

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra genetiky a šlechtění**



**Variabilita genů mt-COX1 a mt-Cytb u parazitických  
hlístic *Trichuris discolor* a *Trichuris ovis* v České republice**

**Diplomová práce**

**Bc. Nikola Puldová**

**Reprodukční biotechnologie**

**doc. Dr. Ing. Pavel Vejl**

**© 2018 ČZU v Praze**

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Variabilita genů mt-COX1 a mt-Cytb u parazitických hlístic *Trichuris discolor* a *Trichuris ovis* v České republice" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 4. 2018

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za velkou pomoc, cenné rady, a hlavně za obrovskou ochotu a vstřícnost při odborném vedení mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala kolektivu z Katedry zoologie a rybářství FAPPZ ČZU v Praze za poskytnutý biologický materiál.

# Variabilita genů mt-COX1 a mt-Cytb u parazitických hlístic *Trichuris discolor* a *Trichuris ovis* v České republice

## Souhrn

Po mnoho let byli zástupci rodu *Trichuris* popisováni pouze na základě relativně malého rozsahu morfologických i biometrických znaků. Nicméně toto hodnocení se ukázalo jako nedostatečné u blízce příbuzných druhů. Tato diplomová práce se zabývá výzkumem sekvenčních polymorfismů mitochondriálních genů mt-COX1 a mt-Cytb a jejich využitím ve fylogenetických analýzách druhů *Trichuris discolor* a *Trichuris ovis* z České republiky. Analyzováno bylo celkem 18 zástupců druhu *T. discolor* a 18 zástupců *T. ovis*, ze kterých byla izolována genomická DNA pomocí kitu NucleoSpin® Tissue Kit. Byly navrženy druhově specifické primerové páry, které umožnily spolehlivou amplifikaci majoritních částí obou studovaných mitochondriálních genů. Pomocí ampikonové sekvenace byly u všech hodnocených jedinců získány reprezentativní sekvence, které posloužily k odvození haplotypů. Haplotypy byly odvozeny rovněž z publikovaných sekvencí v databázi NCBI a získaná data byla zpracována formou tří datasetů genu mt-COX1 a dvou datasetů genu mt-Cytb. Pro porovnání sekvencí byl použit program MAFFT version 7. Pro výběr optimálního substitučního modelu byl použit program jModelTest 2.1.10 v20160303. Metoda NNI (Nearest Neighbor Interchange) byla použita pro nalezení optimální topologie fylogenetických stromů. Z fylogenetické analýzy vyplývá, že druhy *T. discolor* a *T. ovis* jsou sesterské. Byla potvrzena velká genetická vzdálenost subpopulací *T. discolor* a *T. ovis* z České republiky oproti populacím z Asie. U obou mitochondriálních genů byla zjištěna vyšší haplotypová variabilita ve srovnání s publikovanou variabilitou jaderných rDNA genů. V české populaci *T. discolor* a *T. ovis* nebyla prokázána závislost výskytu haplotypů na hostitelských druzích. Výskyt endosymbiotické bakterie rodu *Wolbachia* nebyl pomocí molekulárních metod prokázán u *T. discolor* ani u *T. ovis*. Teoreticky možná partenogeneze *T. discolor* nebude zřejmě způsobena přítomností bakterií rodu *Wolbachia*.

Diplomová práce vznikla za podpory projektů číslo 20152021 a 20182005 grantové agentury CIGA ČZU v Praze.

**Klíčová slova:** *Trichuris discolor*, *Trichuris ovis*, mt-COX1, mt-Cytb, fylogeneze, partenogeneze, *Wolbachia*

# Variability of mt-COX1 and mt-Cytb genes in parasitic nematodes *Trichuris discolor* and *Trichuris ovis* in the Czech Republic

## Summary

For many years, *Trichuris* species have been described only with a relatively narrow range of both morphological and biometrical features. Moreover, there has been insufficient discrimination between closely related species. This diploma thesis is conducted as a research of nucleotide polymorphisms of mitochondrial genes COX1 and Cytb, respectively and their use in phylogenetic analysis of *Trichuris discolor* and *Trichuris ovis* from the Czech Republic. A total of 18 individuals of *T. discolor* and 18 individuals of *T. ovis* were analyzed. Genomic DNA was isolated using NucleoSpin® Tissue Kit. Species-specific primers were designed. These species-specific primers allowed to amplify a major parts of those two mitochondrial genes. Using amplicon sequencing, representative sequences were obtained. These sequences served for evaluation of haplotypes. Haplotypes were also obtained from published sequences in the NCBI database. Obtained data has been processed into three datasets for COX1 gene and two datasets for Cytb gene. The MAFFT version 7 was used to compare the sequences. JModelTest 2.1.10 v20160303 was used to select the optimal substitution model. The Nearest Neighbor Interchange (NNI) method was used to find optimal phylogenetic trees. Phylogenetic analysis resulted that *T. discolor* and *T. ovis* are sister species. Also large genetic distance between *T. discolor* and *T. ovis* subpopulations from the Czech Republic was confirmed in comparison with subpopulations form Asia. In both mitochondrial genes, higher degree of variability was detected compared to the variability of nuclear rDNA genes. In populations of *T. discolor* and *T. ovis* from the Czech Republic the influence of the host was not proved. The presence of bacterial endosymbiont *Wolbachia* was also not proved in *T. discolor* nor *T. ovis*. Apparently, the partnerogenesis in *T. discolor* may not be caused due to the presence of bacterial endosymbiont *Wolbachia*

This study has been funded by the Grant of Internal Grant Competition of Czech University of Life Sciences in Prague, No. 20152021 and 20182005.

**Keywords:** *Trichuris discolor*, *Trichuris ovis*, mt-COX1, mt-Cytb, phylogenesis, parthenogenesis, *Wolbachia*

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Obecná parazitologie .....</b>	<b>3</b>
3.1.1	Parazitologie .....	3
3.1.2	Parazitismus .....	3
3.1.3	Rozdělení parazitů .....	4
<b>3.2</b>	<b>Helminti .....</b>	<b>4</b>
<b>3.3</b>	<b>Rod <i>Trichuris</i>.....</b>	<b>5</b>
3.3.1	Morfologie a anatomie.....	6
3.3.2	Vývojový cyklus .....	7
<b>3.4</b>	<b>Diagnostika.....</b>	<b>9</b>
3.4.1	Vyšetření post mortem.....	9
3.4.2	Koprologické metody .....	10
3.4.2.1	Makroskopická diagnostika.....	10
3.4.2.2	Mikroskopická diagnostika .....	10
3.4.2.2.1	Nativní preparát .....	10
3.4.2.2.2	Koncentrační metody.....	11
3.4.2.2.3	McMasterova kvantifikační metoda .....	12
3.4.2.2.4	Tlustý nátěr dle Kato .....	12
3.4.3	Morfologická diagnostika .....	12
<b>3.5</b>	<b>Systematika .....</b>	<b>13</b>
3.5.1	Taxonomické zařazení .....	14
<b>3.6</b>	<b>Fylogenetika .....</b>	<b>15</b>
3.6.1	Molekulární fylogenetika.....	16
3.6.2	Metody konstrukce fylogenetického stromu.....	17
<b>3.7</b>	<b>Metody molekulární biologie .....</b>	<b>18</b>
3.7.1	Izolace nukleových kyselin.....	18
3.7.2	PCR (Polymerase Chain Reaction).....	19
3.7.3	Gelová elektroforéza.....	20
3.7.4	Sekvenování DNA .....	21
<b>3.8</b>	<b>DNA barcoding .....</b>	<b>23</b>
<b>3.9</b>	<b>Mitochondrie a jejich genom .....</b>	<b>24</b>
3.9.1	Mitochondriální DNA.....	24



3.10	Endosymbiotické bakterie rodu <i>Wolbachia</i> .....	26
4	Materiál a metody .....	28
4.1	Biologický materiál – <i>T. discolor</i> a <i>T. ovis</i> .....	28
4.1.1	Původ biologického materiálu .....	28
4.1.2	Analyzované druhy rodu <i>Trichuris</i> a jejich hostitelé.....	28
4.2	Biologický materiál – <i>Drosophila melanogaster</i> .....	28
4.2.1	Původ biologického materiálu .....	28
4.3	Izolace genomické DNA .....	29
4.4	Navrhování specifických primerů pro amplifikaci mitochondriálních genů mt-COX1 a mt-Cytb u <i>T. ovis</i> a <i>T. discolor</i> .....	29
4.5	Podmínky amplifikace fragmentů genů mt-COX1 a mt-Cytb .....	30
4.6	Sekvenační analýza amplikonů genů mt-COX1 a mt-Cytb.....	31
4.6.1	Čištění amplikonů pomocí separace v agarózovém gelu.....	31
4.6.2	Sekvenační reakce.....	31
4.6.3	Purifikace produktů sekvenační reakce .....	32
4.6.4	Podmínky fragmentační analýzy při stanovení sekvencí.....	32
4.6.5	Nalezení konsenzu sekvencí .....	32
4.7	Fylogenetická analýza rodu <i>Trichuris</i> provedená na základě částečných sekvencí genů mt-COX1 a mt-Cytb .....	33
4.7.1	Volba datasetů u studovaných genů a nalezení haplotypů .....	33
4.7.2	Volba optimálního modelu pro fylogenetické analýzy.....	33
4.8	PCR detekce přítomnosti endosymbiotických bakterií rodu <i>Wolbachia</i> ... ..	34
5	Výsledky .....	35
5.1	Hodnocení sekvencí amplikonů genů mt-COX1 a mt-Cytb .....	35
5.1.1	Specifita navržených primerů a charakteristika získaných amplikonů.....	35
5.1.2	Datasety a oblasti studovaných genů použité jako haplotypy .....	35
5.2	Fylogenetická analýza zpracovaná na základě sekvenčních polymorfismů mt-COX1 a mt-Cytb .....	47
5.2.1	Volba optimálních modelů pro fylogenetickou analýzu.....	47
5.2.2	Fylogenetická analýza.....	48
5.3	Hodnocení výskytu endosymbiotických bakterií rodu <i>Wolbachia</i> .....	54
6	Diskuze .....	56
6.1	Sekvenční polymorfismus mitochondriálních genů mt-COX1 a mt-Cytb .....	57
6.1.1	Volba biologického materiálu.....	57
6.1.2	Izolace DNA .....	57
6.1.3	Optimalizace PCR markerů .....	58
6.1.4	Podmínky PCR amplifikace a sekvenace .....	59
6.1.5	Fylogenetická analýza.....	60

<b>6.2</b>	<b>Molekulární detekce endosymbiotických bakterií rodu <i>Wolbachia</i>.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>68</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>79</b>

# 1 Úvod

Helminți tvoří rozsáhlou skupinu bezobratlých živočichů s kosmopolitním rozšířením na suchozemských i vodních biotopech, kde se žijí převážně parazitickým způsobem života.

Ve světě jsou tyto cizopasní hlísti jednou z nejrozšířenějších skupin parazitů lidí i zvířat, u kterých způsobují závažná onemocnění helmintárního původu, tzv. helmintózy. Největší problém představují především v rozvojových zemích tropického a subtropického pásu Asie, Afriky a Jižní Ameriky, kde je jejich výskyt zapříčiněn zejména nízkou úrovní hygieny, omezeným možnostem lékařské péče nebo špatným stavem zdrojů pitné vody (Čermáková et al., 2007; Hedley a Wani, 2015).

Ač jejich prevalence není tak vysoká, helmintózy jsou běžné i v mírném pásu a v rozvinutých zemích Evropy. V našich podmínkách jsou to především onemocnění trávicího traktu, způsobená gastrointestinálními hlísty, jež mají negativní vliv na zdravotní stav hospodářských i volně žijících zvířat a mohou tak značně ovlivňovat ekonomiku hospodářských podniků (Auer a Aspöck, 2014).

Dle Brindleyho et al. (2009) trpí helmintózami, nebo jsou jimi v přímém ohrožení, více než dvě miliardy světové populace, přičemž největší procento je napadeno právě gastrointestinálními hlísty (Cantacessi et al., 2012). Ti jsou zároveň nejrozšířenější skupinou parazitů u domácích, ale i volně žijících přežvýkavců (Kabešová, 2004; Chroust, 2006; Charlier et al., 2015).

Helmintózy tak celosvětově představují jeden z největších ekonomických i zdravotních problémů, kdy vážné ekonomické ztráty plynou především z parazitóz hospodářsky důležitých zvířat (Cantacessi et al., 2012).

Některé druhy helmintů se v našich klimatických podmínkách vyskytují přirozeně (tzv. autochtonní výskyt), jiné jsou do Evropy zavlčeny z tropických oblastí vlivem současné globalizace a s rozvojem cestovního ruchu (Chroust, 2006; Auer a Aspöck, 2014)

Mezi helminty patří cizopasní zástupci kmenů Plathelminthes (ploší hlísti), kteří zahrnují třídy Trematoda (motolice), Monogenea (jednorodí) a Cestoda (tasemnice); Nematelminthes (oblí hlísti) a Acanthocephala (vrtejši). Navzdory podobné vnější morfologii se jedná o taxonomicky nepříbuzné organismy. V minulosti však byla jejich identifikace založena právě na morfologických znacích, které ovšem nejsou vždy spolehlivé ke správnému určení druhu. Za účelem zvýšení spolehlivosti taxonomické determinace se v současnosti využívají molekulární a cytogenetické metody, které je vhodné kombinovat s výsledky morfologických studií.

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem diplomové práce je potvrdit nebo vyvrátit následující vědecké hypotézy:

- Mutační rychlost mitochondriálního genomu je vyšší oproti jadernému genomu a v průběhu evoluce dochází k sekvenčním změnám, které korelují s mezidruhovou i vnitrodruhovou variabilitou hlístic rodu *Trichuris* a které koresponduje s genetickým driftem hostitelů.
- Přestože druhy *Trichuris discolor* a *Trichuris ovis* jsou v České republice multihostitelské, nejsou sekvenční polymorfismy genů mt-COX1 a mt-Cytb závislé na hostitelském druhu.
- Absence samčích jedinců u *Trichuris discolor* v České republice nemusí být vysvětlována výhradně partenogenezí indukovanou bakteriemi rodu *Wolbachia*.

Z uvedených hypotéz vyplývají následující cíle práce:

- Připravit kolekci izolované DNA z 18 zástupců *Trichuris discolor* a 18 zástupců *Trichuris ovis* pocházejících z různých hostitelů (srnec obecný, jelen evropský, jelen sika, daněk skvrnitý, los evropský, muflon evropský a ovce domácí).
- Pomocí markerů lokalizovaných v oblasti rDNA provést jednoznačné druhové určení u všech hodnocených jedinců.
- Navrhnout druhově specifické primerové páry pro amplifikaci dostatečně velkých fragmentů genů mt-COX1 a mt-Cytb.
- Provést ampikonovou sekvenaci a identifikovat haplotypy s využitím doposud publikovaných sekvencí v mezinárodních nukleotidových databázích.
- Vypracovat fylogenetické studie.
- Optimalizovat molekulární detekci bakterií rodu *Wolbachia* u bezobratlých na modelovém druhu *Drosophila melanogaster* a postup aplikovat u studovaných druhů hlístic.

## **3 Literární rešerše**

### **3.1 Obecná parazitologie**

Dle Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou parazité původci sedmi z deseti nejsledovanějších infekčních onemocnění, a mají tak závažný dopad na zdraví lidí i zvířat (Kořínková, 2006). Nákazy parazitárního původu, tzv. parazitózy provází člověka po celou dobu jeho vývoje a jsou rozšířeny kosmopolitně, avšak riziko vyšší prevalence a ohrožení zdraví představují zejména v chudých oblastech teplého klimatu (Čermáková et al., 2007).

Pozornost parazitárním nákazám je třeba věnovat také v chovech s intenzivní živočišnou výrobou, kde bývá vysoká koncentrace zvířat na relativně malou plochu a může tak docházet k vyššímu výskytu přenosu parazitů (Prantlová-Rašková a Wagnerová, 2013). Značné riziko představuje také mezidruhový přenos, zejména díky pastevnímu způsobu chovu, kdy dochází ke kontaktu s ostatními zvířaty nebo volně žijícími populacemi divoké zvěře (Chroust, 2006). Je proto důležité dodržovat zootechnická opatření, pravidelně sledovat zdravotní stav chovaných zvířat a provádět potřebná antiparazitární ošetření.

Nezanedbatelné nejsou ani tzv. zoonózy neboli nákazy, které jsou schopny přenosu ze zvířat na člověka. Přenos infekce ze zvířete je způsoben buď přímým kontaktem, nebo nepřímým přenosem skrz vektorové organismy, kterými bývá zejména hmyz (CDC, 2017).

#### **3.1.1 Parazitologie**

Parazitologie je věda zabývající se nejen studiem cizopasných organismů nebo jejich vztahy k hostiteli a prostředí, ale také chorobami, které způsobují nebo metodami ochrany a prevence proti nim (Kořínková, 2006). Díky zavedení molekulárních a genetických metod, patří v současnosti mezi rychle se rozvíjející biologické disciplíny. Parazitologie se dále dělí do oborů dle systematického zařazení zkoumaného parazita (Volf a Horák, 2007).

#### **3.1.2 Parazitismus**

Parazitismus je v přírodě velmi rozšířeným a složitým biologickým jevem, který hraje důležitou roli v evoluci a pomáhá udržovat ekologickou rovnováhu v ekosystému (Ryšavý et al., 1989; Kořínková, 2006). Jako parazitismus označujeme koexistenci dvou a více organismů, z nichž alespoň jeden toho druhého určitým způsobem poškozují a čerpá z něj ve svůj prospěch (Kořínková, 2006). Volf a Horák (2007) charakterizují parazita jako živočicha, který se po celý svůj život (trvalý parazit) nebo po určitou část vývoje (dočasný parazit)

vyskytuje uvnitř nebo na těle jiného organismu – tzv. hostitele, živí se na jeho úkor a je na něm závislý. Hostitel mu poskytuje ochranné prostředí a potřebné živiny pro vývoj a rozmnožování, přičemž je sám přítomností parazita poškozován (Horák a Scholz, 1998; Čermáková et al., 2009). Parazité mohou hostiteli škodit jednak mechanicky, kdy svou přítomností narušují funkci napadených orgánů, případně toxickým účinkem produkty látkové výměny či jedovatými toxiny, sloužící k ochraně parazita. Míra poškození je tedy různá, od asymptomatických latentních infekcí až po letální následky patogenního působení.

### **3.1.3 Rozdělení parazitů**

Parazity lze rozdělovat různými způsoby. Ryšavý et al. (1989) je třídí dle taxonomické příbuznosti do tří systematických skupin bezobratlých živočichů na prvoky (Protozoa), helminty a členovce (Arthropoda). Parazité se vyznačují vesměs složitým vývojovým cyklem a během života prodělají několik vývojových stádií, tzv. životních forem, které se od sebe liší v různých fázích ontogeneze (Čermáková et al., 2009). Z hlediska životních cyklů lze cizopasně organismy dělit na monoxenní neboli jednohostitelské a heteroxenní, kteří během vývoje využívají více hostitelů. Podle lokalizace na hostiteli se parazité dělí na vnější ektoparazity, kteří žijí na povrchu těla, a vnitřní endoparazity, vyskytující se ve vnitřních orgánech hostitele. Endoparazité se dále člení na intracelulární (vnitrobuněčné) a extracelulární, kteří osidlují prostory mezi buňkami nebo tělní dutiny (Volf a Horák, 2007). Jinou možností rozdělení je dle vztahu k orgánovým soustavám – jsou to skupiny cizopasníků střevních (gastrointestinální), krevních (hematotropní), tkáňových, dutinových (kavitální) a kožních (dermatotropní) (Kořínková, 2006; Kořístek, 2015).

## **3.2 Helminti**

Pod pojmem helmint se rozumí mnohobuněčný bezobratlý živočich, který alespoň v jedné fázi ontogenetického vývoje parazituje v obratlovcích.

Na parazitický způsob života jsou adaptováni v podobě přichycovacích orgánů a pohlavní soustavy, která zabezpečuje vysokou reprodukční schopnost. Dalším společným znakem helmintů je protáhlé, bilaterálně souměrné tělo a kožně svalový vak, který umožňuje pohyb (Horák a Scholz, 1998; Volf a Horák, 2007).

Vývojový cyklus helmintů je přímý nebo nepřímý, dle čehož je dělíme na geohelminty a biohelminty. U geohelmintů probíhá vývoj bez mezihostitele, kdy je definitivní hostitel infikován přímou ingescí vajíček či larev nebo jejich aktivním průnikem do organismu z

vnějšího prostředí. Oproti tomu ke složitému životnímu cyklu biohelmintů je krom definitivního hostitele, nezbytný další živočich, ve kterém probíhá larvální vývoj (Horák a Scholz, 1998).

Helminty lze podle Horáka a Scholze (1998) dále rozdělit na dvě skupiny dle toho, kde se vyskytují – v dutinách či dutých orgánech (tzv. coelozoičtí parazité) nebo v tkáních (histozoičtí parazité).

Dospělí jedinci parazitují nejčastěji ve střevech obratlovců, ale mohou napadat i jiné orgány (játra, plíce, cévní nebo nervovou soustavu aj.), přičemž každý druh má přesně určenou lokalizaci. Zde mechanicky poškozují tkáň hostitelského organismu a ochuzují jej o živiny (Hedley a Wani, 2015).

### 3.3 Rod *Trichuris*

*Trichuris* neboli tenkohlavec je rod kosmopolitně rozšířených endoparazitických oblič hlístů, spadajících do čeledi Trichuridae. Onemocnění, které tyto parazité způsobují, se nazývá trichurióza, přičemž orgánovým místem výskytu bývá obvykle slepé a tlusté střevo. Trichurióza je parazitární onemocnění způsobující zdravotní problémy lidí i zvířat a má tak významný socioekonomický dopad po celém světě (Zainab a Khan, 2016). Hostitelé se zpravidla infikují alimentárně, požitím znečištěné vody nebo potravy kontaminované vajíčky s infekční larvou.

Penetrace střevní stěny larvou a dospělými jedinci způsobuje podráždění s krvácením. Ač většina případů napadení tenkohlavcem vyvolá latentní (asymptomatickou) parazitární infekci bez zjevných klinických projevů, přesto tak ovlivňuje parametry užitkovosti u napadených zvířat (Koudela a Russ, 2002; Hedley a Wani, 2015). Až masivní infekce, vyvolaná více jak pěti sty dospělci (Kaufmann, 1996), může způsobit závažné zdravotní komplikace, jako jsou průjemy, záněty střev, vznik vředů, silné krvácení, anémie, hubnutí a dehydratace. Ne tak běžné, ale možné jsou i úhyny, zejména u mláďat (Taylor et al., 2007; Zainab a Khan, 2016).

Prevalence nákazy trichuriózou se v různých regionech liší v závislosti na vlhkosti a teplotě, avšak v endemických oblastech autoři udávají i více než 50% zamoření hospodářských zvířat (Nath et al., 2011; Salaba et al., 2013; Gul a Tak, 2016). Odhadovaná prevalence u lidí je až 10 % světové populace (Liu et al., 2012a; Nejsun et al., 2012; CDC, 2013).

V Evropě se prevalence pohybuje v širokém rozmezí od 41,8 % do 100 % u malých přežvýkavců, případně 5 - 100 % v populacích jelenů (Rehbein et al., 1996). V České

republiky byla zaznamenána míra nákazy tenkohlavcem v rozpětí od 12 do 41,6 % (Makovcová et al., 2008; Kudrnáčová a Langrová, 2012).

Rod *Trichuris* čítá několik druhů veterinárního a lékařského významu, jako jsou *Trichuris discolor*, *Trichuris globulosa* nebo *Trichuris ovis* u přežvýkavců, *Trichuris vulpis* u psovitéch šelem, *Trichuris suis* u prasat nebo *Trichuris trichiura*, parazitující v lidském hostiteli. Některá takto infikovaná zvířata mohou být nakažlivá i pro člověka, neboť u druhů *T. vulpis* a *T. suis* byl prokázán zoonotický potenciál (Dunn et al., 2002; Nejsun et al., 2012). Tenkohlavce lze tedy nalézt u širokého spektra hostitelů, přičemž je značně rozšířený především u domácích a divokých přežvýkavců (Salaba et al., 2013; Vejl et al., 2017).

### 3.3.1 Morfologie a anatomie

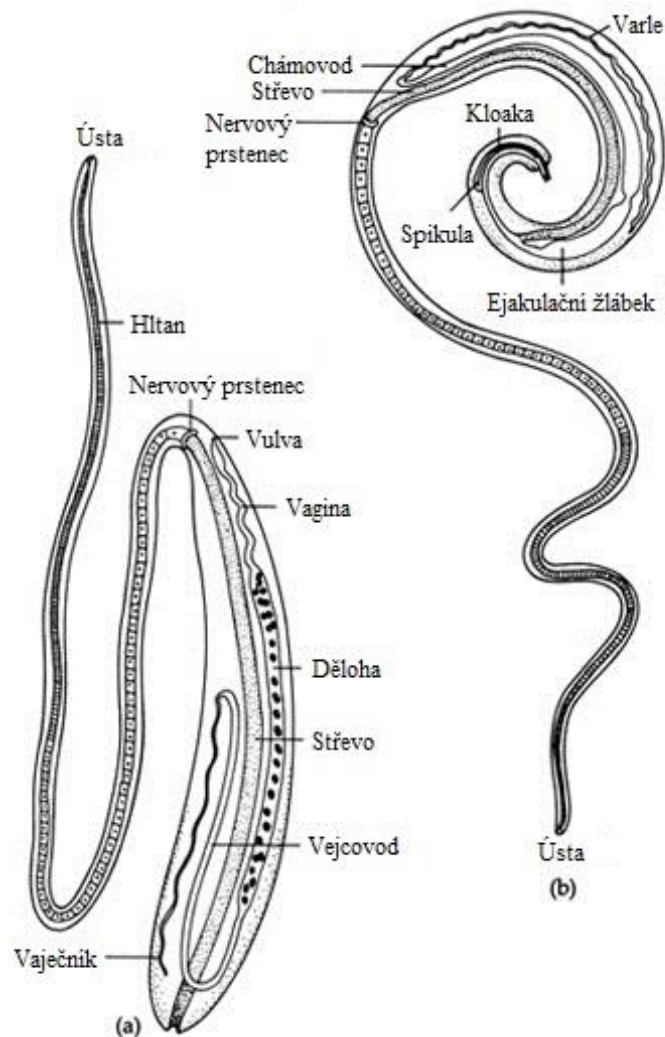
Původcem trichuriózy je bělavý, 3-8 cm dlouhý helmint. Tělo hlísty je válcovitě protáhlé až nitkovité, přičemž se na obou koncích zužuje, a lze jej zřetelně rozdělit na dvě části – hlavovou a ocasní. Přední hlavová část, která je výrazně tenčí a představuje asi dvě třetiny délky (Taylor et al., 2007), je svým koncem zanořena do střevního epitelu formou buněčného syncytia, odkud tenkohlavec získává živiny v podobě krve, střevního obsahu nebo tkáně hostitele (Zainab a Khan, 2016). Široká ocasní část, ve které jsou uloženy ostatní orgány, včetně reprodukčních, volně vyčnívá do lumen střeva, což usnadňuje kopulaci a následnou produkci vajíček (Anderson, 2000; Volf a Horák, 2007). Ocas samic je rovný či mírně zakřivený, zatímco u samců bývá spirálovitě stočený (Taylor et al., 2007; Zainab a Khan, 2016).

Povrch těla tenkohlavců je krytý vícevrstvou kutikulou, která má ochrannou i opornou funkci. Kutikula se nezvětšuje společně s růstem hlísty, a proto je každé vývojové stadium doprovázeno svlékáním a obdobím růstu nové povrchové vrstvy. Pod kutikulou se nachází pokožka, která společně s podélně uloženými hladkými svaly tvoří kožně svalový vak umožňující pohyb. Mezi tělní stěnou a trávicím traktem se nachází tělní dutina vyplněná tekutinou, tzv. pseudocoel. V této dutině, která nahrazuje oběhovou soustavu, jsou volně uloženy pohlavní orgány a úplná trávicí soustava tvořená ústy, hltanem, střevem a řitním otvorem nebo, v případě samců, kloakou. Oviparní rozmnožovací soustava samic je přizpůsobena k vysoké nadprodukci vajíček. Pohlavní orgány obou pohlaví jsou jednoduché, trubicovitého tvaru. U samců se na kaudálním konci v okolí kloaky nachází přídatná pohlavní spikula, chráněná vysouvateľnou pochvou, která může být pokryta trny. Pochva samic je umístěna na přechodu hlavové a ocasní části (Jurášek a Dubinský, 1993; Taylor et al., 2007).



