

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

2008



Bakalářská diplomová práce

Genealogická struktura populací parazitického hlísta
Haemonchus contortus

Tereza Marvanová

Školitel: Prof. RNDr. Václav Hypša, CSc.

České Budějovice, duben 2008

Bakalářská diplomová práce

Marvanová T., 2008, Genealogická struktura populací parazitického hlísta *Haemonchus contortus*. [Genealogical structure of populations of parasitic nematode *Haemonchus contortus* . Bc. Thesis, in Czech] - 27 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Annotace

The genealogical structure of populations of parasitic nematode *Haemonchus contortus* was studied using mitochondrial DNA (mtDNA).

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č.111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích, dne 30.4.2008

.....

Tereza Marvanová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli V.Hypšovi za možnost pracovat v Laboratoři molekulární fylogenetiky a evoluce parazitů a za odborné vedení mé bakalářské práce. Za cenné rady bych chtěla poděkovat také Lence Štifterové a Janu Štefkovi.

Obsah:

1. Úvod	1
1.1. Životní cyklus a klimatická omezení	2
1.2. Populační genetik a struktura populací parazitů	3
1.3. Vymezení druhů	4
1.4. Molekulární markery	5
1.5. Mitochondriální DNA (mtDNA)	5
2. Cíl práce	8
3. Materiál a metodika	9
3.1. PCR amplifikace	10
3.2. Elektroforéza	11
3.3. Purifikace plazmidu	11
3.4. Sekvenační reakce	11
3.5. Zpracování sekvencí	12
3.6. Fylogenetická analýza	12
4. Výsledky	14
5. Diskuze	21
6. Závěr	23
7. Použitá literatura	24

1. Úvod

Haemonchus contortus (Rudolphi, 1803), syn. *Strongylus contortus*, českým názvem vlasovka slézová, je parazitický hlíst z čeledi Trichostrongylidae (řád Strongylida, podřád Trychostrongyloidea), který způsobuje nemoc hemonchózu u domácích turovitých, u ovcí a koz, u srnčí zvěře a dalších přežvýkavců. *H. contortus* je jeden z nejvýznamnějších patogenů přežvýkavců v rozvojových zemích (Perry a kol, 2002). Jeho výskyt převažuje v teplých a vlhkých oblastech. Bylo popsáno 12 druhů z rodu *Haemonchus*, z nichž *H. contortus*, *H. placei* a *H. similis* se globálně vyskytují ve slezu (abomasu) domácích kopytnatců, kde žijí přichyceni ke sliznici a sají krev (Hoberg a kol., 2004). Způsobují velké ekonomické ztráty na zvířatech, zejména přežvýkavcích. Je běžné, že je zvíře nakaženo několika druhy z čeledi Trychostrongylidae najednou. Uplatnění znalostí z biologie a ekologie o těchto parazitech napomáhá při chovu ovcí a je důležité pro udržení ztrát skotu na minimální hranici.

H. contortus je důležitý model jak pro základní, tak pro aplikovaný parazitologický výzkum, například pro studie zabývající se vývojem vakcín a vznikem rezistence proti antihelminetikům. První populační studie, která se zabývala změnami v sekvencích mtDNA populací trichostrongyloidních nematod parazitujících na skotu a ovcích v Severní Americe, naznačovala, že mezi populacemi trichostrongyloidních nematod je jen malá genetická diference (Blouin a kol., 1995). Populace *H. contortus* z různých geografických lokalit v této studii vykazovaly nízkou genetickou diferenciaci. Z novějších údajů je zřejmé, že tato práce byla patrně zatížena některými metodickými chybami. Nedávné studie ukazují, že *H. contortus* je extrémně geneticky různorodý organismus (Troell a kol., 2006). Vnitrodruhová diverzita sekvencí mitochondriální DNA u *H. contortus* a dalších trychostrongyloidních nematod je velmi vysoká, až 10x vyšší než je obvyklé u obratlovců (Blouin a kol., 1995). Práce zaměřené na genetické markery jako jsou SNPs, mikrosatelity a transposonní inserce odhalily existenci významné genetické diference mezi samostatnými populacemi *H. contortus*, ikdyž tyto práce byly provedeny jen na malém množství červů (Otsen a kol., 2000). Značná genetická diference byla prokázána v nedávné době mezi populacemi *H. contortus* z různých kontinentů použitím sekvencí mtDNA a AFLP analýz (Amplified Fragment Length Polymorphism - polymorfismus v délce amplifikovaných fragmentů; Troell a kol., 2006). Znalost genetické struktury populací *H. contortus* je stále velmi omezená a je potřeba provést ještě více detailních genetických analýz jak na laboratorních izolátech tak na populacích z různých geografických lokalit (Redman a kol., 2007).

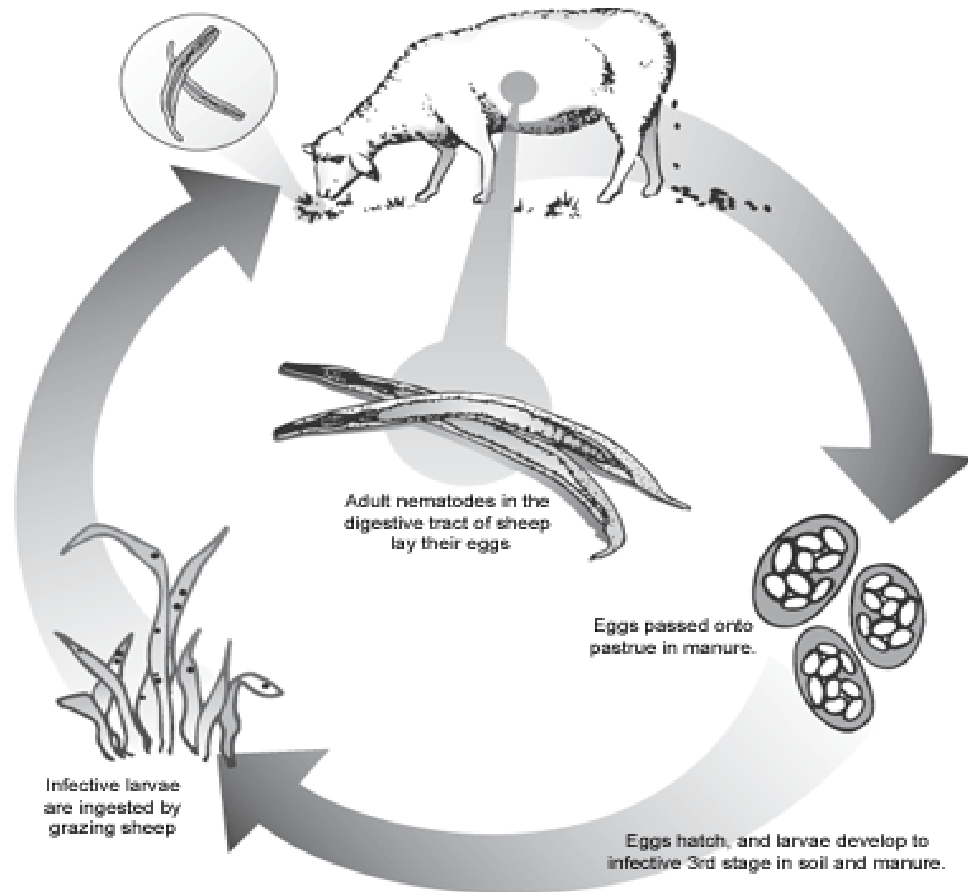
Podobně vysokou hodnotu genetické diverzity naznačují také nukleární lokusy, bodové polymorfismy (SNPs) v kódujících a nekódujících sekvencích, části inzerce a mikrosatelitové lokusy, které ukázaly velmi vysokou hodnotu genetické diverzity mezi populacemi (Beech a kol., 1994). Zdá se, že tato vysoká divergence je způsobena především extrémní velikostí populace, protože jeden hostitel může obsahovat tisíce dospělých červů (Urquhart a kol., 1996).



