

UNIVERZITA KARLOVA v PRAZE

Přírodovědecká fakulta
Studijní program Biologie
Studijní obor Biologie



Karel Kodejš

Charakteristické aspekty populační genetiky živočichů s parazitickou životní strategií
Characteristic population genetics features of animals with parasitic life strategy

Bakalářská práce

Školitel: mgr. Jakub Straka Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 20. srpna 2014

Karel Kodejš

Abstrakt

Parazitické organismy se vyznačují velmi těsnou vazbou na své hostitele. Díky tomu může jejich populační historie, nebo obecně fylogeneze, odrážet historii těchto hostitelů. Zatímco za pomoci morfologických charakteristik lze výzkum koevoluce provést jen na vyšší, minimálně druhové úrovni, rozvoj molekulárních technik a především zavedení selekčně neutrálních markerů v současné době umožnil hlubší náhled do této problematiky.

Tato práce popisuje genetické markery používané pro studium populační dynamiky, se zaměřením na parazitické živočichy a shrnuje jejich výhody a nevýhody při užití v populační genetice a jejich možné aplikace. Dále se zabývá statistickým aparátem využívaným při studiu koevoluce hostitelsko-parazitických systémů, zvláště rekonstrukce koevoluční historie. Popisuje základní statistické algoritmy používané pro hodnocení míry strukturalizace populací a jejich aplikaci. V poslední části se zabývá faktory životního cyklu parazitů a jejich hostitelů, které ovlivňují charakter jejich koevoluce. Zabývá se dopadem různé míry hostitelské specifity, složitosti životního cyklu, mobility hostitele a životních stadií parazitů na výslednou strukturu koevoluční historie.

Klíčová slova: parazitismus, populační genetika, genetické markery, koevoluce, biostatistika, mikrosatelity

Abstract

Organisms with parasitic life strategy are characterized by strong bond to their hosts. Because of that can their population history, or more generally their phylogeny, reflect evolutionary history of the hosts. While with morphological markers alone, coevolution can be examined only at higher, at least species level, the development of molecular techniques, especially usage of selectively neutral markers, provides deeper insight in this problematic.

This thesis describes genetic markers used to investigate population dynamics, with emphasis to parasitic animals, and summarises their advantages, limitations and possible applications. Further it describes statistical methods used in coevolutionary studies, mainly to reconstruct coevolutionary history. It describes basic statistical algorithms to characterize rate of population subdivision. In the last part it describes parasite and host's life history features, which influence characteristics of coevolution, such as rate of host specificity, complexity of life cycle, host and parasite's mobility, which has impact to final coevolutionary pattern.

Keywords: parasitism, population genetics, genetic markers, coevolution, biostatistics, microsatellites

Poděkování:

Chtěl bych v první řadě poděkovat svému školiteli Jakobovi Strakovi za jeho trpělivost, přínosné diskuse o evoluční biologii a diverzitu témat, která lze pod jeho vedením řešit. Dále bych chtěl podporovat Katce Jůzové a Martinovi Těšickému za pomoc s formální i obsahovou stránkou a v neposlední řadě své přítelkyni a rodině za všeobecnou podporu.

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Markery používané v populační genetice	1
2.1.	morfologie.....	2
2.2.	Allozymy.....	3
2.3.	Sekvenční data	3
2.4.	RFLP	4
2.5.	AFLP.....	5
2.6.	RAPD.....	6
2.7.	Mikrosatelity	7
3.	Statistické zpracování koevoluce.....	9
3.1.	Určení míry podobnosti topologií stromů.....	10
3.1.1.	Brooks parsimony analysis.....	10
3.1.2.	Metoda maximální kodivergence	11
3.2.	Charakterizace populační struktury	12
3.2.1.	F statistika a odvozené hodnoty	13
3.2.2.	AMOVA.....	13
3.2.3.	Genetická vzdálenost.....	14
4.	Srovnání populační struktury s hostitelem	15
4.1.	Efektivní velikost populace.....	15
4.2.	Hostitelské přeskoky	16
4.3.	Hostitelská specifita a její východiska	16
4.4.	Vliv způsobu života hostitele.....	18
4.5.	Vliv mobility a horizontálního přenosu parazitů	19
4.6.	Vliv životního cyklu	20
5.	Závěr	21
6.	Použitá literatura	22

1. Úvod

Parazitismus je široce rozšířenou životních strategií organismů (Schmid-Hempel, 2011). Jedná o skupinu velmi heterogenní (zahrnující organismy prakticky z každé větší vývojové linie) Jedním z mnoha směrů výzkumu paraziticko hostitelských asociací je studium vlivu jejich koevoluce na genetickou strukturu hostitelských druhů. Z pohledu koevoluce s hostiteli mají totiž různé parazitické organismy řadu vlastností společných (Schmid-Hempel, 2011). Pro účely této BP se zaměřím především na parazitické živočichy, ačkoli řada mikroevolučních specifík parazitismu byla objevena na systémech obsahující prokaryota (Andras a Ebert, 2013), protista (Doležel a kol., 1999) nebo houby (*fungi*) (Mundt a McDonald, 2001).

