

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Analýza populační struktury parazita
Dicyema moschatum* v hostiteli *Eledone
***moschata* pomocí mikrosatelitních**
markerů

Bakalářská práce

Tereza Flegrová

Školitelka: Mgr. Marie Drábková

České Budějovice 2019

Flegrová T., 2019: Analýza populační struktury parazita *Dicyema moschatum* v hostiteli *Eledone moschata* pomocí mikrosatelitních markerů. [Analysis of infra-population structure of parasite *Dicyema moschatum* in host *Eledone moschata* based on microsatellite markers. Bc. Thesis, in Czech.] - 34 p., Faculty of Science. University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Using microsatellite markers, this study explores infrapopulation structure of *Dicyema moschatum* within its host *Eledone moschata* and among two populations from Croatia and Italy. Set of 8 microsatellite markers was selected and respective primers for polymerase chain amplification were designed for population genetics study. Microsatellite markers were analyzed with fragmentation method and results were evaluated in various bioinformatic programmes focused on basic population genetic metrics; these results showed potential to provide additional information about *D. moschatum* mating systems and how it infects its host.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdání textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 15.4.2019.

Tereza Flegrová

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala svojí školitelce Marušce Drábkové za trpělivost a čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala celé laboratoři molekulární ekologie a evoluce za přátelské prostředí a fajn atmosféru. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za morální podporu, a především svým psům Atosovi a Aramisovi za canisterapii v nejtěžších chvílích.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 <i>Eledone moschata</i> (Lamarck, 1798).....	1
1.1.1 Taxonomie.....	1
1.1.2 Výskyt.....	1
1.1.3 Obecná charakteristika druhu.....	2
1.1.4 Životní strategie.....	3
1.1.5 Parazité.....	3
1.2 Dicyemidé.....	4
1.1.1 Taxonomie.....	4
1.1.2 Životní cyklus.....	5
1.3 Vztah mezi hostitelem a parazitem.....	6
1.4 Mikrosatelitní genetické markery pro studium populací.....	7
2. Cíle práce	9
3. Materiály a metody	10
3.1 Původ vzorků.....	10
3.2 Izolace DNA.....	11
3.3 Ověření druhu hostitele a parazita.....	11
3.4 Identifikace mikrosatelitů a navrhování primerů.....	12
3.5 Optimalizace a PCR.....	12
3.6 Gelová elektroforéza.....	14
3.7 Fragmentační analýza.....	14
3.8 Zpracování dat.....	14
4. Výsledky	15
4.1 Optimalizovaný protokol PCR.....	15
4.2 Kontrola specifičnosti primerů.....	15
4.3 Výsledný dataset.....	15
4.4 Vytríděný dataset.....	16
4.5 Structure.....	17
4.6 GenAlEx.....	17
4.6.1 H_O , H_E , HWE, AMOVA.....	17
4.6.2 Alelické frekvence.....	18
4.6.3 Genetická vzdálenost, F_{IS} a F_{ST}	18
5. Diskuze	19
6. Závěr	22
7. Seznam citované literatury	23
8. Přílohy	27

1. Úvod

Studium struktury infrapopulace parazitů (souhrn jedinců v jednom hostiteli) nám může pomoci odpovědět na základní otázky týkající se životní strategie parazitů, jako například jakým způsobem dochází k infekci a rozmnožování (sexuální vs. asexuální), zda k infekci za život hostitele dochází opakovaně, či zda jsou hostitelé infikováni jen jednou. Asexuální reprodukce společně s jednorázovou infekcí by měla snižovat diverzitu populace, zatímco častá infekce společně se sexuálním rozmnožováním by měla vést k vysoké diverzitě populace parazita uvnitř jednoho hostitele. V případě mikroskopických jednoduše stavěných parazitických organismů bez jasných morfologických znaků (jako je *Dicyema moschatum*) nelze využít klasických ekologických přístupů ke studiu populační struktury využívajících především morfologii, pozorování populací v přirozeném prostředí či (zpětný) odchyt, a to z očividných důvodů velikosti a habitatu zvířete. Naproti tomu moderní molekulární metody se nabízí jako vhodný nástroj ke zkoumání infrapopulace parazitů a mohou nám pomoci odhalit poznatky o ekologii parazita i jeho hostitele. Metoda využívající mikrosatelitních markerů je právě vhodná pro zkoumání mikroskopických živočichů především díky své univerzálnosti a nenáročnosti na požadované množství DNA (viz kapitola 1.4). V případě studovaného systému parazita *D. moschatum* a hostitele *E. moschata* neexistují téměř žádné informace ohledně ekologie a genetické populační struktury. Jejich vzájemná těsná asociace přitom nabízí velký prostor k odhalování životních strategií v systému parazit-hostitel obecně, a hlavně pak v málo prozkoumaném mořském prostředí.

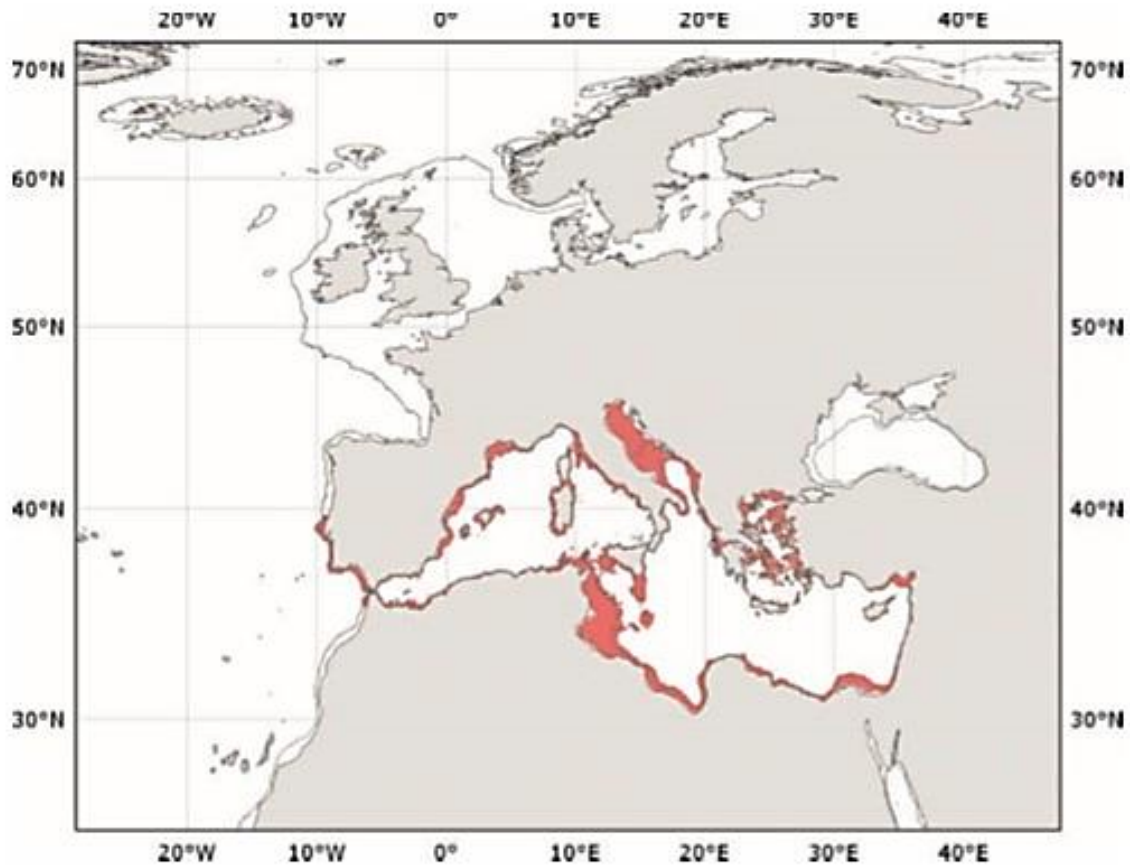
1.1 *Eledone moschata* (Lamarck, 1798)

1.1.1 Taxonomie

E. moschata, česky chobotnice pižmová, je živočich z kmene měkkýši (Mollusca), třídy hlavonožci (Cephalopoda), podtřídy dvoužábří (Coleioidea), nadřádu osmiramenatci (Octopodiformes), řádu chobotnice (Octopoda), nadčeledi Octopodea, čeledi Eledonidae (Jereb & Allcock, 2015).

1.1.2 Výskyt

Chobotnice pižmová se vyskytuje ve Středozezemním moři a v Cádizském zálivu. Najít jí lze v severovýchodním Atlantiku od břehů Portugalska až do 40° severní šířky (Lourenço et al., 2008), běžná je v Jaderském moři i v Egejském moři, méně běžná pak v Jónském moři, nalezena byla i v Marmarském moři (Jereb & Allcock, 2015). Mapa výskytu viz obrázek 1.

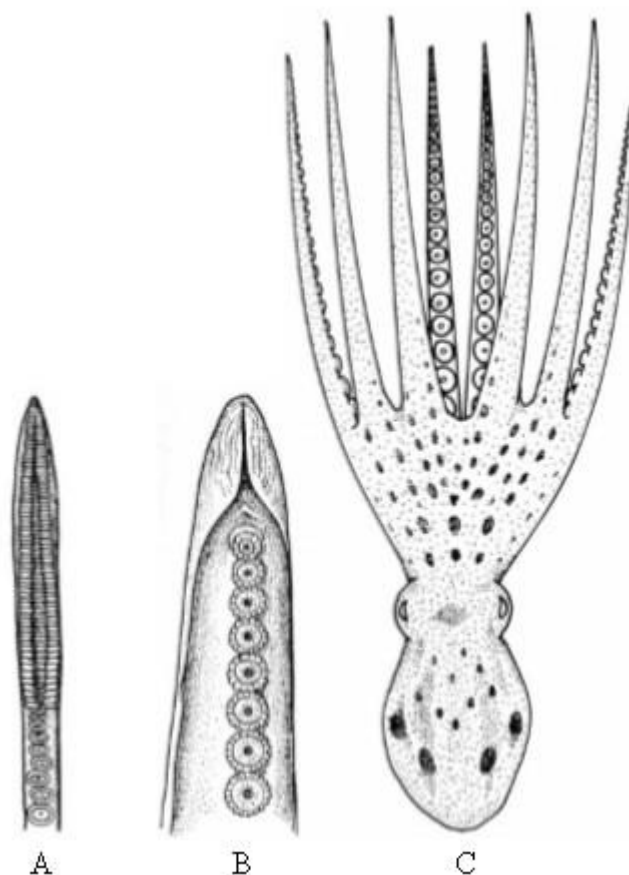


Obr. 1: Mapa výskytu *E. moschata*. Převzato z Norman et al., 2014.

1.1.3 Obecná charakteristika druhu

Eledone moschata je druh vyskytující se u pobřeží, žije především na písčitém či bahnitěm dně, příležitostně i na šterku (Jereb & Allcock, 2015). Nevyskytuje se v kamenitých oblastech, s výjimkou období rozmnožování (Mangold, 1983). Nejčastěji se vyskytuje v hloubkách do 100 m na horním kontinentálním šelfu (Krstulović Šifner & Vrgoč, 2009), příležitostně až do 170 m (Krstulović Šifner et al., 2005). Je to středně veliký, svalnatý druh s jednou řadou přísavek na ramenech, viz obrázek 2 (Norman et al., 2014). Průměrná délka pláště u samců je 8,1 cm a u samic pak 7,4 cm (Akyol, Şen, & Kinacigil, 2007), délka i s rameny pak do 40 cm (Norman et al., 2014). Nejvyšší zaznamenaná váha je 1414 g (Akyol & Şen, 2009). Je považována za „sociální“ chobotnici, tedy druh který se navzájem druží více, než jiné druhy (Mather, 1985). Známá zbarvení jsou bledě krémové s tmavými hnědými až černými skvrnkami či hnědá s černými skvrnkami – což jsou typická zbarvení pro aktivní zvířata; bledé zbarvení bez skvrn - typické pro inaktivní zvířata; hnědá bez skvrn - lze pozorovat když zvíře plave, ale také když je vyrušeno (Mather, 1985). Mívají zářivě zelenou až zlatou linku na okraji pláště (Norman et al., 2014). *E. moschata* se navzdory svému perfektnímu zraku spoléhá spíše na hmatovou informaci, a to kvůli šeru v hloubkách, které běžně obývá (Mather, 1985). *E. moschata* je komerčně významný druh v oblasti Středozemního moře, nejčastěji je chytaná vlečnými sítěmi na dně (Belcari & Sbrana, 1999). Přesnou statistiku o výlovu tohoto druhu není možné určit,

protože je vedena ve společné skupině s *E. cirrhosa* (Belcari et al., 1998), za rok 2016 činil výlov obou druhů pouhých 959 tun (oproti roku 2014 s výlovem 6296 tun) (FAO, 2018).



Obr. 2: Nákres *E. moschata*. A - samec, špička normálního ramene. B - hektokotyl. C - hřbetní pohled. Převzato z Norman et al., 2014.

