

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Porovnání populační struktury hostitele
a parazita na systému
Sépie obecná - Dicyemida**

Bakalářská práce

Nikola Jachníková

Školitelka: Mgr. Marie Krausová

České Budějovice 2018

Jachníková N., 2018: Porovnání populační struktury hostitele a parazita na systému Sépie obecná - Dicyemida. [Comparison of the population structure of host and parasite on the system *Sepia officinalis* - *Dicyemida*. Bc. Thesis, in Czech.] - 40 p., Faculty of Science. University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Using analysis of mitochondrial DNA this study explores the population structure of parasite (*Dicyemida* sp.) and its host (*Sepia officinalis*) in Mediterranean sea.

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

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

V Českých Budějovicích dne 18. 4. 2018.

Nikola Jachníková

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Marii Krausové za cenné rady, připomínky, trpělivost a celkové vedení při práci v laboratoři, zpracování výsledků i psaní mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala mé rodině a přátelům za veškerou podporu, kterou mi po celou dobu poskytovali.

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární rešerše	2
2.1 <i>Sepia officinalis</i> (Linnaeus, 1758)	2
2.1.1 Taxonomie	2
2.1.2 Výskyt	2
2.1.3 Způsob života	2
2.1.4 Rozmnožování	2
2.2 Dicyemida	3
2.2.1 Taxonomie	3
2.2.2 Životní cyklus	4
2.3 Vztahy mezi hostitelem a parazitem	5
2.3.1 Koevoluce hostitel-parazit	6
4. Metodika	9
4.1 Vzorky	9
4.2 Extrakce DNA	10
4.3 Amplifikace DNA	11
4.4 Gelová elektroforéza	13
4.5 Přečištění a sekvenace	13
4.6 Zpracování sekvencí	13
5. Výsledky	15
5.1 Fylogenetické stromy	15
5.2 Populační síť	21
5.3 Populační statistiky	23
6. Diskuze	31
7. Závěr	34
8. Seznam použité literatury	35
9. Přílohy	39

1. Úvod

Ačkoli jsou hlavonožci hojně loveni rybáři a mají významnou obchodní hodnotu, o jejich biologii se toho příliš neví (Krstulović-Šifner et al. 2016), zejména pak o jejich parazitech a populační struktuře, proto je zajímavé zkoumat jejich populace i populace jejich parazitů. Mořské ekosystémy patří k nejméně prozkoumaným, a zároveň k nejstarším a nejstabilnějším ekosystémům. Zkoumání mořských organismů nám stále může poskytnout zajímavé poznatky z biologie i ekologie. Většinu mořské biomasy a biodiverzity tvoří plankton, na kterém lze názorně ukázat, jak málo jsou mořské ekosystémy prozkoumány. Flegontova et al. (2016) se například ve své studii zabývá skupinou planktonu *Diplonema*. V této studii bylo zjištěno, že *Diplonema* jsou v oceánu prakticky všudypřítomné – významné pro mořský ekosystém a překvapivě diverzní. Nicméně se přesto ví velmi málo o jejich biologii a ekologické funkci, ta může být zjištěna pouze pomocí nových dat. Lze očekávat, že i studie vztahů mezi hostitelem a parazitem mořských organismů mohou přinést nové zajímavé výsledky.

Tato práce se zabývá studiem desetiramenného hlavonožce *Sepia officinalis* a jeho parazita ze skupiny *Dicyemida*. V první části této práce se zabývám přehledem biologie studovaných druhů, v další části studiem populací na základě molekulárních dat. Pomocí analýzy genu cytochromoxidáza I (dále COI) jsou sekvence hostitele i parazita porovnány fylogenetickými metodami a populačními sítěmi. U parazita byl použit ještě gen pro malou ribozomální podjednotku (18S) pro prozkoumání druhové diverzity. Pomocí genu COI byly spočteny populační statistiky a populace hostitele a parazita byly porovnány mezi sebou.

2. Literární rešerše

2.1 *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758)

2.1.1 Taxonomie

S. Officinalis je živočich z kmene měkkýši (Mollusca), třídy hlavonožci (Cephalopoda), řádu sépie (Sepiida) a čeledi sépiovití (Sepiidae) (Boyle a Rodhouse, 2005). Patří k desetiramenným hlavonožcům (Decabrachia). Ti mají osm krátkých a dvě dlouhá ramena. Krátká ramena mají čtyři řady přísavek. Dlouhá ramena jsou zatažitelná a na rozšířených koncích mají čtyři řady různě velkých přísavek (Kleinert et al., 2003).

2.1.2 Výskyt

Je známo 23 druhů sépií. *S. Officinalis* se vyskytuje ve Středozezemním, Severním a Baltském moři (Norman, 2000), na šterkovitém a písčitém dně, mezi řasami a mořskou trávou (Kleinert et al., 2003). Kromě *S. Officinalis* se ve Středozezemním moři vyskytuje také *Sepia elegans* a *Sepia orbignyana* (Norman, 2000).

2.1.3 Způsob života

S. Officinalis je přes den zahrabána v písku, večer začne být aktivní a lovit (Kleinert et al., 2003). Živí se především rybami a korýši. Poté co nalezne svou kořist, vymrští lapací ramena a kořist chytí. Ramena se pohybují tak rychle, že je obtížné vidět (Norman, 2000). Oběť je usmrcena pomocí ostrých čelistí a ochromujících sekretů (Kleinert et al., 2003). Predátory *S. Officinalis* jsou především mořští ptáci, tuleni, velryby a větší ryby. Ti nemají žádné speciální adaptace pro její lov (Boyle a Rodhouse, 2005).

S. Officinalis je schopna provádět barvoměnu, za níž jsou zodpovědné tři typy pokožkových buněk – chromatofory, leukofory a iridofory. Pigmenty v chromatoforech mohou mít pět různých barev – žlutou, oranžovou, červenou, hnědou nebo černou. Dospělý jedinec má v pokožce miliony chromatoforů, které jsou řízeny činností mozku. Leukofory obsahují bílý pigment a v pokožce jsou umístěny hlouběji než chromatofory. Iridofory jsou zodpovědné za modrý nebo zelený lesk (Norman, 2000).

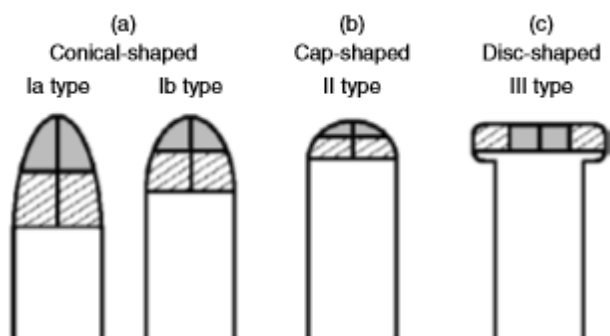
2.1.4 Rozmnožování

Rozmnožování probíhá na jaře, samec má zebrovitě pruhovaný šat, zatímco samice je tlumenějších barev. Samec pomocí lapacího ramene umístí spermatorfor do plášťové dutiny samice (Kleinert et al., 2003). Samice poté klade černá vajíčka, která jsou jednotlivě uzavřena ve vnější ochranné vrstvě. Černé zbarvení je způsobeno vylučováním sekretu

z inkoustového váčku (Boyle a Rodhouse, 2005). Vajíčka jsou upevňována na rostliny. *S. Officinalis* má přímý vývoj. Po vylíhnutí tráví mláďata nějakou dobu v planktonu a poté začínají aktivně plavat (Kleinert et al., 2003).

2.2 Dicyemida

Dicyemida jsou endosymbiotičtí parazité, nacházející se v renálním orgánu bentických hlavonožců. Jejich tělo je tvořeno pouze 8 až 40 buňkami, nemají žádné tělesné dutiny. Jejich tělo se skládá z hlavičky (calotte), hlavní axiální buňky, ve které se vyvíjí embrya, a pokryvných buněk s ciliemi. Většina druhů dicyemidů je hostitelsky specifická a obvykle je v jednom hostiteli nalezeno dva a více druhů (Furuya et al., 2003). Pokud je v jednom hostiteli nalezeno více druhů, liší se tvarem hlavičky. Jsou rozlišovány čtyři základní tvary hlavičky – kuželovitý, diskoidní, "cap-shaped" a nepravidelný (Obr. 1; Furuya et al., 2003).



Obr. 1: Tři hlavní typy pravidelných tvarů hlaviček u vermiformních stadií : (a) kuželovitý, (b) "cap-shaped", (c) diskoidní (převzato z Furuya et al., 2003).

2.2.1 Taxonomie

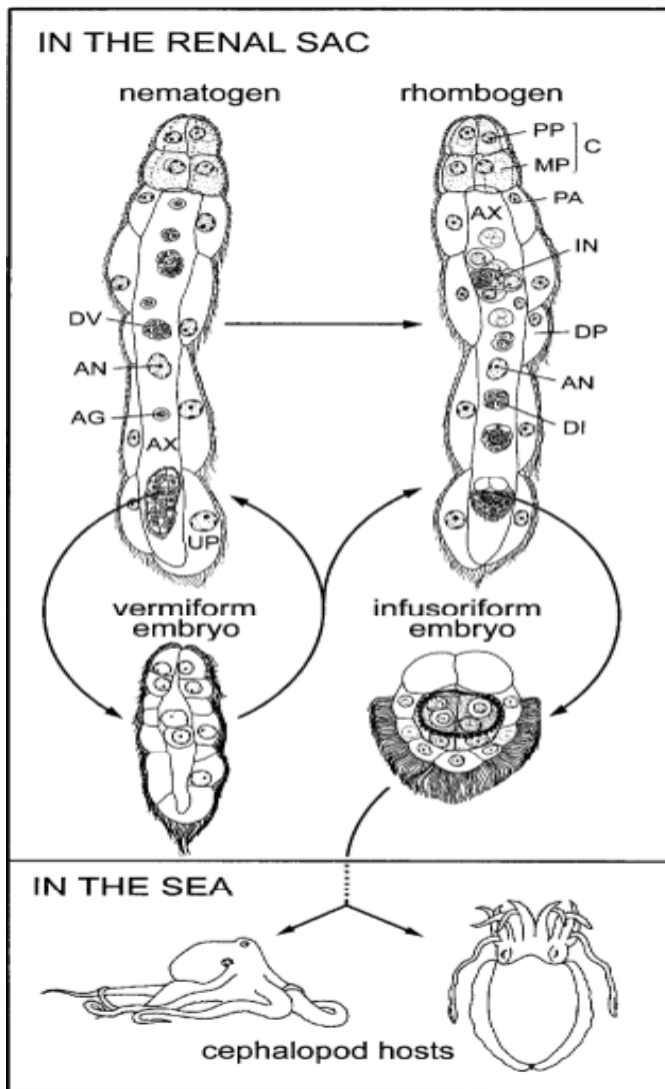
Van Beneden (1876) sec. Eshragh a Leander (2014) použili název Mesozoa, protože věřili, že tato skupina je z evolučního hlediska mezistupněm mezi Protozoa a Metazoa. Taxon Mesozoa tvoří 2 skupiny Orthonectida a Dicyemida. Hyman (1940, 1956) sec. Lapan a Morowitz (1975) navrhl, že díky své jednoduché struktuře by Mesozoa mohli připomínat hypotetického předka Metazoi. Ale zároveň se později objevil názor, že jsou přizpůsobeni parazitickému způsobu života, a proto se zdají být zjednodušení a tím jim i některé orgánové soustavy chybí (tak jako například u tasemnic). A na základě podobnosti v životním cyklu by mohli být řazeni mezi platyhelminthy (Stunkard, 1954).