Studium koevoluce parazitických asociací často fluktuuje mezi čistou populační genetikou a analýzou interspecifickou, zvláště v případech, kdy zkoumané populace parazitů využívají více hostitelů (Štefka a Hypša, 2009), nebo je druhový status některých linií nejasný (Kvičerová a Hypša, 2013).

Informativní přínos studia koevoluce tak úzkého ekologického vztahu, jako je parazitismus, je především v možnosti srovnání dvou nezávislých zdrojů informace o fylogenezi – evoluční historie parazita i jeho hostitele (Nadler, 1995), což na druhou stranu vyžaduje specializovaný statistický aparát na srovnání topologie dvou fylogenetických stromů (Page, 1994b).

Cílem této bakalářské práce je 1) popsat a charakterizovat základní markery používané v populační genetice a klady/ zápory jejich použití, 2) popsat metody statistického zhodnocení koevoluce a 3) na základě příkladových studií popsat společné znaky populační genetiky parazitů.

2. Markery používané v populační genetice

Popis koevoluční struktury a vlastně i jakékoli fylogeneze na vnitropopulační úrovni vyžaduje vysokou citlivost použitých markerů (především z pohledu jejich variability a vyšší mutační rychlosti), než studie zaměřující se na interspecifickou a vyšší taxonomickou úroveň (Avice, 1994). Pro statistické prokázání populační struktury je zároveň nutné zpracování velkého množství vzorků z každé zkoumané populace (Vos et al., 1995). Díky tomu se při výběru použitých genetických markerů dbá především na to, aby se jednalo o markery co nejvariabilnější a zároveň technicky snadno použitelné (Sunnucks, 2000). Pro úplnost je zde

zmíněna v první části i morfologická analýza, neboť byla zejména v prvotních koevolučních studiích hlavním zdrojem informací.

2.1. morfologie

Rekonstrukce fylogenetických vztahů odvozené na základě matice stavu morfologických znaků jsou používány v populačně biologických studiích parazitických organismů jen výjimečně a jen u některých skupin - např.: vši (Page et al., 1995), roupi (Hugot, 1999). Nespornou výhodou morfologických studií je snadné získání znaků bez nutnosti laboratorních analýz. Sporná je ovšem v případě použití morfologických markerů už jejich selekční neutralita. U morfologického znaku zpravidla nelze vyloučit jeho adaptivní hodnotu. Zvláště v případě endoparazitů díky jejich morfologickým adaptacím na život v nitru hostitele navíc takových dobře srovnatelných morfologických znaků mnoho není, zároveň v některých charakteristikách u nich dochází ke konverencím, které takovou analýzu a správný výběr znaků znesnadňují (Schmid-Hempel, 2011). Zároveň se vyznačují nízkým počtem hodnotitelných stavů takových znaků. Tyto problémy sice do jisté míry řeší statistické zpracování dostatečného počtu různých hodnocených znaků (Page et al., 1995, Hugot, 1999), nicméně existuje možnost, že morfologická analýza výslednou představu o strukturalizaci populace výrazně nadhodnotí, případně podhodnotí. Například (Turčeková a kol., 2003) popisuje u *Echinococcus granulosus* velikou populační variabilitu v morfologických znacích, používaných v předešlých studiích na tomto druhu, a to i v rámci populace (n=150), která pochází z experimentální infekce pokusných zvířat jedinou cystou a při použití neutrálních genetických markerů jeví jen minimální variabilitu. Dalším podobným příkladem jsou lidské vši (*Pediculus humanus*), kde byly na základě specializace na rozdílné části těla hostitele a morfologických znaků oddělovány dvě linie – *Pediculus humanus corporis* a *P.h.capitis* (Busvine, 1978). Fylogenetickou analýzou založenou na genetických znacích však byla popřena monofylie těchto dvou linií (Leo et al., 2002). Pozdější práce (Reed et al., 2004) odhlalila bazální divergenci na monofyletickou linii severoamerickou (obsahující jen formu *capitis*) a starosvětskou (formy *corporis* i *capitis*), tedy neodpovídající dvěma dříve předpověděným liniím a tedy ani dříve používaným morfologickým rozlišovacími znakům

Na rozdíl od nejistých výsledků při použití morfologie parazitů jako primárního zdroje informací o fylogenezi se morfologické znaky (a to zejména ultrastrukturní) jeví jako vhodné doplnění při charakterizaci linií definovaných na základě genetických markerů (Zikmundová a kol., 2014; Kvičerová a Hypša, 2013)