Tenkohlavci jsou odděleného pohlaví (gonochoristé), s výrazným pohlavním dimorfismem, kdy samice bývá zpravidla větší než samec (Volf a Horák, 2007). Základní anatomie a morfologie rodu *Trichuris* je znázorněna na Obr. 1.

Obr. 1: Základní anatomie a morfologie rodu *Trichuris*: (a) samice, (b) samec (upraveno dle Church, 2018).



### 3.3.2 Vývojový cyklus

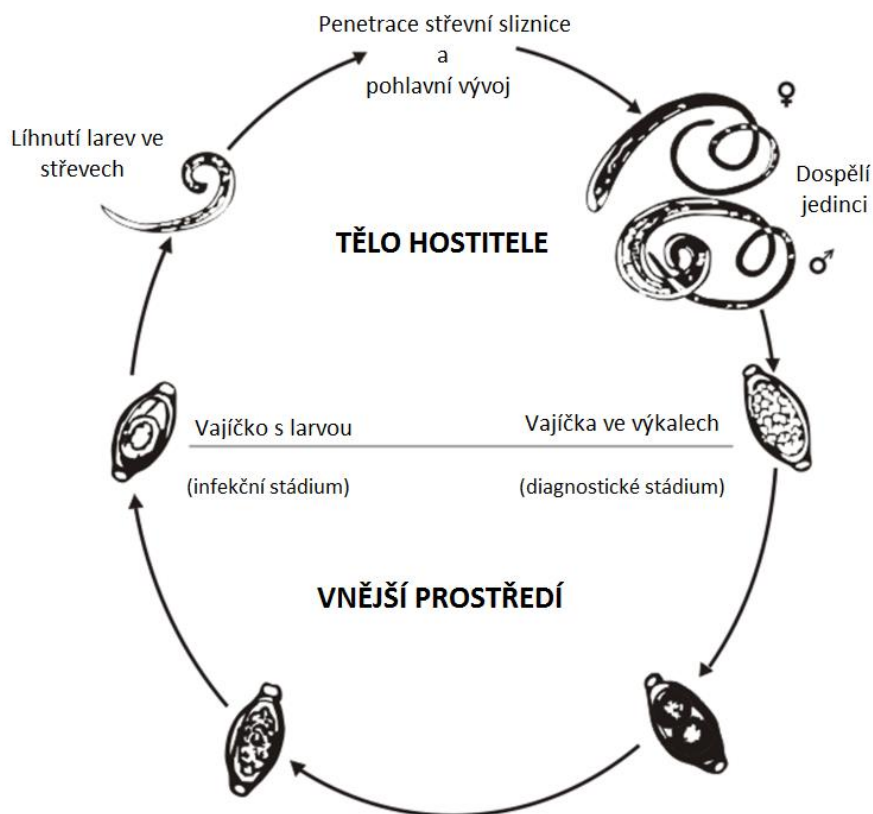
Tenkohlavci jsou monoxenní geohelmintové, takže jejich vývojový cyklus (Obr. 2) je přímý, bez potřeby mezihostitele (Kaufmann, 1996; Koudela a Russ, 2002). Ontogeneze trichurů zahrnuje stádium vajíčka (Obr. 3), larvy a dospělé (Hedley a Wani, 2015).

Vlivem odděleného pohlaví je kopulace samce a samice důležitá pro oplodnění a následnou produkci vajíček. Samice klade denně ve střevech hostitele několik tisíc vajíček,

kteřá posléze odchází z organismu společně s výkaly. Embryonální vývoj probíhá ve vnějším prostředí za dostatečné teploty a vlhkosti, přičemž vajíčka vydrží v půdě životná i několik let. Po minimálně třech týdnech dozrávají ve vajíčku infekční larvy, které mohou následně infikovat dalšího hostitele (Kaufmann, 1996; Koudela a Russ, 2002; Zajac a Conboy, 2006). Nákaza probíhá požitím vajíček s vyvinutou larvou, která je, na rozdíl od většiny helmintů, infekční ihned v prvním stádiu vývoje (Taylor et al., 2007).

Po ingesci dochází v lumen tenkého střeva k rozpuštění pólových zátek vajíčka a uvolnění L1 larev. Ty se následně zavrtávají do žlázek střevní sliznice, kde se několikrát svlékají a vyvíjí do stádia L2 (Zajac a Conboy, 2006; Taylor, 2007). Po dospění do druhého stádia se larvy navrací do lumen dvanáctníku, odkud migrují do svého typického stanoviště ve slepém a tlustém střevě, kde se hlavovou částí zavrtávají do sliznice za tvorby buněčného syncytia (Kaufmann, 1996; Zainab a Khan, 2016). Zde dochází k opětovnému svlékání, přičemž larvy pohlavně dospívají a kopulují. Samičky následně produkují velké množství typických vajíček, která odcházejí společně s trusem a celý cyklus se opakuje (Koudela a Russ, 2002).

Obr. 2: Vývojový cyklus rodu *Trichuris*  
(upraveno, [https://en.wikipedia.org/wiki/Trichuris\\_trichiura](https://en.wikipedia.org/wiki/Trichuris_trichiura)).



Obr. 3: Vajíčko *T. ovis* (Prantlová-Rašková a Wagnerová, 2013).



### 3.4 Diagnostika

Parazitologické vyšetření je prováděno za účelem detekce a identifikace parazitů. Diagnostické metody parazitů se dělí na přímé, nejčastěji za využití mikroskopie, kdy prokazujeme přítomnost vajíček či dospělých jedinců ve vyšetřovaném vzorku; a nepřímé, jako je například výskyt specifických protilátek, antigenů nebo DNA sekvencí (Taylor et al., 2007; Prantlová-Rašková a Wagnerová, 2013).

Diagnóza trichurů, a ostatních střevních parazitů obecně, je obvykle založena na koprologických metodách a následné detekci vajíček či dospělců ve výkalech hostitelského organismu. U jedinců s prolapsem konečníku lze pozorovat dospělé červy přichycené ke sliznici střeva.

#### 3.4.1 Vyšetření post mortem

Parazitologická pitva slouží k postmortální diagnostice parazitóz a současně ke stanovení intenzity napadení jednotlivými parazity. Pomocí této metody zachycujeme makroskopické i mikroskopické vzorky parazitů (SVÚ Jihlava, 2018). Trávicí trakt by měl být z břišní dutiny vyjmut co nejdříve po smrti. Pro vyšetření je nutné od sebe oddělit jednotlivé části trávicího traktu, například zaškrcením, aby se tak předešlo přenosu parazitů z jednoho místa na druhé.

Obsah střev se důkladně promyje proudem vody a procedí skrz síto, které zachytí přítomné parazity (Abakar et al., 2008).

### **3.4.2 Koprologické metody**

Koprologie je soubor diagnostických metod používaných v parazitologii k vyšetření přítomnosti parazitárních infekcí ve výkalech. Jedná se o základní, jednoduchou a levnou formu diagnostiky, která velmi efektivně umožňuje detekci i malého počtu organismů, a je tak hojně využívána ve veterinární i humánní medicíně. Principem je detekce vajíček helmintů, jejich larev či dospělců (Prantlová-Rašková a Wagnerová, 2013). Pro diagnostiku střevních parazitóz se nejčastěji používají dvě metody – tlustý nátěr dle Kato a koncentrační metoda. Připravené preparáty prohlížíme meandrovitým pohybem pod mikroskopem, přičemž nalezené parazity porovnáváme s parazitologickými atlasy a určujeme jejich druh (Votava et al., 2010). Chceme-li upřesnit diagnostiku střevních parazitů, které jsme ve vzorku objevili, můžeme použít specifická barvení (Garcia, 2006).

#### **3.4.2.1 Makroskopická diagnostika**

Makroskopie by měla být běžnou součástí koprologických metod a před každým zpracováním vzorku by se měl provést její makroskopický rozbor (ač se v praxi moc nepoužívá). Makroskopický rozbor výkalů slouží k detekci útvarů, připomínající dospělce nebo jejich části. Také zjištění neobvyklé konzistence, barvy nebo příměsí krve a hlenu ve stolici může indikovat možnou přítomnost gastrointestinálních patogenů v organismu (Garcia, 2006)

#### **3.4.2.2 Mikroskopická diagnostika**

Pro diagnostické metody parazitologických vyšetření je nejdůležitější použití mikroskopických metod. Při orientačním vyhledávání se vzorky prohlížejí do stonásobného zvětšení (Garcia, 2006). Pro podrobnější hledání se využívá zvětšení 200 - 250×. Barvené preparáty a preparáty s použitím imerzního oleje zobrazujeme při zvětšení 1000× (Kaufmann, 1996).

##### **3.4.2.2.1 Nativní preparát**

Tato metoda je vhodná pro rychlé orientační vyšetření trusu. Pomocí nativního preparátu lze ve zředěném vzorku výkalů detekovat přítomnost vajíček a larev helmintů. Malé

množství vzorku rozmícháme s kapkou vody nebo fyziologického roztoku (Garcia, 2006; Votava et al., 2010). Následně tuto suspenzi prohlížíme při zvětšení 50 - 250×. Spolehlivost výsledků této metody ovšem závisí na koncentraci parazitů ve vzorku, která musí být poměrně vysoká. Mezi další nedostatky patří ztížená identifikace parazitů vlivem možného překrytí nečistotami z výkalů nebo neschopnost získu kvantitativních výsledků (Kaufmann, 1996).

#### 3.4.2.2.2 Koncentrační metody

Koncentrační metody jsou nejběžněji využívané pro diagnostiku gastrointestinálních parazitů, přičemž existují dva typy koncentračních metod – sedimentace a flotace. Obě metody jsou navrženy tak, aby oddělily vajíčka helmintů od vzorku výkalů odstředěním, na základě jejich rozdílné měrné hmotnosti. Koncentrační metody navíc umožňují detekci i malého počtu organismů, které tak mohly být přehlédnuty v nativním preparát (Garcia, 2006).

##### Flotační koncentrační metoda

Flotace je rychlá, levná a poměrně nenáročná koprologická metoda, která má široké uplatnění v parazitární diagnostice. Tato metoda je založena na principu, kdy mají vajíčka helmintů nižší hustotu než flotační roztok, kterým jsou obvykle roztoky solí a cukrů o vysoké koncentraci. Volba flotačního roztoku závisí na druhu vyšetřovaného parazita, avšak optimální specifická hmotnost roztoku pro diagnostiku hlístů je mezi 1,10 a 1,30. Vajíčka se poté vlivem gravitace nebo centrifugace oddělí od fekálních nečistot a vyplavou na povrch flotační blanky, odkud mohou být sebrána pro mikroskopické vyhodnocení. Preparáty se ihned prohlíží při zvětšení 40 - 100× (Kaufmann, 1996; Zajac a Conboy, 2012).

##### Sedimentační koncentrační metoda

Sedimentační metody se využívají pro záchyt těžkých vajíček, která díky své specifické hmotnosti nevyplavou k hladině při flotačních metodách (Votava et al., 2010). Zjednodušeným principem sedimentace je promíchání fekálního materiálu s vodou a poté ponechání směsi po určitou dobu v klidu, aby vajíčka mohla klesnout na dno nádoby. Odtud jsou poté odsáta nebo po vylití supernatantu přenesena na sklíčko a vyšetřována při zvětšení 40 - 100× (Zajac a Conboy, 2012). Nevýhodou metody je, že vzniklý sediment může obsahovat více fekálních nečistot (Garcia, 2006). Proces sedimentace je možné urychlit

pomocí centrifugace a různých sedimentačně-koncentračních roztoků (např. formaldehyd, ethylacetát nebo éter) (Garcia, 2006; Prantlová-Rašková a Wagnerová, 2013).

#### 3.4.2.2.3 McMasterova kvantifikační metoda

McMasterova kvantifikační metoda umožňuje výpočet intenzity parazitární infekce jako množství vajíček nebo larev v gramu výkalů. Tato metoda navazuje na flotační metodu, přičemž postup je stejný, avšak povrchová blanka z hladiny se pomocí pipety přenesse do McMasterovy komůrky. Výpočet se provádí vynásobením počtu obsažených vývojových stádií ve čtverci komůrky  $\times 100$  (Kaufmann, 1996).

#### 3.4.2.2.4 Tlustý nátěr dle Kato

Tlustý nátěr dle Kato je standardní vyšetřovací metoda na zjištění přítomnosti vajíček střevních parazitů. Malé množství vzorku stolice rozetřeného na podložním skle překryjeme celofánovou páskou, prosycenou roztokem glycerinu a malachitové zeleni a přitlačíme gumovou zátkou. Takto připravený preparát necháme 30 minut inkubovat při pokojové teplotě, čímž dojde k projasnění a lepšímu zviditelnění objektů. Vzorek prohlížíme při zvětšení 40 - 100 $\times$  (Votava et al., 2010).

### 3.4.3 Morfologická diagnostika

Rozlišení jednotlivých druhů rodu *Trichuris* je téměř výhradně založeno na definovaných morfologických a morfometrických vlastnostech (Robles, 2011; Salaba et al., 2013). Ač je dle Špakulové (1994) většina zástupců velmi dobře popsána, může být jejich morfologická diagnostika značně obtížná z důvodu překrývajících se parametrů jednotlivých znaků, čímž lze od sebe některé druhy hůře odlišit. Identifikace je zároveň ztížena, pokud je morfologie ovlivněna hostitelským druhem a dochází tak k fenotypové plasticitě, neboť není dostatek informací o variabilitě znaků pod vlivem hostitele (Prosser et al., 2013). Z těchto důvodů je tedy žádoucí využít k diagnostice molekulárních metod detekce (Guardone et al., 2013).

V morfologické diagnostice se využívá optický měřič společně se světelným mikroskopem při zvětšení obrazu 40 - 400 $\times$  (Zainab a Khan, 2016). V případě určování nových druhů nebo sledování detailů na kopulačních orgánech lze jako doplňkovou metodu využít skenovací elektronový mikroskop, který umožňuje zobrazení detailních struktur (Torres et al., 2011; Salaba et al., 2013).

Jednotlivé druhy se od sebe odlišují na základě následujících parametrů: celková délka těla, délka hlavové a ocasní části, šířka ve středu hlavové části (v místě spojení jícnu a střeva), maximální šířka ocasní části nebo délka předního úseku jícnu (Salaba et al., 2013). Nicméně hlavní rozdíly jsou ve velikosti a tvaru pohlavních orgánů, přičemž délka a tvar spikuly je považována za hlavní kritérium při identifikaci samců (Vejl et al., 2017). Mezi další morfologické znaky patří šířka kořene spikuly, přítomnost či absence spikulárního kanálu a spikulární pochvy, tvar a umístění trnů na této pochvě či délka a tvar kloaky (Robles, 2011).

Diagnostika u samic je značně náročnější než u samců a je založena primárně na charakteristikách utváření vulvy (Cutillas et al., 2009), přítomnosti kutikulárních trnů v jejím okolí (Torres et al., 2011), případně na vzdálenosti vulvy od děložního svěrače (Callejón et al., 2012; 2015b). Morfologie vulvy je však poměrně variabilní a nemůže tak sloužit jako relevantní znak při určování druhů (Vejl et al., 2017).

V případě diagnostiky vajíček se měří jejich délka a šířka. Oválná vajíčka tenkohlavců jsou žlutohnědá a silnostěnná, s typickým citrónovitým tvarem a dvěma bezbarvými pólovými zátkami, ovšem mezidruhové rozdíly jsou minimální. Z toho důvodu může být jejich morfologická diagnostika náročná a hrozí tak riziko nesprávného určení druhu (Guardone et al., 2013).

### **3.5 Systematika**

Současná systematika neboli taxonomie zkoumá diverzitu organismů a hierarchicky je člení do skupin dle fylogenetických vztahů. Zabývá se jejich poznáváním, tříděním a klasifikací. Každá taxonomická skupina tak seskupuje příbuzné jedince, kteří jsou definováni určitými znaky, jež je odlišují od ostatních taxonomických skupin. Až do 50. let minulého století byli však helminté v rámci starších systémů zařazováni do kmene Vermes (červi), kdy bylo členění založeno převážně na vnější morfologii a studiu vývojových cyklů. Až s nástupem moderních výzkumných metod bylo prokázáno, že tento kmen uměle sdružoval skupiny, které nejsou fylogeneticky příbuzné a helminti tak systematicky patří k několika vzájemně si nepřibuzným liniím Platyhelminthes, Nematohelminthes a Acanthocephala (Špakulová, Holecová et al., 2013).

### 3.5.1 Taxonomické zařazení

Říše: Animalia (živočichové)

Podříše: Eumetazoa (praví mnohobuněční)

Kmen: Nematoda (hlístice)

Třída: Adenophorea

Řád: Enoplida (nitkovci)

Podřád: Trichinellina

Nadčeleď: Trichinelloidea

Čeleď: Trichuridae (tenkohlavcovití)

Rod: *Trichuris* (tenkohlavec)

Gibson et al. (2014)

Zástupce rodu *Trichuris* můžeme nalézt u širokého spektra hostitelů, přičemž v Evropě se hojně vyskytuje několik druhů s veterinárním, ale i lékařským významem, kteří parazitují v tlustém střevě.

Tenkohlavci jsou nejběžnějšími parazity přežvýkavců. U této skupiny živočichů se vyskytují druhy, jako jsou *T. ovis* (tenkohlavec ovčí), *T. globulosa* *T. discolor* nebo *Trichuris skrjabini*, kteří způsobují onemocnění převážně u ovcí, koz, skotu a jiných přežvýkavců, případně *Trichuris capreoli* u jelenů (Kaufmann, 1996; Zajac a Conboy, 2006; Salaba et al., 2013).

Na základě morfologických a biometrických charakteristik však bylo některými autory (Cutillas et al., 1995) zjištěno, že v případě druhů *T. globulosa* a *T. ovis* se pravděpodobně jedná o zástupce jednoho druhu. Tuto domněnku potvrdil Oliveros et al. (2000) pomocí amplifikace a sekvence mezerníků ITS2 ribozomální DNA.

U hlodavců parazitují *Trichuris muris* a *Trichuris arvicolae*, kteří napadají myšovitě, hraboše a křečky (Cutillas et al., 2002; Taylor et al., 2007) nebo *Trichuris myocastoris* (Rylková et al., 2015), nalezený u nutrie. Zajíce a králíky napadá tenkohlavec zvaný *Trichuris leporis*. U divokých i domácích prasat můžeme najít *T. suis* (tenkohlavec prasečí), zatímco kosmopolitně rozšířený *T. trichiura* (tenkohlavec lidský) se nachází u člověka a vyšších



primátů (Taylor et al., 2007). Z dalších evropských druhů je to například *T. vulpis*, parazitující u psů a psovitých šelem (Zajac a Conboy, 2006; Taylor et al., 2007) nebo méně známý *Trichuris felii*, kterého lze najít ve střevech krtků (Ribas a Casanova, 2005).

### 3.6 Fylogenetika

Fylogenetika je systematický obor biologie, který se zabývá studiem evolučního vývoje organismů, stupněm jejich vzájemné příbuznosti a členěním do vyšších taxonů na základě homologních znaků. Všechny organismy jsou tak klasifikovány v závislosti na společných rysech a vlastnostech, které jsou využívány pro odvození evoluční vztahů. Obecným přístupem fylogenetické klasifikace je, že čím více je druh *a* příbuzný druhu *b*, tím je pravděpodobnější, že sdílí společného předka (Hodgman et al., 2009).

Vývoj druhů v procesu evoluce se nazývá fylogeneze. Míra příbuznosti se vyjadřuje různými metodami pomocí souboru určitých znaků, jako jsou morfologické, biologické, ekologické či genetické vlastnosti organismů (Delsuc et al., 2005). Výsledné příbuzenské vztahy a průběh evoluce jednotlivých skupin se schematicky znázorňují do fylogenetického stromu, tvořeného uzly a větvemi. Jednotlivé uzly reprezentují taxonomické jednotky, kdy terminální uzly znázorňují současné taxony a vnitřní uzly představují jejich hypotetické předky. Délky větví mohou odpovídat časové vzdálenosti a počtu evolučních změn. Stromy můžeme rozdělit na zakořeněné (rooted) a nezakořeněné (unrooted). Stromy zakořeněné předpokládají nejstaršího společného předka studovaných taxonů, který reprezentuje kořen stromu. Naopak u nezakořeněných stromů není společný předek definován a vyjadřuje především příbuznost zkoumaných druhů (Hodgman et al., 2009).

V současné době rozlišujeme 3 druhy taxonů – monofyletický, parafyletický a polyfyletický. Monofyletický taxon neboli klád, zahrnuje jednoho společného předka a všechny jeho potomky. Příslušníci monofyletické skupiny jsou charakterizováni jedinečnými znaky, které tento taxon definují. Parafyletický taxon pochází ze společného předka, avšak neobsahuje všechny jeho potomky, neboť z některých se vyvinuly taxony nové, které do původní skupiny neřadíme. Příkladem takového taxonu jsou plazi, kteří v klasickém pojetí nezahrnují ptáky, avšak sdílejí s nimi společného předka. Polyfyletický taxon je skupina založená na nezávisle vzniklé podobnosti, bez existence společného předka. Polyfyletické taxony vznikaly v minulosti, kdy nebyly k dispozici pokročilejší diagnostické metody a organismy byly sdružovány do skupin dle podobnosti fenotypových znaků (tzv. homoplazií),

kteře vznikaly nezávisle u fylogeneticky nepříbuzných druhů vlivem přizpůsobení se na podobný způsob života v určitém prostředí (Flegr, 2009; Špakulová, Holecová et al., 2013)

Pro rekonstrukci vzájemných vztahů mezi jednotlivými skupinami předků a potomků se v současnosti využívá převážně kladistický a evolučně systematický přístup.

U kladistiky je základním předpokladem myšlenka, že se členové jedné skupiny vyvinuli ze společného předka, odštěpením od sesterské skupiny. Organismy tedy nejsou klasifikovány na základě morfologické podobnosti, ale podle jejich pořadí v evolučním stromu. Kladistický druh dle Tomšovského (2015) vzniká odštěpením (speciací) a zaniká vymřením (extinkcí).

Tento způsob klasifikace se snaží, aby co nejpřesněji vyjadřoval příbuznost organismů. Z kladistického hlediska jsou tedy pouze monofyletické taxony jedinou správnou formou taxonu. Vzájemné vztahy jsou graficky znázorněny pomocí kladogramu.

Oproti tomu tradiční evolučně-systematický přístup zohledňuje nejen kladogenezi, ale také hromadění fenotypových změn a vývoj vlastností v rámci evoluce jednotlivých linií. U fylogenetického druhu je tedy požadavek na monofyletičnost a přítomnost určitých znaků, které jsou vhodné k odlišení od jiných druhů (Tomšovský, 2015). Výsledkem je fylogram, který tak znázorňuje stupeň příbuznosti taxonů a zároveň míru a rychlost prodělaných evolučních změn (Špakulová, Holecová et al., 2013).

### **3.6.1 Molekulární fylogenetika**

Molekulární fylogenetika využívá molekulárních metod a molekulárních znaků k zjištění příbuznosti druhů a mechanismu jejich evoluce.

Pod pojmem molekulární znaky se rozumí informace uložené v sekvencích makromolekul, jako jsou DNA, RNA a proteiny. Údaje o sekvencích nukleotidů jsou zdrojem obrovského množství dat a jejich využití proto nabízí značné výhody v porovnání s klasickými metodami fylogenetiky, založených na morfologických nebo biologických znacích.

Nejvhodnějším zdrojem informací pro kladistické analýzy je podle Špakulové, Holecové et al. (2013) primární struktura DNA, neboť na úrovni sekvence nukleotidů vznikají evoluční změny ve formě mutací, které jsou předávány do dalších generací, a nesou tak v sobě informace o historii daného úseku DNA nebo proteinu. Následné porovnání s odpovídajícími lokusy jiných organismů nám umožňuje identifikaci jedince a jeho druhovou příslušnost nebo zjištění příbuzenských vztahů tohoto druhu či taxonomické skupiny s jinými, evolučně vzdálenými.

Každý nukleotid představuje samostatný molekulární znak, tudíž je variabilita DNA ovlivněna pouze různým uspořádáním nukleotidů v odpovídajícím úseku, bez vlivu vnějšího prostředí, jak tomu může být u většiny fenotypových znaků během ontogeneze (Flegr, 2009).

Jelikož jsou sekvence DNA tvořeny pouze čtyřmi nukleotidy, je jejich použití ve fylogenetických analýzách snazší v porovnání s některými klasickými znaky. Zároveň však velikost molekuly DNA zajišťuje dostatečné množství vhodných sekvencí, které umožňují porovnávat i vzájemně nepříbuzné organismy na různých taxonomických úrovních.

Pro fylogenetický výzkum vyšších taxonů se často využívají konzervativní úseky daných makromolekul, jako jsou například sekvence genů kódujících proteiny, sekvence genů pro malou a velkou podjednotku ribozomální RNA (18S a 28S) nebo údaje o lokalizaci mitochondriálních genů. Naopak rychleji mutující úseky, které v sobě v průběhu evoluce kumulují mutační změny, jako jsou repetitivní sekvence jaderné DNA, oblasti ITS1 a ITS2 ribozomální DNA nebo mitochondriální geny pro podjednotku 1 cytochrom c oxidázy (COX1), cytochrom b (Cytb) a nikotinamid dehydrogenázu (*nad4*), jsou vhodné při výzkumu populační genetiky a při porovnávání druhů a populací (Špakulová, Holecová et al., 2013).

### **3.6.2 Metody konstrukce fylogenetického stromu**

Fylogenetické stromy mohou být sestavovány na základě tabulky podobností nebo dle vzdáleností, které poukazují na podobnost mezi taxony pro vybrané znaky. Znaky zvolené pro porovnání mohou být morfologické, biochemické nebo molekulární (Macholán, 2014).

V případě, že jsou použity molekulární znaky, je pro konstrukci fylogenetického stromu nezbytný alignment neboli přiložení sekvencí, přičemž správnost provedení je klíčová pro fungování dalších fylogenetických metod. Jedná se o seřazení a vyhodnocení rozdílů mezi porovnávanými nukleotidovými či aminokyselinovými sekvencemi, kdy jsou zohledněny shodné sekvence i nalezené mezery, které charakterizují podobnost či rozdílnost srovnávaných sekvencí. Cílem alignmentu je najít a seskupit podobné úseky, které tak mohou značit případnou příbuznost (Hodgman et al., 2009; Snustad a Simmons, 2009; Macholán 2014).

Existují dva metodické přístupy pro tvorbu fylogenetického stromu ze získaných dat. Jedním z nich je distanční, který na základě algoritmického výpočtu, což je sled specifických kroků, stanoví jeden nejpravděpodobnější fylogenetický strom. Druhým přístupem je znaková analýza, která sestaví všechny možné fylogenetické stromy a pomocí kritéria optimálnosti pak zvolí ten nejpravděpodobnější.

V současnosti se pro konstrukci fylogramu nejčastěji používají tři základní metody a jejich případné modifikace – minimum evolution (ME), maximum likelihood (ML) a maximal parsimony (MP) (Delsuc et al., 2005).

Minimum evolution (ME, metoda minimální evoluce), je jednou z distančních metod, která pro výpočet používá vzájemné vzdálenosti sekvencí. Ač je metoda početně náročná, je vhodná pro rychlou analýzu velkého množství dat. Metoda minimální evoluce porovnává jednotlivé fylogenetické stromy podle součtu délek všech větví a následně vybere ten, který má součet délek nejmenší (Rzhetsky a Nei, 1992).