obr.1. *Haemonchus contortus*. Převzato z <http://www.nematodes.org>.

1.1. Životní cyklus a klimatická omezení

Haemonchus má vývoj přímý. Horizontální přenos mezi ovce probíhá díky třetímu larválnímu stádiu L3. Životní cyklus je rozdělen na dvě fáze: volně žijící a parazitující uvnitř hostitele. Vajíčka vychází z těla spolu s trusem a vyvíjí se přes první (L1) a druhé (L2) larvální stádium až ke třetímu (L3) přenosnému stádiu. *Haemonchus* je přijatý s potravou a putuje do čtvrtého žaludku (abomasum), kde se vyvíjí v pohlavně zralého dospělého. (obr.2)



obr 2. Životní cyklus parazitického hlísty *Haemonchus contortus*. Převzato z <http://www.ext.vt.edu>

Podmínky životního prostředí mají určující dopad na populaci parazitů. Obecně vzato, *H. contortus* je považován za organismus, který se dokáže lépe přizpůsobit teplému a vlhkému klimatu. Mnoho studií prokázalo, jak změny v prostředí ovlivňují vývoj volně žijících stádií mimo tělo hostitele. Nižší výskyt haemonchózy byl naměřen při průměrných měsíčních teplotách 18°C a minimálních měsíčních srážkách 50mm (Gordon, 1948). Optimální teplota pro vývin z vajíčka do L3 stádia je 28°C a vlhkost nad 70% (Rossanigo & Gruner, 1995), malý nebo žádný vývin vajíčka při teplotě 9°C a nižší (Silverman & Campbell, 1959). Proto studené podnebné pásy svými podmínkami limitují vývin larev *H. contortus* ve stádiích mimo tělo hostitele.

Potlačený vývoj nebo také hypobióza je častým jevem v životě gastrointestinálních nematod přežvýkavců (Eysker & Kooyman, 1993). Za hlavní příčinu této inhibice u *H. contortus* byly považovány sezónní změny (Connan, 1971; Muller, 1968). Předpokládá

se, že tento jev je adaptací na přežití zimního období v oblastech mírného pásu, kdy je přenos díky larválním stádiím výrazně omezen (Blitz & Gibbs, 1972; Waller & Thomas, 1975). Nastává také letní inhibice, která parazita chrání před obdobím sucha (Eysker & Kooyman, 1993). Ale hypobióza v tropických a subtropických oblastech nebyla zaznamenána tak často (Allonby & Urtquhart, 1975). Někteří ostatní vědci předpokládají, že inhibice *H. contortus* je spíše nutná strategie, dána geneticky, než následek vnějších podnětů (Walter & Thomas, 1975).

1.2. Populační genetik a struktura populací parazitů

Genetickou strukturu populací může utvářet a ovlivňovat mnoho aspektů, mezi něž patří např. environmentální a geografické bariéry nebo velikost populace. Populace jsou často více či méně geneticky odlišné, jelikož jsou od sebe izolované velkou vzdáleností. Geografické rozšíření druhů je obvykle větší než rozptylová schopnost samotného jedince. Studie systémů hostitel-parazit jsou většinou složitější a komplikovanější než výzkumy na jednom druhu, protože hostitel a parazit přímo ovlivňují jeden druhého a jsou součástí koevolučního procesu (Poulin a kol., 2000). Srovnání genetické diverzity a struktury dvou různých typů parazitů může poskytnout důležité nahlédnutí do toho, jak vlastnosti hostitelů ovlivňují rozdílnost mezi populacemi parazitů z různých geografických lokalit.

Populační genetik parazitů je poměrně opomíjený obor (Grant, 1994), až v minulém desetiletí se mu dostalo vážnější pozornosti (např. Anderson a kol., 1998; Gasser a Chilton, 2001; Hu a kol., 2004). To má za následek, že některé předpoklady o struktuře populací parazitů zůstávají do velké míry nepotvrzené. Bylo prokázáno, že genetický tok u nematod parazitujících na domácích zvířatech je ovlivněn vývojem parazita i jeho hostitele (Anderson a kol., 1998; Poulin, 1998), ačkoliv je stále nejasné, které faktory uvnitř parazitických populací převažují při tvorbě genetických zákonitostí. Např. větší genetická variabilita uvnitř populace z jedné farmy než mezi dvěma farmami byla pozorována u hlístice *Mazamastrongylus odocoilei* v Severní Americe (Blouin a kol., 1995) a v Evropě (Leignel & Humbert, 2001). Tato skutečnost je přisuzována rozsáhlým pohybům domestikovaných hostitelů (Blouin a kol., 1995). Pohyblivost hostitele je tudíž hlavní určující faktor pro parazity s omezenou schopností rozšiřovat se ve volně žijících stádiích (Blouin a kol., 1995; Nadler, 1995). Pro parazity s vnějšími životními stádii (vně hostitele) může být dalším vhodným faktorem vztah mezi mimohostitelským prostředím a populační strukturou (Höglung a kol., 2004). Např. nepříznivé klima může mít za následek

extrémní podmínky a tím ovlivnit genetickou strukturu těchto parazitů. Navíc ve výzkumu o populacích na velké geografické ploše může být očekáváno, že separace části populace může mít silný dopad na populační strukturu. Několik hypotéz o významu těchto různých účinků na populační genetiku parazitů je v nynější době testováno (Troell a kol, 2006).