2.2. Allozomy

Dnes již prakticky nepoužívaná a překonaná metoda, nicméně v minulosti aplikovaná i v populační genetice parazitů (např (Mulvey et al., 1991)). Využívá existence variability ve struktuře proteinů způsobené mutacemi v DNA daného jedince. Allozymová analýza probíhá následujícím postupem: izolace proteinů, jejich identifikace za použití specifických protilátek a zjištění jejich variability pomocí elektroforézy (Avisé, 1994). Variabilita takto získaných znaků (forem daného proteinu) je oproti modernějším metodám (sekvenace, AFLP, SSR – viz dále) nízká (Abaie et al., 1995). Mulvey et al. (1991) uvádějí v rámci populace motolice *Fascioloides magna* (n=1492) z 5 analyzovaných proteinů u jednoho z nich 4 alely a u zbylých 2 alely na lokus. Populační struktura je pak odvozována především na základě rozdílných frekvencí jednotlivých forem proteinů mezi lokalitami. Nevýhodou allozymových markerů je to, že nemohou být úplně selekčně neutrální – analyzované proteiny musí mít svou funkční strukturu alespoň do určité míry zachovalou, aby mohly vykonávat svou fyziologickou funkci (Avisé, 1994). Technickým nedostatkem a jedním z důvodů, proč se tato metoda dnes již prakticky nepoužívá, je nutnost izolace nativních proteinů, což na rozdíl od DNA nelze provádět se starším nebo fixovaným materiálem (Sunnucks, 2000).

2.3. Sekvenční data

Data získaná sekvenací nukleových kyselin jsou nejkompletnějším zdrojem informace o konkrétním organismu a na interspecifické a vyšší úrovni se takřka výhradně používají k rekonstrukci fylogeneze za použití řady algoritmů k jejich analýze (Avisé, 1994). Vzhledem k relativní technické a finanční náročnosti sekvenace jako takové a nutnosti velkého souboru jedinců se v současné době používají v populační genetice délkově variabilní genetické markery spíše než sekvenační (viz dále) (Sunnucks, 2000).

Nutno nicméně poznamenat, že díky technickému pokroku v oblasti sekvenace a především vývoji technologií tzv. next generation sequencing, existují i ojedinělé snahy vydávající se opačným směrem a ukazující na možnost využívat jako zdroj populačně genetických výzkumů celogenomová data (Alexander et al., 2014). Tento přístup využívá k hodnocení populační struktury jako soubor dat variabilitu homologických sekvencí v rámci celého genomu. I přes stále dostupnější a levnější sekvenační metody i softwarovou kapacitu v tuto chvíli znamená tento přístup pro studium nemodelových organismů spíše v ukázkou toho, že v budoucnu něco podobného bude možné. Aplikace byla zatím možná jen na člověka a *Arabidopsis*, díky dlouhodobým sekvenačním projektům 1000genomes (člověk, Siva,

2008), resp. 1001genomes (*Arabidopsis*, Weigel and Mott, 2009), de novo sekvenace genomů celých populací (nejen) parazitických organismů je prozatím takřka nereálná (Hert et al., 2008)

Ze sekvenačních dat se v populační genetice používají nejčastěji některé úseky mitochondriální DNA vyznačující se vysokou mutační rychlostí a díky tomu variabilní i na intraspecifické úrovni, jako například cytochrom c oxidáza I (Oshaghi et al., 2007), cytochrom b (Nieberding et al., 2004). Nejpodobnější sekvence se pro účely populační genetiky klastrují do haplotypů, se kterými se posléze pracuje ve fylogenetické analýze místo sekvencí konkrétních jedinců (Pritchard et al., 2000). Jaderné geny široce používané ve fylogenetických analýzách na vyšší úrovni, jako je ribosomální 18s rDNA, a protein kódující sekvence, jsou pro účely populačních studií zpravidla málo variabilní (Avisé, 1994)

