

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

Genetická struktura populací tasemnice  
*Ligula intestinalis*

Bakalářská práce

Pavλίna Kočová

Školitel: RNDr. Jan Štefka, PhD

České Budějovice 2015

*Bakalářská práce:*

Kočová P., 2015, Genetická struktura populací tasemnice *Ligula intestinalis*. [Genetic structure of population of the tapeworm *Ligula intestinalis*, Bachelor Thesis in Czech] – 41 pp, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Using analyses of mitochondrial DNA sequences and microsatellite loci the study verifies phylogeographic patterns of the tapeworm *Ligula intestinalis* from new localities in Iran, Hungary and Turkey.

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

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

V Českých Budějovicích dne 24. 4. 2015

Pavλίna Kočová

*Poděkování:*

Ráda bych poděkovala Janu Štefkovi za velice trpělivé a odborné vedení při práci jak v laboratoři, tak při zpracování výsledků. Dále bych chtěla poděkovat všem členům laboratoře Molekulární fylogeneze a evoluce parazitů za veškeré rady a pomoc ve chvílích nejvyšší nouze.

## Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Parazitismus:.....	1
1.2 Populačně genetická struktura:.....	1
1.3 Fylogeografie:.....	2
1.4 Metody užívané v parazitologii.....	3
1.5 Modelový organismus.....	5
2. Cíle práce.....	10
3. Materiál a metody.....	11
3.1 Vzorky.....	11
3.2 Izolace DNA.....	12
3.3 Polymerázová řetězová reakce.....	13
3.4 PCR mitochondriální DNA.....	13
3.5 PCR mikrosatelitní DNA.....	14
3.6 Gelová elektroforéza.....	16
3.7 Sekvence.....	16
3.8 Práce se sekvencemi, fylogenetické analýzy.....	16
3.9 Fragmentační analýza.....	17
4. Výsledky:.....	19
4.1 Sekvenování mitochondriálních genů.....	19
4.2 Fylogenetické analýzy mitochondriálních genů.....	20
4.3 Mikrosatelitní analýza.....	22
5. Diskuze.....	28
6. Závěr.....	31
7. Seznam použité literatury.....	32
8. Přílohy.....	38

## 1. Úvod

### 1.1 *Parazitismus:*

Paraziti představují různorodou skupinu organismů, kteří jsou sjednoceni jen jejich způsobem života. Parazitismus je definován jako vztah dvou jedinců, kdy jeden člen (parazit) využívá druhého (host) pro své životní potřeby, přičemž hostitel z toho vztahu nemá žádný užitek, dokonce je znevýhodněn (Huyese et al., 2005). Parazitismus vznikl mnohokrát nezávisle na sobě a je považován za jednu z nejrozšířenějších životních strategií na Zemi vůbec (Price, 1980). Prioritou parazita není hostitele zabít, ale maximalizovat svou fitness (reprodukční potenciál), což často znamená přežít v hostiteli (endoparazité)/na hostiteli (ektoparazité) nepozorovaně co možná nejdélší dobu. S tímto jevem je spojována důležitá vlastnost parazitů – schopnost úniku před imunitním systémem a dalšími obrannými mechanismy hostitele (Zelmer, 1997).

### 1.2 *Populačně genetická struktura:*

Paraziti zabírají velkou část z výčtu živých organismů a mají nezanedbatelný ekologický význam vzhledem k dopadu na jejich hostitele. Jejich vliv se neodráží pouze na hostitelích samotných (evoluční, lékařský), ale zasahuje i do ne primárně biologických oborů (agronomické, ekonomické). Znalost populační biologie těchto organismů má tedy zásadní význam pro populační a evoluční biologie i pro aplikovanou sféru (Meeus et al. 2006).

Paraziti vynikají schopností přizpůsobovat se neustále se měnícím podmínkám vně (volně se vyskytující stádia) i v hostiteli. Jednou ze zásadních vlastností parazita je únik před imunitou hostitele. Ten napomáhá vzniku a udržování rezistence na léčiva, osvojení si nového hostitele, nebo expanzi na exotická místa (Criscione et al., 2005). Vlastnosti, které nalzáme u parazitů, odrážejí jejich schopnost produkovat rychlé evoluční změny (Price, 1980). Samotný průběh speciace parazitů je ovlivňován tokem genů a genetickým driftem nejen uvnitř parazitických populací, ale i hostitelských populací (Hufbauer, 2005). Koevoluční změny mezi hostiteli a jejich parazity jsou již dlouho uznávány jako základní hnací síla makroevolučních procesů (Poulin and Morand, 2000). Je však užitečné znát vlivy, které tyto procesy ovlivňují na úrovni druhů, například migrační tempo/rychlost a efektivní velikost populace. Pochopení, s jakou mírou různé ekologické faktory ovlivňují populační

strukturu a dynamiku populací, je základ pro pochopení mikroevolučních procesů (Hufbauer, 2005; Nieberding et al, 2008).

Dostupnost hostitelů může být jeden z hlavních ovlivňujících faktorů toků genů u parazitů (je zde poměrně málo volně žijících stádií s omezenými schopnostmi šíření). Z toho vyplývá hypotéza, že tok genů parazitů se složitým (komplexním) životním cyklem je limitován nejmobilnějším hostitelem (Louhi et al., 2010). Tento fakt zmiňuje Louhi ve své práci, která byla zaměřena na genetickou strukturu populace *Diplostomum pseudospathaceum* (Trematoda). V této studii autoři představili hypotézu, ve které se musí brát při zkoumání fragmentací populací ohled i na geografickou strukturu zkoumaných oblastí (Louhi et al., 2010). To znamená, že pokud se v prostředí nevyskytuje žádná přírodní bariéra (moře, pohoří apod.), je disperze organismů jednodušší. Existuje také hypotéza, která se soustředí na rozdílnou schopnost šíření parazitů vzhledem k ekologii jejich hostitelů. Parazité, kteří mají ve svém životním cyklu zapojeny pouze hostitele obývající sladkovodní habitaty, jsou limitováni v disperzi více než parazité, kteří mají do svého cyklu zapojeny i terestrické hostitele (Criscione and Blouin, 2003). Pokud všechna tato fakta shrneme, dostaneme se k závěru, že populační struktura parazitů je určována mnoha faktory jak na makroevoluční, tak na mikroevoluční úrovních. Schopnost rychlé adaptace, upevnění evolučních změn v populacích a často omezené možnosti šíření na větší geografické vzdálenosti vedou k častému vzniku kryptických druhů parazitů (Huysse et al., 2005).

### 1.3 Fylogeografie:

Rekonstrukce historické biogeografie populací a identifikace velkých/hlavních genetických linií uvnitř druhů je hlavním předmětem fylogeografických analýz (Avice, 1987). Fylogenetické stromy poskytují nepřímé záznamy o speciálních událostech, které daly vzniknout dnešním druhům. Současná distribuce druhu nemusí být spolehlivým ukazatelem jeho historického geografického rozsahu, protože zeměpisný rozsah druhu se vyvíjí a může se značně měnit i v krátkých časových intervalech např. post-glaciální expanze (Huysel et al., 2005). Srovnávací fylogeografie může najít historicky a evolučně nezávislé oblasti výskytu určitého druhu parazita. Starší fylogeografické studie na parazitech poukazují na fakt, že organismy s parazitickou životní strategií jsou úzce vázáni na své hostitele. Je tedy pravděpodobné, že parazité a jejich hostitelé mohou sdílet podobné fylogeografické vzory (Criscione et al., 2005). Parazité s vysokou specializovaností na

hostitele mají tyto vzory více provázané se svými hostiteli, zatímco druhy, které jsou schopny napadat širší spektrum hostitelů, nekopírují striktně svého hostitele (Archie, 2010). Stupeň shody závisí na mnoha faktorech, například o jakého hostitele v cyklu parazita se jedná a na způsobu transmise mezi hostiteli a parazitem. Fylogenetické studie založené na zkoumání kospeciace mezi parazitem a hostitelem pomocí statistického testování kospeciálních událostí nám umožňují pochopení evoluce parazitů (Page, 2003). Fylogeografická data mohou být také použita při zkoumání šíření zavlečených druhů parazitů. Tato data mohou naznačit potencionální původ druhu a datování invaze (např. Bouzid et al., 2013). Je dobré znát původ parazita, možný stupeň genetické diverzity a jeho původní prostředí. Tyto znalosti jsou uplatňovány v mnoha vědních odvětvích. V medicíně se používají pro určení správné léčby, kontrolu výskytu, a tím eliminaci materiálních ekologických škod způsobených parazity (Singh et al. 2004)

#### *1.4 Metody užívané v parazitologii*

V oboru parazitologie se využívá rozmanité spektrum výzkumných metod. Ke klasickým metodám, jako je rozpoznání druhů na základě morfologických znaků (Dubinina, 1980) a zkoumání životních stádií a cyklů v laboratorních podmínkách (Loot et al., 2002), dnes již neodmyslitelně patří molekulární metody (Momnis et al., 2001). Správné určení druhu je nezbytné i pro medicínské účely a následné určení správné léčby (Singh et al., 2004). Detekce taxonomických vztahů a historie evoluce parazitů je důležitá nejen pro poskytování vzorů rámců pro následující experimentální studie, ale i k lepšímu pochopení parazitismu v globálním měřítku. Tradičně si taxonomie vystačila s morfologickými, reprodukčními a geografickými studii. Vymezení druhu může být někdy obtížné a v mnoha případech se nelze spoléhat pouze na morfologické znaky. Některé druhy se morfologicky téměř neliší, nebo znaky určující příslušnost k danému druhu nejsou ani definovány (Criscione et al., 2005; Dubinina, 1980). Jiný případ může nastat v momentě, kdy jsou dvě různá vývojová stadia jednoho druhu popsána jako samostatné druhy (např.: Myxozoa – Smothers et al., 1997; Wolf and Markvin, 1984). Pro eliminaci takovýchto chyb v určování druhů se stávají dobrým nástrojem molekulární metody. Například práce s buňkami (průtoková cytometrie, transformace, hybridizace, apod.) přes amplifikaci nukleových kyselin (nejrůznější mutace PCR, elektroforéza) až po práci s proteiny (Western blotting, MLEE - multilokusová enzymová elektroforéza) a mnohé další (Monis et al., 2001).

Využití moderních metod našlo v parazitologii široké uplatnění. Nejenže získáváme genetické informace, podle kterých můžeme spolehlivě určit druh parazita, ale můžeme tímto způsobem sledovat i přenos parazitů mezi hostiteli a neinvazivní metodou detekovat infekce hostitele (Singh et al., 2004). Na základě molekulárních metod se dozvídáme mnohem rozsáhlejší informace, než pouhé určení druhu a tím se může přiblížit pochopení globální biodiverzity (Brooks and Hoberg 2000; Poulin and Morand, 2004). Molekulární metody se staly esenciální i pro mnohá další odvětví parazitologie jako je například epidemiologie a epizootologie (Criscione et al., 2005). Analýzy založené na práci s genetickou strukturou se jeví jako dobrý nástroj pro studium vnitrodruhových procesů, jako je například transpozice, evoluce hostitelské specifity, vzory ve speciaci, rezistence na léky, obcházení imunitního systému hostitele (Criscione et al., 2005).

Nabízí se hned několik důvodů, proč je studium parazitů výhodné pro stanovování obecně aplikovatelných vzorů evolučních procesů – paraziti jsou všudypřítomní, globálně rozšíření, mají široké spektrum životních cyklů a způsobů rozmnožování. Tato fakta dělají z parazitů dobré modely pro studium vzorů reprodukce, disperzních schopností, efektivní velikost populace, populační genetiky, vývojové biologie a mnohých dalších. Toto poskytuje výbornou příležitost pro vytváření porovnávacích studií, studium evoluce parazitů i obecné evoluce (Roe, 2007).