Metoda maximální věrohodnosti (ML, Maximum likelihood) se prosadila jako nejspolehlivější a je vhodná pro analýzu vzdáleně příbuzných sekvencí. Tato metoda zjišťuje pravděpodobnost, nakolik se shoduje teoretický evoluční model se souborem reálných znaků. Na základě toho hledá strom, který nejlépe odpovídá pozorovaným znakům a mohl by tak odpovídat i skutečné evoluci sekvencí (Felsenstein, 1981; Špakulová, Holecová et al., 2013).

Metoda maximální úspornosti (MP, Maximum parsimony) je základní metodou v kladistice, kdy se soubor znaků charakterizující analyzovanou skupinu porovnává s údaji blízké příbuzné „outgroupové“ skupiny. Na základě toho hledá fylogramy, ve kterých je pro vznik taxonů potřeba co nejméně evolučních změn v podobě mutací neboli nejkratší možná cesta od předka k potomkovi. Podstatou metody je volba fylogenetického stromu s minimální celkovou délkou neboli nejmenším počtem evolučních kroků. Nezhledňuje ovšem evoluční rychlost, kdy evoluční novinky v podobě apomorfních znaků vznikaly různě dlouhou dobu, a trpí tak častými chybami (Špakulová, Holecová et al., 2013; Macholán, 2014).

Pro následné zhodnocení kvality a spolehlivosti fylogenetické analýzy se nejčastěji používá metoda bootstrappingu. Bootstrapová procentuální hodnota vyjadřuje stupeň podpory větvení v jednotlivých uzlech vzhledem ke vstupním datům. Výsledek této metody je měřítkem pravděpodobnosti, že zvolený fylogenetický strom znázorňuje skutečnou fylogenezi (Hillis a Bull, 1993).

## **3.7 Metody molekulární biologie**

### **3.7.1 Izolace nukleových kyselin**

Izolace neboli extrakce DNA či RNA je první fází většiny molekulárních metod, jejímž principem je oddělení nukleových kyselin z biologického materiálu. Následná purifikace pak slouží k odstranění nežádoucích kontaminantů ze vzorku a k získání nukleové kyseliny

v dostatečném množství a čistotě. Izolace nukleových kyselin zahrnuje tři základní kroky – rozrušení buněk a tkání, odstranění kontaminujících látek a vlastní extrakci DNA nebo RNA.

K uvolnění vnitřního obsahu buněk je nutné vyvolat jejich lyzi působením degradačních enzymů, detergentů či chelatačních činidel. K dezintegraci buněčné stěny bakterií, rostlin či hub se používají látky jako lysozym, celulózy nebo EDTA. Lyzi živočišných buněk, které postrádají buněčnou stěnu, lze indukovat slabými detergenty. Z takto rozrušených buněk vzniká v lyzačním roztoku směs nukleových kyselin a degradačních produktů buňky, jako jsou proteiny, lipidy, sacharidy, uhlovodíky nebo nízkomolekulární látky. K odstranění kontaminant ze směsi se využívá nukleáz, proteáz a jiných přečišťovacích enzymů. K vlastní extrakci nukleových kyselin se používají metody na principu rozdílné rozpustnosti makromolekul, ultracentrifugaci v gradientních roztocích nebo jejich adsorpce k pevným povrchům.

Dnes se nejčastěji používá metoda fenol-chloroformové extrakce, která odstraňuje proteiny z buněčného lyzátu pomocí směsi fenolu a chloroformu nebo fenolového pufru. Tyto organické látky způsobí denaturaci proteinů a separaci jednotlivých vrstev, přičemž centrifugací se oddělí organická a vodní fáze, ve které je rozpuštěna DNA nebo RNA. Nukleové kyseliny jsou následně vysráženy alkoholem a získaný precipitát je rozpuštěn ve vodném roztoku, obsahující obvykle pufr a inhibitor nukleáz (Šmarda et al., 2010).

### **3.7.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)**

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je relativně jednoduchá a nejčastěji používaná metoda, která umožňuje mnohonásobné namnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA *in vitro* (Bartůňková et al., 2011; Prantlová-Rašková a Wagnerová, 2013). Výhodou je, že vyžaduje minimální množství DNA a lze tedy použít prakticky jakýkoli vzorek, který tuto vyizolovatelnou DNA obsahuje.

Principem reakce je cyklicky se opakující enzymatická syntéza mnoha kopií templátové DNA, během které se pravidelně opakují tři teplotně řízené fáze – denaturace, annealingu a prodlužování (Šmarda et al., 2010).

Požadovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen navázáním dvou vhodně vybraných oligonukleotidových primerů, které specificky hybridizují s komplementárními sekvencemi na obou koncích studovaného úseku DNA a slouží jako základ pro tvorbu nových vláken. Tyto primery se vážou na protilehlá vlákna denaturované DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Následná syntéza nových vláken podle jednořetězcových templátů probíhá

obousměrně od obou primerů ve směru 5'→3' a je katalyzována enzymem termostabilní DNA polymerázou, na principu komplementarity bází. Často používanou je polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, označovaná jako *Taq* polymeráza, která odolává teplotám, při nichž DNA denaturuje (Šmarda et al., 2010; Bartůňková et al., 2011)

Reakční směs pro PCR obsahuje nezbytná komponenta pro průběh reakce, jimiž jsou templátová DNA, syntetické oligonukleotidové primery, deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP), termostabilní DNA polymeráza a hořčičnaté ionty ( $Mg^{2+}$ ), případně PCR pufr (Bartůňková et al., 2011).

Amplifikace probíhá v přístroji zvaném termocykler, ve kterém se automaticky mění teplota v předem naprogramovaných časových intervalech a v závislosti na teplotě reakční směsi tak dochází ke střídání jednotlivých kroků cyklu:

1. Denaturace templátové DNA a separace na jednotlivá vlákna při 94 °C, po dobu 30 s
2. Nasednutí (annealing) primerů k odděleným řetězcům DNA při 30-65 °C, po dobu 30-60 s, čímž dojde hybridizaci.
3. Polymerační reakce (prodlužování, extenze) probíhá při teplotě 65-75 °C, po dobu 45-90 s, přičemž dochází k syntéze nových řetězců dna pomocí DNA polymerázy. Nově vytvořené řetězce poté slouží jako templáty pro další cyklus.

Tyto kroky se neustále opakují, až do dosažení optimálního množství DNA. Neustálým střídáním denaturace a syntézy dojde po každém cyklu zdvojnásobení počtu molekul amplifikovaného úseku a počet kopií DNA tak roste geometrickou řadou (Šmarda et al., 2010; Bartůňková et al., 2011).

Vizualizace a analýza velikosti výsledného produktu (amplikonu) se provádí gelovou elektroforézou na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Na PCR však navazují i další metody či její modifikace, které umožňují zpracování daného úseku pro získání podrobnějších informací. Jsou jimi například sekvenace amplikonu pro stanovení jeho konkrétní nukleotidové sekvence, hybridizace se značenou sondou nebo posouzení vznikajících restrikčních fragmentů pomocí restrikčních enzymů (RFLP-PCR).

### **3.7.3 Gelová elektroforéza**

Elektroforéza patří k nejpoužívanějším separačním technikám v molekulární biologii sloužícím k izolaci a analýze nukleových kyselin nebo proteinů v závislosti na jejich velikosti, konformaci a náboji. K separaci lze rovněž použít i kapilární elektroforézu, která je plně automatizovaná a spotřebuje velmi malé množství vzorku.

V případě nukleových kyselin je principem elektroforézní metody pohyb záporně nabitých molekul DNA nebo RNA v elektrickém poli směrem k opačně nabitě anodě. Vzorky se nanášejí do jamek v gelu, vytvořených pomocí hřebínku.

Gelová elektroforéza nukleových kyselin se provádí na vhodném nosiči, kterým nejčastěji bývá agarózový či polyakrylamidový gel o různé hustotě. V gelu se tak vytváří složitá síť polymerních molekul s póry, jimiž se různě velké molekuly pohybují různou rychlostí. Rychlost pohybu makromolekul označujeme jako elektroforetickou pohyblivost, která je nepřímo úměrná k jejich velikosti. Pro odhad velikosti neznámých makromolekul se do jedné jamky gelu nanáší tzv. hmotnostní standard o definované velikosti jednotlivých fragmentů, který slouží pro porovnání elektroforetické pohyblivosti.

Po dokončení elektroforézy je potřeba zviditelnit polohu separovaných molekul. Pro vizualizaci nukleových kyselin, zejména DNA, se nejčastěji používá značení ethidium bromidem, který po osvětlení ultrafialovým zářením zviditelní označené fragmenty. K detekci poloh fragmentů lze rovněž použít radioaktivní značení nebo hybridizaci se značenou sondou.

Rozdělené molekuly lze posléze z gelu izolovat (Šmarda et al., 2010)

#### **3.7.4 Sekvenování DNA**

Cílem sekvenování je stanovení primární struktury neboli pořadí či sekvence nukleotidů v molekule DNA. Znalost primární struktury DNA nám následně umožňuje odvození aminokyselinových sekvencí kódovaných proteinů. Metody sekvenování DNA jsou založeny na přípravě molekul DNA s přesně definovanými konci a následné separaci a detekci fragmentů DNA, jejichž velikost se liší o jeden nukleotid.

Elektroforéza patří k nejpoužívanějším separačním technikám v molekulární biologii sloužícím k izolaci a analýze nukleových kyselin nebo proteinů v závislosti na jejich velikosti, konformaci a náboji. K separaci lze rovněž použít i kapilární elektroforézu, která je plně automatizovaná a spotřebuje velmi malé množství vzorku.

V případě nukleových kyselin je principem elektroforézní metody pohyb záporně nabitých molekul DNA nebo RNA v elektrickém poli směrem k opačně nabitě anodě. Vzorky se nanášejí do jamek v gelu, vytvořených pomocí hřebínku.

Gelová elektroforéza nukleových kyselin se provádí na vhodném nosiči, kterým nejčastěji bývá agarózový či polyakrylamidový gel o různé hustotě. V gelu se tak vytváří složitá síť polymerních molekul s póry, jimiž se různě velké molekuly pohybují různou rychlostí. Rychlost pohybu makromolekul označujeme jako elektroforetickou pohyblivost, která je

nepřímo úměrná k jejich velikosti. Pro odhad velikosti neznámých makromolekul se do jedné jamky gelu nanáší tzv. hmotnostní standard o definované velikosti jednotlivých fragmentů, který slouží pro porovnání elektroforetické pohyblivosti.

Po dokončení elektroforézy je potřeba zviditelnit polohu separovaných molekul. Pro vizualizaci nukleových kyselin, zejména DNA, se nejčastěji používá značení ethidium bromidem, který po osvětlení ultrafialovým zářením zviditelní označené fragmenty. K detekci poloh fragmentů lze rovněž použít radioaktivní značení nebo hybridizaci se značenou sondou. Rozdělené molekuly lze posléze z gelu izolovat (Šmarda et al., 2010).

V současnosti se pro sekvenování DNA využívají dvě odlišné metody – chemická a enzymatická.

Chemická neboli Maxam-Gilbertova metoda je založena na specifické degradaci nukleových kyselin pomocí chemických sloučenin, přičemž dochází ke štěpení v místech s určitou nukleovou bází. Metoda pracuje s krátkými úseky jednovláknové i dvouvláknové DNA, která je na jednom konci radioaktivně značena, nejčastěji fosforem. Tento vzorek DNA je rozdělen na čtyři části, přičemž každá je vystavena chemikáliím, které specificky přerušují řetězec DNA v místě rozpoznání určitého nukleotidu, čímž vznikne směs různě dlouhých fragmentů, končících v místě určité báze. Fragmenty z těchto čtyř reakcí se následně umístí vedle sebe na polyakrylamidový gel a spustí se elektroforéza. Toto způsobí seřazení sekvencí podle délky, která by se měla lišit o jeden nukleotid. Následným odečtením pozice jednotlivých nukleotidů se docílí stanovení sekvence daného úseku DNA (Rédei, 2008; Šmarda et al., 2010).

Druhou, nejčastěji používanou metodou je enzymatická neboli Sangerova metoda sekvenování, která využívá terminaci enzymatické syntézy DNA po zabudování dideoxynukleotidu (ddNTP) do komplementárního vlákna. Principem této metody je využití DNA, jež má být sekvenována, jako templát pro syntézu komplementárních řetězců různé délky pomocí DNA polymerázy.

K průběhu reakce je tedy nutná přítomnost jednovláknové DNA (templátu), primeru, DNA polymerázy, deoxynukleotidtrifosfátů (dNTP) a jednoho ze čtyř dideoxynukleotidtrifosfátů (ddNTP). Sekvenační reakce je opět prováděna ve čtyřech oddělených vzorcích, přičemž každý obsahuje jeden ddNTP, čímž následně stanovuje pořadí jednoho ze čtyř nukleotidů. Dideoxynukleotidy přítomné v reakční směsi ve vhodně zvoleném poměru se začleňují náhodně do nově vznikajícího vlákna na místo příslušného deoxynukleotidu.



Dideoxynukleotidy ovšem postrádají na svém 3'- konci hydroxylovou skupinu, na níž by se mohl navázat další nukleotid, čímž dochází k zastavení syntézy a řetězec se nemůže dále prodlužovat. Výsledkem Sangerovy metody je vznik různě dlouhých fragmentů DNA, které na svém konci nesou specificky značený dideoxynukleotid. Po proběhnutí polymerační reakce se vytvořené produkty denaturují a separují vedle sebe na polyakrylamidovém gelu pomocí elektroforézy. Následný odečet délek značených dideoxynukleotidů nám indikuje sekvenci nukleových bází v analyzovaném vzorku DNA.

V současnosti se při sekvenování využívají téměř výhradně automatické sekvenátory, které jsou variantou enzymatického sekvenování a velmi urychlují celý proces. Syntéza DNA totiž probíhá pouze v jedné reakci a vzniklé produkty jsou značeny dideoxynukleotidy s fluorescenčními barvivy, jejichž detekce a stanovení pořadí nukleotidů probíhá v kapilární elektroforéze pomocí laserového detektoru (Šmarda et al., 2010).

### **3.8 DNA barcoding**

DNA barcoding je rozvíjející se taxonomická metoda, která využívá velkého množství krátkých fragmentů DNA k urychlení a usnadnění rozlišování druhů a identifikaci neznámých či poškozených vzorků. Barcoding se od molekulární fylogenetiky liší v tom, že hlavním cílem není zjišťování příbuznosti, ale identifikace neznámého vzorku a jeho následné začlenění do existující klasifikace.

Název "barcode" vychází z anglického překladu pro čárový kód, čímž je v biologii míněn krátký a specifický úsek DNA, jehož analýza bude rychlá a levná. Myšlenkou DNA barcodingu je, že genom každého biologického druhu obsahuje tuto krátkou nukleotidovou sekvenci, která je pro něj unikátní a na jejímž základě by mělo být možné odlišit od sebe jednotlivé druhy (Hebert et al., 2003a; Roopnarine, 2006). Požadovaná sekvence by však podle Roopnarineho (2006) měla podléhat mutacím v takové rychlosti, aby byla schopná odlišit blízké příbuzné druhy a zároveň minimalizovat rozdíly mezi jednotlivci uvnitř druhu. Cílem DNA barcodingu je tedy vytvořit rozsáhlou databázi těchto krátkých fragmentů DNA od mnoha jedinců, ve které by mohly být vzorky porovnávány a poskytla by tak unikátní zdroj dat pro výzkum a rozvoj biodiverzity. V současnosti existuje volně přístupný informační systém s názvem The Barcode of Life Data System (BOLD), který podporuje získávání, uchování, analýzu a publikaci záznamů barcodových DNA kódů (Ratnasingham a Hebert, 2007).

V květnu 2004 vzniklo mezinárodní sdružení Consortium of the Barcode of Life (CBOL), sdružující více jak 120 organizací. CBOL podporuje rozvoj mezinárodního výzkumu, potřebného pro vybudování barcodové knihovny pro eukaryotní organismy, která by tak v budoucnu měla být rozsáhlejší, než databáze GenBank. Cílem této organizace je prosadit barcoding jako celosvětový standard při identifikaci biologických druhů (Ratnasingham a Hebert, 2007).

Nejběžněji využívaný region pro barcoding živočichů je mitochondriální gen pro podjednotku 1 cytochrom c oxidázy (COX1), neboť prokázal vysokou úspěšnost při druhové identifikaci, případně diverzifikaci vyšších taxonů. Nedávné výzkumy prokázaly, že více jak 95 % živočišných druhů vlastní odlišitelnou *cox1* sekvenci (Hebert et al., 2003a; 2003b). Výhodou použití tohoto genu je, že jeho sekvence je dostatečně krátká, aby mohla být rychle sekvenována a zároveň dostatečně dlouhá, aby mohla sloužit k identifikaci druhů. Úspěch barcodingu pomocí *cox1* je zejména při určování kryptických či neznámých druhů nebo u druhů, jejichž fenotyp je ovlivněn v závislosti na vnějších podmínkách (Hebert et al., 2003a).

### **3.9 Mitochondrie a jejich genom**

Mitochondrie jsou esenciální semiautonomní membránové organely v eukaryotických buňkách. Jejich základní funkcí je produkce energie pro organismus v podobě buněčné dýchání, při kterém vzniká energeticky bohatý adenosintrifosfát (ATP). Počet mitochondrií v buňce se odvíjí od typu buňky a může nabývat od desítek po tisíce. Jednou z hypotéz jejich původu v eukaryotických buňkách popisuje endosymbiotická teorie, která předpokládá, že mitochondrie byly původně volně žijící prokaryota, která se inkorporovala do primitivní eukaryotické buňky, a stala se tak jejím buněčným endosymbiontem. Jiná teorie se domnívá, že původní hostitelkou buňkou byla autotrofní archebakterie, která pohltila menší bakterii schopnou produkovat vodík, jež by následně mohla sama metabolizovat (Gray et al. 1999). Obě hypotézy by mohly být vysvětlením, proč se v buňkách nachází zároveň jaderná i mitochondriální DNA.

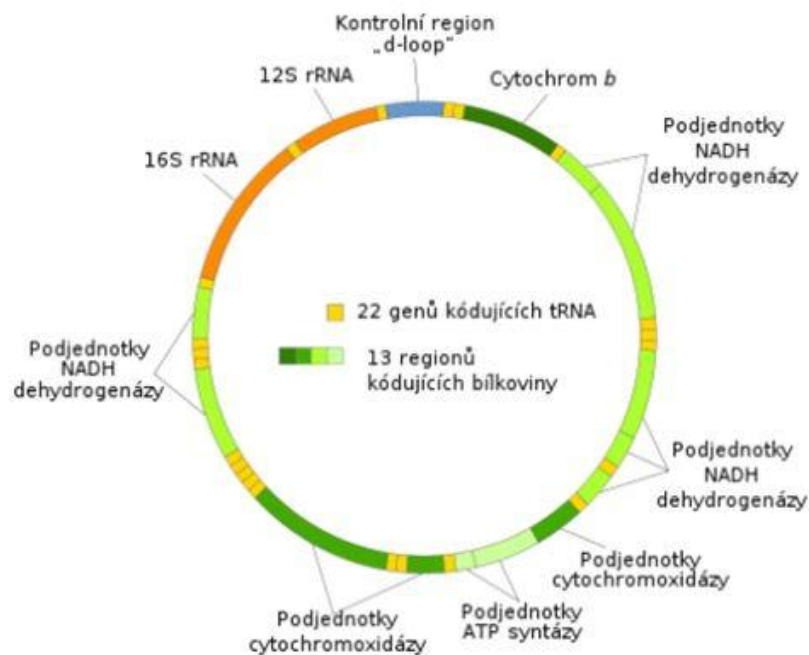
#### **3.9.1 Mitochondriální DNA**

Mitochondriální DNA (mtDNA) (Obr. 4) je relativně malá cirkulární dvoušroubovice DNA o velikosti 13-26 kb, která ve svých genech kóduje enzymy potřebné pro oxidativní fosforylaci, jež je jednou z fází buněčné respirace (Rokas et al., 2003; Hawash et al., 2015). Molekula mtDNA se nachází v mitochondriích přibližně v 2-8 kopiích (Legros et al., 2004).

Vlákná dvoušroubovice jsou odlišná na základě obsahu nukleových bází, které způsobují různou hustotu řetězců. Jedno z vláken bohaté na puriny (A, G) je označováno jako těžké, zatímco druhé s dominantním obsahem pyrimidinů (C, T), jako lehké. mtDNA obsahuje celkem 37 genů, z nichž 28 je zakódováno na těžkém řetězci a 9 na lehkém řetězci. Tyto geny kódují informaci pro 22 molekul transferových RNA (tRNA), 2 ribozomové RNA (rRNA) a 13 proteinů, které jsou nezbytnou součástí oxidativní fosforylace (Liu et al., 2012b). Součástí mitochondriálního genomu je také kontrolní oblast, tzv. D-smyčka, která nekóduje žádné produkty, ale obsahuje transkripční faktory a replikační počátek pro těžký řetězec. Tato oblast se vyznačuje zvýšenou sekvenční variabilitou, která je důsledkem četných mutací (Pakendorf a Stoneking, 2005).

Obr. 4: Molekula mitochondriální DNA

([https://cs.wikipedia.org/wiki/Mitochondri%C3%A1ln%C3%AD\\_DNA](https://cs.wikipedia.org/wiki/Mitochondri%C3%A1ln%C3%AD_DNA)).



Bohužel u rodu *Trichuris* a dalších nematod se D-smyčka nevyskytuje. Tato skutečnost je patrná z výsledků kompletních sekvencí mitochondriálního genomu u rodu *Trichuris*, které publikovali například Liu et al. (2012b).

Vzhledem k přítomnosti obrovského množství kopií mitochondriálního genomu v buňkách, je tak oproti dvěma kopiím jaderné DNA vhodný k analýze i malého množství buněčného

materiálu nebo degradovaných vzorků. Pravděpodobnost získání lepších výsledků je vyšší než z nukleární DNA.

Hlavním důvodem úspěchu mtDNA, jako nejpoužívanějšího molekulárního markeru, je několik klíčových vlastností. Kvůli velkému množství kopií v buňce, striktní maternální dědivosti, vysoké míře mutací a absenci rekombinací, jsou mitochondriální geny významné v mnoha oborech evolučního výzkumu, jako je fylogenetika, fylogeografie nebo populační genetika (Rokas, 2003; Pakendorf a Stoneking, 2005).

Mitochondriální DNA je, na rozdíl od jaderné, děděna pouze po maternální linii, a je tak, kromě mutací vzniklých v průběhu ontogeneze, předávána potomkům v nezměněné podobě. Za vyšší výskyt mutací v mtDNA je zodpovědná snížená přesnost mtDNA polymerázy a méně reparačních mechanismů, než je tomu u nukleární DNA.

Dle Snustada a Simmonse (2009) je každý rozdíl v páru bází při komparativní analýze sekvencí mtDNA považován za mutaci, proto je tato oblast vhodná jako měřítko pro citlivé fylogenetické studie. Komparativní metoda má využití zejména k identifikaci kryptických nebo blízce příbuzných druhů, které nelze rozlišit pomocí klasických metod, jako je například morfologická analýza. Jednou z nevýhod mitochondriální sekvence jsou mitochondriální pseudogeny, což jsou části mtDNA začleněné v jaderném genomu. Ty mohou být analyzovány spolu s požadovanými úseky mtDNA a jejich případná záměna tak může vést k nesprávné interpretaci fylogenetických analýz (Hawash et al., 2015)

### **3.10 Endosymbiotické bakterie rodu *Wolbachia***

Rod *Wolbachia* tvoří fylogeneticky různorodou skupinu bakterií, které jsou formálně řazeny k monofyletickému druhu *Wolbachia pipientis*, jenž je klasifikován do několika superskupin ("supergroup"). Tyto jednotlivé superskupiny vykazují různorodé rozšíření u širokého spektra hostitelů (Lo et al., 2007; Simões et al., 2011).

Wolbachie jsou celosvětově rozšířená gramnegativní endosymbiotické bakterie z čeledi Rickettsiaceae a působí jako nitrobuněčný parazit v reprodukčním traktu u mnoha taxonomických skupin bezobratlých živočichů z kmene Anthropoda (členovci) a Nematoda (hlístice) (Schulenburg et al., 2000; Werren et al., 2008). Napadají zejména filariární hlístice a hmyz, u kterého Hilgenboecker et al. (2008) a Zug et al. (2012) předpokládají přítomnost Wolbachii až u 40–66 % druhů, ale lze je najít i u korýšů, roztočů, termitů nebo pavouků (Werren a Windsor, 2000). U nematod je ovšem *Wolbachia* považována spíše za obligátního mutualistického symbionta než za parazita, protože její přítomnost podmiňuje larvální růst a

vývoj, embryogenezi a viabilitu dospělých jedinců (Taylor et al., 2005; Tamarozzi et al., 2011). Zároveň je známo, že *Wolbachia* hraje ochrannou roli proti některým RNA virům u drozofil (Brownlie a Johnson, 2009).

Tyto bakterie jsou děděny převážně vertikálně z matky skrz vyvíjející se vajíčka na potomstvo, ale některými autory (Werren et al., 1995; Cordaux et al., 2001) byl zaznamenán i horizontální přenos mezi hostitelskými druhy. *Wolbachie* jsou přítomny ve zralém infekčním vajíčku a nikoli v dospělé spermii, tudíž samci mohou být infikováni, ale nepřenášejí bakterii svým potomkům nebo jiným hostitelům.

*Wolbachia* je reprodukční parazit, neboť je známá pro svou schopnost manipulovat s hostitelskou reprodukcí, což je výhodná životní strategie k zajištění svého přežití a zvýšení vlastního přenosu v populaci hostitele. *Wolbachia* si vyvinula čtyři hlavní způsoby reprodukční manipulace a je tak schopna vyvolat v hostitelích několik neobvyklých fenotypů souvisejících s rozmnožováním. Všechny tyto fenotypy přitom narušují poměr pohlaví potomků ve prospěch samic, čímž zajišťují vyšší rychlost přenosu na novou generaci hostitelů (Werren et al., 2008; Guruprasad et al., 2014). Tyto faktory mají následně velký dopad na hostitelskou ekologii a evoluci (Simões et al., 2011).

Mezi manipulační mechanismy s hostitelskou reprodukcí patří:

- feminizace samců neboli vývoj geneticky determinovaných samců v samice, čímž zdvojnásobí potenciální přenos na novou generaci;
- indukovaná partenogeneze, kdy dochází k rozmnožování bez přítomnosti samců a neoplozené samice produkují pouze dcery;
- male-killing neboli úhyny infikovaných samců během embryonálního nebo larválního vývoje;
- cytoplazmatická inkompabilita gamet, což je modifikace spermií u infikovaných samců, která vede k poškození nebo smrti embrya, pokud dojde ke spojení infekčního samce s neinfekční samicí, případně se samicí infikovanou jinou bakteriální linií (Hurst et al., 2002; Werren et al., 2008; White et al., 2013)

## **4 Materiál a metody**

### **4.1 Biologický materiál – *T. discolor* a *T. ovis***

#### **4.1.1 Původ biologického materiálu**

Biologický materiál představoval dospělé jedince *T. discolor* a *T. ovis* samčího i samičího pohlaví, které byly získány ve spolupráci s Katedrou zoologie a rybářství FAPPZ ČZU v Praze. Jednalo se o jedince, kteří byli získáni z hostitelů na základě parazitologické pitvy. Všechny manipulace se zvířaty byly provedeny v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb.

#### **4.1.2 Analyzované druhy rodu *Trichuris* a jejich hostitelé**

Během řešení diplomové práce bylo hodnoceno celkem 18 zástupců druhu *T. discolor* (18 samic), které pocházely z následujících hostitelů: los evropský (*Alces alces*) – 2 jedinci, muflon evropský (*Ovis aries musimon*) – 2 jedinci, srnec obecný (*Capreolus capreolus*) – 4 jedinci, daněk evropský (*Dama dama*) – 4 jedinci, jelen sika (*Cervus nippon*) – 2 jedinci, jelen lesní (*Cervus elaphus*) – 2 jedinci, ovce domácí (*Ovis orientalis aries*) – 2 jedinci.