Ze 40 druhů bentických hlavonožců bylo popsáno kolem sta morfotypů dicyemidů. Jejich charakteristika je založena na počtu a organizaci para- a metapolárních buněk

v hlavičce (Furuya, 2006). Eshragh a Leander (2014) použili k molekulární analýze gen 18S rDNA pro porovnání morfotypů. Sekvence 18S rDNA ukázala vyšší podobnost mezi různými morfotypy v jednom hostiteli. Tato molekulární data ukazují, že počet druhů dicyemidů určených na základě morfologie je v některých případech nižší, než bylo původně popsáno. Na druhou stranu je zatím genetická variabilita dicyemidů málo známá.

2.2.2 Životní cyklus

Životní cyklus dicyemidů (viz Obr. 2) se skládá ze dvou fází, které se odlišují organizací těla - vermiformní fáze a infusoriformní embryo. Ve vermiformní fázi existují dicyemidi jako vermiformní embryo, které vzniká nepohlavně v axiální buňce dospělého v nematogenním stádiu v renálním systému hostitele, a poté dokončuje vývoj jako nematogen nebo rhombogen (Hochberg, 1990; Furuya et al., 1992b, 1993, 1994). Mladí vermiformní jedinci dosáhnou morfologické charakteristiky dospělého poté, co opustí rodičovskou axiální buňku (Ridley, 1968). Infusoriformní embryo se vyvíjí z oplozeného vajíčka. Vysoká populační hustota dicyemidů v hostiteli může vyvolat změnu rozmnožování z nepohlavního na pohlavní (Lapan a Morowitz, 1975). Infusoriformní embryo opouští hostitele a v moři hledá nového. Není známo, jak se infusoriformní larva v novém hostiteli vyvine ve vermiformní fázi (Furuya et al., 2004). Také není jasné, ve které fázi životního cyklu hostitele nastává nová infekce infusoriformním embryem. Podle Catalano et al. (2013) by mohla nová infekce nastat v nově vzniklých vajíčkách hlavonožců. Pro ověření této hypotézy byla sbírána vajíčka sépie druhu *Sepia apama* v Upper Spencer Gulf v jižní Austrálii. Z vajíček byla vyextrahována DNA, byla prováděna PCR amplifikace cytochromoxidázy I (COI) s primery amplifikujícími DNA dicyemidů. Z žádného vzorku se nepodařilo amplifikovat DNA dicyemidů, proto by tato hypotéza měla být vyvrácena. Nicméně Catalano et al. (2013) tvrdí, že to může být způsobeno nižším počtem sépií v období sběru vzorků (2011 a 2012) než v předešlých letech, což by mohlo způsobit i možnou nižší hustotu dicyemidů.



Obr. 2 : Životní cyklus dicyemidů. AG – nepohlavní buňka, AN – jádro axiální buňky, AX – axiální buňka, C – hlavička, DI – vyvíjející se infusoriformní embryo, IN – infusorigen, DP – diapolární buňka, DV – vyvíjející se vermiformní embryo, IN – infusorigen, MP – metapolární buňka, PA – parapolární buňka, PP – propolární buňka, UP – uropolární buňka (podle Furuya et al., 2003).

2.3 Vztahy mezi hostitelem a parazitem

Dicyemida jsou nejčastějšími parazity renálního orgánu bentických hlavonožců (Hochberg, 1990; Short, 1991). Příležitostně mohou být nalezeni i v perikardiu desetiramenných hlavonožců (Hoffman, 1965 sec. Furuya et al, 2004). Svou hlavičkou se zanoří do záhybů renálního orgánu hostitele. Renální orgány jsou unikátním prostředím a hlavním rozhraním mezi hostitelem a dicyemidem (Furuya et al., 1997). Morfologie hlavičky dicyemidů je pravděpodobně adaptací na strukturu hostitelské tkáně (Furuya et al., 2003a). Z tohoto důvodu je struktura renálního orgánu klíčová pro morfologii dicyemidů.

Na drsném a komplikovaném povrchu jsou dicyemidi s kuželovitým tvarem hlavičky (Furuya et al., 2004). Renální orgány desetiramenných hlavonožců jsou menší než u osmiramenných hlavonožců stejné váhy, ale mají stejnou organizaci. Mají mnoho drážek a záhybů. Renální orgán se liší mezi juvenilí a dospělci. U dospělců je povrch renálního orgánu strukturovanější. Neexistuje však žádný vztah mezi velikostí epitelálních buněk a velikostí sépií (Furuya et al., 2004).

Vedle dicyemidů se v renálních orgánech hlavonožců nachází také *Chromidina* sp. (Hochberg, 1990). *Chromidina* a *Dicyemida* jsou fylogeneticky vzdálení parazité (Hochberg, 1983). *Chromidina* se řadí mezi apostomní nálevníky. Ani u dicyemidů ani u chromidin se zatím neví, jak moc škodí svému hostiteli, možná se časem zjistí, že jejich vztah s hostitelem je spíše symbiotického/mutualistického charakteru (Furuya et al., 2004). Ani pro jedno, ani pro druhé zatím nejsou silné důkazy. Ve studii založené na elektronové mikroskopii bylo pozorováno velmi mírné (skoro žádné) poškození tkáně, tam kde je dicyemid přichycen (Ridley 1968).

2.3.1 Koevoluce hostitel-parazit

Studium populací nám umožňuje studovat jejich strukturu, genetickou diferenciaci a změny jejich velikosti. Můžeme mezi sebou porovnávat populace hostitele a parazita, což nám naznačí, jak se navzájem ovlivňují. V případě komerčně lovených druhů, jako je například sépie, je důležité zhodnotit strukturu populace a její resilienci pro nastavení limitů úlovku. Krstulović-Šifner et al. (2016) se ve své studii zabývá populační strukturou *S. officinalis* na základě morfologie, protože je tento druh významný v rybářství. Výsledky ukazují negativní změny velikosti populací v Jaderském moři v období mezi rokem 1996-2008. Aby bylo zajištěno dlouhodobé využívání tohoto druhu v Jaderském moři, měla by být populace *S. officinalis* pečlivě monitorována a rybářské aktivity by měly být regulovány. U *S. officinalis* zatím populační struktura nebyla zkoumána molekulárními metodami, ale můžeme srovnat s jiným druhem sépie, kde byly použity mikrosatelitní markery. Yavarmoghadam et al. (2015) se ve své studii zabývá genetickou analýzou druhu *Sepia pharaonsis* (Ehrenberg, 1831) v Perském zálivu pomocí mikrosatelitních markerů. Vzorok pro tuto studii byly sbírány na třech lokalitách – Bandarabass, Lengeh a Bushehr. Výsledky ukazují, že populační struktura *Sepia pharaonsis* v Perském zálivu není mezi zkoumanými lokalitami zcela homogenní, ale mírně strukturovaná, největší genetická diferenciaci je pak mezi Bandarabass a Bushehr.

Parazité jsou obecně závislí na svém hostiteli – Blasco-Costa a Poulin (2013) se ve své studii zabývají populační strukturou parazitů ze skupiny *Trematoda* a čím je ovlivňována. Z výsledků vyplývá, že hostitelské znaky jsou nejdůležitějším determinantem populační struktury parazita, zejména pak v případě skupiny *Trematoda* pohyblivost hostitele a schopnost disperze určuje výslednou populační strukturu. Výsledky této meta-analýzy nám mohou ukázat trend, který pravděpodobně platí i pro další parazity, jejichž rozšíření je úzce spojeno s hostitelem.

Prozkoumání struktury populace parazita a jeho rozšíření v areálu hostitele nám může poskytnout důležité informace i o způsobu života hostitele (Catalano et al., 2013). Dicyemidi jsou vhodnými kandidáty pro takovou studii z důvodu vysoké prevalence a úzkého vztahu se svým hostitelem (Catalano et al., 2014). Protože klasické morfologické znaky používané pro rozlišování druhů dicyemidů se zdají být nespolehlivé (morfologická plasticita) a hranice u druhů jsou nejasné, je nezbytné využít molekulárních metod. V několika málo zatím publikovaných studiích zaměřených na molekulární diverzitu dicyemidů byly zkoumány gen 18S, podle kterého je možné rozlišit hranice mezi jednotlivými druhy (Eshragh a Leander, 2014), a COI (Catalano et al., 2015). Eshragh a Leander (2014) analyzovali 34 sekvencí 18S genu dicyemidů, které ukázaly větší genetickou podobnost mezi různými morfotypy, což může znamenat, že některé druhy dicyemidů popsané na základě morfologie mohou být geneticky shodné. Catalano et al. (2015) analyzovala ve své studii kruhovou molekulu cytochromoxidázy I, která se skládá z COI genu a nekódující oblasti (NCR), pro 10 druhů dicyemidů. Každá kruhová molekula obsahovala COI kódující sekvenci, 5' COI oblast a nekódující oblast. Pro všechny vzorky dicyemidů, kromě *Dicyema* sp. 1, byl pozorován víc než jeden haplotyp COI. Eshragh a Leander (2014) se věnovali hlavonožcům z pobřeží Tichého oceánu Severní Ameriky a Catalano et al., 2015 australským hlavonožcům. Pro Středozemní moře zatím není žádná podobná studie publikována.

3. Cíle práce

- Zvládnutí základních metod molekulární biologie (extrakce DNA, PCR, sekvenování).
- Vyhodnocení sekvenčních dat (alignment, fylogenetická analýza, programy zaměřené na odhalení populační struktury).
- Porovnání populační struktury hostitele a parazita v kontextu doposud získaných poznatků.