1.3. Vymezení druhů

Existuje mnoho definic, co je a co představuje druh (Cracraft, 2000). Otázka rozhodnutí, co jsou druhy a jak mohou být v přírodě definovány, patřila ve vývojové biologii mezi nejvíce probírané (Turelli a kol., 2001). Při definování druhu existuje několik překážek při použití morfologických, behaviorálních, fyziologických nebo biochemických znaků. Např. selekční tlak může vést ke konvergentním fenotypům různých organismů, kteří si nejsou příbuzní (Kunz, 2002). K definování a oddělování druhů se proto čím stá­le častěji používají molekulární (tj. genetická) data, která jsou považována za spolehlivější zdroj informace. Molekulární data umožňují srovnání bez vedlejších vlivů, kterými jsou životní stadium, věk, hostitel či geografický původ (Nolan & Cribb, 2005). Metody založené na polymerázové řetězové reakci PCR (polymerase chain reaction) našly široké uplatnění, díky své citlivosti dovolují analýzy markerů z omezeného množství DNA. Toto je zvláště významné při zkoumání jedinců parazitických nematod, kdy není možné získat velké množství materiálu DNA nebo pěstovat tyto jedince *in vitro*. Např. rod *Haemonchus* je složen z více než deseti druhů, z nichž *H. contortus* a *H. placei* jsou z veterinárního hlediska významné (Hoberg a kol., 2004). Dříve se předpokládalo, že patří mezi zástupce jediného druhu, protože mají málo morfologických rozdílů a oba se adaptovali na ovce a skot (Gibbons, 1979; Urquhart a kol., 1996). V roce 1995 Stevenson, Chilton a Gasser označili *H. contortus* a *H. placei* skutečně za dva odlišné druhy na základě použití molekulárních metod a markeru v ribosomální DNA (rDNA).

1.4. Molekulární markery

Mimořádný rozvoj v posledních desetiletích se odrazil v oblasti molekulární genetiky. Tento pokrok vedl k rozvoji mnoha druhů odlišných technik, které jsou používány ke studiu genetické variace. Molekulární markery jsou cíleně či náhodně vybrané části genetické informace, které poskytují informace o fylogenetických vztazích a evoluci organismů na základě analýzy jeho molekul (proteinů, DNA). Vypovídají o

genetické podobnosti (příbuznosti) jedinců, populací nebo druhů. Markery se mohou lišit s ohledem na důležité rysy, jako např. množství, charakter polymorfismu, specifika lokusu, opakovatelnosti, liší se samozřejmě také podle technických požadavků (Woodhead a kol., 2005). Proto tedy účelnost markeru závisí na jeho vlastnostech a na tom, k jakému účelu je používán. Z tohoto důvodu žádný marker není dokonalejší či kvalitnější než ostatní. Ideální marker by měl mít přiměřený počet variací pro konkrétní použití (dostatečně nízká vnitrodruhová variace a naopak vysoká míra divergence mezi úzce příbuznými druhy) a měl by být věrohodný.

1.5. Mitochondriální DNA

Každá mitochondrie má svůj vlastní genom, který úzce spolupracuje s jaderným genomem, ale je od něho odlišný. Analýzy prokázaly, že mtDNA je užitečný molekulární marker pro studování evoluce v populacích a stala se důležitým nástrojem pro studium historie a struktur populací (Awise, 2004). Na rozdíl od jaderné DNA v mitochondriální DNA dochází k tzv. maternální dědičnosti (až na pár výjimek např. heteroplasmie, mtDNA je děděna z jedné generace do druhé maternální linií; William, Ballard & Rand, 2005). Mitochondriální DNA obsahuje žádné malé množství rekombinací, má relativně vysokou substituční rychlost a celá molekula se dá jednoduše izolovat (Awise a kol., 1987). Předpokládá se, že přítomný polymorfismus je způsoben mutacemi.

Obecně vzato, mtDNA má vyšší substituční rychlost než jaderná DNA (Blouin, 2002). Ta je způsobena i díky nedostatečně výkonnému reparačnímu mechanismu na opravu mutací (Awise, 2004). Díky této vysoké mutační rychlosti je možné rozpoznat rozdíly mezi velice blízkými příbuznými jedinci. Na druhé straně však způsobuje problémy při určování fylogeneze na vyšší úrovni (Blouin a kol., 1998). Smysluplné porovnávání mtDNA tedy můžeme provést jen mezi blízkými příbuznými taxony, či při studiu populační genetiky (Awise a kol., 1987). Jednotlivé části mtDNA se různě rychle mění, např. kontrolní oblast velmi rychle a tRNA geny mnohem pomaleji (Moritz, Dowling & Brown, 1987; Randi, 2000).

Používání mtDNA má několik podstatných výhod. Většina buněk obsahuje stovky až tisíce molekul mtDNA (Randi, 2000), proto při používání mtDNA markeru potřebujeme menší množství materiálu ve srovnání s markerem jaderné DNA. Nedostatek materiálu je běžným problémem, jelikož parazitických helmintů nemohou být kultivováni *in vitro*. Pro studium populační genetiky mnoha parazitických nematod jsou používány

především specifické části mitochondriálního genomu *nad4* a *cox1* geny (Höglund a kol., 2006).

Několik vlastností naznačuje, že evoluce mtDNA nematod je ve srovnání s jinými kmeny nezvyklá. Např. mtDNA nematod má sklon být extrémě bohatá na AT báze 75-80% (Anderson a kol., 1998; Blouin a kol., 1998). Je také dokázáno, že mtDNA nematod se rychle vyvíjí (Anderson a kol., 1998; Blouin a kol., 1995; Blouin a kol., 1998) a mitochondriální genom nematod je náchylnější na rekombinace a přeskupování genů než u ostatních organismů (Blouin a kol., 1998). Mitochondriální genomy nematod jsou obvykle menší (cca 13,6 - 14,3 kb) než mitochondriální genomy ostatních skupin metozoí (Hu a kol., 2004). Mezi známé výjimky patří *Trichinella spiralis* a *Romanomermis culicivorax*, jejichž mitochondriální genom je velký cca 21 – 26kb (Hu a kol., 2004).

2. Cíl práce

- Cílem práce je pomocí sekvencí mitochondriálních genů provést na materiálu poskytnutém spolupracujícími laboratořmi ve Skotsku analýzu populační struktury a genealogických vztahů parazitického hlísta druhu *Haemonchus contortus* z různých lokalit. Výsledná genealogická struktura bude dále sloužit jako podklad při studiu vzniku a šíření anthelmintické resistance vůči lékům a vakcínám.

