný intron. Druhý vytipovaný jaderný marker wingless se nepodařilo získat u žádného z druhů masařek.

Markery *16S* a *wsp* byly použity k detekci bakterie *Wolbachia*. Přítomnost této bakterie se podařilo prokázat pouze u jednoho jedince z druhu *S. caerulescens*, a to pomocí markeru *16S*.

#### 4.1.1 Mitochondriální markery – *COI*

Ze 72 analyzovaných vzorků bylo 63 úspěšně amplifikováno a osekvenováno. Amplifikace se nepodařila u jednoho jedince druhu *S. variegata* a *S. noverca*, u 2 jedinců druhu *S. albiceps*, *S. lehmanni* a u 3 jedinců *S. argyrostoma*. K úspěšně získaným sekvencím z českých druhů a populací byly pro statistické analýzy přidány sekvence z GenBank/BOLD

databáze z různých států světa, a to s dohledatelným určením místa sběru, které obsahovaly alespoň 550 bp (přílohy 1 - 9).

Sekvence byly u každého druhu upraveny na stejnou délku. V tabulce V je přehled základních charakteristik nukleotidové variability.

**Tab. V:** Druhá genetická variabilita mitochondriálního *COI* markeru, N = délka sekvence, C = počet konzervativních míst, V = počet variabilních míst, Pi = počet parsimoniálně informativních míst.

<b>Druh</b>	<b>Počet jedinců</b>	<b>N (bp)</b>	<b>C</b>	<b>V</b>	<b>Pi</b>
<i>S. africa</i>	55	648	595	53	30
<i>S. albiceps</i>	83	648	583	65	41
<i>S. argyrostoma</i>	51	642	584	58	25
<i>S. caerulescens</i>	112	648	625	24	19
<i>S. carnaria</i>	124	653	629	25	10
<i>S. incisilobata</i>	31	644	624	20	7
<i>S. lehmanni</i>	33	644	627	17	11
<i>S. noverca</i>	10	644	641	3	1
<i>S. variegata</i>	157	644	604	40	17

Nejvíce variabilních míst bylo objeveno u *S. albiceps*, konkrétně 65, což činilo 10 % z celkové délky sekvence. Parsimoniálně informativních míst bylo nejvíce taktéž u *S. albiceps*, a to 41. U *S. noverca* byla nalezena naopak pouze 3 variabilní místa (0,5 %) a 1 parsimoniálně informativní místo, tedy nejméně ze všech studovaných druhů.

Dále byla u každého druhu vypočítána průměrná frekvence nukleotidů, která je zaznamenána v přílohách (Příloha 10). Z tabulky je patrné, že převažuje zastoupení A-T nukleotidů u všech studovaných druhů masařek.

V programu DnaSP byla provedena analýza haplotypů, přehled vyhodnocených charakteristik je uveden v tabulce č. VI.

**Tab. VI:** Nukleotidová ( $\pi$ ) a haplotypová variabilita (h, Hd).

<b>Druh</b>	<b>h</b>	<b>Hd</b>	<b><math>\pi</math></b>
<i>S. africa</i>	13	0,621	0,009
<i>S. albiceps</i>	28	0,868	0,007
<i>S. argyrostoma</i>	22	0,816	0,008
<i>S. caerulescens</i>	10	0,575	0,013
<i>S. carnaria</i>	14	0,404	0,002
<i>S. incisilobata</i>	10	0,714	0,004
<i>S. lehmanni</i>	12	0,811	0,005
<i>S. noverca</i>	4	0,533	0,002
<i>S. variegata</i>	23	0,824	0,007

Nejvíce haplotypů (28) bylo identifikováno u *S. albiceps*. U tohoto druhu byla zároveň zjištěna nejvyšší hodnota haplotypové diverzity, a to 0,868. Naopak nejnižší hodnota Hd (0,404) byla zaznamenána u *S. carnaria* a nejmenší počet haplotypů (4) u *S. noverca*. Hodnoty nukleotidové variability se pohybovaly v rozmezí od 0,002 (u *S. noverca*) do 0,013 (u *S. caerulescens*).

Pro vizualizaci výskytu haplotypů v jednotlivých státech byly v programu Popart vytvořeny haplotypové sítě, zobrazené v přílohách (Příloha 11). Z haplotypových sítí je patrné, že nedošlo k oddělení populací, jelikož populace sdílejí společné haplotypy.

V dalším programu Arlequin byly spočítány testy neutrality, Tajimův a Fuův test, které pomáhají identifikovat možné demografické procesy. Záporná hodnota testů neutrality signalizuje populační expanzi, kladná zase poukazuje na působení nedávného „bottlenecku“, tedy náhlého snížení počtu jedinců. Výsledné hodnoty testů neutrality byly doplněny do tabulky č. VII.

**Tab. VII:** Testy neutrality pro jednotlivé lokality u všech studovaných druhů, N - počet jedinců, S - počet segregujících míst, p - hodnota signifikance, žlutě vyznačeny signifikantní hodnoty. Zkratky lokalit byly vytvořeny podle mezinárodních kódů ISO.

Druh	Lokalita	N	S	Tajimovo D	Tajimovo D p hodnota	Počet alel	Fuovo FS	Fuovo FS p hodnota
<i>S. africa</i>	CZE	6	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	AUS	13	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	FRA	5	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	KEN	2	3	0.000	1.000	2	1.099	0.409
	CHN	12	10	1.590	0.961	4	3.339	0.933
	ESP	6	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	ITA	5	11	-1.199	0.045	3	2.055	0.827
	USA	3	5	0.000	1.000	3	-0.077	0.213
	DEU	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	ZAF	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	EGY	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
<i>S. albiceps</i>	CZE	6	2	-0.050	0.424	3	-0.427	0.186
	FRA	5	1	-0.817	0.304	2	0.090	0.305
	KOR	5	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	CHN	48	21	-2.040	0.003	20	-17.141	0.000
	POL	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	THA	2	2	0.000	1.000	2	0.693	0.376
	BGD	9	1	-1.088	0.200	2	-0.263	0.186
	SAU	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	IND	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	PAK	2	15	0.000	1.000	2	2.708	0.585
DEU	2	1	0.000	1.000	2	0.000	0.232	
ESP	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.	
<i>S. argyrostoma</i>	CZE	8	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	BEL	2	1	0.000	1.000	2	0.000	0.245
	FRA	2	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	ITA	7	2	-1.237	0.124	2	0.856	0.599
	ESP	32	46	-1.546	0.038	20	-6.332	0.013
<i>S. caerulea</i>	CZE	9	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	FRA	5	3	0.699	0.751	3	0.276	0.510
	RUS	2	2	0.000	1.000	2	0.693	0.343
	BEL	4	2	1.893	0.965	2	1.530	0.701
	ESP	4	1	-0.612	0.376	2	0.172	0.345
	FIN	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	DEU	3	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	CAN	83	13	0.003	0.574	4	5.691	0.961
	USA	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
<i>S. carnaria</i>	CZE	8	1	-1.055	0.222	2	-0.182	0.211
	DEU	100	9	-2.020	0.001	10	-11.268	0.000

	DNK	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	BEL	2	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	FRA	5	4	0.273	0.691	4	-1.012	0.127
	GBR	4	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	ITA	4	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
<i>S. incisilobata</i>	CZE	4	9	-0.492	0.412	4	-0.615	0.212
	FRA	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	BGR	2	2	0.000	1.000	2	0.693	0.393
	DEU	24	7	-0.914	0.200	6	-1.133	0.223
<i>S. lehmanni</i>	CZE	16	11	-1.860	0.021	4	0.965	0.734
	FRA	6	7	1.014	0.847	3	2.202	0.857
	USA	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	ESP	3	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	ITA	6	3	-1.233	0.119	4	-1.813	0.022
	GRC	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
<i>S. noverca</i>	CZE	3	2	0.000	1.000	3	-1.216	0.091
	FRA	2	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	ITA	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	BGR	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	DEU	3	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
<i>S. variegata</i>	CZE	10	2	-1.401	0.030	2	0.586	0.440
	BEL	7	2	0.206	0.605	3	-0.237	0.240
	FRA	4	2	-0.710	0.276	2	1.099	0.633
	ITA	9	6	-1.728	0.015	4	-0.450	0.253
	GBR	3	1	0.000	1.000	2	0.201	0.405
	ESP	2	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	EGY	35	7	-1.532	0.044	5	-1.102	0.231
	NOR	2	1	0.000	1.000	2	0.000	0.245
	BLR	16	7	1.237	0.913	5	1.277	0.776
	DEU	59	8	-0.850	0.209	9	-3.095	0.050
	HRV	6	3	-1.233	0.101	2	1.609	0.739
	BGR	1	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.
	ROU	3	0	0.000	1.000	1	0.000	N.A.

N.A. = not applicable, nelze stanovit.

Testy neutrality byly signifikantní u čínských populací druhu *S. albiceps*, u španělských populací druhu *S. argyrostoma* a také u německých populací druhu *S. carnaria*. Všechny populace měly záporné hodnoty Tajimova D i Fuova FS a relativně velký počet alel, mohlo zde tedy dojít k nedávné expanzi populací.

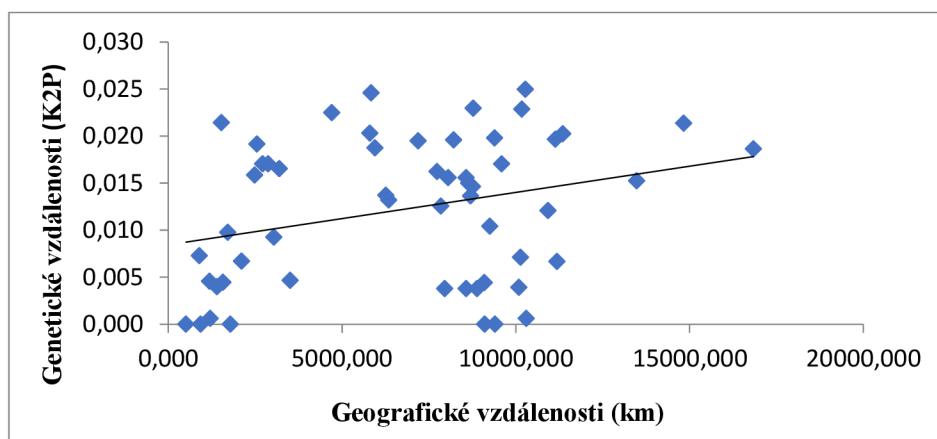
Izolace populací na základě geografické vzdálenosti byly analyzovány pomocí korelace geografické a genetické (K2P) vzdálenosti, jejíž signifikance určil Mantelův test. Výsledky jsou sumarizovány v tabulce VIII a vizualizovány pomocí grafů (Obr. 6 a Příloha 12).

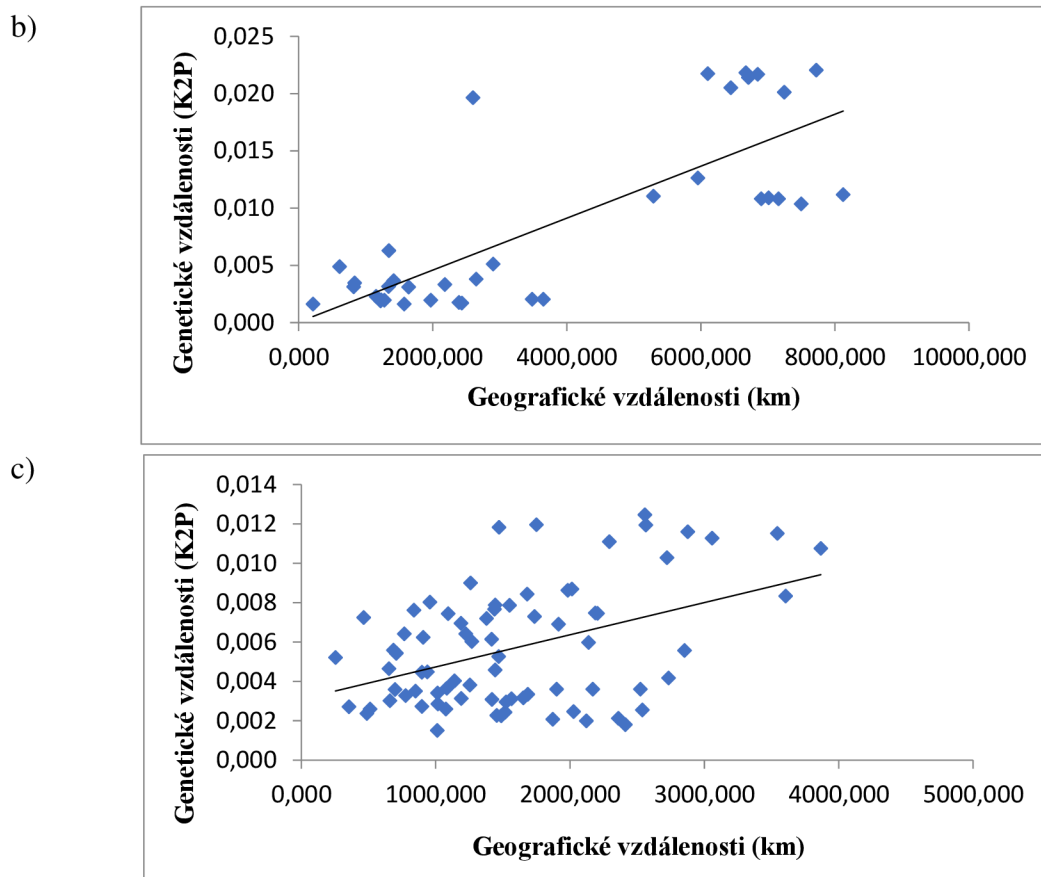
**Tab. VIII:** Mantelův test,  $R_{xy}$  = korelační koeficient,  $p$  - hodnota signifikance.

Druh	$R_{xy}$	$p$
<i>S. africa</i>	0,288	0,04
<i>S. albiceps</i>	0,172	0,05
<i>S. argyrostoma</i>	0,579	0,07
<i>S. caerulescens</i>	0,788	0,022
<i>S. carnaria</i>	0,022	0,41
<i>S. incisilobata</i>	-0,713	0,096
<i>S. lehmanni</i>	0,343	0,052
<i>S. noverca</i>	0,646	0,11
<i>S. variegata</i>	0,429	0,037

Hodnoty korelačního koeficientu se pohybovaly od -0,713 do 0,788. Nejmenší hodnota ( $R_{xy} = -0,713$ ) byla zjištěna u druhu *S. incisilobata*, hodnota nejvyšší ( $R_{xy} = 0,788$ ) byla pozorována u *S. caerulescens*. Pouze u druhů *S. africa*, *S. caerulescens* a *S. variegata* byla hodnota  $p$  signifikantní ( $p < 0,05$ ), byla zde zjištěna určitá korelace mezi genetickými a geografickými vzdálenostmi (Obr. 6). Naopak u všech ostatních druhů byla hodnota  $p > 0,05$ , výsledky byly tedy neprůkazné (Příloha 12).

a)





**Obr. 6:** Grafické znázornění korelace mezi geografickou a genetickou (K2P) vzdáleností, a) *S. africa*, b) *S. caerulea*, c) *S. variegata*.

Možné shlukování jedinců podle lokalit bylo analyzováno klastrovací metodou hlavních souřadnic - Principal Coordinates Analysis (PCoA) na základě genetických vzdáleností. Výsledné grafy jsou zobrazeny v přílohách (Příloha 13) a je z nich patrné, že nedošlo k rozdělení podle geografického původu.

U každého druhu byly také v programu IQ Tree vytvořeny dendrogramy metodou Maximum Likelihood (Ultrafast bootstrap). Dendrogramy u všech druhů *Sarcophaga* byly zakořeněny pomocí modelové *S. bullata* (přílohy 14 - 22). Stejně jako v předchozích analýzách (haplotypové sítě, PCoA), u dendrogramů také nedošlo k rozdělení vzorků do klastrů podle jejich geografické lokality, jednotlivé populace (lokality) se mezi sebou mísily.

#### 4.1.2 Jaderné markery – *ITS*

PCR amplifikace celého *ITS* fragmentu byla u většiny druhů úspěšná, ale přímé sekvenování tohoto produktu ne. U všech chromatogramů (ve směru forward i revers) byly čitelné jen části sekvence, většinou však měly silné pozadí, ať už v důsledku smíchání s další sekvencí nebo s možnou sekundární strukturou. Proto bylo nutné tyto PCR produkty zaklonovat. Sekvenování klonů poté vedlo k úspěšnému získání DNA sekvencí u všech druhů.

Pozice jednotlivých fragmentů *ITS1*, *5.8S*, *2S* a *ITS2* byly stanoveny na základě porovnání s fylogeneticky vzdálenější *D. melanogaster* (Dmel) a fylogeneticky bližší forenzní mouchou *Lucilia caesar* (Lcae). Fragment *2S* byl identický u všech druhů, včetně Dmel a Lcae, proto nebyl použit do dalších analýz.

##### 4.1.2.1 Nukleotidová variabilita *ITS*

Nejprve byly určeny délky *ITS* sekvencí u jednotlivých druhů a nukleotidové frekvence. *ITS* Sekvence byly porovnány s Dmel a Lcae. Hodnoty jsou zaznamenány v tabulce IX.

**Tab. IX:** Frekvence A-T a G-C nukleotidů a délka (= N) *ITS* sekvencí u jednotlivých druhů.

Druh	<i>ITS</i>		<i>ITS1</i>			<i>5.8S</i>			<i>ITS2</i>		
	N [bp]	A-U [%]	G-C [%]	N [bp]	A-U [%]	G-C [%]	N [bp]	A-U [%]	G-C [%]	N [bp]	
Dmel	1264	73.1	27	728	48.7	51.2	121	80.2	19.8	415	
Lcae	985	78.5	21.5	521	49.5	50.4	121	81.1	19	343	
Safr	1575	77	23	1107	49.5	50.4	121	79.8	20.2	347	
Salb	1435	77.7	22.4	954	48.7	51.2	121	80.6	19.4	360	
Sarg	1564	75.3	24.7	1069	49.5	50.4	121	80.2	19.8	374	
Sbul	1450	76.6	23.4	966	49.5	50.4	121	80.4	19.6	363	
Scae	1430	76.7	23.3	953	49.5	50.4	121	79.7	20.3	356	
Scar	1437	78	12	957	49.5	50.4	121	80.3	19.8	359	
Sinc	1436	77.2	22.8	956	49.5	50.4	121	79.9	20.1	359	
Sleh	1473	76.9	23.2	996	49.5	50.4	121	80	20	356	
Snov	1568	77	23	1074	49.5	50.4	121	79.9	20.1	373	
Svar	1438	78	22	958	49.5	50.4	121	80.3	19.7	359	

Z tabulky je patrné, že u *ITS1* a *ITS2*, na rozdíl od *5.8S*, převažuje zastoupení A-U nukleotidů před G-C nukleotidy. Průměrná frekvence A-U nukleotidů u *ITS1* u rodu *Sarcophaga* činila 77 %, což je zhruba o 4 % více než u Dmel a o 1,5 % méně než u Lcae. U



*ITS2* byla průměrná hodnota frekvence A-U nukleotidů 80 %, přibližně stejné frekvence byly i u *Dmel* a *Lcae*.

*ITS1* byl ze 3 porovnávaných fragmentů nejdelší. U tohoto fragmentu lze pozorovat délkovou variabilitu mezi druhy, která je způsobena indely. Průměrná délka *ITS1* fragmentu u *Sarcophaga* byla 999 bp, nejkratší fragment obsahovala *S. caerulescens* (953 bp), nejdelší *S. africa* (1107). V porovnání s *Lcae* a *Dmel* byla průměrná délka *ITS* u *Sarcophaga* o více než 400 bp větší než *Lcae* a o více než 200 bp větší než *Dmel*.

Fragment *5.8S* měl u všech druhů stejnou délku, 121 bp. *ITS2* byl svou délkou mezi druhy, podobně jako *ITS1*, variabilní. Průměrná délka *ITS2* u masařek byla 361 bp. Nejdelší fragment měla *S. argyrostoma* (374 bp), nejkratší naopak *S. africa* (347 bp). Délka *ITS2* fragmentu u *Lcae* a *Dmel* se nepatrně odlišovala, u *Dmel* byla 415 bp dlouhá, u *Lcae* měřila 343 bp.

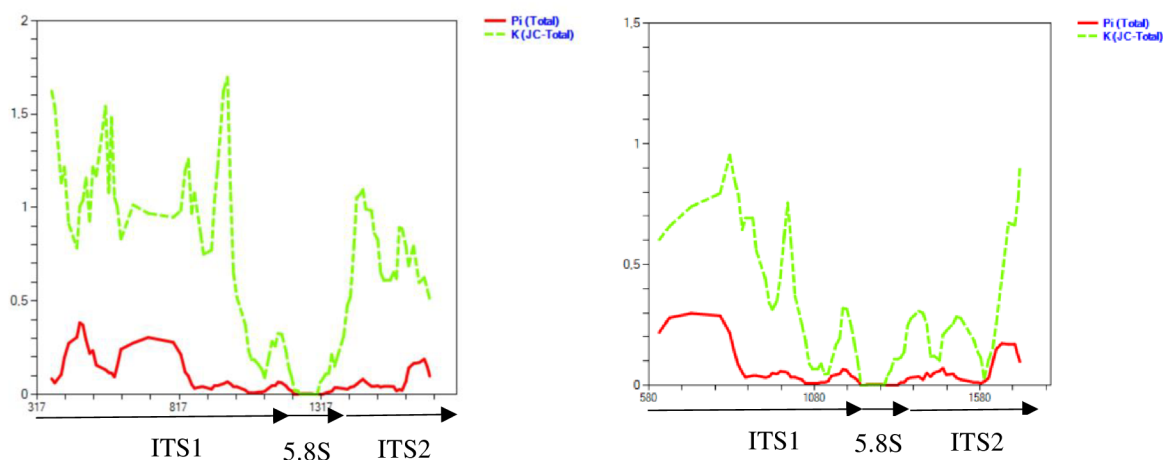
Dále byla v programu DNAsp vyhodnocena genetická variabilita *ITS* markeru, která je zaznamenána v následující tabulce X.

**Tab. X:** Genetická variabilita jaderného *ITS* markeru, P = počet polymorfismů, k =  $\Pi$  = vnitrodruhová variabilita v rámci *Sarcophaga*, K *Lcae* = divergence mezi *Sarcophaga* a *L. caesar*, K *Dmel* = divergence mezi *Sarcophaga* a *D. melanogaster*.

	<b>P</b>	<b>k</b>	<b>K Lcae</b>	<b>K Dmel</b>
<i>ITS1</i>	163	0,121	0,341	0,498
<b>5.8S</b>	1	0,002	0,001	0,009
<i>ITS2</i>	69	0,055	0,208	0,393

Nejméně variabilní byl *5.8S* fragment, který obsahoval pouze 1 polymorfismus a hodnota variability v rámci rodu *Sarcophaga* byla  $k = 0,002$ . Naproti tomu největší variabilitu vykazoval *ITS1*, s hodnotou  $k = 0,121$  a se 163 polymorfismy. U *ITS2* byla vyhodnocena variabilita  $k = 0,055$  a 69 polymorfismů. Divergence mezi *Sarcophaga* a *Lucilie caesar* byla nejmenší taktéž u *5.8S* fragmentu a největší u *ITS1*, stejně tak tomu bylo i u porovnání variability *Sarcophaga* s *D. melanogaster*.

V programu DNAsp byly pomocí metody klouzavého okénka („sliding window“) vytvořeny grafy (Obr. 7), znázorňující rozložení variabilních míst po celé délce sekvence.



**Obr. 7:** Rozložení variabilních míst po celé délce ITS sekvence, vlevo variabilita mezi *Sarcophaga* a *D. melanogaster*, vpravo variabilita mezi *Sarcophaga* a *L. caesar*.

U obou grafů je patrné, že nejvíce variabilní je *ITS1* fragment, méně variabilní je *ITS2* a u *5.8S* není téměř žádná variabilita. Z grafů lze také vyčíst, že mezi *Sarcophaga* a *D. melanogaster* hodnoty variability dosahují největších čísel kolem 900. bp a mezi *Sarcophaga* a *L. caesar* se nejvyšší hodnoty variability pohybují kolem 800. bp, větší variabilita je tedy mezi *Sarcophaga* a *D. melanogaster*.