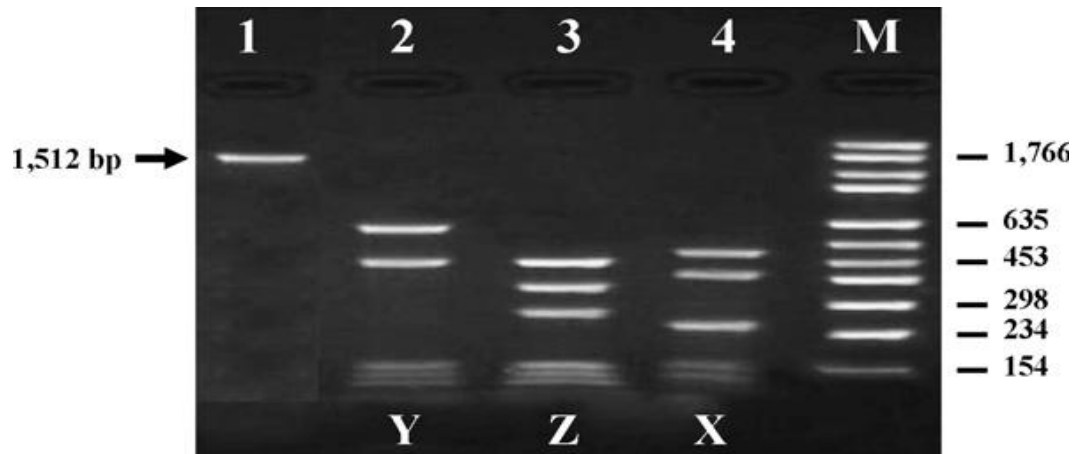
2.4. RFLP

RFLP neboli restriction fragment length polymorphism je metoda využívající k analýze genetické variability organismů restriční endonukleázy štěpící DNA v místě, kde se nachází pro ně specifická sekvence. Analyzovaná DNA je naštěpena jednou nebo více restričními endonukleázami a analyzována pomocí elektroforézy. Výsledkem je velké množství délkově rozrůzněných fragmentů DNA, které se mezi jedinci navzájem liší. Délková variabilita odráží jednak mutace v sekvenci restričních míst, jednak inserce/delece v oblastech mezi dvěma restričními místy (Avisé, 1994). Pomocí RFLP lze nagenarovat obrovské množství hodnotitelných znaků, které lze ale mezi jedinci jen obtížně homologizovat. Tento problém lze do jisté míry řešit selekcí jen části fragmentů za pomoci značené DNA vážící se na konkrétní část genomu daného organismu - southern blot (Mundt and McDonald, 2001), případně omezením této metody na předem vybraný úsek – tzv. PCR-RFLP, což redukuje množství získaných fragmentů a usnadňuje jejich homologizaci.

PCR-RFLP je omezením RFLP na konkrétní úsek genomu. Z izolované DNA je nejdříve pomocí PCR amplifikován konkrétní úsek (nemusí se nutně jednat jen o jeden gen, nýbrž i delší úsek mezi geny – viz (Oshaghi et al., 2007), který je následně naštěpen vybranou restriční endonukleázou. Výsledkem je vzor několika délkových fragmentů, které lze snadno analyzovat (obr. 1). Touto metodou lze zjistit polymorfismus v daném genu a klastrovat jedince do haplotypů bez nutnosti sekvenace (Oshaghi et al., 2007, Ferreira et al., 2013).

Nespornou výhodou RFLP a PCR-RFLP jsou oproti sekvenaci nižší náklady, dále nízká technická náročnost a přesnost i při analýze velkého množství jedinců. Především PCR-RFLP

se vyznačuje vysokou reprodukovatelností díky jednoznačnosti použitých primerových kombinací i restrikčních enzymů (Wolf et al., 1999).



Obr. 1: ukázka vzoru výsledných proužků PCR-RFLP u *Anopheles superpictus* na úseku mitochondriální DNA mezi geny COI a COII za použití endonukleázy AluI.

1 - celkový amplifikovaný úsek; 2, 3,4 – jednotlivé haplotypy (2 - 640, 450, 150, 140, 130 bp; 3 - 450, 360, 280, 150, 140, 130, bp; 4 - 540, 420, 260, 150, 140 bp), M – délkový marker.

z Oshaghi et al. (2007)

2.5. AFLP

AFLP, neboli amplified fragment length polymorphism, je v současnosti spolu s mikrosatelity jednou z nejpoužívanějších metod v populační genetice. Podobně jako RFLP generuje velký počet délkově variabilních fragmentů DNA bez nutnosti sekvenace. Poprvé se objevila v roce 1995 (Vos et al., 1995). Jedná se v podstatě o rozšíření myšlenky RFLP s využitím PCR amplifikace místo southern blotingu. Celková DNA je naštěpena restrikčními endonukleázami (zpravidla dvěma na jednu reakci), na volné konce se naváží adaptéry a následuje PCR replikace. Při reakci se využívá toho, že restrikční endonukleázy po štěpení zanechají volné několikabázové jednořetězcové konce („sticky ends“) známé sekvence, na které se adapter dá navázat. PCR primery sloužící k výběru fragmentů pro replikaci mají tři části: úsek komplementární k sekvenci adapteru, úsek komplementární k restrikčnímu místu a třetí část s libovolným počtem arbitrárně zvolených specifických nukleotidů (**viz. obrázek 2**). Specifické nukleotidy zabezpečí selekci fragmentů, neboť díky nim dochází k amplifikaci jen těch fragmentů, které mají v sousedství restrikčního místa k nim komplementární sekvenci. Čím delší je specifický úsek, tím méně fragmentů se amplifikuje (Vos et al., 1995)

struktura AFLP adaptéru při použití restrikční endonukleázy EcoR1 :

5-CTCGTAGACTGCGTACC
CATCTGACGCATGGTTAA-5

struktura primeru pro EcoR1 AFLP:

5-GACTGCGTACCAATTCNNN-3
adapterová sekvence specifické nukleotidy
enzymová sekvence