3. Materiál a metodika

Pro tuto práci byla použita izolovaná mitochondriální DNA (mtDNA) zasláná spolupracující laboratoří (Dr. John Gilleard, University of Glasgow). Celkem bylo zasláno 150 jedinců parazitických hlístů rodu *Haemonchus contortus*, jejichž hostitelem je ovce domácí (*Ovis aries*). Jedinci parazitovali na hostitelích v těchto lokalitách: Chennai, Coimbatore, Hyderabad a Vijayawada (obr.3) Dále byly zaslány 4 skupiny izolátů dlouhodobě udržované a běžně používané v parazitologických laboratořích pro studium anthelmintické rezistence: ISE, WRS, CAVR a MoH. Celkem tvoří 11 populací mezi nimiž byla zjišťována genealogická struktura.

Obr.3 Lokality, ze kterých pocházejí vzorky. Převzato z <http://www.eceesty.cz>.



3.1. PCR amplifikace

Izolovaná mtDNA byla použita jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Pro amplifikaci byla použita HotStarTaq polymeráza kvůli omezení tvorby nespecifických produktů. V případě negativních výsledků byly upravovány postupy míchání, pipetování nebo byly poupraveny nasedací teploty a koncentrace DNA ve snaze najít optimální kombinace. Jiné koncentrace při míchání upravovány nebyly. Vždy byly současně připravovány negativní a pozitivní kontroly. PCR probíhala na přístrojích Eppendorf Mastercycler a XP Thermal Cycler BIOER.

- Pro amplifikaci byly použity tyto primery:

primery 16S rDNA: forward: 3'-GTTTTGGTAATTGAATGTT-5'

reverse: 5'-CTACAGTATACATATGATGAG-3'

- Složení reakční směsi o výsledném objemu 20 μ l do 0,5ml Eppendorfek:

dNTP 2mM	2 μ l
Hot buffer 10x (Qiagen)	2 μ l
Hot MgCl ₂ 25mM (Qiagen)	2 μ l
HotStarTaq polymeráza (Qigen)	0,2 μ l
Primer I (20 μ M)	1 μ l
Primer II (20 μ M)	1 μ l
DNA (koncentrace neměřena)	1 μ l
dH ₂ O	10,8 μ l

- Amplifikace probíhala na přístrojích za těchto podmínek:

reakční cyklus:

1. 95°C 15min

2. 94°C 1min

 50°C 45sec

72°C 1min

 30 cyklů opakování

3. 72°C 10min

4. 10°C

Ke kontrole úspěšné amplifikace byla provedena elektroforéza na agarózovém gelu.

3.2. Elektroforéza

0,4 g agarózy bylo rozpuštěno ve 40ml roztoku pufru TAE (40mM Tris- CH_3COOH , pH 8,2; 20mM NaOAc; 1mM EDTA pH 8,0), vloženo do mikrovlnné trouby a prošlo varem. Celý roztok byl ochlazen na 50°C a nalit do elektroforetické formy s hřebínky. Po ztuhnutí gelu byly nanесeny vzorky s barvou Syber Green do jamek a rozběhnuta elektroforéza (MiniRun Gel Electrophoresis Systém GE-100, Bioer Technology). DNA byla dělena při napětí 50-90V a detekována na UV světle přístroje BIOMETRA TI3 při určité vlnové délce. Velikost fragmentu byla stanovena porovnáním s markerem Gene Ruler™ 1kbp DNA Ladder.

3.3. Purifikace plazmidu

Plazmidová DNA byla poté přečištěna pomocí PCR Product Purification Spin Kit/250, postup purifikace byl proveden podle manuálu výrobce.

3.4. Sekvenační reakce

- Reakční směs o celkovém objemu 20 μl byla připravena do 0,5ml Eppendorfek a obsahovala:

plazmidová DNA 6 μl (koncentrace neměřena)

dH₂O 5 μl

bylo dáno do PCR cykлерu denaturovat na 3min při teplotě 96°C, poté přidáno:

R-mix 2 μl

2,5x ředícího pufru 6 μl

sekvenační primer 1 μl

Všechny reakční směsi byly vloženy do PCR cykлерu (XP Thermal Cycler BIOER) a spuštěn program sekvenační reakce.

▪ Sekvenace probíhala za těchto podmínek:

1. 96°C 10sec
2. 52°C 20sec
3. 62°C 4min
 30 cyklů opakování
4. 4°C

Poté byla reakce přerušena přidáním 4 μ l Stop pufru (8 μ l 50mM EDTA+32 μ l H₂O) a označené Eppendorfký se vzorky byly odneseny na ledu do laboratoře genomiky (Ústav molekulární biologie rostlin, AV ČR) na přečištění produktu. Sekvence byly čitelné cca 650 bp.

3.5. Zpracování sekvencí

Ke zpracování výsledků sekvenace byl použit soubor programů DNASTAR (Lasergene, Inc., 2002). V programu Seqman bylo provedeno spojení komplementárních sekvencí, jejich úprava a vytvoření konsenzuálních sekvencí. Do alignmentu bylo zahrnuto celkem 70 sekvencí (včetně outgroupu, viz Tab.1), jako outgroup byl zvolen rod *Cooperia* (z čeledi Trychostrongylidae stejně jako *Haemonchus contortus*). Matice byla sestavena programem Megalign a upravena na jednotnou délku sekvencí v programu Bioedit (Hall, 1999). Matice neobsahovala žádné gapy a nevyžadovala tedy testování alignovacích parametrů.

3.6. Fylogenetická analýza

Z následujících analýz byly vypuštěny začátky (cca 20bp) a konce (cca 30bp) všech sekvencí, z důvodu chybějící informace u některých sekvencí v těchto místech. Analýzy byly provedeny na nukleotidové úrovni.

Tab.1 Počet sekvencí v různých populacích, které byly vyhodnoceny

	název populace	počet sekvencí
1.	WRS	17
2.	CAVR	13
3.	MoH	13
4.	ISE	13
5.	Chennai	4
6.	Coimbatore-40	3
7.	Coimbatore-45	3
8.	Hyderabad-23	2
9.	Hyderabad-26	1

Analýza genealogických vztahů byla provedena programem PAUP* verze 4b10 (Swofford, 1998), následujícími metodami: maximální parsimonie (MP) se stanoveným standardním poměrem transverzí a tranzic 1:1, distanční metoda minimum evolution (ME) s použitím jednoparametrového evolučního modelu Jukes-Cantor (JC) a Kimurova dvouparametrového modelu (K2P). Vzniklý kladogram byl upraven programem Treeview verze 1.6.6. a programem FigTree verze 1.1.2. a převeden do grafického formátu.

Haplotypová síť byla zkonstruována použitím programu TCS verze 1.2.1, spojovací limit byl nastaven standardně na hodnotu 95%.

4. Výsledky

Byly získány úseky mtDNA o délce cca kolem 650bp, které byly ve výsledné matici zkráceny u všech sekvencí na stejnou délku 600bp. Celkem ze 150 vzorků izolované DNA, kterou zaslala spolupracující laboratoř ve Skotsku (Tab.2) se podařilo osekvenovat 69 vzorků z různých populací (Tab.3). Ostatní DNA se nepodařilo amplifikovat pomocí PCR ani po několika pokusech, případně byly získané sekvence identifikovány jako kontaminace a tudíž nemohly být dále použity. Kladogramy získány různými metodami analýzou matice se neliší, proto je uváděna ve výsledcích jako příklad pouze topologie získaná modelem Jukes-Cantor.