4. Metodika

4.1 Vzorky

Vzorky použité v této práci byly sbírány od roku 2015 do roku 2017 během několika terénních cest v Itálii, Chorvatsku, Řecku, Portugalsku a na Kypru (oblasti původu vzorků viz Obr. 3). Sépie byly zakoupeny čerstvě zabitě od rybářů, od nichž bylo (pokud možno) zjištěno kde byly odchyceny.



Obr. 3: Mapa oblastí sbírání vzorků s vyznačenými lokalitami odběru.

Přednostně byly vybírány sépie nemražené, označené jako lokálního původu a s reakcí chromatoforů v kůži (důkaz čerstvosti a tak i krátkého převozu). Sépiím byl odebrán kousek chapadla (1-2cm), který byl uložen do mikroskopické zkumavky a zalit čistým lihem (ethanol p.a.). Poté byl proveden mediální ventrální řez, jímž byla odkryta plášťová dutina. Aby bylo možné vyjmout renální orgán, musely být nadzdvíženy nidamentální žlázy a inkoustový váček. Kousek renálního orgánu byl odebrán do mikroskopické zkumavky a fixován čistým lihem. Pokud byla k dispozici centrifuga a připravená mořská voda (ASW, artificial sea water, podle Lapan a Morowitz, 1975), byl renální orgán vymáčan ve zkumavce s čistou mořskou vodou. Lehce zakalená tekutina obsahující uvolněné parazity (dicyemidy) byla přenesena do mikroskopické zkumavky. Mikroskopická zkumavka byla krátce centrifugována, poté byl supernatant odstraněn kapátkem či pipetou a k peletu na dně byl přidán nový podíl tekutiny z renálního orgánu. Mikroskopická zkumavka byla znovu centrifugována a supernatant odebrán. Jako závěrečný krok byl přidán k peletu čistý líc.

4.2 Extrakce DNA

Pro extrakci DNA z hostitele byl použit malý kousek chapadla. K extrakci byl použit kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). Postup byl následující:

- Z chapadla byla odstraněna kůže s chromatofory, protože pigment obsažený v chromatoforech by mohl inhibovat PCR. Chapadlo bylo nakrájeno na malé kousky, které byly umístěny do mikrozkušavky. Odstraňování kůže i krájení chapadla bylo prováděno sterilně, aby nedošlo ke kontaminaci mezi vzorky. Kousky chapadel v mikrozkušavce byly krátce vysušeny. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 20 μ l proteinasy K a 180 μ l lyzačního pufru ATL. Vše bylo promícháno vortexováním. Poté byly vzorky inkubovány při 56 °C v termální lázni, dokud nebyly zcela zlyzovány.
- Bylo přidáno 200 μ l pufru AL a zortexováno. Poté bylo přidáno 200 μ l ethanolu (ethanol min. 96%, p.a.) a zortexováno.
- Směs byla přenesena do DNeasy Mini spin kolonky, umístěné v 2 ml sběrné kolonce. Bylo centrifugováno 1 minutu na 8000 rpm.
- DNeasy Mini spin kolonka byla umístěna do nové 2 ml sběrné zkumavky. Na kolonku bylo napipetováno 500 μ l promývacího pufru AW1. Poté bylo centrifugováno 1 minutu na 8000 rpm.
- DNeasy Mini spin kolonka byla umístěna do nové 2 ml sběrné zkumavky. Bylo přidáno 500 μ l promývacího pufru AW2 a centrifugováno 3 minuty na 14000 rpm.
- DNeasy Mini spin kolonka byla umístěna do 1,5 ml mikrozkušavky, bylo přidáno 200 μ l pufru AE. Poté byla zkumavka s kolonkou 5 minut inkubována při pokojové teplotě a centrifugována 1 minutu na 8000 rpm.

Při extrakci DNA parazita nejprve musela být zkumavka otevřena, aby došlo k vyschnutí vzorku. K extrakci byl použit QIAamp DNA microkit (Qiagen) pro práci s menším množstvím biologického materiálu. Postup byl následující:

- Do zkumavky bylo ke vzorku napipetováno 180 μ l lyzačního ATL pufru a 20 μ l proteinasy K. Poté bylo vše promícháno na vortexu a zkumavky byly umístěny do termální lázně, kde byly inkubovány při 56 °C, dokud nebyl vzorek zcela zlyzován.
- Bylo přidáno 200 μ l pufru AL. Pomocí vortexu došlo k promíchání vzorku.

- Bylo přidáno 200 μ l ethanolu a promícháno. Poté byla směs 5 minut inkubována.
- Lyzát byl přenesen na QIAamp MinElute kolonku, která byla umístěna ve 2 ml sběrné zkumavce.
- Bylo přidáno 500 μ l promývacího pufru AW1. Vzorky byly dány do centrifugy a byly centrifugovány 1 minutu na 8000 rpm.
- QIAamp MinElute kolonka byla přendána do nové 2 ml sběrné zkumavky. Na kolonku bylo napipetováno 500 μ l promývacího pufru AW2. Poté byly vzorky opět centrifugovány 1 minutu na 8000 rpm.
- QIAamp MinElute kolonka byla opět přemístěna do nové 2 ml sběrné zkumavky. Bylo centrifugováno 3 minuty na 14000 rpm, aby byla membrána zcela vysušena.
- QIAamp MinElute kolonka byla umístěna do 1,5 ml mikrozkušavky. Na kolonku bylo napipetováno 30 μ l pufru AE. Poté byla zkumavka s kolonkou 5 minut inkubována při pokojové teplotě.
- Bylo centrifugováno 1 minutu na 14000 rpm.

4.3 Amplifikace DNA

Pro amplifikaci genetického markeru byla použita PCR (řetězová polymerázová reakce) se specifickými primery (průběh PCR a použité primery viz Tab. I, II).

Rozpis pro 20 μ l PCR amplifikaci cytochromoxidázy I (COI) hostitele byl následující: 1 μ l vzorku, 1 μ l forward primeru (5pM, F1490, Folmer et al., 1994; sekvence viz Tab. I), 1 μ l reverse primeru (5pM, H7005, Hafner et al 1994; sekvence viz Tab. I), 2 μ l pufru (PCR blue buffer, Top-bio), 0,5 μ l nukleotidů (dNTPs 10mM, ThermoFisher), 0,2 μ l Taq polymerázy (Top-bio) a 14,3 μ l H₂O.

Rozpis pro 20 μ l PCR amplifikaci COI parazita byl: 1 μ l vzorku, 3 μ l forward primeru (5pM, COIdic9F, navržen a optimalizován v laboratoři během přípravné fáze tohoto projektu na základě sekvence z transkriptomu; Krausová et al., nepublikováno, sekvence viz Tab. I), 3 μ l reverse primeru (5pM, COIdic6R, navržen a optimalizován v laboratoři během přípravné fáze tohoto projektu na základě sekvence z transkriptomu; , Krausová et al., nepublikováno, sekvence viz Tab. I), 2 μ l pufru (PCR blue buffer, Top-bio), 0,5 μ l nukleotidů (dNTPs 10mM, ThermoFisher), 0,2 μ l Taq polymerázy (Top-bio) a 10,3 μ l H₂O.

U parazita bylo prováděno ještě pro ověření druhu (genotypu) PCR 18S genu. Rozpis pro tuto 20 μ l PCR amplifikaci byl: 1 μ l vzorku, 1 μ l forward primeru (5pM, F3,

Eshragh et al. 2014; sekvence viz Tab. I), 1 µl reverse primeru (5pM,R2, Eshragh et al. 2014; sekvence viz Tab. I), 2 µl pufru (PCR blue buffer, Top-bio), 0,5 µl nukleotidů (dNTPs 10mM, ThermoFisher), 0,2 µl Taq polymerázy (Top-bio) a 14,3 µl H₂O.

Tab. I: Přehled primerů použitých v této studii, jejich sekvence a zdroj.

Lokus	Název	Sekvence primeru 5' → 3'	Forward/ Reverse	Autor
COI hostitele	F1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	F	Folmer et al. 1994
	H7005	CCGGATCCACANCRARTANGTRTCRTG	R	Hafner et al. 1994
COI parazita	COIdic9F	GCTTGTGCWGGTGAAGCTCTATATCCWCC	F	Krausová et al., nepublikováno
	COIdic6R	TGYATAARRTAWCGMCGAGGTATHGCWGM	R	
18S gen parazita	F3	CGGCTCATTAATCGGACATAC	F	Eshragh et al. 2014
	R2	CCAACAACCTCACCAAATCATTC	R	

Tab. II: Tabulka protokolů PCR reakcí.

Reakce	Počáteční denaturace	Počet cyklů (Denaturace, Nasedání primerů, Syntéza)	Denaturace	Nasedání primerů	Syntéza	Finální Syntéza
COI hostitele	94°C / 5 minut	30	92°C/ 1 minuta	52°C/ 1 minuta	72°C/ 1 minuta	72°C/ 5 minut
COI parazita	95°C/ 5 minut	30	92°C/ 1 minuta	53°C/ 1 minuta	72°C/ 1 minuta	72°C/ 5 minut
18S gen parazita	94°C/ 2 minuty	40	94°C/ 45 sekund	50°C/ 45 sekund	72°C/ 2 minuty	72°C/ 5 minut

4.4 Gelová elektroforéza

Průběh PCR reakcí byl ověřen pomocí elektroforézy. Vzorky byly nanášeny na 1% agarózový gel. Pro přípravu gelu bylo použito 20 ml pufru TAE (Merck), 0,2 g agarózy (ThermoFisher) a 2 μ l GelRed (Biotium) fluorescentního barviva pro vizualizaci DNA. Na gel bylo nanášeno pomocí 6x Loading Dye (ThermoFisher) 2 μ l PCR produktu. Byl použit ladder 1 kb gene ruler (ThermoFisher). Elektroforéza probíhala přibližně 20 minut při 100 V. Po dokončení elektroforézy byl gel osvětlen pod UV světlem pro vizualizaci fragmentů DNA.

4.5 Přečištění a sekvenace

Získané PCR produkty viditelné na gelu byly enzymaticky přečištěny (rozpis pro enzymatické přečištění viz Tab. III), čištění probíhalo 15 minut při 37°C a 15 minut při 80°C. Společně s primery použitými pro amplifikaci daného genu byly PCR produkty zaslány na sekvenaci do SeqMe nebo Eurofins (klasické Sangerovo sekvenování).

Tab. III: Rozpis pro enzymatické přečištění vzorků.