**Obr. 2: příklad adaptéru a primeru pro AFLP za použití endonukleázy EcoR1.
podle Vos et al. (1995), upraveno**

Nespornou výhodou AFLP je stejně jako u RFLP velké množství znaků -Alacs et al. 2011 uvádí v rámci populace (n=73) za použití dvou primerových párů (MseI a EcoRI) a 3-4 specifických nukleotidů 39 výsledných proužků, z toho 33 polymorfních. Dále je nespornou výhodou technická snadnost vývoje primerových a adapterových kombinací oproti mikrosatelitům (viz. dále), vysoká reprodukovatelnost výsledků a především oproti RFLP vyšší pravděpodobnost homologizace jednotlivých fragmentů (Mueller and Wolfenbarger, 1999)

2.6. RAPD

RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) je další metodou využívající délkově variabilní markery. Vyvinuta byla už roku 1990 (Williams et al., 1990), tudíž byla používána dříve než AFLP. Umožňuje vytvoření vzoru délkových proužků bez nutnosti restrikce pomocí enzymů a jejich selekci rovnou při PCR. Využívá náhodně vybraných primerů, se kterými je provedena PCR. Výsledkem je opět vzor proužkování, které lze statisticky vyhodnotit (Lynch and Milligan, 1994). S délkou použitých primerů klesá počet získaných proužků i chybovost metody. Při použití krátkých primerů totiž vzrůstá pravděpodobnost jejich zcela náhodného nebo jen částečného nasedání a následné amplifikace zcela nespecifických úseků (Perez et al., 1998). Co se týká počtu získaných hodnotitelných znaků, například C M Davies (1999) uvádí u *Schistosoma haematobium* v populaci (n=57) za použití 6 desetinukleotidových primerů vznik 40 proužků, z toho 37 polymorfních, a tedy nesoucích informaci o populační struktuře. Pro mezipostitele – plže *Bulinus globosus* (n=60), pak s 10 primery vznik 234 proužků, z toho 221 polymorfních. Zvláště díky nízké specifitě této metody, především z ohledu neznámého složení naštěpených markerů se tato metoda příliš nepoužívá.

2.7. Mikrosatelity

Mikrosatelity neboli SSR (simple sequence repeats) jsou typem repetitivních sekvencí vyskytujících se na různých místech genomu. Skládají se z 2-10 nukleotidových motivů variabilních z pohledu počtu jejich opakování v daném lokusu (Bhargava and Fuentes, 2010). Od méně variabilních minisatelitů byly arbitrálně odlišeny na základě délky motivu repetic (repetiční motiv o délce vyšší než 10 bází je nazýván minisatelitem, kratší mikrosatelitem – (Richard and Paques, 2000)). Variabilita v počtu opakování repetičního motivu vzniká na základě sklouznutí (slippage) DNA polymerázy při replikaci mikrosatelitového úseku, kdy dojde k přeskočení části mikrosatelitu, nebo je naopak část z něj amplifikována dvakrát (Ellegren, 2004), případně inserce/delece nukleotidů do sekvence mikrosatelitu, nebo splynutí dvou mikrosatelitových lokusů (čímž mohou vznikat i přerušené, respektive složené repetic - (Bhargava and Fuentes, 2010).

Jednoduché repetitivní sekvence jsou v rámci genomu široce rozšířené – například u člověka je z 1 milionu bází genomu v průměru přes 10000 z nich součástí 1-6 nukleotidových repetic (Tóth et al., 2000).

Použití mikrosatelitů v populační genetice spočívá v analýze délek jednotlivých lokusů v rámci populace (Ellegren, 2004). Při použití primerů v oblastech sousedících s repetitivní sekvencí lze pomocí PCR mikrosatelitové lokusy izolovat a následně srovnávat jejich délky bez nutnosti sekvenace, pomocí elektroforézy na gelu (Morgante and Olivieri, 1993), nebo v dnešní době kapilární elektroforézou s mnohem větší rozlišovací schopností, nicméně vyžadující použití fluorescenčně značených primerů (Minárik a Bazsalovicsová, 2014). Při použití mikrosatelitů se kvůli časové a materiální úspoře osvědčilo analyzovat více lokusů naráz (tzv. panel), pokud se tyto signifikantně liší svojí průměrnou délkou a nedochází k délkovému překryvu mezi nimi (Smee et al., 2013). Rozmezím délek se překrývající lokusy je možné do panelu zahrnout jen za použití odlišných fluorescenčních značek pro každý z nich (Minárik a Bazsalovicsová, 2014).

V kontrastu se snadným použitím je relativně vysoká technická náročnost vývoje primerů (Queller et al., 1993). První a dlouhou dobu jedinou metodou k charakterizaci mikrosatelitových lokusů a definování primerů v přiléhajících oblastech je vytvoření bakteriální genomické knihovny (Jarne and Lagoda, 1996). Zahrnuje naštěpení kompletní DNA restrikcí enzymem, zaklonování jednotlivých fragmentů do plasmidových vektorů a jejich vložení do bakteriální kultury. Následuje selekce těch kolonií, které obsahují mikrosatelity pomocí značené DNA sondy komplementární k sekvenci žádané repetic. Ty

jsou vybrány, do nich vložený fragment je osekvenován a následuje design primerů (Solano et al., 1997). Tento přístup je technicky a hlavně časově velmi náročný (López-Uribe et al., 2013).