Nejčastěji používanými markery určených pro molekulární analýzy jsou mitochondriální (mtDNA) a ribozomální geny (rDNA). MtDNA dlouhou dobu dominuje na poli molekulární systematiky díky její maternální dědičnosti, omezené rekombinaci, rychlé evoluci a odolnosti proti degradaci v odebraných tkáních. To vše dělá z mtDNA ideální materiál pro řešení mnoha otázek na druhové úrovni (Avise, 1987). Nejen úseky mtDNA jsou vhodné pro fylogenetické výzkumy. Blouin et al. (2002) porovnává účinnost použití úseků ribozomální DNA (ITS-1a ITS-2) s mitochondriálními geny *cox1* a *nad4* u hlístic. Podle výsledků v této práci docházejí k závěru, že obě metody jsou aplikovatelné na fylogenetické studie, avšak měl by být brán ohled na cíl práce. Pokud je cílem hledat kryptické druhy, nebo rozdíly mezi druhy fylogeneticky blízkými, jeví se vhodnější užití mtDNA vzhledem k rychlejší akumulaci substitučních mutací. Naopak rDNA vykazuje nižší polymorfismus, a tím pádem se pro diagnostické účely zdá být více vyhovujícím nástrojem (Boulin et al. 2001). Při výzkumu fylogeneze na molekulární úrovni se doporučuje nespoléhat na sekvenci pouze jednoho genu, je zde vyšší pravděpodobnost zkreslenosti výsledků z důvodu horizontálních přenosů genů na fylogenetické úrovni a nekompletní lineage sorting na vnitrodruhové úrovni (Anderson, 2001).



V neposlední řadě se jako užitečný nástroj pro zkoumání populačně-genetické struktury druhu jeví mikrosatelitní lokusy. Jedná se o krátké repetitivní tandemové nekódující úseky DNA vyskytující téměř náhodně v celém genomu. Nejčastěji se můžeme setkat se dvou bázovou repeticí, ale ani tří nebo čtyř bázové opakování nejsou neobvyklé. Pro účely genetických analýz je potřeba, aby tyto lokusy vykazovaly polymorfismus – heterozygotismus (Susol et al., 2000). Ačkoli i mikrosatelity jsou v poslední době nahrazovány genomickými metodami poskytujícími větší objem dat, zejména SNP screeningem (např. RAD sekvenování, REF), mikrosatelity poskytují řadu výhod. Jako metoda založená na PCR amplifikaci krátkých fragmentů (obvykle do 250 bp), fungují velmi dobře i u biologických vzorků s malým objemem DNA (malé organismy, srst, exkrementy, apod.), nebo u historických či jinak degradovaných vzorků (muzejní vzorky, nevhodně fixované vzorky ( Wandeler et al., 2007).

### 1.5 Modelový organismus

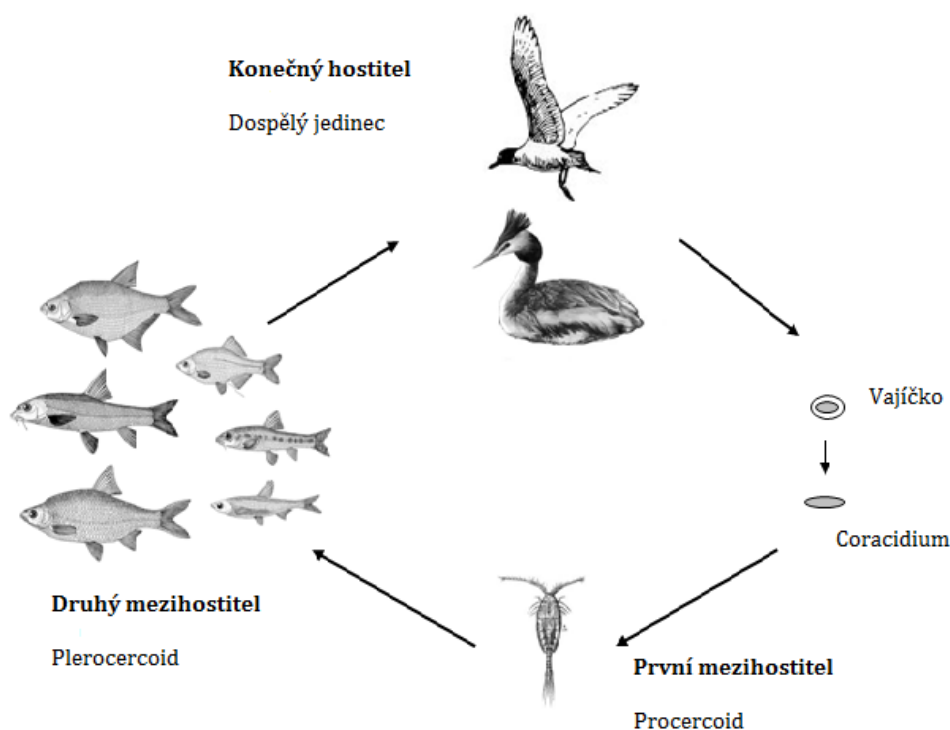
*Ligula intestinalis*: Cestoda – *Diphyllobothriidea*, (Linnaeus, 1758). Jedná se o parazita sladkovodních ryb s celosvětovou distribucí. V dřívějších letech byla *L. intestinalis* zaznamenávána především v holarktických oblastech, ale její výskyt byl popsán například i v Mexiku a Austrálii (Hoole, 2009; Morgan, 2003). *L. intestinalis* se vyznačuje komplexním životním cyklem. Během svého vývoje infikuje celkem 3 zcela odlišné hostitele.

Životní cyklus začíná od vajíčka, které se nachází volně ve vodním sloupci. Během několika dní (5-10) se přemění na volné plovoucí larvální stádium *coracidium*. Prvním mezihostitelem se stává klanonožec (*Copepoda*), k infekci dochází požitím *coracidia* volně se pohybujícího ve vodě. Tato událost indukuje přeměnu *coracidia* na následující stádium vývoje – *procercoid*, které je infekční pro ryby. Zpravidla doba strávená v prvním hostiteli nepřesahuje dobu delší než 20 dní (Dubinina, 1980).

Po požití klanonožce se druhým mezihostitelem stává sladkovodní ryba. Z větší části je napaden zástupce řádu kaprovitých, nejedná se však o striktní podmínku. Infekce konkrétního druhu je závislá na geografických a ekologických podmínkách (Loot, 2001). Tasemnice následně putuje skrz stěnu střeva do abdominální oblasti, kde se vyvíjí v třetí stádium – *plerocercoid*. Červ je schopen v rybím mezihostiteli přežít až dva roky (Dubinina, 1980).

Konečným hostitelem *L. intestinalis* je rybožravý pták, např. zástupci řádů brodivých (*Ciconiiformes*), dlouokřídých (*Charadriiformes*), vrubozobí (*Anseriformes*), nebo dravců (*Falconiformes*). Dospělec infikuje konečného hostitele po dobu maximálně 4-6 dní. Během této doby dochází k pohlavnímu rozmnožování v zažívacím traktu ptáka. Vajíčka vyloučená zpět do sladkovodního prostředí uzavírají životní cyklus *L. intestinalis* (Dubinina, 1980).

S ohledem na životní cyklus, snadným přístupem a dlouhou dobou inkubace tasemnice, většina evolučně-ekologických studií pracuje se stádiem *plerocercoid* odebraným z druhého meziphostitele. Infekce ryby trvá nejdéle z celého životního cyklu a je proto ideální pro odběr vzorků pro následné analýzy (Hoole, 2009). Spektrum meziphostitelů i konečných hostitelů není striktně dané. Byla prokázána závislost na prostředí, dostupnosti hostitele, geografických a ekologických podmínkách (Bouzid et al., 2008a, b; Loot et al., 2001, Bouzid et al., 2013). Preference určitého druhu rybiho hostitele může být vázaná i na schopnost unikát imunitnímu systému daného druhu (Arme, 97).



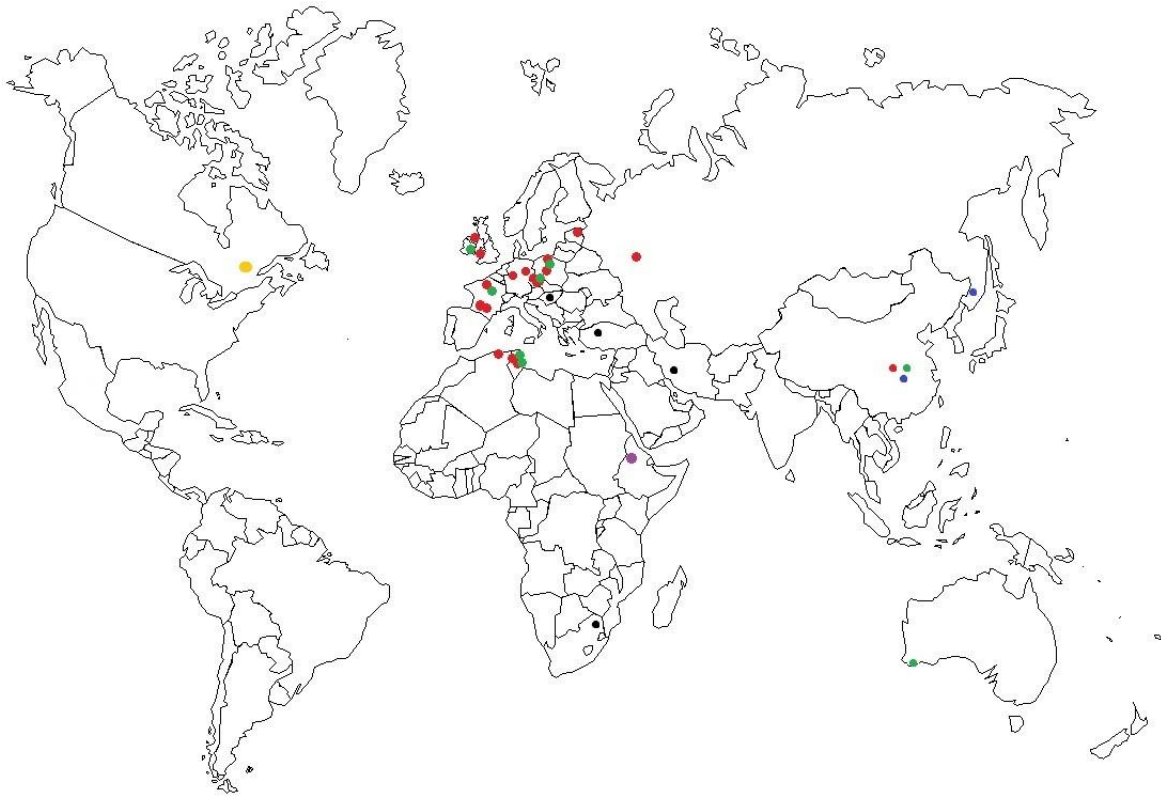
**Obr. 1:** Životní cyklus *Ligula intestinalis*. Převzato z Štefka et al., 2009.

*L. intestinalis* se v posledních letech stala často využívaným modelem mnoha studií zaměřených na různé vědní disciplíny. Jako modelový organismus byla použita ve studiích zaměřených na vnitrodruhovou fylogenezi (např.: Li and Lao, 2003; Logan et al., 2004), interakce host/parazit (např.: Loot et al., 2002; Bouzid et al. 2008b; Brown et al. 2002), populačně geneticky orientované studie (např.: Bouzid et al. 2008a; Morgan, 2002; Li and Lao, 1999; Štefka et al., 2009) i epidemiologické výzkumy (Bouzid et al., 2013).