Chemikálie	Množství
Exo I(BioLabs)	0,5 μ l
FastAp (ThermoFisher)	2 μ l
H ₂ O	2,5 μ l

4.6 Zpracování sekvencí

Sekvence byly zpracovány v programu Geneious. Sekvence (výsledné chromatogramy) byly složeny pomocí assemble - de novo assemble, byly odstraněny části se špatnou kvalitou a uložen konsensus obou vláken. K porovnání sekvencí byl vytvořen alignment. K vytvoření alignmentu byl použit algoritmus MAFFT (Kato et al., 2002). Poté byl vytvořen pomocí Fast Tree (Price et al., 2010) orientační maximum likelihood strom, ukazující které sekvence jsou si podobné více než jiné, pro rychlé ověření úspěšnosti sekvenace.

Pro zařazení sekvencí do fylogenetického kontextu byly k alignmentu přidány referenční sekvence a v programu IQ - TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>, Trifinopoulos et al., 2016) byl vytvořen fylogenetický strom typu maximum likelihood pro COI gen hostitele, COI gen parazita a 18S gen parazita. Pro výběr modelu evoluce sekvencí byl použit Model Finder s nastavením AUTO (Kalyaanamoorthy et al., 2017)

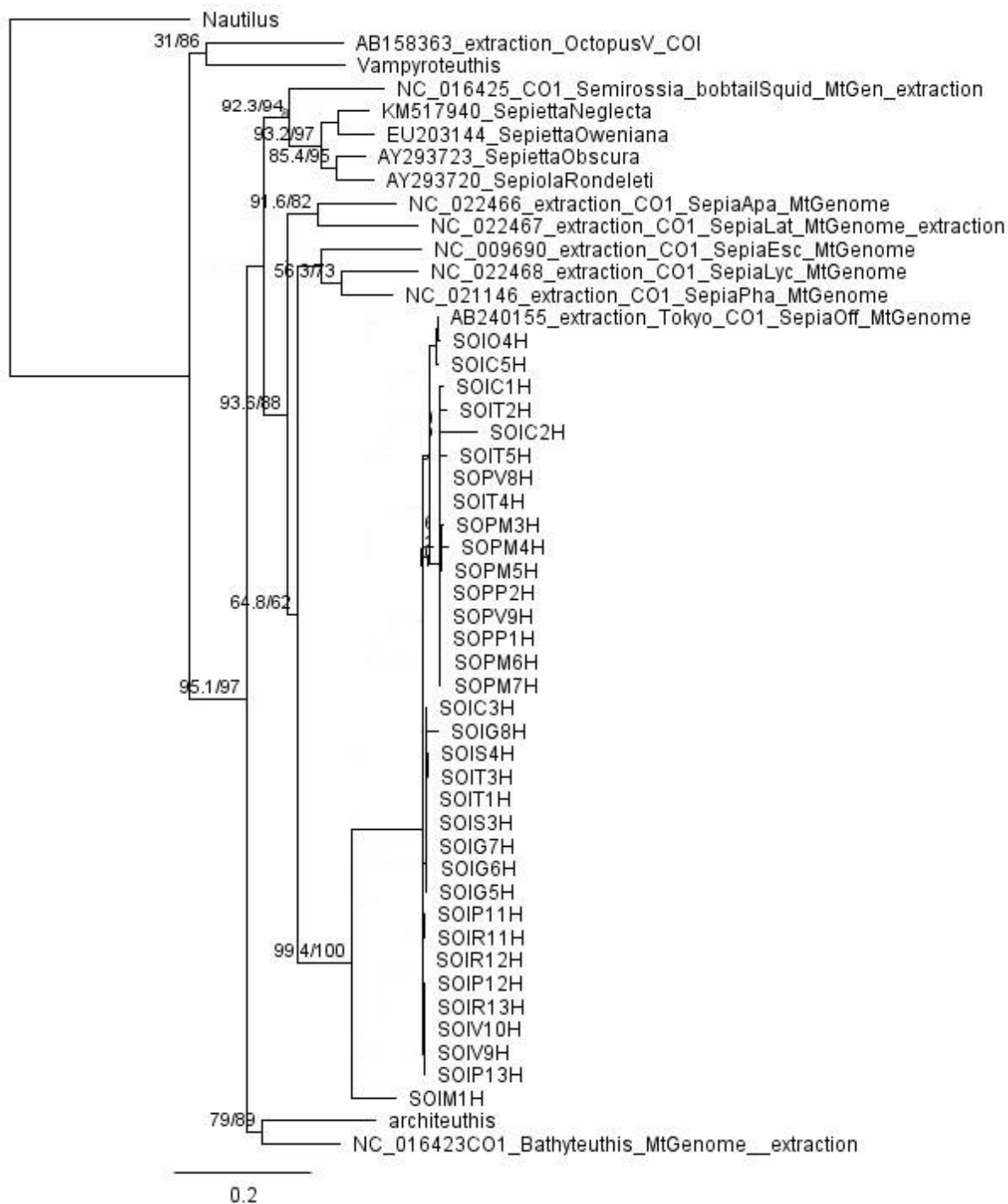
V programu PopART (Bandelt et al.; 1999, Leigh a Bryan, 2015) byla vytvořena populační síť typu Medium joining network pro COI geny hostitele i parazita.

Populační statistiky byly spočítány v programu DnaSP (Rozas et al., 2017). Pro prozkoumání diverzity jednotlivých populací na základě COI genu byla počítána celková charakteristika populací (DNA polymorfismus) – nukleotidová diverzita, haplotypová diverzita, počet polymorfních lokusů (SNPs). Byly vytvořeny grafy změn velikostí populací, které byly ověřeny ragedness testem a koalescenční simulací s 10000 opakováními. Byl prováděn Fu and Li's test a Tajima's D test, které byly ověřeny koalescentní simulací s 10000 opakováními.

5. Výsledky

5.1 Fylogenetické stromy

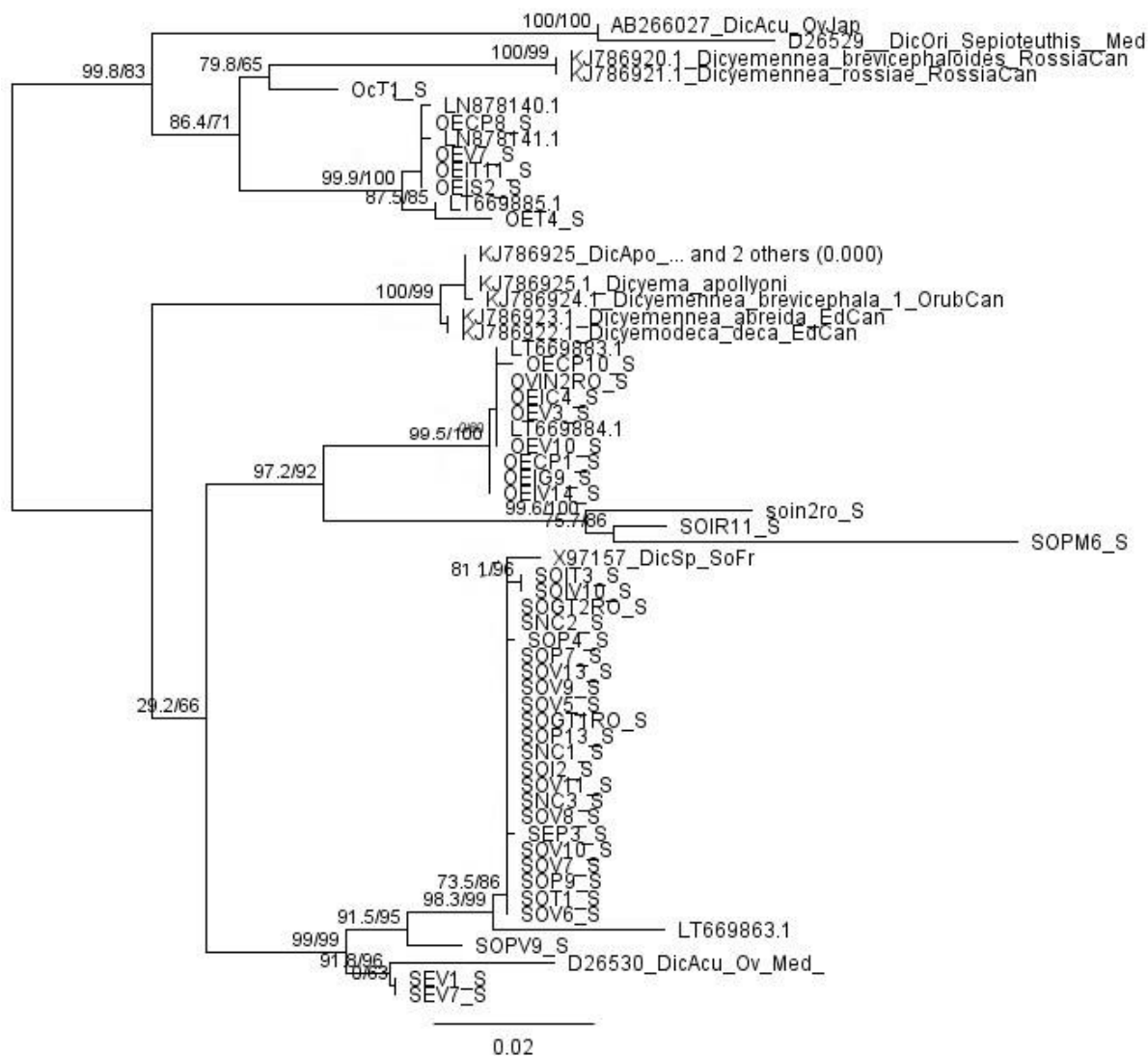
Během této práce se podařilo získat 34 sekvencí genu COI u hostitele, 44 sekvencí genu COI u parazita a 28 sekvencí 18S genu parazita. Pro celkové zařazení sekvencí byly vytvořeny fylogenetické stromy - genu COI hostitele, COI parazita a 18S genu parazita.



Obr. 4: Fylogenetický strom typu maximum likelihood genu COI hostitele, jako outgroup byly použity sekvence příbuzných hlavonožců (se zaměřením na různé druhy sépií) stažené z databáze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) Kořenem je loděnka (*Nautilus*). Bylo použito 34 nových sekvencí a 16 referenčních. Délka alignmentu je 2360 párů bází. Podpory větví jsou uvedeny jako ultrafast bootstrap (UFBoot, Hoang et al., 2018) a aLRT statistika. Vysvětlení popisek viz přílohy, Tab. VIII.