Díky rozvoji možností sekvenace je v poslední době od klonovací metody upouštěno. Next generation sequencing technologie umožňují mnohem rychlejší definování mikrosatelitových lokusů díky tomu, že lze po naštěpení DNA a identifikaci mikrosatelity obsahujících fragmentů (pomocí hybridizace) tyto fragmenty rovnou osekvenovat (Abe'i et al., 2011). S použitím 454 sekvenování popisuje (López-Uribe et al., 2013) vývoj primerů trvající 3 týdny (oproti 2 měsícům za použití klonovací metody testované stejným autorem v téže práci).

Mikrosatelitové markery jsou na rozdíl od předchozích metod (s výjimkou sekvenace) plně kodominantní, u diploidního organismu tedy lze zaznamenat obě alely (Jarne and Lagoda, 1996). Umožňují tak jednak provádět analýzy paternity (Brante et al., 2011), jednak na selektivně neutrálních znacích analyzovat míru heterozygoty, která odráží podíl inbreedingu v dané populaci (Jarne and Lagoda, 1996). Velkou výhodou je také jejich vysoká variabilita na vnitropopulační úrovni – až několik desítek alel na lokus (Jarne and Lagoda, 1996) díky známé okolní sekvenci a jednoznačnosti kombinací primerů, které leží v přiléhajících méně variabilnějších úsecích, kombinují mikrosatelity hypervariabilitu se snadnou homologizací jednotlivých lokusů a dobrou reprodukovatelností metody (Grandjean et al., 2014)

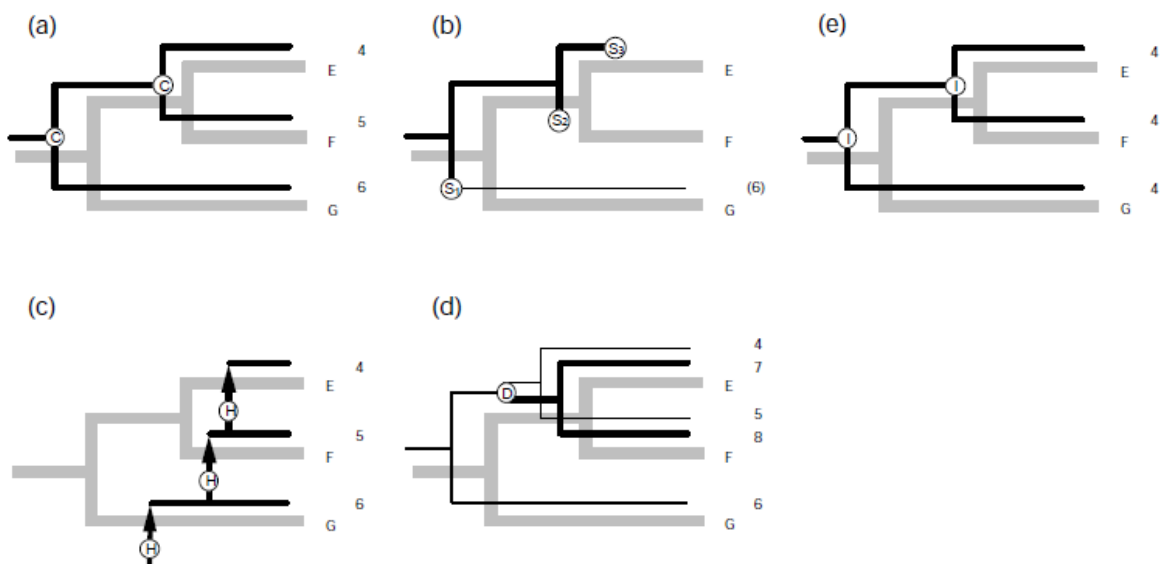
Komplikujícím, ale statisticky řešitelným faktorem, je občasný výskyt tzv. nulových alel – tedy neamplifikace alely u některého jedince. Výskyt nulové alely může být způsoben různými příčinami zahrnujícími mutaci v primerové oblasti, delecí mikrosatelitové oblasti i lidský faktor (například nevhodnou koncentrací templátové DNA, kdy se přednostně amplifikují kratší fragmenty) (Dakin and Avise, 2004). Nulové alely mohou způsobit chybné vyhodnocení paternity, případně podcenění míry heterozygoty (genetický profil jedinců u kterých se nulová alela v jedné kopii vyskytne je prakticky neodlišitelný od homozygota), je tedy zapotřebí na ně při analýze myslet (Dakin and Avise, 2004), v případě dostatečného počtu použitelných lokusů je vhodnější ty, u kterých jsou nulové alely zaznamenány, dále nepoužívat (Alacs et al., 2011).

Mikrosatelitové lokusy jsou díky své vysoké variabilitě ve většině případů amplifikovatelné jen u jednoho druhu (Jarne and Lagoda, 1996), příklady interspecifické použitelnosti primerů jsou řídké (Dubut et al., 2010).