Populačně-geneticky orientované studie naznačují, že *L. intestinalis* je druh s mnoha geneticky oddělenými liniemi (viz Obr. 2). Bylo nalezeno několik monofyletických linií, které odpovídaly geografickým výskytům. Jednalo se o skupiny izolované z oblastí Mexika, Kanady, Číny a Austrálie (Bouzid et al., 2008a). Rozsáhlejší studie (Bouzid et al., 2008b) potvrdila výskyt geograficky oddělených linií vyskytujících se sympatricky. Zmiňované práce se liší zejména v množství analyzovaných dat a v aplikaci různých statistických postupů ve fylogenetických analýzách. V práci Bouzid et al. (2008b) byla mimo jiné zjištěna korelace mezi druhem meziphostitele (ryby), ze kterého byly vzorky odebrány a jejich genetickou příslušností. Do této studie byly zahrnuty vzorky získané z mnoha různých oblastí napříč severní polokoulí a Austrálie. Pomocí sekvenování dvou mitochondriálních genů (cytochrom oxidáza podjednotka I, cytochrom oxidáza B) a jednoho ribozomálního genu (ITS2) byl sestaven fylogenetický strom. Na základě výsledků se došlo k závěru, že geograficky vzdálené linie jsou i geneticky oddělené, což potvrzuje výsledky z předchozí studie (Bouzid et al., 2008a, b). Zajímavým zjištěním byl výskyt dvou sympatrických linií vyskytujících se v okolí Středozemního moře (Evropa, Tunisko, Alžírsko). Tyto linie byly označeny jako A a B. Přičemž zástupci *L. intestinalis* spadající do kladu A byly převážně odebrány z fylogeneticky odvozených kaprovitých ryb (*Abramis*, *Alburnus*, *Phoxinus*, *Rutilus*, *Scardinius*), klad B poté zahrnoval vzorky odebrané z fylogeneticky bazálních skupin kaprovitých druhů (*Barbus*, *Gobio*, *Rhodeus*). Přesto, že klady A a B zahrnují především vzorky z euro-mediteránních oblastí, byly zjištěny i výskyty geograficky velmi vzdálené, které do těchto kladů zapadají. V kladu A se vyskytovaly vzorky ze západní oblasti Ruska. Klad B poté obsahoval linie z východní Číny a Ruska (Bouzid et al., 2008b).

V navazující studii se autoři rozhodli zmapovat populační strukturu *L. intestinalis* pomocí mikrosatelitních markerů (Štefka et al., 2009). Tento postup přinesl přesnější výsledky především v populační struktuře mezi klady A a B. Rozložení linií ovšem stále kopírovalo předchozí studie s těmi rozdíly, že v tomto případě byly rozpoznatelné jemnější rozdíly v genetické struktuře sympatrických populací (Štefka et al., 2009).

Geograficky oddělené linie vznikly nejspíše díky omezenému toku genů mezi místy výskytu. Velké rozdíly byly pozorovány u linií geograficky velmi vzdálených. V lokálním měřítku bylo pozorováno několik rozdílů mezi sympatrickými skupinami a objevila se rýsující populační struktura uvnitř kladu A mezi evropským a africkým kontinentem (Štefka et al., 2009). Vzhledem k životnímu cyklu vázanému na sladkovodní organismy a krátkému trvání infekce v ptačích hostitelích zajišťujících disperzi zde Středozevní moře funguje jako účinná bariera genovému toku. Výskyt linie A v severní Africe byl přisuzován lidskému faktoru. V 60. letech minulého století byly do Tuniska importovány některé evropské druhy kaprovitých ryb za ekonomickými účely. Tímto aktem zřejmě došlo i k introdukci evropské linie *L. intestinalis*. Směr této introdukce (z Evropy do severní Afriky) byl pak ověřen pomocí koalescenční analýzy multilokusových dat (Bouzid et al., 2013).



**Obr. 2:** Světová mapa zaznamenaných výskytů linií *Ligula intestinalis* podle Bouzid et al. (2013) s vyznačením míst původu nově zkoumaných vzorků. Žlutá: Kanada; červená: klad A; zelená: klad B; fialová: Etiopie, modrá: *Digramma inetrrupta*; černá: nové populace z Turecka, Maďarska, Íránu a Jihoafrické Republiky.

## **2. Cíle práce**

Pro doposud netestované populace *Liguly intestinalis* z Turecka, Maďarska, Íránu a Afriky:

- 1) Získat sekvence mitochondriálních genů cytochrom oxidáza podjednotka I (COI) a cytochrom oxidáza B (COB).
- 2) Získat multilokusová data pomocí analýz mikrosatelitních lokusů.
- 3) Vyhodnotit genetickou strukturu populací v kontextu dříve studovaných oblastí a spektra hostitelů.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Vzorky

K analýze bylo použito celkem 16 jedinců z Turecka, 3 z Maďarska, 3 z Íránu a 2 ze západní Afriky, které byly obdrženy od spolupracujících laboratoří. Všechny vzorky byly uchovány v 96 % etanolu při teplotě 4°C. Původní fixáž íránských a afrických vzorků pravděpodobně obsahovala denaturovaný alkohol a/nebo stopy formaldehydu.

**Tab. 1:** V tabulce jsou vypsány všechny studované vzorky, jejich původ, lokalita sběru a hostitel.

Země původu	Označení vzorku	Lokalita	Hostitel	Řád (Čeleď)
Turecko	TR3	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> (Cyprinidae)
Turecko	TR4	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> (Cyprinidae)
Turecko	TR5	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> (Cyprinidae)
Turecko	TR6	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> (Cyprinidae)
Turecko	TR7	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> (Cyprinidae)
Turecko	TR8	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> (Cyprinidae)
Turecko	TR9	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> (Cyprinidae)
Turecko	TR10	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> (Cyprinidae)
Turecko	TR11	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> (Cyprinidae)
Turecko	TR12	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> (Cyprinidae)
Turecko	TR13	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> (Cyprinidae)

Turecko	TR14	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> ( <i>Cyprinidae</i> )
Turecko	TR15	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> ( <i>Cyprinidae</i> )
Turecko	TR16	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> ( <i>Cyprinidae</i> )
Turecko	TR17	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> ( <i>Cyprinidae</i> )
Turecko	TR18	Sapanca lake	<i>Rhodeus sericeus</i>	<i>Cypridiformes</i> ( <i>Cyprinidae</i> )
Maďarsko	H1	Balaton	<i>Neogobius</i> <i>fluviatilis</i>	<i>Perciformes</i> ( <i>Gobiidae</i> )
Maďarsko	H3	Balaton	<i>Rutilus rutilus</i>	<i>Cypridiformes</i> ( <i>Cyprinidae</i> )
Maďarsko	H11	Balaton	<i>Neogobius</i> <i>fluviatilis</i>	<i>Perciformes</i> ( <i>Gobiidae</i> )
Iran	IR1	Choghakhor lake	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Cypridiformes</i> ( <i>Cyprinidae</i> )
Iran	IR2	Choghakhor lake	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Cypridiformes</i> ( <i>Cyprinidae</i> )
Iran	IR3	Choghakhor lake	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Cypridiformes</i> ( <i>Cyprinidae</i> )
Západní Afrika	ZA1	Nwanedi Dam	<i>Phalacrocorax</i> <i>lucidus</i>	<i>Pelecaniformes</i> ( <i>Phalacrocoracidae</i> )
Západní Afrika	ZA2	Nwanedi Dam	<i>Phalacrocorax</i> <i>lucidus</i>	<i>Pelecaniformes</i> ( <i>Phalacrocoracidae</i> )

### 3.2 Izolace DNA

Pro izolaci DNA byla z každého jedince odebrána tkáň o velikosti přibližně 2mm<sup>2</sup>. Vzorky byly ponechány minimálně dvě hodiny v otevřené zkumavce, kdy došlo k odpaření zbytkového etanolu. K izolaci DNA byl použit kit Blood & Tissue (Qiagen), postupovalo se dle výrobcem přiloženého návodu. Kvantita vyizolované DNA byla změřena pomocí přístroje Qubit (Invitrogen).



### 3.3 Polymerázová řetězová reakce

Reakční směsi a podmínky se lišily celkovým objemem i objemem použitých reagens podle druhů jednotlivých reakcí a produktů, které jsem se snažila získat. Amplifikace byla provedena pomocí přístroje MasterCycler Pro (Eppendorf).

### 3.4 PCR mitochondriální DNA

Složení reakcí o celkovém objemu 20  $\mu$ l bylo následující: 10  $\mu$ l komerčně vyráběného Hotstar mastermixu (Qiagen, Germany), 1  $\mu$ l forward primeru, 1  $\mu$ l reverse primeru (oba o koncentraci 5 pMol), 7  $\mu$ l PCR H<sub>2</sub>O a 1  $\mu$ l DNA. Primery (viz Tab. 2) a protokol PCR (viz Tab. 4) byly převzaty z Bouzit et al., 2013. Některé vzorky se nepodařilo amplifikovat za použití primerů nasedajících na okraje daných genů, zřejmě z důvodu degradace DNA kvůli fixaci v nekvalitním alkoholu. Pro tyto vzorky byly použity primery nasedající uprostřed genu v kombinaci s původními primery. Cílový úsek byl amplifikován ve dvou menších fragmentech. PCR reakce byly namíchány obdobným způsobem, avšak bylo použito vyšší množství vyizolované DNA, pro zlepšení průběhu reakcí byl přidán Q-Solution (Qiagen). Reakce pro vzorky nutné amplifikovat tímto způsobem byly tedy následující: 10  $\mu$ l komerčně vyráběného Hotstar mastermixu (Qiagen, Germany), 1  $\mu$ l forward primer, 1  $\mu$ l reverse primer, 3  $\mu$ l PCR H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l Q-Solution a 2  $\mu$ l vyizolované DNA. Termální protokol PCR se shodoval s protokolem použitým pro předchozí reakce.

**Tab. 2:** Primery použité pro detekci mitochondriálních genů.

Název Směr	Sekvence	Produkt
COBA forward	GTATGTGGCTGATTCAGAGTTGAGC	COB
COBB reverse	TTCGAGCCCGAAGAATGCAAGTAG	COB
COIA2 forward	CATATGTTTTGATTTTTTGG	COI
COIB2 reverse	AKAACATAATGAAAATGAGC	COI
COB_inF_Lig forward	GCTGCTACTGTGTTAACTGCAATAG	2. polovina COB
COB_inR_Lig reverse	CTATTGCAGTTAACACAGTAGCAGC	1. polovina COB
COI_inF_Lig forward	TTTAGTTCAGTTACTATGATTATTGGC	2. polovina COI
COI_inR_Lig reverse	GCCAATAATCATAGTAACTGAACTAAA	1. polovina COI

### 3.5 PCR mikrosatelitní DNA

Pro detekci multilokusových úseků byly použity primery Štefka et al. (2007). Primery byly rozděleny podle barevného značení a délky lokusů do čtyř skupin vždy po čtyřech sadách primerů. Pro detekci multilokusové DNA byly použity dva protokoly pro PCR, vždy dle vlastností použitých sad primerů v reakci. Reakční směs obsahovala 5,5  $\mu$ l Hotstar mastermixu (Qiagen, Germany), 1  $\mu$ l od každého použitého primru (viz Tab. 3) - celkem tedy 4  $\mu$ l, 0,5  $\mu$ l DNA, 0,5  $\mu$ l Q-Soulution.