#### 4.1.2.2 Sekundární struktury *ITS*

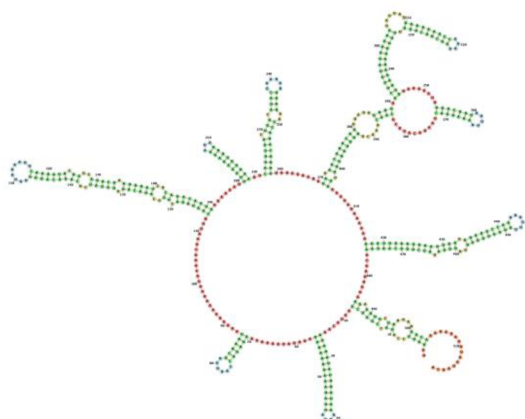
Sekundární struktura *ITS1* a *ITS2* byla zkonstruována pro každý druh zvlášť, pro porovnání s *D. melanogaster* a *L. caesar* poté byla vytvořena i z konsenzuální sekvence ze všech druhů *Sarcophaga*. U všech fragmentů byly detekovány 4 základní prvky (Obr. 8, 9 a Příloha 23, 24), mezi které patří kmínek („stem“) – dvojřetězec komplementárních bází, smyčka větvená („multibranching loop“) – kruhová struktura s několika kmínky, nespárované báze („bulge“) – nespárované báze v kmínku a vlásenka („hairpin“) - koncová smyčka na kmínku. Počet a typ strukturních prvků u jednotlivých druhů je vyhodnocen v tabulce č. XI a XII.

**Tab. XI:** Sekundární struktury u *ITS1* fragmentu.

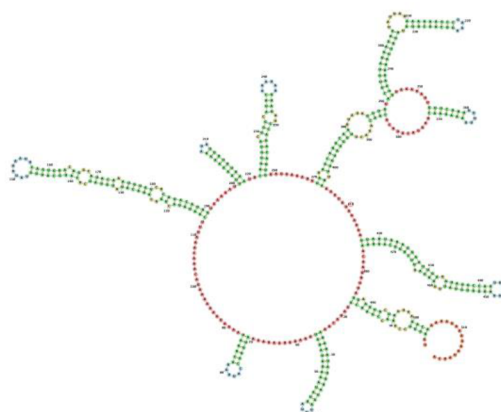
Druh	Kmínek	Smyčka větvená	Nespárované báze	Vlásenka
	stem	loop	bulge	hairpin
Dmel	10	2	15	8
Lcae	10	2	15	8
SarcoCons	25	5	22	20
Safr	26	4	25	23
Salb	25	6	24	19
Sarg	22	6	29	19
Sbul	27	7	22	19
Scae	22	3	23	19
Scar	25	5	19	20
Sinc	28	6	20	22
Sleh	22	3	25	19
Snov	23	5	31	20
Svar	22	4	23	18

U sekundárních struktur *ITS1*, kmínek a nespárované báze tvořily nejpočetnější prvky u *Sarcophaga*, Dmel i Lcae. Nejméně početné byly velké větvené smyčky. Lcae a Dmel měly téměř totožné sekundární struktury, od *Sarcophaga* se výrazně lišily menším počtem všech 4 prvků. To bylo dané kratším fragmentem *ITS1* u Lcae i Dmel. Další odlišností byla rozdílná velikost, zejména větvených smyček. Zatímco Dmel a Lcae obsahovaly jednu velkou centrální smyčku a dvě menší, konsenzuální *Sarcophaga* obsahovala zhruba 5 menších smyček (Obr.8). Mezi druhy u *Sarcophaga* se velikost i počet struktur u všech druhů lišily (Příloha 23).

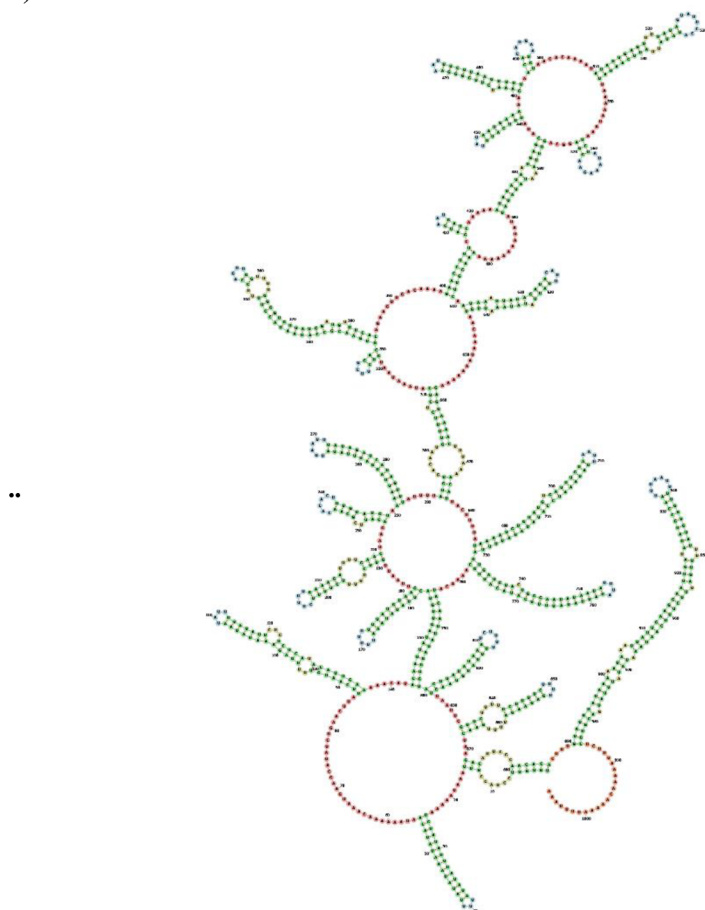
a)



b)



c)



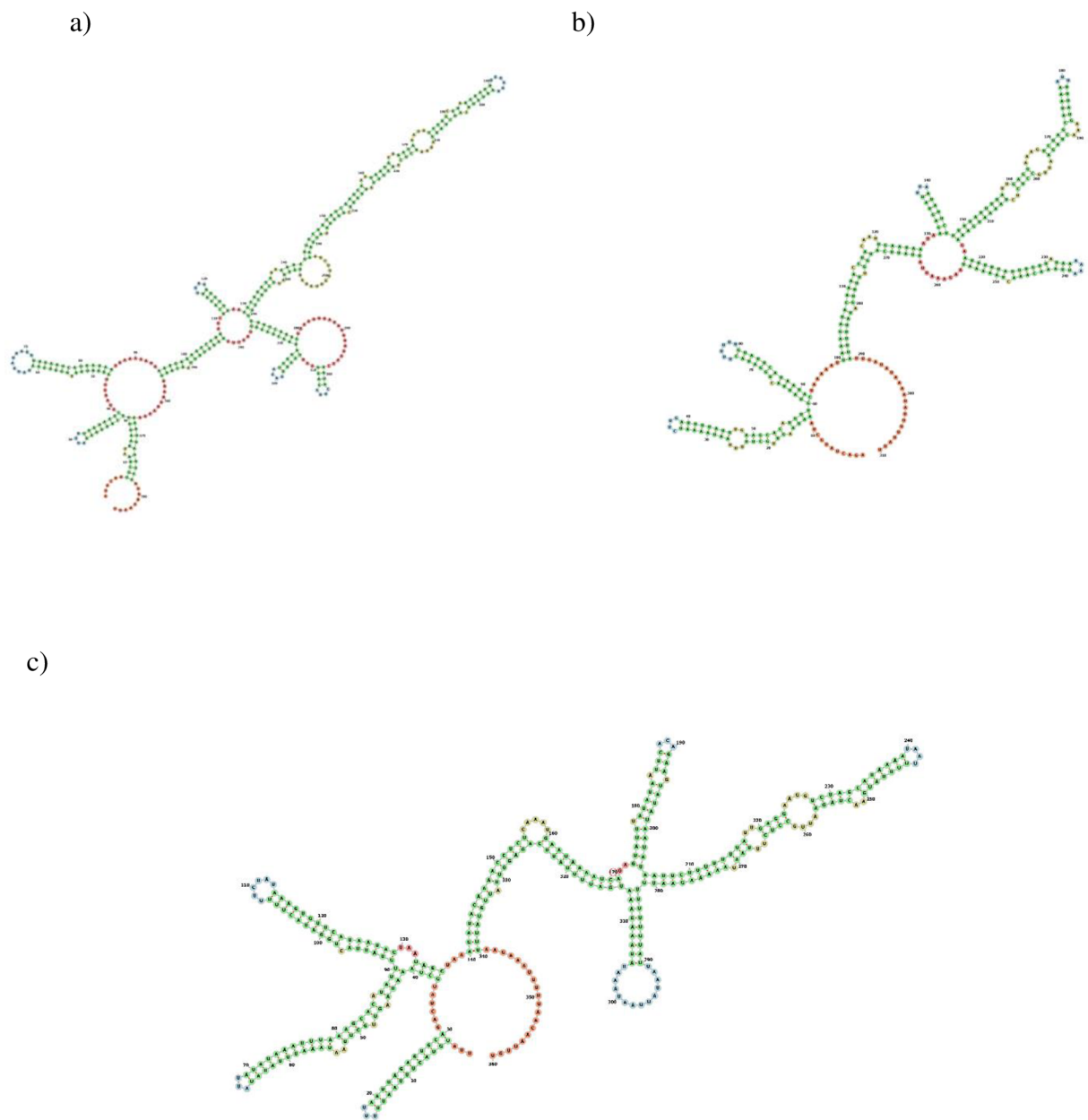
**Obr. 8:** Predikovaná sekundární struktura fragmentu *ITS1*.

a) *D. melanogaster*, b) *L. caesar*, c) konsenzuální *Sarcophaga*. Číslo označuje pořadí nukleotidů, barvy odlišují strukturální prvky: oranžová – základní smyčka (obsahuje 5' a 3' konec), červeně – větvená smyčka, zeleně – kmínek, modře – vlásenka.

**Tab. XII:** Sekundární struktury u *ITS2*.

Druh	Kmínek	Smyčka větvená	Nespárované báze	Vlášenska
	stem	loop	bulge	hairpin
Dmel	9	3	12	6
Lcae	6	1	12	5
SarcoCons	8	2	12	6
Safr	5	1	12	4
Salb	7	2	12	5
Sarg	8	1	11	7
Sbul	8	2	11	7
Scae	7	1	12	6
Scar	7	2	12	5
Sinc	7	2	12	5
Sleh	6	1	12	5
Snov	7	1	15	6
Svar	7	2	12	5

U sekundárních struktur *ITS2* byly nejvíce zastoupeny, stejně jako u *ITS1*, nespárované báze, větvené smyčky byly nejméně zastoupeny. Na rozdíl od *ITS1* se prvky mezi druhy *Sarcophaga* velikostně příliš nelišily, byly více konzervované. Početní rozdílnost prvků zde byla, avšak ne tak velká jako u *ITS1* (Příloha 24). Dmel a Lcae prvky také neprokazovaly výraznou velikostní odlišnost, počet prvků se ale od konsenzuální *Sarcophaga* lišil (Obr. 9).



**Obr. 9:** Predikovaná sekundární struktura fragmentu *ITS2*.

a) *D. melanogaster*, b) *L. caesar*, c) konsenzuální *Sarcophaga*. Čísla označují pořadí nukleotidů, barvy odlišují strukturální prvky: oranžová – základní smyčka (obsahuje 5' a 3' konec), červeně – větvená smyčka, zeleně – kmínek, modře – vlásenka.

### 4.1.3 Porovnání mezidruhové variability *COI*, *ITS1* a *ITS2*

K porovnání variability mezi lokusy *COI*, *ITS1* a *ITS2* byly v programu MEGA, pomocí modelu p-distance, vypočteny genetické vzdálenosti mezi druhy (viz Tab. XIII, XIV, XV).

**Tab. XIII:** Genetické vzdálenosti mezi druhy u *COI*, modře znázorněny odchylky.

	Safr	Salb	Sarg	Scae	Scar	Sinc	Sleh	Snov	Svar
Safr		0,009	0,010	0,009	0,010	0,011	0,010	0,010	0,010
Salb	0,077		0,011	0,009	0,009	0,010	0,010	0,010	0,009
Sarg	0,088	0,084		0,012	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011
Scae	0,069	0,066	0,096		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
Scar	0,078	0,061	0,079	0,075		0,009	0,006	0,010	0,006
Sinc	0,082	0,074	0,087	0,072	0,062		0,010	0,011	0,010
Sleh	0,082	0,071	0,087	0,078	0,024	0,072		0,010	0,002
Snov	0,077	0,070	0,088	0,067	0,062	0,080	0,070		0,010
Svar	0,079	0,066	0,081	0,079	0,025	0,070	0,008	0,067	

**Tab. XIV:** Genetické vzdálenosti mezi druhy u *ITS1*, modře znázorněny odchylky.

	Safr	Salb	Sarg	Scae	Scar	Sinc	Sleh	Snov	Svar
Safr		0,012	0,013	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,012
Salb	0,174		0,013	0,012	0,003	0,004	0,007	0,013	0,004
Sarg	0,210	0,198		0,010	0,013	0,013	0,014	0,012	0,013
Scae	0,165	0,144	0,113		0,012	0,013	0,013	0,012	0,012
Scar	0,172	0,011	0,195	0,143		0,003	0,006	0,013	0,003
Sinc	0,177	0,017	0,202	0,149	0,009		0,007	0,013	0,004
Sleh	0,203	0,046	0,234	0,152	0,043	0,051		0,013	0,007
Snov	0,202	0,179	0,182	0,151	0,175	0,183	0,211		0,013
Svar	0,172	0,013	0,196	0,142	0,009	0,019	0,045	0,178	

**Tab. XV:** Genetické vzdálenosti mezi druhy u *ITS2*, modře znázorněny odchylky.

	Safr	Salb	Sarg	Scae	Scar	Sinc	Sleh	Snov	Svar
Safr		0,012	0,014	0,013	0,012	0,013	0,012	0,016	0,012
Salb	0,050		0,010	0,009	0,002	0,005	0,009	0,013	0,003
Sarg	0,081	0,042		0,012	0,011	0,011	0,012	0,015	0,011
Scae	0,058	0,031	0,059		0,009	0,010	0,003	0,013	0,009
Scar	0,053	0,003	0,045	0,031		0,004	0,009	0,013	0,004
Sinc	0,058	0,008	0,050	0,037	0,006		0,009	0,013	0,005
Sleh	0,055	0,028	0,056	0,003	0,028	0,034		0,013	0,008
Snov	0,096	0,064	0,093	0,062	0,064	0,070	0,059		0,013
Svar	0,053	0,003	0,045	0,031	0,006	0,011	0,028	0,064	

Nejméně variabilní mezi druhy byl *ITS2* lokus, hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 0,003 do 0,096; marker *COI* byl mezi druhy podobně variabilní, hodnoty byly v rozmezí od 0,008 do 0,088. Největší variabilitu mezi druhy prokazoval *ITS1* fragment s hodnotami, pohybujícími se od 0,010 do 0,234.

#### 4.1.4 EPIC

Z EPIC markerů se podařilo amplifikovat lokusy *RP S12* u *S. africa*, *S. incisilobata*, *S. albiceps*. U druhů *S. argyrostoma*, *S. carnaria* a *S. variegata* se nepovedl namnožit celý fragment, část intronu chyběla. *RP S13* fragment se povedl amplifikovat u *S. africa*, *S. argyrostoma*, *S. variegata* a *S. carnaria*. Lokus *RP L12* se povedlo namnožit u *S. africa*, *S. incisilobata*, *S. variegata* a *S. carnaria*. Délky úspěšně získaných sekvencí celkových amplikonů a intronů byly v Tab. XVI porovnány se *S. bullata*.

U elongačního faktoru  $1\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ) se pomocí primerů EFO - 5' a EF2 - 3' b u druhu *S. argyrostoma* povedl namnožit úsek dlouhý zhruba 500 bp. Při zpracování sekvence se zjistilo, že zde není přítomen intron, a proto se s tímto markerem dále nepracovalo.

**Tab. XVI:** Délka celkových amplikonů a intronů u ribozomálních proteinů.

Ribozomální protein S12		
Druh	Délka celkového amplikonu (bp)	Délka intronu (bp)
<i>S. africa</i>	321	57
<i>S. albiceps</i>	306	57
<i>S. bullata</i>	370	54
<i>S. incisilobata</i>	316	57
Ribozomální protein S13		
Druh	Délka celkového amplikonu (bp)	Délka intronu (bp)
<i>S. africa</i>	313	73
<i>S. argyrostoma</i>	317	73
<i>S. bullata</i>	353	73
<i>S. carnaria</i>	268	66
<i>S. variegata</i>	317	73
Ribozomální protein L12		
Druh	Délka celkového amplikonu (bp)	Délka intronu (bp)
<i>S. africa</i>	238	68
<i>S. bullata</i>	367	70
<i>S. carnaria</i>	249	68
<i>S. incisilobata</i>	247	68
<i>S. variegata</i>	247	68



Při porovnání mezi druhy bylo nejvíce variabilních míst v celkovém amplikonu detekováno u lokusu *RPS 13* (52), v intronu bylo 31 variabilních míst. Jako nejvíce konzervovaný se jevil fragment *RPL 12*, kde bylo detekováno celkově 6 variabilních míst, z toho 3 v intronu. U *RPS 12* bylo v intronu nalezeno 9 variabilních míst a v celém amplikonu 17.

#### **4.1.5 *Wolbachia***

Pomocí markeru *16S* se u jednoho jedince druhu *S. caerulescens* povedl amplifikovat a poté osekvenovat fragment o velikosti zhruba 820 bp. V BLASTU byl tento fragment přiřazen k *Wolbachii* izolované z *D. melanogaster* (Query cover 99 %, Identity 99.87 %). U dalších druhů se přítomnost *Wolbachia* prokázat nepodařilo.

## 5. Diskuse

### 5.1 Metody - Extrakce DNA a PCR

Extrakce DNA byla prováděna primárně z nohou masařek, protože jsme chtěli předejít možné koamplifikaci bakterií *Wolbachia*. Naopak pro detekci tohoto endosymbionta musela být extrakce provedena také ze zadečků, protože *Wolbachia* se nachází především v reprodukčních orgánech (Werren, Baldo and Clark, 2008).

K izolaci DNA byly vybrány 2 komerční kity. Primárně byl používán DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN). Pomocí tohoto kitu byla extrakce DNA úspěšná u 63 dodaných jedinců. U 9 sušených vzorků se izolace nepodařila, proto byl u těchto vzorků vyzkoušen druhý kit, DEP - 25 Extraction Kit (Top - Bio). Ani pomocí něho se však DNA z 9 sušených vzorků izolovat nepodařilo. Příčinou mohla být degradace tkání. U vzorků skladovaných v etanolu se izolace DNA podařila ve všech případech.

Při výběru polymerázy je třeba zohlednit i finanční náročnost. Proto byly reakční směsi pro amplifikaci DNA míchány s Unis Taq (Top - Bio) polymerázou, která je standardně používaná v obdobném výzkumu. Byla tedy ověřena její vhodnost. Pokud se daný fragment nedařilo amplifikovat, byla využita účinnější, ale také dražší, TaKaRa ExTaq polymeráza (TaKaRa Bio). Tato polymeráza má na rozdíl od první zmiňované větší citlivost, bylo s ní tak dosaženo lepších výsledků.

U amplifikace fragmentu *16S* pro detekci *Wolbachia* nepomohla ani TaKaRa ExTaq polymeráza, do reakce bylo proto přidáno BSA (Bovine Serum Albumin), pomocí kterého se již fragment namnožit podařilo.

Lokusy *AT*, *Wg*, *RPL7*, *Pβ2* a *wsp* se nepodařilo amplifikovat ani po přidání účinnější polymerázy, BSA nebo změně PCR profilu, proto s nimi dále nebylo pracováno. Neúspěch mohl být způsoben i špatným nasedáním primerů. I když toto nasedání bylo předem ověřováno, šlo o sekvence příbuzných druhů, a proto je variabilita v primerových oblastech možná.

### 5.2 Mitochondriální marker *COI*

Pomocí univerzálních markerů LCO - 1490 a HCO - 2198 (Folmer *et al.*, 1994) se podařilo namnožit DNA u většiny jedinců bez větších problémů. Marker *COI*, tzv. barcode marker, se hojně využívá k identifikaci druhů. V této práci byl však analyzován i z hlediska

vnitrodruhové variability. Případné oddělení jednotlivých geografických populací by bylo velmi důležité pro forenzní entomologii. Mohlo by sloužit k odhalení posmrtného přesouvání ostatků mezi jednotlivými lokalitami. Z tohoto důvodu byly k sekvencím z České republiky přidány také sekvence, pocházející z různých států světa, vybrané z GenBank a BOLD databázi.

Jako druhový identifikační marker se *COI* jeví velmi dobře. K oddělení geografických populací ale nedošlo, což potvrzují dendrogramy, PCoA analýza i haplotypové sítě. Většina populací se mísí mezi sebou a lokality sdílí společné haplotypy. Určitá korelace mezi genetickými a geografickými vzdálenostmi byla zjištěna pouze u druhů *S. africa*, *S. albiceps* a *S. variegata*. Stejně výsledky byly objeveny i v práci (Jordaens *et al.*, 2013), kde byl *COI* testován u 56 druhů masařek ze západní Evropy.

Tyto výsledky je však nutno považovat za velmi předběžné. Poukazují hlavně na systémový problém s nerovnoměrným počtem vzorků z různých geografických oblastí i lokalit. Zatímco u *S. albiceps* mohlo být do analýz zahrnuto 83 sekvencí, u *S. noverca* pouze 10. Menší počet vzorkovaných jedinců převážně z jedné nebo několika velmi blízkých lokalit nutně vede k detekci jen omezené variability, ať už na úrovni polymorfismů, tak i následně počtu haplotypů. Při dalších studiích by tak bylo dobré zaměřit se na systematické vzorkování po celém areálu rozšíření.

### 5.3 Jaderný marker *ITS*

Další marker *ITS* byl vybrán na základě publikací, které popisují jeho značnou variabilitu (Zaidi *et al.*, 2011; Douglas and Haymer, 2001). Zaidi *et al.* (2011) také uvádí, že z důvodu vysoké variability, zejména *ITS1*, je získání kvalitních sekvencí velmi obtížné. V této práci se však pomocí univerzálních primerů 1975F a 52R (Ratcliffe *et al.*, 2003) povedlo získat sekvence *ITS1* i *ITS2* od všech 9 druhů.

Genetická variabilita byla vyhodnocena zvláště u fragmentů *ITS1*, *5.8S* a *ITS2*, k porovnání s jinými druhy hmyzu byly přidány sekvence *D. melanogaster* a *L. caesar*. Zajímavé je, že *ITS1* u *L. caesar* byl téměř o 400 bp kratší, u *Dmel* o 200 bp kratší. Mezi masařkami byla také přítomna určitá délková variabilita, způsobena indely. U tohoto markeru by tak k odlišení některých druhů stačila pouze PCR amplifikace, délková variabilita by měla být vidět na gelu. Stejně jako u *ITS1*, u *ITS2* byla délková variabilita také přítomna jak mezi druhy *Sarcophaga*, tak i mezi *Sarcophaga*, *L. caesar* a *D. melanogaster*. Avšak ne tak velká

jako u *ITS1*, rozlišitelnost druhů by tak na gelu viditelná nebyla. Délková variabilita *ITS* fragmentu u masařek, mezi druhy *Boettcherisca javanica*, *Boettcherisca peregrina*, *Boettcherisca karnyi* *Boettcherisca highlandica* byla zjištěna i ve studii Roziah and Tan, (2015). Dále bylo zjištěno, že divergence mezi *Sarcophaga* a *D. melanogaster* dosahuje vyšších hodnot než divergence mezi *Sarcophaga* a *L. caesar*. Tento výsledek však byl očekávaný, neboť *D. melanogaster* je fylogeneticky vzdálenější než *L. caesar*.

Z výsledků se dá usuzovat, že vzhledem k větší variabilitě, potenciálním populačním markerem by mohl být *ITS1*. Zatímco *ITS2* je více konzervovaný, mohl by proto být používán k identifikaci druhů. Tuto hypotézu potvrzují i publikace Song, Wang and Liang (2008) a Park *et al.* (2018), kde se pomocí *ITS2* markeru druhu masařek povedlo úspěšně identifikovat.