3. Statistické zpracování koevoluce

Stejně jako výběr adekvátních markerů je v populační genetice neméně důležitý výběr správné statistické metody pro zpracování dat. Při použití fylogenetické informace z DNA sekvenčních znaků máme při studiu koevoluce hostitelů a parazitů oproti standardní fylogenetice k dispozici dva zdroje informací – hypotéza o evoluční historii parazitů a hypotéza o evoluční historii jejich hostitelů, navíc se známou asociací koncových článků (primárně kvůli společnému odběru obou vzorků). Přibývá tak statistický aparát pro kvantitativní srovnání topologie dvou fylogenezí (Page, 1994a).

V případě použití délkově variabilních markerů (AFLP, mikrosatelity...) je obvykle stěžejní charakterizace populační struktury pomocí analýzy jejich variability.



Obr. 3: ukázka možných koevolučních událostí na srovnání fylogeneze hostitele (šedá) a parazita (černá).

(a) C – kodivergence, vznik dvou linií parazita i hostitele společně;

(b) S -sorting (třídění), parazit je z dané hostitelské linie ztracen, S1 – falešný sorting – parazit je v linii přítomen, ale při získání vzorků není podchycen;

(c) H – host switching (přeskok) – parazitická linie pochází původně z jiného hostitele, na nové se adaptoval druhotně;

(d) D – duplikační událost – linie parazitů speciovala nezávisle na hostitelské a

(e) inertní chování parazitické linie – nedošlo ke speciaci linií parazita, kodivergence jsou zdánlivé, ve skutečnosti se od sebe „linie“ parazita na vzájem neliší

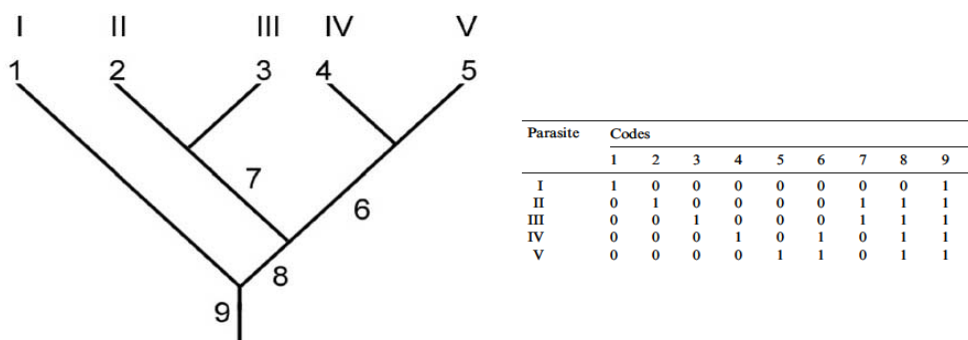
z (Paterson et al., 2003), **upraveno**

3.1. Určení míry podobnosti topologií stromů

Pro kvantifikaci míry podobnosti fylogenetických struktur parazitů a jejich hostitelů a formulace co nejoptimálnější hypotézy o koevoluci (posléze použitelné například pro fylogeografické analýzy např. Nieberding et al. 2004), je zapotřebí specifického statistického aparátu. Jako první tuto potřebu a vlastně i možnost použití parazitů coby zdroje informace o fylogenezi hostitelských organismů vyjádřil W. Hennig. (Hennig, 1966). Uvádí, že by fylogenetická struktura parazitických organismů (stejně jako monofágního býložravého hmyzu) mohla díky dlouhodobé koevoluci podpořit hypotézu o hostitelské fylogenezi. Problematiku nicméně uzavírá konstatováním, že by vyžadovala další studium a není uspokojivě vyřešena.

3.1.1. Brooks parsimony analysis

S první takovou statistickou metodou přišel roku 1981 D. R. Brooks. Ve své metodologické práci (Brooks, 1981) formuloval metodický aparát, v pozdějších publikacích po několika úpravách nazývaný BPA - Brooks parsimony analysis (např. (Brooks, 1990); Dowling, 2002). Jedná se totiž o metodu založenou na maximální parsimonii (jednoduchosti), snažící se o získání takové rekonstrukce koevoluce, která obsahuje co největší počet společných divergencí hostitele a parazita (koevoluční události parazitických asociací, obr.3). Jejím základním předpokladem je to, že asociace s parazity má v případě velmi silné vazby s hostitelem z pohledu rekonstrukce jeho fylogeneze podobnou výpovědní hodnotu jako jakýkoli jiný znak. K hodnocení koevolučních závislostí využívá vytvoření binární matice – každé linii fylogenetického stromu je přiřazeno číslo a ve výsledné matici je každý taxon zaznamenán kódem podle toho, jaké linie se nacházejí na cestě k němu od společného předka (pokud se v jeho historii daná linie objevuje, je v matici uvedena hodnota 1, pokud ne 0 – obr. 4).