**Tab. 3:** Sady primerů v jednotlivých reakcích detekující mikrosatelitní lokusy, jejich sekvence a barevné značení.

Multiple- xová reakce	Název lokusu	Sekvence foreward primer	Sekvence reverse primer	Barevné značení
Long 1	Li. 2	GATCAAGGAAATAGAT AAGGCATT	GAGCTAGCTGCATCGTA AGTCG	VIC
	Li. 7	TCACGCAGGACGAACG AC	GATCTCAGGTAGTCCAC AGCC	NED
	Li. 14	AATGTGGATGTCGTCA ATGT	AGGCACTGCTTCTCACT CC	6-FAM
	Li. 25	TGACTTGGAAGGACAG GTTAGC	GCGTGACGTAGACCACC CA	PET
Long 2	Li. 6	AGCTGACAAAGACGGG CAAAGTG	AGCGCTGCCTACCTCAT TACC	6-FAM
	Li. 18	GCCTGAAGCTGGGAAA CTTC	TATTCGCGATATGCTCG CC	6-FAM
	Li. 21	GGCCATACCAATGCCT CATA	GTCGCCTGACTCTATGC AAAG	PET
	Li. 30	TCATTAACGCGGCACT ATGTG	TGGCAAATACAATAGTT CTGACCT	VIC
Short 1	Li. 1	ACGTAAGGCACTAGAA TGGGAGAT	CCGTCAGGCGATGGAAC A	NED
	Li. 8	GATCAAAGAATTCGGC AGTTCAAC	AAGTTAGGGAGAGTTGC GGCTGTT	VIC
	Li. 17	CCGCTTGGGTTTAAAC AGTCC	GAAGCTTGGCCAGGAG ACTG	6-FAM
	Li. 24	ATTTACTTACATCAGG GAGTTGCC	CGTAGATTCTTAAACCT ACGCTCTT	6-FAM
Short 2	Li. 5	GCGAAGCTGACTCACA CAAGGTT	TGAGTTGCTACCATAAT CCTGACG	NED
	Li. 11	TGCAAACAGTTGTAGC GAACGG	CACCTGACGTCTCGACA TCCG	6-FAM
	Li. 15	ACAAGAGGAGAAAGC CAGAGTATC	TTTGTTGGTACTGTTTTT CTGTCT	PET
	Li. 23	GACCAACTGCCTTAGG GTGTG	CGTGGACGCCGTTCTTA GTA	6-FAM

**Tab. 4:** Tabulka protokolů PCR reakcí.

Reakce	Počáteční denaturace	Počet cyklů	Denaturace	Nasedání primerů	Syntéza	Finální syntéza	Reference
Mitochondriální geny	95°C / 15 min	30	94°C/ 30 s	50°C / 45 s	72°C/ 45 s	72°C/ 10 min	Bouzid et al., 2008b
Mikrosatelitní DNA - Long	95°C / 15 min	30	94°C/ 15 s	58°C/ 30 s	72°C/ 20 s	72°C/ 15 min	Štefka et al., 2009
Mikrosatelitní DNA - Short	95°C / 15 min	30	94°C/ 15 s	58°C/ 30 s	72°C/ 20 s	72°C/ 1 min	Štefka et al., 2009

### 3.6 Gelová elektroforéza

Průběh PCR reakcí byl ověřen pomocí elektroforézy. Vzorky byly naneseny na 1% (mitochondriální geny) nebo 2% (mikrosatelitní DNA) agarosový gel obarvený GelRed (BIOTIUM). Na gel byl nanesen 2 µl PCR produktu. Jednotlivé vzorky byly naneseny pomocí 6x DNA Loading Dye (Fermentas). Pro odečtení délky produktů byl použit Ladder 100 pb (Fermentas). Vizuální kontrola fragmentů byla provedena pomocí UV transiluminátoru.

### 3.7 Sekvence

Získané PCR produkty byly enzymaticky přečištěny (enzymy Exonukláza I, alkalická fosfatáza, New England Biolabs) a odeslány k sekvenaci do MacroGen, SeqMe. Získané sekvence byly dále zpracovány v programu Geneious 8.1.

### 3.8 Práce se sekvencemi, fylogenetické analýzy

Získané sekvence byly zpracovány v programu Geneious 8.1. Sekvence byly sestaveny do kontigů. Následně byly odříznuty konce obsahující primery. Identifikace sekvencí byla provedena pomocí programu BLAST, NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pro fylogenetické analýzy byly oba mitochondriální geny konkatenovány, a to v pořadí COI, COB. Vzorky byly následně převedeny na haplotypy pomocí softwaru Geneious 8.1. Bylo tak provedeno po vzoru z předchozí studie (Bouzid et al., 2013), k jejímž výsledkům byly

mnou získané sekvence přiřazeny za účelem kompletních fylogenetických analýz. Jako outgroupy byly použity *Hymenolepis diminuta* a *Taenia crassiceps* (viz příloha).

Celkový soubor haplotypů byl analyzován pomocí metod Neighbor joining (NJ) a Maximum Likelihood (ML). NJ analýza byla provedena v programu Geneious 8.1 pomocí algoritmu Geneious tree builder. Pro výpočet distancí byla použita korekce HKY. Bootstrapová podpora byla získána 1000 opakování.

ML analýzy byly provedeny v programu PHYML (Guindon and Gascuel, 2003) s mutačním modelem GTR + I + G převzatým z práce Bouzid et al. (2013). Bootstrapové podpory byly vygenerovány v online portálu PHYML (PhyML 3.0: <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) se stejným nastavením a 1000 replikacemi.

### 3.9 Fragmentační analýza

Odečítání velikostí mikrosatelitních úseků DNA bylo provedeno v programu Geneious 8.1 v mikrosatelitním plugginu. Odečtené hodnoty byly přiřazeny k výsledkům ze Štefka et al., 2009. Následně byly kompletní hodnoty zpracovány pomocí programu STRUCTURE 2.2.4 (Falush, 2007). V tomto programu byly spuštěny celkem dvě sady analýz. První obsahovala kompletní seznam všech vzorků z obou prací. K původním 338 vzorkům z 34 lokalit (viz přílohy) bylo přiřazeno 22 nových jedinců ze 3 lokalit dle geografického původu a druhu hostitele. Nejdříve byl program spuštěn pro hodnotu K od 1 do 37 s počtem MCMC opakování 100 000 burnin/1 000 000.

Druhá analýza byla navržena tak, aby bylo lépe rozpoznatelné strukturování početně málo zastoupených populací, které byly zároveň od sebe geograficky vzdálené. Byla vyřazena většina vzorků evropských linií spadající do kladu A (populace: 1-22). V datasetu byla ponechána pouze jedna populace z kladu A (populace 9 – Novomlýnské nádrže), pro možnost porovnání nově analyzovaných linií i s evropským zástupcem. Jednalo se celkem o 16 populací, a to 9 a 23 – 37 (viz příloha). Tato analýza běžela v počtu MCMC opakování 100 000 burnin/1 000 000 s hodnotou K=1 až 15.

Ve všech analýzách byly nastaveny parametry: Admixture Model a korelace alelických frekvencí. Oba modely byly spuštěny dvakrát nezávisle na sobě a výsledky stejných analýz byly porovnány. Likelihoodové hodnoty (logLn) pro oba běhy byly zprůměrovány, na jejich základě byl v programu Excel vytvořen graf závislosti logLn na hodnotě K. Z grafu byla následně odhadnuta ideální hodnota K.

S výsledky programu Structure při daných hodnotách  $K$  se dále pracovalo v grafickém programu DISTRUCT (Rosemberg, 2004).

## 4. Výsledky:

### 4.1 Sekvenování mitochondriálních genů

Z celkového počtu 24 vzorků jsem musela dva vzorky z analýz vyřadit. V obou případech se jednalo o africké vzorky. Amplifikace byla zcela neúspěšná, nejspíše kvůli uchování vzorků v nekvalitním alkoholu.

U některých vzorků (viz Tab. 5) byla detekce mitochondriálních genů, za použití primerů nasedajících na okraje úseků, obtížná. Při vizuální kontrole na gelu byl produkt PCR příliš slabý, nebo místo očekávaného jednoho produktu se jich vyskytovalo více. Tento jev byl nejspíše způsobený degradovanou DNA, a tím byla znehodnocena i kvalita průběhu polymerázové řetězové reakce.

Vzorky, které nebylo možné amplifikovat pomocí klasických primerů, byly amplifikovány pomocí primerů, které byly navrženy tak, aby nasedaly uvnitř genů. Tím vznikly dva kratší úseky, které byly následně složeny do jedné kompletní sekvence, úpravy jsem prováděla pomocí programu Geneious 8.1. Tento postup se osvědčil a podařilo se získat kvalitní sekvence z téměř všech vzorků, přesto musely být z analýz vyřazeny jedinci, u kterých nebyl úspěšný žádný zmiňovaný postup: H1, TR3, TR6, TR8.

Po převedení konkatenovaných sekvencí na haplotypy byly z celkového počtu 13 amplifikovaných tureckých vzorků identifikovány dva haplotypy TR3 a TR5, každý ze dvou amplifikovaných maďarských vzorků zastupoval jeden samostatný holotyp, a to H3 a H11, všechny tři íránské vzorky utvořily jediný haplotyp IR1. Mnou získaná data jsem přiřadila k převzatému datasetu z předchozí studie (Bouzid et al., 2013) čímž vznikl nový soubor dat pro následující analýzy. Tento dataset obsahoval 82 haplotypů z původní studie a 5 mnou detekovaných holotypů.

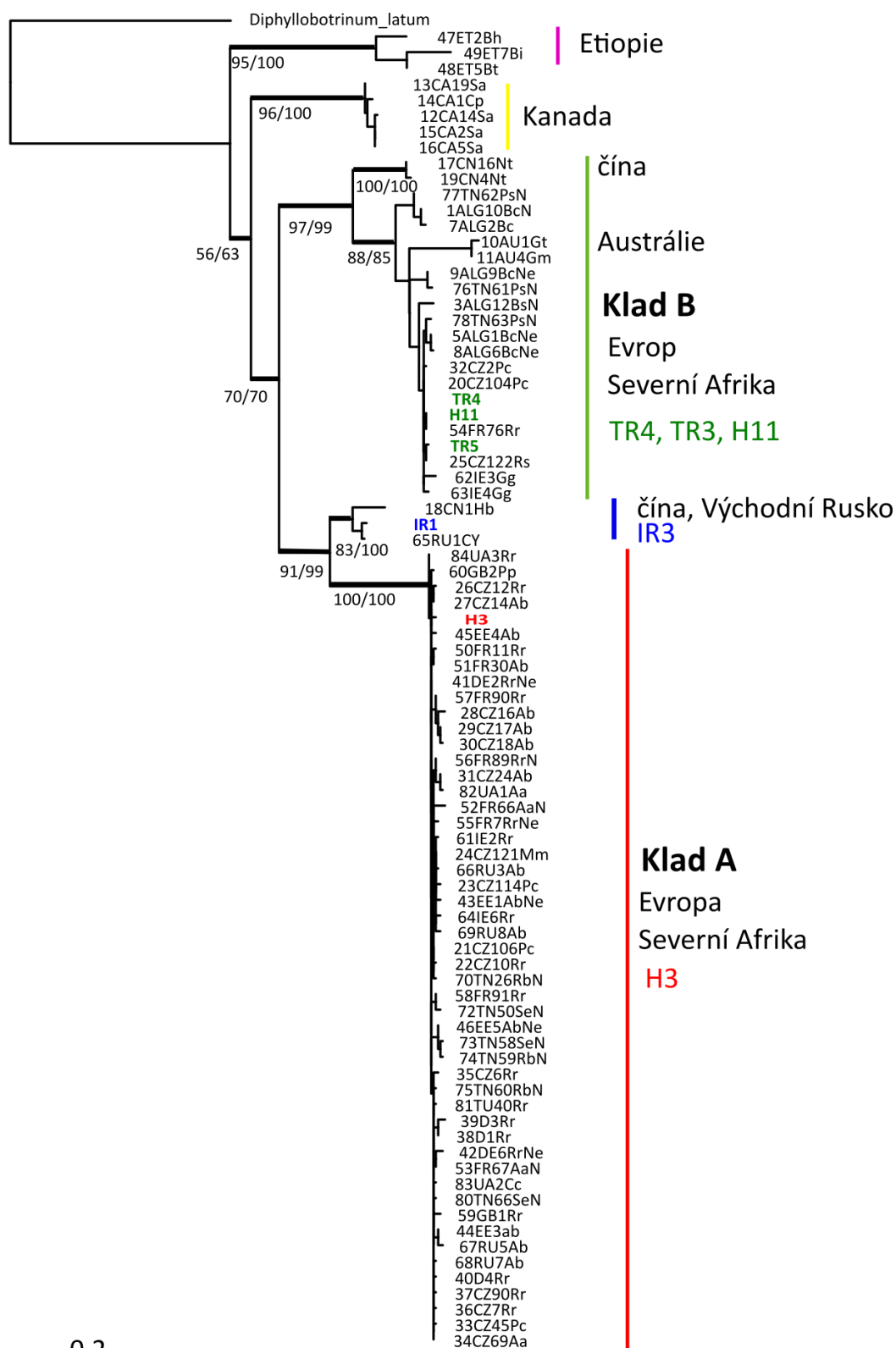
**Tab. 5:** Tabulka vzorků, které se nepodařilo amplifikovat pomocí základních primerů.