Dále bylo hodnoceno 18 zástupců rodu *T. ovis* (11 samic, 7 samců), které pocházely z hostitelů: los evropský (*Alces alces*) – 1 jedinec, muflon evropský (*Ovis aries musimon*) – 3 jedinci, srnec obecný (*Capreolus capreolus*) – 3 jedinci, daněk evropský (*Dama dama*) – 4 jedinci, jelen lesní (*Cervus elaphus*) – 3 jedinci, ovce domácí (*Ovis orientalis aries*) – 4 jedinci.

Druhové určení provedl kolektiv pracovníků Katedry zoologie a rybářství FAPPZ ČZU v Praze na základě morfologických znaků. Jejich závěry byly potvrzeny na pracovišti Katedry genetiky a šlechtění FAPPZ ČZU v Praze pomocí molekulárních metod, vycházejících z mezidruhových polymorfismů rDNA. Pro potvrzení druhové příslušnosti byla použita metoda podle Vejl et al. (2017).

### **4.2 Biologický materiál – *Drosophila melanogaster***

#### **4.2.1 Původ biologického materiálu**

Při řešení diplomové práce jsem vycházela z předpokladu, že ve volně žijících populacích *Drosophila melanogaster* se budou vyskytovat jedinci s endosymbiotickými bakteriemi rodu

*Wolbachia*. V lokalitě Horoměřice byl v září 2017 proveden odchyt 10 samců a 10 samic, kteří byli po dobu přibližně pěti generací chováni a reprodukováni v laboratorních podmínkách. Jejich výživa byla zajištěna kvasicím ovocem. Přibližně v páté generaci bylo odebráno 50 samců a 50 samic, kteří byli fixováni v 70% ethanolu.

### 4.3 Izolace genomické DNA

Jedinci druhů *T. ovis* a *T. discolor* byli po pitvě konzervováni v 70% ethanolu. Rovněž i jedinci *D. melanogaster* byli uchováni v 70% ethanolu. Před extrakcí DNA byli jedinci opláchnuti 96% ethanolom a následně byli vysušeni v lyofilizátoru (Alpha 1-4 Christ) ve vakuu po dobu 60 minut. Pro izolaci DNA byl použit NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel). Kit je založen na kolonkovém principu. Pro extrakci byla dodržena procedura doporučená výrobcem kitu z živočišných tkání. Kvantita a kvalita izolované genomické DNA byla hodnocena pomocí UV spektrofotometrické metody- NanoPhotometer (Implen). Vysokomolekularita extrahované DNA byla ověřena pomocí gelové elektroforézy- SubCell (BioRad). Pro fragmentaci byl využit 1% agarózový gel v 1× TBE pufru. Genomická DNA byla vizualizována pomocí ethidium bromidu.

### 4.4 Navrhování specifických primerů pro amplifikaci mitochondriálních genů mt-COX1 a mt-Cytb u *T. ovis* a *T. discolor*

Pro navrhování primerů byly použity sekvence publikované v databázi NCBI pod čísla NC\_018597.1 a NC\_018596.1 (Liu et al., 2012b). Pro navržení degenerovaných primerů pro amplifikaci genu mt-COX1 (Trich-cox1-F: 5'-CTTTYGGYYTATGAAGAGGYAT-3' a Trich-cox1-R: 5'-AAAWCGATGTGAKGAKRTTCTTTC-3') a pro amplifikaci genu mt-Cytb (Trich-cytb-F: 5'-CTTCTCCTTGRAATATTTTCWTAYTTRTG-3' a Trich-cytb-R: 5'-ATCWGCTCTTCAWGAKGCAATTC-3') byl použit program Primer3 Input 0.4.0 Program (Rozen a Skaletsky, 2000). Amplikony získané při použití výše získaných primerů byly osekvenovány, a na základě získaných výsledků byly navrženy druhově specifické primerové páry:

Gen mt-COX1

seq-F-COX1-*T. ovis* 5'-CGCACATGCTGTTGCTATGA-3'

seq-R-COX1-*T. ovis* 5'-ACGTATCGTCGGGGTATGC-3'

seq-F-COX1-*T. discolor* 5'-TTACAACACAGTAGTGTCTGCACAT-3'

seq-R-COX1-*T. discolor* 5'-TCCTGTATAGCAGTCGGCATAGTC-3'

## Gen mt-Cytb

seq-F-CYTB-*T. ovis* 5'-ATCCCCAGCGAACTAGAAGC-3'

seq-R-CYTB-*T. ovis* 5'-TGAGACACTGTTGCAGGGAGT-3'

seq-F-CYTB-*T. discolor* 5'-CCTAGGGAGTTAGAAGCGTTCA-3'

seq-R-CYTB-*T. discolor* 5'-TCTTGAGAAGCTATTGAAGGAAG-3'

### 4.5 Podmínky amplifikace fragmentů genů mt-COX1 a mt-Cytb

Složení reakčních směsí pro amplifikaci obou studovaných genů u obou druhů rodu *Trichuris* byly identické (viz Tabulka 1). V Tabulce 2 je uveden shodný PCR profil, který byl použit pro amplifikaci obou genů u obou studovaných druhů. Pro amplifikaci byl použit termocykler TGRADIENT (Biometra®).

Tabulka 1: Složení PCR reakce amplikonů určených k sekvenční analýze.

Složka	Koncentrace
Genomická DNA	15 ng . 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
Pufr KCl	1 $\times$
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dNTP	200 $\mu\text{M}$
Primer F	0,4 $\mu\text{M}$
Primer R	0,4 $\mu\text{M}$
Enhancer	2 mM
BSA	5 ng . 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
<i>Taq</i> polymeráza (Thermo SCIENTIFIC)	0,7U . 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$



Tabulka 2: Teplotní a časový profil PCR.

<b>Počáteční denaturace</b>	95 °C	180 s	1×
<b>Denaturace</b>	95 °C	30 s	40×
<b>Annealing</b>	60 °C	30 s	
<b>Prodlužování</b>	72 °C	90 s	
<b>Závěrečné prodlužování</b>	72 °C	420 s	1×

## 4.6 Sekvenační analýza amplikonů genů mt-COX1 a mt-Cytb

### 4.6.1 Čištění amplikonů pomocí separace v agarózovém gelu

Amplikony byly separovány v 1,5% agarózovém gelu v 1× TBE puftru. Separace probíhala při konstantním napětí 120 V po dobu 60 minut. Fragmenty DNA s požadovanou velikostí byly vyříznuty pomocí skalpelu. Ze získaných agarózových bločků byla vyizolována DNA pomocí GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo SCIENTIFIC). Extrahované fragmenty byly tímto způsobem zbaveny možných nezabudovaných nukleotidů a primerů. Následně byla provedena UV spektrofotometrická kvantifikace.

### 4.6.2 Sekvenační reakce

Pro sekvenační reakci byl použit kit BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo SCIENTIFIC). Složení sekvenační reakce je uvedeno v Tabulce 3. Pro sekvenaci byl použit termocykler C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BIO RAD).

Tabulka 3: Složení sekvenační reakce.

Komponenta	Koncentrace	Objem
PCR produkt	40 ng . $\mu\text{l}^{-1}$	5,0 $\mu\text{l}$
5x Sequencing Buffer (Thermo SCIENTIFIC)	1×	4,0 $\mu\text{l}$
Primer F resp. R	3,2 pikomolů . 20 $\mu\text{l}^{-1}$	3,2 $\mu\text{l}$
Terminator Ready Reaction Mix (Thermo SCIENTIFIC)	2 $\mu\text{l}$ . 20 $\mu\text{l}^{-1}$	2,0 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O		5,8 $\mu\text{l}$

Každý amplicon byl sekvenován od F a R primerů ve třech opakováních.

#### 4.6.3 Purifikace produktů sekvenační reakce

Ke každému produktu sekvenační reakce byly přidány 2  $\mu\text{l}$  roztoku glykogenu (Thermo SCIENTIFIC), 2  $\mu\text{l}$  3M octanu sodného a 50  $\mu\text{l}$  96% ethanolu. Vzorky byly inkubovány 15 minut při 25°C. Následně byly odstředěny pomocí stolní centrifugy (13 200 × g, 30 minut, 15 °C). Vzniklý supernatant byl odstraněn a sediment byl propláchnut 250  $\mu\text{l}$  70% ethanolu. Vzorky byly následně odstředěny za shodných podmínek. Oplachování ethanolom bylo provedeno ještě jednou. Vzniklý sediment byl vysušen v termobloku (30 minut, 50 °C) a následně rozpuštěn v 15  $\mu\text{l}$  Hi-Di formamidu. Před fragmentační analýzou byly vzorky denaturovány při 95 °C po dobu 5 minut a následně ochlazeny na 4 °C.

#### 4.6.4 Podmínky fragmentační analýzy při stanovení sekvencí

Pro zjištění sekvencí byla použita kapilární elektroforéza ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Thermo SCIENTIFIC).

#### 4.6.5 Nalezení konsenzu sekvencí

Bylo provedeno ruční čtení získaných sekvencí. Po vyloučení nepřesně osekvenovaných začátků a konců ampliconu byly sestaveny konsenzus sekvence obou studovaných genů pomocí programu BioEdit 7.0.5.2. (Hall, 1999). Pro identifikaci haplotypů byl použit program DnaSP 6 (Rozas et al., 2017).

## **4.7 Fylogenetická analýza rodu *Trichuris* provedená na základě částečných sekvencí genů mt-COX1 a mt-Cytb**

### **4.7.1 Volba datasetů u studovaných genů a nalezení haplotypů**

Vzhledem k tomu, že v mezinárodní nukleotidové databázi NCBI jsou publikovány různě dlouhé fragmenty obou studovaných genů, bylo při řešení diplomové práce přistoupeno k vytvoření tří datasetů pro gen mt-COX1 a dvou datasetů pro gen mt-Cytb. Haplotypy v každém datasetu představují vždy fragment genu se shodnou délkou nukleotidů, který byl identifikován u různých záznamů NCBI databáze, včetně nově získaných sekvencí při řešení diplomové práce. Velikost sekvencí považovaných za haplotypy v jednotlivých datasetech je přehledně uvedena ve výsledkové části diplomové práce. V této části diplomové práce jsou rovněž uvedeny druhy rodu *Trichuris* zařazené do analýzy, autoři, kteří sekvence získali, pohlaví trichurů, jejich hostitele a země původu.

### **4.7.2 Volba optimálního modelu pro fylogenetické analýzy**

Pro alignment sekvencí byl použit program MAFFT version 7 (Kato a Toh, 2008). Pomocí programu jModelTest 2.1.10 v20160303 (Darriba et al., 2012) byl proveden výběr optimálního substitučního modelu. Metoda NNI (Nearest Neighbor Interchange) byla použita pro nalezení optimální topologie fylogenetických stromů. Nejlepší substituční model byl vybrán na základě hodnot AIC (Akaike Information Criterion) (Akaike, 1973), BIC (Bayesian Information Criterion) (Schwarz, 1978) a DT (Decision Theory Performance-Based Selection) (Minin et al., 2003). Pro konstrukci fylogramů byl použit program PhyML 3.0 (Guindon a Gascuel, 2003), který využívá metody ML. Ve výsledkové části diplomové práce budou u jednotlivých mitochondriálních genů prezentovány konkrétní modely, které byly považovány za nejvhodnější z pohledu více různých testovacích kritérií.

Pro zakořenění všech fylogramů byly použity sekvence u příbuzného druhu *Trichinella spiralis*, který plní roli outgroupového genotypu. Při tvorbě fylogramů byla použita metoda konsenzus evolučního stromu, který vychází z tisíce opakování při tzv. bootstrappingu. Na základě tohoto algoritmu byly považovány za samostatné pouze takové větve fylogramu, kde bootstrapová procentuální hodnota dosáhla 70 a více %.

#### 4.8 PCR detekce přítomnosti endosymbiotických bakterií rodu *Wolbachia*

PCR detekce byla provedena u 50 samců a 50 samic chované populace *D. melanogaster*, která sloužila jako standard s předpokládaným výskytem této bakterie. Současně byl výskyt hodnocen u všech sekvenovaných zástupců *T. discolor* (18 jedinců) a *T. ovis* (18 jedinců). Pro identifikaci byla použita dvojice specifických primerů W-Specf a W-Specr, které navrhli Werren a Windsor (2000). Tyto primery nasedají do oblasti 16S rDNA a amplifikují v případě přítomnosti bakterií rodu *Wolbachia* fragment o velikosti 438 bp. V případě absence *Wolbachie* k amplifikaci nedochází. Teplotní a časový profil amplifikace byl použit podle Werren a Windsor (2000). Pro amplifikaci byl použit qRT-PCR termocykler LightCycler® Nano Instrument (Roche), který je schopen kvantifikovat množství templátové DNA i při její malé koncentraci v reakční směsi. Složení PCR reakce je uvedeno v následující Tabulce 4.

Tabulka 4: Složení PCR reakce pro amplifikace markerů bakterií rodu *Wolbachia*.

Složka	Koncentrace
Genomická DNA	20 ng . 10 $\mu$ l <sup>-1</sup>
W-Specf	0,5 $\mu$ M
W-Specr	0,5 $\mu$ M
FastStart Essential DNA Green Master	1 $\times$

Výsledky amplifikace byly hodnoceny pomocí amplifikačních křivek a křivek teploty tání (řídící program LightCycler® Nano Instrument (Roche)). Současně byly amplikony separovány v 1,5% agarózovém gelu v prostředí 1 $\times$  TBE pufru a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

## 5 Výsledky

### 5.1 Hodnocení sekvencí ampliconů genů mt-COX1 a mt-Cytb

#### 5.1.1 Specifita navržených primerů a charakteristika získaných ampliconů

Pro genetické analýzy byly použity zástupci rodu *Trichuris*, pocházejících z různých hostitelů z České republiky. Pomocí inzerčně-delečních markerů, které navrhl Vejl et al. (2017) bylo před analýzou mitochondriálních genů provedeno jednoznačné určení druhové příslušnosti. To znamená, že pomocí těchto markerů bylo potvrzeno, že se jedná skutečně o 18 jedinců *T. ovis* a 18 jedinců *T. discolor*. Toto určení bylo výhodné pro následující sekvenační analýzy mitochondriálních genů.

Pomocí navržených specifických markerů byly získány spolehlivé sekvence, které byly u druhu *T. discolor* dlouhé 1049 bp pro gen mt-COX1 a 727 bp pro gen mt-Cytb. U druhu *T. ovis* byly získané sekvence genu mt-COX1 dlouhé 1011 bp a sekvence genu mt-Cytb 665 bp. V současné době jsou tyto sekvence připraveny pro vložení do mezinárodní nukleotidové databáze NCBI.

#### 5.1.2 Datasets a oblasti studovaných genů použité jako haplotypy

Získané sekvence obou genů byly porovnány s mezinárodní databází NCBI a byly vybrány tři oblasti genu mt-COX1 a dvě oblasti genu mt-Cytb, které budou v další fylogenetické analýze sloužit jako sekvence haplotypů. Pomocí programu DnaSP 6 (Rozas et al., 2017) byly přesně identifikovány sekvence haplotypů zařazených do třech datasetů genu mt-COX1 a dvou datasetů genu mt-Cytb. Vzhledem k tomu, že cílem práce bylo fylogenetické zařazení dvou modelových druhů *T. discolor* a *T. ovis* do fylogenetického stromu, byly získané sekvence srovnávány s dostupnými sekvencemi všech druhů rodu *Trichuris*, bez ohledu na jejich geografický výskyt a hostitelský druh. Identifikované haplotypy včetně jejich detailních popisů jsou prezentovány v následujících tabulkách (Tabulka 5 - 15).

Tabulka 5: Haplotypy odvozené na základě sekvencí genu mt-COX1 – 1.část.

Druh	Označení sekvence	Autor	Země původu	Pohlaví	Hostitel	Dataset A		Dataset B		Dataset C	
						Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH65	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Dama</i>	Cox1-TDA1	18-983	Cox1-TDB1	18-464	Cox1-TDC1	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH140	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis aries musimon</i>	Cox1-TDA1	18-983	Cox1-TDB1	18-464	Cox1-TDC1	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH141	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis aries musimon</i>	Cox1-TDA1	18-983	Cox1-TDB1	18-464	Cox1-TDC1	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH59	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis orientalis aries</i>	Cox1-TDA2	18-983	Cox1-TDB2	18-464	Cox1-TDC1	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH98	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Capreolus capreolus</i>	Cox1-TDA2	18-983	Cox1-TDB2	18-464	Cox1-TDC1	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH30	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Capreolus capreolus</i>	Cox1-TDA3	18-983	Cox1-TDB3	18-464	Cox1-TDC2	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH95	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Capreolus capreolus</i>	Cox1-TDA4	18-983	Cox1-TDB4	18-464	Cox1-TDC3	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH195	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Dama dama</i>	Cox1-TDA5	18-983	Cox1-TDB5	18-464	Cox1-TDC1	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH380	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Alces alces</i>	Cox1-TDA6	18-983	Cox1-TDB6	18-464	Cox1-TDC4	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH99	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Capreolus capreolus</i>	Cox1-TDA7	18-983	Cox1-TDB7	18-464	Cox1-TDC5	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH210	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Dama dama</i>	Cox1-TDA8	18-983	Cox1-TDB2	18-464	Cox1-TDC6	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH382	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Alces alces</i>	Cox1-TDA9	18-983	Cox1-TDB3	18-464	Cox1-TDC7	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH160	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis orientalis aries</i>	Cox1-TDA10	18-983	Cox1-TDB8	18-464	Cox1-TDC8	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH313	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Cervus nippon</i>	Cox1-TDA11	18-983	Cox1-TDB2	18-464	Cox1-TDC1	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH397	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Cervus elaphus</i>	Cox1-TDA12	18-983	Cox1-TDB6	18-464	Cox1-TDC4	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH211	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Dama dama</i>	Cox1-TDA13	18-983	Cox1-TDB2	18-464	Cox1-TDC9	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH402	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Cervus elaphus</i>	Cox1-TDA12	18-983	Cox1-TDB6	18-464	Cox1-TDC4	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	COX1-TRICH312	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Cervus nippon</i>	Cox1-TDA14	18-983	Cox1-TDB9	18-464	Cox1-TDC10	499-845
<i>Trichuris discolor</i>	JQ996231	Liu et al. (2012b)	CN	N	<i>Bos grunniens mutus</i>	Cox1-TDA15	241-1206	Cox1-TDB10	241-687	Cox1-TDC11	722-1068
<i>Trichuris discolor</i>	HE653139	Callejón et al. (2013)	N	N	<i>Bos taurus</i>	-	-	-	-	Cox1-TDC12	18-364
<i>Trichuris discolor</i>	HE653140	Callejón et al. (2013)	N	N	<i>Bos taurus</i>	-	-	-	-	Cox1-TDC12	18-364
<i>Trichuris discolor</i>	HE653141	Callejón et al. (2013)	N	N	<i>Bos taurus</i>	-	-	-	-	Cox1-TDC12	19-365
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH320	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Cervus elaphus</i>	Cox1-TOA1	1-966	Cox1-TOB1	1-447	Cox1-TOC1	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH323	získaná sekvence	CZ	samec	<i>Cervus elaphus</i>	Cox1-TOA1	1-966	Cox1-TOB1	1-447	Cox1-TOC1	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH347	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis aries musimon</i>	Cox1-TOA2	1-966	Cox1-TOB2	1-447	Cox1-TOC2	482-828

Tabulka 6: Haplotypy odvozené na základě sekvencí genu mt-COX1 – 2.část.

Druh	Označení sekvence	Autor	Země původu	Pohlaví	Hostitel	Dataset A		Dataset B		Dataset C	
						Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH351	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Dama dama</i>	Cox1-TOA2	1-966	Cox1-TOB2	1-447	Cox1-TOC2	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH235	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis orientalis aries</i>	Cox1-TOA3	1-966	Cox1-TOB3	1-447	Cox1-TOC3	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH322	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Cervus elaphus</i>	Cox1-TOA4	1-966	Cox1-TOB4	1-447	Cox1-TOC3	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH381	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Alces alces</i>	Cox1-TOA5	1-966	Cox1-TOB1	1-447	Cox1-TOC1	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH358	získaná sekvence	CZ	samec	<i>Dama dama</i>	Cox1-TOA6	1-966	Cox1-TOB5	1-447	Cox1-TOC4	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH17	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis orientalis aries</i>	Cox1-TOA7	1-966	Cox1-TOB6	1-447	Cox1-TOC3	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH103	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Capreolus capreolus</i>	Cox1-TOA8	1-966	Cox1-TOB7	1-447	Cox1-TOC5	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH356	získaná sekvence	CZ	samec	<i>Dama dama</i>	Cox1-TOA9	1-966	Cox1-TOB8	1-447	Cox1-TOC6	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH349	získaná sekvence	CZ	samec	<i>Ovis aries musimon</i>	Cox1-TOA10	1-966	Cox1-TOB9	1-447	Cox1-TOC7	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH350	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis aries musimon</i>	Cox1-TOA11	1-966	Cox1-TOB10	1-447	Cox1-TOC8	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH15	získaná sekvence	CZ	samec	<i>Ovis orientalis aries</i>	Cox1-TOA12	1-966	Cox1-TOB6	1-447	Cox1-TOC9	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH253	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Capreolus capreolus</i>	Cox1-TOA13	1-966	Cox1-TOB8	1-447	Cox1-TOC10	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH362	získaná sekvence	CZ	samec	<i>Dama dama</i>	Cox1-TOA14	1-966	Cox1-TOB11	1-447	Cox1-TOC11	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH164	získaná sekvence	CZ	samec	<i>Capreolus capreolus</i>	Cox1-TOA15	1-966	Cox1-TOB12	1-447	Cox1-TOC12	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	COX1-TRICH163	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis orientalis aries</i>	Cox1-TOA16	1-966	Cox1-TOB12	1-447	Cox1-TOC13	482-828
<i>Trichuris ovis</i>	JQ996232	Liu et al. (2012b)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	Cox1-TOA17	241-1206	Cox1-TOB13	241-687	Cox1-TOC14	722-1068
<i>Trichuris ovis</i>	HE653143	Callejón et al. (2013)	N	N	<i>Capra hircus</i>	-	-	-	-	Cox1-TOC15	13-359
<i>Trichuris ovis</i>	HE653144	Callejón et al. (2013)	N	N	<i>Capra hircus</i>	-	-	-	-	Cox1-TOC16	13-359
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918084	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB14	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918085	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB14	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918086	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB14	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918087	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB14	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918088	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB14	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918089	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB14	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918090	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB14	172-618	-	-

Tabulka 7: Haplotypy odvozené na základě sekvencí genu mt-COX1 – 3.část.

Druh	Označení sekvence	Autor	Země původu	Pohlaví	Hostitel	Dataset A		Dataset B		Dataset C	
						Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918091	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB14	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918092	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB13	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918093	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB14	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918094	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB14	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918095	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB13	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918096	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB15	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918097	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB14	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918098	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB14	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918099	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cox1-TOB13	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918100	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Taurotragus derbianus</i>	-	-	Cox1-TOB13	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918101	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Taurotragus derbianus</i>	-	-	Cox1-TOB16	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918102	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Taurotragus derbianus</i>	-	-	Cox1-TOB13	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918103	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Taurotragus derbianus</i>	-	-	Cox1-TOB14	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918104	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Taurotragus derbianus</i>	-	-	Cox1-TOB14	172-618	-	-
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918105	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Taurotragus derbianus</i>	-	-	Cox1-TOB13	172-618	-	-
<i>Trichuris muris</i>	KU575057	Wasimuddin et al. (2016)	CZ	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA1	157-1122	Cox1-TMB1	157-603	Cox1-TMC1	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575058	Wasimuddin et al. (2016)	CZ	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA2	157-1122	Cox1-TMB1	157-603	Cox1-TMC2	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575085	Wasimuddin et al. (2016)	ES	N	<i>Apodemus spp.</i>	Cox1-TMA2	157-1122	Cox1-TMB1	157-603	Cox1-TMC2	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575059	Wasimuddin et al. (2016)	DE	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA3	157-1122	Cox1-TMB2	157-603	Cox1-TMC3	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575083	Wasimuddin et al. (2016)	CZ	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA3	157-1122	Cox1-TMB2	157-603	Cox1-TMC3	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575060	Wasimuddin et al. (2016)	DE	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA4	157-1122	Cox1-TMB1	157-603	Cox1-TMC4	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575061	Wasimuddin et al. (2016)	CZ	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA5	157-1122	Cox1-TMB3	157-603	Cox1-TMC2	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575062	Wasimuddin et al. (2016)	DE	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA6	157-1122	Cox1-TMB4	157-603	Cox1-TMC2	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575063	Wasimuddin et al. (2016)	DE	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA7	157-1122	Cox1-TMB5	157-603	Cox1-TMC2	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575064	Wasimuddin et al. (2016)	DE	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA8	157-1122	Cox1-TMB6	157-603	Cox1-TMC5	638-984



Tabulka 8: Haplotypy odvozené na základě sekvencí genu mt-COX1 – 4.část.

Druh	Označení sekvence	Autor	Země původu	Pohlaví	Hostitel	Dataset A		Dataset B		Dataset C	
						Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]
<i>Trichuris muris</i>	KU575065	Wasimuddin et al. (2016)	DE	N	<i>Apodemus spp.</i>	Cox1-TMA9	157-1122	Cox1-TMB7	157-603	Cox1-TMC6	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575066	Wasimuddin et al. (2016)	CZ	N	<i>Apodemus spp.</i>	Cox1-TMA10	157-1122	Cox1-TMB2	157-603	Cox1-TMC7	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575067	Wasimuddin et al. (2016)	FR	N	<i>Apodemus spp.</i>	Cox1-TMA11	157-1122	Cox1-TMB8	157-603	Cox1-TMC8	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575068	Wasimuddin et al. (2016)	ES	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA12	157-1122	Cox1-TMB9	157-603	Cox1-TMC8	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575069	Wasimuddin et al. (2016)	FR	N	<i>Rattus rattus</i>	Cox1-TMA13	157-1122	Cox1-TMB10	157-603	Cox1-TMC8	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575070	Wasimuddin et al. (2016)	CZ	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA14	157-1122	Cox1-TMB1	157-603	Cox1-TMC9	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575071	Wasimuddin et al. (2016)	DE	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA15	157-1122	Cox1-TMB4	157-603	Cox1-TMC2	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575072	Wasimuddin et al. (2016)	DE	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA16	157-1122	Cox1-TMB11	157-603	Cox1-TMC3	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575073	Wasimuddin et al. (2016)	DE	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA17	157-1122	Cox1-TMB2	157-603	Cox1-TMC3	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575074	Wasimuddin et al. (2016)	CZ	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA18	157-1122	Cox1-TMB12	157-603	Cox1-TMC2	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575075	Wasimuddin et al. (2016)	CZ	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA19	157-1122	Cox1-TMB13	157-603	Cox1-TMC2	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575076	Wasimuddin et al. (2016)	DE	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA20	157-1122	Cox1-TMB2	157-603	Cox1-TMC10	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575077	Wasimuddin et al. (2016)	DE	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA21	157-1122	Cox1-TMB2	157-603	Cox1-TMC11	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575078	Wasimuddin et al. (2016)	DE	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA22	157-1122	Cox1-TMB14	157-603	Cox1-TMC12	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575079	Wasimuddin et al. (2016)	CZ	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA23	157-1122	Cox1-TMB15	157-603	Cox1-TMC11	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575080	Wasimuddin et al. (2016)	CZ	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA24	157-1122	Cox1-TMB15	157-603	Cox1-TMC13	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575081	Wasimuddin et al. (2016)	DE	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA25	157-1122	Cox1-TMB16	157-603	Cox1-TMC14	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575082	Wasimuddin et al. (2016)	CZ	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA26	157-1122	Cox1-TMB1	157-603	Cox1-TMC2	638-984
<i>Trichuris muris</i>	KU575084	Wasimuddin et al. (2016)	CZ	N	<i>Mus musculus</i>	Cox1-TMA27	157-1122	Cox1-TMB17	157-603	Cox1-TMC13	638-984
<i>Trichuris muris</i>	LC050561	Holroyd et al. (2015)	GB	N	N	Cox1-TMA28	241-1206	Cox1-TMB6	241-687	Cox1-TMC15	722-1068
<i>Trichuris suis</i>	KT449822	Hawash et al. (2015)	DK	N	<i>Suis scrofa</i>	Cox1-TSUA1	241-1206	Cox1-TSUB1	241-687	Cox1-TSUC1	722-1068
<i>Trichuris suis</i>	FM253701	Liang (2008)	N	N	<i>Suis scrofa</i>	-	-	-	-	Cox1-TSUC2	14-360
<i>Trichuris suis</i>	GU070737	Liu et al. (2012b)	CN	N	<i>Suis scrofa</i>	Cox1-TSUA2	241-1206	Cox1-TSUB2	241-687	Cox1-TSUC3	722-1068
<i>Trichuris suis</i>	HE653124	Callejón et al. (2013)	N	N	<i>Suis scrofa</i>	-	-	-	-	Cox1-TSUC4	12-358
<i>Trichuris suis</i>	HE653125	Callejón et al. (2013)	N	N	<i>Suis scrofa</i>	-	-	-	-	Cox1-TSUC5	14-360

Tabulka 9: Haplotypy odvozené na základě sekvencí genu mt-COX1 – 5.část.