### 5.3.1 Sekundární struktury *ITS*

Pro *ITS1* a *ITS2* lokusy byly predikované sekundární struktury, které mohou být také důležité pro identifikaci druhů a fylogenetické vztahy. U obou lokusů byly detekovány 4 základní prvky (kmínek, smyčka větvená, nespárované báze, vlásenka). Sekundární struktura *ITS1*, vzhledem k vyšší variabilitě, není moc prozkoumaná. Odlišnost *ITS1* struktur mezi *Sarcophaga*, *D. melanogaster* a *L. caesar* byla především v počtu a velikosti jednotlivých prvků. *D. melanogaster* a *L. caesar* měly výrazně menší počet všech prvků, to bylo ale dané délkovou variabilitou *ITS1* mezi těmito druhy. Mezi druhy u *Sarcophaga* byla odlišnost především ve velikosti jednotlivých prvků, zejména větvených smyček. Početní rozdíl prvků se zde také vyskytoval, ale rozdíly byly daleko menší než mezi *Sarcophaga*, *L. caesar* a *D. melanogaster*. Sekundární struktury *ITS2* se mírně odlišovaly od Young and Coleman (2004) vzhledem k použitému software (mají jiné algoritmy pro predikci). V zásadě byly však stejné. Na rozdíl od *ITS1* byly prvky více velikostně konzervované u všech druhů, včetně *D. melanogaster* a *L. Caesar*. Počet prvků se odlišoval.

Bylo zjištěno, že masařky mají svoji typickou sekundární strukturu, která se od *D. melanogaster* i *L. caesar* odlišuje. Potenciál pro fylogenetické analýzy byl zde tedy potvrzen.

### 5.4 EPIC markery

EPIC markery byly do mé studie vybrány zejména na základě práce Villablanca, Roderick and Palumbi (1998), kde byl u vrtule velkohlavé (*Ceratitis capitata*) zjištěn jejich

populačně - genetický potenciál. V mé práci se povedlo namnožit lokusy *RP S12*, *RP S13*, *RP L12* a také *EF1 $\alpha$* , ne však u všech studovaných druhů. Lokus *EF1 $\alpha$*  nakonec neměl intron, proto byl z EPIC vyřazen. Z ostatních lokusů se na základě nejvyšší variability jako slibný jeví *RP S13*. U masařek by mohl mít potenciál pro oddělení populací. Pro další studie by však bylo dobré získat více sekvencí od více druhů.

## **5.5 *Wolbachia***

V mé práci byla *Wolbachia* testována zejména kvůli jejímu možného vlivu na zkreslení výsledků DNA barcodingu, což u forezních dipter ve své práci popisuje zejména Whitworth *et al.* (2007) a také protože může poskytovat odolnost vůči některým parazitárním a bakteriálním patogenům. Tuto bakterii se podařilo prokázat pouze u jednoho jedince druhu *S. argyrostoma*. Je otázkou, do jaké míry *Wolbachia* rod *Sarcophaga* infikuje, neboť i ve studii na forezním hmyzu z Thajska (Mingchay *et al.*, 2014) byla bakterie nalezena jen u jednoho druhu (*S. dux*) z pěti studovaných masařek. Tyto výsledky jsou také ovlivněny množstvím analyzovaných vzorků, pokud je *Wolbachia* u druhu spíše výjimečná, pak by její nalezení vyžadovalo skřínink většího množství jedinců.

## 6. Závěr

V této pilotní studii byly na základě literatury vybrány a otestovány markery pro druhovou identifikaci a studium genetické variability u forenzně významné čeledi masařkovití. Základním testovacím souborem bylo 72 jedinců, představujících 9 druhů typických pro Českou republiku. Sekvence mitochondriálního markeru *COI* byly získány ze všech analyzovaných jedinců. U všech druhů byl charakterizován marker *ITS*, a také několik jaderných markerů EPIC. U jednoho jedince druhu *S. caerulea* se podařilo prokázat přítomnost jednoho z nejčastěji se vyskytujících endosymbiontů hmyzu, bakterii *Wolbachia*.

Na základě genetické variability bylo dle předpokladu zjištěno, že *COI* je výborným markerem pro identifikaci druhů, avšak pro geografické oddělení populací se nejeví příliš vhodný. Ačkoliv zejména údaje o výskytu stejných haplotypů v různých i geograficky vzdálených lokalitách jsou dost přesvědčivé, celkové výsledky byly nepochybně ovlivněny množstvím dostupných DNA sekvencí (tedy počtem jedinců z jednotlivých lokalit). Pro konečné závěry by proto bylo žádoucí provést rozsáhlejší studii založenou na rovnoměrném systematickém vzorkování po celém areálu rozšíření.

Marker *ITS* se pro další používání jeví jako slibný. Zatímco *ITS2* by mohl být doplňkovým markerem pro druhovou identifikaci, více variabilní *ITS1* by mohl být vhodným kandidátem pro studium populací. Nevýhodou však může být obtížné získávání sekvencí. V dalším výzkumu by mělo být otestováno, zda amplifikace obou fragmentů jednotlivě nepřinese lepší výsledky. U *ITS* byly také predikovány druhově specifické sekundární struktury, které by mohly být užitečné pro studium fylogenetických vztahů.

Z otestovaných EPIC markerů se pro oddělení populací zdá být nejvíce vhodný lokus *RPS13*, u něhož by měl následovat skrínink vnitrodruhové variability.

## 7. Literatura

**Amendt, J. et al. (2011)** ‘Forensic entomology: Applications and limitations’, *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 7(4), pp. 379–392. doi: 10.1007/s12024-010-9209-2.

**Anderson, G. S. and Huitson, N. R. (2004)** ‘Myiasis in pet animals in British Columbia: the potential of forensic entomology for determining duration of possible neglect’, *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 45(12), pp. 993–998. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15646845>.

**Avise, J. C. (1994)** ‘Molecular tools’, in *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Springer, Boston, MA, pp. 44–91.

**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.

**Boore, J. L. (1999)** ‘Animal mitochondrial genomes.’, *Nucleic acids research*, 27(8), pp. 1767–1780. doi: 10.1093/nar/27.8.1767.

**Braig, H. R. et al. (1998)** ‘Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*’, *Journal of Bacteriology*, 180(9), pp. 2373–2378. doi: 10.1128/jb.180.9.2373-2378.1998.

**Cameron, S. L. (2014)** ‘Insect mitochondrial genomics: Implications for evolution and phylogeny’, *Annual Review of Entomology*, 59, pp. 95–117. doi: 10.1146/annurev-ento-011613-162007.

**De Carvalho, C. J. B. and De Mello-Patiu, C. A. (2008)** ‘Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America’, *Revista Brasileira de Entomologia*, 52(3), pp. 390–406. doi: 10.1590/S0085-56262008000300012.

**Clary, D. O. and Wolstenholme, D. R. (1985)** ‘The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code’, *Journal of molecular evolution*, 22(3), pp. 252–271. doi: 10.1007/BF02099755.

**Daguin, C. and Borsa, P. (1999)** ‘Genetic characterisation of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in North West Africa DNA markers’, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 235, pp. 55–65. doi: 10.1016/S0022-0981(98)00163-4.

**Douglas, L. J. and Haymer, D. S. (2001)** ‘Ribosomal ITS1 Polymorphisms in *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae)’, *Annals of the Entomological Society of America*, 94(5), pp. 726–731. doi: 10.1603/0013-8746(2001)094[0726:RIPICC]2.0.CO;2.

**Duarte, G. T., De Azeredo-Espin, A. M. L. and 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), pp. 667–676. doi: 10.1603/0022-2585(2008)45[667:TMCROB]2.0.CO;2.

**Durden, A. L. and Mullen, R. G. (2002)** ‘Medical entomology’. doi: 10.1016/B978-0-12-510451-7.50003-7.

**Ersts, P. J. (2006)** *Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3)*. Available at: [https://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg/](https://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg/) (Accessed: 15 November 2021).

- Excoffier, L. and Lischer, H. E. L. (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), pp. 564–567. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>.
- Federico, C. et al. (2018)** ‘Rapid molecular identification of necrophagous diptera by means of variable-length intron sequences in the wingless gene’, *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 56(March), pp. 66–72. doi: 10.1016/j.jflm.2018.03.003.
- 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*, 3, pp. 294–299.
- Fuentes-López, A. et al. (2020)** ‘Molecular identification of forensically important fly species in Spain using COI barcodes’, *Science & Justice*, 60(3), pp. 293–302. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2019.12.003>.
- Gerbi, S. A. (1985)** ‘Evolution of ribosomal DNA’, in MacIntyre, R. J. (ed.) *Molecular evolutionary genetics*. Springer US, pp. 419–517.
- Goff, M. L. (1991)** ‘Comparison of insect species associated with decomposing remains recovered inside dwellings and outdoors on the island of Oahu, Hawaii.’, *Journal of forensic sciences*, 36(3), pp. 748–753.
- Harvey, M. L., Dadour, I. R. and Gaudieri, S. (2003)** ‘Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia.’, *Forensic science international*, 131(2–3), pp. 134–139. doi: 10.1016/s0379-0738(02)00431-0.
- Hebert, P. D. N. et al. (2003)** ‘Biological identifications through DNA barcodes.’, *Proceedings. Biological sciences*, 270(1512), pp. 313–321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218.
- Hoang, D. et al. (2017)** ‘UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation’, *Molecular Biology and Evolution*, 35. doi: 10.1093/molbev/msx281.
- Hoy, M. (2003)** ‘Mitochondria’, in *Insect Molecular Genetics- An Introduction to Principles and Applications*. Academic Press, pp. 363–365.
- Hurst, G. D. D. and 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 B: Biological Sciences*, 272(1572), pp. 1525–1534. doi: 10.1098/rspb.2005.3056.
- Ji, Y.-J., Zhang, D.-X. and 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 Notes*, 3(4), pp. 581–585. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00519.x>.
- Jordaens, K. et al. (2013)** ‘Identification of forensically important Sarcophaga species (Diptera: Sarcophagidae) using the mitochondrial COI gene’, *International Journal of Legal Medicine*, 127(2), pp. 491–504. doi: 10.1007/s00414-012-0767-6.
- Kalyaanamoorthy, S. et al. (2017)** ‘ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates’, *Nature methods*, 14(6), pp. 587–589. doi: 10.1038/nmeth.4285.
- Kambris, Z. et al. (2009)** ‘Immune activation by life-shortening Wolbachia and reduced



filarial competence in mosquitoes.’, *Science (New York, N.Y.)*, 326(5949), pp. 134–136. doi: 10.1126/science.1177531.

**Kerpedjiev, P., Hammer, S. and Hofacker, I. L. (2015)** ‘Forna (force-directed RNA): Simple and effective online RNA secondary structure diagrams’, *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2015/06/22, 31(20), pp. 3377–3379. doi: 10.1093/bioinformatics/btv372.

**Kimura, M. (1980)** ‘A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.’, *Journal of molecular evolution*, 16(2), pp. 111–120. doi: 10.1007/BF01731581.

**Klojdoová, M. (2018)** ‘Molekulární markery pro detekci genetické variability přírodních populací forenzně významných druhů bzučivkovitých (Calliphoridae, Diptera)’.

**Kumar, S. et al. (2018)** ‘MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms.’, *Molecular biology and evolution*, 35(6), pp. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.

**LaRue, B. et al. (2009)** ‘Generalized structure and evolution of ITS1 and ITS2 rDNA in black flies (Diptera: Simuliidae)’, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(3), pp. 749–757. doi: 10.1016/j.ympev.2009.07.032.

**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.

**Lessa, E. P. (1992)** ‘Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations.’, *Molecular biology and evolution*, 9(2), pp. 323–330. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040723.

**Lorenz, R. et al. (2011)** ‘ViennaRNA Package 2.0’, *Algorithms for Molecular Biology*, 6(1). doi: 10.1186/1748-7188-6-26.

**Loxdale, H. D. and Lushai, G. (1998)** ‘Molecular markers in entomology’, *Bulletin of Entomological Research*, 88(6), pp. 577–600. doi: 10.1017/s0007485300054250.

**Margulis, L. (1970)** *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press.

**Michel, H. (2013)** ‘Respiratory Chain Complex IV’, in Lennarz, W. J. and Lane, M. D. (eds) *Encyclopedia of Biological Chemistry*.

**Mingchay, P. et al. (2014)** ‘Wolbachia supergroups A and B in natural populations of medically important filth flies (diptera: muscidae, calliphoridae, and sarcophagidae) in Thailand’, *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 45(2), pp. 309–318.

**Moore, W. S. (1995)** ‘Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees.’, *Evolution; international journal of organic evolution*, 49(4), pp. 718–726. doi: 10.1111/j.1558-5646.1995.tb02308.x.

**Nguyen, L.-T. et al. (2015)** ‘IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies’, *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), pp. 268–274. doi: 10.1093/molbev/msu300.

**Nishida, K. (1984)** ‘Experimental studies on the estimation of postmortem intervals by means of fly larvae infesting human cadavers.’, *Nihon hoigaku zasshi = The Japanese journal of legal medicine*, 38(1), pp. 24–41.

- O'Neill, S. L. et al. (1992)** '16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), pp. 2699–2702. doi: 10.1073/pnas.89.7.2699.
- De Oliveira, C. D. et al. (2015)** 'Broader prevalence of Wolbachia in insects including potential human disease vectors', *Bulletin of Entomological Research*, 105(3), pp. 305–315. doi: 10.1017/S0007485315000085.
- Palumbi, S. R. (1996)** 'Nucleic acids II: the polymerase chain reaction', in *Molecular Systematics Second Edition*. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 205–247.
- Pape, T. (1996)** 'Catalogue of the Sarcophagidae of the world', *Memoires of Entomology International*, 8(2), pp. 1–558.
- Park, J. H. et al. (2018)** 'Molecular identification of forensically important calliphoridae and sarcophagidae species using ITS2 nucleotide sequences', *Forensic Science International*, 284(January), pp. 1–4. doi: 10.1016/j.forsciint.2017.12.017.
- Parker, P. et al. (1998)** 'What Molecules Can Tell Us about Populations: Choosing and Using a Molecular Marker', *Aspen Bibliography*, 79. doi: 10.2307/176939.
- Peakall, R. and Smouse, P. E. (2012)** 'GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update', *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2012/07/20, 28(19), pp. 2537–2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Pentinsaari, M. et al. (2016)** 'Molecular evolution of a widely-adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life', *Scientific Reports*, 6(1), p. 35275. doi: 10.1038/srep35275.
- Pietri, J. E., DeBruhl, H. and Sullivan, W. (2016)** 'The rich somatic life of Wolbachia', *MicrobiologyOpen*. 2016/07/26, 5(6), pp. 923–936. doi: 10.1002/mbo3.390.
- Pohjoismäki, J. L. O. et al. (2010)** 'Indoors forensic entomology: colonization of human remains in closed environments by specific species of sarcosaprophagous flies.', *Forensic science international*, 199(1–3), pp. 38–42. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.02.033.
- Povolný, D. (2005)** 'Masařky dokládají geologickou minulost Sicílie', *Vesmír*, 84(2), pp. 85–88.
- Povolný, D. and Verves, Y. (1997)** *The Flesh-Flies of Central Europe (Insecta, Diptera, Sarcophagidae)*, SPIXIANA.
- Rambaut, A. (2009)** 'FigTree v1.4.4', *Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology*.
- Ratcliffe, S. T. et al. (2003)** 'PCR-RFLP identification of Diptera (Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae)--a generally applicable method.', *Journal of forensic sciences*, 48(4), pp. 783–785.
- 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.
- Roziah, A. and Tan, S. H. (2015)** 'Mitochondrial and Nuclear DNA for Identification of Forensically Important Flesh Flies (Sarcophagidae: Boettcherisca Spp)', *Entomology*,

*Ornithology & Herpetology: Current Research*, 04(04), pp. 10–13. doi: 10.4172/2161-0983.1000163.

**Schlötterer, C. et al. (1994)** ‘Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*’, *Molecular Biology and Evolution*, 11(3), pp. 513–522. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040131.

**Shang, Y. et al. (2019)** ‘Comparative Mitogenomic Analysis of Forensically Important Sarcophagid Flies (Diptera: Sarcophagidae) and Implications of Species Identification’, *Journal of Medical Entomology*, 56(2), pp. 392–407. doi: 10.1093/jme/tjy162.

**Shewell, G. . (1987)** ‘Sarcophagidae’, *Manual of Nearctic Diptera*, 2(28), pp. 1159–1186.

**Simon, C. et al. (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), pp. 651–701. doi: 10.1093/aesa/87.6.651.

**Smith, K. G. V. (1986)** *A manual of forensic entomology*. London: British Museum.

Song, Z. K., Wang, X. Z. and Liang, G. Q. (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), pp. 17–22. doi: 10.1016/j.forsciint.2007.04.227.

**Sperling, F. A., Anderson, G. S. and Hickey, D. A. (1994)** ‘A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation.’, *Journal of forensic sciences*, 39(2), pp. 418–427.

**Šuláková, H. (2006)** ‘Speciální biologie: využití hmyzu při stanovení post mortem intervalu’, *Kriminalistický sborník*, (3), pp. 36–37.

**Šuláková, H. (2014)** ‘Forezní entomologie – když smrt je začátek’, *Živa*, 5, pp. 250–256. Available at: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/foreznni-entomologie-kdyz-smrt-je-zacatek.pdf>.

**Šuláková, H. and Eliášová, H. (2012)** ‘Forezní entomologie’, in *Soudní lékařství a jeho moderní trendy*. Praha: Grada Publishing, pp. 281–325.

**Villablanca, F. X., Roderick, G. K. and Palumbi, S. R. (1998)** ‘Invasion genetics of the mediterranean fruit fly: Variation in multiple nuclear introns’, *Molecular Ecology*, 7(5), pp. 547–560. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00351.x.

**Waugh, J. (2007)** ‘DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls.’, *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 29(2), pp. 188–197. doi: 10.1002/bies.20529.

**Wells, J. D. and Sperling, F. A. (2001)** ‘DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae).’, *Forensic science international*, 120(1–2), pp. 110–115. doi: 10.1016/s0379-0738(01)00414-5.

**Wells, J. D. and Stevens, J. R. (2008)** ‘Application of DNA-based methods in forensic entomology’, *Annual Review of Entomology*, 53, pp. 103–120. doi: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091423.

**Werren, J. H., Baldo, L. and Clark, M. E. (2008)** ‘Wolbachia: master manipulators of

invertebrate biology', *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), pp. 741–751. doi: 10.1038/nrmicro1969.

**Whiting, M. F. (2002)** 'Phylogeny of the holometabolous insect orders: molecular evidence', *Zoologica Scripta*, 31(1), pp. 3–15. doi: <https://doi.org/10.1046/j.0300-3256.2001.00093.x>.

**Whitworth, T. L. et al. (2007)** 'DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae)', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1619), pp. 1731–1739. doi: 10.1098/rspb.2007.0062.

**Young, I. and Coleman, A. W. (2004)** 'The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: A *Drosophila* example', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(1), pp. 236–242. doi: 10.1016/S1055-7903(03)00178-7.

**Zaidi, F. et al. (2011)** 'Utility of multi-gene loci for forensic species diagnosis of blowflies', *Journal of Insect Science*, 11(59), pp. 1–12. doi: 10.1673/031.011.5901.

**Zehner, R. et al. (2004)** 'Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae).', *International journal of legal medicine*, 118(4), pp. 245–247. doi: 10.1007/s00414-004-0445-4.

**Zhou, W., Rousset, F. and O'Neil, S. (1998)** 'Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences', *Proceedings. Biological sciences*, 265(1395), pp. 509–515. doi: 10.1098/rspb.1998.0324.

#### **Internetové zdroje:**

<https://www.biolib.cz/>

<http://www.boldsystems.org/>

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

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

<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>

<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi/>

## 8. Přílohy

**Příloha 1:** Seznam stažených *COI* sekvencí *S. africa* z databáze BOLD/GenBank.

BOLD kód	GenBank kód	Země	Lokalita	Souřadnice	Zkratka
AUSFF011-08	JW200	Austrálie	New South Wales	-34,8358S; 148,916E	Safr-AUS-NSW1
AUSFF136-11	KM336	Austrálie	Rockingham, WA	32,266N; 115,716E	Safr-AUS-ROC
AUSFF137-11	KM461	Austrálie	Armadale, WA	32,116N; 116,016E	Safr-AUS-ARM1
AUSFF139-11	KM468	Austrálie	Armadale, WA	32,116N; 116,016E	Safr-AUS-ARM2
AUSFF140-11	KM471	Austrálie	Armadale, WA	32,116N; 116,016E	Safr-AUS-ARM3
AUSFF141-11	KM488	Austrálie	WA	31,916N; 116,316E	Safr-AUS-WA
AUSFF142-11	KM510	Austrálie	Dalby, Qld	27,183N; 151,25E	Safr-AUS-DAL
AUSFF143-11	KM618	Austrálie	Yeppoon, Qld	23,15N; 150,75E	Safr-AUS-YEP
AUSFF144-11	KM974	Austrálie	Kensington Gardens, SA	34,916N; 138,65E	Safr-AUS-KEN1
AUSFF145-11	KM977	Austrálie	Kensington Gardens, SA	34,916N; 138,65E	Safr-AUS-KEN2
AUSFF146-11	KM981	Austrálie	Kensington Gardens, SA	34,916N; 138,65E	Safr-AUS-KEN3
AUSFF147-11	KM982	Austrálie	Kensington Gardens, SA	34,916N; 138,65E	Safr-AUS-KEN4
GBDP12447-12	JQ413455	Keňa	Subukia	0,0133N; 36,248E	Safr-KEN-SUB1
GBDP12448-12	JQ413456	Francie	Le Soler	42,677N; 2,771E	Safr-FRA-LS1
GBDP12456-12	JQ582014	Francie	Saint-Guilhem-le-Désert	43,734N; 3,548E	Safr-FRA-SGLD
GBDP12457-12	JQ582015	Francie	Roquebrun	43,5N; 3,031E	Safr-FRA-ROQ
GBDP12560-12	JQ582118	Francie	Le Soler	42,677N; 2,771E	Safr-FRA-LS2
GBDP12561-12	JQ582119	Francie	Le Soler	42,677N; 2,771E	Safr-FRA-LS3
GBDP12562-12	JQ582120	Keňa	Subukia	0,013N; 36,248E	Safr-KEN-SUB2
GBDP14152-13	KF030486	USA	San Jose, Santa Clara County	37,371874N; -122,0097W	Safr-USA-SJ
GBDP14397-13	KF038001	Čína	Luoyang, Henan	34,691N; 112,458E	Safr-CHN-LUO1
GBDP14398-13	KF038000	Čína	Zhangzhou, Henan	34,7705N; 113,619E	Safr-CHN-ZHAN
GBDP14399-13	KF037999	Čína	Ordos, Inner mengaolia	39,793N; 110,008E	Safr-CHN-ORD
GBDP14400-13	KF037998	Čína	Urumqi, Xinjiang	43,841N; 87,531E	Safr-CHN-URU
GBDP15802-14	KC249715	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Safr-CHN-CHAN1
GBDP15803-14	KC249716	Čína	Xining	36,619N; 101,702E	Safr-CHN-XIN