1.1.4 Životní strategie

E. moschata je bentický druh, živící se především koryši, dále pak rybami, hlavonožci, plži, mlži a mnohoštětinatci (Krstulović Šifner & Vrgoč, 2009). Jsou to však dravci, a snadno přechází z jedné potravy na jinou (Mangold, 1983). Zdají se být spíše nočními zvířaty s aktivitou po soumraku (Mangold, 1983). Rozmnožovací cyklus je sezónní a obvykle dosahuje dvou vrcholů v různých měsících, v závislosti na lokalitě výskytu. Životní cyklus je krátkodobý a dlouhodobý (Silva et al., 2004), dlouhodobý lze pozorovat u exemplářů jež se rozmnožovali na začátku třetí sezóny, krátkodobý u jedinců, jež se třeli na konci třetí sezóny. Délka života nepřesahuje 2 roky (Mangold, 1983). Veliký vliv na rozmnožování a velikost jedince má teplota (Ezzeddine-Najai, 1997), kdy ve vyšších teplotách se rodí menší mláďata (Villanueva et al., 2016).

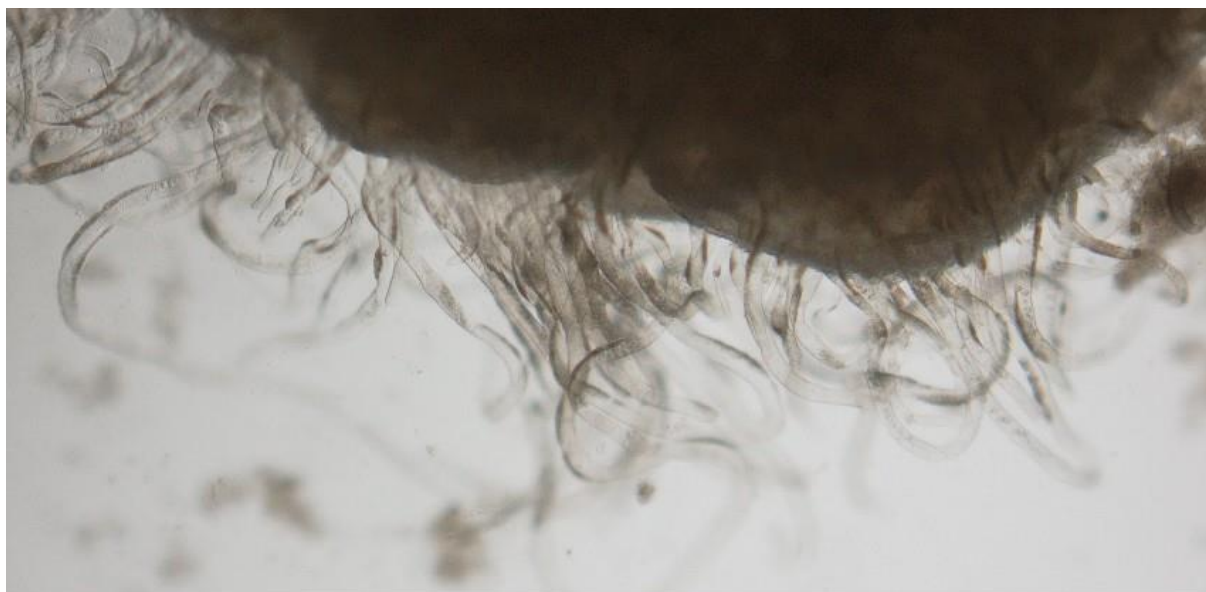
1.1.5 Parazité

Stejně tak, jako všechny *Eledone* spp., i *E. moschata* může být napadena různými parazity. Nalézt lze tasemnice *Scolex p. unilocularis*, *S. p. quadrilocularis*, *Acanthobothrium* sp., *Orygmatoscolex pusillum*, *Phyllobothrium pusillus*, *Nybelinia lingualis*; hlístice *Ascaris*

moschata, buchanku *Pennella varians* a také dicyemidy *Dicyema moschatum* a *Dicyemenea eledones* (Hochberg, 1983), kteří byli vzhledem ke svým unikátním vlastnostem (viz níže) zvoleni ke studiu v této práci.

1.2 Dicyemidé

Dicyemidé jsou mikroskopičtí, červovití živočichové, žijící jako parazité renálních orgánů bentických hlavonožců. Renální orgány pokrývají v hustotě tisíců jedinců na cm³ (Furuya & Tsuneki, 2003). Jejich tělní organizace je velmi prostá, sestávající z pouhých 8 až 40 buněk; nemají žádné tělní dutiny ani diferencované orgány (Suzuki, 2010). Mají jednu dlouhou axiální buňku, která je obklopena buňkami okrajovými. V přední části se okrajové buňky seskupují v útvar „calotte“, kterým je jedinec přichycen na tkáň renálního orgánu hlavonožce, viz obrázek 3, a který se dá rozdělit do tří typů dle tvaru (Furuya & Tsuneki, 2003). Druhů je uváděno 112, nicméně kvůli nedostatečné dokumentaci a nepřesnému popisu některých druhů není jasné, zda některé druhy nejsou uváděny pod více názvy, či zda vůbec existují (Catalano, 2012). V úvahu je však potřeba vzít i možnou existenci tzv. kryptických druhů, které jsou morfologicky neodlišitelné, nicméně geneticky odlišné (de León et al., 2019).



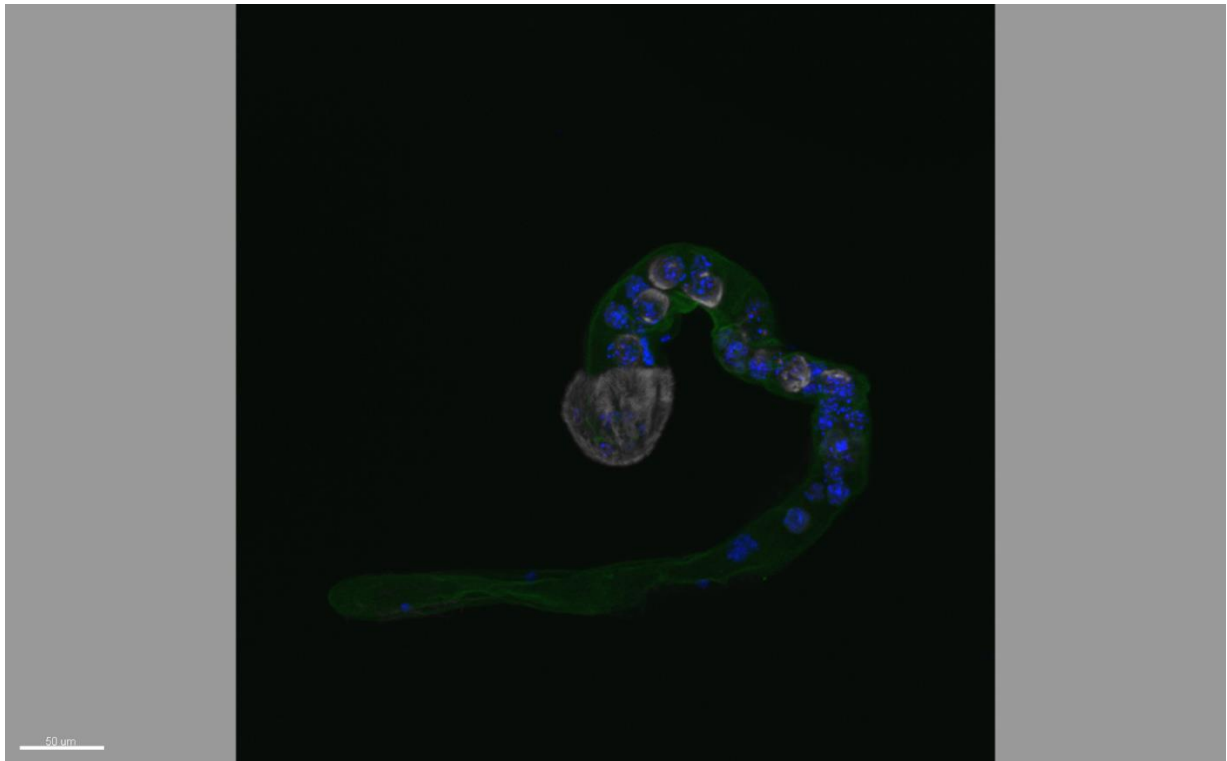
Obr. 3: *Dicyemida* sp. přichycení na renálním orgánu *E. moschata*. Foto Marie Drábková.

Dicyemidé využití v této práci (obrázek 4) patří ke druhu *Dicyema moschatum* (Whitman, 1883), což je druh, který lze nalézt ve dvou hostitelích, a to sice *Eledone moschata* a *Sepiola rondeleti* (Furuya, 1999).

1.2.1 Taxonomie

Skupina *Dicyemida* je společně se skupinou *Orthonectida* řazena mezi Mesozoa. Název skupiny Mesozoa měl podle Van Benedena (1876) vyjadřovat jejich postavení jako mezistupeň mezi Protozoa a Metazoa. Vzhledem k jejich jednoduché struktuře byli považováni za možné předchůdce Metazoi (Lapan & Morowitz, 1975), nicméně vzhledem k jejich životní strategii je možné, že je jejich struktura zjednodušená právě kvůli parazitismu (Stunkard, 1954). Stunkard

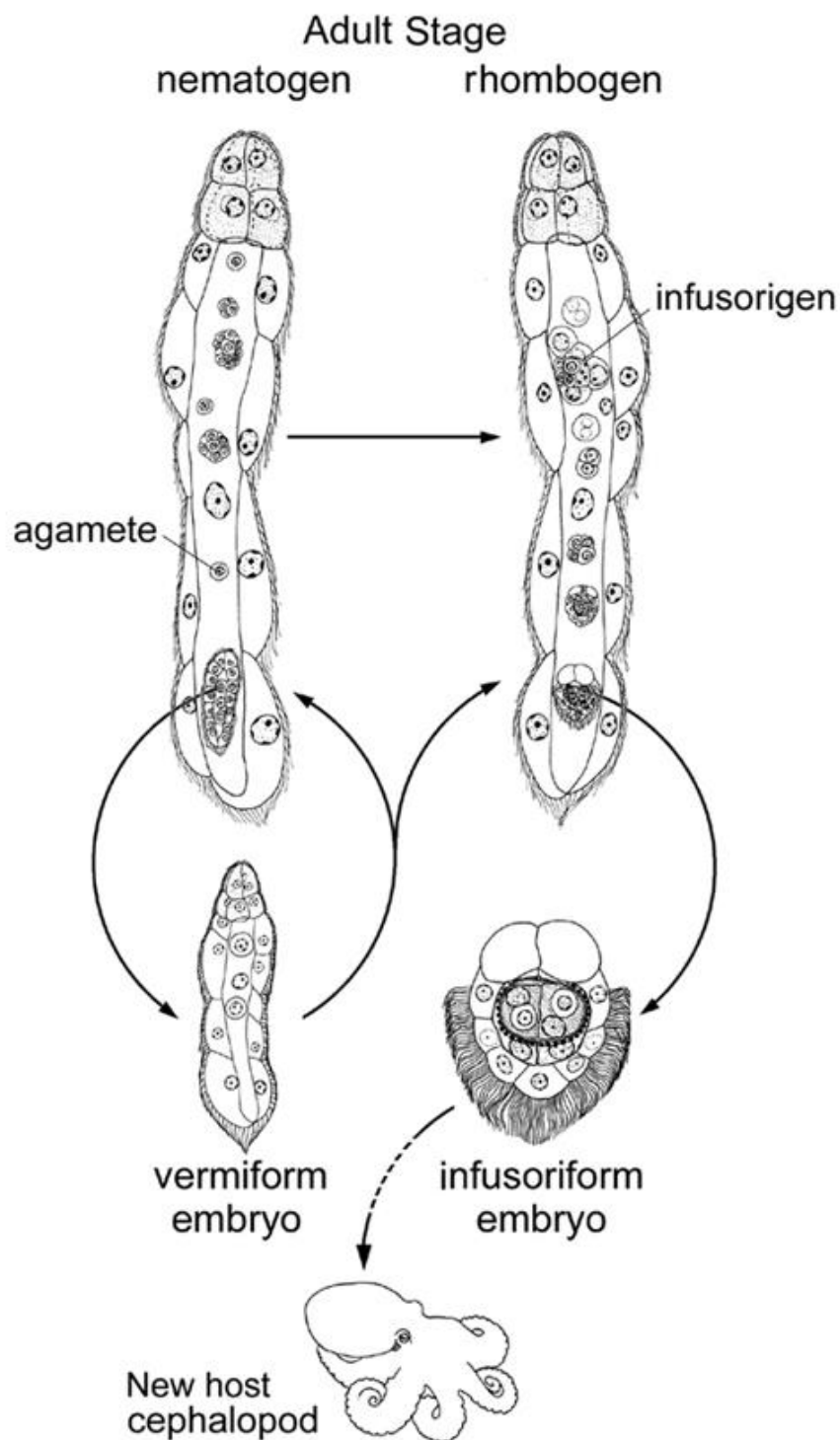
(1954) uvedl, že by mohli být řazeni mezi ploštěnce, toto zařazení však později nebylo podpořeno (Suzuki et al., 2010). Podle novějších studií by mohli dicyemidé patřit mezi Lophotrochozoa (Lu et al., 2017; Schiffer et al., 2018).