Druh	Označení sekvence	Autor	Země původu	Pohlaví	Hostitel	Dataset A		Dataset B		Dataset C	
						Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]
<i>Trichuris suis</i>	HE653126	Callejón et al. (2013)	N	N	<i>Suis scrofa</i>	-	-	-	-	Cox1-TSUC4	12-358
<i>Trichuris suis</i>	HE653127	Callejón et al. (2013)	N	N	<i>Suis scrofa</i>	-	-	-	-	Cox1-TSUC6	12-358
<i>Trichuris suis</i>	HE653128	Callejón et al. (2013)	N	N	<i>Suis scrofa</i>	-	-	-	-	Cox1-TSUC6	12-358
<i>Trichuris suis</i>	HE653129	Callejón et al. (2013)	N	N	<i>Suis scrofa</i>	-	-	-	-	Cox1-TSUC6	12-358
<i>Trichuris suis</i>	HQ183740	Liang et al. (2010)	CN	N	<i>Suis scrofa</i>	-	-	-	-	Cox1-TSUC7	19-365
<i>Trichuris suis</i>	HQ183741	Liang et al. (2010)	CN	N	<i>Suis scrofa</i>	-	-	-	-	Cox1-TSUC8	19-365
<i>Trichuris suis</i>	HQ183742	Liang et al. (2010)	CN	N	<i>Suis scrofa</i>	-	-	-	-	Cox1-TSUC8	19-365
<i>Trichuris suis</i>	HQ204208	Zhang et al. (2010)	CN	N	<i>Suis scrofa</i>	-	-	-	-	Cox1-TSUC9	14-360
<i>Trichuris suis</i>	HQ204209	Zhang et al. (2010)	CN	N	<i>Suis scrofa</i>	-	-	-	-	Cox1-TSUC10	14-360
<i>Trichuris suis</i>	HQ204210	Zhang et al. (2010)	CN	N	<i>Suis scrofa</i>	-	-	-	-	Cox1-TSUC11	14-360
<i>Trichuris suis</i>	JF690969	Petrasova et al. (2011)	SK	N	<i>Suis scrofa</i>	-	-	-	-	Cox1-TSUC12	2-348
<i>Trichuris suis</i>	KT449823	Hawash et al. (2015)	UG	N	<i>Suis scrofa</i>	Cox1-TSUA3	241-1206	Cox1-TSUB3	241-687	Cox1-TSUC13	722-1068
<i>Trichuris trichiura</i>	GU385218	Liu et al. (2012b)	CN	N	<i>Homo sapiens</i>	Cox1-TTA1	241-1206	Cox1-TTB1	241-687	Cox1-TTC1	722-1068
<i>Trichuris trichiura</i>	AP017704	Kikuchi et al. (2015)	N	N	N	Cox1-TTA2	244-1209	Cox1-TTB2	244-690	Cox1-TTC2	725-1071
<i>Trichuris trichiura</i>	HE653116	Callejón et al. (2013)	ES	N	N	-	-	-	-	Cox1-TTC3	20-366
<i>Trichuris trichiura</i>	HE653117	Callejón et al. (2013)	ES	N	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	-	-	-	-	Cox1-TTC3	20-366
<i>Trichuris trichiura</i>	HE653118	Callejón et al. (2013)	ES	N	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	-	-	-	-	Cox1-TTC4	20-366
<i>Trichuris trichiura</i>	HE653120	Callejón et al. (2013)	ES	N	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	-	-	-	-	Cox1-TTC3	20-366
<i>Trichuris trichiura</i>	FR846241	Callejón et al. (2011)	N	N	N	-	-	-	-	Cox1-TTC3	20-366
<i>Trichuris trichiura</i>	KT449826	Hawash et al. (2015)	UG	N	<i>Homo sapiens</i>	Cox1-TTA3	241-1206	Cox1-TTB3	241-687	Cox1-TTC5	722-1068
<i>Trichuris globulosa</i>	LN626969	Callejón et al. (2015)	IR	samice	<i>Camellus sp.</i>	-	-	-	-	Cox1-TGC1	8-354
<i>Trichuris globulosa</i>	LN626970	Callejón et al. (2015)	IR	samice	<i>Camellus sp.</i>	-	-	-	-	Cox1-TGC1	8-354
<i>Trichuris globulosa</i>	LN626971	Callejón et al. (2015)	IR	samice	<i>Camellus sp.</i>	-	-	-	-	Cox1-TGC1	8-354
<i>Trichuris skrjabini</i>	LN626972	Callejón et al. (2015)	ZA	samec	<i>Ovis aries</i>	-	-	-	-	Cox1-TSKC1	8-354
<i>Trichuris skrjabini</i>	HQ183744	Liang et al. (2010)	CN	N	<i>Capra hircus</i>	-	-	-	-	Cox1-TSKC2	19-365

Tabulka 10: Haplotypy odvozené na základě sekvencí genu mt-COX1 – 6.část.

Druh	Označení sekvence	Autor	Země původu	Pohlaví	Hostitel	Dataset A		Dataset B		Dataset C	
						Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]
<i>Trichuris skrjabini</i>	HQ183743	Liang et al. (2010)	CN	N	<i>Capra hircus</i>	-	-	-	-	Cox1-TSKC2	19-365
<i>Trichuris skrjabini</i>	HQ183745	Liang et al. (2010)	CN	N	<i>Capra hircus</i>	-	-	-	-	Cox1-TSKC2	19-365
<i>Trichuris skrjabini</i>	LN626973	Callejón et al. (2015)	ZA	samec	<i>Ovis aries</i>	-	-	-	-	Cox1-TSKC1	8-354
<i>Trichuris skrjabini</i>	HE653123	Callejón et al. (2013)	N	N	<i>Capra hircus</i>	-	-	-	-	Cox1-TSKC3	19-365
<i>Trichuris skrjabini</i>	HE653122	Callejón et al. (2013)	N	N	<i>Capra hircus</i>	-	-	-	-	Cox1-TSKC3	19-365
<i>Trichuris skrjabini</i>	HE653121	Callejón et al. (2013)	N	N	<i>Capra hircus</i>	-	-	-	-	Cox1-TSKC3	19-365
<i>Trichuris skrjabini</i>	AM932679	Cutillas a Rocio (2008)	N	N	<i>Capra hircus</i>	-	-	-	-	Cox1-TSKC3	19-365
<i>Trichuris arvicolae</i>	FR851275	Callejón et. (2013)	FI	N	<i>Microtus agrestis</i>	-	-	-	-	Cox1-TAC1	11-357
<i>Trichuris arvicolae</i>	FR851276	Callejón et. (2013)	FI	N	<i>Microtus agrestis</i>	-	-	-	-	Cox1-TAC2	11-357
<i>Trichuris arvicolae</i>	FR851277	Callejón et. (2013)	FI	N	<i>Microtus agrestis</i>	-	-	-	-	Cox1-TAC3	11-357
<i>Trichuris arvicolae</i>	FR851278	Callejón et. (2013)	FI	N	<i>Microtus agrestis</i>	-	-	-	-	Cox1-TAC4	10-356
<i>Trichuris arvicolae</i>	FR851279	Callejón et. (2013)	GB	N	<i>Microtus agrestis</i>	-	-	-	-	Cox1-TAC4	10-356
<i>Trichuris arvicolae</i>	FR851280	Callejón et. (2013)	SE	N	<i>Microtus agrestis</i>	-	-	-	-	Cox1-TAC5	11-357
<i>Trichuris arvicolae</i>	FR851281	Callejón et. (2013)	IT	N	<i>Microtus arvalis</i>	-	-	-	-	Cox1-TAC6	11-357
<i>Trichuris arvicolae</i>	FR851282	Callejón et. (2013)	HR	N	<i>Microtus arvalis</i>	-	-	-	-	Cox1-TAC7	11-357
<i>Trichuris arvicolae</i>	FR851283	Callejón et. (2013)	HR	N	<i>Microtus arvalis</i>	-	-	-	-	Cox1-TAC8	11-357
<i>Trichuris arvicolae</i>	FR851284	Callejón et. (2013)	ES	N	<i>Microtus arvalis</i>	-	-	-	-	Cox1-TAC9	11-357
<i>Trichuris arvicolae</i>	FR851285	Callejón et. (2013)	FI	N	<i>Microtus agrestis</i>	-	-	-	-	Cox1-TAC10	11-357
<i>Trichuris arvicolae</i>	FR851286	Callejón et. (2013)	FI	N	<i>Microtus agrestis</i>	-	-	-	-	Cox1-TAC11	11-357
<i>Trichuris arvicolae</i>	FR851287	Callejón et. (2013)	FR	N	<i>Myodes glareolus</i>	-	-	-	-	Cox1-TAC12	11-357
<i>Trichuris arvicolae</i>	FR851288	Callejón et. (2013)	ES	N	<i>Myodes glareolus</i>	-	-	-	-	Cox1-TAC13	11-357
<i>Trichuris navonae</i>	HG934457	Callejón et. (2016)	AR	N	<i>Thaptomys nigrita</i>	-	-	-	-	Cox1-TNC1	17-363
<i>Trichuris navonae</i>	HG934458	Callejón et. (2016)	AR	N	<i>Akodon montensis</i>	-	-	-	-	Cox1-TNC2	17-363
<i>Trichuris navonae</i>	HG934459	Callejón et. (2016)	AR	N	<i>Akodon montensis</i>	-	-	-	-	Cox1-TNC3	17-363
<i>Trichuris navonae</i>	HG934461	Callejón et. (2016)	AR	N	<i>Akodon montensis</i>	-	-	-	-	Cox1-TNC4	17-363

Tabulka 11: Haplotypy odvozené na základě sekvencí genu mt-COX1 – 7.část.

Druh	Označení sekvence	Autor	Země původu	Pohlaví	Hostitel	Dataset A		Dataset B		Dataset C	
						Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]
<i>Trichuris navonae</i>	HG934462	Callejón et. (2016)	AR	N	<i>Akodon montensis</i>	-	-	-	-	Cox1-TNC3	17-363
<i>Trichuris navonae</i>	HG934464	Callejón et. (2016)	AR	N	<i>Akodon montensis</i>	-	-	-	-	Cox1-TNC5	17-363
<i>Trichuris pardinasi</i>	HG934451	Callejón et. (2016)	AR	N	<i>Phyllotis bonariensis</i>	-	-	-	-	Cox1-TPC1	17-363
<i>Trichuris pardinasi</i>	HG934452	Callejón et. (2016)	AR	N	<i>Phyllotis bonariensis</i>	-	-	-	-	Cox1-TPC2	17-363
<i>Trichuris pardinasi</i>	HG934454	Callejón et. (2016)	AR	N	<i>Phyllotis xanthopygus</i>	-	-	-	-	Cox1-TPC3	17-363
<i>Trichuris pardinasi</i>	HG934455	Callejón et. (2016)	AR	N	<i>Phyllotis xanthopygus</i>	-	-	-	-	Cox1-TPC4	17-363
<i>Trichuris pardinasi</i>	HG934456	Callejón et. (2016)	AR	N	<i>Phyllotis xanthopygus</i>	-	-	-	-	Cox1-TPC5	17-363
<i>Trichuris vulpis</i>	HE653135	Callejón et. (2013)	ES	N	<i>Canis lupus familiaris</i>	-	-	-	-	Cox1-TVC1	12-358
<i>Trichuris vulpis</i>	HE653136	Callejón et. (2013)	ES	N	<i>Canis lupus familiaris</i>	-	-	-	-	Cox1-TVC1	12-358
<i>Trichuris vulpis</i>	HE653137	Callejón et. (2013)	ES	N	<i>Canis lupus familiaris</i>	-	-	-	-	Cox1-TVC1	12-358
<i>Trichuris vulpis</i>	HE653138	Callejón et. (2013)	ES	N	<i>Canis lupus familiaris</i>	-	-	-	-	Cox1-TVC1	12-358
<i>Trichinella spiralis</i>	KM357422	Mohaas et al. (2014)	PL	N	<i>Suis scrofa</i>	Cox1-TSPA1	244-1209	Cox1-TSPB1	244-690	Cox1-TSPC1	725-1071
<i>Trichinella spiralis</i>	AF293969	Lavrov a Brown (2001)	N	N	N	Cox1-TSPA1	10865-11830	Cox1-TSPB1	10865-11311	Cox1-TSPC1	11346-11692

Tabulka 12: Haplotypy odvozené na základě sekvencí genu mt-Cytb – 1.část.

Druh	Označení sekvence	Autor	Země původu	Pohlaví	Hostitel	Dataset A		Dataset B	
						Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH30	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Capreolus capreolus</i>	Cytb-TDA1	7-671	Cytb-TDB1	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH95	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Capreolus capreolus</i>	Cytb-TDA3	7-671	Cytb-TDB2	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH99	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Capreolus capreolus</i>	Cytb-TDA9	7-671	Cytb-TDB8	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH59	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis orientalis aries</i>	Cytb-TDA8	7-671	Cytb-TDB5	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH140	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis aries musimon</i>	Cytb-TDA12	7-671	Cytb-TDB6	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH141	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis aries musimon</i>	Cytb-TDA6	7-671	Cytb-TDB3	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH160	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis orientalis aries</i>	Cytb-TDA11	7-671	Cytb-TDB7	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH195	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Dama dama</i>	Cytb-TDA8	7-671	Cytb-TDB5	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH312	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Cervus nippon</i>	Cytb-TDA2	7-671	Cytb-TDB10	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH313	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Cervus nippon</i>	Cytb-TDA8	7-671	Cytb-TDB5	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH397	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Cervus elaphus</i>	Cytb-TDA7	7-671	Cytb-TDB3	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH402	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Cervus elaphus</i>	Cytb-TDA7	7-671	Cytb-TDB3	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH65	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Dama dama</i>	Cytb-TDA12	7-671	Cytb-TDB6	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH210	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Dama dama</i>	Cytb-TDA13	7-671	Cytb-TDB6	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH211	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Dama dama</i>	Cytb-TDA4	7-671	Cytb-TDB2	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH380	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Alces alces</i>	Cytb-TDA3	7-671	Cytb-TDB2	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH382	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Alces alces</i>	Cytb-TDA10	7-671	Cytb-TDB9	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	Cytb-TRICH98	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Capreolus capreolus</i>	Cytb-TDA5	7-671	Cytb-TDB4	75-502
<i>Trichuris discolor</i>	JQ996231	Liu et al. (2012b)	CN	N	<i>Bos grunniens mutus</i>	Cytb-TDA14	8417-9081	Cytb-TDB11	8485-8912
<i>Trichuris discolor</i>	LM994702	Callejón et al. (2015)	N	N	<i>Bos taurus</i>	-	-	Cytb-TDB10	29-456
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH103	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Capreolus capreolus</i>	Cytb-TOA3	1-665	Cytb-TOB1	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH15	získaná sekvence	CZ	samec	<i>Ovis orientalis aries</i>	Cytb-TOA1	1-665	Cytb-TOB2	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH163	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis orientalis aries</i>	Cytb-TOA4	1-665	Cytb-TOB11	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH164	získaná sekvence	CZ	samec	<i>Capreolus capreolus</i>	Cytb-TOA5	1-665	Cytb-TOB3	69-496

Tabulka 13: Haplotypy odvozené na základě sekvencí genu mt-Cytb – 2.část.

Druh	Označení sekvence	Autor	Země původu	Pohlaví	Hostitel	Dataset A		Dataset B	
						Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH17	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis orientalis aries</i>	Cytb-TOA2	1-665	Cytb-TOB6	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH235	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis orientalis aries</i>	Cytb-TOA6	1-665	Cytb-TOB7	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH253	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Capreolus capreolus</i>	Cytb-TOA7	1-665	Cytb-TOB5	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH320	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Cervus elaphus</i>	Cytb-TOA8	1-665	Cytb-TOB4	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH322	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Cervus elaphus</i>	Cytb-TOA9	1-665	Cytb-TOB8	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH323	získaná sekvence	CZ	samec	<i>Cervus elaphus</i>	Cytb-TOA8	1-665	Cytb-TOB4	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH347	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis aries musimon</i>	Cytb-TOA10	1-665	Cytb-TOB2	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH349	získaná sekvence	CZ	samec	<i>Ovis aries musimon</i>	Cytb-TOA10	1-665	Cytb-TOB2	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH350	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Ovis aries musimon</i>	Cytb-TOA10	1-665	Cytb-TOB2	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH351	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Dama dama</i>	Cytb-TOA11	1-665	Cytb-TOB2	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH356	získaná sekvence	CZ	samec	<i>Dama dama</i>	Cytb-TOA12	1-665	Cytb-TOB9	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH358	získaná sekvence	CZ	samec	<i>Dama dama</i>	Cytb-TOA13	1-665	Cytb-TOB12	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH362	získaná sekvence	CZ	samec	<i>Dama dama</i>	Cytb-TOA14	1-665	Cytb-TOB10	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	Cytb-TRICH381	získaná sekvence	CZ	samice	<i>Alces alces</i>	Cytb-TOA15	1-665	Cytb-TOB13	69-496
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918106	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB14	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918107	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB15	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918108	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB15	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918109	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB15	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918110	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB15	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918112	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB15	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918113	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB15	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918118	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB15	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918120	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB15	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918122	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Taurotragus derbianus</i>	-	-	Cytb-TOB15	1-428

Tabulka 14: Haplotypy odvozené na základě sekvencí genu mt-Cytb – 3.část.

Druh	Označení sekvence	Autor	Země původu	Pohlaví	Hostitel	Dataset A		Dataset B	
						Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918123	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Taurotragus derbianus</i>	-	-	Cytb-TOB15	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918124	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Taurotragus derbianus</i>	-	-	Cytb-TOB15	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918125	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Taurotragus derbianus</i>	-	-	Cytb-TOB15	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918126	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Taurotragus derbianus</i>	-	-	Cytb-TOB15	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ996232	Liu et al. (2012b)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	Cytb-TOA16	8435-9099	Cytb-TOB15	8503-8930
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918111	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB16	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918114	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB17	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918127	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Taurotragus derbianus</i>	-	-	Cytb-TOB17	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918115	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB18	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918116	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB19	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918117	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB20	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918121	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB20	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	JQ918119	Wang et al. (2013)	CN	N	<i>Addax nasomaculatus</i>	-	-	Cytb-TOB21	1-428
<i>Trichuris ovis</i>	LM994697	Callejón et al. (2015)	N	N	<i>Capra hircus</i>	-	-	Cytb-TOB22	29-456
<i>Trichuris ovis</i>	LN626976	Callejón et al. (2014)	ZA	N	N	-	-	Cytb-TOB23	22-449
<i>Trichuris ovis</i>	LN626977	Callejón et al. (2014)	ZA	N	N	-	-	Cytb-TOB23	22-449
<i>Trichuris globulosa</i>	LN626974	Callejón et al. (2014)	IR	N	N	-	-	Cytb-TGB1	22-449
<i>Trichuris skrjabini</i>	LM994700	Callejón et al. (2015)	N	N	<i>Capra hircus</i>	-	-	Cytb-TSKB1	29-456
<i>Trichuris skrjabini</i>	LN626979	Callejón et al. (2014)	ZA	N	N	-	-	Cytb-TSKB3	22-449
<i>Trichuris skrjabini</i>	LN626978	Callejón et al. (2014)	ZA	N	N	-	-	Cytb-TSKB2	22-449
<i>Trichuris muris</i>	LC050561	Holroyd et al. (2015)	GB	N	N	Cytb-TMA1	8427-9091	Cytb-TMB1	8495-8922
<i>Trichuris muris</i>	LM994701	Callejón et al. (2015)	N	N	<i>Mus domesticus</i>	-	-	Cytb-TMB2	29-456
<i>Trichuris leporis</i>	LM994705	Callejón et al. (2015)	N	N	<i>Lepus europaeus</i>	-	-	Cytb-TLB1	29-456
<i>Trichuris arvicolae</i>	LM994698	Callejón et al. (2015)	N	N	<i>Myodes glareolus</i>	-	-	Cytb-TAB1	29-456

Tabulka 15: Haplotypy odvozené na základě sekvencí genu mt-Cytb – 4. část.

Druh	Označení sekvence	Autor	Země původu	Pohlaví	Hostitel	Dataset A		Dataset B	
						Haplotypy	Rozsah [bp]	Haplotypy	Rozsah [bp]
<i>Trichuris suis</i>	KT449822	Hawash et al. (2015)	DK	N	<i>Sus scrofa</i>	Cytb-TSUA1	8732-9396	Cytb-TSUB2	8800-9223
<i>Trichuris suis</i>	LM994696	Callejón et al. (2015)	N	N	<i>Sus scrofa</i>	-	-	Cytb-TSUB2	29-456
<i>Trichuris suis</i>	GU070737	Liu et al. (2012b)	CN	N	<i>Sus scrofa</i>	Cytb-TSUA2	8670-9334	Cytb-TSUB1	8738-9165
<i>Trichuris suis</i>	KT449823	Hawash et al. (2015)	UG	N	<i>Sus scrofa</i>	Cytb-TSUA3	8645-9309	Cytb-TSUB3	8713-9140
<i>Trichuris trichiura</i>	AP017704	Holroyd et al. (2015)	N	N	N	Cytb-TTA2	8487-9151	Cytb-TTB1	8555-8982
<i>Trichuris trichiura</i>	GU385218	Liu et al. (2012b)	CN	N	<i>Homo sapiens</i>	Cytb-TTA1	8441-9105	Cytb-TTB2	8509-8936
<i>Trichuris trichiura</i>	KT449826	Hawash et al. (2015)	UG	N	<i>Homo sapiens</i>	Cytb-TTA3	8412-9076	Cytb-TTB3	8480-8907
<i>Trichuris colobae</i>	LM994704	Callejón et al. (2015)	N	N	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	-	-	Cytb-TCB1	29-456
<i>Trichuris vulpis</i>	LM994699	Callejón et al. (2015)	N	N	<i>Canis lupus familiaris</i>	-	-	Cytb-TVB1	29-456
<i>Trichinella spiralis</i>	KM357422	Mohandas et al. (2014)	PL	N	<i>Sus scrofa</i>	Cytb-TSPA1	11053-11717	Cytb-TSPB1	11121-11541
<i>Trichinella spiralis</i>	AF293969	Lavrov and Brown (2001)	N	N	N	Cytb-TSPA1	5090-5754	Cytb-TSPB1	5158-5585



Při bioinformatickém zpracování jsme vycházeli z předpokladu, že v rámci jednoho zoologického rodu se uvnitř studovaných mitochondriálních genů nebudou vyskytovat delečně-inzerční polymorfismy. Tento předpoklad byl potvrzen na základě alignmentů všech získaných haplotypových sekvencí u obou studovaných genů. Polymorfismy, které jsme identifikovali, měly charakter nukleotidových substitucí. Většina z těchto substitucí vykazovala synonymní charakter, což znamená, že tyto mutace nevedly ke změnám aminokyselinového složení kódovaného peptidu. Minimum mutací představovalo nesynonymní sekvenční změny. Přesto tyto změny aminokyselinového složení kódovaných peptidů dle hodnocení bioinformatickým softwarem nevedlo ke změně struktur domén typických pro geny mt-COX1 a mt-Cytb. Sekvenační analýza prokázala vnitropopulační polymorfismus u *T. discolor* a *T. ovis* u obou studovaných mitochondriálních genů. Vzhledem k tomu, že při diplomové práci bylo získáno celkem 36 sekvencí, které byly porovnávány s desítkami publikovaných sekvencí, jsem se rozhodla pro větší názornost neuvádět všechny nalezené SNP. Za mnohem vhodnější způsob prezentace jsem považovala jejich zpracování v podobě fylogenetické analýzy.

## **5.2 Fylogenetická analýza zpracovaná na základě sekvenčních polymorfismů mt-COX1 a mt-Cytb**

V předcházející kapitole práce jsem uvedla, jakým způsobem byly vybrány jednotlivé datasey, a v jakých pozicích se nacházejí sekvence použité pro odvození haplotypů. Z tabulek tudíž vyplývá, že u genu mt-COX1 byly hodnoceny celkem tři datasey (Tabulka 5 – 11) a u genu mt-Cytb datasey dva (Tabulka 12 – 15). Z těchto tabulek rovněž vyplývá, že jednotlivé datasey se od sebe odlišují četností záznamů pro dva modelové druhy diplomové práce- *T. ovis* a *T. discolor*. Liší se rovněž i dalšími zástupci rodu *Trichuris*, kteří byli do daných datasetů zahrnuti. Tento fakt je způsoben tím, že různí autoři se u různých druhů rodu *Trichuris* zabývají různými oblastmi genu mt-COX1 a mt-Cytb.

### **5.2.1 Volba optimálních modelů pro fylogenetickou analýzu**

Pro fylogenetickou analýzu je klíčovým faktorem volba optimálního modelu, na jehož základě probíhá konstrukce fylogenetického stromu. V následující Tabulce 16 jsou uvedeny výstupy programu MAFFT version 7 (Katoh a Toh, 2008). Těmito výstupy jsou navržené modely, které byly získány na základě třech různých kritérií, a které jsou podle těchto kritérií

považovány za optimální. Pro vlastní fylogenetickou analýzu jsem použila takový model, který byl pro daný dataset a daný gen doporučen na základě většího počtu testovacích kritérií.

Tabulka 16: Přehled modelů pro fylogenetickou analýzu u jednotlivých datasetů.