Tab.2 Zaslané vzorky

označení vzorku	název populace	označení vzorku	název populace
1836	Chennai	284	WRS
1837	Chennai	285	WRS
1838	Chennai	286	WRS
1839	Chennai	287	WRS
1840	Chennai	288	WRS
1841	Chennai	289	WRS
1842	Chennai	290	WRS
1843	Chennai	291	WRS
1844	Chennai	292	WRS
1845	Chennai	293	WRS
1862	Coimbatore-40	294	WRS
1863	Coimbatore-40	295	WRS
1864	Coimbatore-40	296	WRS
1865	Coimbatore-40	297	WRS
1866	Coimbatore-40	298	WRS
1867	Coimbatore-40	299	WRS
1868	Coimbatore-40	300	WRS
1869	Coimbatore-40	301	WRS
1870	Coimbatore-40	302	WRS
1871	Coimbatore-45	303	WRS
1873	Coimbatore-45	333	ISE
1874	Coimbatore-45	334	ISE
1875	Coimbatore-45	335	ISE
1876	Coimbatore-45	336	ISE
1877	Coimbatore-45	337	ISE
1878	Coimbatore-45	338	ISE
1879	Coimbatore-45	339	ISE
1880	Coimbatore-45	340	ISE
1881	Coimbatore-45	341	ISE
1882	Coimbatore-45	342	ISE
1980	Hyderabad-26	355	ISE

1981	Hyderabad-26
1982	Hyderabad-26
1983	Hyderabad-26
1984	Hyderabad-26
1985	Hyderabad-26
1986	Hyderabad-26
1987	Hyderabad-26
1989	Hyderabad-26
1990	Hyderabad-26
2001	Hyderabad-23
2002	Hyderabad-23
2003	Hyderabad-23
2004	Hyderabad-23
2005	Hyderabad-23
2006	Hyderabad-23
2007	Hyderabad-23
2008	Hyderabad-23
2009	Hyderabad-23
2010	Hyderabad-23
2021	Vijayawada-29
2022	Vijayawada-29
2023	Vijayawada-29
2024	Vijayawada-29
2025	Vijayawada-29
2026	Vijayawada-29
2027	Vijayawada-29
2028	Vijayawada-29
2029	Vijayawada-29
2030	Vijayawada-29
2042	Vijayawada-31
2043	Vijayawada-31
2044	Vijayawada-31
2045	Vijayawada-31
2046	Vijayawada-31
2047	Vijayawada-31
2048	Vijayawada-31
2049	Vijayawada-31
2050	Vijayawada-31
2051	Vijayawada-31

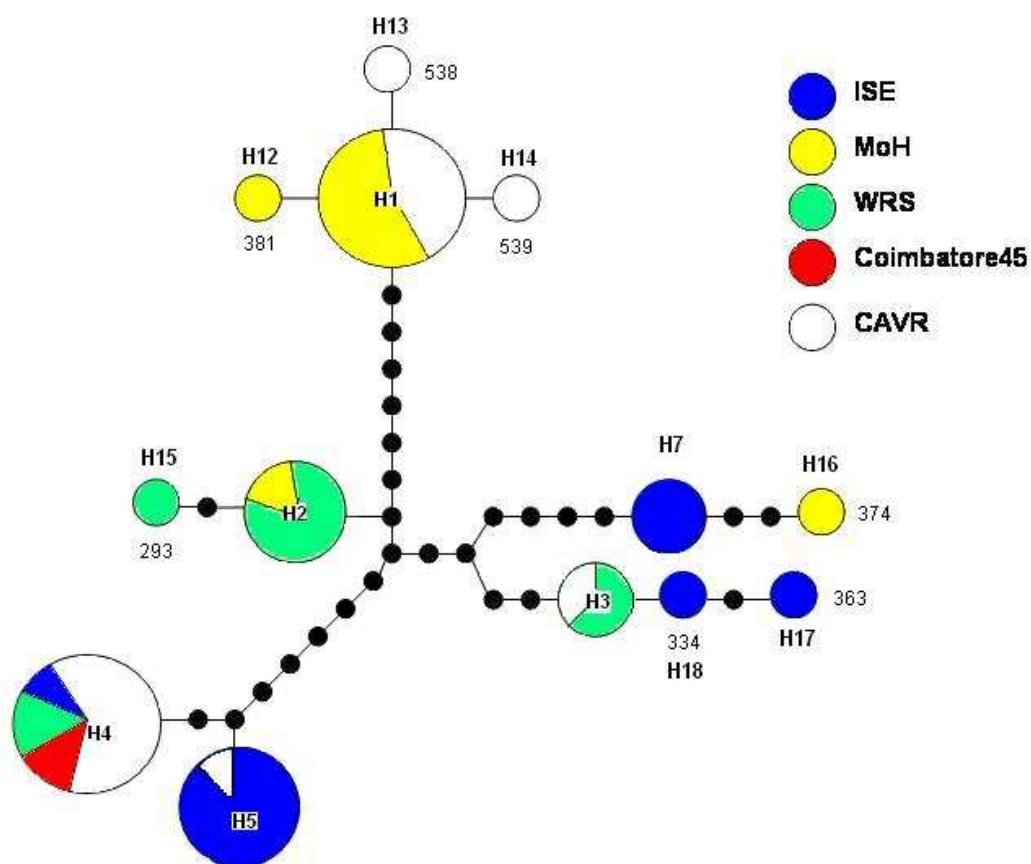
356	ISE
357	ISE
358	ISE
359	ISE
360	ISE
361	ISE
362	ISE
363	ISE
364	ISE
530	CAVR
531	CAVR
532	CAVR
533	CAVR
534	CAVR
535	CAVR
536	CAVR
537	CAVR
538	CAVR
539	CAVR
1540	CAVR
1541	CAVR
1542	CAVR
1543	CAVR
1544	CAVR
1545	CAVR
1546	CAVR
1547	CAVR
1548	CAVR
1549	CAVR
368	MoH
369	MoH
370	MoH
371	MoH
372	MoH
373	MoH
374	MoH
375	MoH
376	MoH
377	MoH
378	MoH
379	MoH
380	MoH
381	MoH
382	MoH
383	MoH
384	MoH
385	MoH
386	MoH
387	MoH

Tab.3 Osekvenované vzorky z různých populací.