Z fylogenetického stromu na základě genu pro COI hostitele (Obr. 4) vidíme, že všechny vzorky patří ke stejnému druhu (nejpodobnější je reference pro *Sepia officinalis*), pouze vzorek SOIM1H se podstatně liší a mohl by představovat jiný druh.

Na fylogenetickém stromu COI genu parazita (Obr. 5) vidíme, že sekvenované vzorky tvoří jednu kompaktní skupinu až na vzorek SOIC4, který je jiný než ostatní vzorky a mohl by představovat jiný druh, proto byl tento vzorek vyřazen z následných populačních analýz. Ostatní získané vzorky dicyemidů jsou nejpodobnější popsanému vzorku *Dicyema* sp., ale přesto tvoří samostatnou skupinu.



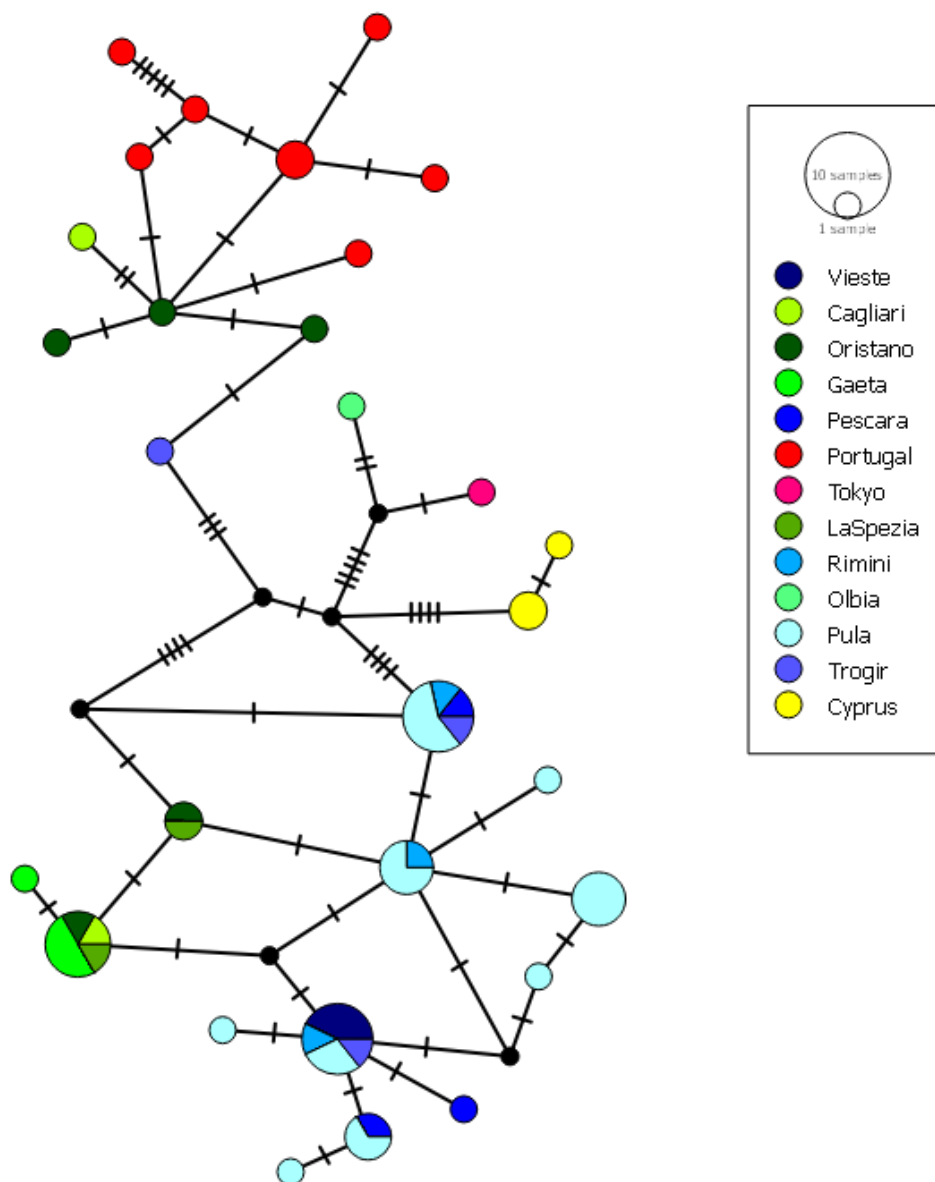
Obr. 6: Fylogenetický strom typu maximum likelihood 18S genu parazita, jako outgroup byly použité sekvence stažené z databáze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Délka alignmentu je 1691 párů bazí. Bylo použito 28 nových sekvencí a 33 referenčních. Podpory větví jsou uvedeny jako ultrafast bootstrap (UFBoot, Hoang et al., 2018) a aLRT statistika. Vysvětlení popisek viz přílohy, Tab. VIII.

Na fylogenetickém stromu 18S genu parazita (Obr. 6) je vidět, že vzorky SOIR11 a SOPM6 jsou jinými druhy než ostatní sekvenované vzorky dicyemidů získaných ze sépií,

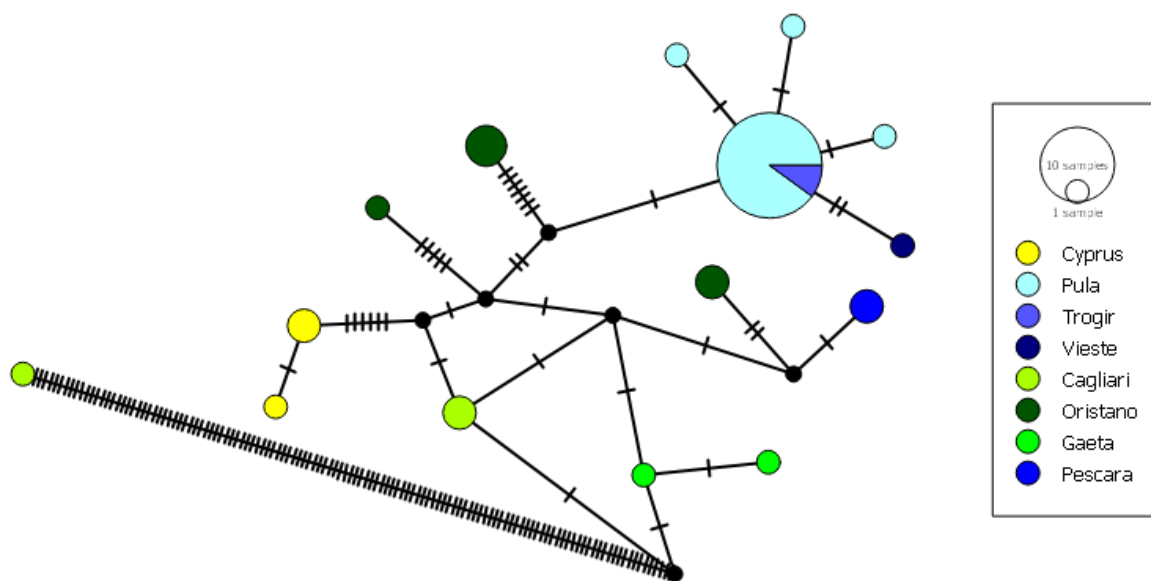
a spadají blíže k dicyemidům obvykle nacházených v *Eledone moschata*. Ostatní získané vzorky dicyemidů jsou nejpodobnější popsanému vzorku *Dicyema acuticephalum*, ale přesto tvoří samostatnou skupinu. Vzorek SOPM6 byl ponechán ve fylogenetickém stromu i přes horší kvalitu sekvence, způsobenou špatnou kvalitou ve forward a reversed chromatogramu, protože je to jediný vzorek z Portugalska, který se podařilo amplifikovat.

5.2 Populační síť

Pro zjištění vztahů mezi skupinami haplotypů v kontextu jejich původu byly vytvořeny populační síť hostitele i parazita.



Obr. 7: Populační síť COI hostitele. K vytvoření sítě bylo použito 34 sekvencí. Odstíny modré – Jaderské moře, odstíny zelené – Tyrhénské moře, červená – Atlantik (Portugalsko), žlutá – Kypr, růžová – sekvence stažená z databáze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Čárky na spojnici jednotlivých haplotypů představují počet změn mezi nimi.



Obr. 8: Populační síť COI parazita. K vytvoření sítě bylo použito 44 sekvencí. Odstíny modré – Jaderské moře, odstíny zelené – Tyrhénské moře, žlutá – Kypr. Čáry na spojnicích jednotlivých haplotypů představují počet změn mezi nimi.

Na populačních sítích (Obr. 7, 8) jsou vidět jednotlivé haplotypy. U populační sítě parazita chybí vzorky z Portugalska, které se nepodařilo amplifikovat. Je možné, že se jedná o jiný druh dicyemida. Na populační síti parazita vidíme vzorek s velkým počtem změn, je to vzorek SOIC4, který můžeme vidět i na fylogenetickém stromu genu COI parazita (Obr. 5), protože je odlišný od ostatních vzorků, byl tento vzorek vyřazen z následného výpočtu populačních statistik.

5.3 Populační statistiky

Porovnáme-li populace *S. officinalis* a *Dicyemida* (viz. Tab. IV, V), vidíme, že počet vzorků u *S. officinalis* je větší, u *Dicyemida* se totiž nepodařilo amplifikovat žádné vzorky z Atlantiku, pravděpodobně se jednalo o jiný druh ze skupiny *Dicyemida*, nebo mohla být DNA příliš degradovaná. Dále vidíme, že *Dicyemida* má nižší nukleotidovou i haplotypovou diverzitu. Tajima's D test v obou populacích je menší než 0, což naznačuje možný signál změny velikosti obou populací, ale výsledek není statisticky průkazný. Je zajímavé o kolik nižší jsou hodnoty všech diverzit pro Jaderské moře u *Dicyemida*. Vypadá to buď na nedávný vznik populací, nebo dlouhodobě menší populační velikost než v Tyrhénském moři. Zatímco u *S. officinalis* taková změna vidět není. Srovnáme-li jednotlivé subpopulace, vidíme, že u Jaderského moře má *S. officinalis* větší nukleotidovou i haplotypovou diverzitu, Tajima's D test vyšel u obou populací Jaderského moře záporně, stejně jako u celých populací to značí změnu velikosti populací, ale opět výsledek není průkazný. U subpopulací Tyrhénského moře má také vyšší nukleotidovou i haplotypovou diverzitu *S. officinalis*. Tajima's D test vyšel u Tyrhénské populace *S. officinalis* opět záporně, u *Dicyemida* vyšel kladně. Pokud u *S. officinalis* porovnáme mezi sebou subpopulace Atlantiku a Jaderského moře + Tyrhénského moře, vidíme, že Atlantik má nižší nukleotidovou diverzitu, ale haplotypová diverzita je téměř stejná. Tajima's D test vyšel u obou populací záporně.