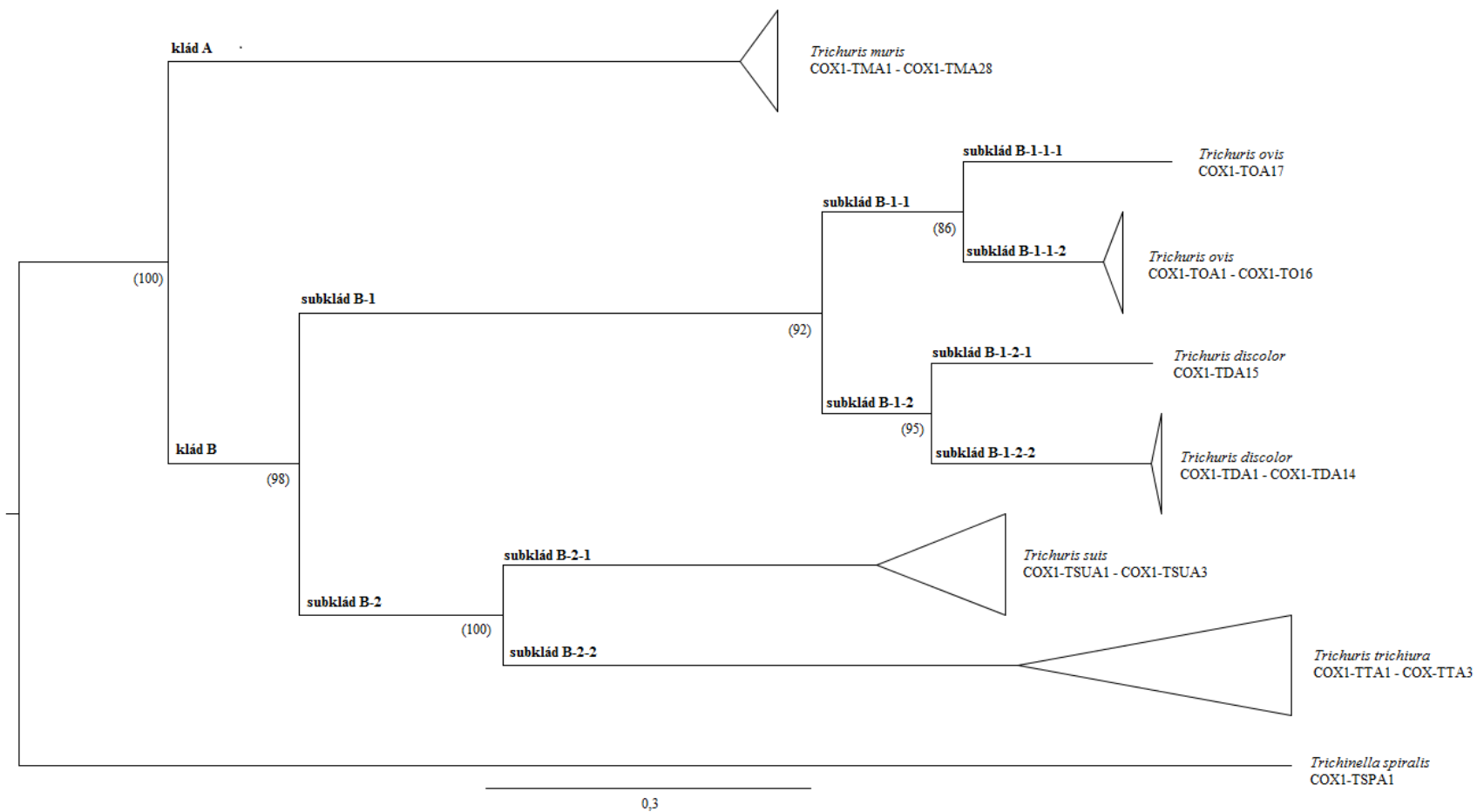
Datasety	Testovací kritérium		
	AIC	BIC	DT
<b>COX1 DATASET A</b>	012342+I+G+F	012232+I+G+F	012232+I+G+F
<b>COX1 DATASET B</b>	012232+I+G+F	012232+I+G+F	012232+I+G+F
<b>COX1 DATASET C</b>	012232+I+G+F	012212+I+G+F	012212+I+G+F
<b>CYTB DATASET A</b>	010230+I+G+F	010230+I+G+F	010230+I+G+F
<b>CYTB DATASET B</b>	012342+I+G+F	012342+I+G+F	012342+I+G+F

Modely, které byly doporučeny na základě většího počtu testovacích kritérií a podle kterých byla zpracována fylogenetická analýza jsou v Tabulce 16 vyznačeny žlutou barvou.

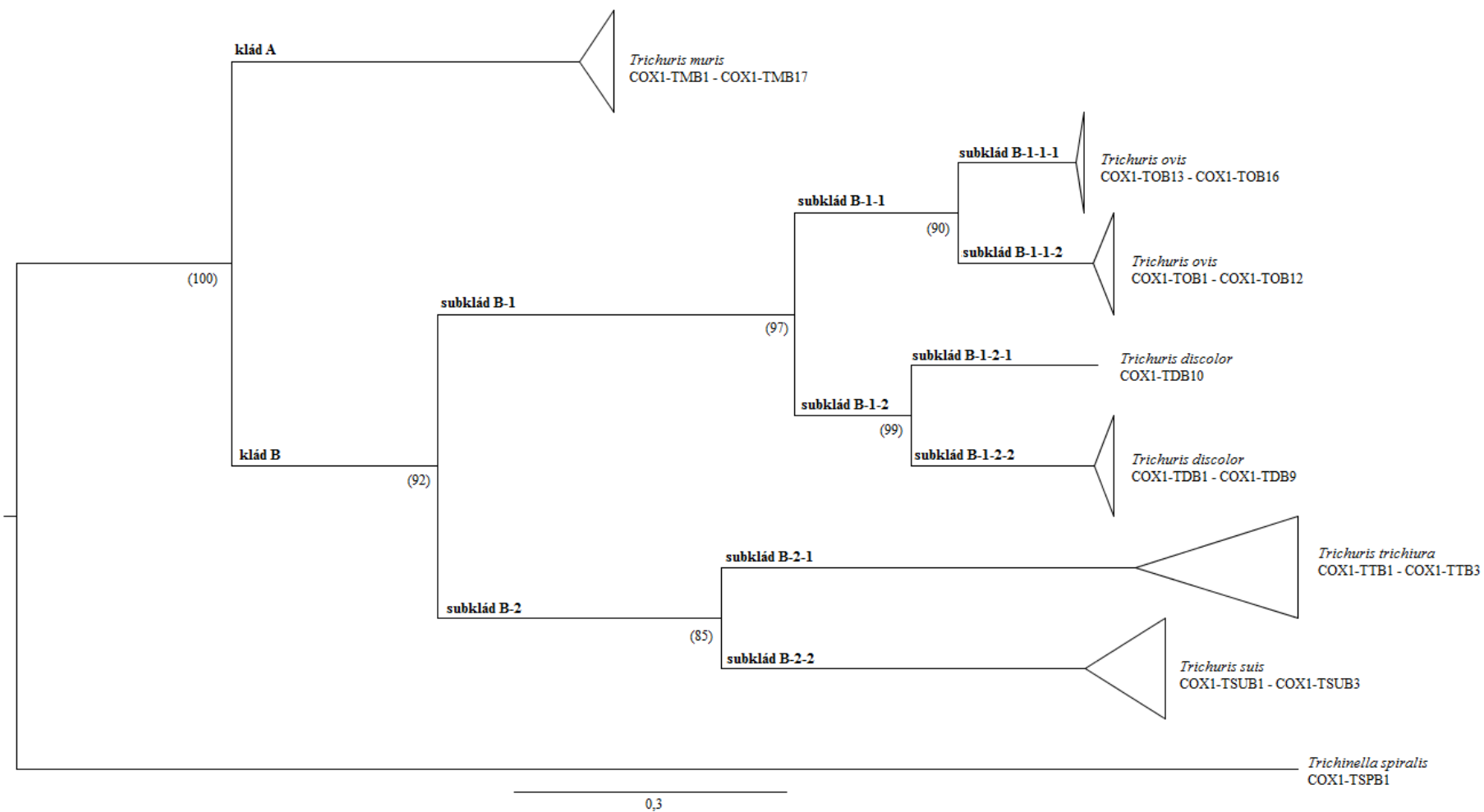
### 5.2.2 Fylogenetická analýza

Z Tabulky 16 vyplývá, že fylogenetická analýza byla zpracována na základě tří datasetů odvozených od genu mt-COX1 a dvou datasetů odvozených od genu mt-Cytb. Výsledky těchto analýz jsou prezentovány v následujících pěti fylogramech (Obr. 5 - 9).

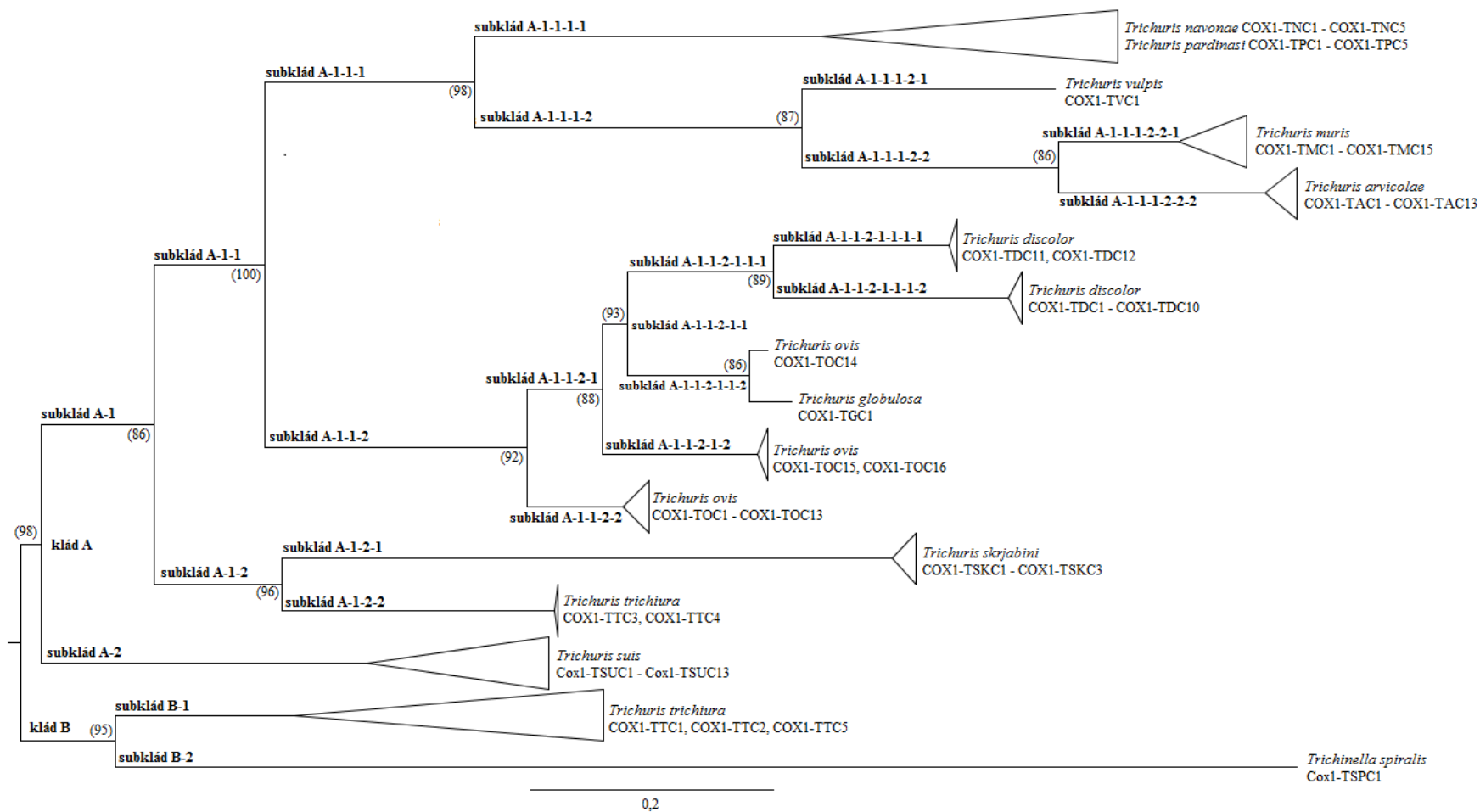
Obr. 5: Fylogenetický strom vytvořený na základě datasetu A genu mt-COX1.



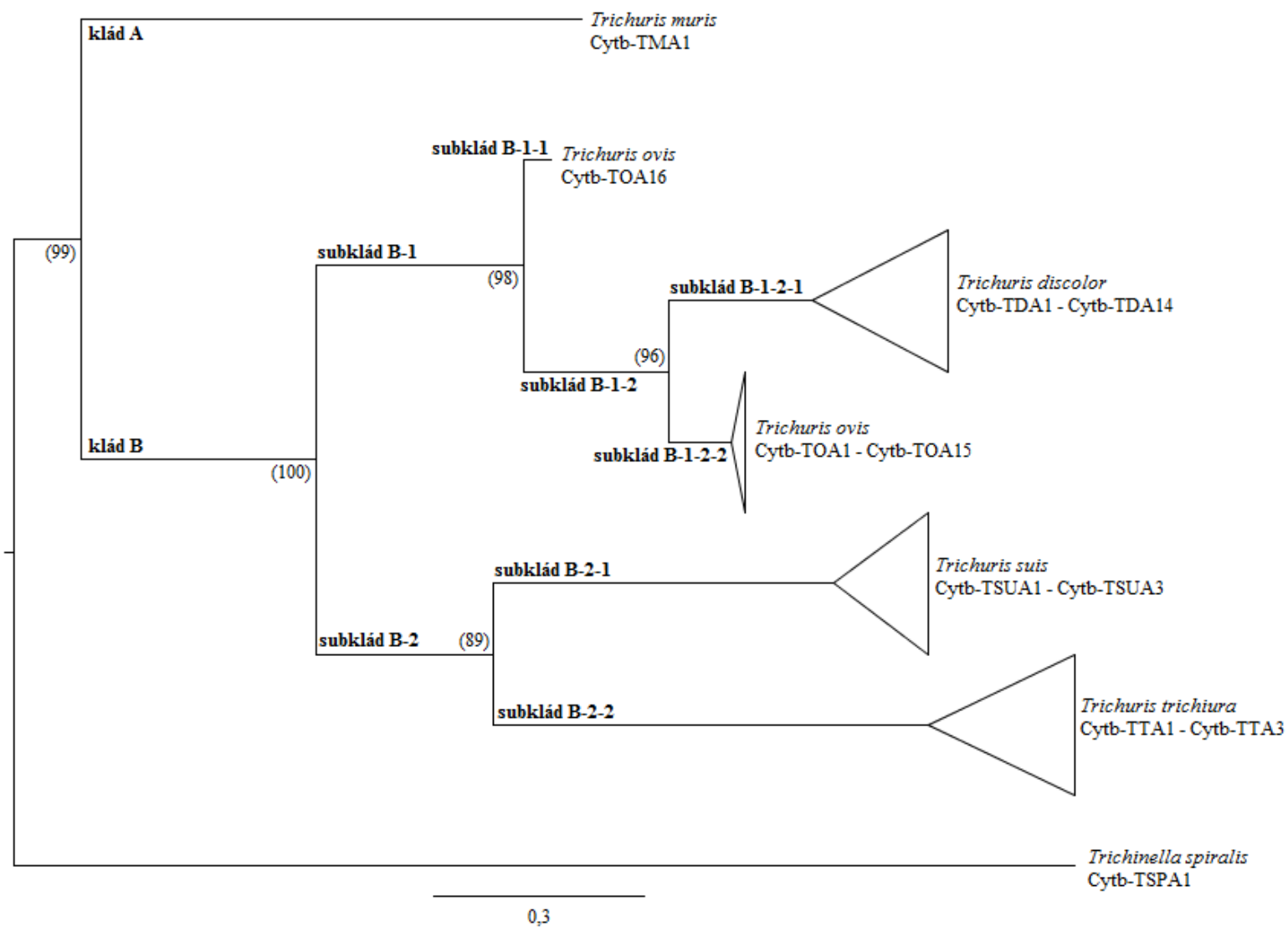
Obr. 6: Fylogenetický strom vytvořený na základě datasetu B genu mt-COX1.



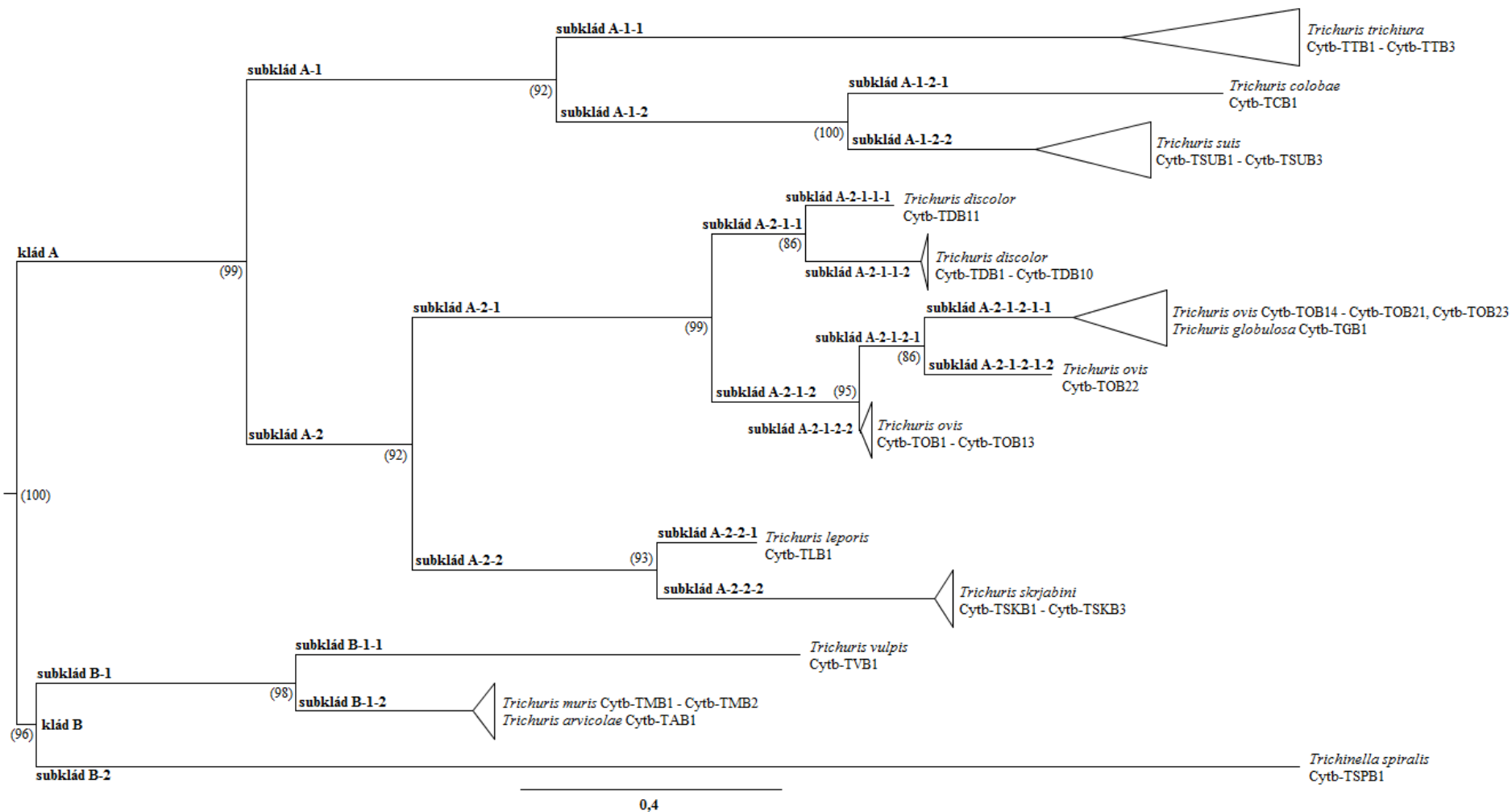
Obr. 7: Fylogenetický strom vytvořený na základě datasetu C genu mt-COX1.



Obr. 8: Fylogenetický strom vytvořený na základě datasetu A genu mt-Cytb.



Obr. 9: Fylogenetický strom vytvořený na základě datasetu B genu mt-Cytb.



### 5.3 Hodnocení výskytu endosymbiotických bakterií rodu *Wolbachia*

Použitý PCR marker podle Werren a Windsor (2000) dokázal spolehlivě detekovat bakterie rodu *Wolbachia* v chované populaci *D. melanogaster*. Z 50 testovaných samic byla *Wolbachia* prokázána ve 42 jedincích a z 50 testovaných samců byla prokázána u 36 jedinců. Díky této testovací populaci byla prokázána vysoká specifita a senzitivita použitého markeru. Bohužel u žádného ze zástupců *T. ovis* a *T. discolor* nebyla *Wolbachia* prokázána. Na následujícím obrázku (Obr. 10) je uveden elektroforeogram s PCR amplikony u *D. melanogaster*

Obr. 10: Elektroforeogram PCR markerku, detekující přítomnost bakterií rodu *Wolbachia*.



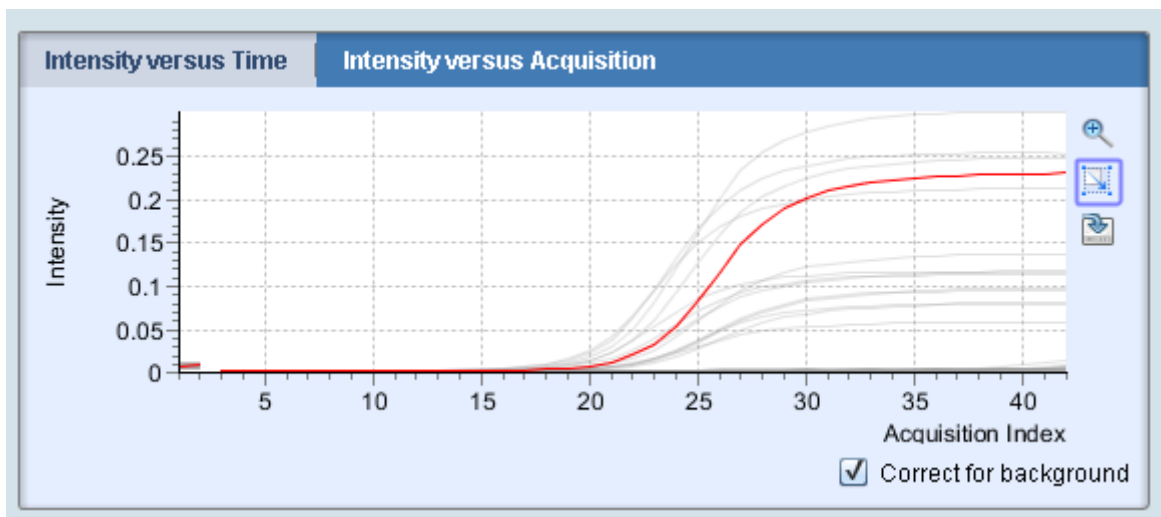
S - GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo SCIENTIFIC)

Na Obr. 11 a 12 jsou znázorněny výsledky analýzy pomocí qRT-PCR. Obr. 11 představuje amplifikační křivky u populace *D. melanogaster*. Z průběhu amplifikačních křivek vyplývá, že k exponenciálnímu nárůstu dochází přibližně po 18 cyklech amplifikace. Tento výsledek svědčí o tom, že u všech sledovaných jedinců byla přibližně shodná intenzita výskytu bakterií rodu *Wolbachia*. U všech hodnocených jedinců *T. discolor* a *T. ovis* k amplifikaci

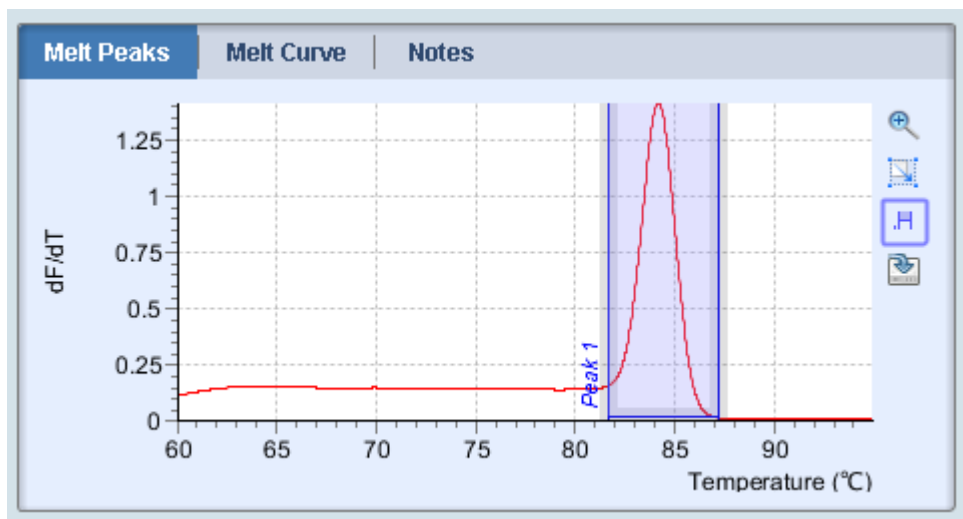


nedocházelo, a tudíž grafický výstup neobsahoval žádné křivky. Na Obr. 12 je znázorněn výstup postamplifikační analýzy pomocí křivky tání. U všech amplikonů *D. melanogaster* křivka tání představovala symetrický pík, který svědčí o specifičnosti amplifikace a koresponduje s jasně ohraničenými píky, uvedenými na Obr. 10.

Obr. 11: Průběh amplifikačních křivek.



Obr. 12: Křivka tání amplikonu.



## 6 Diskuze

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na studium variability dvou mitochondriálních genů, které sloužily jako molekulární markery pro druhy *T. ovis* a *T. discolor*. Oba druhy parazitických hlístic byly získány z různých druhů přežvýkavců z České republiky. Bylo vybráno 18 jedinců od každého zkoumaného druhu rodu *Trichuris*, přičemž morfologická analýza byla provedena na Katedře zoologie a rybářství FAPPZ ČZU v Praze. Výsledky morfologické analýzy korespondovaly se zařazením pomocí dvou inzerčně-delečních markerů, navržených dle Vejl et al. (2017). Tento postup druhové identifikace sekvenovaných jedinců považuji za důležitý, protože řada autorů ve svém výzkumu neuvedla, jakým způsobem jednotlivé zástupce rodu *Trichuris* identifikovala, což mohlo případně vést k nesprávné interpretaci dat a zkreslení závěrů prováděných experimentů.

Nejpoužívanějšími molekulárními markery pro diagnostické studie a analýzu genetických vztahů u zkoumaných druhů rodu *Trichuris* jsou úseky ribozomální DNA ITS1 a ITS2. (Oliveros et al., 2000; Cutillas et al., 2002; Callejón et al., 2012). Nicméně tyto oblasti zahrnují četné repetice, takže výsledný alignment sekvencí i mezi úzce příbuznými jedinci bude obsahovat řadu mezer v důsledku delečně-inzerčních mutací. To vedlo některé autory k závěru, že druhové a fylogenetické analýzy rodu *Trichuris* je nutno doplnit dalšími genetickými markery, jako jsou geny mitochondriální DNA (Lavrov and Brown, 2001; Cutillas et al. 2009; Callejón et al., 2012; 2013; Liu et al. 2012b; Hawash et al. 2015). Mitochondriální DNA se ukázala jako vhodná v důsledku maternální dědičnosti, rychlosti divergence, minimu rekombinací a obvykle snadné PCR amplifikaci i z malého množství biologického materiálu, z čehož jsem vycházela v diplomové práci. Mitochondriální geny mt-COX1 a mt-Cytb se standardně používají v barcoding systému, protože obsahují typické oblasti s vysokým obsahem mutací, které jsou schopny podchytit evoluční změny na úrovni vnitro- i mezidruhové variability. Někteří autoři využívali také geny pro 16S (Callejón et al., 2012), TPI (Callejón et al., 2015a) nebo podjednotku 5 nikotinamid dehydrogenázy (Wang et al., 2013).

Detailní metodika byla navržena na základě vědeckého výzkumu dle Vejl et al. (2017), přičemž v mnoha bodech bylo postupováno obdobně.

## **6.1 Sekvenční polymorfismus mitochondriálních genů mt-COX1 a mt-Cytb**

### **6.1.1 Volba biologického materiálu**

Podobně jako u ostatních druhů helmintů jsou tenkohlavci rozlišováni na základě morfologických a biometrických znaků, hostitele a jejich zeměpisného původu (Robles et al., 2011, Torres et al., 2011). Ovšem mnohdy ani tato diagnostika nemusí být dostačující (Callejón et al., 2015a; Vejl et al., 2017). Ze studia odborné literatury, která je zaměřená na problematiku identifikace druhů rodu *Trichuris* pomocí molekulárních metod vyplývá, že různí autoři zvolili pro své experimenty různé druhy tohoto rodu. Volba biologického materiálu do mé diplomové práce vycházela z publikovaných výsledků různých autorů (Callejón et al., 2012; Liu et al., 2012b; Wang et al., 2013; Vejl et al., 2017). Druhy *T. ovis* a *T. discolor* byly vybrány na základě toho, že se jedná o blízce příbuzné druhy, parazitující u stejného spektra hostitelů, kteří se hojně vyskytují na území České republiky.

Vzorky byly získány pomocí parazitologické pitvy ze střev poražených nebo uhynulých hostitelských zvířat, přičemž od každého modelového druhu bylo vybráno 18 jedinců. Následně byly vzorky konzervovány v 70% ethanolu a uchovány dle klasických postupů, které jsou uvedeny v metodice, přičemž stejné postupy dodržovali i další autoři (Liu et al., 2012b; Callejón et al., 2013; 2016; Wang et al., 2013; Vejl et al. 2017).