Obr. 4: Mikrofotografie *Dicyema moschatum*, fluorescenční barvení: modrá - DAPI (DNA, jádra) + zelená phalloidin (aktin, povrch buněk) + bílá - protilátka proti beta tubulinu (tubulin, cilie). Foto Marie Drábková.

1.2.2 Životní cyklus

Životní cyklus dicyemidů zahrnuje dvě stádia – vermiformní a infusoriformní, které se od sebe odlišují tělní stavbou (obrázek 5). Vermiformní stádium představuje buď embryo vzniklé asexuální reprodukcí či nematogenního/rhombogenního dospělého. Infusoriformní stádium je pak embryo vzniklé ze sexuální reprodukce, vylíhlé z oplodněného vajíčka z infusorigenu. Vermiformní stádia se nalézají pouze v renálním orgánu hostitele, zatímco infusoriformní stádium může hostitele opustit a hledat nového hostitele; samostatně zvládne plavat *in vitro* i několik dní (McConnaughey, 1951). Nicméně zatím není jisté, jak se infusoriformní jedinec změní na vermiformního v novém hostiteli a jakým způsobem dochází k infekci nového hostitele (Furuya & Tsuneki, 2003). Vzhledem k celkové neprobádanosti dicyemidů je možné, že je časem spíše, než parazity budeme definovat jako mutualisty chobotnic (Katayama et al., 1995; Furuya et al., 2004).



Obr. 5: Životní cyklus dicyemidů (podle Furuya et al., 2003).

1.3 Vztah mezi hostitelem a parazitem

Jak již bylo uvedeno, dicyemidé žijí v záhybech renálního orgánu hlavonožců. Tvar calotte je tedy úzce závislý na struktuře tkáně, ke které je přichycen. V jednom hostiteli by se tedy teoreticky měli nacházet morfologicky podobné druhy dicyemidů. Pokud však příslušnost jedince k určitému druhu nezávisí na morfologii zvířete, měli by se v rámci druhu hostitele nacházet blízké geneticky příbuzní dicyemidé a taktéž blízké příbuzní hlavonožci by měli hostit blízké příbuzné dicyemidy (Eshragh & Leander, 2014). Eshragh et al. (2014) tvrdí, že tvar calotte je přechodný znak, který si každý jedinec dicyemida přizpůsobí dle struktury renálního orgánu

hostitele. To značí, že jsou během vývoje schopni adaptovat se v závislosti na hostiteli; takováto morfologická plasticita se zdá být u parazitů běžná (Nolte et al., 2010). Naznačuje to, že i malá změna v tkáni hostitele by velmi ovlivnila populaci parazita v něm a naopak (Poulin et al., 2011). Výsledky sekvenací genu pro malou ribozomální podjednotku (18S rDNA) dokazují bližší příbuznost mezi morfologicky odlišnými typy dicyem, což ukazuje na významný koevoluční tlak mezi parazitem a hostitelem (Eshragh & Leander, 2014). Kontrastním tvrzením je pak názor, že dicyemidé jsou hostitelsky vysoce specifictí a v každém hostiteli lze najít jeden až dva druhy morfologicky odlišných dicyemidů (Furuya, 1999), k diferenciaci mezi různými druhy by pak patrně docházelo při pozdní embryogenezi (Furuya et al., 2003).

Vzhledem k neúplné probádanosti životního cyklu dicyem se neví, zda existuje další mezihostitel, ani jak přesně se hlavonožec nakazí. Ohledně osudu infusoriformních jedinců tedy vyvstává řada otázek, a to sice jak daleko jsou schopni migrovat a jak vlastně přežívají, než narazí na dalšího hostitele. Aby parazit našel dalšího hostitele, musí překonat řadu enviromentálních překážek, proniknout do hostitele a vyrovnat se s nevýhodami vlastního životního cyklu (Roberts et al., 2002). Vzhledem k úzké provázanosti s ekologií hostitele je pravděpodobné, že nakažení nových jedinců závisí na vlastnostech hostitele, například může souviset s jeho velikostí, životností, areálem výskytu či věkem (Catalano et al., 2014). Primárním úkolem parazita je pak nalézt svého hostitele; v případě moře a oceánu se jeví být výhodnou strategií být parazit generalista; nicméně u dicyemidů je pozorována vysoká hostitelská specifita. Vzhledem ke krátkověkosti hlavonožců (Semmens et al., 2007), je pro dicyemidy nutné uniknout z hostitele a nakazit dalšího během krátkého časového intervalu. Navzdory tomu, že je jen těžko představitelné, jak vlastně malé infusoriformní embryo úspěšně v moři najde dalšího hostitele, je prevalence dicyemidů vysoká (v oblasti Středozemního moře až 100%, Nouvel, 1947).

Jedna z teorií o infekci vychází z faktu, že infusoriformní embryo obsahuje vysoký podíl hořčnatých solí inositol hexafosfátů, jež způsobuje u embrya záporný vztlak, a tedy je nutí klesat – pak by mohlo k infekci docházet u právě vylíhnutých při dně žijících hlavonožců (Hochberg 1990, Lapan 1975). Catalano (2013) provedli experiment, jež měl dokázat, že hlavonožci jsou dicyemidy nakaženi již ve vajíčku. Během experimentu byla sbírána vajíčka druhu *Sepia apama*, ze kterých byla extrahována DNA, nicméně z žádného vajíčka se nepodařilo prokázat DNA dicyemidů, což naznačuje, že k nakažení dochází až po vylíhnutí hlavonožce. Catalano nicméně argumentuje, že neúspěšnost lze vysvětlit i nízkým stavem populace sépií v období sběru vzorků. Výzkum systému dicyemid-hlavonožec nicméně také ztěžuje zahrnutí chobotnic ve směrnici EU 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (Roumbedakis et al., 2018). Pokoušet se tedy na mnohé z otázek ohledně životního cyklu dicyemidů odpovědět pomocí laboratorního odchovu hlavonožců vyžaduje kromě důkladně zabezpečených akvárií i povolení.

1.4 Mikrosatelitní genetické markery pro studium populací

Mikrosatelity, synonymně také VNTR (variable number tandem repeats), STR (short tandem repeats), SSR (simple sequence repeats), patří mezi genetické markery společně s například alozymy, mitochondriální či jadernou DNA. Předpokladem každého dobrého genetického markeru je, že je v selekci neutrální a podléhá Mendelovým zákonům dědičnosti. S pomocí genetických markerů lze sledovat značnou část vlastností studované populace jako jsou rychlost migrace, velikost populace, bottleneck, způsob rozmnožování (zda jsou v populaci klony či zda dochází k sexuálnímu rozmnožování atd.), příbuznost mezi jedinci a další (Selkoe & Toonen, 2006). Mikrosatelity jsou tandemová opakování jednoho až šesti nukleotidů, obvyklý počet opakování je mezi pěti až čtyřiceti. Nalézají se v genomu s vysokou frekvencí a jsou běžné u většiny taxonů. Disponují vysokou mutační rychlostí (mezi 10^{-2} a 10^{-6} mutací na lokus za generaci), což způsobuje vysokou alelickou diverzitu vhodnou pro genetické studie na populační úrovni (Schlötterer, 2000). Nejběžnějšími volbami pro molekulárně genetické studie jsou dinukleotidová, trinukleotidová a tetranukleotidová opakování; trinukleotidová opakování jsou zajímavá také z důvodu, že nezpůsobují posun čtecího rámce, a proto se mohou nacházet i v kódujících oblastech genu (Toth et al., 2000). DNA sousedící s mikrosatelity se nazývá ohraničující oblast (flanking region). Tato oblast by měla být konzervována mezi jedinci stejného druhu, aby ji bylo možné využít pro navrhnutí primerů nutných k reakci PCR. Při výběru mikrosatelitních sekvencí je zásadním bodem vybrat takový lokus, pro který existuje více alel, ale zároveň je v dobře konzervované oblasti, aby se na různé jednotlivce bylo možné používat stejné primery bez problému s nasedáním. Dalším pozitivem mikrosatelitních markerů je i obvyklá krátká délka amplifikovaného úseku, lze je tedy amplifikovat snadněji než jiné delší sekvence, které se s postupnou degradací lámou (Taberlet et al., 1999). Dále pak také s faktem, že mikrosatelity bývají vysoce druhově specifické, se minimalizuje možnost kontaminace cizí DNA, což je jinak v případě živočichů žijících v tkáních jiných živočichů velice pravděpodobné. S klesající cenou oligonukleotidů na míru, dostupností sekvenačních služeb a jednoduchostí PCR jsou mikrosatelitní markery téměř ideální molekulární metodou. Nicméně, není možné spoléhat pouze na jeden mikrosatelitní lokus, z důvodu možných genealogických odlišností mezi různými genetickými oblastmi, které by mohly být způsobeny selekcí, rekombinací či genetickým driftem. V případě studií zabývajících se paternitou, klonalitou, strukturou populací a migrací je dobré vybrat lokusy s vysokou alelickou diverzitou (Kalinowski, 2002; Queller et al., 1993).

Tato práce se tedy pokusí pomocí analýzy mikrosatelitních markerů (návrh primerů, testování a selekce vhodných lokusů) odpovědět na otázky týkající se infekce *E. moschata* dicyemidy, popsat jejich populační strukturu napříč hostiteli i v rámci jednoho hostitele (tedy jejich infrapopulace).

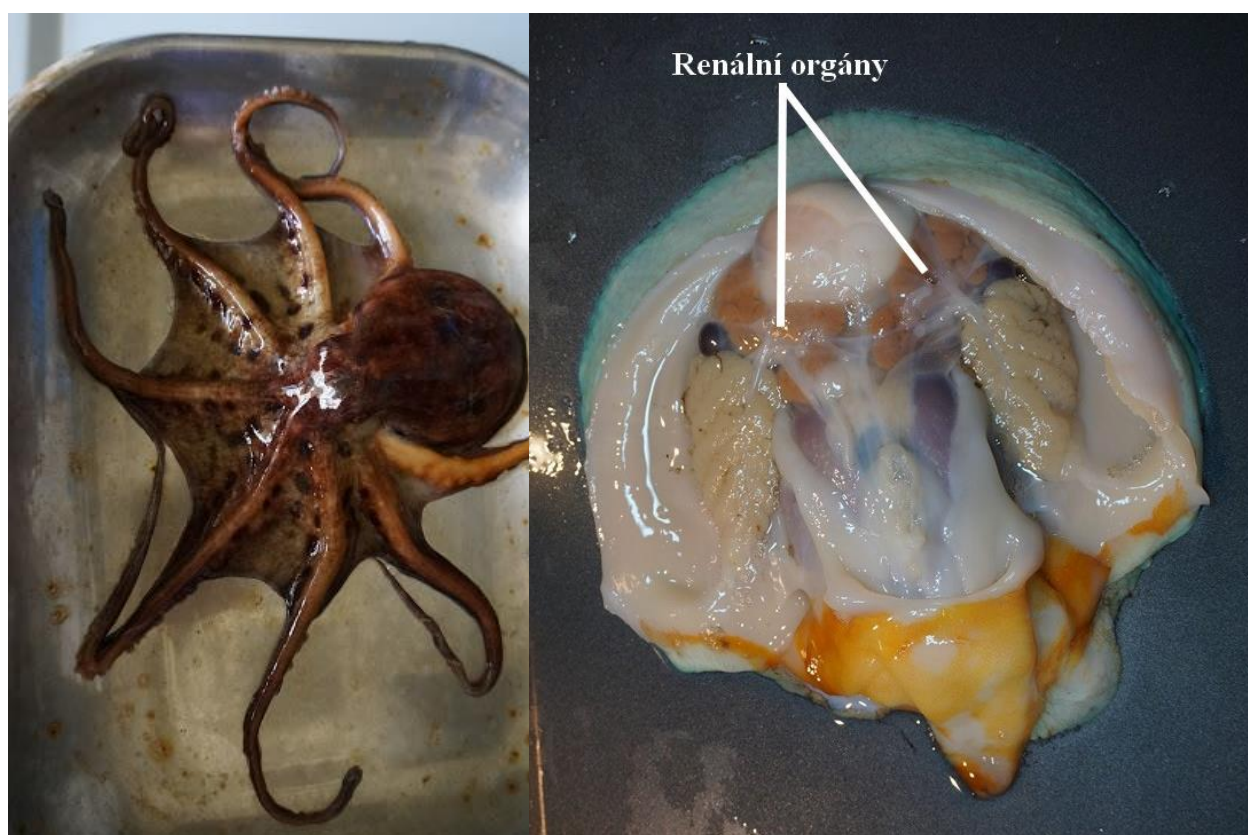
2. Cíle práce

- Osvojit si základní metody molekulární biologie (PCR) a aplikovat je na “low DNA input“ typ templátové DNA, jakou jsou vzorky dicyemidů.
- Optimalizovat použití mikrosatelitních markerů pro *Dicyema moschatum*.
- Vyhodnotit populační strukturu parazita *D. moschatum* na základě mikrosatelitních markerů uvnitř jednoho hostitele a napříč populacemi.