GBDP15804-14	KC249717	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Safr-CHN-CHAN2
GBDP15930-15	KM279651	Čína	Chengdu, Sichuan	30,624N; 103,985E	Safr-CHN-CHEN
GBDP24366-19	KX161466	Španělsko	Ponferrada, León	42,549N; -6,595W	Safr-ESP-PON
GBDP24367-19	KX161467	Španělsko	Rincón de la Victoria, Málaga	36,716N; -4,283W	Safr-ESP-MAL1
GBDP24368-19	KX161468	Španělsko	Rincón de la Victoria, Málaga	36,716N; -4,28W	Safr-ESP-MAL2
GBDP24369-19	KX161469	Španělsko	Llagostera, Gerona	41.824989N; 2.884597E	Safr-ESP-LLAG
GBDP28550-19	MG434767	Itálie	Sicily, Catania	37,507913N; 15,076888E	Safr-ITA-SIC1
GBDP28551-19	MG434762	Itálie	Sicily, Catania	37,507913N; 15,076888E	Safr-ITA-SIC2
GBDP28552-19	MG434763	Itálie	Sicily, Catania	37,507913N; 15,076888E	Safr-ITA-SIC3
GBDP28553-19	MG434764	Itálie	Sicily, Catania	37,507913N; 15,076888E	Safr-ITA-SIC4
GBDP28554-19	MG434765	Itálie	Sicily, Catania	37,507913N; 15,076888E	Safr-ITA-SIC5
GBDP9232-10	GQ223343	USA	Coos Co., Oregon	43,307510N; - 124,166W	Safr-USA-OR
GBMIN20225-13	JX402731	USA	California, Los Angeles Co., CA	34,9N; -118,22W	Safr-USA-LA
GBMIN60144-17	KY001836	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Safr-CHN-CHAN3
GBMIN60145-17	KY001835	Čína	Guizhou, Guiyang	26,567739N; 106,640841E	Safr-CHN-GUI
GBMNA27776-19	MK547616	Austrálie	New South Wales, Orange	33,259N; 149,053514E	Safr-AUS-NSW2
GBMNA37003-19	MH187881	Čína	Luoyang, Henan	34,643004N; 112,283314E	Safr-CHN-LUO2
GBMNA37004-19	MH187882	Čína	Luoyang, Henan	34,643004N; 112,283314E	Safr-CHN-LUO3
GBMNB15080-20	MK679916	Španělsko	Alcoy (Alicante)	38,697633N; -0,482E	Safr-ESP-AL1
GBMNB15081-20	MK679917	Španělsko	Alcoy (Alicante)	38,697633N; -0,48E	Safr-ESP-AL2
GMEGT013-14	BIOUG14794-B12	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Safr-EGY-ALE
GMGMH293-14	BIOUG16895-F08	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Safr-DEU-RP
GMSAY040-14	BIOUG14723-G10	Jihoafrická republika	Gauteng	-26,026S; 27,545E	Safr-ZAF-GAU

**Příloha 2:** Seznam stažených *COI* sekvencí *S. albiceps* z databáze BOLD/GenBank.

<b>BOLD kód</b>	<b>GenBank kód</b>	<b>Země</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Souřadnice</b>	<b>Zkratka</b>
BCFOR466-15	BCFORENSIK_0072	Česká republika	Olomouc, Litovel-Brezove	49,689N; 17,126E	Salb-CZE-LIT
GBDP12504-12	JQ582062	Francie	Dompierre-sur-Besbre	46,521N; 3,682E	Salb-FRA-DSB1
GBDP12505-12	JQ582063	Francie	Dompierre-sur-Besbre	46,521N; 3,682E	Salb-FRA-DSB2
GBDP12538-12	JQ582096	Francie	Camélas	42,641N; 2,697E	Salb-FRA-CAM1
GBDP12539-12	JQ582097	Francie	Camélas	42,641N; 2,697E	Salb-FRA-CAM2
GBDP12556-12	JQ582114	Francie	Camélas	42,641N; 2,697E	Salb-FRA-CAM3
GBDP14417-13	KF037981	Čína	Xining, Qinghai	36,626N; 101,734E	Salb-CHN-XIN
GBDP14418-13	KF037980	Čína	Changsha, Hunan	36,619N; 101,72E	Salb-CHN-CHAN1
GBDP14419-13	KF037979	Čína	Zhangzhou, Henan	34,7705N; 113,619E	Salb-CHN-ZHAN
GBDP14420-13	KF037978	Čína	Luoyang, Henan	34,691N; 112,458E	Salb-CHN-LUO
GBDP15227-14	AB907176	Indie	Tamil Nadu	11,892N; 78,707E	Salb-IND-TN
GBDP15358-14	JX861469	Jižní Korea	Seoul	37,558N; 126,991E	Salb-KOR-SEO1
GBDP15359-14	JX861470	Jižní Korea	Seoul	37,558N; 126,991E	Salb-KOR-SEO2
GBDP15360-14	JX861471	Jižní Korea	Seoul	37,558N; 126,991E	Salb-KOR-SEO3
GBDP15361-14	JX861472	Jižní Korea	Seoul	37,558N; 126,991E	Salb-KOR-SEO4
GBDP15362-14	JX861473	Jižní Korea	Seoul	37,558N; 126,991E	Salb-KOR-SEO5
GBDP15805-14	KC249711	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN-CHAN2
GBDP15806-14	KC249712	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN-CHAN3
GBDP15934-15	KM279643	Čína	Chengdu, Sichuan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN-CHEN
GBDP15942-15	KM279642	Čína	Chongqing	28,158N; 112,854E	Salb-CHN-CHON
GBDP22635-19	KJ129147	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN-CHAN4
GBDP22636-19	KJ129148	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN-CHAN5
GBDP22637-19	KJ129149	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN-CHAN6
GBDP22638-19	KJ129150	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN-CHAN7
GBDP22639-19	KJ129151	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN-CHAN8
GBDP22640-19	KJ129152	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN-CHAN9
GBDP22641-19	KJ129153	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN-CHAN10

GBDP22642-19	KJ129154	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN11
GBDP22643-19	KJ129155	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN12
GBDP22644-19	KJ129156	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN13
GBDP22645-19	KJ129157	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN14
GBDP22646-19	KJ129158	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN15
GBDP22647-19	KJ129159	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN16
GBDP22648-19	KJ129160	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN17
GBDP22649-19	KJ129161	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN18
GBDP22650-19	KJ129162	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN19
GBDP22651-19	KJ129163	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN20
GBDP22652-19	KJ129164	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN21
GBDP22653-19	KJ129165	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN22
GBDP22654-19	KJ129166	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN23
GBDP22655-19	KJ129167	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN24
GBDP22656-19	KJ129168	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN25
GBDP22657-19	KJ129169	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN26
GBDP22658-19	KJ129170	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN27
GBDP22659-19	KJ129171	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN28
GBDP22660-19	KJ129172	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN29
GBDP22661-19	KJ129173	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN30
GBDP22662-19	KJ129174	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN31
GBDP22663-19	KJ129175	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN32
GBDP22664-19	KJ129176	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN33
GBDP22665-19	KJ129177	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN34
GBDP22666-19	KJ129178	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN35
GBDP22667-19	KJ129179	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN36
GBDP23973-19	KR150135	Čína	Chaohu	31,6475N; 117,878E	Salb-CHN- CHAO1
GBDP24353-19	KX161498	Španělsko	Badalona, Barcelona	41,439N; 2,223E	Salb-ESP-BAD
GBDP25504-19	KY749778	Polsko	Toruń	52,9575N; 18,5714E	Salb-POL-TOR



GBMIN60148-17	KR150123	Čína	Ruhu	23,1838N; 114,516E	Salb-CHN- RUH1
GBMIN60149-17	KR150124	Čína	Ruhu	23,1838N; 114,516E	Salb-CHN- RUH2
GBMIN60150-17	KR150136	Čína	Chaohu	31,6475N; 117,878E	Salb-CHN- CHAO2
GBMIN60151-17	KR150134	Čína	Chaohu	31,6475N; 117,878E	Salb-CHN- CHAO3
GBMIN60152-17	GQ912668	Pákistán	Rawalpindi	33,578N; 72,9787E	Salb-PAK-RAW
GBMNA27959-19	MH765515	Thajsko	Baan Bua	15,13N; 104,91E	Salb-THA-BB
GBMNA27960-19	MH765516	Thajsko	Thake Ban National Park	6,71N; 100,17E	Salb-THA-TB
GBMNA9829-19	KT444443	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN37
GBMTG5861-16	NC_028413	Čína	Changsha, Hunan	28,158N; 112,854E	Salb-CHN- CHAN38
GMBCB1782-15	BIOUG21563-D03	Bangladéš	Chittagong	22,4685N; 91,7808E	Salb-BGD- CHIT1
GMBC1692-15	BIOUG21670-E04	Bangladéš	Chittagong	22,4685N; 91,7808E	Salb-BGD- CHIT2
GMBC2255-15	BIOUG22945-D02	Bangladéš	Chittagong	22,4685N; 91,7808E	Salb-BGD- CHIT3
GMBCD3114-15	BIOUG23285-A01	Bangladéš	Chittagong	22,4685N; 91,7808E	Salb-BGD- CHIT4
GMBCD3168-15	BIOUG23285-E07	Bangladéš	Chittagong	22,4685N; 91,7808E	Salb-BGD- CHIT5
GMBCE2154-15	BIOUG23287-D04	Bangladéš	Chittagong	22,4685N; 91,7808E	Salb-BGD- CHIT6
GMBCI4779-15	BIOUG24887-B01	Bangladéš	Chittagong	22,4685N; 91,7808E	Salb-BGD- CHIT7
GMBCI4813-15	BIOUG24887-D11	Bangladéš	Chittagong	22,4685N; 91,7808E	Salb-BGD- CHIT8
GMBCM2536-15	BIOUG25201-D08	Bangladéš	Chittagong	22,4685N; 91,7808E	Salb-BGD- CHIT9
GMGMB066-14	BIOUG16267-G09	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Salb-DEU-RP1
GMGMB067-14	BIOUG16267-G10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Salb-DEU-RP2
GMSUB400-14	BIOUG17671-A07	Saúdská Arábie	Makkah, Jeddah	21,795N; 39,711E	Salb-SAU-MAK
MADIP629-12	NIBGE DIP- 00629	Pákistán	Punjab, Bahawalpur	34,02N; 71,37E	Salb-PAK-PUN

**Příloha 3:** Seznam stažených *COI* sekvencí *S. argyrostoma* z databáze BOLD/GenBank.

<b>BOLD kód</b>	<b>GenBank kód</b>	<b>Země</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Souřadnice</b>	<b>Zkratka</b>
GBDP12440-12	JQ413448	Belgie	Gent	51,042N; 3,7014E	Sarg-BEL-GEN
GBDP12441-12	JQ413449	Francie	Jaligny/Besbre	46,379N; 3,591E	Sarg-FRA-BES
GBDP12442-12	JQ413450	Francie	Le Soler	42,677N; 2,771E	Sarg-FRA-LS
GBDP12443-12	JQ413451	Belgie	Laeken	50,889N; 4,374E	Sarg-BEL-LAE
GBDP23730-19	KY316532	Itálie	Janov	44,455225N; 8,829023E	Sarg-ITA-JAN1
GBDP24328-19	KX161470	Španělsko	Llagostera (Girona)	41,818081N; 2,888974E	Sarg-ESP-LLAG
GBDP24329-19	KX161471	Španělsko	Zaragoza (Zaragoza)	41,643204N; -0,889147W	Sarg-ESP-ZAR
GBDP24330-19	KX161472	Španělsko	Coca (Segovia)	41,212426N; -4,517807W	Sarg-ESP-COC
GBDP24331-19	KX161473	Španělsko	Almazán (Soria)	41,487195N; -2,504447W	Sarg-ESP-ALM
GBMIN60164-17	KY316519	Itálie	Janov	44,455225N; 8,829023E	Sarg-ITA-JAN2
GBDP28559-19	MG434766	Itálie	Catania (Sicily)	37,497841N; 15,057259E	Sarg-ITA-CAT1
GBMIN60166-17	KY316536	Itálie	Janov	44,455225N; 8,829023E	Sarg-ITA-JAN3
GBMIN60167-17	KY316522	Itálie	Janov	44,455225N; 8,829023E	Sarg-ITA-JAN4
GBMNB14983-20	MK679819	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC1
GBMNB14984-20	MK679820	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC2
GBMNB14985-20	MK679821	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC3
GBMNB14986-20	MK679822	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC4
GBMNB14987-20	MK679823	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC5
GBMNB14988-20	MK679824	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC6
GBMNB14989-20	MK679825	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC7
GBMNB14990-20	MK679826	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC8
GBMNB14991-20	MK679827	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC9
GBMNB14992-20	MK679828	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC10
GBMNB14993-20	MK679829	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC11
GBMNB14994-20	MK679830	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC12
GBMNB14995-20	MK679831	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC13
GBMNB14996-20	MK679832	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC14
GBMNB14997-20	MK679833	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC15

GBMNB14998-20	MK679834	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC16
GBMNB14999-20	MK679835	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC17
GBMNB15000-20	MK679836	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC18
GBMNB15001-20	MK679837	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC19
GBMNB15002-20	MK679838	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC20
GBMNB15003-20	MK679839	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC21
GBMNB15004-20	MK679840	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC22
GBMNB15005-20	MK679841	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC23
GBMNB15006-20	MK679842	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC24
GBMNB15007-20	MK679843	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC25
GBMNB15008-20	MK679844	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC26
GBMNB15009-20	MK679845	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC27
GBMNB15010-20	MK679846	Španělsko	Alicante	38,354320N; -0,497933W	Sarg-ESP-ALIC28
GBMND93778-21	MZ189703	Itálie	Cesena	44,154107N; 12,231218E	Sarg-ITA-CES
SASI001-15		Itálie	Catania (Sicily)	37,497841N; 15,057259E	Sarg-ITA-CAT2

**Příloha 4:** Seznam stažených *COI* sekvencí *S. caerulescens* z databáze BOLD/GenBank.

<b>BOLD kód</b>	<b>GenBank kód</b>	<b>Země</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Souřadnice</b>	<b>Zkratka</b>
BBDCP242-10	10BBCDIP-1957	Kanada	British Columbia	51,443N; -116,542W	Scae-CAN- BC1
BBDCP243-10	10BBCDIP-1958	Kanada	British Columbia	51,443N; -116,542W	Scae-CAN- BC2
BBDCP245-10	10BBCDIP-1960	Kanada	Alberta	53,687N; -112,813W	Scae-CAN- ALB1
BBDEC073-09	09BBEDI-0073	Kanada	Nova Scotia	46,812N; -60,768W	Scae-CAN- NS1
BBDEC074-09	09BBEDI-0074	Kanada	Nova Scotia	46,655N; -60,372W	Scae-CAN- NS2
BBDEC076-09	09BBEDI-0076	Kanada	Nova Scotia	46,812N; -60,768W	Scae-CAN- NS3
BBDED301-10	09BBEDI-1283	Kanada	Nova Scotia	44,383N; -65,202W	Scae-CAN- NS4
BBDEE788-10	09BBEDI-2751	Kanada	Nova Scotia	46,713N; -60,383W	Scae-CAN- NS5
BCFOR701-15	BCFORENSIK0710	Francie	Nord-Pas-de-Calais	50,5306N; 3,47639E	Scae-FRA- NPDC1
BCFOR727-15	BCFORENSIK0736	Francie	Nord-Pas-de-Calais	50,5132N; 3,03043E	Scae-FRA- NPDC2
BCFOR733-15	BCFORENSIK0742	Francie	Nord-Pas-de-Calais	50,5306N; 3,47639E	Scae-FRA- NPDC3
CNEID3042-12	BIOUG03647-H10	Kanada	Alberta	53,685N; -112,86W	Scae-CAN- ALB2
CNEID3171-12	BIOUG03718-D11	Kanada	Alberta	53,685N; -112,86W	Scae-CAN- ALB3
CNLMS127-14	BIOUG14404-D12	Kanada	Quebec	46,6507N; -72,9698W	Scae-CAN- QB1
CNMIF780-14	BIOUG12409-D10	Kanada	Quebec	50,2135N; -63,7979W	Scae-CAN- QB2
DRYAS11081-15	24538-F01	Rusko	Khibiny	67,594N; 33,699E	Scae-RUS- Khib1
DRYAS13530-15	24468-D08	Rusko	Khibiny	67,594N; 33,699E	Scae-RUS- Khib2
GBDP12506-12	JQ582064	Francie	Etaples	50,514N; 1,637E	Scae-FRA- ETAP
GBDP12507-12	JQ582065	Francie	Saint-Privat-la-Montagne	40,189N; 6,035E	Scae-FRA- SPLM
GBDP12548-12	JQ582106	Belgie	Arlon	49,65N; 5,752E	Scae-BEL- AR
GBDP12550-12	JQ582108	Belgie	Steendorp	51,124N; 4,247E	Scae-BEL- STE1
GBDP12552-12	JQ582110	Belgie	Steendorp	51,124N; 4,247E	Scae-BEL- STE2
GBDP12553-12	JQ582111	Belgie	Steendorp	51,124N; 4,247E	Scae-BEL- STE3
GBDP12554-12	JQ582112	Belgie	Steendorp	51,124N; 4,247E	Scae-BEL- STE4
GBDP24304-19	KX161501	Španělsko	San Sebastian, Guipuzcoa	43,31N; -1,988W	Scae-ESP-SS
GBDP24305-19	KX161502	Španělsko	Betanzos, La Corunna	43,277N; -8,217W	Scae-ESP- BET1
GBDP24306-19	KX161503	Španělsko	Arrigorriaga, Vizcaya	43,211N; -2,894W	Scae-ESP- ARRI

GBDP24307-19	KX161504	Španělsko	Betanzos, La Corunna	43,277N; -8,217W	Scae-ESP-BET2
GBDP7835-09	FJ715747	Finsko	Nokia	61,4678N; 23,5097E	Scae-FIN-NOK
GMGMJ220-14	BIOUG17070-A09	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scae-DEU-RP1
GMGMJ455-14	BIOUG17026-F03	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scae-DEU-RP2
GMGML1399-14	BIOUG17271-B12	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scae-DEU-RP3
GMOLH005-15	BIOUG22954-G11	Kanada	Northwest Territories	68,3261N; -133,634W	Scae-CAN-NOR
JSDIQ840-10	10JSROW-1840	Kanada	Ontario	44,621N; -75,773W	Scae-CAN-ONT1
JSDIR767-11	BIOUG00867-C04	Kanada	Ontario	44,621N; -75,773W	Scae-CAN-ONT2
MOBIL10185-19	BOLD-3O02UFPH6	USA	Alaska	64,8595N; -147,845W	Scae-USA-AL
RBINA5373-13	BIOUG08060-A03	Kanada	Ontario	43,8444N; -79,197W	Scae-CAN-ONT3
SMTPD5148-13	BIOUG08664-D11	Kanada	Ontario	43,528N; -80,229W	Scae-CAN-ONT4
SMTPI9241-14	BIOUG16072-C04	Kanada	Ontario	43,341N; -80,297W	Scae-CAN-ONT5
SMTPI9242-14	BIOUG16072-C05	Kanada	Ontario	43,341N; -80,297W	Scae-CAN-ONT6
SSEIA461-13	BIOUG04821-H09	Kanada	Alberta	53,567N; -112,841W	Scae-CAN-ALB4
SSEIA462-13	BIOUG04821-H10	Kanada	Alberta	53,567N; -112,841W	Scae-CAN-ALB5
SSEIA463-13	BIOUG04821-H11	Kanada	Alberta	53,567N; -112,841W	Scae-CAN-ALB6
SSEIA7987-13	BIOUG05439-A08	Kanada	Alberta	53,567N; -112,841W	Scae-CAN-ALB7
SSEIA995-13	BIOUG04829-A01	Kanada	Alberta	53,567N; -112,841W	Scae-CAN-ALB8
SSEID1969-13	BIOUG08182-C05	Kanada	Alberta	53,567N; -112,841W	Scae-CAN-ALB9
SSEID2295-13	BIOUG08186-A06	Kanada	Alberta	53,567N; -112,841W	Scae-CAN-ALB10
SSEID2315-13	BIOUG08186-C02	Kanada	Alberta	53,567N; -112,841W	Scae-CAN-ALB11
SSEID2334-13	BIOUG08186-D09	Kanada	Alberta	53,567N; -112,841W	Scae-CAN-ALB12
SSEID2335-13	BIOUG08186-D10	Kanada	Alberta	53,567N; -112,841W	Scae-CAN-ALB13
SSEID2357-13	BIOUG08186-F08	Kanada	Alberta	53,567N; -112,841W	Scae-CAN-ALB14
SSEID2359-13	BIOUG08186-F10	Kanada	Alberta	53,567N; -112,841W	Scae-CAN-ALB15
SSEID2646-13	BIOUG08222-E10	Kanada	Alberta	53,567N; -112,841W	Scae-CAN-ALB16
SSGBB7050-14	BIOUG14531-F11	Kanada	Newfoundland and Labrador	49,429N; -57,741W	Scae-CAN-NL
SSGLA1651-15	BIOUG22777-G12	Kanada	British Columbia	51,361N; -117,429W	Scae-CAN-BC3
SSJAE10647-13	BIOUG08954-A12	Kanada	Alberta	53,193N; -117,954W	Scae-CAN-ALB17

SSJAE5989-13	BIOUG08704-D12	Kanada	Alberta	53,193N; -117,954W	Scae-CAN- ALB18
SSJAE6191-13	BIOUG08706-E12	Kanada	Alberta	53,193N; -117,954W	Scae-CAN- ALB19
SSJAE6293-13	BIOUG08707-F07	Kanada	Alberta	53,193N; -117,954W	Scae-CAN- ALB20
SSJAE6294-13	BIOUG08707-F08	Kanada	Alberta	53,193N; -117,954W	Scae-CAN- ALB21
SSKUA12814-15	BIOUG27387-E08	Kanada	Yukon Territory	60,714N; -137,434W	Scae-CAN- YT1
SSKUA12815-15	BIOUG27387-E09	Kanada	Yukon Territory	60,714N; -137,434W	Scae-CAN- YT2
SSKUA12818-15	BIOUG27387-E12	Kanada	Yukon Territory	60,714N; -137,434W	Scae-CAN- YT3
SSKUA12819-15	BIOUG27387-F01	Kanada	Yukon Territory	60,714N; -137,434W	Scae-CAN- YT4
SSKUA12820-15	BIOUG27387-F02	Kanada	Yukon Territory	60,714N; -137,434W	Scae-CAN- YT5
SSKUA12821-15	BIOUG27387-F03	Kanada	Yukon Territory	60,714N; -137,434W	Scae-CAN- YT6
SSKUA9034-15	BIOUG27155-A03	Kanada	Yukon Territory	60,714N; -137,434W	Scae-CAN- YT7
SSKUA9040-15	BIOUG27155-A09	Kanada	Yukon Territory	60,714N; -137,434W	Scae-CAN- YT8
SSKUB11754-15	BIOUG27466-B02	Kanada	Yukon Territory	60,748N; -137,513W	Scae-CAN- YT9
SSKUB12505-15	BIOUG27506-C10	Kanada	Yukon Territory	60,748N; -137,513W	Scae-CAN- YT10
SSPAA5681-13	BIOUG06143-E04	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS1
SSPAA5684-13	BIOUG06143-E07	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS2
SSPAA6245-13	BIOUG06203-A10	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS3
SSPAA6246-13	BIOUG06203-A11	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS4
SSPAA6247-13	BIOUG06203-A12	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS5
SSPAA6248-13	BIOUG06203-B01	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS6
SSPAA6249-13	BIOUG06203-B02	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS7
SSPAA6250-13	BIOUG06203-B03	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS8
SSPAA6251-13	BIOUG06203-B04	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS9
SSPAA6252-13	BIOUG06203-B05	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS10
SSPAA6253-13	BIOUG06203-B06	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS11
SSPAA6254-13	BIOUG06203-B07	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS12
SSPAA6255-13	BIOUG06203-B08	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS13
SSPAA6256-13	BIOUG06203-B09	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS14
SSPAA6257-13	BIOUG06203-B10	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN- SAS15

SSPAA6258-13	BIOUG06203-B11	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS16
SSPAA6259-13	BIOUG06203-B12	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS17
SSPAA6260-13	BIOUG06203-C01	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS18
SSPAA6261-13	BIOUG06203-C02	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS19
SSPAA6262-13	BIOUG06203-C03	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS20
SSPAA6263-13	BIOUG06203-C04	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS21
SSPAA6264-13	BIOUG06203-C05	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS22
SSPAA6265-13	BIOUG06203-C06	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS23
SSPAA6266-13	BIOUG06203-C07	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS24
SSPAA6267-13	BIOUG06203-C08	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS25
SSPAA6268-13	BIOUG06203-C09	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS26
SSPAA6269-13	BIOUG06203-C10	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS27
SSPAA6270-13	BIOUG06203-C11	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS28
SSPAA6271-13	BIOUG06203-C12	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS29
SSPAA6272-13	BIOUG06203-D01	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS30
SSPAA6273-13	BIOUG06203-D02	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS31
SSPAA6274-13	BIOUG06203-D03	Kanada	Saskatchewan	53,9055N; -106,025W	Scae-CAN-SAS32
SSWLD3934-13	BIOUG06464-A06	Kanada	Alberta	49,065N; -113,778W	Scae-CAN-ALB22
SSWLE7641-13	BIOUG08962-B05	Kanada	Alberta	49,088N; -113,883W	Scae-CAN-ALB23