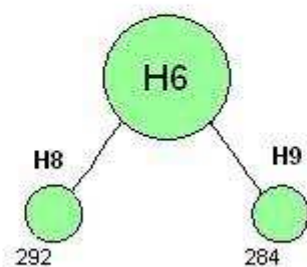
označení vzorku	název populace	označení vzorku	název populace
257	WRS	379	MoH
284	WRS	380	MoH
287	WRS	381	MoH
288	WRS	382	MoH
289	WRS	383	MoH
292	WRS	384	MoH
293	WRS	385	MoH
294	WRS	386	MoH
295	WRS	387	MoH
296	WRS	530	CAVR
297	WRS	532	CAVR
298	WRS	534	CAVR
299	WRS	536	CAVR
300	WRS	538	CAVR
301	WRS	539	CAVR
302	WRS	1540	CAVR
303	WRS	1542	CAVR
333	ISE	1545	CAVR
334	ISE	1547	CAVR
335	ISE	1546	CAVR
336	ISE	1548	CAVR
337	ISE	1549	CAVR
338	ISE	1837	Chennai
339	ISE	1838	Chennai
341	ISE	1840	Chennai
356	ISE	1844	Chennai
357	ISE	1863	Coimbatore-40
359	ISE	1865	Coimbatore-40
361	ISE	1867	Coimbatore-40
363	ISE	1873	Coimbatore-45
368	MoH	1875	Coimbatore-45
372	MoH	1878	Coimbatore-45
374	MoH	1980	Hyderabad-26
378	MoH	2002	Hyderabad-23
		2009	Hyderabad-23

Obr.4 Haplotypové sítě zkonstruované programem TCS, spojovací limit nastaven standardně na 95%.

Sít' A



Sít' B



Sít' C

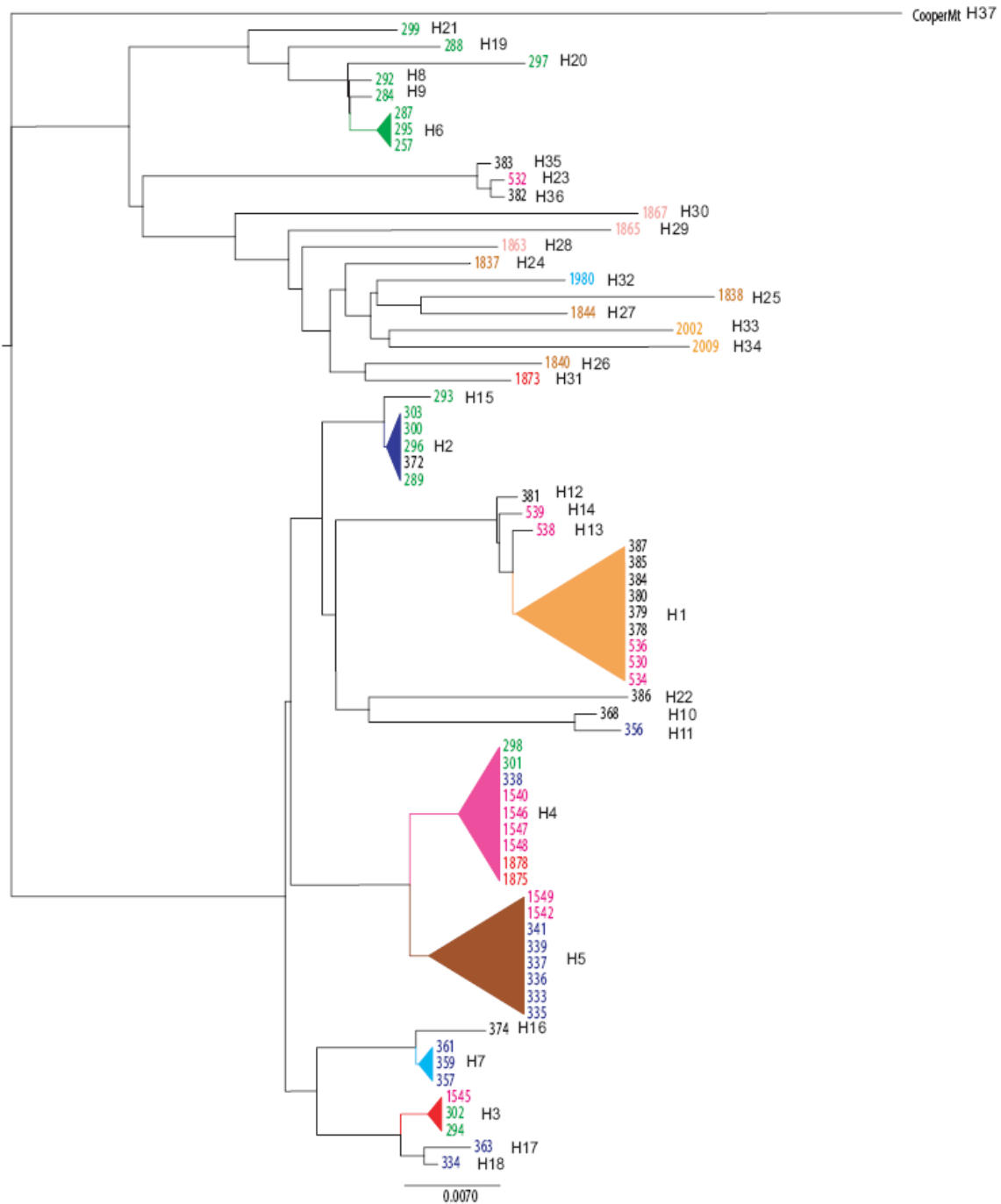


Seznam sekvencí, které tvoří jednotlivé haplotypy:

- **H1**: MoH: 379, 380, 384, 385, 387
CAVR: 530, 534, 536, 378
- **H2**: WRS: 289, 300, 303, 296
CAVR:372
- **H3**: WRS: 302, 294
CAVR:1545
- **H4**: CAVR:1548, 1547, 1546, 1540
Coimbatore 45: 1875, 1878
WRS: 298, 301
ISE: 338
- **H5**: ISE: 341, 339, 337, 336, 335, 333
CAVR:1549, 1542
- **H6**: WRS: 295, 257, 287
- **H7**: ISE: 361, 359, 357
- **H8**: WRS: 292
- **H9**: WRS: 284
- **H10**: MoH: 368
- **H11**: ISE: 356
- **H12**: MoH: 381
- **H13**: CAVR:538
- **H14**: CAVR:539
- **H15**: WRS: 293
- **H16**: MoH: 374
- **H17**: ISE: 363
- **H18**: ISE: 334
- **H19**: WRS: 288
- **H20**: WRS: 297
- **H21**: WRS: 299
- **H22**: MoH: 386
- **H23**: CAVR:532
- **H24**: Chennai: 1837
- **H25**: Chennai: 1838

- **H26**: Chennai: 1840
- **H27**: Chennai: 1844
- **H28**: Coimbatore-45: 1863
- **H29**: Coimbatore-40: 1865
- **H30**: Coimbatore-40: 1867
- **H31**: Coimbatore-45: 1873
- **H32**: Hyderabad-26: 1980
- **H33**: Hyderabad-23: 2002
- **H34**: Hyderabad-23: 2009
- **H35**: MoH: 383
- **H36**: MoH: 382
- **H37**: CooperMt

Obr.5 Kladogram odvozený metodou minimum evolution s použitím evolučního modelu Jukes-Cantor (JC) upravený v programu FigTree. Vzorčky označeny barevně podle toho, do které populace patří. Zvýrazněné skupiny sekvencí, které představují stejný haplotyp. Délka větve outgroupu a nulové délky větví byly upraveny a neodpovídají měřítku.