Tab. IV: Přehled charakteristik populací *S. officinalis*.

	Celá populace	Jaderské moře	Tyrhénské moře	Atlantik	Jaderské moře + Tyrhénské moře
Počet sekvencí	55	29	14	8	43
Počet haplotypů	29	11	7	7	19
Nukleotidová diverzita	0.01191	0.00428	0.00963	0.00418	0.00712
Haplotypová diverzita	0.956	0.882	0.795	0.964	0.929
Fu&Li (D*)	-1.52413	-1.36099	-0.78019	-1.22472	-2.12484
Koalescenční simulace	0.99700	0.91670	0.21750	0.99650	0.98750
Tajima's D	-0.80900	-0.52095	-0.53545	-1.14554	-1.17757
Koalescenční simulace	0.99640	0.91730	0.21410	0.99710	0.98780
Počet polymorfních lokusů (SNPs)	43	13	21	10	29

Tab. V: Přehled charakteristik populací *Dicyemida*.

	Celá populace	Jaderské moře	Tyrhénské moře
Počet sekvencí	39	24	10
Počet haplotypů	14	5	6
Nukleotidová diverzita	0.00719	0.00082	0.01198
Haplotypová diverzita	0.734	0.312	0.889
Fu&Li (D*)	-0.82419	-2.44310	0.40561
Koalescenční simulace	0.10830	0.17502	0.39240
Tajima's D	-1.35397	-1.93998	0.13981
Koalescenční simulace	0.10350	0.19060	0.39300
Počet polymorfních lokusů (SNPs)	33	6	24

Z výsledků F_{st} (viz Tab. VI, VII) vidíme, že i u *S. officinalis* i u *Dicyemida* je nejmenší diferenciace mezi populacemi Jaderského a Tyrhénského moře. I když je rozdíl mezi populacemi Jaderského a Tyrhénského moře nejmenší, jsou hodnoty F_{st} větší než 0,2, což značí, že Jaderské a Tyrhénské moře jsou z hlediska populací oddělené, i když jsou si geograficky blízko. Největší diferenciace je u *S. officinalis* mezi Kyprem a Atlantikem a u *Dicyemida* mezi Kyprem a Jaderským mořem.

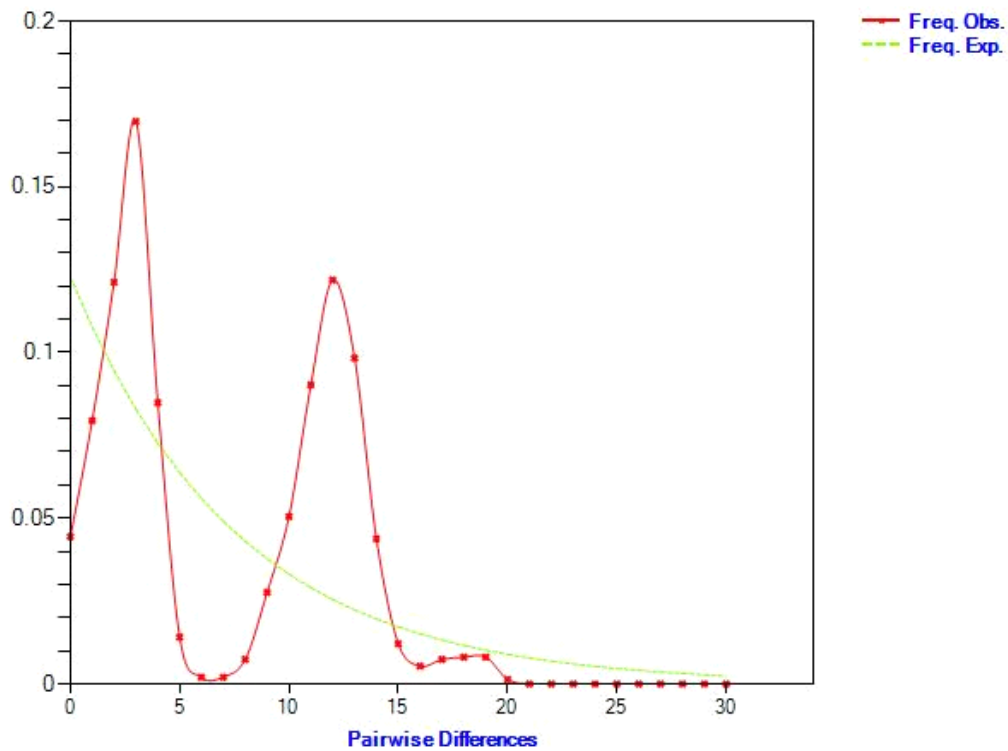
Tab. VI: Genetická diference populací (Fst) *S. officinalis*.

Populace 1	Populace 2	Fst
Kypr	Atlantik	0,86426
Kypr	Tyrhénské moře	0,72947
Kypr	Jaderské moře	0,84569
Atlantik	Tyrhénské moře	0,54379
Atlantik	Jaderské moře	0,77906
Tyrhénské moře	Jaderské moře	0,24656

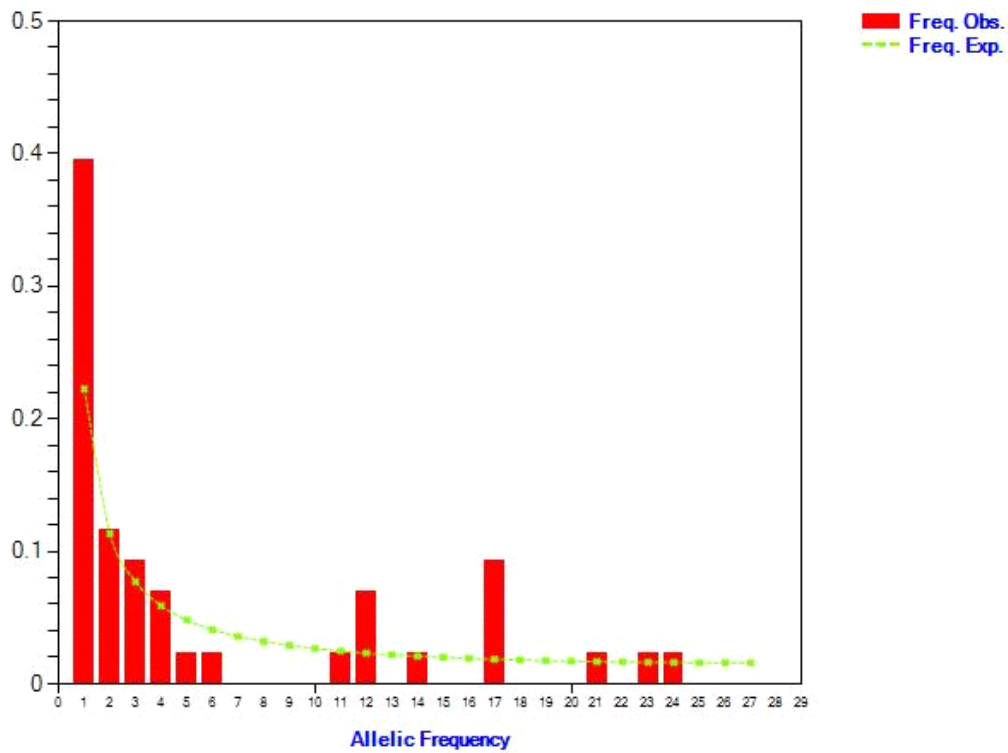
Tab. VII: Genetická diference populací (Fst) *Dicyemida*.

Populace 1	Populace 2	Fst
Kypr	Jaderské moře	0,89992
Kypr	Tyrhénské moře	0,6368
Jaderské moře	Tyrhénské moře	0,34549

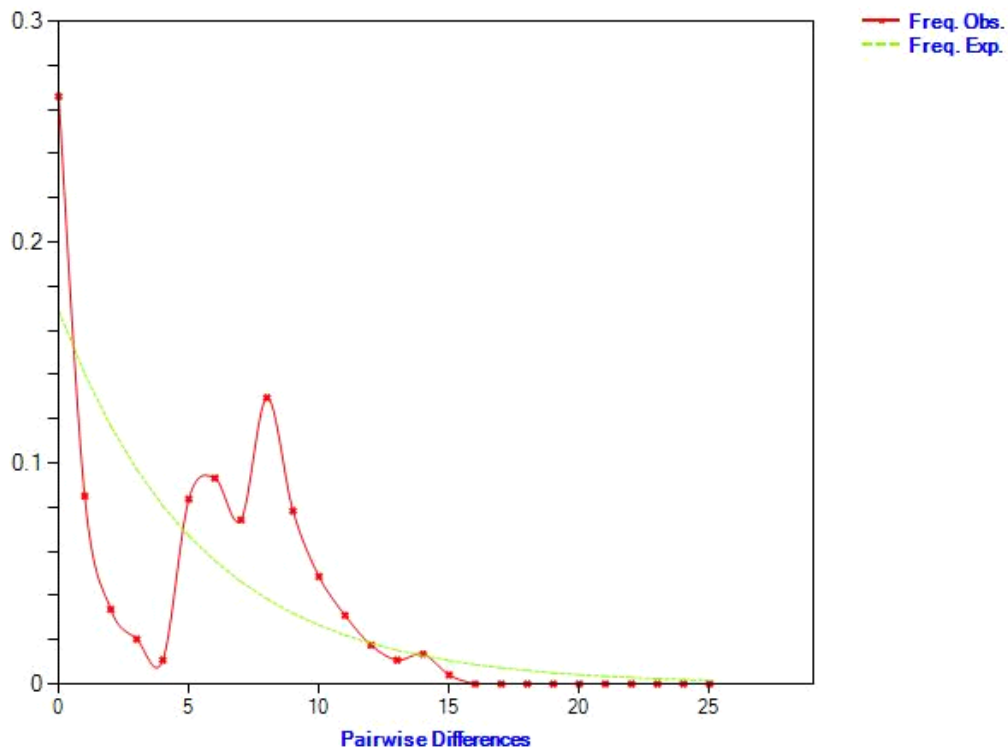
V grafech změny velikosti populace *S.Officinalis* i *Dicyemida* (Obr. 9, 11) vyšel raggedness test 0.0258, pro populaci *S.Officinalis* a 0.0486 pro *Dicyemida*, oba výsledky jsou tedy neprůkazné. V grafech alelové frekvence *S.Officinalis* i *Dicyemida* (Obr. 10, 12) vyšel raggedness test 0.0000 pro *S.officinalis*, to by mohlo znamenat expanzi populace, a 0.0486 u *Dicyemida*, neprůkazně.