Gen	Název vzorku					
COI	IR1	IR2	IR3	TR6	TR8	-
COB	IR1	IR2	IR3	TR3	TR8	TR12

#### 4.2 *Fylogenetické analýzy mitochondriálních genů*

Výsledky fylogenetických analýz kompletního datasetu kopírovaly vzor z dřívějších analýz (Obr. 3), dobře se shodovaly s topologií z dřívějších analýz (Bouzid et al., 2008b, Bouzid et al., 2013). Mou nově přidané haplotypy (TR4, TR5, IR1, H3, H11) do souboru dat byly detekovány v několika dobře podpořených větvích. Oba turecké haplotypy spadaly dovnitř větve tvořené euro-mediteránními vzorky, označených jako klad B. Rybí mezihostitelé z kladu B jsou původem z několika rybích řádů. Dosavadní studie odhalily infekci druhů z řádů *Cypriniformes* (bazální kaprovití), *Osteriformes* (Bouzid et al. 2013). Haplotyp IR1, geograficky náležící Íránu, usedl k větvi, kterou tvořily dva haplotypy *Digramma interrupta* z východní Číny a východního Ruska. Dva maďarské vzorky, a zároveň haplotypy, které se podařilo analyzovat, se ve svém místě ve fylogenetickém stromě rozcházely. Haplotyp H3 byl přiřazen ke kladu A, který reprezentují zástupci z evropských a afrických lokalit. V tomto kladu se nacházejí především zástupci z odvozených kaprovitých ryb. Naopak haplotyp H11 byl přiřazen ke kladu B.





**Obr. 3:** Maximum likelihood fylogeneze datasetu konkatenovaných sekvencí mitochondriálních genů COI a COB. Bootstrapové hodnoty nad 50% (ML/NJ) uvedeny u jednotlivých větví. Mnou přidáné haplotypy do původního datasetu (Bouzid et al., 2013) jsou vyznačeny barevně. Barvy odpovídají lokalitám vyznačeným na Obr. 2.

### 4.3 Mikrosatelitní analýza

Pro detekci mikrosatelitních lokusů jsem použila všechny dostupné vzorky, bohužel ani v této analýze se mi nepodařilo získat data ze západoafrických zástupců, byly tedy vyřazeny i z této části práce. Z šestnácti hledaných lokusů jsem jich spolehlivě detekovala 15. Lokus Li. 15 neamplifikoval u žádného zkoumaného vzorku, což odpovídá i výsledkům z práce Štefka et al. (2009). Data byla po exportu z Geneious 8.1 zpracována pomocí Bayesiánského přístupu v programu Structure 2.2.4.

Při prvním typu analýzy, kdy se pracovalo s kompletním datasetem, byla vybrána optimální hodnota  $K=6$  i přes to, že v této hodnotě nebylo dosaženo nejoptimálnější hodnoty  $\log L_n$  (viz Obr. 4). Při vyšších hodnotách  $K$  docházelo k jen velmi pozvolnému navyšování  $\log L_n$  a ke štěpení jedinců mezi více klastrů bez biologické relevance. Při hodnotách  $K$  nad 20 docházelo i k velkým výkyvům mezi oběma běhy MCMC, které se projevilo rozkolísáním průměrných hodnot  $\log L_n$ .

Výsledky analýzy ukazují samostatné klastrování tureckých vzorků. K nim částečně spadají maďarské vzorky, které vykazují vnitřní fragmentaci. Jedinci z Íránu v této analýze vykazují afinitu k vzorkům *D. interrupta* z Východní Asie a zároveň k alžírským vzorkům (Obr. 6b).

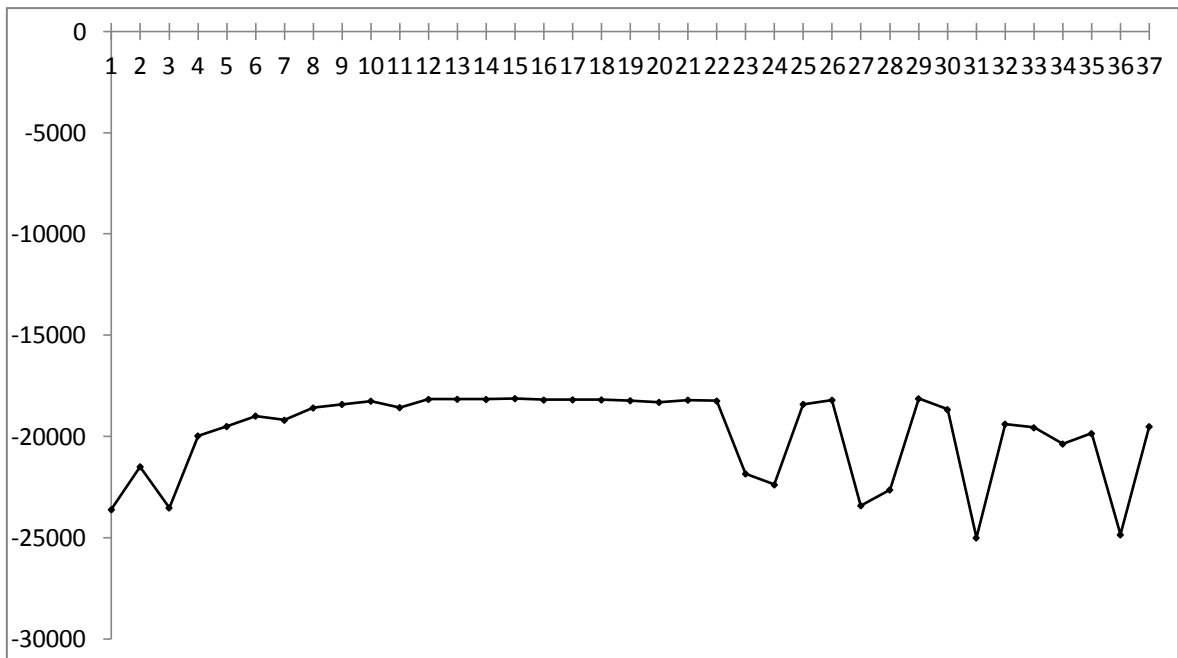
Druhá analýza byla zaměřena na podrobnější strukturu neevropských populací. Nejvyšší hodnota  $\log L_n$  oscilovala kolem hodnot  $K=7$  a  $K=8$ . Rozložení populací při  $K=7$  se jevilo jako nedostačující, alžírské populace byly přiřazeny k vzorkům *D. interrupta* z Východní Asie, což neodpovídalo výsledkům ze studie Štefka et al. 2009. Nejideálnější struktura populací byla tedy vygenerována pro  $K=8$ . Viz Obr. 5 pro porovnání hodnot těchto dvou běhů.

Turecké vzorky utvořily jednotnou samostatnou skupinu (TR Rs, Obr. 7), která nesdílela shodné genotypy s ostatními skupinami.

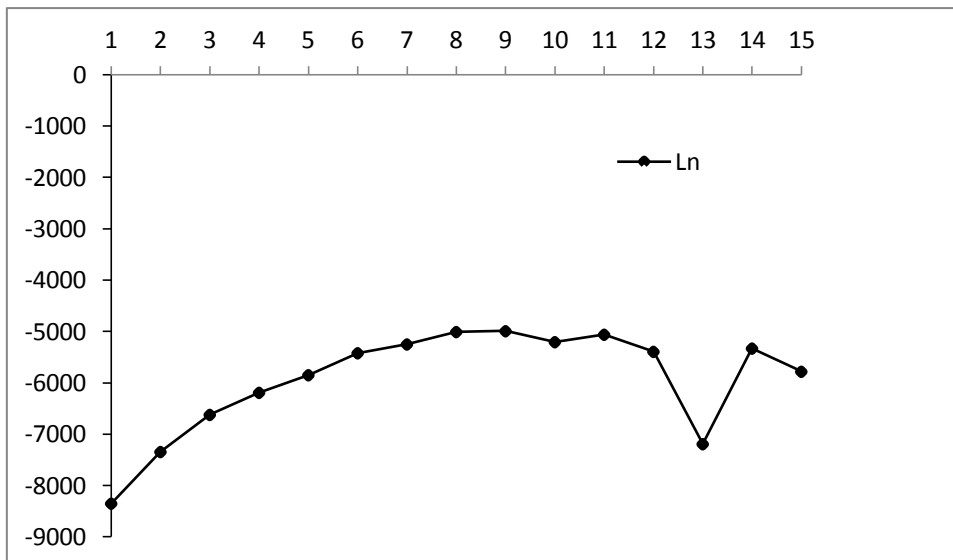
Maďarská populace vykazovala roztržičnost genotypů jednotlivých vzorků. Populace HU Nf, tvořená vzorky H1 a H11 byla přiřazena k několika dalším populacím, které spadají do kladu B. Ve fylogenetickém stromě, vygenerovaném na základě analýz mitochondriálních genů, byl použit pouze vzorek H1 (H11 neamplifikoval v PCR), který byl přiřazen taktéž ke kladu B. Výsledky těchto dvou analýz, fragmentační a fylogenetické, tedy nejsou v rozporu. Jedinec H3 (HU Rr, Obr. 7) projevoval nejvyšší afinitu k evropské populaci CZ3Ab, patříci do kladu A, která byla v datasetu pro tento model ponechána právě pro porovnání všech možných genetických klastrů. Toto zjištění je ve shodě s výsledky z fylogenetických analýz,

kdy haplotyp H3 klastroval k euro-mediteránnímu kladu A. Část genotypu H3 (ve smyslu posteriorní pravděpodobnosti) byla však sdílena i s ostatními dvěma maďarskými vzorky a s tureckou populací.