3. Metody a materiály

3.1 Původ vzorků

Chobotnice, ze kterých vzorky v této práci pocházejí (obrázek 6 vlevo), byly zakoupeny na rybářských trzích v italské Neapoli v květnu 2017 a v chorvatské Pule v květnu 2016. Chobotnice byly kupovány vždy pokud možno nejčerstvější, mrtvé, ale s ještě aktivními chromatofory. Vzorek svalové tkáně chobotnic (pro extrakci referenční hostitelské DNA neinfikované dicyemidy) byl odebírán zpravidla z chapadel, z vnitřní strany. K získání vzorku dicyemidů bylo zapotřebí vypreparovat z chobotnic jejich renální orgán, který se nachází v plášťové dutině (viz obrázek 6 vpravo).



Obr. 6: Vlevo *Eledone moschata* před preparací. Vpravo plášťová dutina hostitele. Foto Marie Drábková.

Renální orgán byl jemně vymáčán v čisté mořské vodě (ASW, artificial sea water připravená podle Lapan & Morowitz, 1975), čímž se dicyemidé sami uvolnili z renálního orgánu. Z jejich zmeti pak byli individuálně mikropipetou nanášeni na filtrační papír napuštěný TE-pufrem nebo přímo jednotlivě v mikrozkušavkách fixováni v čistém lihu (ethanol p.a.). Směsné vzorky (více jedinců z jednoho hostitele) byly fixovány v RNAlateru (Sigma-Aldrich) a buď se využívaly dále jako směsné, nebo byly později využity jako zdroj pro přípravu dalších jednotlivých „single“ vzorků (tedy vzorků obsahujících pouze jednoho jedince dicyemida). Příprava single vzorků z RNA lateru spočívala v precizním odpipetováním jednotlivých zvířat do kapky vody, aby se očistili od RNA lateru a pak do samostatných zkumavek.

3.2 Izolace DNA

Izolace DNA z dicyem byla provedena pomocí QIAamp DNA microkitu (Qiagen) dle návodu výrobce. Izolace DNA z hostitele byla provedena pomocí kitu DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) dle návodu výrobce.

3.3 Ověření druhu hostitele a parazita

Druh chobotnice byl ověřen pomocí genetického markeru cytochromoxidázy I (COI) a to sice amplifikací DNA pomocí PCR (průběh PCR a detaily použitých primerů viz tab. I, II). Rozpis reakce byl následující: 1 µl vzorku, 1 µl forward primeru (5pM, F1490, Folmer et al., 1994; sekvence viz Tab. I), 1 µl reverse primeru (5pM, H7005, Hafner et al 1994; sekvence viz Tab. I), 2 µl pufru (PCR blue buffer, Top-bio), 0,5 µl nukleotidů (dNTPs 10mM, ThermoFisher), 0,2 µl Taq polymerázy (Top-bio) a 14,3 µl H₂O.

Druh dicyemida byl ověřen pomocí 18S rDNA genu, taktéž amplifikací DNA pomocí PCR (průběh PCR a detaily použitých primerů viz tab. I, II). Rozpis reakce byl následující: 1 µl vzorku, 1 µl forward primeru (5pM, F3, Eshragh et al. 2014; sekvence viz Tab. I), 1 µl reverse primeru (5pM,R2, Eshragh et al. 2014; sekvence viz Tab. I), 2 µl pufru (PCR blue buffer, Top-bio), 0,5 µl nukleotidů (dNTPs 10mM, ThermoFisher), 0,2 µl Taq polymerázy (Top-bio) a 14,3 µl H₂O.

Tab. I: Přehled primerů použitých k ověření druhu hostitele a parazita.

Lokus	Název	Sekvence primeru 5' → 3'	Forward /Reverse	Autor
COI hostitele	F1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	F	Folmer et al., 1994
	H7005	CCGGATCCACANCRTARTANGTRTC RTG	R	Hafner et al., 1994
18S parazita	F3	CGGCTCATTAATCGGACATAC	F	Eshragh et al., 2014
	R2	CCAACAACCTCACCAAATCATTC	R	Eshragh et al., 2014

Tab. II: Protokol PCR pro ověření druhu hostitele a parazita.

Pro lokus	Počáteční denaturace	Počet cyklů	Denaturace	Nasedání primerů	Elongace	Finální elongace
COI hostitele	94° C 5 minut	30	92° C 1 minuta	52° C 1 minuta	72° C 1 minuta	72° C 5 minut
18S parazita	94° C 2 minuty	40	94° C 45 sekund	50° C 45 sekund	72° C 2 minuty	72° C 5 minut

3.4 Identifikace mikrosatelitů a navrhování primerů

Mikrosatelitní sekvence a primery k jejich amplifikaci použité v této práci byly navrženy programem QDD3 (Megléc et al., 2014) na základě sekvence genomu dicyemy (Drábková et al., in review). Program vygeneroval seznam všech možných mikrosatelitních sekvencí a primerů a z těch bylo vybráno 45 nejslibnějších (Megléc, 2010). Detailní soupis sekvencí viz příloha. Těchto 45 specificky navržených vhodných primerů (DicMiSat01-DicMiSat45) bylo syntetizováno externím dodavatelem (Sigma Aldrich).

3.5 Optimalizace a PCR

Protokol PCR bylo třeba optimalizovat, což bylo provedeno pomocí série gradientových PCR pro prvních 10 párů primerů (DicMiSat01 – DicMiSat10) s nasedací teplotou od 48°C do 65°C (finální rozpis viz tab. III v kapitole 4.1). Všechny 45 primerů pak bylo odzkoušeno na 6 vzorcích tak, aby byly zastoupeny vzorky z geograficky vzdálených lokalit (Neapol, Pula) a taktéž single i směsné vzorky (s větší koncentrací DNA pro ověření vyloučení neúspěšné amplifikace z důvodu malé koncentrace DNA u single vzorků). Rozpis PCR byl následující: 1 µl vzorku, 1 µl forward primeru (5pM, navrženo v rámci této práce, sekvence viz tabulka A v příloze), 1 µl reverse primeru (5pM, navrženo v rámci této práce, sekvence viz tabulka A v příloze), 2 µl pufru (PCR blue buffer, Top-bio), 0,5 µl nukleotidů (dNTPs 10mM, ThermoFisher), 0,2 µl Taq polymerázy (Top-bio) a 14,3 µl H₂O. Výsledky PCR byly ověřeny gelovou elektroforézou, viz kapitola gelová elektroforéza.

Podle výsledku PCR bylo vybráno 25 primerů, jež se zdály fungovat dobře a ty byly objednány fluorescenčně značené 6-FAM (vždy jen forward). Byly otestovány pomocí PCR, kdy rozpis i protokol byl stejný, jako při zkoušce nebarvených primerů. Výsledky PCR byly ověřeny gelovou elektroforézou a úspěšně amplifikované vzorky byly zaslány na fragmentační analýzu (SeqMe, CZ případně Macrogen, Korea).

Dle výsledků z fragmentační analýzy bylo vybráno osm nejspolehlivějších mikrosatelitních lokusů. Těchto osm lokusů bylo uspořádáno do dvou skupin po čtyřech tak, aby se sekvence nepřekrývaly a příslušné primery byly objednány fluorescenčně značené barvami VIC, NED, PET a již zmíněným 6-FAM (ThermoFisher) pro multiplex PCR. Detailní rozpis obou sad uvádí tab. III.

Tab. III: Sady primerů pro mikrosatelitní lokusy dicyem.

Sada	Název	Sekvence primeru 5' → 3'	Forward / Reverse	Barveno
A	DicMiSat05	GTCATAGAGGCGATGTAGGGC	F	NED
		CACCCGACAGAACTTGCACT	R	
	DicMiSat07	ATGCACCTTCTTCGTCGGTT	F	6-FAM
		AACAAGCAAACACGCTGCAA	R	
	DicMiSat02	CCCTCAAATTCGCTGATGTGAA	F	PET
		TGAGAATGGCATACAAACAACACA	R	
DicMiSat27	ACTGAAGCTATGTGCCGGAA	F	VIC	
	TTTCTCTGGCCATCCTTCGC	R		
B	DicMiSat08	AATGAATCCACCCAACCCGC	F	NED
		CAAGCCTGGCTCTGTCAGAA	R	
	DicMiSat31	ATCATTTAAAGATTTGGCTGGCA	F	6-FAM
		TTCTTGGTGACCTTATAAAGTGTGTG	R	
	DicMiSat17	GGGTTGCAAGTGTGTGGAAG	F	PET
		AGGTGCCGTCCAAATGTTCA	R	
DicMiSat41	GCCGTGATACCAACGTCCA	F	VIC	
	CTGGGCACGTTTCGAGTATGT	R		

Reakci pro multiplex PCR však bylo třeba optimalizovat. Byly vyzkoušeny různé poměry primerů v množstvích od 0,4 µl až do 1,2 µl, nejlépe se však osvědčil následující rozpis: 1 µl vzorku, 0,6 µl forward primeru (5pM, navrženo v rámci této práce, značeno 6-FAM, sekvence viz tabulka III), 0,6 µl reverse primeru (5pM, navrženo v rámci této práce, sekvence viz tabulka III), 0,6 µl forward primeru (5pM, navrženo v rámci této práce, značeno VIC, sekvence viz tabulka III), 0,6 µl reverse primeru (5pM, navrženo v rámci této práce, sekvence viz tabulka III), 0,6 µl forward primeru (5pM, navrženo v rámci této práce, značeno PET, sekvence viz tabulka III), 0,6 µl reverse primeru (5pM, navrženo v rámci této práce, sekvence viz tabulka III), 0,6 µl forward primeru (5pM, navrženo v rámci této práce, značeno NED, sekvence viz tabulka III), 0,6 µl reverse primeru (5pM, navrženo v rámci této práce, sekvence viz tabulka III) 2 µl pufru (PCR blue buffer, Top-bio), 0,5 µl nukleotidů (dNTPs 10mM, ThermoFisher), 0,5 µl Taq polymerázy (Top-bio), 10,2 µl H₂O a 1 µl Q-solutions (5x, Qiagen). Cycler je třeba před začátkem PCR vyhrát (10 minut na 50 °C). V případě přípravy více reakcí bylo potřeba pracovat rychle a pokud možno reakci udržovat na ledě, v opačném případě hrozila rychlá degradace reakční směsi.

Finální multiplex PCR byla provedena na 49 vzorcích (viz Příloha, tabulka B) s oběma sadami primerů (tab. III), protokol PCR viz tab. IV, rozpis PCR je uveden výše. Úspěšnost PCR

byla ověřena gelovou elektroforézou a výsledky reakce zaslány na fragmentační analýzu (MacroGen, Korea přístroj DNA Analyzer 3730XL AB, USA, kit BigDye v3.1, AB, USA).

Pro ověření specifity použitých primerů byla provedena kontrolní PCR na vzorcích z hostitele, s rozpisem reakce viz výše na protokolu PCR, jež byl dříve optimalizován.

3.6 Gelová elektroforéza

Úspěšnost průběhu PCR byla vždy ověřována gelovou elektroforézou. Z důvodu malé velikosti fragmentů byl používán 2% agarózový gel. Na přípravu gelu bylo použito 95 ml pufru TAE (Merck), 1,9 g agarózy (ThermoFisher) a 9,5 μ l GelRed (Biotium) fluorescentního barviva pro vizualizaci DNA. Nanášeno bylo vždy 2 μ l vzorku s 0,5 μ l 6x Loading Dye (ThermoFisher). Jako ladder byl použit GeneRuler 100 bp Plus DNA (ThermoFisher). Gelová elektroforéza byla spuštěna 35 minut na 105 V. Po dokončení byl gel osvětlen UV světlem pro vizualizaci fragmentů DNA.

3.7 Fragmentační analýza

Fragmentační analýza, tedy kapilární elektroforéza, je způsob separace fluorescenčně značených fragmentů DNA, v našem případě mikrosatelitních lokusů. Vyzkoušena byla dvě sekvenační centra, a to sice SeqMe a MacroGen, nicméně výsledky z MacroGenu vykazovaly vyšší kvalitu. Vzorky byly zasílány bez enzymatického čištění. Pro porovnání délky fragmentů byl používán ladder LIZ 600. Výstupní data z fragmentační analýzy byla zpracována v programu Geneious s pomocí Microsatellite pluginu. Chromatogram obvykle bylo potřeba zkontrolovat (zda ladder sedí); dále pak vyhodnotit relevanci peaků – zda se nejedná o stutter či bleed through.

3.8 Zpracování dat

Data z programu Geneious byla převedena do formátu tabulky v MS Excel a taktéž byla spočítána úspěšnost amplifikace pro jak jednotlivé chobotnice (infrapopulace) a jednotlivé dicyemidy, tak i pro každý lokus zvlášť. Na základě této úspěšnosti byly vyřazeny špatně funkční lokusy a jednotlivci. Na tomto „vytříděném“ datasetu byly pak pomocí plug-inu GenAIEx (Peakall & Smouse 2006, 2012) v MS Excel spočítány základní populačně genetické charakteristiky: pozorovaná heterozygosita (H_O), očekávaná heterozygosita (H_E), alelická frekvence přes lokusy, genetické vzdálenosti populací, fixační index (F_{ST}), analýza molekulární variance (AMOVA) a za pomoci programu RMES (David et al., 2007) míra samoplození (selfing rate, s , g_2 a F_{IS}). V programu Structure byl pak původní (nevytříděný) dataset zpracován s nastavením 100 000 burn-in, 1 000 000 kroků a 15 opakování. Výsledný graf byl získán pomocí programu CLUMPAK (Kopelman et al., 2015), který pracuje s výsledky ze Structure. Výsledky ze Structure (best K) byly analyzovány pomocí StructureSelector (Li & Liu, 2018).