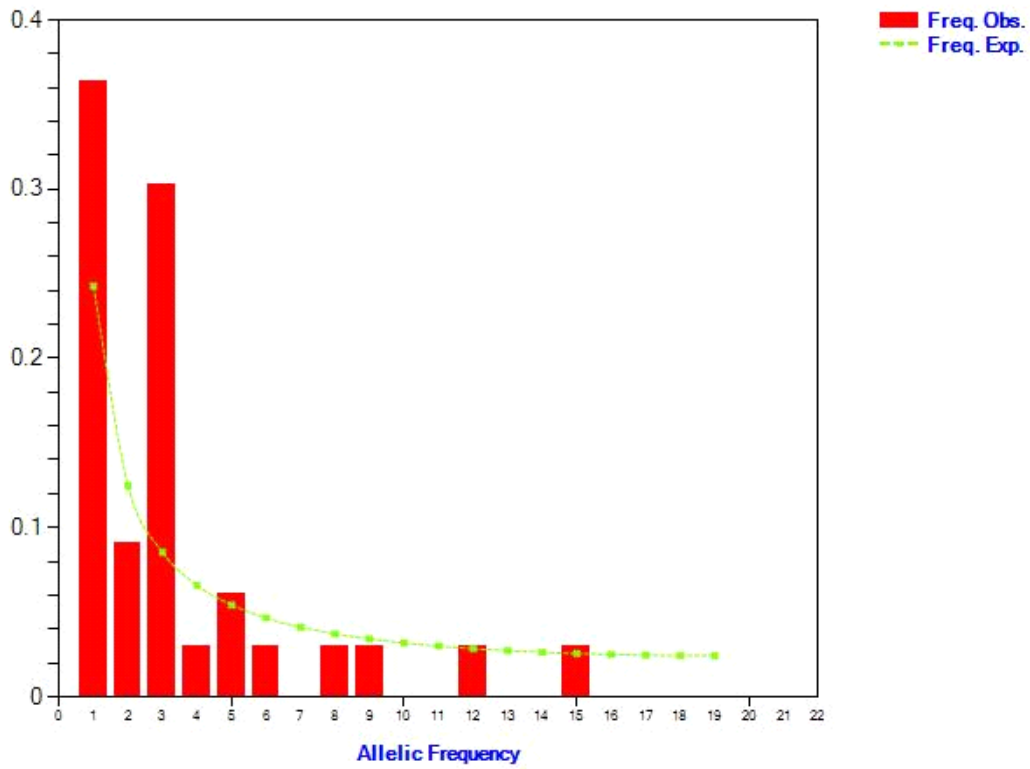
Obr. 9: Graf změny velikosti populace *S. officinalis*. Červená – pozorovaná frekvence, zelená – očekávaná frekvence. Raggedness test vyšel 0.0258, koalescentní simulace vyšla 0.99690.



Obr. 10: Graf alelové frekvence *S. officinalis*. Červená – pozorovaná frekvence, zelená – očekávaná frekvence. Raggedness test vyšel 0.0000, koalescenční simulace vyšla 0.99740.



Obr. 11: Graf změny velikosti populace *Dicyemida* sp. Červená - pozorovaná frekvence, zelená - očekávaná frekvence. Raggedness test se rovná 0.0486, koalescenční simulace vyšla 0.10580.



Obr. 12: Graf alelové frekvence *Dicyemida* sp. Červená – pozorovaná frekvence, zelená – očekávaná frekvence. Raggedness test se rovná 0.0486, koalescenční simulace vyšla 0.10550.

6. Diskuze

COI je mitochondriální marker, který by se měl vyvíjet rychleji a proto se používá pro zkoumání populací, 18S gen je oproti COI více konzervativní a vhodný k rozlišení vztahů na úrovni druhů a výš. Proto byly COI a 18S markery vybrány pro tuto studii a zdá se, že tento výběr byl vhodný. Přesto v případě dicyemidů interpretaci výsledků u obou markerů znesnadňuje to, že v databázích je poměrně málo sekvencí dicyemidů a zároveň některé nejsou určené do druhu (např. *Dicyema* sp.). Dalším problémem je, že se data v databázích nepřekrývají, buď jsou pro určitý druh dostupné sekvence COI nebo 18S, nikoli obě a také jsou dostupné datasety převážně z východního pobřeží Tichého oceánu a Austrálie, což je geograficky poměrně vzdálené. V této práci ukazují COI i 18S v oblasti Středozemního moře, kde dostupná data zatím chyběla.

Při této studii byl použit směsný vzorek dicyemidů, proto nemůžeme zaručit, že v renálním orgánu hostitele nebylo přítomno více druhů najednou. Protože byly použity specifické primery (viz. Tab. I). Porovnáваме tak nejvíce zastoupený druh (přesněji ten, který se nejlépe amplifikuje).

Fylogenetické analýzy zařadily sekvence genu COI hostitele nejbližší k referenční sekvenci *S. officinalis*. Jeden ze zkoumaných vzorků (SOIM1H) byl podobný hlavní skupině, ale evidentně mimo ni, bohužel k tomuto vzorku nemáme fotografii, a proto nemůžeme udělat morfologické určení druhu. Sekvence genu COI parazita byly přiřazeny nejbližší k referenční sekvenci *Dicyema* sp., ale tvoří samostatnou skupinu. Eshragh a Leander (2014) tvrdí že sekvence 18S rDNA ukazují, že je vyšší míra podobnosti mezi různými popsányými morfotypy dicyemidů, v mé práci jsou všechny sekvence 18S rDNA, kromě sekvencí SOIR11 a SOPM6, nejbližší referenční sekvenci *Dicyema acuticephalum*. To naznačuje, že *S. officinalis* ve Středozemním moři je obvykle infikována jedním hlavním typem dicyemida. Na fylogenetickém stromu (Obr. 5) i populační síti COI parazita (Obr. 8) vidíme, že se nepodařilo amplifikovat žádné vzorky dicyemidů z Portugalska, možná se jednalo o jiný druh dicyemida, na který nenasadaly primery použité v této práci (viz Tab. I). Příčinou by mohla být degradace DNA, ale použité primery jsou silně druhově specifické, to by spíše ukazovalo, že se jejich parazitofauna liší. Vzorek SOIC4 se značně liší v sekvenci COI, mohlo by se jednat o příbuzný druh. Sekvence 18S se u tohoto vzorku nepodařilo amplifikovat. Bohužel se nepodařilo amplifikovat DNA hostitele (SOIC4H), která by nám mohla říci více.

Na populační síti hostitele (Obr. 7) i parazita (Obr. 8) vidíme, že pozice vzorků ze Sardinie (Cagliari, Oristano, Olbia), přesto že jsou blízko pevnině (Gaeta), jsou odlišné a jsou si podobnější více mezi sebou než vzorkům u pevniny a tvoří skupinu. Na síti hostitele (Obr. 7) také vidíme, že není rozdíl mezi vzorky z Ligurského (La Spezia) a Tyrhénského moře (Cagliari, Oristano, Olbia, Gaeta). Protože na populační síti parazita nemáme žádné vzorky z La Spezia, nemůžeme porovnat rozdíl mezi Ligurským a Tyrhénským mořem. Diferenciace v případě hostitele naznačuje, že struktura populace sépie reaguje možná více na souvislost mořského pobřeží, než na geografické rozdělení na Tyrhénské-Ligurské moře. V tomto případě se však spíše jedná o předběžný odhad, na přesnější vyhodnocení by bylo třeba přidat data z prostředí (hloubku, typ dna, roční teploty, salinitu). Celkově na tomto příkladu ale můžeme vidět, že mořské organismy respektují jiné hranice, jako například mořské proudy či tvar pobřeží.

Tato práce je zaměřena na Středozemní moře, což je příklad relativně malého polo-uzavřeného systému. Stejně jako Krstulović-Šifner et al. (2016) říká, že v období 1996-2008 došlo k negativní změně velikosti populace *S. officinalis* v Jaderském moři, výsledky této práce naznačují expanzi ve Středozemním moři, ale v ostatních statistikách to nebylo potvrzeno.

Z výsledků F_{st} vidíme, že i když je genetická diferenciace nejmenší u hostitele a parazita mezi Jaderským a Tyrhénským mořem, tak hodnota F_{st} naznačuje, že jde o oddělené populace i když jsou si geograficky blízké. Největší genetická diferenciace je u *S. officinalis* mezi Kyprem a Atlantikem a u *Dicyemida* mezi Kyprem a Jaderským mořem, čemuž odpovídá i vzdálenost mezi nimi.

V grafech změn velikosti populace *S. officinalis* (Obr. 9) i *Dicyemida* (Obr. 11) vidíme, že pozorovaná frekvence změn velikostí se liší od té očekávané. Stejně tak v grafech alelové frekvence *S. officinalis* (Obr. 10) i *Dicyemida* (Obr. 12) se pozorovaná frekvence liší od té očekávané, i když výsledky raggedness testu ukazují, že jsou frekvence statisticky neprůkazné, kromě grafu alelové frekvence *S. officinalis* (Obr. 10).

Tato práce přináší poznatky o populační struktuře *S. officinalis* a *Dicyemida* ve Středozemním moři a zařazení hostitele i parazita pomocí fylogenetických stromů COI genu hostitele a parazita a 18S genu parazita.

Do budoucna by bylo dobré získat vzorky z celého areálu, zjistit jaký druh dicyemida infikuje atlantské sépie, zaměřit se i na jiné druhy sépií a také propojit genotyp s morfotypem (u hostitele i parazita). Také by bylo zajímavé srovnat výsledky i s jiným druhem hlavonožců a jiným vývojovým stádiem.

7. Závěr

- Byla vyextrahována DNA hostitele i parazita, která byla následně amplifikována řetězovou polymerázovou reakcí (PCR), úspěšnost amplifikace byla ověřena gelovou elektroforézou a vzorky, které byly úspěšně amplifikovány, byly poslány na sekvenaci (klasické Sangerovo sekvenování).
- Sekvenační data byla zpracována v programu Geneious, byly vytvořeny fylogenetické stromy pro zařazení sekvencí, také byly vytvořeny populační sítě a spočteny populační statistiky.
- Byly porovnány populační struktury hostitele i parazita, populace hostitele byla větší a také měla vyšší nukleotidovou i haplotypovou diverzitu. Tajima's D test v obou populacích vyšel záporně, což značí změnu velikosti populací, ale výsledek tohoto testu je neprůkazný.
- Na základě genetické diferenciacce populací (F_{st}) byla zjištěna genetická struktura hostitele i parazita.