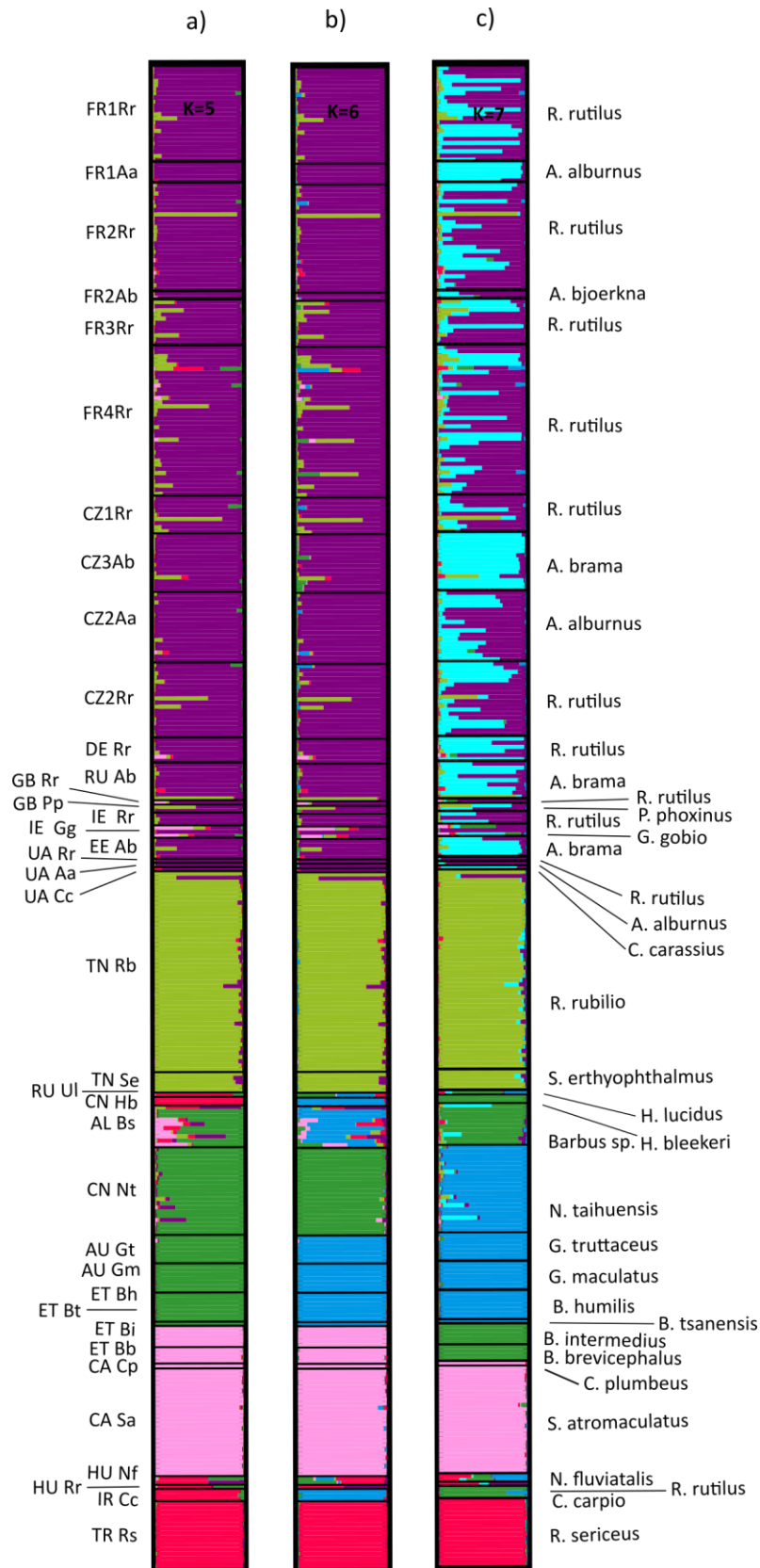
Íránští jedinci utvořili jediný klast. Tato linie byla téměř identická se dvěma dalšími populacemi, a to RU H1 a CN Hb. Stejně jako u předchozí, fylogenetické, analýzy se jednalo o vzorky druhu *Digramma interrupta* původem z Východní Asie.



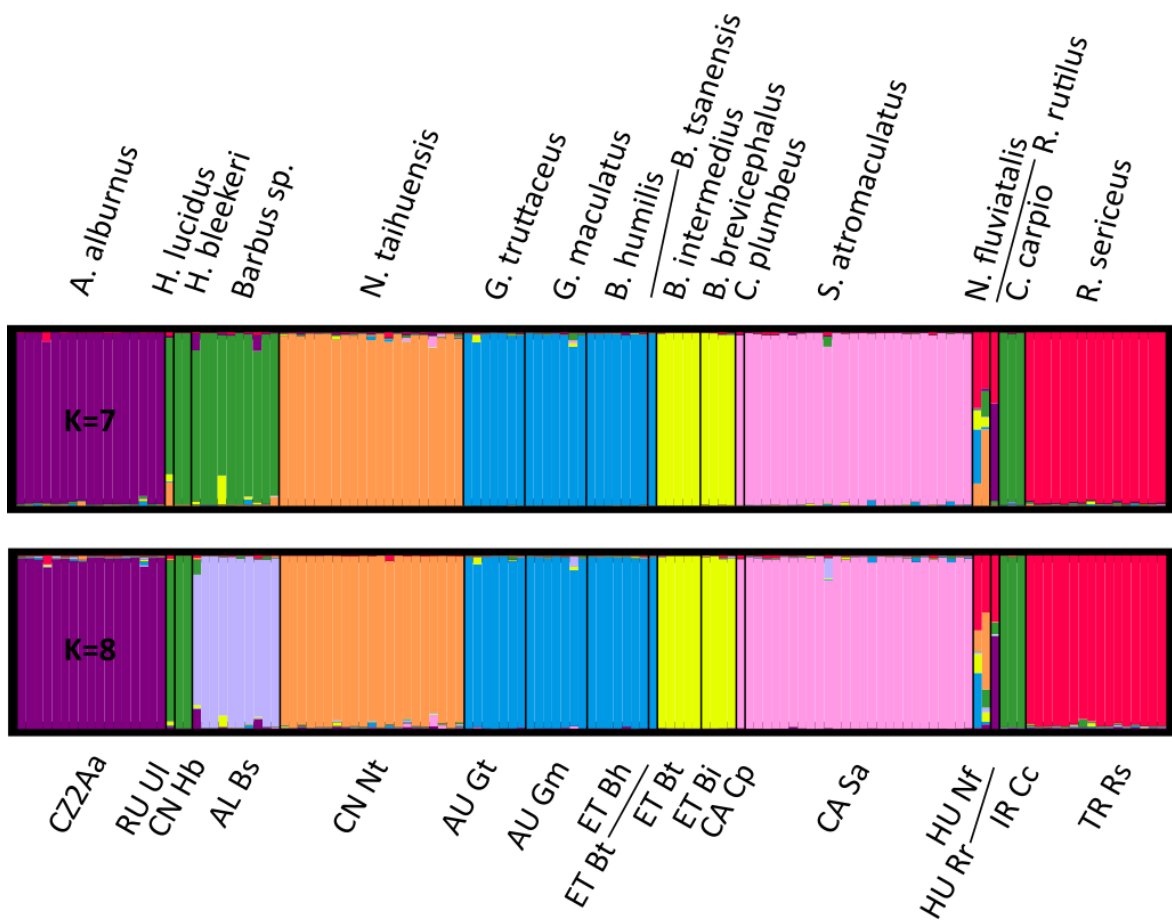
**Obr. 4:** Graf závislosti zprůměrovaných hodnot dvou běhů modelu pro kompletní dataset  $K=1$  až 37.  $\text{LogLn}$  – maximum likelihood (osa y) pro počet klastrů  $K$  (osa x). Nejrychlejší nárůst hodnot  $\text{LogLn}$  je patrný mezi  $K=3-6$ , k ustálení růstu dochází mezi  $K=6-22$ . Nejoptimálnější hodnota  $K=8$ .



**Obr. 5:** Graf závislosti zprůměrovaných hodnot dvou běhů modelu pro populace 9 a 23-37,  $K=15$ .  $\text{LogLn}$  – maximum likelihood (osa y) pro počet klastrů  $K$  (osa x). Nejrychlejší nárůst hodnot  $\text{LogLn}$  je patrný mezi  $K= 1-6$ , k ustálení růstu dochází mezi  $K= 6-9$ .  $\text{LogLn}$  dosáhl nejvyšší hodnoty při  $K=9$ .



**Obr. 6:** Výsledky shlukování klastrů vygenerované v programu Structure pro první analýzu (K=1-37; MCMC replikace 100 000 burnin/1 000 000). a) Klastrování při K=5; b) klastrování při K=6; c) Klastrování při K=7.



**Obr. 7:** Výsledky shlukování klastrů vygenerované v programu Structure pro druhou analýzu (K=1-15; MCMC replikace 100 000 burnin/1 000 000). a) Klastrování při K=7; b) klastrování při K=8.

## 5. Diskuze

Výsledky molekulárních analýz mitochondriálních genů v kombinaci s detekcí mikrosatelitních lokusů u mnou nově zkoumaných vzorků potvrdily vzor populační struktury *Ligula intestinalis* vyplývající z předchozích studií (Bouzid et al., 2008a; Bouzid et al., 2008b; Štefka et al., 2009; Bouzid et al., 2013). Z těchto prací lze vyvodit několik závěrů. Geograficky oddělené populace *L. intestinalis* utvářejí samostatné linie, mezi kterými prokazatelně nedochází k toku genů. Vzdálenost mezi populacemi je tedy jedna z hlavních genetických bariér tohoto druhu. Populace nacházející se v mediteránních oblastech (Evropa, Severní Afrika) utvářejí dvě samostatné oddělené linie. Tyto linie se liší na základě molekulárních analýz, ale také v preferenci rybího meziphostitele, která je nejspíše odrazem adaptace parazita na rozdílné imunitní systémy různých druhů ryb (Arme, 1997). Z výše uvedených prací dále vyplynulo, že pro pochopení historie globální expanze populací (či linií) *L. intestinalis*, je třeba analyzovat více lokalit, zejména mimo evropský kontinent.

Dvě ze tří nově vzorkovaných populací studovaných v této práci pocházely právě z oblastí mediteránu a Přední Asie. Vzorky byly vyjmuty z ryb řádů Máloostní (*Cypriniformes*) a Ostnoploutví (*Perciformes*) (viz Tab. 1).

Maďarské vzorky spadají dle výsledků fylogenetických analýz do obou evropských kladů A, respektive B. Mnou studovaní maďarští zástupci pocházely z dvou řádů ryb. Zástupce *L. intestinalis* haplotypu H3 byl vyjmut z meziphostitele *Rutilus rutilus* patřícího do odvozené skupiny čeledi kaprovitých (*Cyprinidae*). Tato populace *L. intestinalis* byla dle analýz přiřazena do kladu A, ve kterém se nacházejí zástupci populací tohoto parazita vyjmutých právě z odvozených kaprovitých ryb (Bouzid et al., 2013). Tato větev byla statisticky velice dobře podpořena NJ a ML analýzách (Obr. 3).

Naopak tomu bylo u druhého maďarského identifikovaného haplotypu nesoucí pracovní název H11. Meziphostitelem této linie byl zástupce řádu Ostnoploutví (*Perciformes*), a to *Neogobius fluviatilis*. Populace *N. fluviatilis* není v Balatonu původní. Přirozený výskyt je zaznamenán v přímořských oblastech Černého moře (Biro, 1971). Otázkou je, nakolik rozšíření tohoto druhu do nepůvodních oblastí narušuje přirozenou rovnováhu mezi dynamikou linií parazita a ostatních hostitelských druhů. Prevalence *L. intestinalis* u jednotlivých hostitelů na daných lokalitách prochází dlouhodobými cykly (Kennedy, 2001) a přítomnost nového hostitele může tyto cykly pozměnit. Haplotyp H11 spadl do kladu B. Tento klad se vyznačuje především rybími hostiteli ze skupiny tzv. bazálních kaprovitých. V kladu B se objevují i jedinci *L. intestinalis* z jiných řádů ryb:



*Osmeriformes*, *Galaxiformes* (Bouزيد et al., 2008). Toto rozdělení podpořilo výsledky z (Bouزيد et al, 2008b; Bouزيد et al., 2013), které poukazují na preferenci různých rybích meziphostitelů uvnitř mediteránních kladů.

Výsledky fragmentačních analýz u maďarských vzorků nebyly zcela jednoznačné. Jednotlivé vzorky byly štěpeny mezi několik dalších, dříve zkoumaných, populací. Vzorky H1 a H11, které pocházely ze stejného hostitele (*N. fluviatilis*), vykazovaly příslušnost k populacím Turecka, Číny, Austrálie a Etiopie v různých poměrech. Všechny tyto populace, až na linie pocházející z Etiopie, jsou zástupci kladu B. Tato afinita ke kladu B kopírovala vzor z fylogenetické analýzy.

Vzorek H3 odebrán z hostitele *R. Rutilus* vykazoval taktéž tříštěný původ. I v tomto případě byla nalezena podobnost s tureckou populací jako u vzorků H1 a H11, ale tentokrát převažovala shoda s evropskou populací CZ3Ab (Novomlýnské nádrže), což je zástupce kladu A. Ani u tohoto jedince nedošlo k zásadnímu rozporu mezi výsledky fylogenetických a fragmentačních analýz.