Barevně označené čísla vzorků značí tyto populace:

- | | | |
|----------------|-----------------|-----------------|
| ■ CAVR | ■ Hyderabad-26 | ■ Coimbatore-45 |
| ■ Hyderabad-23 | ■ Coimbatore-40 | ■ ISE |
| ■ WRS | ■ Chennai | ■ MoH |

5. Diskuze

Různé druhy izolátů *H. contortus* jsou běžně používány v laboratořích pro experimentální práce či teoretické studie o biologii parazita, imunitní odpovědi hostitele a o resistenci proti anihelminikům (Redman a kol., 2008). Různé izoláty jsou také používány při zkouškách účinnosti vakcín a antihelminik. Mnoho z těchto izolátů pochází z odlišných geografických regionů a proto mezi nimi můžeme předpokládat významnou genetickou variaci, která může mít vážný dopad pro vyhodnocování, srovnávání a interpretaci různých experimentálních studií. Genetické diference mohou také nastat během běžných rutinních postupů, kdy je *H. contortus* používán k sériovým infekcím ovcí či koz po několik let. Izoláty jsou často vyměňovány mezi různými laboratořemi, které používají různé metody pro odlišné postupy. Detailní historie izolátů používaných v odlišných laboratořích není vždy dostupná a může se rozšiřovat po mnoho let. Většina izolátů používaných v laboratořích je geneticky necharakterizována a je nedostatek jednoduchých, rychlých a ekonomicky přijatelných metod pro jejich rutinní testování a monitorování (Redman a kol., 2007).

Odhalená struktura ukazuje, že jednotlivé populace nejsou geneticky homogenními a genealogicky izolovanými liniemi (obr.5). V celém paternu genealogických vztahů se nachází pouze jediný případ, kde se geneticky homogenní skupina haplotypů rozrůstá, štěpí, ale stále zůstává omezena výhradně na jednu populaci (WRS: 299, 288, 297, 287, 295, 292, 257, 284). Výsledkem analýzy v programu TCS bylo velké množství neuchycených sekvencí, bez jednoznačně definovaných vztahů, což vypovídá o tom, že tyto haplotypy jsou do značné míry izolované. Výsledek ukazuje, že laboratorní izoláty mají nízkou genetickou diversitu a v žádném případě od sebe nejsou izolovány. Vzorky nasbírané na farmách na několika lokalitách v Indii jsou mnohem více geneticky diversifikovány. Patern poukazuje na tyto dvě možné skutečnosti:

- a) populace jsou značně fragmentované a navzájem promíchané
- b) jde o velké populace prosbírané velmi řídko, což vede k tomu, že spousta haplotypů může chybět, jelikož vůbec nebyla nasbírána

Vzhledem k celkovému uspořádání a délce větví jednotlivých haplotypů pokládám za pravděpodobnější druhou variantu. Lze tedy předpokládat, že s reprezentativnějším sběrem

bude možné získat v TCS programu kompletně propojenou haplotypovou síť – z distribuce jednotlivých haplotypů je patrné, že jednotlivé populace od sebe nejsou izolovány.

Mitochondriální DNA se dědí po maternální linii, tudíž nerekombinuje a zachycuje kompletní genealogii, díky ní můžeme zjistit jak vzorek v minulosti vznikl a k jakému jinému vzorku je příbuzný. Z kladogramu můžeme vymapovat například populace CAVR a WRS po mitochondriální linii až k samému kořeni stromu. To jasně ukazuje, že tyto populace vznikly smíšením haplotypů z kompletního spektra genealogických větví zahrnujícího i nejdříve odštěpené linie. Odlišná situace je například u populace ISE. Populace ISE. Ta je složena výhradně z linií, které se odštěpily později, což ale může být důsledkem toho, že tato populace není dostatečně prosbíráná. Z výsledků vyplývá, že populace WRS, CAVR a ISE jsou populace složené, stejně jako populace nasbírané v Indii. Vznikly tak, že se jedinci různého původu promíchali a vytvořili nové, geneticky heterogenní populace.

Pro všechny zkoumané populace byla v nedávné době uveřejněna studie využívající jako markeru mikrosatelity (Redman a kol., 2008). Mikrosatelitové analýzy nezachycují minulost, ale současnost, zkoumají zda je od sebe genetické složení populací úplně oddělené či ne. Tyto analýzy nám nedávají jednoznačné informace o fylogenezi. Naše výsledky dokazují, že historicky jsou populace složené z více zdrojů (tedy haplotypy více linií), zatímco v krátkodobém horizontu se chovají jako poměrně izolované a málo se křížící skupiny (mikrosatelity; Redman a kol., 2008). Ze studie zabývající se mikrosatelitovou analýzou vzorků ze stejných populací WRS a CAVR (Redman a kol., 2008) vyplývá, že tyto dvě složené populace se začínají chovat jako do značné míry uzavřené, tudíž jsou geneticky odlišitelné. Naše výsledky naopak dokazují, že WRS a CAVR od sebe nejsou dlouhodobě izolované, ale tvoří nehomogenní soubor genotypů různého původu.

6. Závěr

Byla zjištěna genealogická struktura populací červů *Haemonchus contortus* parazitujících na ovcích. Ze vzorků, které se podařilo osekvenovat byla vytvořena matice a zalignována, kde všechny sekvence byly zkráceny na stejnou délku 600bp. Z některých červů se nepodařilo amplifikovat DNA. Analýzy byly provedeny programem PAUP* verze 4b10 a haplotypové sítě programem TCS verze 1.2.1. Z výsledků vyplývá, že populace WRS, CAVR a ISE jsou populace složené. Stejně jako populace nasbírané v Indii. Odhalená struktura ukazuje, že jednotlivé populace nejsou geneticky homogenními a genealogicky izolovanými liniemi.