### **6.1.2 Izolace DNA**

Při řešení diplomové práce byla jako výchozí biologický materiál určený k izolaci DNA zvolena tkáň celého těla *T. ovis*, *T. discolor* i *D. melanogaster*. Před extrakcí DNA byli jedinci opláchnuti 96% ethanolem a následně vysušeni pomocí lyofilizátoru, stejný postup provedli ve svém výzkumu i Simões et al. (2011) nebo Vejl et al. (2017). Ze studia vědecké literatury vyplývá, že téměř všichni autoři (Cutillas et al., 2004; Simões et al. 2011; Callejón et al., 2012; 2015a; 2016; Vejl et al., 2017) využívali pro izolaci DNA komerčně vyráběné kity. Při řešení této diplomové práce byl k izolaci DNA rovněž zvolen komerčně vyráběný NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel), který byl využit také autory Simões et al. (2011) a Vejl et al. (2017). Ostatní autoři při výzkumu používali DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) (Cutillas et al., 2004; Callejón et al., 2013; 2015a; 2016). Někteří z autorů však při izolaci DNA použili extrakční pufr dodecylsiranu sodného (SDS) s proteinkinázou K a následnou purifikací pomocí centrifugačních kolonek. Tento postup extrakce popisuje

například Liu et al. (2012b) nebo Wang et al. (2013). Kvantita a kvalita izolované genomické DNA byla zjištěna pomocí UV spektrofotometru. Vysokomolekularita extrahované DNA byla ověřena gelovou elektroforézou SubCell (BioRad) na 1% agarózovém gelu. Callejón et al. (2012; 2013; 2015a; 2015b) a Salaba et al. (2013) prováděli elektroforetickou analýzu na 0,8% gelu. Ostatní autoři tuto metodu nepopisují. Genomická DNA byla vizualizována barvením pomocí ethidium bromidu, což bylo shodné s postupy Callejón et al. (2012; 2013; 2015a; 2015b). Uvedené výsledky potvrdily, že NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel) je vhodný pro izolaci DNA z uvedeného biologického materiálu. Extrakce DNA pomocí izolační sady je většinou autorů využívána z důvodu, že výrazně urychluje izolaci DNA, při současném zachování stabilních podmínek během celé izolace, čímž výrazně minimalizuje riziko možné kontaminace vzorků. Kvalita extrahované DNA byla prokázána tím, že vzniklé izoláty DNA fungovaly u všech vzorků jako bezproblémový PCR templát.

### 6.1.3 Optimalizace PCR markerů

Pro navrhování specifických degenerovaných primerů byly použity sekvence z databáze NCBI, které publikovali Liu et al. (2012b). Na základě stejných sekvencí navrhli odlišné primery také Callejón et al. (2015b). Liu et al. (2012b) jako jediní publikovali relevantní výsledky, založené na sekvenci celého mitochondriálního genomu *T. ovis* a *T. discolor*. Ovšem vzorky *T. ovis* a *T. discolor* použité v jejich výzkumu nepocházely z evropských hostitelů, nýbrž se jednalo o africkou antilopu adax nubijský, chovanou v Číně. Dalším hostitelem byl jak domácí, pocházející rovněž z Číny. V tomto případě jsem však předpokládala, že publikované sekvence mitochondriálního genomu budou podobné s *T. ovis* a *T. discolor* z České republiky. Oba degenerované primery pro amplifikaci genu mt-COX1 a mt-Cytb byly v rámci řešení diplomové práce navrženy pomocí programu Primer3 Input 0.4.0 Program (Rozen a Skaletsky, 2000).

Amplikony získané při použití těchto primerů byly osekvenovány a na základě získaných sekvencí byly navrženy druhově specifické primerové páry pro oba mitochondriální geny mt-COX1 a mt-Cytb, rovněž za použití programu Primer3 Input 0.4.0 Program (Rozen a Skaletsky, 2000). Stejný program pro tvorbu primerů ve svém výzkumu použili i Vejl et al. (2017), naopak Liu et al. (2012b) použili Primer 5 Design Program (PREMIER Biosoft International). Mnoho autorů ovšem vycházelo z již dříve publikovaných primerů, takže využití některého z programů ve svém výzkumu nepopisují. Tímto je tato diplomová práce

originální, protože je založena na tvorbě zcela nových druhově specifických primerových párech.

Optimalizaci molekulárních markerů je nutné provést před jejich vlastním použitím, z důvodu nemožnosti zajištění identických podmínek při průběhu PCR amplifikace, jak bylo popisováno jinými autory. Každá laboratoř totiž používá k izolaci DNA různé komerčně vyráběné kity, odlišný typ termocykleru nebo jinou termostabilní polymerázu. Klasickým krokem optimalizace je volba vhodné teploty pro annealing těchto specifických primerů. Tento postup jsem použila i ve své diplomové práci, kdy jsem pomocí teplotního gradientu zvolila jako optimální annealační teplotu 60 °C, která byla použita pro amplifikaci obou genů u obou studovaných druhů. Shodnou teplotu využili i Callejón et al. (2013). Při této teplotě vznikala specifický úsek DNA o definované velikosti. Autoři Liu et al. (2012b) a Wang et al. (2013) použili annealační teplotu 55°C pro amplifikaci genu mt-COX1 a 50°C pro amplifikaci genu mt-Cytb. Specifičnost nasedání primerů byla řešena pomocí *in silico* analýzy. Sekvenační analýzou byla následně prokazatelně potvrzena správná volba vhodné annealační teploty, která poskytovala specifické PCR amplikony s požadovanou sekvencí v dostatečném množství.

#### **6.1.4 Podmínky PCR amplifikace a sekvenace**

V experimentální části byla pro amplifikaci DNA použita polymeráza *Taq* polymeráza (Thermo SCIENTIFIC) v množství 0,7U, což je shodné s výzkumem Vejl et al. (2017). Liu et al. (2012b) a Wang et al. (2013) využili *rTaq* polymerázu od firmy TaKaRa ve shodném množství 5U. Callejón et al. (2015a; 2016) využívali pro svůj výzkum 1U AmpliTaq® polymerázy. Ostatní autoři neuvádí přesného výrobce *Taq* polymerázy, pouze shodné množství 2,5U (Cutillas et al., 2004; Callejón et al., 2012; 2013; Robles et al., 2014). Pro provedení amplifikace jsem použila TGRADIENT (Biometra®). Jiní autoři dále využívali odlišné typy termocyklerů značky Biometra (Liu et al., 2012b; Wang et al., 2013), Perkin Elmer (Callejón et al., 2012; 2013; 2015b) nebo BIO RAD (Vejl et al., 2017). Následné podmínky PCR amplifikace byly u různých autorů odlišné.

Sekvenační analýza vycházela z ověření experimentálních postupů, které publikovali Callejón et al., (2012; 2016) a Vejl et al. (2017) a obdobné metody jsem použila i při řešení mé diplomové práce. Všichni tito autoři využili pro separaci amplikonů agarózovou gelovou elektroforézu v 1 x TBE pufru. Koncentrace gelu se u jednotlivých autorů pohybovala v rozmezí od 1 do 2%. Amplikony v mé praktické části byly separovány v 1,5% agarózovém

gelu. Stejnou hustotu gelu použili i Hawash et al. (2015). Pro vizualizaci fragmentů bylo následně použito barvení ethidium bromidem a zobrazení pod UV světlem. Z vyříznutých agarózových bločků s fragmenty DNA o požadované velikosti byla vyizolována DNA pomocí GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo SCIENTIFIC). Jiní autoři využívali Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System od firmy Promega (Liu et al., 2012b; Callejón et al., 2015b; 2016) nebo MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen) (Vejl et al., 2017). Pro sekvenční reakci byl použit kit BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo SCIENTIFIC), který využívali také Liu et al. (2012b) a Vejl et al. (2017). Vzniklé produkty sekvenční reakce byly purifikovány a osekvenovány pomocí kapilární elektroforézy ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Thermo SCIENTIFIC).

### **6.1.5 Fylogenetická analýza**

V databázi NCBI jsou různými autory publikovány různě dlouhé sekvence obou studovaných genů, proto byly v rámci diplomové práce vytvořeny tři datasey pro gen mt-COX1 a dva datasey pro gen mt-Cytb. Každý dataset obsahoval fragmenty genů se stejnou délkou, které představovaly jednotlivé haplotypy získané na základě dat publikovaných v NCBI, současně s nově získanými sekvencemi, které jsou připraveny k vložení do této databáze.

Cílem experimentální část diplomové práce bylo zhodnocení těchto vstupních dat za účelem grafického zobrazení fylogenetických vztahů a znázornění jednotlivých haplotypů pomocí zakořeněných fylogenetických stromů.

Všechny sekvence byly vzájemně porovnány za použití programu MAFFT version 7, stejný postup použili i Vejl et al. (2017). Jiní autoři využívali program ClustalX 1.83 (Liu et al., 2012a; 2012b; Wang et al., 2013; Callejón et al., 2015) nebo ClustalW (Callejón et al., 2012; 2015; Salaba et al., 2013; Robles et al., 2014; Hawash et al., 2015). Pomocí programu jModelTest a hodnot AIC, BIC a DT byl vybrán optimální substituční model, který odpovídá algoritmu sestavení fylogramu podle principu maximální parsimonie (MP) a věrohodnosti (ML). Z vědeckých publikací bylo jasně patrné, že z uvedených statistických hodnot je autory nejvíce využívána pouze hodnota AIC (Liu et al., 2012a; 2012b; Wang et al., 2013; Callejón et al., 2013; 2015; 2016; Hawash et al., 2015). Hodnoty BIC a DT ve svém výzkumu použili jen Vejl et al. (2017). Výhodou použití více testovacích kritérií pro volbu modelu je, že získané fylogramy jsou podpořeny více matematickými algoritmy, které hodnotí shodná vstupní data. Jinými slovy lze říci, že postup zvolený při řešení diplomové práce vedl k vyšší statistické podpoře prezentovaných výsledků v podobě fylogenetických stromů. Shodný

statistický program jModelTest byl použit i mnoha jinými autory (Wang et al., 2013; Hawash et al., 2015; Callejón et al., 2016; Vejl et al. 2017). Fylogenetické stromy pro jednotlivé datasey genů mt-COX1 a mt-Cytb byly vytvořeny metodou ML pomocí programu PhyML 3.0, který byl opět široce používán mnohými autory (Wang et al., 2013; Callejón et al., 2015; 2016; Robles et al., 2014; Vejl et al., 2017). Zakořenění fylogramů bylo provedeno tak, že mezi porovnávané haplotypy byla zařazena sekvence příbuzného druhu *T. spiralis*, která se sekvenčně lišila od zkoumaných haplotypů. Při řešení diplomové práce byla vyslovena hypotéza, že *T. spiralis* a rod *Trichuris* mají jednoho společného předka. Druh *T. spiralis* využili jako pomocnou outgroupovou skupinu také autoři Liu et al. (2012a), Wang et al. (2013), Callejón et al. (2015) nebo Hawash et al. (2015). Jinou možností příbuzného druhu je *Asaris suum*, kterou při svých experimentech použili Callejón et al. (2012) a Liu et al. (2012b). Při výzkumu fylogeneze u druhů rodu *Trichuris* z přežvýkavých hostitelů, byla do analýzy začleněna sekvence *T. trichiura* (Salaba et al., 2013) nebo *T. myocastoris* (Vejl et al., 2017).

Do experimentální části diplomové práce byly zahrnuty všechny dostupné sekvence z databáze NCBI, protože cílem bylo zjistit umístění mnou zkoumaných druhů *T. ovis* a *T. discolor* z České republiky ve výsledném fylogenetickém stromu. Do fylogenetických analýz byly tedy použity nejen publikované sekvence evropských druhů, ale také data charakterizující parazity a hostitele z Afriky, Ameriky a Asie.

Fylogenetické stromy byly hodnoceny na základě použitých sekvencí, které jsou uvedeny v Tabulce 5 - 15. Čím samostatněji stojí jednotlivé větve fylogramu, tím obsahují více mutací oproti ostatním sekvencím a lze tak hodnotit jejich fylogenetický vývoj. Odvození fylogeneze druhů rodu *Trichuris* bylo provedeno pro geny mt-COX1 a mt-Cytb zvláště, ovšem někteří autoři využívali pro fylogenetické analýzy metodu kombinace více genů (Wang et al., 2013; Callejón et al., 2015; 2016). Plocha trojúhelníkových symbolů charakterizujících sloučené větve ve fylogramu vyjadřuje homogenitu dané skupiny. Čím je tedy plošší, tím se snižuje variabilita a počet mutačních rozdílů mezi seskupenými jedinci, kteří si jsou tak více příbuzní. Obecným předpokladem zpracování fylogenetických analýz byl monofyletický původ rodu *Trichuris*. Všechny fylogramy uvedené na Obr. 5 - 9 dokumentují dichotomické větvení. V jednotlivých uzlech se nacházely teoretičtí společní předci studovaných druhů.

Jinou možností hodnocení fylogenetických vztahů je založeno na procentuálním zastoupení nukleotidů C+G, respektive A+T, ve zkoumaných sekvencích. Tato metoda je sice rychlejší a jednodušší, ovšem z poskytnutých dat nelze vyčíst přesnou pozici

jednotlivých SNP mutací, takže se dá považovat za nepřesnou. Nicméně tuto metodu hodnocení ve svém výzkumu publikovali například Liu et al. (2012a; 2012b), Callejón et al. (2012; 2013; 2015), Wang et al. (2013) nebo Robles et al. (2015).

Z Obr. 5 je patrné, že se fylogram vytvořený na základě datasetu A pro gen mt-COX1 rozdělil na dva klády A a B. Klád A je jednoduchý a seskupil všechny zkoumané jedince *T. muris* (haplotypy TMA1 – TMA28), kteří pocházejí z České republiky, Francie, Německa a Španělska. Oproti tomu klád B je členěný na více nižších subkládů, přičemž subklád B-1 a B-2 tvoří sesterské větve. Sesterskými skupinami jsou také subklád B-1-1 a B-1-2 nebo subklád B-2-1 a B-2-2. Dále pak jednotlivé subklády, které vycházely z těchto větví. Vzhledem k tomu, že se jedná o sesterské větve, lze tedy konstatovat, že subklády B-1-1-1, B-1-1-2, B-1-2-1 a B-1-2-2 měly společného předka. Subklád B-1-1 seskupuje druh *T. ovis* a rozkládá se na dvě samostatné větve, které odpovídají subkládu B-1-1-1 a B-1-1-2. Haplotyp COX1-TOA17 pochází z adaxe nubijského z Číny (Liu et al., 2012b), oproti haplotypům COX1-TOA1 - COX1-TOA16 z různých hostitelů z České republiky, které byly hodnoceny v rámci diplomové práce. Rozdělení bylo dáno genetickým driftem, který tuto populaci separoval. Stejně je tomu i u subkládu B-1-2, který sdružuje druh *T. discolor*, kdy opět haplotyp COX1-TDA15 pochází z Číny (Liu et al., 2012b) a haplotypy COX1-TDA1 - COX1-TDA14 z České republiky, přičemž populace trichurů byly opět rozděleny migrací hostitelů. Subklád B-2 nese dvě sesterské větve, které tvoří blízké příbuzné druhy *T. suis* a *T. trichiura*. Důvodem tohoto seskupení je zřejmě omnivorní způsob obživy hostitelů. Tento výsledek může také souviset s případným zoonotickým potenciálem druhu *T. suis*.

Obr. 6 odpovídá fylogramu pro gen mt-COX1 dle datasetu B. Je jasně patrné, že fylogenetické stromy na Obr. 5 a 6 jsou si velmi podobné. Jednotlivé větve seskupují stejné druhy, jen s rozdílnými haplotypy. Opět lze sledovat rozdělení subkládu B-1-1 na dvě sesterské větve B-1-1-1 a B-1-1-2, přičemž zástupci druhu *T. ovis* na subkládu B-1-1-1 s haplotypy COX1-TOB13 - COX1-TOB16 pocházejí z Číny (Wang et al., 2013) a haplotypy COX1-TOB1 - COX1-TOB12 pochází z České republiky. Toto platí i pro subklád B-1-2 s druhem *T. discolor*, kdy byl haplotyp COX1-TDB10 získán autory Liu et al. (2012b) v Číně, zatímco subklád B-1-2-2 tvoří jasně izolovanou skupinu *T. ovis* z České republiky. Diverzifikace subpopulací druhů *T. ovis* i *T. discolor* byla opět zřejmě podmíněna vzájemnou geografickou vzdáleností hostitelů.

U fylogramu na Obr. 7 je patrné bohaté členění větví. Je to způsobeno tím, že dataset C je seskupen z části genu mt-COX1, jehož sekvence je známá u největšího počtu druhů rodu



*Trichuris*, a tvoří tak nejsložitější strukturu s největším množstvím kládů a subkládů. Tento fylogram se rozkládá na klád A a B. Subklád A-1 je široce diverzifikován, přičemž zahrnuje i neevropské druhy *Trichuris navonae* a *Trichuris pardinasi* z Argentiny (Callejón et al., 2016) na subkládu A-1-1-1-1. Subklád A-1-1-2-1-1-1 se dělí na dvě samostatné větve, které odpovídají druhu *T. discolor*. Opět se ukázalo, že se jedná o sesterské skupiny. Haplotypy COX1-TDC11 a COX1-TDC12 na subkládu A-1-1-2-1-1-1-1 odpovídají jedincům *T. discolor* z jaha domácího (Liu et al., 2012b) a tura domácího (Callejón et al., 2016). Haplotypy COX1-TDC1 - COX1-TDC10 na sesterském subkládu A-1-1-2-1-1-1-2 zahrnují jedince *T. discolor* z České republiky, sekvenované v rámci praktické části diplomové práce. Na subkládu A-1-1-2 došlo k oddělení jedinců *T. ovis* do tří nižších subkládů (A-1-1-2-2, A-1-1-2-1-2, A-1-1-2-1-1-2). Haplotypy COX1-TOC1 - COX1-TOC13 nebyly dosud nikým publikovány a tvoří skupinu *T. ovis* z České republiky. Haplotypy COX1-TOC15 a COX1-TOC16 pochází z kozy domácí, ovšem autory nebyla publikována země původu (Callejón et al., 2013). Haplotyp COX1-TOC14 (Liu et al., 2012b) z Číny tvoří sesterskou skupinu společně s *T. globulosa* (COX1-TGC1), která byla získána v Íránu z velblouda (Callejón et al., 2015). Vzhledem k tomu, že Callejón et al. (2015) studovali pouze velice omezený počet jedinců a současně uvádějí pouze morfologický způsob druhového určení, je teoreticky možné, že se nemuselo jednat o druh *T. globulosa*, ale o jedince ze subpopulace *T. ovis*. Na Obr. 7 můžeme také pozorovat, že došlo k rozdělení jedinců *T. suis* a *T. trichiura* do odlišných kládů. Tyto druhy přitom v předchozích fylogramech (Obr. 5 a 6) tvořily sesterské větve. Zároveň došlo k rozdělení druhu *T. trichiura* do dvou skupin (subklád A-1-2-2 a subklád B-1) dle geografického původu, neboť se haplotypy COX1-TTC3- COX1-TTC4 původem ze Španělska (Callejón et al., 2013) lišily bodovými mutacemi od haplotypů COX1-TTC1 z Číny (Liu et al., 2012a), COX1-TTC2 (Holroyd a Kikuchi, 2016) a COX1-TTC5 z Ugandy (Hawash et al., 2015) v závislosti na genetickém driftu.

Fylogenetický strom vytvořený na základě datasetu A genu mt-Cytb (Obr. 8) byl rozložen na klád A a klád B. Klád A nese pouze jediného publikovaného zástupce druhu *T. muris* s haplotypem Cytb-TMA1 (Holroyd a Kikuchi, 2015). Stejně tak subklád B-1-2-1 zahrnuje pouze jedince *T. discolor* s haplotypy Cytb-TDA1 - Cytb-TDA14, řešených v rámci této práce. Sesterskou skupinu tomuto subkládu je subklád B-1-2-2 s haplotypy Cytb-TOA1 - Cytb-TOA15, které odpovídají mnou studovaným jedincům *T. ovis*. Subklád B-1-2 tedy tvoří jasně izolovanou skupinu jedinců z České republiky. Subklád B-2 se dělí na sesterské větve, přičemž subklád B-2-1 nese skupinu zástupců *T. suis* s haplotypy Cytb-TSUA1 - Cytb-

TSUA3, zatímco subklád B-2-2 zahrnuje jedince druhu *T. trichiura* s haplotypy Cytb-TTA1 - Cytb-TTA3. Oba tyto druhy jsou seskupeny jako sesterské, pravděpodobně na základě původu z omnivorních hostitelů.

Fylogram z datasetu B pro gen mt-Cytb (Obr. 9) je také bohatě větvený, ovšem ne tolik, jako fylogram na Obr. 7. Lze se tedy domnívat, že části genu mt-Cytb pro dataset B jsou také poměrně dobře prozkoumané a jeho sekvence se vyskytuje u většího počtu druhů rodu *Trichuris*. Mnou sledovaný druh *T. discolor* s haplotypy Cytb-TDB1 - Cytb-TDB10 leží na větvi A-2-1-1-2, přičemž jeho sesterskou skupinu tvoří jedinec *T. discolor* Cytb-TDB11 z jarka domácího (Liu et al., 2012b). Subklád A-2-1-2-1 nese haplotypy *T. ovis* (Cytb-TOB14 - Cytb-TOB23) a *T. globulosa* (Cytb-TGB1), které se jasně odlišují od jedinců *T. ovis* (Cytb-TOB1 - Cytb-TOB13) z České republiky na subkládu A-2-1-2-2. Rozdělení druhů *T. ovis* a *T. discolor* do sesterských skupin s jedinci stejného druhu, kteří ovšem nepocházejí z České republiky, je opět způsobeno genetickým driftem, který tyto skupiny oddělil. Na tomto fylogramu je dále zajímavé, že tentokrát nebyl haplotyp pro *T. spiralis* vyčleněn samostatně jako outgroupová skupina, ale byl zařazen do kládu B, společně s druhy *T. vulpis*, *T. muris* (Callejón et al., 2015) a *T. arvicolae* (Holroyd a Kikuchi, 2016).

Z předchozích fylogenetických stromů (Obr. 5 - 9) vyplývá, že ač autoři Liu et al. (2012b), Wang et al. (2013) nebo Callejón et al. (2014; 2015) hodnotili *T. ovis* a *T. discolor* z Číny a Jihoafrické republiky na základě jiných markerů, bylo i tak pomocí fylogramů dokázáno, že se jedná o sesterské druhy se zástupci stejných druhů z České republiky, jejichž populace byly pouze rozděleny následkem genetického driftu. Lze tedy předpokládat, že tyto sesterské větve měly společného předka. Dále bylo prokázáno, že i přesto, že jedinci druhu *T. ovis* a *T. discolor* pocházeli z různých hostitelů, je mezi nimi patrný nízký stupeň variability, což značí, že hostitel nemá vliv na specializaci parazita a jedná se tak o multihostitelské druhy.

## 6.2 Molekulární detekce endosymbiotických bakterií rodu *Wolbachia*

Pro detekci endosymbiotických bakterií rodu *Wolbachia* u chované populace *D. melanogaster* byla při řešení diplomové práce použita dvojice specifických primerů navržených dle autorů Werren a Windsor (2000). Tyto primery využili i Simões et al. (2011). Další často využívané PCR markery byly primery navržené dle O'Neill et al. (1992), které ve svém výzkumu použili například Hong et al. (2002), Riegler et al. (2005) a Borgo et al. (2009). Současně byli na výskyt *Wolbachie* hodnoceni i vybraní zástupci *T. ovis* (18 jedinců)

a *T. discolor* (18 jedinců). Pro amplifikaci a zhodnocení jejích výsledků jsem použila termocykler a řídicí program LightCycler® Nano Instrument (Roche). Simões et al. (2011) při svém výzkumu používali Tetrad® Thermocycler (Bio-Rad). Na základě těchto PCR markerů byla *Wolbachia* detekována u 42 samic a 36 samců z celkové testovací populace 50 samic a 50 samců, čímž byla prokázána jejich vysoká specifita a senzitivita. U zkoumaných jedinců *T. ovis* a *T. discolor* nebyla *Wolbachia* prokázána.

Důvodem testování zástupců rodu *Trichuris* na výskyt bakterií rodu *Wolbachia*, byla hypotéza, že se jedinci *T. discolor* rozmnožují partenogeneticky, neboť při parazitologické pitvě nebyl u tohoto druhu nalezen jediný samec. Dále tomu nasvědčoval výzkum autorů Vejtl et al. (2017), kteří u zkoumaných jedinců *T. discolor* zjistili pouze jeden shodný haplotyp rDNA. Ovšem v mé diplomové práci bylo zjištěno, že u mitochondriální DNA toto neplatí. U *T. discolor* bylo zjištěno, že se v České republice vyskytuje 14 haplotypů dle datasetu A, 9 haplotypů dle datasetu B a 10 haplotypů dle datasetu C, stanovených na základě sekvence genu mt-COX1. Dále bylo u *T. discolor* z České republiky zjištěno 13 haplotypů dle datasetu A a 10 haplotypů dle datasetu B, stanovených na základě sekvence genu mt-Cytb. Tento výsledek je v rozporu se závěry Vejtl et al. (2017), kdy tito autoři identifikovali pouze jediný haplotyp stanovený na základě sekvence rDNA. Z výsledků mé práce tudíž vyplývá, že v české populaci *T. discolor* existuje poměrně vysoká variabilita samičích jedinců. Tento výsledek sice jednoznačně nevylučuje hypotetickou možnost partenogeneze, a to z následujících důvodů. Je možné že mitochondriální geny podléhají mutačním změnám s mnohem vyšší frekvencí oproti jaderným genům, které zkoumali Vejtl et al. (2017). Je tudíž teoreticky možné, že i samice množí se partenogeneticky, vykazují v populaci variabilitu způsobenou vyšší mutační rychlostí u genů mt-COX1 a mt-Cytb.

Vzhledem k tomu, že molekulární markery neprokázaly přítomnost bakterií rodu *Wolbachia* v jedincích *T. discolor*, lze tedy předpokládat, že výskyt partenogeneze je u tohoto druhu možný, ne však na základě přítomnosti endosymbiotických bakterií. Současně nelze ani vyloučit skutečnost, že k absenci samců během parazitologických pitvě došlo v důsledku jejich přirozené smrti po oplodnění samic a vyloučení mrtvých jedinců trávicí soustavou. Tato představa je však v rozporu s výsledky, které u sesterského druhu *T. ovis* publikovali například Vejtl et al. (2017), kdy tito autoři nalézali zcela běžně při parazitologických pitvách jedince obojího pohlaví.

## 7 Závěr

Během řešení diplomové práce byly získány dva typy výsledků. Prvním typem jsou výsledky metodického charakteru. Mezi tyto výsledky patří navržení nových originálních primerových párů, které jsou druhově specifické, a které umožní amplifikovat značnou část genů mt-COX1 a mt-Cytb. Tyto primerové páry lze úspěšně použít pro sekvenční analýzy. Druhá skupina získaných výsledků má fylogenetický charakter a je základem pro zpřesnění informací o evoluci *T. discolor* a *T. ovis*.

Během řešení diplomové práce byly potvrzeny všechny vědecké hypotézy:

- Vzhledem k nalezenému počtu haplotypů stanovených na základě sekvencí mt-COX1 a mt-Cytb u obou studovaných druhů bylo potvrzeno, že mitochondriální genom mutuje rychleji ve srovnání s jaderným, který je prezentován haplotypovým polymorfismem rDNA genů.
- Fylogenetická analýza jednoznačně potvrdila, že sekvenční polymorfismus genů mt-COX1 a mt-Cytb koreluje s druhovým zařazením a v řadě případů i s geografickou vzdáleností hodnocených jedinců. Výskyt shodných haplotypů *T. discolor* i *T. ovis* v různých hostitelích z České republiky potvrdil hypotézu, že oba druhy jsou multihostitelské, a že hostitelé nemají vliv na genetickou variabilitu studovaných českých populací.
- Molekulární analýza, jejíž citlivost byla ověřena na chované populaci *D. melanogaster* s výskytem jedinců s endosymbiotickými bakteriemi rodu *Wolbachia*, nepotvrdila výskyt těchto bakterií v žádném z jedinců *T. discolor* a *T. ovis*. Byla tak potvrzena hypotéza, že teoreticky možná partenogeneze u druhu *T. discolor* nemusí být způsobena přítomností bakterií rodu *Wolbachia*.