8. Seznam použité literatury

Bandelt, H., Forster, P., Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16(1):37–48.

Blasco-Costa, I., Poulin, R. (2013). Host traits explain the genetic structure of parasites: a meta-analysis. *Parasitology*, 140(10):1316-1322.

Boyle, P. R., Rodhouse, P. (2005). *Cephalopods: ecology and fisheries*. Oxford: Blackwell Science. ISBN 0-632-06048-4.

Catalano, S. R., Whittington, I. D., Donnellan, S. C., Bertozzi, T., Gillanders, B. M. (2015). First comparative insight into the architecture of COI mitochondrial minicircle molecules of dicyemids reveals marked inter-species variation. *Parasitology*, 142(8):1066-1079.

Catalano, S. R., Whittington, I. D., Donnellan, S. C., Gillanders, B. M. (2013). Using the giant Australian cuttlefish (*Sepia apama*) mass breeding aggregation to explore the life cycle of dicyemid parasites. *Acta Parasitologica / Witold Stefański Institute of Parasitology, Warszawa, Poland*, 58(4):599–602.

Eshragh, R., & Leander, B. S. (2014). Molecular contributions to species boundaries in dicyemid parasites from eastern Pacific cephalopods. *Marine Biology Research*, 11(November):414–422.

Flegontova, O., Flegontov, P., Malviya, S., Audic, S., Wincker, P., de Vargas, C., Bowler, C., Lukeš, J., & Horák, A. (2016). Extreme Diversity of Diplonemid Eukaryotes in the Ocean. *Current Biology*, 26:3060-3065.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3:294–99.

Furuya, H. (2006). Current advances in dicyemid taxonomy. *TAXA, Proceedings of the Japanese Society of Systematic Zoology*, 21:19–32.

Furuya, H., Hochberg, F. G., & Tsuneki, K. (2003). Calotte morphology in the phylum Dicyemida: niche separation and convergence. *Journal of Zoology*, 259:361–373.

- Furuya, H., K. Tsuneki, and Y. Koshida (1993). The development of the hermaphroditic gonad in four species of dicyemid mesozoans. *Zool. Sci.*, 10:455–466.
- Furuya, H., K. Tsuneki, and Y. Koshida (1994). The development of the vermiform embryos of two mesozoans, *Dicyema acuticephalum* and *Dicyema japonicum*. *Zool. Sci.*, 11:235–246.
- Furuya, H., K. Tsuneki, and Y. Koshida (2003). Biology of Dicyemid Mesozoans. *Zool. Sci.*, 20(5):519-532.
- Furuya, H., K. Tsuneki, and Y. Koshida (1992b) Development of the infusoriform embryo of *Dicyema japonicum* (Mesozoa: Dicyemidae). *Biol. Bull.*, 183:248–257.
- Furuya, H., Ota, M., Kimura, R., & Tsuneki, K. (2004). Renal organs of cephalopods: A habitat for dicyemids and chromidinids. *Journal of Morphology*, 262(2):629–643.
- Furuya, H., Tsuneki, K., Koshida, Y. (1997). Fine structure of a dicyemid mesozoan, *Dicyema acuticephalum*, with special reference to cell junctions. *J. Morphol.*, 231:297–305.
- Hafner, M.S., Sudman, P.D., Villablanca, F.X., Spradling, T.A., Demastes, J.W., Nadler, S.A. (1994). Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science*, 365:1087–1090.
- Hoang, D.T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B.Q., Vinh, L.S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.*, 35:518–522.
- Hochberg, F.G. (1983). The parasites of cephalopods: a review. *Mem. Natl. Mus. Vict.*, 44:109–145.
- Hochberg, F.G. (1990). Diseases caused by protistans and mesozoans. In: Kinne O, editor. *Diseases of marine animals*, vol. III. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland.47–202.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., Jermin, L.S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*, 14:587-589.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14):3059-3066.

Krstulović-Šifner, S., Ikica, Z., Đurović, M., Vrgoč, N., Isajlović, I., Joksimović, A. (2013). Distribution, abundance and population structure of the common cuttlefish, *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758, in the Adriatic Sea. VI International conference "WATER & FISH" - conference proceedings:380-385.

Lapan, E. A., & Morowitz, H. J. (1975). The Dicyemid Mesozoa as an Integrated System for Morphogenetic Studies, description, isolation and maintenance. *J Exp Zool*, 193:147–160.

Leigh, J.W., Bryant, D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6(9):1110–1116.

Norman, M.D. (2000). *Cephalopods, a world guide: Pacific ocean, Indian ocean, Red sea, Atlantic ocean, Caribbean, Arctic, Antarctic*. Hackenheim: ConchBooks, ISBN 3-925919-32-5.

Kleinert, E. (2003). *Pavoukovci a další bezobratlí: štíři - solifugy - pavouci - štírci - sekáči - roztoči - korýši - mnohonožky - bičíkovci - měňavky - nálevníci - parazitární prvoci - vířníci - houby - žahavci - žebernatky - mechovky - ploštěnci - kroužkovci - chroustnatky - mořští plži - mořští mlži - hlavonožci - suchozemští plži - sladkovodní mlži - ostnokožci - pláštěnci*. Přeložil Antonín KŮRKA. Praha: Euromedia Group - Knižní klub, 2003. *Zoologická encyklopedie*. ISBN 80-242-1114-9.

Price, M.N., Dehal, P.S., and Arkin, A.P. (2010). FastTree 2 -- Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE*, 5(3):e9490.

Ridley, R.K. (1968). Electron microscopic studies on dicyemid mesozoa. I. Vermiform stages. *J Parasitol* 54:975–998.

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 Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 34: 3299-3302. DOI: 10.1093/molbev/msx248.

Short, R.B. (1991). *Marine flora and fauna of the eastern United States, Dicyemida*. NOAA Technical Reports NMFS 100.

Stunkard, H.W. (1954). "The Life-History and Systematic Relations of the Mesozoa," *The Quarterly Review of Biology*, 29(3):230-244.

Trifinopoulos, J., Nguyen L.-T., von Haeseler, A., Minh, B.Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis.. *Nucleic Acids Res.*, 44:W232-W235.

Yavarmoghadam, H., Zolgharnein, H., Aliabadi, M.A.S., Keyvanshokoo, S., Modarresi, M. (2015). Genetic Analysis of Cuttlefish *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831) Populations in Persian Gulf with Microsatellite Markers. *Journal of Shellfish Research*, 34(2):469-472.

9. Přílohy

Tab. VIII.: Seznam vzorků a lokalit. SO = *S. officinali*, H = hostitelská tkáň, CO = COI, S= 18S gen.

Popis vzorku	Lokalita sběru
SOIN	Itálie, Neapol
SOIT	Sardinie, Oristano
SOIC	Sardinie, Cagliari
SOIO	Sardinie, Olbia
SOIS	Itálie, La Spezia
SOIG	Itálie, Gaeta
SOIV	Itálie, Vieste
SOIP	Itálie, Pescara
SOIR	Itálie, Rimini
SOIM	Sicilie, Marsala
SOV	Chorvatsko, Veruda
SOT	Chorvatssko, Trogir
SOP	Chorvatsko, Pula
SNC	Řecko, Kypr
SOGT	Řecko, Thelasoniki
SOPM	Portugalsko, Porto, Matosinhos
SOPP	Portugalsko, Porto, Bolhao
SOPV	Portugalsko, Vigo

Tab. IX: Výčet sekvencí stažených v databázi GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) a použitých jako outgroup.

Kód sekvence	Druh	Zdroj
AB011832.1	<i>Dicyema misakiense</i>	GenBank
AB158363	<i>Octopus vulgaris</i>	GenBank
AB240155	<i>Sepia officinalis</i>	GenBank
AB266027	<i>Dicyema acuticephalum</i>	GenBank
AY293720	<i>Sepiola rondeleti</i>	GenBank
AY293723	<i>Sepietta obscura</i>	GenBank
D26529	<i>Dicyema orientale</i>	GenBank
D26530	<i>Dicyema acuticephalum</i>	GenBank
EU203144	<i>Sepietta oweniana</i>	GenBank
KF208320.1	<i>Dicyema</i> sp. 2	GenBank
KF208321.1	<i>Dicyema furuyi</i>	GenBank
KF208323.1	<i>Dicyema</i> sp. 3	GenBank
KF208349.1	<i>Dicyema</i> sp. 4	GenBank
KF208352.1	<i>Dicyema papuceum</i>	GenBank
KF208354.1	<i>Dicyema</i> sp. 1	GenBank
KF208356.1	<i>Dicyema</i> sp. 5	GenBank
KF208357.1	<i>Dicyemenea floscephalum</i>	GenBank
KF208359.1	<i>Dicyemenea</i> sp. 1	GenBank
KJ786920.1	<i>Dicyemenea brevicephaloides</i>	GenBank
KJ786921.1	<i>Dicyemenea rossiae</i>	GenBank
KJ786922.1	<i>Dicyemodeca deca</i>	GenBank
KJ786923.1	<i>Dicyemenea abreida</i>	GenBank
KJ786924.1	<i>Dicyemenea brevicephala</i>	GenBank
KJ786925	<i>Dicyema apollyoni</i>	GenBank
KJ786925.1	<i>Dicyema apollyoni</i>	GenBank
KJ786926.1	<i>Dicyemenea adscita</i>	GenBank
KJ786927.1	<i>Dicyemenea adminicula</i>	GenBank
KM517940	<i>Sepietta neglecta</i>	GenBank
LN878140.1	<i>Dicyemenea eledones</i>	GenBank
LN878141.1	<i>Dicyemenea eledones</i>	GenBank
LT669863.1	<i>Dicyema</i> sp. E2	GenBank
LT669883.1	<i>Dicyema</i> sp. E9	GenBank
LT669884.1	<i>Dicyema</i> sp. E7	GenBank
LT669885.1	<i>Dicyemidae</i> sp.	GenBank
NC009690	<i>Sepia esculenta</i>	GenBank
NC016423	<i>Bathyteuthis abyssicola</i>	GenBank
NC016425	<i>Semirossia patagonica</i>	GenBank
NC021146	<i>Sepia pharaonis</i>	GenBank
NC022466	<i>Sepia apama</i>	GenBank
NC022467	<i>Sepia latimanus</i>	GenBank
NC022468	<i>Sepia lycidas</i>	GenBank