7. Použitá literatura

- Allonby, E.W. & Urquhart, G.M. 1975. The epidemiology and pathogenic significance of haemonosis in a merino flock in East Africa. *Veterinary parasitology* 1, 129-143.
- Anderson, T.J., Blouin, M.S. & Beech, R.N. 1998. Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. *Advances in parasitology* 41, 219-283.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. 2nd Edition. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Niegel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics* 18, 489-522.
- Beech, R.N., Prichard, R.K., Scott, M.E., 1994, Genetic variability of the beta-tubulin genes in benzimidazole-susceptible and – resistant strains of *Haemonchus contortus*. *Genetics* 138, 103-110
- Blitz, N.M. & Gibbs, H.C. 1972. Studies on the arrested development of *Haemonchus contortus* in sheep. I. The introduction of arrested development. *International journal for parasitology* 2, 5-12.
- Blouin, M.S. 2002. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International journal for parasitology* 32, 527-531.
- Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H. & Dame, J.B. 1995. Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics* 141, 1007-1014.
- Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H. & Dame, J.B. 1998. Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. *Molecular biology and evolution* 15. 1719-1727.
- Connan, R.M. 1971. The seasonal incidence of inhibition of development in *Haemonchus contortus*. *Research in veterinary science* 12, 272-274.
- Cracraft, J. 2000. Species concepts in theoretical and applied biology: A systematic debate with consequences. In *Species concepts and phylogenetic theory*. Edited by Q.D. Wheeler & R. Meier. Columbia university press. New York.
- Eysker, M. & Kooyman, F.N. 1993. Notes on necropsy and herbage processing techniques for gastrointestinal nematodes of ruminants. *Veterinary parasitology* 46, 205-213.

- Gasser, R.B., Chilton, N.B., 2001. Applications of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to taxonomy, diagnosis, population genetics and molecular evolution of parasitic nematodes. *Veterinary Parasitology* 101, 201-213.
- Gordon, H.M. 1948. The epidemiology of parasitic diseases, with special references to studies with nematode parasites of sheep. *Australian veterinary journal* 24, 17-44.
- Grant, W.N., 1994. Genetic variation in parasitic nematodes and its implication. *International journal for parasitology* 24, 821-830.
- Hoberg, E.R., Lichtenfels, J.R. & Gibbons, L. 2004. Phylogeny for species of *Haemonchus* (Nematoda. Trichostrongyloidea): considerations of their evolutionary history and global biogeography among Camelidae and Pecora (Artiodactyla). *Journal of parasitology* 90, 1085-1102.
- Hu, M., Chilton, N.B. & Gasser, R.B. 2004. The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio-economic importance: recent progress, and implications for population genetics and systematic. *Advances in parasitology* 56, 133-212.
- Höglund, J., Engström, A., Morrison, D.A. & Mattsson, J.G. 2004. Genetic diversity assessed by amplified fragment length polymorphism analysis of the parasitic nematode *Dictyocaulus viviparus* the lungworm of cattle. *International journal for parasitology* 34, 475-484.
- Höglund, J., Morrison, D.A., Mattsson, J.G. & Engström, A. 2006. Population genetics of the bovine/cattle lungworm (*Dictyocaulus viviparus*) based on mtDNA and AFLP marker techniques.
- Kunz, W. 2002. When is a parasite species a species? *Trends in parasitology* 18, 121-124.
- Moritz, C., Dowling, T.E. & Brown, W.M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual review of ecology and systematics* 18, 269-292.
- Muller, G.L. 1968. The epizootiology of helminth infestation in sheep in the south-western district of the Cape. *Onderstepoort journal of veterinary research* 35, 159-193.
- Nadler, S.A., 1995. Microevolution and the genetic structure of parasite populations. *Journal of Parasitology* 81, 395-403
- Nolan, M.J. & Cribb, T.H. 2005. The use and application of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Advances in parasitology* 60, 223-228.
- Otsen, M., Plas, M.E., Groeneveld, J., Roos, M.H., Lenstra, J.A., 2000. Genetic markers for the parasitic nematode *Haemonchus contortus* based on intron sequences. *Experimental parasitology* 95, 226-229

- Perry, B.D., Randolph, T.F., McDermott, J.J., Sones, K.R. & Thornton, P.K. 2002. *Investing in animal health research to alleviate poverty*. ILRI (International Livestock research Institute). Nairobi, Kenya.
- Poulin, R., 1998. *Evolutionary Acology of Parasites*. Chapman & Hall, London.
- Poulin, R., Morand, S., Skorping, A., 2000. *Evolutionary Biology of Host-parasite Relationships: Theory Meets Reality*. Elsevier, Oxford.
- Redman, E., Packard, E., Grillo, V., Smith, J., Jackson, M., Gilleard, J.S., Microsatellite analysis reveals maked genetic differentiation between *Haemonchus contortus* laboratory isolates and provides a rapid system of genetic fingerprinting, *International journal for Parasitology* 38, 111-122.
- Randi, E. 2000. Mitochondrial DNA. In *Molecular methods in ecology*. Edited by A.J. Baker. Blackwell Sciences Ltd. Oxford.
- Rossanigo, C.E. & Gruner, L. 1995. Moisture and temperature requirements in faeces for the development of free-living stages of gastrointestinal nematodes of sheep, cattle and deer. *Journal of helminthology* 69, 357-365.
- Silverman, P.H. & campbell, J.A. 1959. Studies on parasitic worms of sheep in Scotland. I. Embryonic and larval development of *Haemonchus contortus* at constant conditions. *Parasitology* 49, 23-38.
- Soulsby, E.J.L. 1983. *Helminths, arthropods and protozoa of domestic animals*. 7th edition. Baillière Tindall. London.
- Troell, K., 2006, Genotypic and Phenotypic Characterization of *Haemonchus contortus* in Sweden, Doctoral Thesis, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2006.
- Troell, K., Engström, A., Morrison, D.A., Mattson, J.G., Höglund, J., 2006, Global patterns reveal strong population structure in *Haemonchus contortus*, a nematode parasite of domesticated ruminants, *International journal for parasitology* 36, 1305-1316.
- Turelli, M., Barton, N.H. & Coyne, J.A. 2001. Theory and speciation. *Trends in ecology and evolution* 16, 330-343.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. & Jennings, F.W. 1996. *Veterinary parasitology*. 2nd edition. Blackwell Science Ltd. Oxford.
- Waller, P.J. & Thomas, R.J. 1975. Field studies on inhibition of *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 71, 285-291.

- William, J., Ballard, O. & Rand, D.M. 2005. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annual review of ecology evolution and systematics* 36, 621-642.
- Woodhead, M., Russell, J., Squirrell, J., Hollingsworth, P.M., Mackenzie, K., Gibby, M. & Powell, W. 2005. Comparative analysis of population genetic structure in *Athyrium distentifolium* (Pteridophyta) using AFLPs and SSRs from anonymous and transcribed gene regions. *Molecular ecology* 14, 1681-1695.