4. Výsledky

4.1 Optimalizovaný protokol PCR

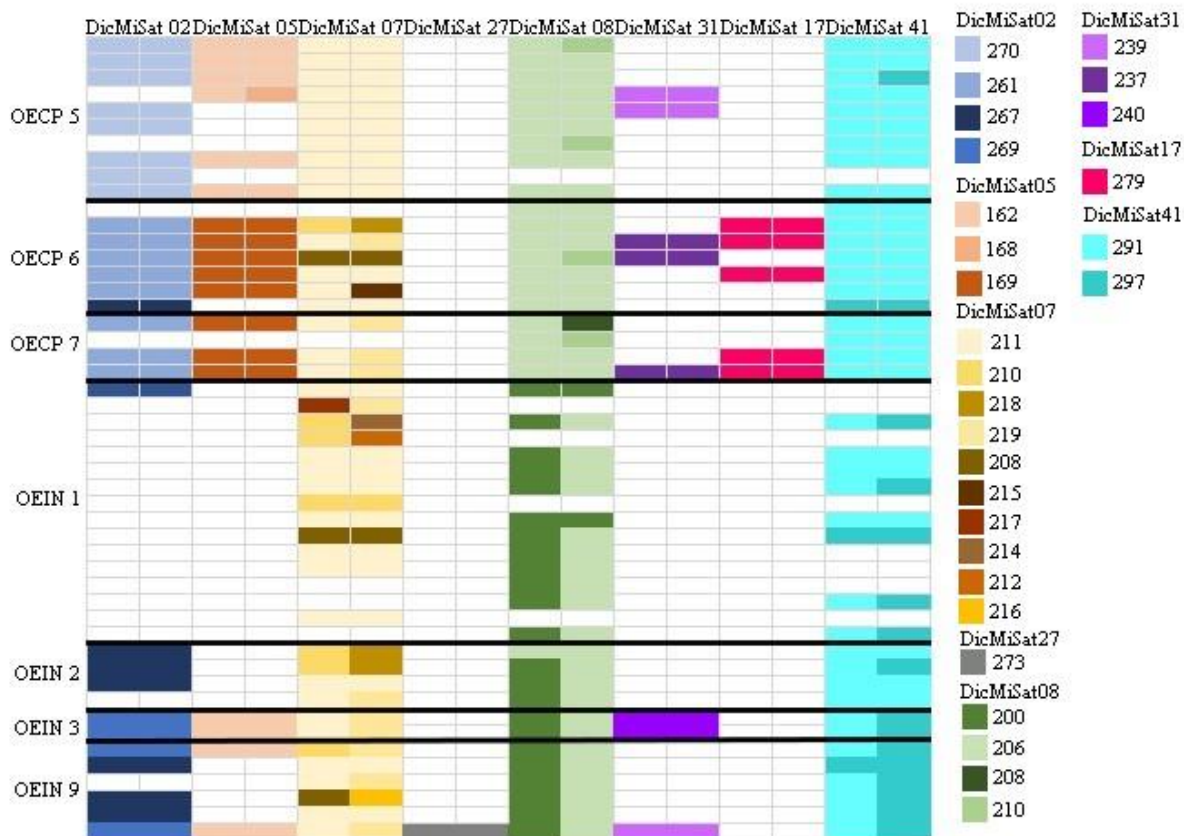
Počáteční denaturace	Počet cyklů	Denaturace	Nasedání primerů	Elongace	Finální elongace
94° C 5 minut	35	94° C 30 sekund	54° C 30 sekund	72° C 1 minuta	72° C 4 minut

4.2 Kontrola specifičnosti primerů

Z výsledného gelu z gelové elektroforézy bylo jasné, že při kontrole s DNA hostitele nedochází k amplifikaci týž lokusů, jako při amplifikaci DNA dicyemidů. Na gelu se nicméně vytvořily nespecifické produkty různých délek tvořící laddery.

4.3 Výsledný dataset

Dataset získaný z programu Geneious byl zpracován do tabulky (viz Příloha, tabulky C1, C2). Každý lokus obsahoval jen omezený počet alel (nejméně 1, nejvíce 10). Proto bylo možno snadno vizualizovat genotypy jednotlivců graficky. Byl vytvořen obrázek 7, kdy každý odstín představuje konkrétní alelu, každý řádek pak jednotlivé dicyemidy.



Obr. 7: Barevné vyobrazení genotypů přítomných napříč datasetem (první sloupec vyjadřuje hostitele; bílá znázorňuje chybějící data).

4.4 Vytríděný dataset

Jak je patrné z obrázku 7, napříč původním datasetem je velké množství chybějících dat. Na základě hodnot úspěšnosti amplifikace jednotlivých populací (v rámci jednoho hostitele, tedy infrapopulace; viz tabulka V) a jednotlivých lokusů (viz tabulka VI), byl vytvořen vytríděný dataset (viz Příloha, tabulka D), s kterým se pracovalo dále. Vybrány byly jen 4 lokusy, a to sice DicMiSat 02 s úspěšností 57 %, DicMiSat 05 s úspěšností 37 %, DicMiSat 08 s úspěšností 90 % a DicMiSat 41 s úspěšností 82 %. DicMiSat 07 měl sice vysokou hodnotu amplifikačního úspěchu (90 %), nicméně pattern (schéma) alel byl nestandardní. Ostatní lokusy měly úspěšnost pod 20 %, konkrétně pak DicMiSat 27 měl 2 %, DicMiSat 31 měl 16 % a DicMiSat 17 měl 10 %. Z 49 původních jedinců bylo do vytríděného datasetu vybráno 39 (vyřazeny byly vzorky 9, 23, 25, 29, 32, 33, 34, 36, 42, 43; vzorky 42 a 43 zastupovaly infrapopulaci/hostitelského jedince OEIN 3 - ta tedy kompletně v dalších výsledcích chybí).

Tab. V: Tabulka hodnot pro jednotlivé populace.

Populace	N individuí	N genotypů	Úspěšnost amplifikace	H _O	H _E
OECP 5	10	44	55 %	0.063	0.057
OECP 6	7	36	64 %	0.080	0.169
OECP 7	4	20	63 %	0.188	0.113
OEIN 1	16	34	27 %	0.196	0.193
OEIN 2	4	15	47 %	0.219	0.176
OEIN 3	2	12	75 %	0.375	0.188
OEIN 9	6	27	56 %	0.313	0.256
Průměr				0.205	0.164
Směrodatná odchylka				0.046	0.031

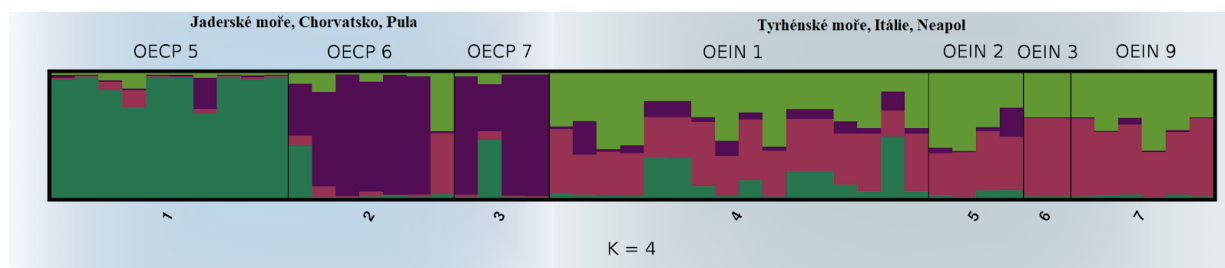
Tab. VI: Tabulka hodnot pro jednotlivé lokusy.

Lokus	Úspěšnost amplifikace	H _O	H _E	F _{IT}
DicMiSat 02	57 %	0.000	0.108	1.000
DicMiSat 05	37 %	0.024	0.022	0.968
DicMiSat 07	90 %	0.592	0.512	0.022
DicMiSat 27	2 %	0.000	0.000	1.000
DicMiSat 08	90 %	0.635	0.384	-0.308
DicMiSat 31	16 %	0.000	0.000	1.000

DicMiSat 17	10 %	0.000	0.000	1.000
DicMiSat 41	82 %	0.100	0.289	-0.014
Průměr				0.583
Směrodatná chyba				0.203

4.5 Structure

Evannovou metodou (Evanno et al., 2005) bylo zjištěno, že nejvíce odpovídá datům rozdělení do 4 genetických klastrů (K=4). Tabulka s výpočtem viz Příloha, tabulka E. Výsledný graf rozdělení jedinců dicyemidů podle 4 klastrů z programu CLUMPAK viz obrázek 8.



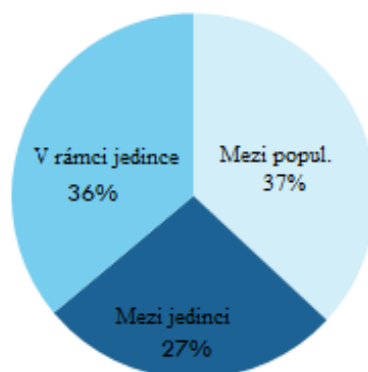
Obr. 8: Genetický profil jedinců podle 4 hypotetických zdrojových populací (Structure, Clumpak).

4.6 GenAlEx

4.6.1 H_O , H_E , HWE, AMOVA

Tato část již pracovala s vytríděným datasetem. Výsledné hodnoty očekávané a pozorované heterozygosity jsou zapsány v tabulce V a VI. S výjimkou lokusu DicMiSat 02 jsou hodnoty pozorované heterozygosity H_O zpravidla vyšší než očekávané H_E . Většina lokusů ve většině populací je v Hardy-Weinbergově rovnováze s výjimkou lokusu DicMiSat 02 u populací 2 (OECP 6) a 7 (OEIN 9), lokusu DicMiSat 41 u populace 2 (OECP 6) a lokusu DicMiSat 08 u populace 7 (OEIN 9).

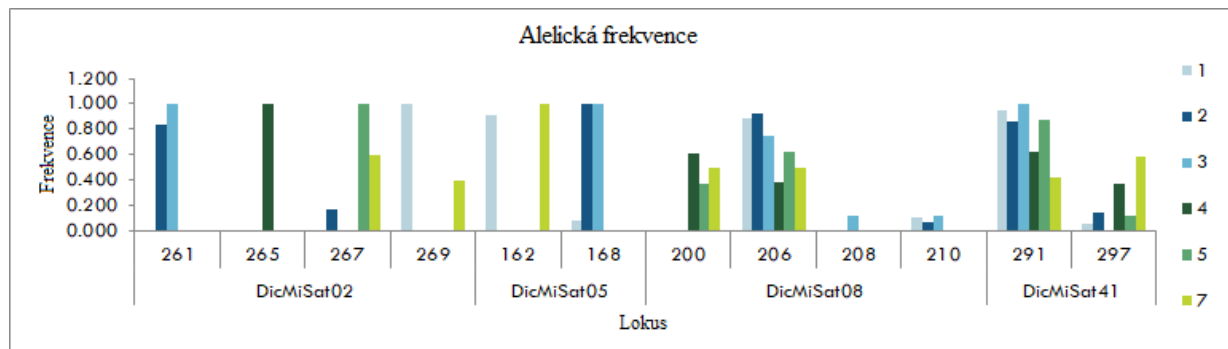
Výsledný graf AMOVA znázorňuje obrázek 9. Je z něj patrné, že genetická diverzita mezi populacemi a mezi jedinci dosahuje téměř totožných hodnot.



Obr. 9: Graf AMOVA vyjadřující procenta molekulární variance na různých populačních úrovních.

4.6.2 Alelické frekvence

Graf znázorňující výskyt alel jednotlivých lokusů v rámci vymezených populací znázorňuje obrázek 10. Je patrné, že v polymorfních lokusech DicMiSat 02 a 08 existují varianty alel typické pro chorvatskou či italskou populaci (privátní alely) ale zároveň i alely společné pro obě populace.



Obr. 10: Graf znázorňující alelickou frekvenci. Odstíny modré představují chorvatské chobotnice, zelené pak ty z Itálie.

4.6.4 Genetická vzdálenost populací, F_{IS} a F_{ST}

Genetické vzdálenosti populací (N_{EI} genetic distance) a hodnoty F_{ST} ukazující strukturovanost populace vyjadřuje tabulka VII. Hodnota F_{IS} vypočítaná v programu RMES dosáhla hodnoty $s=0,387$, míra samoplození je tedy 38,7 %.

Tab. VII: F_{ST} (nad diagonálou) a N_{EI} genetická vzdálenost (pod diagonálou).