**Příloha 5:** Seznam stažených *COI* sekvencí *S. carnaria* z databáze BOLD/GenBank.

<b>BOLD kód</b>	<b>GenBank kód</b>	<b>Země</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Souřadnice</b>	<b>Zkratka</b>
BCFOR736-15	BCFORENSIK0745	Francie	Nord-Pas-de-Calais	50,5306N; 3,47639E	Scar-FRA- NPDC
GBDP12444-12	JQ413452	Belgie	Oud-Heverlee	50,813N; 4,686E	Scar-BEL- OH
GBDP12536-12	JQ582094	Francie	Le Soler	42,677N; 2,771E	Scar-FRA- LS
GBDP12555-12	JQ582113	Belgie	Gembloux	50,565N; 4,247E	Scar-BEL- GEM
GBDP9233-10	GQ223342	Dánsko	Lejre	50,593N; 11,955E	Scar-DNK- LEJ
GBMNA27541-19	MH118259	Velká Británie	Salisbury	51,2779N; - 1,957W	Scar-GBR- SAL1
GBMNA27542-19	MH118258	Velká Británie	Salisbury	51,2779N; - 1,957W	Scar-GBR- SAL2
GBMNA27543-19	MH118257	Velká Británie	Tadley	51,3475N; - 1,121W	Scar-GBR- TAD1
GBMNA27544-19	MH118260	Velká Británie	Tadley	51,3475N; - 1,121W	Scar-GBR- TAD2
GBMNA27545-19	MH118256	Česká republika	Jetřichovice	50,8549N; 14,4054E	Scar-CZE- JET
GBMNA27568-19	MH118252	Itálie	Bolzano-Bozen	46,5199N; 11,5228E	Scar-ITA- BOL1
GBMNA27569-19	MH118253	Itálie	Bolzano-Bozen	46,5199N; 11,5228E	Scar-ITA- BOL2
GBMNA27570-19	MH118254	Itálie	Bolzano-Bozen	46,5199N; 11,5228E	Scar-ITA- BOL3
GBMNA27571-19	MH118255	Itálie	Bolzano-Bozen	46,5199N; 11,5228E	Scar-ITA- BOL4
GBMNA29109-19	MH118176	Francie	Briançon	44,8998N; 6,64201E	Scar-FRA- BRIA1
GBMNA29110-19	MH118177	Francie	Briançon	44,8998N; 6,64201E	Scar-FRA- BRIA2
GBMNA29115-19	MH118182	Francie	Chaudeney-sur-Moselle	48,6345N; 5,902E	Scar-FRA- CHSM
GMGMA318-14	BIOUG15980-C02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP1
GMGMA327-14	BIOUG15980-C11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP2
GMGMA629-14	BIOUG16211-E04	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP3
GMGMB020-14	BIOUG16267-C11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP4
GMGMB031-14	BIOUG16267-D10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP5
GMGMB043-14	BIOUG16267-E10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP6
GMGMB051-14	BIOUG16267-F06	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP7
GMGMB058-14	BIOUG16267-G01	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP8
GMGMB065-14	BIOUG16267-G08	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP9
GMGMB576-14	BIOUG16273-G04	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP10



GMGMB582-14	BIOUG16273-G10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP11
GMGMB583-14	BIOUG16273-G11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP12
GMGMB585-14	BIOUG16273-H01	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP13
GMGMB586-14	BIOUG16273-H02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP14
GMGMB588-14	BIOUG16273-H04	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP15
GMGMB590-14	BIOUG16273-H06	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP16
GMGMB591-14	BIOUG16273-H07	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP17
GMGMB752-14	BIOUG16275-F02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP18
GMGMC047-14	BIOUG16353-F08	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP19
GMGMC054-14	BIOUG16353-G03	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP20
GMGMC058-14	BIOUG16353-G07	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP21
GMGMC069-14	BIOUG16353-H06	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP22
GMGMD213-14	BIOUG16607-E09	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP23
GMGMD215-14	BIOUG16607-E11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP24
GMGMD250-14	BIOUG16607-H10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP25
GMGME139-14	BIOUG16648-E10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP26
GMGMH1259-14	BIOUG17000-A02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP27
GMGMH1354-14	BIOUG17017-A02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP28
GMGMI110-14	BIOUG17085-A10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP29
GMGMI115-14	BIOUG17085-B03	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP30
GMGMI126-14	BIOUG17085-C02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP31
GMGMI139-14	BIOUG17085-D03	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP32
GMGMI148-14	BIOUG17085-D12	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP33
GMGMI177-14	BIOUG17085-G05	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP34
GMGMJ241-14	BIOUG17070-C06	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP35
GMGMJ326-14	BIOUG17071-B08	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP36
GMGMK043-14	BIOUG17071-E11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP37
GMGMK047-14	BIOUG17071-F03	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP38
GMGMK048-14	BIOUG17071-F04	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP39

GMGMK064-14	BIOUG17071-G08	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP40
GMGMK068-14	BIOUG17071-G12	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP41
GMGMK074-14	BIOUG17071-H06	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP42
GMGMK274-14	BIOUG17175-A05	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP43
GMGMK306-14	BIOUG17175-D01	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP44
GMGML074-14	BIOUG17228-F10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP45
GMGML076-14	BIOUG17228-F12	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP46
GMGML080-14	BIOUG17228-G04	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP47
GMGML084-14	BIOUG17228-G08	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP48
GMGML086-14	BIOUG17228-G10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP49
GMGML087-14	BIOUG17228-G11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP50
GMGML088-14	BIOUG17228-G12	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP51
GMGML089-14	BIOUG17228-H01	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP52
GMGML090-14	BIOUG17228-H02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP53
GMGML093-14	BIOUG17228-H05	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP54
GMGML094-14	BIOUG17228-H06	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP55
GMGML096-14	BIOUG17228-H08	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP56
GMGML098-14	BIOUG17228-H10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP57
GMGML205-14	BIOUG17230-A11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP58
GMGML208-14	BIOUG17230-B02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP59
GMGML213-14	BIOUG17230-B07	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP60
GMGML214-14	BIOUG17230-B08	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP61
GMGML217-14	BIOUG17230-B11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP62
GMGML221-14	BIOUG17230-C03	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP63
GMGML222-14	BIOUG17230-C04	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP64
GMGML232-14	BIOUG17230-D02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP65
GMGML233-14	BIOUG17230-D03	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP66
GMGML238-14	BIOUG17230-D08	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP67
GMGML249-14	BIOUG17230-E07	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP68

GMGML256-14	BIOUG17230-F02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP69
GMGML278-14	BIOUG17230-G12	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP70
GMGML279-14	BIOUG17230-H01	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP71
GMGMM206-14	BIOUG17298-B02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP72
GMGMM215-14	BIOUG17298-B11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP73
GMGMM235-14	BIOUG17298-D07	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP74
GMGMM239-14	BIOUG17298-D11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP75
GMGMM249-14	BIOUG17298-E09	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP76
GMGMM252-14	BIOUG17298-E12	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP77
GMGMM254-14	BIOUG17298-F02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP78
GMGMM257-14	BIOUG17298-F05	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP79
GMGMM262-14	BIOUG17298-F10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP80
GMGMM265-14	BIOUG17298-G01	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP81
GMGMM267-14	BIOUG17298-G03	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP82
GMGMM268-14	BIOUG17298-G04	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP83
GMGMM270-14	BIOUG17298-G06	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP84
GMGMM275-14	BIOUG17298-G11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP85
GMGMM278-14	BIOUG17298-H02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP86
GMGMN202-14	BIOUG17382-E08	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP87
GMGMN221-14	BIOUG17382-G03	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Scar-DEU- RP88
GMGRB1541-13	BIOUG05265-F12	Německo	Bavaria, Niederbayern	48,9509N; 13,422E	Scar-DEU- BAV-1
GMGRB2087-13	BIOUG06405-C08	Německo	Bavaria, Niederbayern	48,9509N; 13,422E	Scar-DEU- BAV-2
GMGRC3027-13	BIOUG06405-F04	Německo	Bavaria, Niederbayern	48,9509N; 13,422E	Scar-DEU- BAV-3
GMGRC3032-13	BIOUG06405-F09	Německo	Bavaria, Niederbayern	48,9509N; 13,422E	Scar-DEU- BAV-4
GMGRF6347-13	BIOUG07948-A08	Německo	Bavaria, Niederbayern	48,9509N; 13,422E	Scar-DEU- BAV-5
GMGRF6349-13	BIOUG07948-A10	Německo	Bavaria, Niederbayern	48,9509N; 13,422E	Scar-DEU- BAV-6
GMGRF6353-13	BIOUG07948-B02	Německo	Bavaria, Niederbayern	48,9509N; 13,422E	Scar-DEU- BAV-7
GMGRF6360-13	BIOUG07948-B09	Německo	Bavaria, Niederbayern	48,9509N; 13,422E	Scar-DEU- BAV-8
GMGRF6364-13	BIOUG07948-C01	Německo	Bavaria, Niederbayern	48,9509N; 13,422E	Scar-DEU- BAV-9

GMGRG4861-13	BIOUG08215-A01	Německo	Bavaria, Niederbayern	48,9509N; 13,422E	Scar-DEU-BAV-10
GMGRG4862-13	BIOUG08215-A02	Německo	Bavaria, Niederbayern	48,9509N; 13,422E	Scar-DEU-BAV-11
GMGRH2097-13	BIOUG08215-C03	Německo	Bavaria, Niederbayern	48,9509N; 13,422E	Scar-DEU-BAV-12

**Příloha 6:** Seznam stažených *COI* sekvencí *S. incisilobata* z databáze BOLD/GenBank.

<b>BOLD kód</b>	<b>GenBank kód</b>	<b>Země</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Souřadnice</b>	<b>Zkratka</b>
GBDP12534-12	JQ582092	Francie	Le Soler	42,677N; 2,771E	Sinc-FRA-LS
GMBUC147-14		Bulharsko	Sofiya, Godech	43,009N; 23,058E	Sinc-BGR-SOF1
GMBUD162-14		Bulharsko	Sofiya, Godech	43,009N; 23,058E	Sinc-BGR-SOF2
GMGMA363-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP1
GMGMA649-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP2
GMGMA853-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP3
GMGMB047-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP4
GMGMB060-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP5
GMGMB744-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP6
GMGMB754-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP7
GMGMH070-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP8
GMGMH1286-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP9
GMGMI1137-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP10
GMGMI323-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP11
GMGMK039-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP12
GMGMK057-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP13
GMGMK1133-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP14
GMGMK1146-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP15
GMGMK320-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP16
GMGMK523-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP17
GMGML432-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP18
GMGML488-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP19
GMGMM1020-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP20
GMGMM1036-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP21

GMGMM509-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP22
GMGMN1238-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Sinc-DEU-RP23
GMGMN1500-14		Německo	Bavaria, Oberbayern	48,1333N; 11,5667E	Sinc-DEU-BAV

**Příloha 7:** Seznam stažených *COI* sekvencí *S. lehmanni* z databáze BOLD/GenBank.

<b>BOLD kód</b>	<b>GenBank kód</b>	<b>Země</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Souřadnice</b>	<b>Zkratka</b>
GBDP12450-12	JQ413458	Francie	Le Soler	42,677N; 2,771E	Sleh-FRA-LS1
GBDP12537-12	JQ582095	Francie	Le Soler	42,677N; 2,771E	Sleh-FRA-LS2
GBDP12542-12	JQ582100	Francie	Le Soler	42,677N; 2,771E	Sleh-FRA-LS3
GBDP12557-12	JQ582115	Francie	Camélas	42,641N; 2,696E	Sleh-FRA-CAM
GBDP12558-12	JQ582116	Francie	Le Soler	42,677N; 2,771E	Sleh-FRA-LS4
GBDP12559-12	JQ582117	Francie	Le Soler	42,677N; 2,771E	Sleh-FRA-LS5
GBDP13967-13	JQ806823	USA	Findlay, OH 45840	41.041N; -83.643W	Sleh-USA-FIN
GBDP24285-19	KX161480	Španělsko	La Roda (Albacete)	39.188N; -2.173W	Sleh-ESP-LR1
GBDP24286-19	KX161481	Španělsko	Barannain (Navarra)	42.803N; -1.686W	Sleh-ESP-BAR
GBDP24287-19	KX161482	Španělsko	La Roda (Albacete)	39.189N; -2.172W	Sleh-ESP-LR2
GBMNA27504-19	MH118213	Itálie	Berceto, Provincie Parma	44.502N; 9.976E	Sleh-ITA-BER
GBMNA27505-19	MH118215	Itálie	Seravezza, Provincie Lucca	44.0063N; 10.233E	Sleh-ITA-SER
GBMNA27506-19	MH118216	Itálie	Str. Campagnolo, Marmiolo	45.2059N; 10.742E	Sleh-ITA-CAM
GBMNA27507-19	MH118217	Itálie	Rosello, Provincie Chieti	41.8888N; 14.351E	Sleh-ITA-ROS
GBMNA27508-19	MH118214	Itálie	Monte Sant'Angelo	41.806N; 15.982E	Sleh-ITA-MSA
GBMNA27509-19	MH118218	Itálie	Chiaromonte PZ	40.059N; 16.152E	Sleh-ITA-CHIA
GBMNA27565-19	MH118212	Česká republika	Jetřichovice	50.854N; 14.405E	Sleh-CZE-JET
GBMNA29111-19	MH118178	Řecko	Tsotili	40.217N; 21.200E	Sleh-GRC-TSO

**Příloha 8:** Seznam stažených *COI* sekvencí *S. noverca* z databáze BOLD/GenBank.

<b>BOLD kód</b>	<b>GenBank kód</b>	<b>Země</b>	<b>Lokality</b>	<b>Souřadnice</b>	<b>Zkratka</b>
GBDP12466-12	JQ582024	Francie	Metz	49,116N; 6,173E	Snov-FRA-MZ
GBDP12467-12	JQ582025	Francie	Moutiers	45,485N; 6,527E	Snov-FRA-MO
GBMIN60345-17	KU746545	Itálie	Roma	41.940N; 12.410E	Snov-ITA-ROM
GMBUG357-14		Bulharsko	Sofiya, Godech	43.009N; 23.058E	Snov-BGR-SOF
GMGMK301-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50.552N; 7,17E	Snov-DEU-RP1
GMGMK322-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50.552N; 7,17E	Snov-DEU-RP2
GMGMM250-14		Německo	Rhineland-Palatinate	50.552N; 7,17E	Snov-DEU-RP3

**Příloha 9:** Seznam stažených *COI* sekvencí *S. variegata* z databáze BOLD/GenBank.

<b>BOLD kód</b>	<b>GenBank kód</b>	<b>Země</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Souřadnice</b>	<b>Zkratka</b>
GBDP12518-12	JQ582076	Francie	Saint-Etienne d'Issensac	43,845N; 3,704E	Svar-FRA-SED
GBDP12532-12	JQ582090	Belgie	Oud-Heverlee	50,813N; 40,686E	Svar-BEL-OH1
GBDP12533-12	JQ582091	Belgie	Oud-Heverlee	50,813N; 40,686E	Svar-BEL-OH2
GBDP12540-12	JQ582098	Francie	Le Soler	42,677N; 2,771E	Svar-FRA-LS1
GBDP12543-12	JQ582101	Francie	Le Soler	42,677N; 2,771E	Svar-FRA-LS2
GBDP12544-12	JQ582102	Belgie	Watervliet	50,285N; 3,607E	Svar-BEL-WAT1
GBDP12545-12	JQ582103	Belgie	Watervliet	50,285N; 3,607E	Svar-BEL-WAT2
GBDP12547-12	JQ582105	Belgie	Watervliet	50,285N; 3,607E	Svar-BEL-WAT3
GBDP12549-12	JQ582107	Belgie	Watervliet	50,285N; 3,607E	Svar-BEL-WAT4
GBDP12551-12	JQ582109	Belgie	Watervliet	50,285N; 3,607E	Svar-BEL-WAT5
GBDP24356-19	KX161478	Španělsko	Betanzos, La Corunna	43,277N; - 8,213W	Svar-ESP-BET
GBDP24357-19	KX161479	Španělsko	San Sebastian, Guipuzcoa	43,308N; - 1,984W	Svar-ESP-SS
GBMNA27510-19	MH118219	Itálie	Berceto	44,502N; 9,976E	Svar-ITA-BER
GBMNA27511-19	MH118220	Itálie	Mantova	45,206N; 10,7422E	Svar-ITA-MAN1
GBMNA27512-19	MH118221	Itálie	Mantova	45,206N; 10,7422E	Svar-ITA-MAN2
GBMNA27513-19	MH118211	Itálie	Mantova	45,206N; 10,7422E	Svar-ITA-MAN3
GBMNA27514-19	MH118222	Itálie	Mantova	45,206N; 10,7422E	Svar-ITA-MAN4

GBMNA27539-19	MH118209	Velká Británie	England, Laysters	52,259N; -2,64W	Svar-GBR-LAY1
GBMNA27540-19	MH118210	Velká Británie	England, Laysters	52,259N; -2,64W	Svar-GBR-LAY2
GBMNA27546-19	MH118204	Česká republika	Děčín, Jetřichovice	50,8549N; 14,4054E	Svar-CZE-JET1
GBMNA27547-19	MH118205	Česká republika	Děčín, Jetřichovice	50,8549N; 14,4054E	Svar-CZE-JET2
GBMNA27549-19	MH118206	Rumunsko	Bacău County, Comănești	46,4274N; 26,4343E	Svar-ROU-BAC1
GBMNA27558-19	MH118200	Velká Británie	Isles of Scilly, Hugh Town	49,9179N; - 6,288W	Svar-GBR- IOS
GBMNA27559-19	MH118201	Rumunsko	Bacău County, Comănești	46,4274N; 26,4343E	Svar-ROU- BAC2
GBMNA27560-19	MH118202	Česká republika	Děčín, Jetřichovice	50,8549N; 14,4054E	Svar-CZE- JET3
GBMNA27561-19	MH118203	Rumunsko	Bacău County, Comănești	46,4274N; 26,4343E	Svar-ROU- BAC3
GBMNA27566-19	MH118208	Česká republika	Děčín, Jetřichovice	50,8549N; 14,4054E	Svar-CZE- JET4
GBMNA27572-19	MH118207	Itálie	Bolzano-Bozen	46,5199N; 11,5228E	Svar-ITA- BOL
GBMNA29107-19	MH118172	Itálie	Province of Belluno	46,2498N; 12,197E	Svar-ITA- POB
GBMNA29112-19	MH118179	Itálie	Trentino	46,18N; 11,83E	Svar-ITA- TRE
GBMNA29113-19	MH118180	Itálie	Province of Mantua	45,2193N; 10,7561E	Svar-ITA- POM
GBMNA29114-19	MH118181	France	Briançon	44,8998N; 6,642E	Svar-FRA- BRI
GBMNA29116-19	MH118185	Itálie	Treviso	45,7308N; 12,2605E	Svar-ITA- TREV
GBMNA31297-19	MH118261	Chorvatsko	Plitvica	44,8971N; 15,6254E	Svar-HRV- PLIT1
GBMNA31298-19	MH118262	Chorvatsko	Plitvica	44,8971N; 15,6254E	Svar-HRV- PLIT2
GBMNA31299-19	MH118263	Chorvatsko	Baške Oštarije	44,5309N; 15,1271E	Svar-HRV- BO1
GBMNA31300-19	MH118264	Chorvatsko	Baške Oštarije	44,5309N; 15,1271E	Svar-HRV- BO2
GBMNA31301-19	MH118265	Chorvatsko	Baške Oštarije	44,5086N; 15,2186E	Svar-HRV- BO3
GBMNA31302-19	MH118266	Chorvatsko	Gospić	44,5302N; 15,3266E	Svar-HRV- GOS
GMBMA015-17	BIOUG36068-F09	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR- MIN1
GMBMI008-17	BIOUG36068-G08	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR- MIN2
GMBMM016-17	BIOUG36611-G05	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR- MIN3
GMBMN116-17	BIOUG36732-C06	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR- MIN4
GMBMN117-17	BIOUG36732-C07	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR- MIN5
GMBMP043-17	BIOUG36769-C06	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR- MIN6
GMBMP046-17	BIOUG36769-C09	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR- MIN7

GMBMP051-17	BIOUG36769-D02	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR-MIN8
GMBMP057-17	BIOUG36769-D08	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR-MIN9
GMBMP080-18	BIOUG36755-B12	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR-MIN10
GMBMQ013-17	BIOUG36758-G01	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR-MIN11
GMBMQ015-17	BIOUG36758-G03	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR-MIN12
GMBMQ017-17	BIOUG36758-G05	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR-MIN13
GMBMR095-17	BIOUG36759-E07	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR-MIN14
GMBMR139-17	BIOUG36784-A08	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR-MIN15
GMBMS070-18	BIOUG36769-F12	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR-MIN16
GMBMS071-18	BIOUG36769-G01	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR-MIN17
GMBMT033-18	BIOUG37051-D06	Bělorusko	Minsk	53,9156N; 27,6062E	Svar-BLR-MIN18
GMBUD148-14	BIOUG15150-C02	Bulharsko	Godech	43,009N; 23,058E	Svar-BGR-GOD
GMEGA031-14	BIOUG12232-C07	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE1
GMEGA032-14	BIOUG12232-C08	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE2
GMEGA034-14	BIOUG12232-C10	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE3
GMEGA036-14	BIOUG12232-C12	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE4
GMEGA052-14	BIOUG12232-E04	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE5
GMEGA055-14	BIOUG12232-E07	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE6
GMEGA061-14	BIOUG12232-F01	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE7
GMEGB101-14	BIOUG14330-E01	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE8
GMEGB157-14	BIOUG14331-A10	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE9
GMEGB159-14	BIOUG14331-A12	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE10
GMEGB175-14	BIOUG14331-C04	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE11
GMEGC016-14	BIOUG14331-E11	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE12
GMEGD008-14	BIOUG14331-G08	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE13
GMEGD009-14	BIOUG14331-G09	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE14
GMEGJ033-14	BIOUG14432-B03	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE15
GMEGK116-14	BIOUG14630-A05	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE16
GMEGK128-14	BIOUG14630-B05	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE17



GMEGK140-14	BIOUG14630-C05	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE18
GMEGK146-14	BIOUG14630-C11	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE19
GMEGK150-14	BIOUG14630-D03	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE20
GMEGK198-14	BIOUG14630-H03	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE21
GMEGL012-14	BIOUG14432-F09	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE22
GMEGM006-14	BIOUG14432-H06	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE23
GMEGS014-14	BIOUG14794-B07	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE24
GMEGS015-14	BIOUG14794-B08	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE25
GMESA177-14	BIOUG14443-F05	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE26
GMESB730-14	BIOUG14518-B04	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE27
GMESC093-14	BIOUG14518-E10	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE28
GMESD023-14	BIOUG14518-G05	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE29
GMESJ1090-14	BIOUG14834-D10	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE30
GMESJ1094-14	BIOUG14834-E02	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE31
GMESJ1106-14	BIOUG14834-F02	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE32
GMESK580-14	BIOUG14839-B02	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE33
GMESK581-14	BIOUG14839-B03	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE34
GMESK583-14	BIOUG14839-B05	Egypt	Alexandria	30,9256N; 29,7755E	Svar-EGY-ALE35
GMGMA303-14	BIOUG15980-A11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP1
GMGMA380-14	BIOUG15980-H04	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP2
GMGMB022-14	BIOUG16267-D01	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP3
GMGMB025-14	BIOUG16267-D04	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP4
GMGMB028-14	BIOUG16267-D07	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP5
GMGMB029-14	BIOUG16267-D08	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP6
GMGMB040-14	BIOUG16267-E07	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP7
GMGMB044-14	BIOUG16267-E11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP8
GMGMB045-14	BIOUG16267-E12	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP9
GMGMB059-14	BIOUG16267-G02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP10
GMGMB589-14	BIOUG16273-H05	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP11