Vnitřní fragmentovanost maďarských vzorků a sdílený signál pro část genotypu poukazuje na možnost výskytu hybridních linií druhu *L. intestinalis*. Hybridizace není jediným možným vysvětlením. Může se jednat o jedince, jejichž genotypy v analýze Structure 2.2.4 nevytvářejí dostatečně charakteristický pattern (vzor) k vytvoření vlastního klastru. Bohužel populační vzorek z této oblasti byl nedostačující pro utvoření jasných závěrů.

Turečtí zástupci obou detekovaných haplotypů (TR4 a TR5) byly získány z totožného druhu hostitele (*Rhodeus sericeus*: *Cyprinidae*). Dle fylogenetických analýz byla celá geografická skupina řazena dovnitř kladu B. Detekce mikrosatelitních úseků DNA ustanovila turecké vzorky jako samostatný klastr.

Výskyt haplotypů spadajících do kladů A a B není limitován pouze na euro-mediterránní oblasti. Klad A obsahuje vzorky z Ruska, klad B zahrnuje vzorky z Austrálie a Číny. Přesto, že se klady často vyskytují na společných lokalitách, vykazují vyšší afinitu k příbuzným vzorkům z geograficky vzdálenějších lokalit než mezi sympatricky se vyskytujícími populacemi různých kladů navzájem podobně jako v práci Bouزيد et al. (2013). Není tedy zcela překvapivé, že populace nacházející se v Turecku klastrují do jednoho z těchto kladů, přesněji do kladu B. S ohledem na hostitele tureckých haplotypů, byl tento výsledek předpokládán. Geografický rozsah kladu B byl tímto potvrzen i v oblastech blízkého východu. Ovšem neznamená to, že klad nemůže být rozšířen i hlouběji do asijských oblastí.

Íránský haplotyp IR1 přinesl zajímavý výsledek. Tento vzorek zapadal do poměrně málo zastoupené, přesto fylogeneticky/statisticky dobře podpořené větve, která obsahovala výhradně jedince příbuzného druhu *Ligula intestinalis* - *Digramma interrupta*. Lze tedy předpokládat, že íránské vzorky zkoumané v naší práci jsou zástupci právě *D. interrupta*.

Původní složení této linie zahrnovalo populace z východních oblastí Ruska a Číny, což jsou lokality od místa nálezů íránských vzorků vzdálené více než 5 000 km. Geografické rozložení této linie se zdá být tedy značně široké. S ohledem na skutečnost, že disperzní schopnost parazita je velice často značně limitovaná nejmobilnějším hostitelem (Louhi et al., 2010), je velice pravděpodobné, že tato linie *D. interrupta* se nebude vyskytovat pouze na právě zjištěných lokalitách, ale bude se nacházet i mezi těmito vzdálenými místy. Dubinina (1980) ve své práci uvádí místa výskytu v západní Evropě a jihovýchodní Asii.

Morfologie těchto druhů, *Ligula intestinalis* a *Digramma inerrupta*, se liší pouze v drobných morfologických odchylkách. Tyto rozdíly jsou navíc nejlépe rozpoznatelné u dospělého jedince (Dubinina, 1980). Vzhledem k faktu, že všechny mou zkoumané vzorky byly odebrány ve stádiu *plerocercoid* (druhé larvální stádium), bylo prvotní určení druhu (*Ligula intestinalis*) pouze na základě morfologie chybné. Tato chyba byla eliminována pomocí molekulárních metod, kdy byl na základě shody sekvencí určen správný druh parazita. I přes to, že se stále jedná o dva druhy, populace *D. interrupta* se objevují uvnitř fylogenetického stromu složeného ze zástupců *L. intestinalis*. Nabízí se otázka, zda se nejedná o jeden druh. Tímto tématem se zabýval Luo et al. (2003), kdy na molekulární úrovni porovnávali čínské populace *D. interrupty* a *L. Intestinalis*. Z jejich studie nevzešel jednoznačný závěr, bylo navrženo další zkoumání (Luo et al., 2003).

Populační struktura *L. intestinalis* se jeví více fragmentovaná, než se původně předpokládalo. Bylo objeveno několik dobře statisticky podpořených geneticky oddělených populací, které se navzájem geograficky překrývají. Je zcela namístě se domnívat, že sympatrický výskyt více linií *L. intestinalis*, s odlišnou hostitelskou specifitou, je mnohem častější, než bylo dosud popsáno. Je třeba dalších výzkumů, zejména sběr materiálu v mimoevropských oblastech, k získání komplexnějších informací o populačně-geografických trendech tohoto parazita a o průběhu jeho globální expanze.

## 6. Závěr

- ✦ Vzorky zkoumané v této práci kopírovaly populačně-geografický vzor předchozích studií. Obě použité analýzy, fylogeneze založená na sekvenci mitochondriálních genů COI a COB a fragmentační analýza, přinesly stejné výsledky a navzájem se nevylučovaly. Detekce mikrosatelitních úseků odhalila vyšší vnitřní členění u populací pocházejících z Maďarska, než jaké mohlo být detekováno pomocí sekvencí mitochondriálních genů.
- ✦ Shoda byla nalezena i u preference rybího hostitele uvnitř euro-mediteránních kladů A a B. Klad A obsahuje vzorky *L. intestinalis* získané především z odvozených kaprovitých ryb, zatímco u kladu B byla potvrzena preference bazálních kaprovitých. Do kladu B nově zapadal vzorek získaný z řádu *Perciformes*.
- ✦ Populace pocházející z Íránu a Maďarska byly zastoupeny poměrně malým počtem vzorků. Pro upevnění nově nabytých vědomostí o populační struktuře *L. intestinalis*, respektive *D. interrupta*, v těchto oblastech, bude třeba dalšího zkoumání.

## 7. Seznam použité literatury

Anderson, T., J., C.; Haubold, B.; Williams, J., T.; Estrada-Franco, J., G.; Richardson, L.; Mollinedo, R.; Bockarie, M.; Mokili, J.; Mharakurwa, S.; French, N.; Whitworth, J.; Velez, I., D.; Brockman, A., H.; Nosten, F.; Ferreira, M., U.; Day, K., P. (2000) Microsatellite Markers Reveal a Spectrum of Population Structures in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular Biology and Evolution*. 17(10): pp: 1467–1482.

Anderson, T., J., C. (2001) The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. *TRENDS in Parasitology* Vol. 17 No.4, pp: 183-188.

Archie, E., A. and Ezenwa, V., O. (2011) Population genetic structure and history of a generalist parasite infecting multiple sympatric host species. *International Journal for Parasitology* 41 (2011) pp: 89–98.

Avise, J., C.; Arnold, J.; Ball, M., R.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J., E.; Reeb, C., A.; Saunders, N., C. (1987) Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Vol. 18 (1987), pp. 489-522.

Arme, C. (1997) Ligulosis in two cyprinid hosts: *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Helmithologia* 34 pp: 191–196.

Biro P. (1971) *Neogobius fluviatilis* in Lake Balaton - a Ponto-Caspian goby new to the fauna of central Europe. *Journal of Fish Biology*., 4, pp: 249-255.

Blouin, M., S. (2002) Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International Journal for Parasitology* 32 (2002) pp: 527–531.

Bouzig, W.; Lek, S.; Mace M, Ben Hassine OK, Etienne R, Legal L, Loot G (2008a) Genetic diversity of *Ligula intestinalis* (Cestoda: Diphyllbothriidea) based on analysis of inter-simple sequence repeat markers. *Journal of Zoological Systematics Evolutionary Res* 46: pp: 289–296.

Bouزيد W, Štefka J, Hypša V, Lek S, Scholz T, Legal L, Ben Hassine OK, Loot G (2008b) Geography and host specificity: two forces behind the genetic structure of the freshwater fish parasite *Ligula intestinalis* (Cestoda: Diphylobothriidae). *International Journal of Parasitology*, 38, pp: 1465–1479.

Bouزيد, W.; Štefka, J.; Bahir-Sfar, L.; Beerli, P.; Loot, G.; Lek, S.; Haddaoui, N.; Hypša, V.; Scholz, T.; Dkhil-Abbes, T.; Meddour, R.; Hassine, O., K., B (2013) Pathways of cryptic invasion in a fish parasite traced using coalescent analysis and epidemiological survey. *Biological Invasions* (2013) 15, pp: 1907–1923.

Brooks, D.; Hoberg, E., P. (2000) Triage for the biosphere: the need and rationale for taxonomic inventories and phylogenetic studies of parasites. *Comparative Parasitology*, 67, pp: 1–25.

Brown SP, Loot G, Grenfell BT, Gue'gan JF (2002) Host manipulation by *Ligula intestinalis*: accident or adaptation? *Parasitology* 123, pp: 519–529.

Criscione, C., D. and Blouin, M., S. (2004) Live cycles shape parasite evolution: comparative population genetics of salmon trematodes. *Evolution*, 58(1), pp: 198-202.

Criscione, C., D.; Poulin, R.; Blouin, M., S. (2005) Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology* (2005) 14, pp: 2247–2257.

Dubinina, M., N. (1980) Tapeworms (Cestoda, Ligulidae) of the fauna of the USSR. Amerind Publishing Co, New Delhi.

Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematics. Biology* 2003, 52 (5), pp: 696 - 704.

Hoole, D.; Carter, V.; Dufour, S. (2010) *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidea): an ideal fish-metazoan parasite model? *Parasitology*, 137, pp: 425-438. f Cambridge University Press 2010.

Hufbauer, R., A. and Roderick, G., K. (2005) Microevolution in biological control: Mechanisms, patterns, and processes. *Biological Control* 35 (2005) pp: 227–239.

Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J., K (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7 pp: 574–578.

Huyse, T.; Poulin, R. and Théron, A. (2005) Speciation in parasites: a population genetics approach. *TRENDS in Parasitology* Vol.21 No.10 October 2005, pp: 469-475.

Innal, D.; Keskin, N. (2007) Distribution of *Ligula intestinalis* (L.) in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 7, pp: 19-22.

Kennedy, C. R., Shears, P. C. and Shears, J. A. (2001). Long-term dynamics of *Ligula intestinalis* and roach *Rutilus rutilus*: a study of three epizootic cycles over thirty-one years. *Parasitology* 123, pp: 257–269.

Li J, Liao X, Yang H (2000) Molecular characterization of a parasitic tapeworm (*Ligula*) based on DNA sequences from formalin-fixed specimens. *Biochemical Genetics* 38, pp: 309–322.

Li, J. and Liao, X. (2003) The taxonomic status of *Digramma* (Pseudophyllidae: Ligulidae) inferred from DNA sequences. *Journal of Parasitology* 89 pp: 792–799.

Logan, F.J.; Horák, A.; Štefka, J.; Aydogdu, A.; Scholz, T. (2004). The phylogeny of diphyllbothriid tapeworms (Cestoda: Pseudophyllidea) based on ITS-2 rDNA sequences. *Parasitology Research*, 94, pp: 10–15.

Loot, G.; Francisco, P.; Santoul, F.; Lek, S.; Guegan, J.,F. (2001). The three hosts of the *Ligula intestinalis* (Cestoda) life cycle in Lavernose Lacasse gravel pit, France. *Arch. Hydrobiol.* 152, pp: 511–525.

Luo, H.,Y.; Nie, P.;Yao, W., J.; Wang, G., T.; Gao, Q. (2003) Is the genus *Digramma* synonymous to the genus *Ligula* (Cestoda: Pseudophyllidea)? Evidence from ITS and 5'end 28S rDNA sequences. *Parasitology Research* 89, pp: 419–421.

McManus, D., P. and Bowles, J. (1996) Molecular Genetic Approaches to Parasite Identification: Their Value in Diagnostic Parasitology and Systematics. *Internaciolna Journal for Parasitology*. Vol. 26, No. 7, pp 687-704.

de Meeus, T.; Mc Coy, K., D.; Prugnolle, F.; Chevillon, C.; Durand, P.; Hurtrez-Bousse's, S.; Renaud, F. (2007) Population genetics and molecular epidemiology or how to “de´busquer la be^te”. *Infection, Genetics and Evolution* 7, pp: 308–332.