1	2	3	4	5	7	
x	0,407	0,476	0,594	0,515	0,255	1
0,686	x	0,071	0,545	0,47	0,469	2
0,737	0,021	x	0,616	0,541	0,546	3
1,037	1,015	1,087	x	0,535	0,417	4
0,723	0,608	0,763	0,716	x	0,374	5
0,315	1,064	1,338	0,846	0,454	x	7

5. Diskuze

Provedený experiment a navržené mikrosatelitní markery lze považovat za úspěšné. Vzhledem k faktu, že studium dicyemidů po molekulární stránce je stále v plenkách, je výsledný set čtyř navržených mikrosatelitních lokusů a jejich primerů dobrým začátkem pro budoucí studie. Největším nedostatkem této práce je velké množství chybějících dat z fragmentační analýzy a nízký počet vzorků. Možným důvodem nízké úspěšnosti amplifikace mohla být degradace vzorků a nízká koncentrace DNA. Vzorky, kromě svého stáří, byly i intenzivně využívány a časté opakované rozmrazování během optimalizace celého experimentu mohlo vést k jejich degradaci. V případě některých vzorků jejich omezené množství vedlo k chybějícím datům pro některé jedince/lokusy. Zároveň mohlo docházet během multiplex PCR ke kompetici primerů u některých lokusů a špatné amplifikaci jednotlivých lokusů, protože při samostatných jedno-lokusových amplifikacích k tomuto problému nedocházelo.

Z hlediska úspěšnosti amplifikace mikrosatelitních markerů pro populační analýzy zaměřené na dicyemidy by bylo vhodné rozšířit experiment o nové vzorky, optimálně z více různých lokací a také z každého hostitele získat více single vzorků; to je však manuálně velmi náročné a časově omezené, protože k oddělování jedinců od sebe je potřeba, aby byli živí a nedocházelo k jejich poškození při pipetování. Bohužel, zatím není možné je dlouhodobě udržet v kultuře, takže na přípravu single vzorků je jen několik hodin. V budoucích experimentech by bylo také vhodné případně odzkoušet další možné mikrosatelitní lokusy, pro získání setu alespoň osmi spolehlivě funkčních lokusů; bylo by vhodné dále optimalizovat PCR a zjistit, zda by za upravených podmínek problémové lokusy nefungovaly lépe. V recentní studii Light et al. (2019) uvádí podobný experimentální přístup jako v našem případě, bylo by tedy vhodné poučit se z jejich poznatků a využít je při případném opakování našeho experimentu.

Přes zmíněné nedostatky však získaná data přinesla řadu nových poznatků. Z výsledků jasně vyplývá, že dicyemidy jsou diploidními živočichy (přítomnost heterozygotů) a že v rámci infrapopulací se nenacházejí pouze klony = identické genotypy (viz obr. 7 rozložení genotypů), ačkoliv u dicyemidů se předpokládá asexuální či klonální množení alespoň v části životního cyklu. Klonalita jako taková snižuje genotypovou variabilitu a také ovlivňuje tzv. linkage disequilibrium (LD), tedy vytváří nenáhodné asociace mezi různými lokusy – nárůst prevalence určitého typu klonu by pak výrazně přispíval k vyšší míře LD (Huo et al., 2016). Genetickou variabilitu ovlivňuje mimo genetického toku (gene flow) a genetického posunu (genetic drift) i inbreeding. Mezi dopady vysoké míry inbreedingu v systému patří snížení hodnoty efektivní velikosti populace (N_e). To vede k silnějšímu genetickému driftu a tím snazší ztrátě alel, což celkově snižuje genetickou diverzitu (Cole & Viney, 2018). Tabulka IV uvádí F_{IT} (inbreeding coefficient vzhledem k celkové populaci), hodnoty se pohybují průměrně kolem 0,5, značící existující inbreeding u celkové populace. Hodnota míry samoplození (s , selfing rate = 0,387)

dosahující na téměř 39 % pak ukazuje, že v rámci infrapopulací tento způsob rozmnožování nepřevažuje, ale je běžný. Z analýzy struktury populace založené na přiřazení jedinců k hypotetickým populacím (program STRUCTURE, obr. 8) je vidět, že jednotlivci uvnitř jednoho hostitele nejsou navzájem identičtí a že jednotlivé infrapopulace do určité míry odpovídají geografickému rozložení jejich hostitelů.

V našem systému je pozorovaná heterozygosita většinou vyšší než ta očekávaná, hodnoty F_{ST} ukazují na relativně oddělené populace a hodnoty z AMOVA taktéž ukazují na běžnou úroveň vnitro-populační i mezi-populační diverzity; dohromady s výsledky ze Structure (ukazující na podobné složení geograficky blízkých infrapopulací) je téměř až zarážející, že se dicyemidé chovají jako populace poměrně standardně, vezmeme-li v úvahu jejich životní strategii a habitat. Ve srovnání s výše zmíněnou studií na všenkách (Light et al., 2019) jsme dosáhli podobných hodnot počtu alel a to 1-10, po vyřídění lokusů jen na finální čtyři pak byly 2-4 alely na lokus (Light uvádí 3-9 alel na lokus). Očekávaná heterozygosita na lokus se pohybovala v rozsahu 0,022-0,384 u oněch 4 plně funkčních lokusů (vs. hodnoty 0,32-0,70 u všenek). Značně rozdílné jsou pak hodnoty F_{ST} – našich 0,071-0,616 vs. 0,01-0,05 u všenek; rovněž i hodnota mezi-populační variance AMOVA, která v naší studii dosahovala 37 % a u Light et al. pouhé 2 %. Nicméně na hodnoty F_{ST} může mít vliv vzdálenost porovnávaných populací – naše populace jsou od sebe značně vzdáleny, zatímco u všenek se jedná o porovnání infrapopulací ze stejné geografické oblasti.

Genetická populační struktura se dá chápat jako distribuce genetické variability v čase a prostoru; zásadně ovlivňuje, jak druh reaguje na selekční tlaky a dává tím prostor evoluci. Výhod plynoucích ze studia genetické populační struktury parazitů volně žijících zvířat je více. Mezi hlavní patří možnost pochopit způsoby infekce (Criscione et al., 2005); odhalit možné kryptické druhy (de León et al., 2019), které i když morfologicky neodlišitelné, mohou být geneticky velmi odlišné či lépe pochopit fylogeografii jak parazita, tak hostitele (Cole & Viney, 2018). Na základě výsledků plynoucích z této studie lze předpokládat, že k infekci hlavonožce dicyemidy dochází pravděpodobně více než jednou; soudě dle výskytu více různých genotypů v rámci jedné infrapopulace a také výskytu více než jednoho druhu dicyemida v jednom hostiteli (na základě sekvenace 18S genu, Drábková, pers. comm.). Výskyt kryptických druhů u dicyemidů nelze podle této studie zatím vyloučit, ani potvrdit. Vzhledem k faktu, že na většinu zvířat bylo možno použít stejné mikrosatelitní markery, lze předpokládat, že se jedná o jedince stejného druhu. Podrobnější rozlišení by ale mohlo poskytnout genomové sekvenování. Genetická struktura parazita by se také dala využít k odhadu genetické struktury hostitele; jsou známy případy využívání parazitů jako tzv. biological tags (biologické označení) u mořských migrujících zvířat (MacKenzie, 2002). Přítomnost či absence parazita pak může vypovědět o původu hostitelského zvířete a pokud je populace parazita více rozdělená a specifická, dal by se genotyp parazita

teoreticky využít k přesnějšímu odhadu původní populace hostitele, než za pomoci genotypu hostitele (Criscione et al., 2005). Přestože dicyemidé mohou být vhodným kandidátem pro využití jako biological tags (Catalano, 2013), zatím tento přístup není příliš využíván, pravděpodobně vzhledem k mnohým nejasnostem ohledně jejich životního cyklu a celkovému nedostatku informací o rozšíření jejich populací.

Tato pilotní studie ukazuje, že využití mikrosatelitních markerů při studiu dicyemidů přineslo nové zajímavé poznatky o populační struktuře těchto málo známých parazitů, nicméně opakování experimentu s čerstvým materiálem by zajisté vyneslo přesnější – a především kompletnější – data.

6. Závěr

- Byly navrhnuty mikrosatelitní lokusy a jejich primery pro *Dicyema moschatum*.
- Proces PCR byl optimalizován.
- Výsledky byly zpracovány v programech Structure a GenAIEx.
- Na základě výskytu více genotypů v rámci jedné infrapopulace dochází k infekci pravděpodobně opakovaně.
- Z výsledků vyplývá, že zvířata se nemnoží pouze klonálně a že jsou diploidní.
- Populace dicyemidů nejsou geneticky homogenní, ale strukturované.
- Výsledky naznačují, že genotypy jedinců se do jisté míry liší dle geografického regionu hostitele.

7. Seznam citované literatury

- Akyol, O., Şen, H. (2009). A New Maximum Size for *Eledone Moschata* (Cephalopoda: Octopodidae). *Marine Biodiversity Records*, 1 (August 2007): 2008–2008.
- Akyol, O., Şen, H., Kinacigil, H.T. (2007). Reproductive Biology of *Eledone Moschata* (Cephalopoda: Octopodidae) in the Aegean Sea (Izmir Bay, Turkey). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87 (4): 967–70.
- Belcari, P., Sbrana M. (1999). *Eledone moschata*. In: G. Relini, J.A. Bertrand and A. Zamboni (eds.), synthesis of the knowledge on bottom fishery resources in central mediterranean (Italy and Corsica). *Biol. mar. mediterr.*, 6(Suppl. 1): 737-746.
- Belcari, P., Sartor, P., De Ranieri, S. (1998). I cefalopodi nello sbarcato commerciale con reti a strascico nel Mar Tirreno Settentrionale. *Biologia Marina Mediterranea*, 5: 318–325.
- Catalano, S.R. (2012). A Review of the Families, Genera and Species of Dicyemida Van Beneden, 1876. *Zootaxa*, 32 (3479): 1–32.
- Catalano, S.R. (2013). First Descriptions of Dicyemid Mesozoans (Dicyemida : Dicyemidae) from Australian Octopus (Octopodidae) and Cuttlefish (Sepiidae), Including a New Record of Dicyemid in Australian Waters. *Folia Parasitologica*, 5683: 306–20.
- Catalano, S.R., Whittington, I.D., Donnellan, S.C., Gillanders, B.M. (2013). Using the giant Australian cuttlefish (*Sepia apama*) mass breeding aggregation to explore the life cycle of dicyemid parasites. *Acta Parasitologica*, 58(4): 599–602.
- Catalano, S.R., Whittington, I.D, Donnellan, S.C., Gillanders, B.M. (2014). Dicyemid Fauna Composition and Infection Patterns in Relation to Cephalopod Host Biology and Ecology. *Folia Parasitologica*, 61 (4): 301–10.
- Cole, R., Viney, M. (2018). The population genetics of parasitic nematodes of wild animals. *Parasites & Vectors*, 11: 590-610.
- Criscione, C.D., Poulin, R., Blouin, M.S. (2005). Molecular ecology of parasites : elucidating ecological and microevolutionary processes, *Molecular Ecology*, 14: 2247–2257.
- David, P., Pujol, B., Viard, F., Castela, V., Goudet, J. (2007). Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular Ecology*, 16: 2474-2487.
- Eshragh, R., Leander, B.S. (2014). Molecular contributions to species boundaries in dicyemid parasites from eastern Pacific cephalopods, *Marine Biology Research*, 11(4): 414–422.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611–2620.
- Ezzeddine-Najai, S. (1997). Maturation sexuelle d'*Eledone moschata* (Cephalopoda, Octopoda) du Golfe de Gabès. *Vie et Milieu*, 47: 69–76.
- FAO (2018). FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2016/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2016/FAO anuario. *Estadísticas de pesca y acuicultura* 2016. Rome/Roma. 104pp.

- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–99.
- Furuya, H. (1999) Fourteen new species of dicyemid Mesozoans from six Japanese cephalopods, with comments on host specificity. *Species Diversity*, 4: 257–319.
- Furuya, H., Tsuneki, K. (2003). Biology of Dicyemid Mesozoans, *Zoological Science*, 20(5): 519–532.
- Furuya, H., Ota, M., Kimura, R., and Tsuneki, K. (2004). Renal organs of cephalopods: a habitat for dicyemids and chromidinids. *J. Morphol*, 262: 629–643.
- Furuya, H., Hochberg, F.G., Tsuneki, K. (2007) Cell number and cellular composition in vermiform larvae of dicyemid mesozoans. *Journal of Zoology*, 272: 284–298.
- Hafner, M.S., Sudman, P.D., Villablanca, F.X., Spradling, T.A., Demastes, J.W., Nadler, S.A. (1994). Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science*, 365: 1087–1090.
- Hochberg, F.G. (1983). The parasites of cephalopods: a review. *Memoirs of the National Museum of Victoria*, 44: 109–145.
- Hochberg, F.G. (1990). Diseases caused by protists and mesozoans. In: O. Kinne (Ed.), Diseases of Marine Animals. Vol. 3. *Biologische Anstalt Helg.*
- Huo, G., Liu, L., He, H., Attwood, S.W. (2016). An investigation into the potential effects of infrapopulation structure and other sources of sampling error , on population genetic studies of the transmission of *Schistosoma japonicum* (Trematoda : Digenea), *Parasites & Vectors*, 9: 165-180.
- Jereb, P., Allcock, A.L. (2015). Cephalopod biology and fisheries in Europe : II . Species Accounts . ICES Cooperative Research Report Rapport des Recherches Collectives June 2015 Cephalopod biology and fisheries in Europe : II . Species Accounts . ISBN 978-87-7482-155-7.
- Kalinowski, S.T. (2002). How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity*, 88: 62–65.
- Katayama, T., Wada, H., Furuya, H., Satoh, N., and Yamamoto, M. (1995). Phylogenetic position of the dicyemid Mesozoa inferred from 18S rDNA sequences. *Biol.Bull.*, 189: 81–90.
- Kopelman, N.M. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15: 1179–1191.
- Krstulović Šifner, S. et al. (2005). Composition and Distribution of the Cephalopod Fauna in the Eastern Adriatic and Eastern Ionian Sea, *Israel Journal of Zoology*, 51(4): 315–330.
- Krstulović Šifner, S., Vrgoč, N. (2009). Reproductive cycle and sexual maturation of the musky octopus *Eledone moschata* (Cephalopoda: Octopodidae) in the northern and central Adriatic Sea, *Scientia Marina*, 73(3): 439–447.
- Krstulović Šifner, S., Vrgoč, N. (2009). Diet and feeding of the musky octopus, *Eledone moschata*, in the northern adriatic sea, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89(2): 413–419.