GMGMC057-14	BIOUG16353-G06	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP12
GMGMD207-14	BIOUG16607-E03	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP13
GMGMD217-14	BIOUG16607-F01	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP14
GMGMD228-14	BIOUG16607-F12	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP15
GMGMH1280-14	BIOUG17000-B11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP16
GMGMH1315-14	BIOUG17000-E10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP17
GMGMH1324-14	BIOUG17000-F07	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP18
GMGMI106-14	BIOUG17085-A06	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP19
GMGMJ198-14	BIOUG17069-G10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP20
GMGMJ233-14	BIOUG17070-B10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP21
GMGMK044-14	BIOUG17071-E12	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP22
GMGMK050-14	BIOUG17071-F06	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP23
GMGMK051-14	BIOUG17071-F07	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP24
GMGMK053-14	BIOUG17071-F09	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP25
GMGMK061-14	BIOUG17071-G05	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP26
GMGMK062-14	BIOUG17071-G06	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP27
GMGMK063-14	BIOUG17071-G07	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP28
GMGMK271-14	BIOUG17175-A02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP29
GMGMK289-14	BIOUG17175-B08	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP30
GMGMK291-14	BIOUG17175-B10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP31
GMGMK305-14	BIOUG17175-C12	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP32
GMGMK314-14	BIOUG17175-D09	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP33
GMGML085-14	BIOUG17228-G09	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP34
GMGML092-14	BIOUG17228-H04	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP35
GMGML1389-14	BIOUG17271-B02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP36
GMGML207-14	BIOUG17230-B01	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP37
GMGML218-14	BIOUG17230-B12	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP38
GMGML237-14	BIOUG17230-D07	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP39
GMGML241-14	BIOUG17230-D11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP40

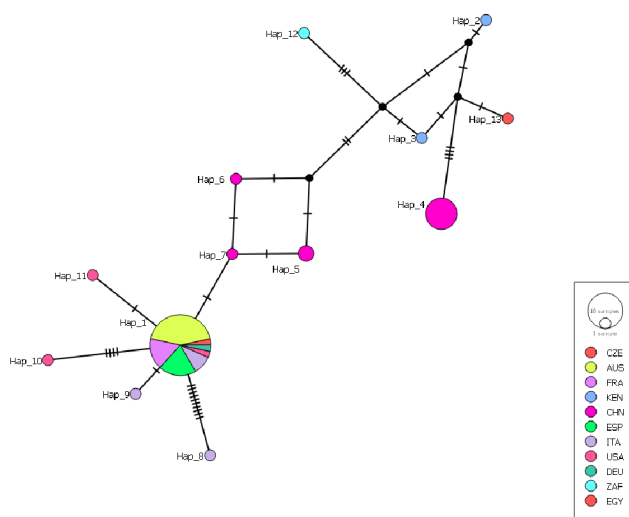
GMGML257-14	BIOUG17230-F03	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP41
GMGML273-14	BIOUG17230-G07	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP42
GMGML276-14	BIOUG17230-G10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP43
GMGML277-14	BIOUG17230-G11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP44
GMGML500-14	BIOUG17232-G03	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP45
GMGMM217-14	BIOUG17298-C01	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP46
GMGMM242-14	BIOUG17298-E02	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP47
GMGMM251-14	BIOUG17298-E11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP48
GMGMM274-14	BIOUG17298-G10	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP49
GMGMN205-14	BIOUG17382-E11	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP50
GMGMN213-14	BIOUG17382-F07	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP51
GMGMN302-14	BIOUG17383-F01	Německo	Rhineland-Palatinate	50,552N; 7,17E	Svar-DEU-RP52
GMGRB1542-13	BIOUG05265-G01	Německo	Bavaria	48,9509N; 13,422E	Svar-DEU-BAV1
GMGRE2800-13	BIOUG06444-A12	Německo	Bavaria	48,9509N; 13,422E	Svar-DEU-BAV2
GMGRF6346-13	BIOUG07948-A07	Německo	Bavaria	48,9509N; 13,422E	Svar-DEU-BAV3
GMGRF6351-13	BIOUG07948-A12	Německo	Bavaria	48,9509N; 13,422E	Svar-DEU-BAV4
GMGRG4863-13	BIOUG08215-A03	Německo	Bavaria	48,9509N; 13,422E	Svar-DEU-BAV5
GMGRG4866-13	BIOUG08215-A06	Německo	Bavaria	48,9509N; 13,422E	Svar-DEU-BAV6
GMNWI3532-14	BIOUG16254-F07	Norsko	Sor-Trondelag	63,405N; 10,383E	Svar-NOR-ST1
GMNWK4259-14	BIOUG16429-A02	Norsko	Sor-Trondelag	63,405N; 10,383E	Svar-NOR-ST2

**Příloha 10:** Průměrná frekvence nukleotidů u *COI* markeru.

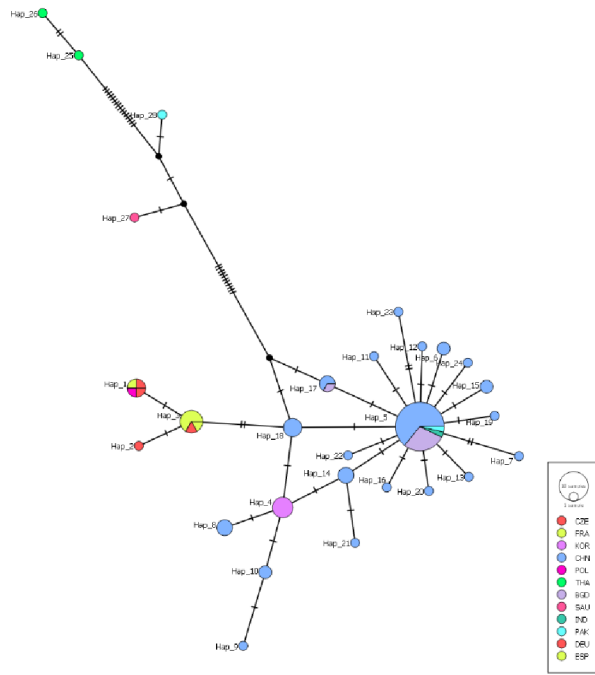
Druh	Průměrná frekvence nukleotidů (%)			
	T	C	A	G
<i>S. africa</i>	38.0	16,6	28.9	16.4
<i>S. albiceps</i>	38.1	15.6	30.0	16.3
<i>S. argyrostoma</i>	36.7	17.5	30.2	15.6
<i>S. caerulescens</i>	37.4	16.5	29.8	16.2
<i>S. carnaria</i>	37.4	17.1	29.1	16.4
<i>S. incisilobata</i>	37.8	17.4	28.4	16.4
<i>S. lehmanni</i>	37.5	17.1	28.6	16.8
<i>S. noverca</i>	37.1	16.5	30.1	16.2
<i>S. variegata</i>	37.8	16.7	28.7	16.8

**Příloha 11:** Haplotypové sítě pro oblast *COI* (a - *S. africa*, b - *S. albiceps*, c - *S. argyrostoma*, d - *S. caerulescens*, e- *S. carnaria*, f - *S. incisilobata*, g- *S. lehmanni*, h – *S. noverca*, ch) *S. variegata*). Velikost kruhu závisí na počtu jedinců, u kterých se daný haplotyp vyskytuje. Počet mutací je značen příčnými čárkami. Jednotlivé země jsou barevně značeny, zkratky jsou vytvořeny podle mezinárodních kódů ISO.

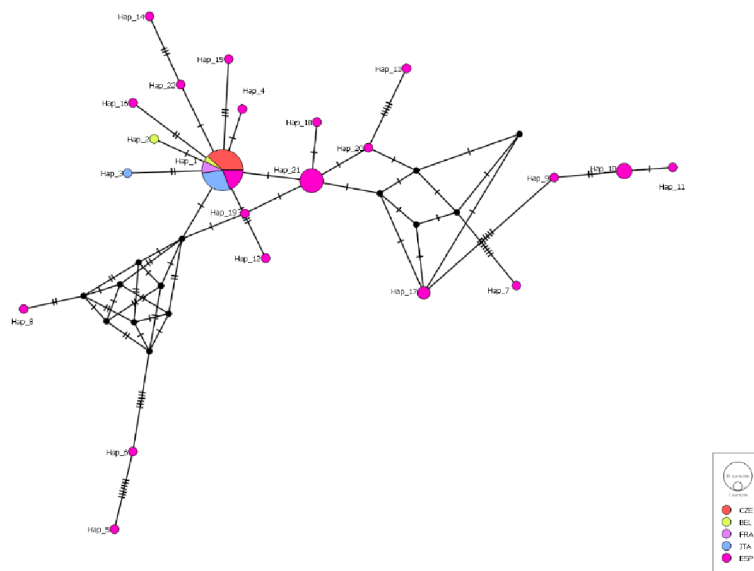
a)



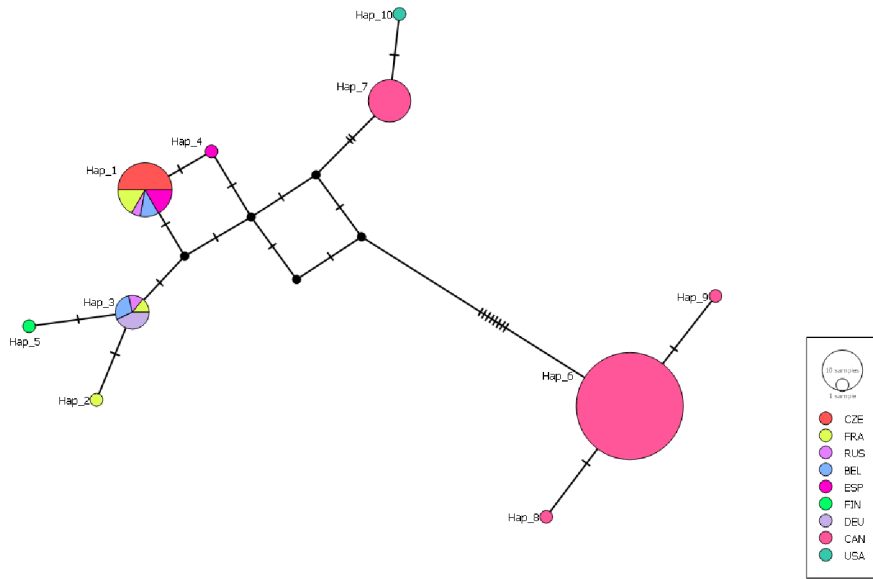
b)



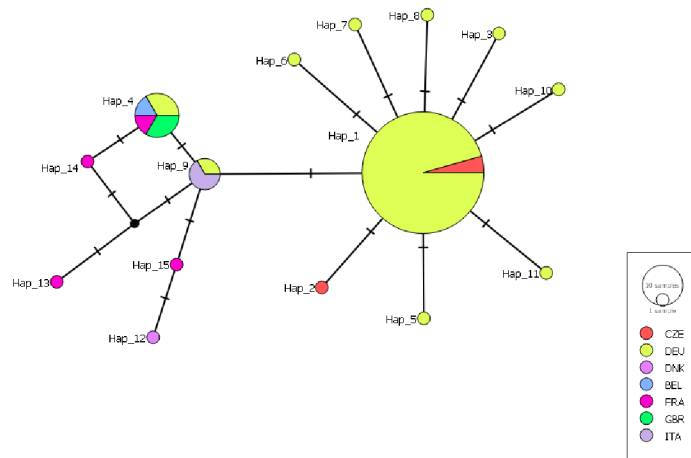
c)



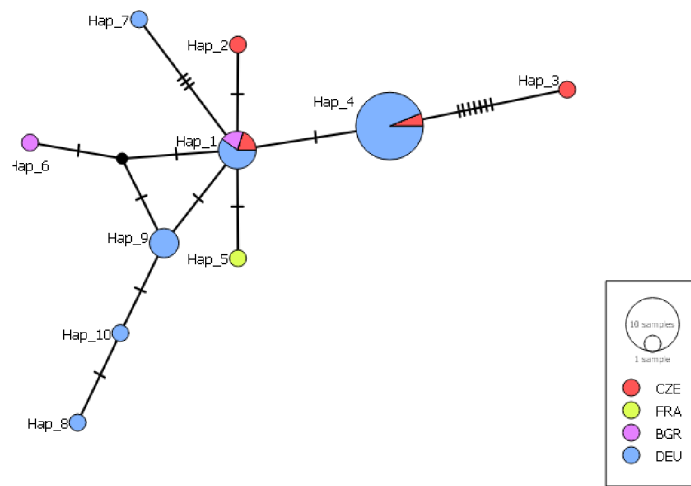
d)



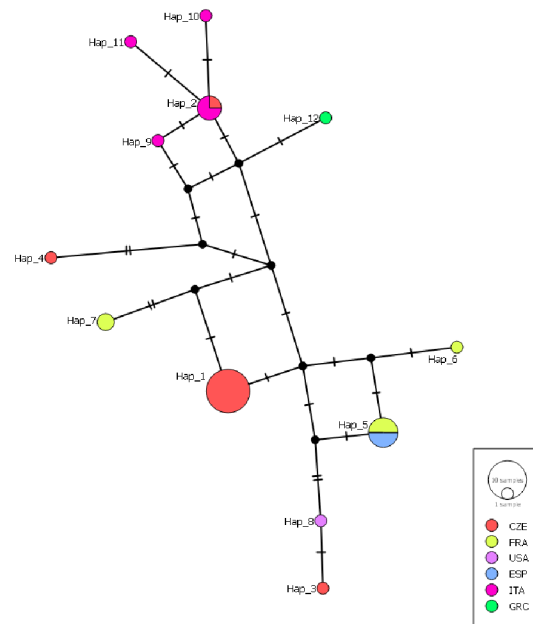
e)



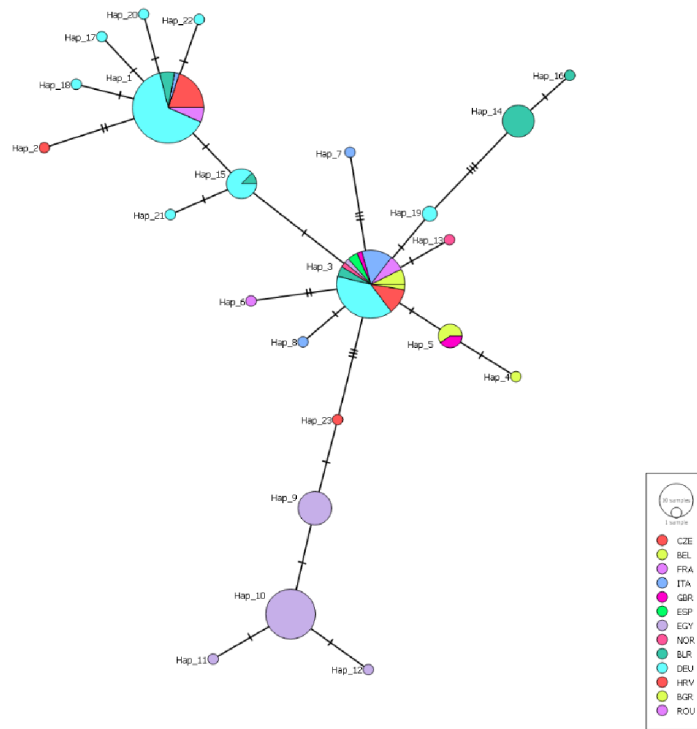
f)



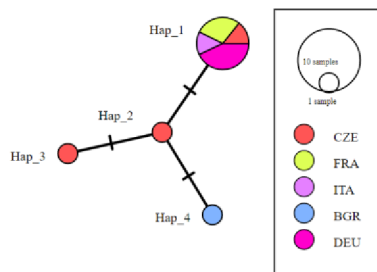
g)



h)



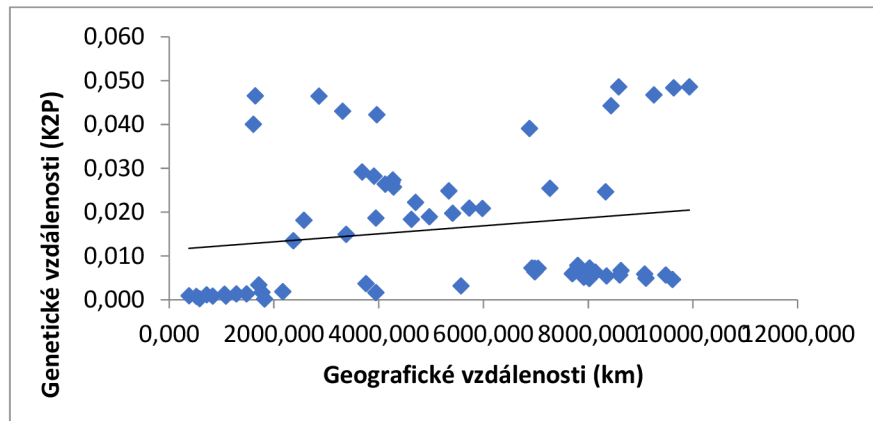
ch)



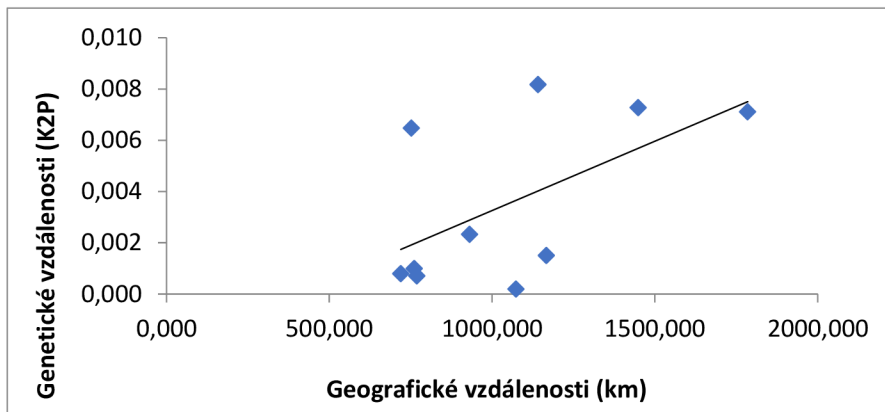


**Příloha 12:** Grafické znázornění Mantelova testu. Genetické vzdálenosti byly spočítány pomocí Kimura 2 - parametru (K2P), a) *S. albiceps*, b) *S. argyrostoma*, c) *S. carnaria*, d) *S. incisilobata*, e) *S. lehmanni*, f) *S. noverca*.

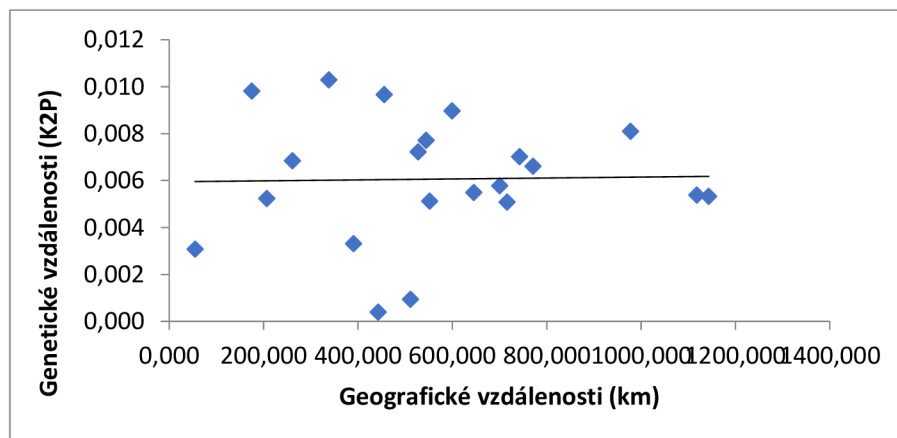
a)

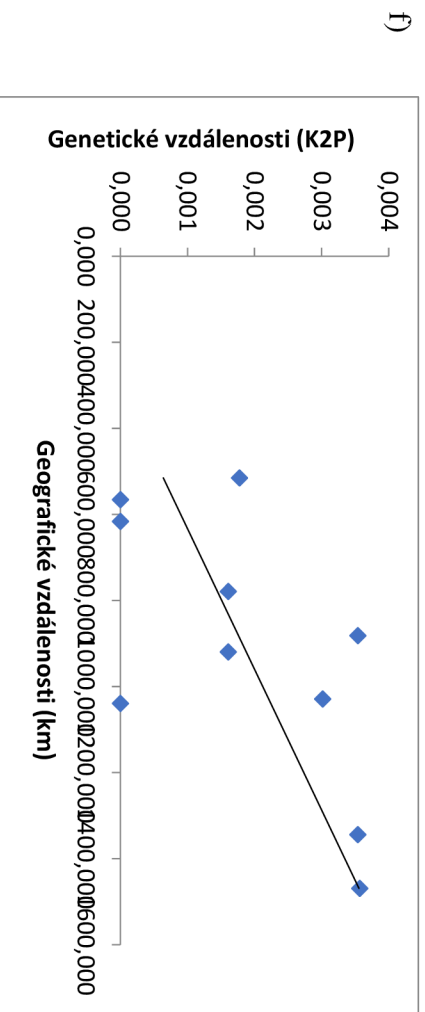
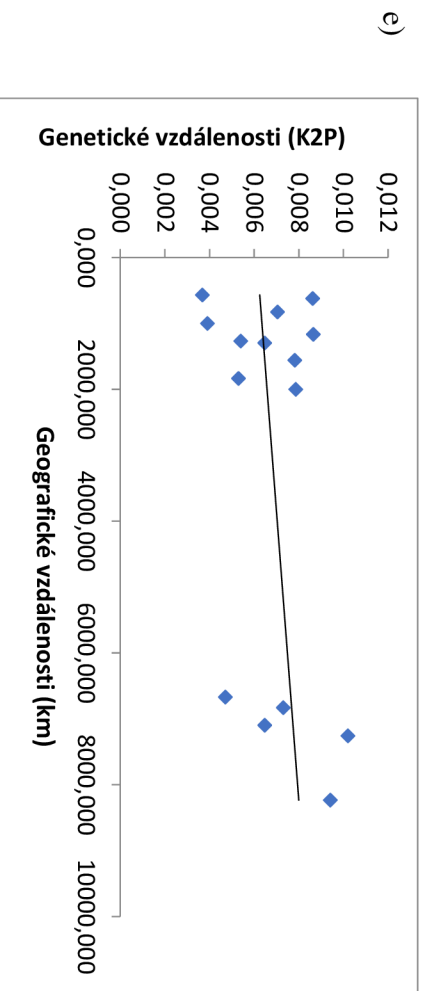
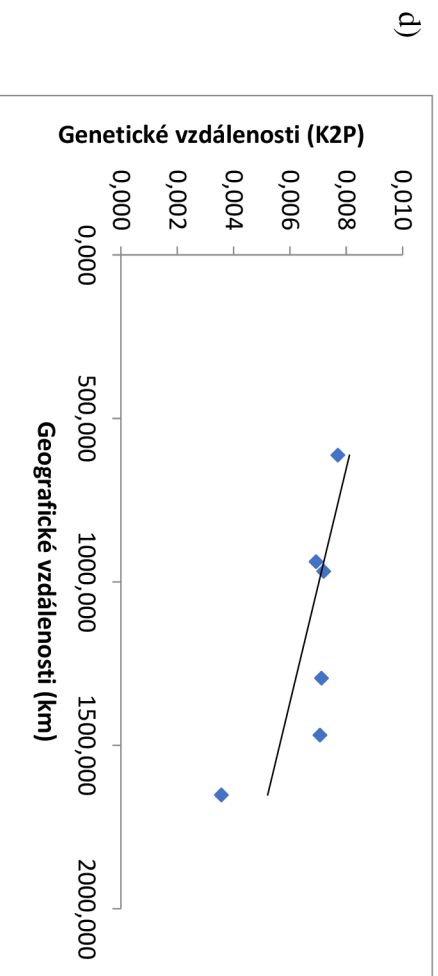


b)



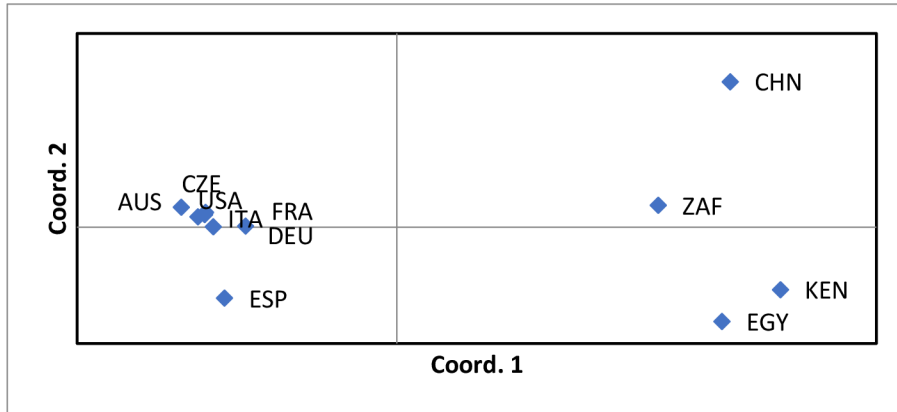
c)



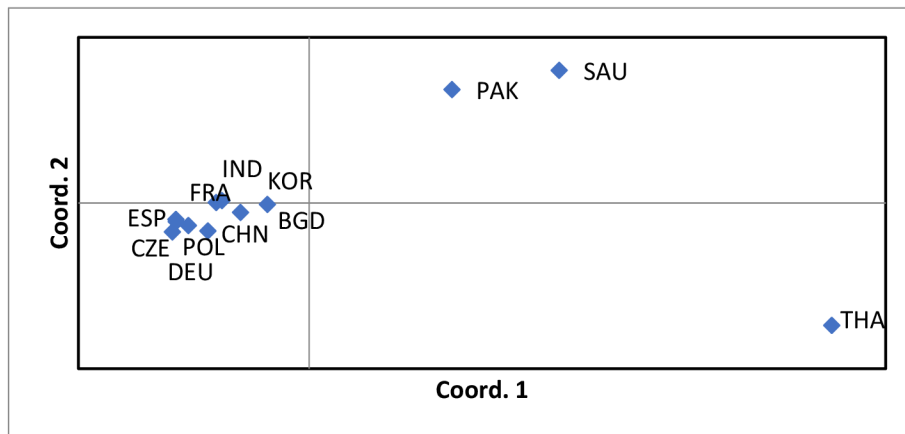


**Příloha 13:** Klastrová analýza-PCoA, a) *S. africa*, b) *S. albiceps*, c) *S. argyrostoma*, d) *S. caerulescens*, e) *S. carnaria*, f) *S. incisilobata*, g) *S. lehmanni*, h) *S. noverca*, ch) *S. variegata*.