Z konkrétních výsledků, získaných při řešení diplomové práce, vyplývají i některá doporučení pro parazitologickou praxi i další genetický výzkum. Byly získány další molekulární markery, které lze s úspěchem použít jako diagnostické pro identifikaci a odlišení *T. discolor* a *T. ovis*. Použití většího počtu molekulárních markerů, zejména u druhů, kdy mezidruhové morfologické rozdíly nejsou zřetelné, zvyšuje spolehlivost druhového určení. Pro fylogenetické analýzy a zejména pro věrohodnost jejich závěrů je optimální vyhodnocovat sekvenční polymorfismy stanovené z co nejdelších úseků studovaných genů. Navržené a optimalizované sekvenční postupy umožnili získání

informací o majoritní části genů mt-COX1 a mt-Cytb, které svou délkou výrazně přesahují většinu publikovaných sekvencí v nukleotidové databázi NCBI.

## 8 Seznam použité literatury

- Akaike, H. 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. International Symposium on Information Theory. 267–281.
- Almalaik, A. H. A., Bashar, A. E., Abakar, A. D. 2008. Prevalence and dynamics of some gastrointestinal parasites of sheep and goats in Tulus area based on post-mortem examination. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 3(6). 390-399.
- Anderson, R. C. 2000. Nematode Parasites of vertebrates. CABI Publishing. Wallingford. 650 s. ISBN: 0-85199-421-0.
- Auer H, Aspöck H. 2014. Helminths and helminthoses in Central Europe: general overview and diseases caused by trematodes (flukes). Wiener Medizinische Wochenschrift. 164. 405-413.
- Bartůňková, J., Paulík, M. (eds.). 2011. Vyšetřovací metody v imunologii. 2. přepracované a doplněné vydání. Grada. Praha. 172 s. ISBN: 978-80-247-3533-7.
- Borgo, S. N., Sattler, E. C., Hogardt, M., Adler, K., Plewig, G. (2009). PCR analysis for *Wolbachia* in human and canine *Demodex mites*. Archives of dermatological research. 301(10). 747-752.
- Brindley, P., Mitreva, M., Ghedin, E., Lustigman, S. 2009. Helminth Genomics: The Implications for Human Health. PLoS Neglected Tropical Diseases. 3(10). e538.
- Brownlie, J. C., Johnson, K. N. 2009. Symbiont-mediated protection in insect hosts. Trends in mikrobiology. 17(8). 348-354.
- Callejón, R., Cutillas, C., Nadler, S. A. 2015a. Nuclear and mitochondrial genes for inferring *Trichuris* phylogeny. Parasitology research. 114(12). 4591-4599.
- Callejón, R., Cutillas, C., Petrášová, J. *Trichuris trichiura* partial COI gene for cytochrome oxidase subunit 1 [online]. National Center for Biotechnology Information. 2011 [cit. 2018-10-04]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FR846241>>.
- Callejón, R., Gutiérrez-Avilés, L., Halajian, A., Zurita, A., de Rojas, M., Cutillas, C. 2015b. Taxonomy and phylogeny of *Trichuris globulosa* Von Linstow, 1901 from camels. A review of *Trichuris* species parasitizing herbivorous. Infection, Genetics and Evolution. 34. 61-74.
- Callejón, R., Halajian, A., De Rojas, M., Marrugal, A., Guevara, D., Cutillas, C. 2012. 16S partial gene mitochondrial DNA and internal transcribed spacers ribosomal DNA as differential markers of *Trichuris discolor* populations. Veterinary parasitology. 186(3-4). 350-363.

- Callejón, R., Nadler, S., De Rojas, M., Zurita, A., Petrášová, J., Cutillas, C. 2013. Molecular characterization and phylogeny of whipworm nematodes inferred from DNA sequences of *cox1* mtDNA and 18S rDNA. *Parasitology research*. 112(11). 3933-3949.
- Callejón, R., Robles, M. D. R., Panei, C. J., Cutillas, C. 2016. Molecular diversification of *Trichuris* spp. from Sigmodontinae (Cricetidae) rodents from Argentina based on mitochondrial DNA sequences. *Parasitology research*. 115(8). 2933-2945.
- Cantacessi, C., Campbell, B. E., Jex, A. R., Hall, R. S., Young, N. D., Nolan, M. J., Gasser, R. B. 2012. Recent Progress in Transcriptomics of Key Gastrointestinal Nematodes of Animals—Fundamental Research Toward New Intervention Strategies. *Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines*. 61-72.
- CDC. Parasites - Trichuriasis (also known as Whipworm Infection) [online]. Centers for Disease Control and Prevention. 2013 [cit. 2018-03-05]. Dostupné z <<https://www.cdc.gov/parasites/whipworm/>>.
- Cordaux, R., Michel-Salzat, A., Bouchon, D. 2001. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *Journal of Evolutionary Biology*. 14(2). 237-243.
- Cutillas, C., Callejon, R., De Rojas, M., Tewes, B., Ubeda, J. M., Ariza, C., Guevara, D. C. 2009. *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Tropica*. 111(3). 299-307.
- Cutillas, C., German, P., Arias, P., Guevara, D. 1995. *Trichuris ovis* and *Trichuris globulosa*: morphological, biometrical, and genetic studies. *Experimental parasitology*. 81(4). 621-625.
- Cutillas, C., Oliveros, R., De Rojas, M., Guevara, D. C. 2002. Determination of *Trichuris muris* from murid hosts and *T. arvicolae* (Nematoda) from arvicolid rodents by amplification and sequentiation of the ITS1–5.8 S-ITS2 segment of the ribosomal DNA. *Parasitology research*. 88(6). 574-582.
- Cutillas, C., Oliveros, R., De Rojas, M., Guevara, D. C. 2004. Determination of *Trichuris skrjabini* by sequencing of the ITS1–5.8 S–ITS2 segment of the ribosomal DNA: comparative molecular study of different species of trichurids. *Journal of Parasitology*. 90(3). 648-652.
- Cutillas, C., Rocio, C. R. *Trichuris skrjabini* partial mitochondrial *cox1* gene for cytochrome c oxidase subunit I [online]. National Center for Biotechnology Information. 2016 [cit. 2018-10-04]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AM932679>>.

- Čermáková, Z., Valenta, Z., Buchta, V. 2009. Parazitičtí helminti člověka. *Folia gastroenterologica et hepatologica*. 7(1). 21-24.
- Čermáková, Z., Voxová, B., Ryšková, O., Valenta, Z., Plíšek, S., Prášil, P. 2007. Laboratorní diagnostika parazitárních infekcí. *Folia gastroenterologica et hepatologica*. 5(3-4). 40-43.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*. 9(8). 772-775.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Philippe, H. 2005. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nature Reviews Genetics*. 6(5). 361.
- Dunn, J. J., Columbus, S. T., Aldeen, W. E., Davis, M., Carroll, K. C. 2002. *Trichuris vulpis* recovered from a patient with chronic diarrhea and five dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(7). 2703-2704.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*. 17(6). 368-376.
- Flegr, J. 2009. *Evoluční biologie*. 2. opr. a rozš. vyd. Academia. Praha. 569 s. ISBN: 978-80-200-1767-3.
- Garcia, L., S. 2006. *Diagnostic Medical Parasitology*. 5th ed. American Society for Microbiology Press. Washington, DC. p. 1202. ISBN: 1-55581-380-1.
- Gibson, D. I., Bray, R. A., Hunt, D., Georgiev, B. B., Scholz, T., Harris, P. D., Bakke, T. A., Pojmanská, T., Niewiadomska, K., Kostadinova, A., Tkach, V., Bain, O., Durette-Desset, M. C., Gibson, L., Moravec, F., Petter, A., Dimitrova, Z. M., Buchmann, K., Valtonen, E. T., de Jong, Y. 2014. Fauna Europaea: helminths (animal parasitic). *Biodiversity Data Journal*. 2. e1060.
- Gray, M. W., Burger, G., Lang, B. F. 1999. Mitochondrial evolution. *Science*. 283(5407). 1476-1481.
- Guardone, L., Deplazes, P., Macchioni, F., Magi, M., Mathis, A. 2013. Ribosomal and mitochondrial DNA analysis of Trichuridae nematodes of carnivores and small mammals. *Veterinary parasitology*. 197(1-2). 364-369.
- Guindon, S., Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*. 52(5). 696-704.
- Gul, N., Tak, H. 2016. Prevalence of *Trichuris* spp. in small ruminants slaughtered in Srinagar District (JK). *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*. 40(3). 741-744.



- Guruprasad, N. M., Jalali, S. K., Puttaraju, H. P. 2014. *Wolbachia*-a foe for mosquitoes. Asian Pacific journal of tropical disease. 4(1). 78-81.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In Nucleic acids symposium series. 41. 95-98.
- Hawash, M. B., Andersen, L. O., Gasser, R. B., Stensvold, C. R., Nejsum, P. 2015. Mitochondrial genome analyses suggest multiple *Trichuris* species in humans, baboons, and pigs from different geographical regions. PLoS neglected tropical diseases. 9(9). e0004059.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., de Waard, J. R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. 270(1512). 313-321.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., de Waard, J. R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. 270. 96-99.
- Hedley, L., Wani R. L. S. Helminth infections: diagnosis and treatment. The Pharmaceutical Journal [online]. Říjen 2015. [cit. 2018-02-28]. Dostupné z <<https://www.pharmaceutical-journal.com/learning/learning-article/helminth-infections-diagnosis-and-treatment/20069529.article>>.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., Werren, J. H. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*?—a statistical analysis of current data. FEMS microbiology letters. 281(2). 215-220.
- Hillis, D. M., Bull, J. J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Systematic biology. 42(2). 182-192.
- Hodgman, C., French, A., Westhead, D. 2009. Bioinformatics. 2nd ed. Taylor Francis. p. 354. ISBN: 978-0415394949.
- Holroyd, N., Kikuchi, T., Berriman, M. *Trichuris muris* mitochondrial DNA, complete genome, isolate: Edinburgh [online]. National Center for Biotechnology Information. 2008 [cit. 2018-10-04]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LC050561>>.
- Hong, X. Y., Gotoh, T., Noda, H. 2002. Sensitivity comparison of PCR primers for detecting *Wolbachia* in spider mites. Applied entomology and zoology. 37(3). 379-383.
- Horák P., Scholz, T. 1998. Biologie helmintů. Karolinum. Praha. 139 s. ISBN: 80-7184-7828.

- Hurst, G. D., Jiggins, F. M., Pomiankowski, A. 2002. Which way to manipulate host reproduction? *Wolbachia* that cause cytoplasmic incompatibility are easily invaded by sex ratio-distorting mutants. *The American Naturalist*. 160(3). 360-373.
- Charlier, J., De Waele, V., Ducheyne, E., van der Voort, M., Vande Velde, F., Claerebout, E. 2016. Decision making on helminths in cattle: diagnostics, economics and human behaviour. *Irish Veterinary Journal*. 69. 14-19.
- Chroust, K. 2006. Parazitózy u masných plemen skotu v marginálních oblastech a jejich tlumení. *Veterinářství*. 56. 430-437.
- Church, C. Parasitology [online]. Metropolitan State University of Denver. 2018 [cit. 2018-12-04]. Dostupné z <[http://rowdysites.msudenver.edu/~churchcy/BIO3270/Images/Nematodes/Trichuris\\_trichiura.htm](http://rowdysites.msudenver.edu/~churchcy/BIO3270/Images/Nematodes/Trichuris_trichiura.htm)>.
- Jurášek, V., Dubinský, P. 1993. *Veterinární parazitologie*. Příroda. Bratislava. p. 382. ISBN: 80-07-00603-6.
- Katoh, K., Toh, H. 2008. Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework. *BMC bioinformatics*. 9(1). 212.
- Kaufmann, J. 1996. *Parasitic infections of domestic animals: A diagnostic manual*. Birkhäuser. Bern. p. 423. ISBN: 3-7643-5115-2
- Kikuchi, T., Holroyd, N., Berriman, M. *Trichuris trichiura* mitochondrial DNA, complete sequence [online]. National Center for Biotechnology Information. 2015 [cit. 2018-10-04]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AP017704>>.
- Kořínková, K. 2006. *Obecná parazitologie: význam a biologie parazitů*. Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Přírodovědecká fakulta. Ústí nad Labem. 91 s. ISBN: 80-7044-798-2.
- Kořístek, K. 2015. *Parazitologie*. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc. 65 s. ISBN: 978-80-244-4540-3.
- Koudela, B., Russ, M. 2002. Trichurióza prasat. *Veterinářství*. 52. 32-37.
- Kudrnáčová, M., Langrová, I. 2012. Occurrence and seasonality of domestic sheep gastrointestinal parasites. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 43(3). 104–108.
- Kyral, A. Parazitózy u spárkaté zvěře – prevence a léčba. *Veterinářství* [online]. Prosinec 2004. [cit. 2018-02-27]. Dostupné z <<http://vetweb.cz/parazitozy-u-sparkate-zvere-prevence-a-lecba/>>.

- Lavrov, D. V., Brown, W. M. 2001. *Trichinella spiralis* mtDNA: a nematode mitochondrial genome that encodes a putative ATP8 and normally structured tRNAs and has a gene arrangement relatable to those of coelomate metazoans. *Genetics*. 157(2). 621-637.
- Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombès, A., Rojo, M. 2004. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *Journal of cell science*. 117(13). 2653-2662.
- Liang, X. J. *Trichuris suis* mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I [online]. National Center for Biotechnology Information. 2008 [cit. 2018-10-04]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FM253701>>.
- Liang, X. J., Zhang, H. J., Li, G. Q., Li, J. P., Pu, W. J., Li, G. Q. *Trichuris suis* isolate TsHZ cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial [online]. National Center for Biotechnology Information. 2010 [cit. 2018-10-04]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ183740>>.
- Liu, G. H., Gasser, R. B., Su, A., Nejsum, P., Peng, L., Lin, R. Q., Li, M. W., Xu, M. J., Zhu, X. Q. 2012a. Clear genetic distinctiveness between human-and pig-derived *Trichuris* based on analyses of mitochondrial datasets. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 6(2). e1539.
- Liu, G. H., Wang, Y., Xu, M. J., Zhou, D. H., Ye, Y. G., Li, J. Y., Song, H. Q., Lin, R. Q., Zhu, X. Q. 2012b. Characterization of the complete mitochondrial genomes of two whipworms *Trichuris ovis* and *Trichuris discolor* (Nematoda: Trichuridae). *Infection, Genetics and Evolution*. 12(8). 1635-1641.
- Lo, N., Paraskevopoulos, C., Bourtzis, K., O'Neill, S. L., Werren, J. H., Bordenstein, S. R., Bandi, C. 2007. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *International journal of systematic and evolutionary mikrobiology*. 57(3). 654-657.
- Macholán, M. 2014. *Základy fylogenetické analýzy*. Masarykova univerzita. Brno. 289 s. ISBN: 978-80-210-6363-1.
- Makovcová, K., Langrová, I., Vadlejch, J., Jankovská, I., Lytvynets, A., Borkovcová, M. 2008. Linear distribution of nematodes in the gastrointestinal tract of tracer lambs. *Parasitology research*. 104(1). 123.
- Minin, V., Abdo, Z., Joyce, P., Sullivan, J. 2003. Performance-based selection of likelihood models for phylogeny estimation. *Systematic Biology*. 52(5). 674-683.
- Mohandas, N., Pozio, E., La Rosa, G., Korhonen, P. K., Young, N. D., Koehler, A. V., Chang, B. C. 2014. Mitochondrial genomes of *Trichinella* species and genotypes—a basis for

- diagnosis, and systematic and epidemiological explorations. *International journal for parasitology*. 44(14). 1073-1080.
- Nath, B., Roy, K., Shaikat, A., Shil, S. 2011. A study on prevalence and pathological effects of intestinal helminthes in black Bengal goat in Chittagong. *Yuzuncu Yil Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. 22. 139-142.
- Nejsum, P., Betson, M., Bendall, R. P., Thamsborg, S. M., Stothard, J. R. 2012. Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis*: looking to the future from an analysis of the past. *Journal of helminthology*. 86(2). 148-155.
- Oliveros, R., Cutillas, C., De Rojas, M., Arias, P. 2000. Characterization of four species of *Trichuris* (Nematoda: *Enoplida*) by their second internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence. *Parasitology research*. 86(12). 1008-1013.
- O'Neill, S. L., Giordano, R., Colbert, A. M., Karr, T. L., Robertson, H. M. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89(7). 2699-2702.
- Pakendorf, B., Stoneking, M. 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 6. 165-183.
- Petrášová, J., Oborník, M., Petrželková, K. J., Cutillas, C., Modrý, D. *Trichuris suis* isolate T8 cytochrome oxidase subunit 1 gene, partial cds; mitochondrial [online]. National Center for Biotechnology Information. 2011 [cit. 2018-10-04]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF690969>>
- Prantlová Rašková, V., Wagnerová, P. *Obrazový atlas parazitů* [online]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 2013 [cit. 2018-03-10]. Dostupné z <<http://kaf.zf.jcu.cz/upload/roman/Obrazovy%20atlas%20parazitu.pdf>>.
- Prosser, S. W., Velarde-Aguilar, M. G., León-Règagnon, V., Hebert, P. D. 2013. Advancing nematode barcoding: a primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. *Molecular Ecology Resources*. 13(6). 1108-1115.
- Rabis, A., Casanova, J. C. 2004. A new whipworm, *Trichuris felii* [Nematoda, Trichuridae] from *Talpa europaea* [Insectivora, Talpidae]. *Acta Parasitologica*, 49(2).
- Ratnasingham, S., Hebert, P. D. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Resources*. 7(3). 355-364.
- Rédei, G. P. 2008. *Encyclopedia of genetics, genomics, proteomics, and informatics*. 3rd ed. Springer Science Business Media. New York. p. 2201. ISBN: 978-1-4020-6753-2.

- Rehbein, S., Kollmannsberger, M., Visser, M., Winter, R. 1996. Untersuchungen zum Helminthenbefall von Schlachtschafen in Oberbayern. 1. Artenspektrum, Befallsextenzität und Befallsintensität. *Berliner Und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*. 109. 161-167.
- Riegler, M., Sidhu, M., Miller, W. J., O'Neill, S. L. 2005. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*. 15(15). 1428-1433.
- Robles, M. D. R. 2011. New species of *Trichuris* (Nematoda: Trichuridae) from *Akodon montensis* Thomas, 1913, of the Paranaense forest in Argentina. *The Journal of parasitology*. 97(2). 319-327.
- Robles, M., Cutillas, C., Panei, C. J., Callejón, R. 2014. Morphological and molecular characterization of a new *Trichuris* species (Nematoda-Trichuridae), and phylogenetic relationships of *Trichuris* species of cricetid rodents from Argentina. *PloS one*. 9(11). e112069.
- Rokas, A., Ladoukakis, E., Zouros, E. 2003. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology Evolution*. 18(8). 411-417.
- Roopnarine, P. DNA Barcoding: Today Is Too Soon. *The Magazine of the California Academy of Sciences* [online]. 2006. [cit. 2018-03-20]. Dostupné z <<http://researcharchive.calacademy.org/calwild/2006winter/stories/today.html>>.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., Sánchez-Gracia, A. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular biology and evolution*. 34(12). 3299-3302.
- Rozen, S., Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols*. 365-386.
- Rylková, K., Tůmová, E., Brožová, A., Jankovská, I., Vadlejch, J., Čadková, Z., Frýdlová, J., Peřinková P., Langrová I., Chodová D., Nechybová, S., Scháňková, Š. 2015. Genetic and morphological characterization of *Trichuris myocastoris* found in *Myocastor coypus* in the Czech Republic. *Parasitology research*. 114(11). 3969-3975.
- Ryšavý, B. (ed.). 1989. *Základy parazitologie*. Státní pedagogické nakladatelství. Praha. 215 s. ISBN: 80-04-20864-9.
- Rzhetsky, A., Nei, M. 1992. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Molecular Biology and Evolution*. 9(5). 945-967.
- Salaba, O., K. Rylková, J. Vadlejch, M. Petrtýl, Š. Scháňková, A. Brožová, I. Jankovská, L. Jebavý, Langrová, I. 2013. The first determination of *Trichuris* sp. from roe deer by

- amplification and sequenation of the ITS1-5.8S-ITS2 segment of ribosomal DNA. *Parasitology Research*. 112. 955 – 960.
- Schulenburg, J. H. G. V., Hurst, G. D., Huigens, T. M., van Meer, M. M., Jiggins, F. M., Majerus, M. E. 2000. Molecular evolution and phylogenetic utility of *Wolbachia* *ftsZ* and *wsp* gene sequences with special reference to the origin of male-killing. *Molecular Biology and Evolution*. 17(4). 584-600.
- Schwarz, G. 1978. Estimating the dimension of a model. *The annals of statistics*. 6(2). 461-464.
- Simões, P. M., Mialdea, G., Reiss, D., Sagot, M. F., Charlat, S. 2011. *Wolbachia* detection: an assessment of standard PCR protocols. *Molecular Ecology Resources*. 11(3). 567-572.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J., Matalová, A. 2009. *Genetika*. Masarykova univerzita. Brno. 894 s. ISBN: 978-80-210-4852-2.
- SVÚ Jihlava. Diagnostické metody používané na oddělení parazitologie [online]. Státní veterinární ústav Jihlava. 2018 [cit. 2018-03-27]. Dostupné z <<http://www.svujihlava.cz/204-diagnosticke-metody.html>>.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. 2010. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita. Brno. 188 s. ISBN: 978-80-210-3841-1.
- Špakulová, M. 1994. Discriminant analysis as a method for the numerical evaluation of taxonomic characters in male trichurid nematodes. *Systematic Parasitology*. 29(2). 113-119.
- Špakulová, M., Holecová, M. (eds.). 2013. *Vybrané kapitoly z parazitologie: (Parazity lidí, živočichov a rostlín)*. Parazitologický ústav SAV. Košice. 220 s. ISBN: 978-80-971331-1-5.
- Tamarozzi, F., Halliday, A., Gentil, K., Hoerauf, A., Pearlman, E., Taylor, M. J. 2011. Onchocerciasis: the role of *Wolbachia* bacterial endosymbionts in parasite biology, disease pathogenesis, and treatment. *Clinical microbiology reviews*. 24(3). 459-468.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., Wall, R. L. 2007. *Veterinary parasitology*. 3rd ed. Blackwell Publishing. Oxford. p. 874. ISBN: 978-1-4051-1964-1.
- Taylor, M. J., Bandi, C., Hoerauf, A. 2005. *Wolbachia*. Bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Advances in parasitology*. 60. 245-284.
- Tomšovský, M. Aplikace DNA markerů v mykologii a molekulární taxonomii [online]. Mendelova univerzita v Brně. 2015 [cit. 2018-03-15]. Dostupné z

- <[https://akela.mendelu.cz/~xcepl/inobio/inovace/Mendelova\\_genetika/MGP\\_6\\_INOBI\\_O\\_Aplikace\\_DNA\\_markeru\\_v\\_mykologii-\\_molekularni\\_taxonomie.pdf](https://akela.mendelu.cz/~xcepl/inobio/inovace/Mendelova_genetika/MGP_6_INOBI_O_Aplikace_DNA_markeru_v_mykologii-_molekularni_taxonomie.pdf)>.
- Torres, E. J. L., Nascimento, A. P., Menezes, A. O., Garcia, J., dos Santos, M. A. J., Maldonado Jr, A., Miranda, K., Lanfredia, R. M., de Souza, W. 2011. A new species of *Trichuris* from *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae) in Brazil: Morphological and histological studies. *Veterinary parasitology*. 176(2-3). 226-235.
- Vejl, P., Nechybová, S., Peřínková, P., Melounová, M., Sedláková, V., Vašek, J., Čilová, D., Rylková, K., Jankovská, I., Vadlejch, J., Langrová, I. 2017. Reliable molecular differentiation of *Trichuris ovis* and *Trichuris discolor* from sheep (*Ovis orientalis aries*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) and morphological characterisation of their females: morphology does not work sufficiently. *Parasitology research*. 116(8). 2199-2210.
- Volf, P., Horák, P. 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Triton. Praha. 318 s. ISBN: 978-80-7387-008-9.
- Votava, M. (ed.). 2010. *Lékařská mikrobiologie: Vyšetřovací metody*. Neptun. Brno. 495 s. ISBN: 978-80-86850-04-7.
- Wang, Y., Liu, G. H., Li, J. Y., Xu, M. J., Ye, Y. G., Zhou, D. H., Zhu, X. Q. 2013. Genetic variability among *Trichuris ovis* isolates from different hosts in Guangdong Province, China revealed by sequences of three mitochondrial genes. *Mitochondrial DNA*. 24(1). 50-54.
- Wasimuddin, Bryja, J., Ribas, A., Baird, S. J. E., Piálek, J., Goüy de Bellocq, J. 2016. Testing parasite “intimacy”: the whipworm *Trichuris muris* in the European house mouse hybrid zone. *Ecology and Evolution*. 6(9). 2688–2701.
- Werren, J. H., Baldo, L., Clark, M. E. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*. 6(10). 741-751.
- Werren, J. H., Windsor, D. M. 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 267(1450). 1277-1285.
- Werren, J. H., Zhang, W., Guo, L. R. 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 261(1360). 55-63.
- White, J. A., Giorgini, M., Strand, M. R., Pennacchio, F. 2013. Arthropod endosymbiosis and evolution. *Arthropod Biology and Evolution*. 441-477.

- Zainab, T., Khan, W. 2016. Morphological and Histopathological Studies of *Trichuris Ovis* in Goat Intestine. *Journal of Parasitic Diseases: Diagnosis and Therapy*. 1. 1-7.
- Zajac, A. M., Conboy, G. A. 2006. *Veterinary Clinical Parasitology*. 8th ed. Blackwell Publishing. Oxford. p. 354. ISBN: 978-0-8138-2053-8.
- Zhang, H. J., Liang, X. J., Li, G. Q., Bai, A. Q., Li, J. P., Zhang, G. L., Pu, W. J., Li, G. Q. *Trichuris suis* isolate TSHZ cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds; mitochondrial [online]. National Center for Biotechnology Information. 2010 [cit. 2018-10-04]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ204208>>.
- Zug, R., Hammerstein, P. 2012. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40 % of terrestrial arthropod species are infected. *PloS one*. 7(6). e38544.



## 9 Seznam použitých zkratek

A- adenin

AIC- Akaike Information Criterion

AR- Argentina

ATP- adenosintrifosfát

BIC- Bayesian Information Criterion

CIGA- The University Internal Grant Competition

CN- Čína

COX1- podjednotka 1 cytochrom c oxidázy

Cytb- cytochrom b

C- cytosin

CZ- Česká republika

ČZU- Česká zemědělská univerzita

ddNTP- dideoxynukleotidtrifosfát

DE- Německo

DK- Dánsko

dNTP- deoxynukleotidtrifosfát

DT- Decision Theory Performance-Based Selection

EDTA- kyselina ethilendiamintetraoctová

ES- Španělsko

FAPPZ- Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

FI- Finsko

FR- Francie

G- guanin

GB- Spojené království

HR- Chorvatsko

IR- Írán

IT- Itálie

ME- minimum evolution

ML- maximum likelihood

MP- maximal parsimony

mt- mitochondriální

N- nespecifikováno

*nad*- nikotinamid dehydrogenáza  
NCBI- National Center for Biotechnology Information  
NNI- Nearest Neighbor Interchange  
Obr- obrázek  
PCR- Polymerase Chain Reaction  
PL- Polsko  
qRT-PCR- quantitative Real-time PCR  
SDS- dodecylsírán sodný  
SE- Švédsko  
SNP- Single Nucleotide Polymorfismus  
T- thymín  
TBE- Tris-borát-EDTA  
TPI- trióza-fosfát izomeráza  
UG- Uganda  
ZA- Jihoafrická republika