- Lapan, E.A., Morowitz, H.J. (1975). The dicyemid Mesozoa as an integrated system for morphogenetic studies. *Journal of Experimental Zoology*, 193: 147–160.
- de León, G.P.P., Nadler, S.A. (2019). What We Don't Recognize Can Hurt Us: A Plea for Awareness About Cryptic Species, *Journal of Parasitology*, 96(2) : 453-464.
- Li, Y.L., Liu, J.X. (2018). StructureSelector: A web based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*, 18: 176–177.
- Light, J.E., Harper, S.E., Johnson, K.P., Demastes, J.W., Spradling, T.A. (2019). Development and Characterization of 12 Novel Polymorphic Microsatellite Loci for the Mammal Chewing Louse *Geomydoecus Aurei* (Insecta : Phthiraptera) and a Comparison of Next-Generation Sequencing Approaches for Use in Parasitology. *Journal of Parasitology*, 104(1) : 89-95.
- Lourenço, S., Moreno, A., Pereira, J. (2008). Distribution and biological revision of *Eledone moschata* (Lamarck, 1978) in south and southwestern Portuguese waters. Third Congresso da Ordem dos Biólogos, Lisboa, 25–27 Fevereiro 2008 [Poster].
- Lu, T.M., Kanda, M., Satoh, N., Furuya, H. (2017). The Phylogenetic Position of Dicyemid Mesozoans Offers Insights into Spiralian Evolution. *Zoological Letters*, 3 (1): 1–9.
- Megléczy, E., Costedoat, C., Dubut, V., Gilles, A., Malausa, T., Pech, N. (2010). QDD : a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics*, 26(3): 403–404.
- Megléczy, E., Pech, N., Gilles, A., Dubut, V., Hingamp, P., Trilles, A., Grenier, R. (2014). QDD version 3 . 1 : a user-friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited : experimental validation of variables determining genotyping success rate. *Molecular ecology*, 14: 1302–1313.
- Mangold, K. (1983). Food, feeding and growth in cephalopods. In Stone D.E. (ed.) *Memoirs of the National Museum of Victoria*. Melbourne, pp. 81–93.
- Mather, J.A. (1985). Behavioural interactions and activity of captive *Eledone moschata*: laboratory investigations of a “social” octopus, *Animal Behaviour*, 33(4): 1138–1144.
- McConnaughey, B.H. (1951) The life cycle of the dicyemid Mesozoa. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 55: 295–336.
- Nolte, V., Pandey, R.V., Jost, S., Medinger, R., Ottenwälder, B., Boenigk, J., et al. (2010). Contrasting seasonal niche separation between rare and abundant taxa conceals the extent of protist diversity. *Molecular Ecology*, 19: 2908–15.
- Norman, M.D., Finn, J.K., Hochberg, F.G. (2014). Family Octopodidae. In P. Jereb, C.F.E. Roper, M.D. Norman & J.K. Finn eds. *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 3. Octopods and Vampire Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes*. No. 4, Vol. 3. Rome, FAO. pp. 36-215.
- Nouvel, H. (1947). Les dicyémides 1er partie: systématique, générations vermiformes, infusorigène et sexualité. *Archives de Biologie*, 58: 59–214.
- Poulin, R., Krasnov, B.R., Mouillot, D. (2011). Host specificity in phylogenetic and geographic space. *Trends in Parasitology*, 27: 355–61.

- Peakall, R., Smouse P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology*, 6: 288-295.
- Peakall, R., Smouse P.E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- Queller, D.C., Strassmann, J.E., Hughes, C.R. (1993). Microsatellites and kinship. *Trends Ecol. Evol.*, 8: 285–288.
- Roberts, M.G., Dobson, A.P., Arneberg, P., de Leon, G.A., Krecek, R.C., Manfredi, M.T., Lanfranchi, P., Zaffaroni, E. (2002). Chapter 4: Parasite Community Ecology and Biodiversity. In: P.J. Hudson, A. Rizzoli, B.T. Grenfell and H. Heesterbeek (Eds.), *The Ecology of Wildlife Diseases*. Oxford University Press, New York, pp. 63–82.
- Roumbedakis, K., Drábková, M., Tým, T., di Cristo, C. (2018). A Perspective Around Cephalopods and Their Parasites, and Suggestions on How to Increase Knowledge in the Field, *Frontiers in Physiology*, 9(November): 1–9.
- Schiffer, P.H., Robertson, H.E., Telford, M.J. (2018). Report Orthonectids Are Highly Degenerate Annelid Worms. *Current Biology*, 1–5.
- Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chrom.*, 109: 365–371.
- Selkoe, K.A., Toonen, R.J. (2006). Microsatellites for ecologists : a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615–629.
- Semmens, J.M., Pecl, G.T., Gillanders, B.M., Waluda, C.M., Shea, E.K., Jouffre, D., Ichii, T., Zumholz, K., Katugin, O.N., Leporati, S.C., Shaw, P.W. (2007). Approaches to resolving cephalopod movement and migration patterns. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 17: 401–423.
- Silva, L., Ramos, F., Sobrino, I. (2004). Reproductive biology of *Eledone moschata* (Cephalopoda: Octopodidae) in the Gulf of Cádiz (south-western Spain, ICES Division IXa). *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 84: 1221–1226.
- Suzuki, T.G. et al. (2010). Phylogenetic Analysis of Dicyemid Mesozoans (Phylum Dicyemida) From Innexin Amino Acid Sequences: Dicyemids Are Not Related to Platyhelminthes, *Journal of Parasitology*, 96(3): 614–625.
- Stunkard, H.W. (1954) The life history and systematic relations of the Mesozoa. *Quart. Rev. Biol.*, 29: 230–244.
- Suzuki, T.G., Ogino, K., Tsuneki, K., Furuya, H. (2010) Phylogenetic analysis of dicyemid mesozoans (Phylum Dicyemida) from innexin amino acid sequences: dicyemids are not related to platyhelminthes. *Journal of Parasitology*, 96: 614–625.
- Taberlet, P., Waits, L.P., Luikart, G. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.*, 14: 323–327.
- Toth, G., Gaspari, Z., Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.*, 10: 967–981.
- Villanueva, R., Vidal, E.A.G., Fernandez-Alvarez, F.A., Nabhitabhata, J. (2016). Early mode of life and hatchling size in cephalopod molluscs: Influence on the species distributional ranges, *PLoS ONE*, 11(11): 1–27.

8. Přílohy

Tab. A: Seznam mikrosatelitních lokusů a jejich primerů použitých v této studii, navržených programem QDD3. Tučně zvýrazněno 8 vybraných lokusů.

Název lokusu	Opakování	Motiv	Sekvence primeru 5' → 3'	Forward/Reverse	Barveno
DicMiSat01	6	AT	CCTGCCAGAAACAGTTCCCA CCCAGAAGTTGTTGCGATAGA	F R	
DicMiSat02	5	AG	CCCTCAAATTCGCTGATGTGAA TGAGAATGGCATACAAACAACACA	F R	6-FAM, PET
DicMiSat03	5	AG	TGCGTAGGCATTGCTGAGAT AACATCAACTTTAATCGTTTGTGGT	F R	6-FAM
DicMiSat04	5	ACC	CGACGAATTCCTCCGTCCA TGGGATGCTTACTTCGCGAA	F R	
DicMiSat05	5	AC	GTCATAGAGGCGATGTAGGGC CACCCGACAGAACTTGCACT	F R	6-FAM, NED
DicMiSat06	6	AAC T	GTGGGTACGGCCTGTCTTAG CCGTAAACTCCACGATGGCT	F R	
DicMiSat07	5	AT	ATGCACCTTCTTCGTCGGTT AACAAGCAAACACGCTGCAA	F R	6-FAM
DicMiSat08	5	AC	AATGAATCCACCCAACCCGC CAAGCCTGGCTCTGTCAGAA	F R	6-FAM, NED
DicMiSat09	6	AG	TGGAGTTCACGTGATCCGAC CAAGAACCCTCTCCACCCAC	F R	6-FAM
DicMiSat10	5	AAT	TTTCACTTTGCCAATTCTACTT CA TCGCGTGTAGATTATGACGTT	F R	
DicMiSat11	6	AT	CGGACATTTCGATCGATGACG AACTTGGCCCTCTCTCCTTG	F R	
DicMiSat12	6	AC	TGTTGTCTTACTCAGGTGCGA AGCCATCGATGCTGCTACAG	F R	6-FAM
DicMiSat13	6	AC	GGTTCTCAAGCAATAGCATT GAGA TCGAAACCTTCTTGGGCTTCA	F R	
DicMiSat14	5	AAT	TCTGTCACCGCCTTTATGC CTTGTGTAAACCGGCTCCCA	F R	6-FAM
DicMiSat15	6	AAT	CAGATCCTTACGAGGCGTGC GTCACATCGACACTCCAGGG	F R	
DicMiSat16	5	AAT T	AAAGGCCGGATCACAGAAAT TACTCAATCCGTGCTGCTGG	F R	6-FAM
DicMiSat17	5	AAC	GGGTTGCAAGTGTGTGGAAG AGGTGCCGTCCAAATGTTCA	F R	6-FAM, PET
DicMiSat18	5	AAT	TGTCATGACTAGGGCTGACC TCACCAGCATATCAAATCTCTG A	F R	6-FAM
	5	AG	CGATGAGGATATGACCCAGGG	F	

DicMiSat1 9			TGTCCTTCGACTTCTTGGTGA	R	
DicMiSat2 0	5	AC	AAGGAATTGGCCATCCGCAT	F	
			CGTTGGCAATCCGTTCTTCG	R	
DicMiSat2 1	5	AC	AGTTCGCGTGGTTCATTCT	F	6-FAM
			CTGAGCACAAGGTCCCTGAA	R	
DicMiSat2 2	5	AAAT	TCTGAGGGAAGCCGAGATCA	F	
			CGAATGCAATCGGCTGGAAG	R	
DicMiSat2 3	5	AG	AAGATCACCTGACGGAGGA	F	6-FAM
			GGAGGACGTAATTATCCGCG	R	
DicMiSat2 4	5	AAT	ACGTTGAGGCATCTGCAGAA	F	6-FAM
			CGTGGAAACTCGTGCTCCAT	R	
DicMiSat2 5	5	AC	AAAGGAGCTTCACTGGGACG	F	6-FAM
			CCCAAGACGAGTAAATCCGACT	R	
DicMiSat2 6	5	AG	GTTATCCCGTAAGCGTTGCC	F	6-FAM
			TTCGGAAGCCACATGTCCTT	R	
DicMiSat 27	6	AT	ACTGAAGCTATGTGCCGGAA	F	6-FAM, VIC
			TTTCTCTGGCCATCCTTCGC	R	
DicMiSat2 8	5	AAT	AGGAATTACTCCCACAGTGCA	F	6-FAM
			TCGGACTGAAGATCTGCGAG	R	
DicMiSat2 9	5	ACC	GCCGCCTTGAATCACAACAA	F	6-FAM
			TTAGACCATAGGCGGCGTTG	R	
DicMiSat3 0	5	AG	AATCCGGAAAGCAACGAGGT	F	6-FAM
			ATGGAAGAGTTCTGCTGGCC	R	
DicMiSat 31	6	AT	ATCATTAAAGATTTGGCTG GCA	F	6-FAM
			TTCTTGGTGACCTTATAAAGT GTGTG	R	
DicMiSat3 2	5	AG	TGCAAATGAGGACCATCACTT	F	
			GTGCTTTCGGTACCCGATACT	R	
DicMiSat3 3	5	AG	CCTATGACGGGAACAGGCTG	F	6-FAM
			GAAACTCCGCATCGCAACTC	R	
DicMiSat3 4	5	AG	CTCTTTGACGAGATGATGCC	F	
			TGTTCCCTTTCATGCTGAAGA	R	
DicMiSat3 5	5	AC	TCTGATCCAACCTGCGTGTCC	F	
			GGGAGTCGAATCACCATCGT	R	
DicMiSat3 6	5	AGG	CCCATCTGAGCACGGAAGTT	F	
			CGTACCCTTCATCCAAGCGG	R	
DicMiSat3 7	5	AG	CGAAAGGCCTACACCCTCTT	F	
			TGTGGTGCTCTAATTGGGAGG	R	
DicMiSat3 8	5	AT	AAATCTCTCTCAATCGCACAA A	F	
			CCGCAATCACAGAAAGCAGC	R	
DicMiSat3 9	5	AG	CGCAGAATGTCCTCCTCTCC	F	6-FAM
			CGACATGAACCTCTCCTCCC	R	
DicMiSat4 0	6	AT	AGTACAACCTCGTGTGGTT	F	
			TGAAATTTAAAGTGCAACT CAGA	R	
DicMiSat 41	5	AC	GCCGTGATACCAACGTCCA	F	6-FAM, VIC

			CTGGGCACGTTTCGAGTATGT	R	
DicMiSat4 2	5	AG	ATCGCAAACAGACGTGGCTA TGGTCTATTGTTGGGATGGATG	F R	
DicMiSat4 3	5	AG	GCAGACAATCTTGTGGGCG ACCAGAATCCAAAGTTGTGAC C	F R	6-FAM
DicMiSat4 4	5	AC	AGTTTAAAGAACTTGCTATTGG CGA ATTAGCTTAGCCATCCTATCGG	F R	
DicMiSat4 5	5	AG	TTCCCGATGCTGACAGTCTG TGACCAACCTTGAAATATTGG GA	F R	

Tab. B: Seznam vzorků a jejich lokace použitých v této studii.