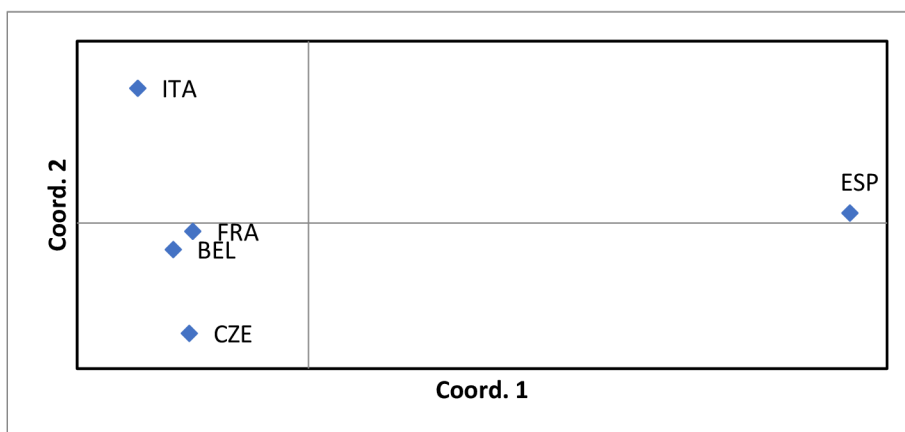
a)

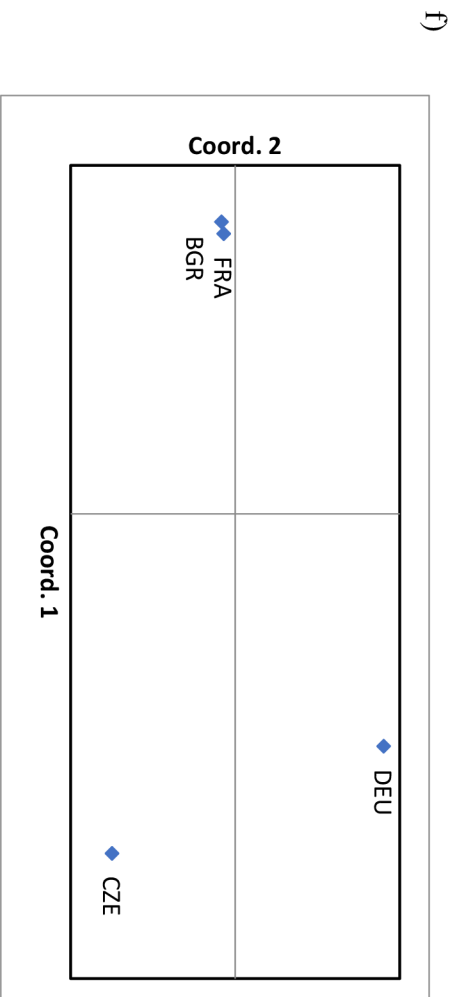
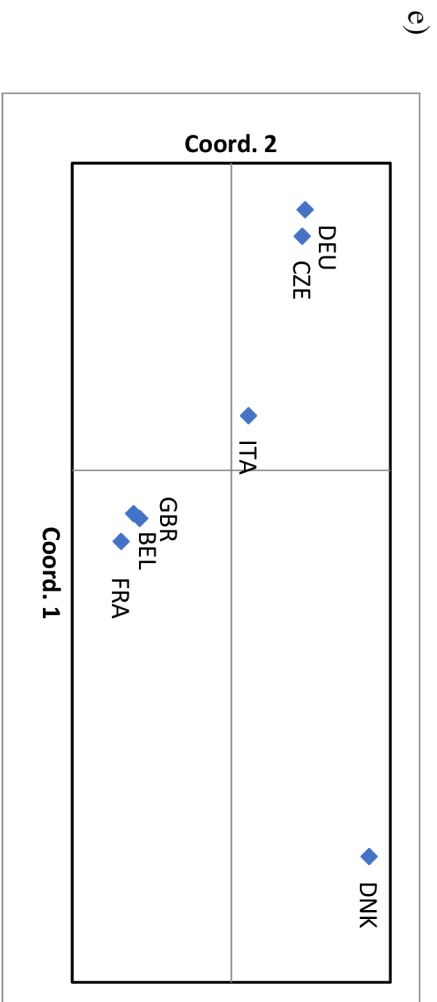
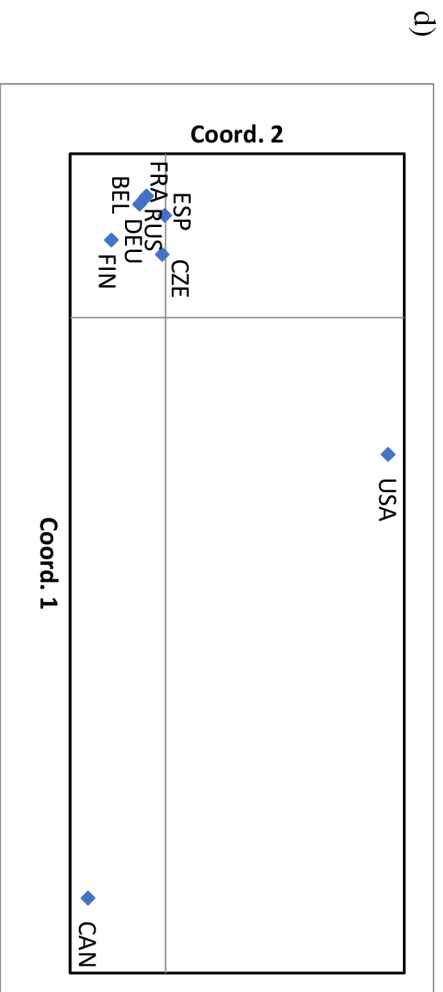


b)

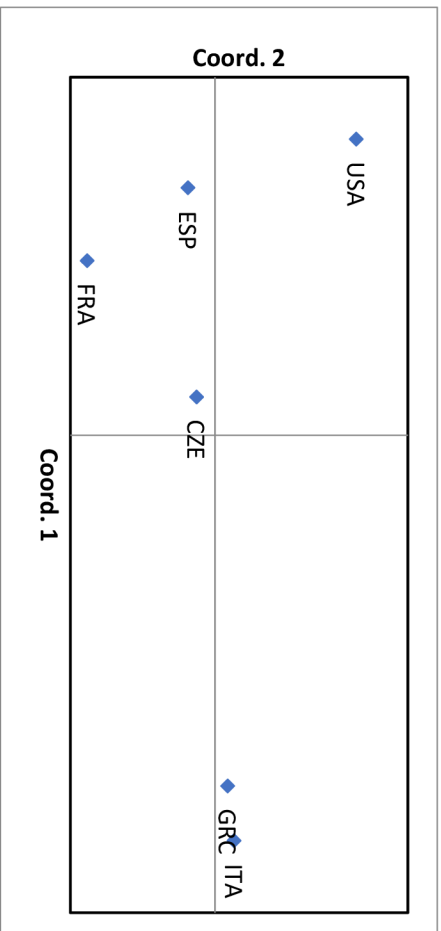


c)

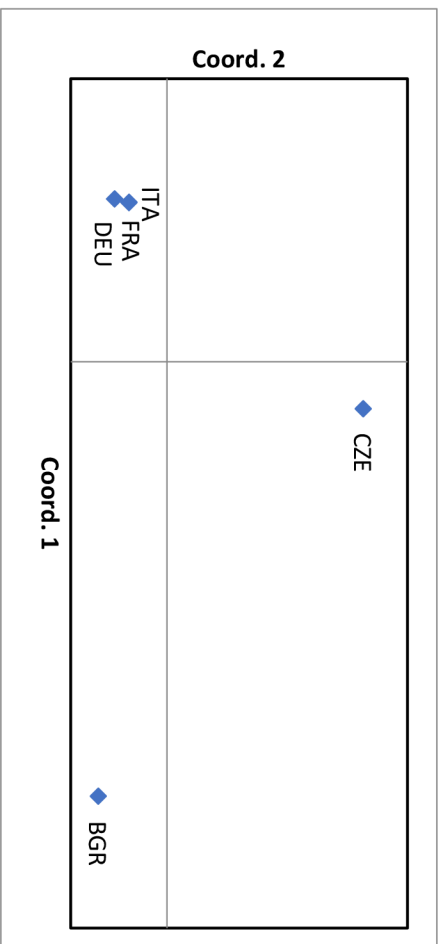




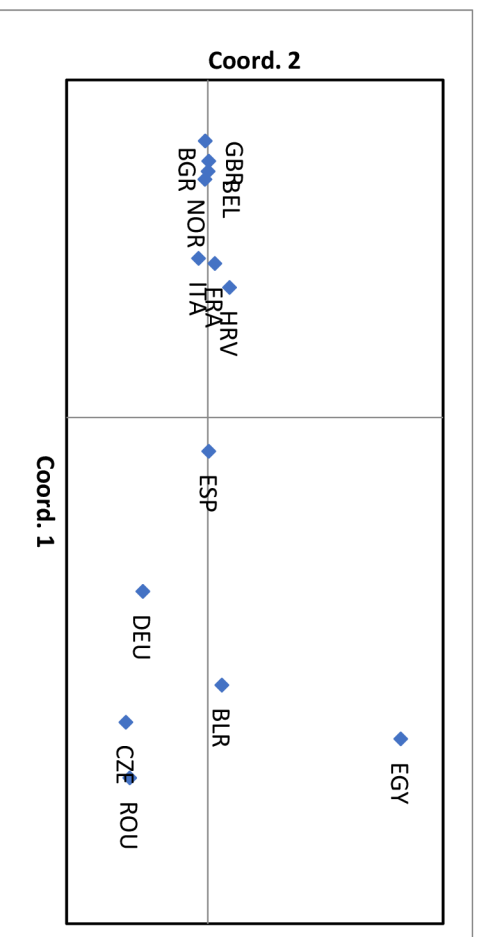
g)



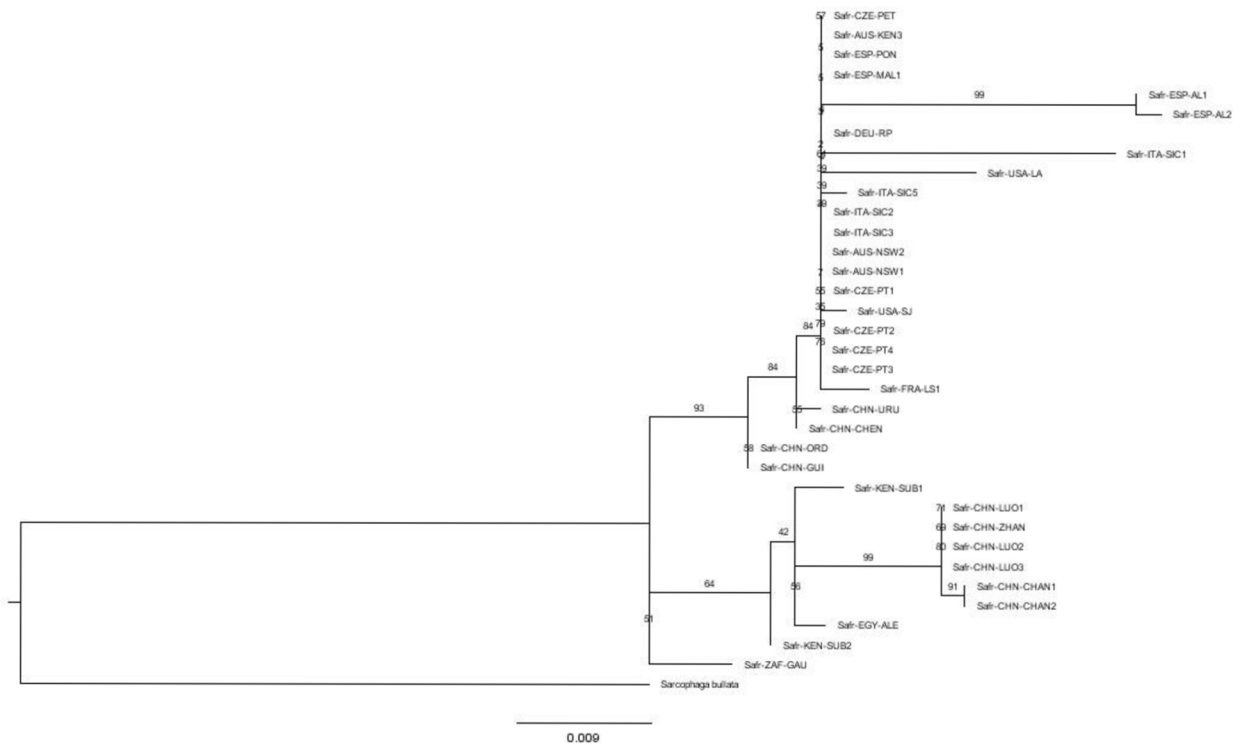
h)



ch)



**Příloha 14:** Dendrogram pro druh *S. africa* (Maximum Likelihood, TN+F+G4 model, 1000x Bootstrap). Zakořeno pomocí *S. bullata*. Zkratky lokalit jsou zaznamenány v příloze 1-9 a Tab. I.



**Příloha 15:** Dendrogram pro druh *S. albiceps* (Maximum Likelihood, TPM3+F+G4 model, 1000x Bootstrap). Zakořeněno pomocí *S. bullata*. Zkratky lokalit jsou zaznamenány v v příloze 1-9 a Tab. I.

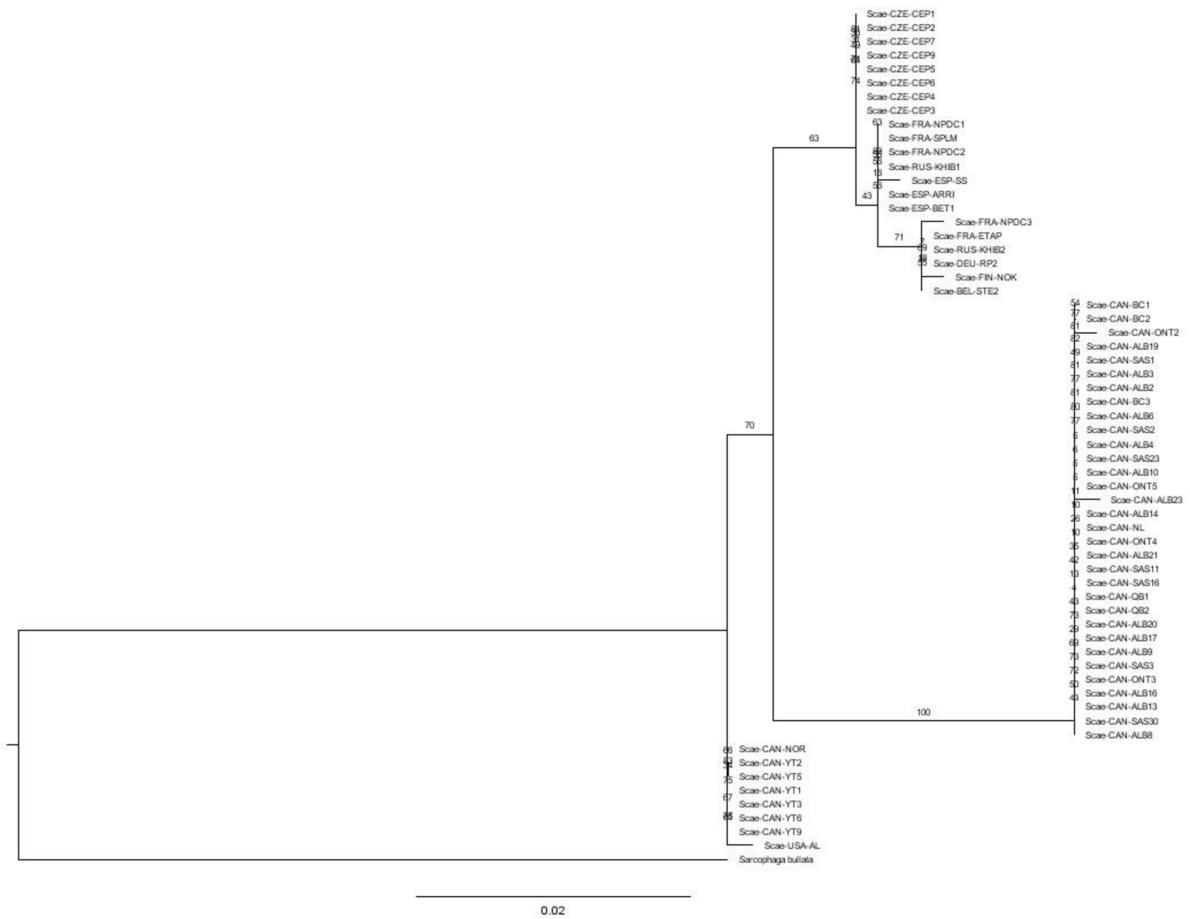


**Příloha 16:** Dendrogram pro druh *S. argyrostoma* (Maximum Likelihood, TN+F+G4 model, 1000x Bootstrap). Zakořeněno pomocí *S. bullata*. Zkratky lokalit jsou zaznamenány v příloze 1-9 a Tab. I.

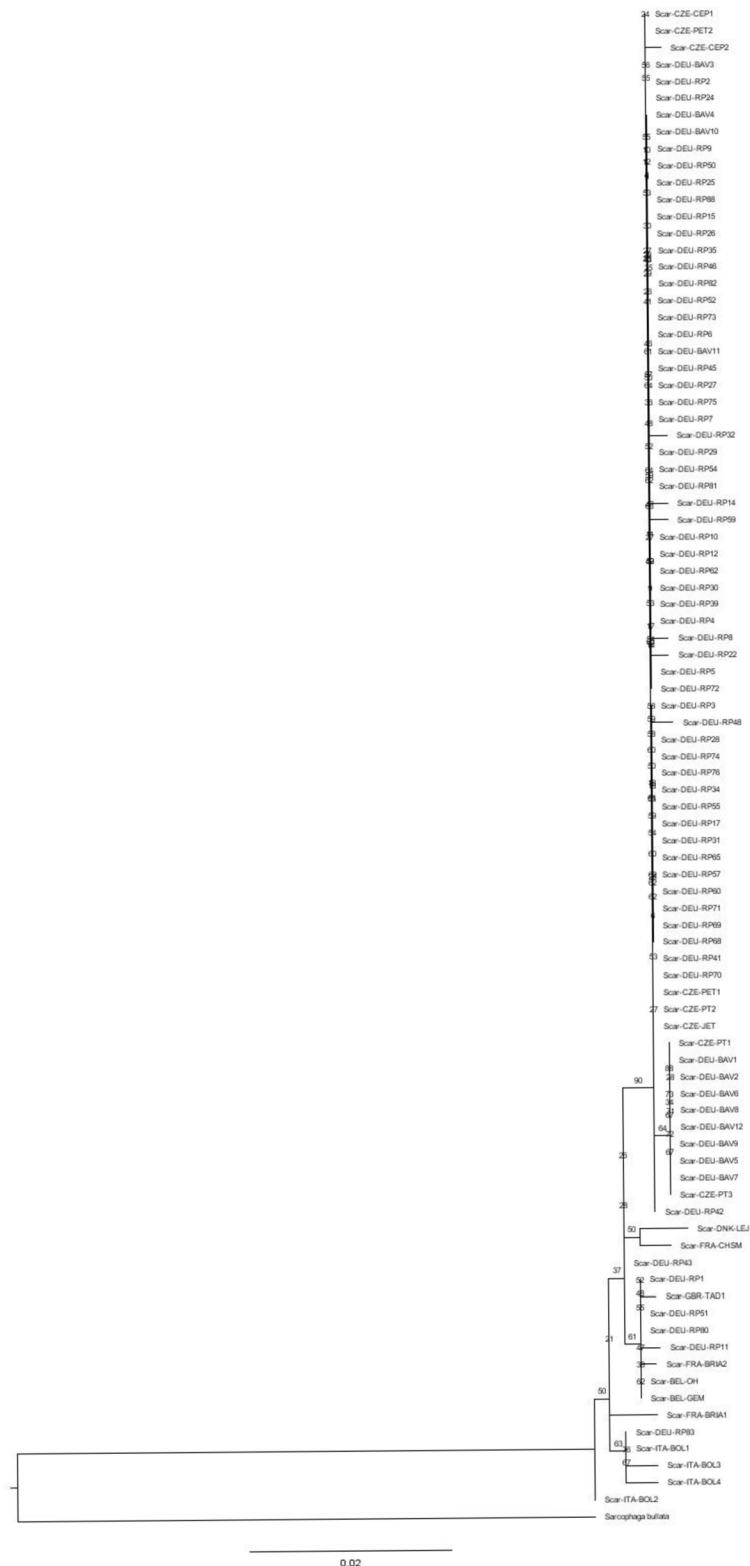




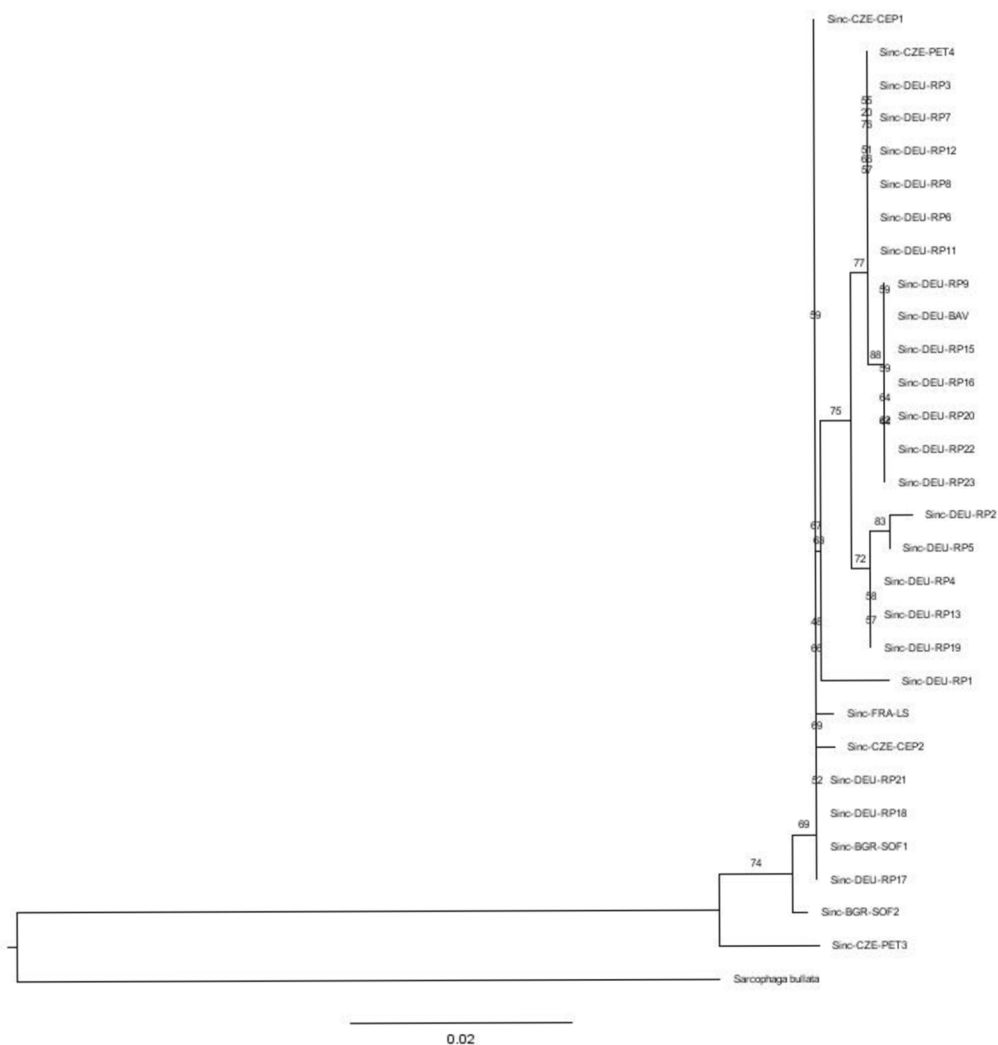
**Příloha 17:** Dendrogram pro druh *S. caeruleus* (Maximum Likelihood, HKY+F+I model, 1000x Bootstrap). Zakořeno pomocí *S. bullata*. Zkratky lokalit jsou zaznamenány v příloze 1-9 a Tab. I.