Monis, P., T.; Andrews, R., H.; Santa, C., P. (2001) Molecular biology techniques in parasite ecology. *International Journal for Parasitology* 32, pp: 551–562.

Morgan, D., L. (2003). Distribution and biology of *Galaxias truttaceus* (Galaxiidae) in south-western Australia, including first evidence of parasitism of fishes in Western Australia by *Ligula intestinalis* (Cestoda). *Environmental Biology of Fish* 66, pp: 55–167.

Nieberding, C., M.; Durette-Desset, M., C.; Vanderpoorten, A.; Casanova, J., C.; Ribas, A.; Deffontaine, V.; Feliu, C.; Morand, S.; Libois, R.; Michaux, J., R. (2008) Geography and host biogeography matter for understanding the phylogeography of a parasite. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47, pp: 538 – 554.

Page, R., D., M. (2003) *Tangled Trees: Phylogeny, Cospeciation, and Coevolution*. The University of Chicago Press.

Poulin, R. and Morand, S. (2004) *Parasite Biodiversity*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.

Price, P., W. (1980) *Evolutionary Biology of Parasites*. Princeton, New Jersey, Princeton University Press.

Prugnolle, F.; Liu, H.; de Meeus, T.; Balloux, F. (2005). Population genetics of complex life-cycle parasites: an illustration with trematodes. *International Journal for Parasitology*, 35, pp: 255–263.

Roe, A., D.; Sperling, F., A., H. (2007) Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44, pp: 325–345.

Rosenberg N., A. (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, pp: 137–138.

Singh, B.; Sung, L., K.; Matusop, A.; Radhakrishnan, A.; Shamsul, S., S., G.; Cox-Singh, J.; Thomas, A.; Conway, D., J. (2004) A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *THE LANCET*, Vol 363, pp: 1017-1024.

Susol, E.; Eyre, S. and John, S. (2000) High-Throughput Genotyping of Microsatellite Markers. *SNP and Microsatellite Genotyping: Markers for Genetic Analysis*. Edited by Ali Hajeer, Jane Worthington, and Sally John. Eaton Publishing, Natick, MA, pp: 49-66.

Smothers, J., F.; von Dohlen, C., D.; Smith Jr, L., H.; Spall, R., D. (1994) Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. *Science*, vol. 16;265(5179), pp. 1719-21.

Štefka J.; Gilleard J., S.; Grillo V.; Hypša V. (2007) Isolation and characterization of microsatellite loci in the tapeworm *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidea). *Molecular Ecology Notes* 7, pp: 794–796.

Štefka J.; Hypša V.; Scholz T. (2009) Interplay of host specificity and biogeography in the population structure of a cosmopolitan endoparasite: microsatellite study of *Ligula intestinalis* (Cestoda). *Molecular Ecology* 18, pp: 1187–1206.

Wandeler, P.; Hoeck, P., E., A. and Keller L., F. (2007) Back to the future: museum specimens in population genetics. *TRENDS in Ecology and Evolution* Vol. 22 No.12, , pp: 634-642



Wolf, K.; Markwin, M., E. (1984) Biology Contravenes Taxonomy in the Myxozoa: New Discoveries Show Alternation of Invertebrate and Vertebrate Hosts. *Science*: Vol. 225, no. 4669, pp. 1449-1452.

Zelmer, D., A (1997) An evolutionary of parasitism. *International Journal for Parasitology*, 28, pp: 531-533.

## 8. Přílohy

Výčet převzatých vzorků *Ligula intestinalis* ze studie Bouzid et al. (2013) použitých pro fylogenetické analýzy. Uveden geografický původ, hostitel a přístupový kód v databázi GenBank.

Země původu	Lokalita sběru	Hostitelský druh	Značení	Počet vzorků analyzovaných pro oba geny	GenBank kód	
					COB	COI
Alžírsko	Keddara reservoir	<i>Barbus</i> sp.	ALG1Bsp	4 (1, 2, 4)	JQ279107/44- 45/48	JQ279072
	Taksebt reservoir	<i>Barbus setivimensis</i>	ALG2Bs	3 (2, 3)	JQ279108/46- 47	JQ279070- 71/73
	Oued Hamiz	<i>Barbus</i> sp.	ALG3Bsp	10 (1, 4, 5, 7, 8, 9)	JQ279106/09- 12/14-15 [EU241143- 45]	JQ279068/74 -79 [EU241219- 21]
	Goodga river	<i>Galaxias truttaceus</i> (Osmeriformes)	AU Gt	1 (10)	[EU241146]	[EU241222]
Austrálie	Moates lake	<i>Galaxias maculatus</i> (Osmeriformes)	AU Gm	1 (11)	[EU241147]	[EU241223]
	Dalpec lake	<i>Coulsius plumbeus</i>	CA Cp	1 (14)	[EU241152]	[EU241228]
Kanada	Dumbo lake	<i>Semotilus atromaculatus</i>	CA Sa	4 (12, 13, 15, 16)	[EU241148- 49/50-51]	[EU241224- 27]
	Dong Tink lake	<i>Hemiculter bleekeri</i>	CN Hb	2 (18)	[EU241153- 54]	[EU241229- 30]
Čína	Zhanghe reservoir	<i>Neosalanx taihuensis</i> (Osmeriformes)	CN Nt	3 (17, 19)	[EU241155- 57]	[EU241232/ 34/36]
Česká Republika	Vodní nádrž Lipno	<i>Rutilus rutilus</i>	CZ1Rr	4 (22, 26, 35, 36)	[EU241159/65 /69/70]	[EU2412477 -81]
	Vodní nádrž Želivka		CZ2Rr	1 (37)	[EU241178]	[EU241282]
		<i>Alburnus alburnus</i>	CZ2Aa	1 (34)	[EU241177]	[EU241246]
	Nové Mlýny	<i>Abramis brama</i>	CZ3Ab	5 (27, 28, 29, 30, 31)	[EU241166/79 /80/82/84]	[EU241263- 70/83-86]
	Rybníky Záhlinice a Tlumačov	<i>Podiceps cristatus</i>	CZ4Pc	6 (20, 21, 23, 32)	[EU241164/67 /68/74/87/90/9 1]	[EU241244- 45/62/87/93]
		<i>Mergus merganser</i>	CZ4Mm	1 (24)	[EU241193]	[EU241239]

	Rybník Továčov	<i>Podiceps cristatus</i>	CZ5Pc	1 (33)	[EU241186]	[EU241288]
Estonsko	Jezero Peipsi	<i>Abramis brama</i>	EE Ab	5 (24, 43, 44, 45, 46)	JQ279121-22 [EU241160/92/95]	JQ279085-86 [EU241275-76/94]
Etiopie	Jezero Tana	<i>Barbus humilis</i>	ET Bh	1 (47)	[EU241197]	[EU241295]
		<i>Barbus tsanensis</i>	ET Bt	1 (48)	[EU241196]	[EU241296]
		<i>Barbus intermedius</i>	ET Bi	1 (49)	[EU241198]	[EU241297]
Francie	Jezera Pareloup a Vioulou	<i>Alburnus alburnus</i>	FR1Aa	3 (21, 52, 53)	JQ279123-24 [EU241163/99]	JQ279087-88 [EU241258/60]
		<i>Rutilus rutilus</i>	FR1Rr	5 (21, 41, 50)	JQ279117/19/42 [E]	JQ279081/83-84/104
	Jezera Muret a Lavernose		FR2Rr	2 (41, 51)	JQ279118/43	JQ279082/105
		<i>Blicca bjoerkna</i>	FR2Bb	1 (51)	[EU241201]	[EU241259]
	Nádrž Créteil	<i>Rutilus rutilus</i>	FR3Rr	5 (50, 54, 55, 56, 57, 58)	JQ279125-26 [EU241172/73/200]	JQ279089/90 [EU241261/99/300, EU636655]
Německo	Müggelsee	<i>Rutilus rutilus</i>	DE Rr	6 (34, 38, 39, 40, 41, 42)	JQ279116/20 [EU24185/202-04]]	JQ279080/84 [EU241273-74/301/02]
Velká Británie	Skotsko, řeka Gryfe	<i>Rutilus rutilus</i>	GB Rr	1 (59)	[EU241205]	[EU241303]
		<i>Phoxinus phoxinus</i>	GB Pp	1 (60)	[EU241175]	[EU241304]
	Wales, Aberystwyth	<i>Phoxinus phoxinus</i>	GB Pp	1 (44)	[EU241161]	[EU241247]
Irsko	Jezero Lough Neagh	<i>Rutilus rutilus</i>	IE Rr	3 (41, 61, 64)	[EU241117/206/07]	[EU241248-50]
		<i>Gobio gobio</i>	IE Gg	3 (20, 62, 63)	[EU241188/89/208]	[EU241290/305]
Polsko	Nádrž Wloclawski	<i>Rhodeus amarus</i>	PL Ra	1 (25)	[EU241194]	[EU241289/92]
Rusko	Jezero Khanka, Far East	<i>Hemiculter lucidus</i>	RU Hl	1 (65)	[EU241209]	[EU241311]
	Nádrž Rybinsk	<i>Abramis brama</i>	RU Ab	5 (44, 66, 67, 68, 69)	[EU241158/210/11/12/13]	[EU241251-56/58/309-10]
Tunis	Nádrž Sidi Salem	<i>Rutilus rubilio</i>	TN1Rb	8 (70, 71, 73, 81)	JQ279127-29 [EU241214-17]	JQ279091-92 [EU241271/312-15]
		<i>Scardinius</i>	TN1Se	5 (21, 72, 73,	JQ279130/32/	JQ279093/95

		<i>erythrophthalmus</i>		80)	34/41 [EU241162]	/97/103 [EU241272]
		<i>Barbus callensis</i>	-	-	-	-
		<i>Pseudophoxinus callensis</i>	-	-	-	-
	Nádrž Nebhana	<i>Rutilus rubilio</i>	TN2Rb	2 (74, 75)	JQ279135-36	JQ279098-99
		<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	TN2Se	2 (73)	JQ279131/33	JQ279094/96
		<i>Barbus callensis</i>	-	-	-	-
		<i>Pseudophoxinus callensis</i>	-	-	-	-
	Oued Joumine	<i>Pseudophoxinus callensis</i>	TN3Psc	2 (76, 77)	JQ279137/38	JQ279100-01
	Oued Remel	<i>Pseudophoxinus callensis</i>	TN4Psc	2 (78, 79)	JQ279139/40	JQ279102
Ukrajina	Řeka Dniester	<i>Carassius carassius</i>	UA Cc	1 (83)	[EU241218]	[EU241238]
		<i>Rutilus rutilus</i>	UA Rr	1 (84)	[EU241176]	[EU241317]
		<i>Alburnus alburnus</i>	UA Aa	1 (82)	[EU241181]	[EU241316]
Celkem				199 (84)		

Výčet populací převzatých z Štefka et al. (2009) použitých při mikrosatelitních analýzách.

Číslo populace, kód (zkratka země původu/zkratka hostitele), počet jedinců.

Populace	Kód	Počet jedinců
1	FR1Rr	23
2	FR1Aa	5
3	FR2Rr	26
4	FR2Bb	2
5	FR3Rr	11
6	FR4Rr	36
7	CZ1Rr	9
8	CZ3Ab	14
9	CZ2Aa	17
10	CZ2Rr	18
11	DE Rr	6
12	RU Ab	9

13	GB Rr	1
14	GB Pp	2
15	IE Rr	3
16	IE Gg	3
17	EE Ab	5
18	UA Rr	1
19	UA Aa	1
20	UA Cc	1
21	TN Rb	48
22	TN Se	5
23	RU Hl	1
24	CN Hb	2
25	AL Bc	10
26	CN Nt	21
27	AU Gm	5
28	AU Gt	4
29	ET Bh	7
30	ET Bt	7
31	ET Bi	7
32	ET Bb	1
33	CA Cp	1
34	CA Sa	26
celkem		338