Název vzorku	Kód vzorku	Lokace	Kód lokace	Z hostitele	Kód hostitele
OECP5 1.2	1	Chorvatsko-Pula	A	OECP5 H	1
OECP5 1.3	2	Chorvatsko-Pula	A	OECP5 H	1
OECP5 1.4	3	Chorvatsko-Pula	A	OECP5 H	1
OECP5 2.2	4	Chorvatsko-Pula	A	OECP5 H	1
OECP5 2.3	5	Chorvatsko-Pula	A	OECP5 H	1
OECP5 2.4	6	Chorvatsko-Pula	A	OECP5 H	1
OECP5 3.1	7	Chorvatsko-Pula	A	OECP5 H	1
OECP5 3.2	8	Chorvatsko-Pula	A	OECP5 H	1
OECP5 3.3	9	Chorvatsko-Pula	A	OECP5 H	1
OECP5 3.4	10	Chorvatsko-Pula	A	OECP5 H	1
OECP6 1.1	11	Chorvatsko-Pula	A	OECP6 H	2
OECP6 1.2	12	Chorvatsko-Pula	A	OECP6 H	2
OECP6 1	13	Chorvatsko-Pula	A	OECP6 H	2
OECP6 2	14	Chorvatsko-Pula	A	OECP6 H	2
OECP6 3	15	Chorvatsko-Pula	A	OECP6 H	2
OECP6 4	16	Chorvatsko-Pula	A	OECP6 H	2
OECP6 1L	17	Chorvatsko-Pula	A	OECP6 H	2
OECP7 2.3	18	Chorvatsko-Pula	A	OECP7 H	3

OECP7 1	19	Chorvatsko-Pula	A	OECP7 H	3
OECP7 1P	20	Chorvatsko-Pula	A	OECP7 H	3
OECP7 1L	21	Chorvatsko-Pula	A	OECP7 H	3
OEIN1 a	22	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 c	23	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 d	24	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 e	25	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 f	26	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 g	27	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 h	28	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 i	29	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 j	30	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 k	31	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 l	32	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 m	33	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 n	34	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 o	35	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 p	36	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN1 q	37	Itálie- Neapole	B	OEIN1 H	4
OEIN2 c	38	Itálie- Neapole	B	OEIN2 H	5
OEIN2 e	39	Itálie- Neapole	B	OEIN2 H	5
OEIN2 f	40	Itálie- Neapole	B	OEIN2 H	5
OEIN2 g!	41	Itálie- Neapole	B	OEIN2 H	5
OEIN3 1	42	Itálie- Neapole	B	OEIN3 H	6
OEIN3 3	43	Itálie- Neapole	B	OEIN3 H	6
OEIN9 1	44	Itálie- Neapole	B	OEIN9 H	7
OEIN9 3	45	Itálie- Neapole	B	OEIN9 H	7
OEIN9 5	46	Itálie- Neapole	B	OEIN9 H	7
OEIN9 6	47	Itálie- Neapole	B	OEIN9 H	7
OEIN9 8	48	Itálie- Neapole	B	OEIN9 H	7
OEIN9 11	49	Itálie- Neapole	B	OEIN9 H	7

Tab. C1: Původní dataset z programu Geneious, lokusy DicMiSat 02, 05, 07, 27.

		DicMiSat02		DicMiSat05		DicMiSat07		DicMiSat27	
1	A	270,3	270,3	162,2	162,2	210,6	210,6	nd	nd
1	A	270,3	270,3	162,9	162,9	210,7	210,7	nd	nd
1	A	270,2	270,2	161,9	161,9	210,7	210,7	nd	nd
1	A	nd	nd	162	168	210,6	210,6	nd	nd
1	A	270,4	270,4	nd	nd	210,6	210,6	nd	nd
1	A	270,3	270,3	nd	nd	210,6	210,6	nd	nd
1	A	nd	nd	nd	nd	210,7	210,7	nd	nd
1	A	270,4	270,4	161,9	161,9	210,3	210,3	nd	nd
1	A	270,3	270,3	nd	nd	210,7	210,7	nd	nd
1	A	270,3	270,3	162,9	162,9	210,7	210,7	nd	nd
2	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	A	261,3	261,3	168,5	168,5	210	218	nd	nd
2	A	261,1	261,1	169,1	169,1	210,6	218,6	nd	nd

2	A	261,3	261,3	169	169	208	208	nd	nd
2	A	261,1	261,1	169,1	169,1	210,5	210,5	nd	nd
2	A	261,2	261,2	169,1	169,1	210,5	215,4	nd	nd
2	A	267	267	nd	nd	210,7	210,7	nd	nd
3	A	261,2	261,2	169,2	169,2	210,6	218,7	nd	nd
3	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3	A	261,3	261,3	168,8	168,8	210,7	218,6	nd	nd
3	A	261,2	261,2	169,1	169,1	210,4	218,5	nd	nd
4	B	265	265	nd	nd	210,7	210,7	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	216	219	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	210	213,5	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	210	212,6	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	211	211	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	210,8	210,8	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	210,7	210,7	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	210	210	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	210,9	210,9	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	208	208	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	210,8	210,8	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	211	211	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	210,8	210,8	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	B	267	267	nd	nd	210	218	nd	nd
5	B	267	267	nd	nd	210	218	nd	nd
5	B	267	267	nd	nd	210,6	210,6	nd	nd
5	B	nd	nd	nd	nd	210,6	218	nd	nd
6	B	269,4	269,4	162,3	162,3	210,6	218	nd	nd
6	B	269,4	269,4	161,7	161,7	210,5	218,2	nd	nd
7	B	269	269	162,4	162,4	210,4	218	nd	nd
7	B	267	267	nd	nd	210,6	210,6	nd	nd
7	B	nd	nd	nd	nd	210,7	218,2	nd	nd
7	B	267	267	nd	nd	208	216	nd	nd
7	B	267	267	nd	nd	210,6	210,6	nd	nd
7	B	269,3	269,3	163	163	210,6	218,3	273	273

Tab. C2: Původní dataset z programu Geneious. Lokusy DicMiSat 08, 31, 17, 41.

		DicMiSat08		DicMiSat31		DicMiSat17		DicMiSat41	
1	A	206	210,1	nd	nd	nd	nd	290,7	290,7
1	A	205,8	205,8	nd	nd	nd	nd	290,9	290,9
1	A	206,6	206,6	nd	nd	nd	nd	289,7	295,7
1	A	206	206	239	239	nd	nd	290,8	290,8
1	A	206,1	206,1	239	239	nd	nd	290,8	290,8
1	A	205,8	205,8	nd	nd	nd	nd	290,8	290,8
1	A	206	210,8	nd	nd	nd	nd	290,8	290,8
1	A	206	206	nd	nd	nd	nd	290,7	290,7

1	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1	A	206	206	nd	nd	nd	nd	290,7	290,7
2	A	206,3	206,3	nd	nd	nd	nd	290,8	290,8
2	A	206,3	206,3	nd	nd	278,6	278,6	290,7	290,7
2	A	206,3	206,3	236,6	236,6	278,6	278,6	290,7	290,7
2	A	206,3	210,1	236,6	236,6	nd	nd	290,8	290,8
2	A	206,9	206,9	nd	nd	278,6	278,6	290,7	290,7
2	A	206	206	nd	nd	nd	nd	290,8	290,8
2	A	206	206	nd	nd	nd	nd	296,7	296,7
3	A	206,3	208,3	nd	nd	nd	nd	290,7	290,7
3	A	206,3	211	nd	nd	nd	nd	290,7	290,7
3	A	206,3	206,3	nd	nd	278,6	278,6	290,8	290,8
3	A	206,3	206,3	236,6	236,6	278,6	278,6	290,7	290,7
4	B	200	200	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	B	200	206	nd	nd	nd	nd	291	297
4	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	B	200	206	nd	nd	nd	nd	290,8	290,8
4	B	200	206	nd	nd	nd	nd	290,8	290,8
4	B	200	206	nd	nd	nd	nd	290,1	297
4	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	B	200	200	nd	nd	nd	nd	290,8	290,8
4	B	200	206	nd	nd	nd	nd	296,8	296,8
4	B	200	206	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	B	200	206	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	B	200	206	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	B	200	206	nd	nd	nd	nd	290,7	296,8
4	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	B	200	206	nd	nd	nd	nd	290,8	296,8
5	B	206	206	nd	nd	nd	nd	290,8	290,8
5	B	200	206	nd	nd	nd	nd	290,9	296,9
5	B	200	206	nd	nd	nd	nd	291	291
5	B	200	206	nd	nd	nd	nd	290,8	290,8
6	B	200	206	239,5	239,5	nd	nd	290,9	296,9
6	B	200	206	239,5	239,5	nd	nd	291	297
7	B	200	206	nd	nd	nd	nd	290,8	296,7
7	B	200	206	nd	nd	nd	nd	297	297
7	B	200	206	nd	nd	nd	nd	291	297
7	B	200	206	nd	nd	nd	nd	290,8	296,8
7	B	200	206	nd	nd	nd	nd	290,8	296,7
7	B	200	206	239,4	239,4	nd	nd	290,8	296,8

Tab. D: Vytříděný dataset.

Vzorek	Lokace	DicMiSat02		DicMiSat05		DicMiSat08		DicMiSat41	
1	1	269	269	162	162	206	210	291	291
2	1	269	269	162	162	206	206	291	291
3	1	269	269	162	162	206	206	291	297

4	1	0	0	162	168	206	206	291	291
5	1	269	269	0	0	206	206	291	291
6	1	269	269	0	0	206	206	291	291
7	1	0	0	0	0	206	210	291	291
8	1	269	269	162	162	206	206	291	291
10	1	269	269	162	162	206	206	291	291
11	2	0	0	0	0	206	206	291	291
12	2	261	261	168	168	206	206	291	291
13	2	261	261	168	168	206	206	291	291
14	2	261	261	168	168	206	210	291	291
15	2	261	261	168	168	206	206	291	291
16	2	261	261	168	168	206	206	291	291
17	2	267	267	0	0	206	206	297	297
18	3	261	261	168	168	206	208	291	291
19	3	0	0	0	0	206	210	291	291
20	3	261	261	168	168	206	206	291	291
21	3	261	261	168	168	206	206	291	291
22	4	265	265	0	0	200	200	0	0
24	4	0	0	0	0	200	206	291	297
26	4	0	0	0	0	200	206	291	291
27	4	0	0	0	0	200	206	291	291
28	4	0	0	0	0	200	206	291	297
30	4	0	0	0	0	200	200	291	291
31	4	0	0	0	0	200	206	297	297
35	4	0	0	0	0	200	206	291	297
37	4	0	0	0	0	200	206	291	297
38	5	267	267	0	0	206	206	291	291
39	5	267	267	0	0	200	206	291	297
40	5	267	267	0	0	200	206	291	291
41	5	0	0	0	0	200	206	291	291
44	7	269	269	162	162	200	206	291	297
45	7	267	267	0	0	200	206	297	297
46	7	0	0	0	0	200	206	291	297
47	7	267	267	0	0	200	206	291	297
48	7	267	267	0	0	200	206	291	297
49	7	269	269	162	162	200	206	291	297

Tab. E: Delta K. Evanova metoda. Z programu StructureSelector.

K	Reps	Mean	Stdev	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
		LnP(K)	LnP(K)			
1	16	-364.53125	0.58163	NA	NA	NA
2	16	-300.98750	1.67407	63.54375	32.92500	19.66767
3	16	-270.36875	3.58306	30.61875	16.00625	4.46721
4	16	-255.75625	1.23557	14.61250	32.95000	26.66793
5	16	-274.09375	4.10877	-18.33750	11.30625	2.75174
6	16	-281.12500	5.57118	-7.03125	7.68125	1.37875
7	16	-295.83750	12.45476	-14.71250	13.42500	1.07790
8	16	-297.12500	8.82364	-1.28750	47.68125	5.40381
9	16	-346.09375	180.60815	-48.96875	91.33897	0.50573
10	17	-303.72353	5.12939	42.37022	NA	NA