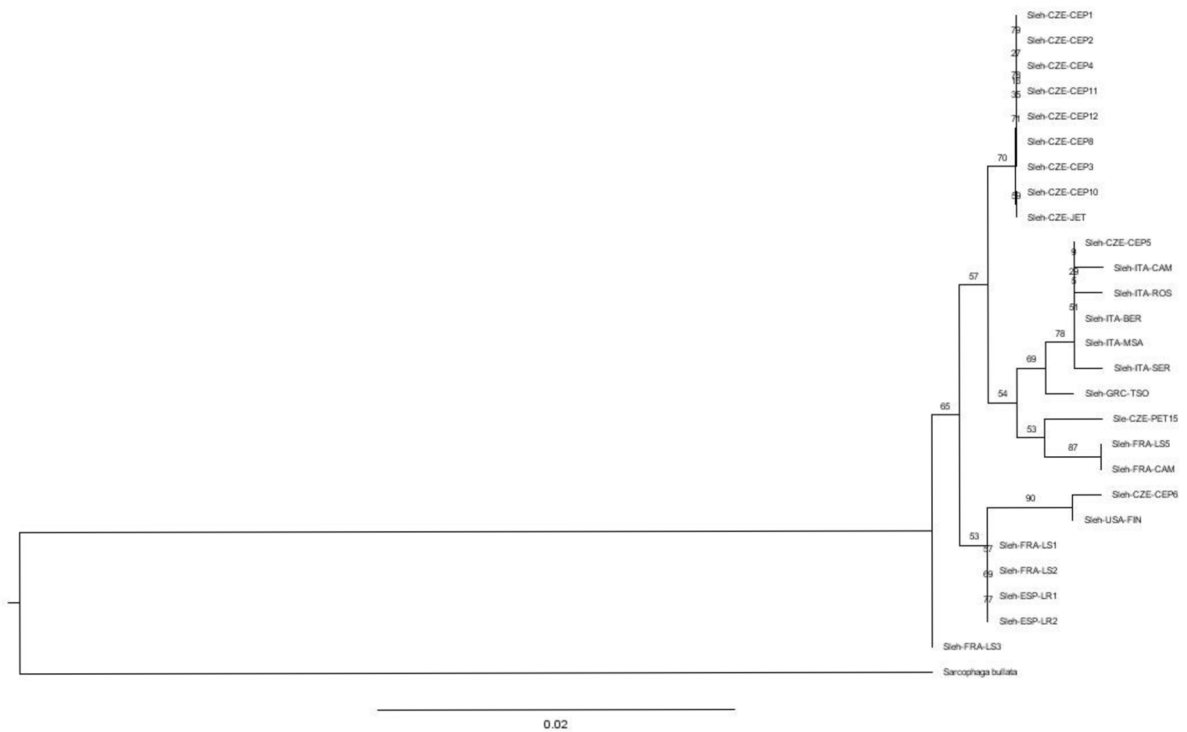
**Příloha 18:** Dendrogram pro druh *S. carnaria* (Maximum Likelihood, HKY+F+I model, 1000x Bootstrap). Zakořeněno pomocí *S. bullata*. Zkratky lokalit jsou zaznamenány v příloze 1-9 a Tab. I.



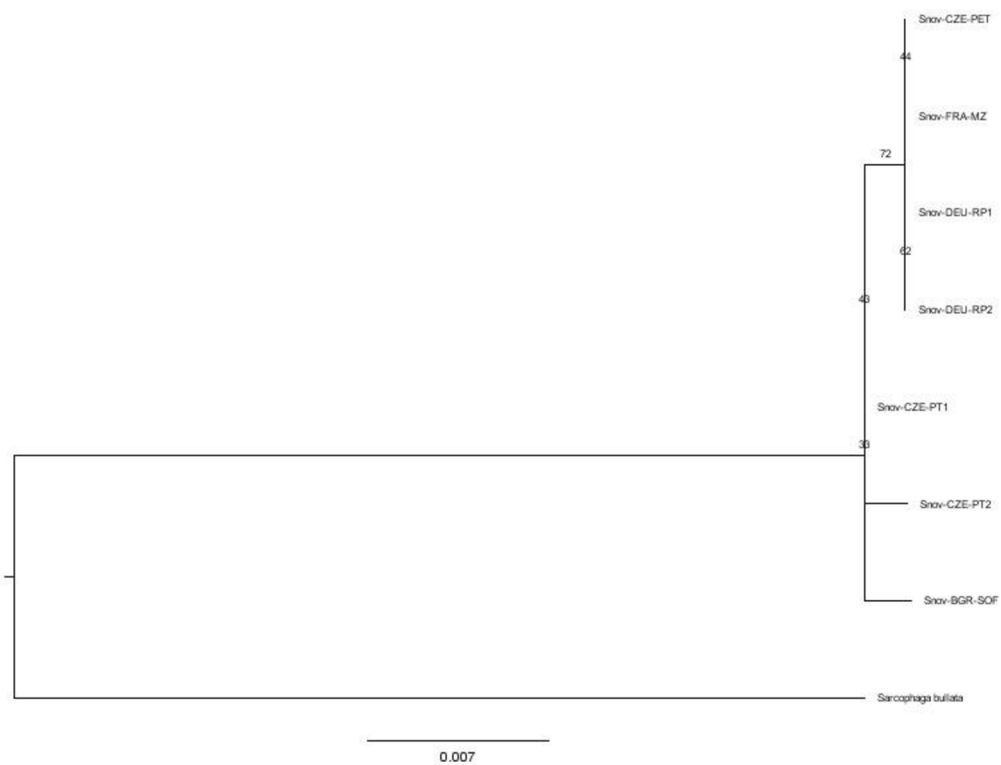
**Příloha 19:** Dendrogram pro druh *S. incisilobata* (Maximum Likelihood, TN+F+G4 model, 1000x Bootstrap). Zakořeněno pomocí *S. bullata*. Zkratky lokalit jsou zaznamenány v příloze 1-9 a Tab. I.



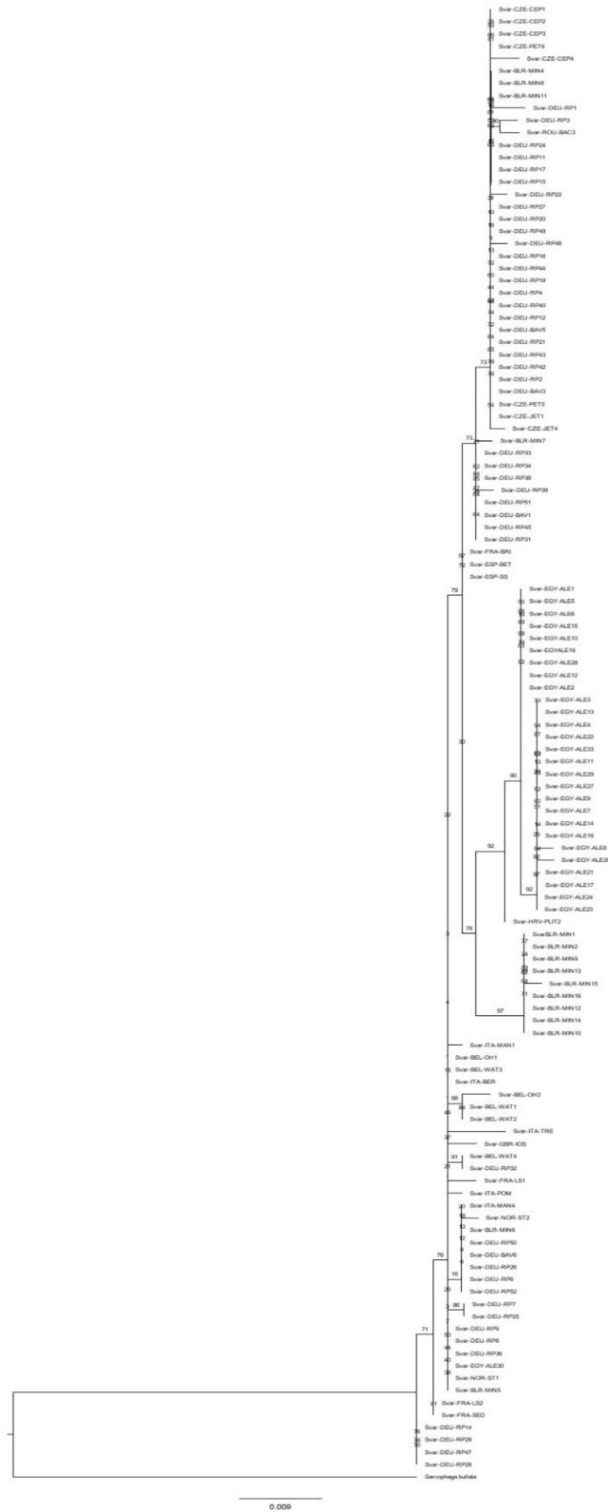
**Příloha 20:** Dendrogram pro druh *S. lehmanni* (Maximum Likelihood, HKY+F+I model, 1000x Bootstrap). Zakořeněno pomocí *S. bullata*. Zkratky lokalit jsou zaznamenány v příloze 1-9 a Tab. I.



**Příloha 21:** Dendrogram pro druh *S. noverca* (Maximum Likelihood, TN+F model, 1000x Bootstrap). Zakořeno pomocí *S. bullata*. Zkratky lokalit jsou zaznamenány v příloze 1-9 a Tab. I.

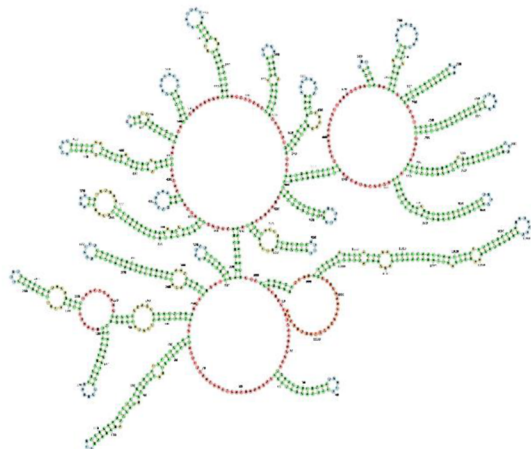


**Příloha 22:** Dendrogram pro druh *S. variegata* (Maximum Likelihood, HKY+F+I model, 1000x Bootstrap). Zakořeněno pomocí *S. bullata*. Zkratky lokalit jsou zaznamenány v příloze 1-9 a Tab. I.

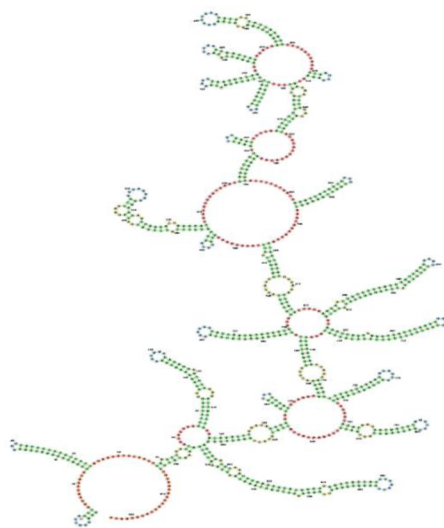


**Příloha 23:** Predikované sekundární struktury u *ITS1* fragmentu, a) *S. africa*, b) *S. albiceps*, c) *S. argyrostoma*, d) *S. bullata*, e) *S. caerulea*, f) *S. carnaria*, g) *S. incisilobata*, h) *S. lehmanni*, ch) *S. noverca*, i) *S. variegata*.

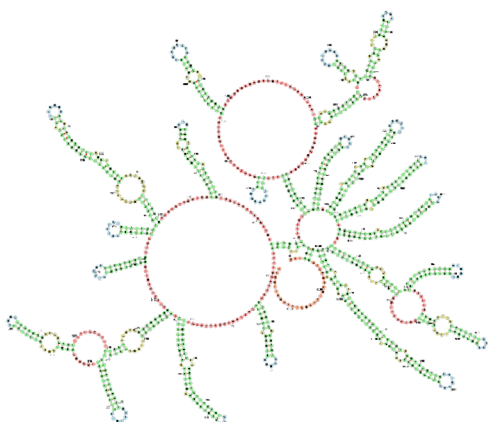
a)



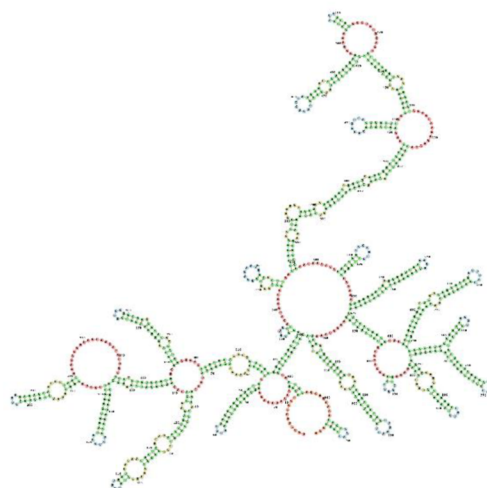
b)



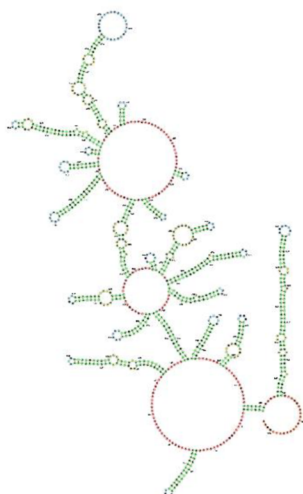
c)



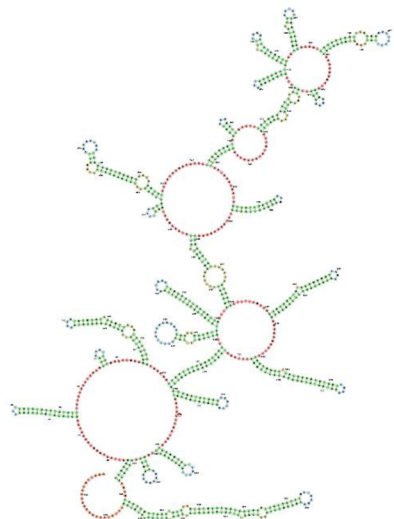
d)



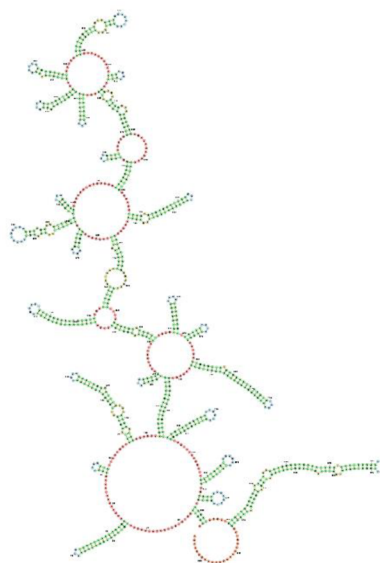
e)



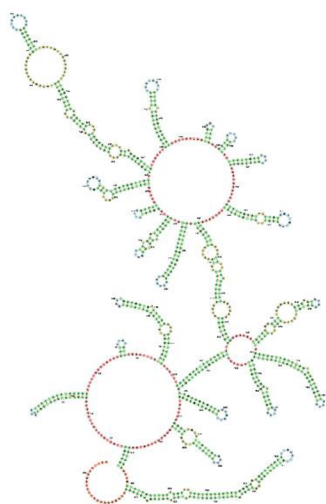
f)



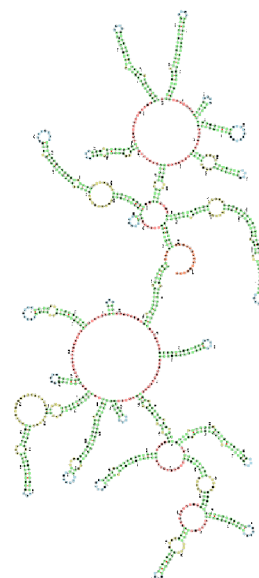
g)



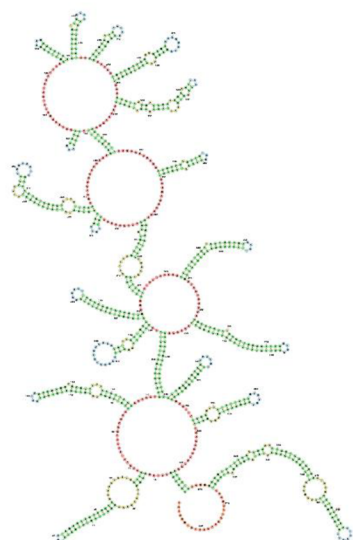
h)



ch)



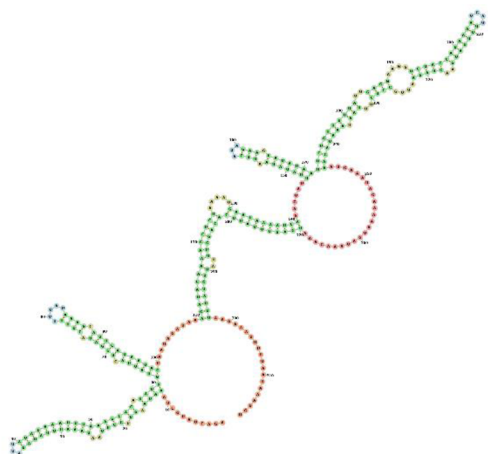
i)



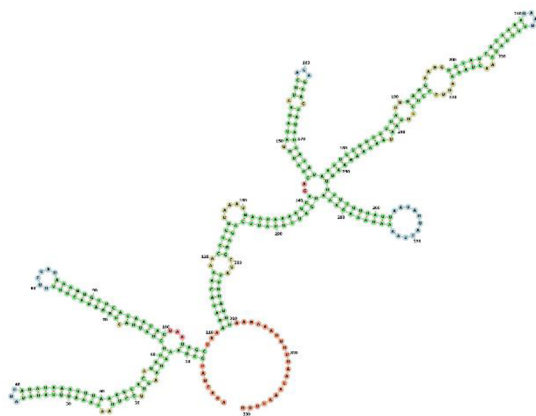


**Příloha 24:** Sekundární struktury u *ITS2* fragmentu, a) *S. africa*, b) *S. albiceps*, c) *S. argyrostoma*, d) *S. bullata*, e) *S. caerulescens*, f) *S. carnaria*, g) *S. incisilobata*, h) *S. lehmanni*, ch) *S. noverca*, i) *S. variegata*.

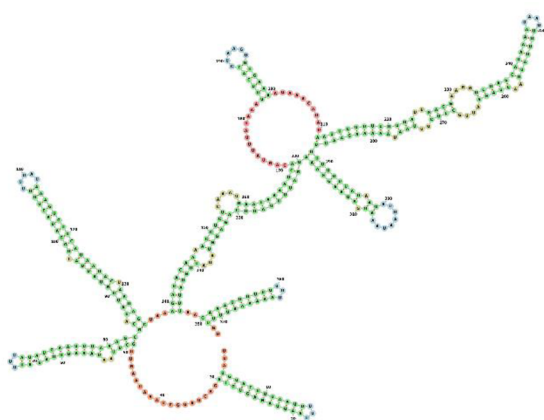
a)



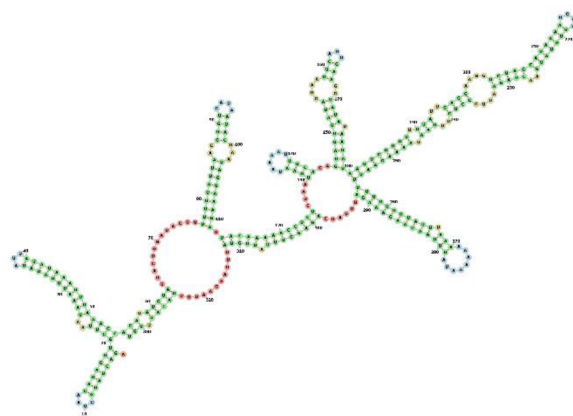
b)



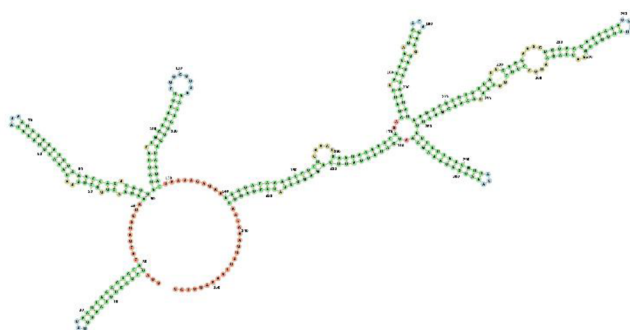
c)



d)



e)



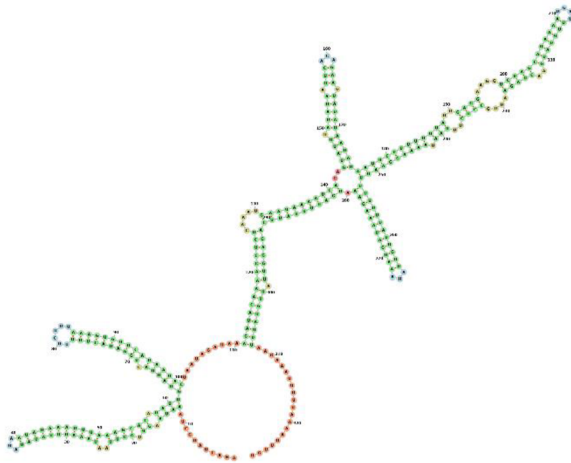
f)



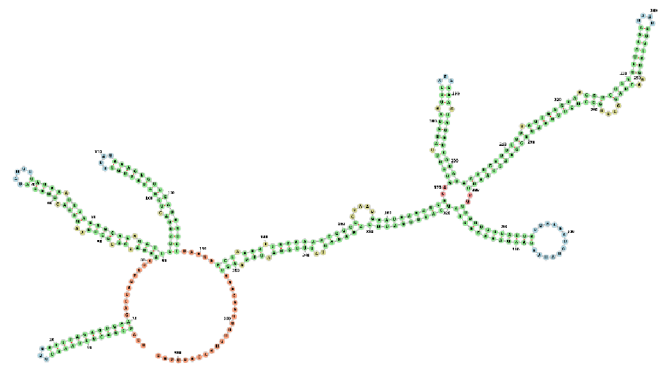
g)



h)



ch)



i)