Obr. 4: Transformace stromového diagramu parazitů do binární matice pro účely BPA
 vlevo kladogram parazitů, vpravo výsledná matice;
 například parazit IV ve své historii prošel liniemi 4, 6, 8 a 9, proto mu náleží binární kód 000101011
 z Dowling (2002)

Matice se následně přetransformuje na matici pro hostitele (ke každému hostiteli je přiřazen kód jeho parazita, v případě více parazitů na hostitele vznikne výsledný kód záznamem všech linií jeho parazitů). Takto získanou matici lze použít ke dvěma účelům. Buď je z ní rekonstruován fylogenetický strom hostitelů de novo (Brooks, 1981; Siddall and Perkins, 2003). Další možností je vymapování daných očíslovaných znaků přímo na hostitelskou fylogenezi a z takto popsaného stromu rekonstrukce koevoluční historie za použití maximální parsimonie (cílem je rekonstrukce s maximálním množstvím kodivergencí a minimum hostitelských přeskoků).

Statistický aparát BPA je díky své univerzalitě použitelný i v historické biogeografii. Umožňuje porovnání fylogeneze organismů a na základě geologie odvozené „fylogeneze“ kontinentů nebo ostrovů, případně namodelování historie ostrovů a částí kontinentů na základě fylogeneze organismů, které se zde vyskytují (Brooks, 1990) (použitá maticová algebra umožňuje porovnávat topologii libovolných stromových diagramů nezávisle na jejich původu).

3.1.2. Metoda maximální kodivergence

Další metodu pro hodnocení koevoluce formuloval (Page, 1994b). Jeho přístup se od předchozího liší v tom, že uvažuje parazity jako linie a nikoli jako znaky, využívá modelování parazitického stromu na hostitelský. Je základem algoritmů programu TreeMap (Page and Charleston, 1995), i pozdějšího TreeFitter (Ronquist, 2008), umožňujícího koevoluční analýzy výpočetní cestou. Prvním krokem je namapování parazitické fylogeneze na hostitelskou, tedy přiřadit k sobě jednotlivé hostitelské asociace. K vlastnímu popisu míry

podobnosti topologií využívá proměnou K , která určuje maximální počet kodivergencí. Zcela vyřešený fylogenetický strom s n koncovými větvemi má právě $(n-1)$ uzlů, tedy potenciálních míst divergence. Pokud se topologie stromů zcela shodují, pak platí, že $K=n-1$ (každý uzel představuje zároveň kodivergenci) a vzor koevoluce je vyřešený. Pokud se topologie liší, nejdříve se vypočítá počet kodivergencí, k (pro odlišení od maximálního počtu – K), a je hodnocena odchylka tohoto počtu od maxima (d). Platí, že $d=(n-1)-k$. Přidáním hostitelských přeskoků lze získat topologii s vyšším počtem kodivergencí (a tedy s nižším d). Cílem je získat topologii s co nejmenším d a zároveň s co nejmenším počtem jiných než kodivergenčních událostí.

Zatímco u stromů s malým n lze takovýto postup provést u všech myslitelných koevolučních vzorů, u větších datasetů se využívá heuristická modifikace tohoto postupu, která probíhá ve třech krocích:

- 1) Namapování primární struktury a ohodnocení počtu koevolučních událostí. Pokud platí, že $k_1=K=n-1$, koevoluce je vyřešena, pokud ne $\rightarrow 2$.
- 2) Postupné přidávání hostitelských přeskoků. Po každém z nich ohodnocení. Pokud je získaný počet k_2 vyšší než k_1 , daný přeskok se uloží a použije při hledání dalšího stromu.
- 3) Pokud ani k_2 není rovno K , pokračuje se dalším hostitelským přeskokem dokud není k maximální.

Nevýhodou takového postupu je, že z pohledu skóre dané koevoluční topologie dosáhne lokálního, čili ne vždy globálního maxima (Page, 1994b), nicméně u běžně analyzovaného množství jedinců by i v případě použití softwarové varianty výpočet všech možných variant byl časově i kapacitně příliš náročný a rozdíl v topologii příliš malý na to, aby se takový postup vyplatil (Huyse and Volckaert, 2005).

Kromě těchto v literatuře nejdiskutovanějších algoritmů se používají i jiné, obvykle metodicky odvozené ze dvou předchozích (Ronquist, 2002; Merkle et al., 2010). Poněkud odlišný je i přístup hodnocení populační struktury hostitelů na základě dat o přítomnosti/nepřítomnosti parazita (Brooks, 1981).

3.2. Charakterizace populační struktury

Ve většině populačních studií je důležité, kromě rekonstrukce fylogenetických vztahů daných populací, kvantifikovat také míru odlišnosti mezi nimi. V případě AFLP a mikrosatelitových markerů je určována alelická diverzita, v případě mitochondriální DNA haplotypová a nukleotidová diverzita (Valade et al., 2009). Tyto hodnoty nám umožňují v rámci populací

rekonstruovat historii dané populace z pohledu průchodů hrdlem lahve (bottleneck effect), expanzí a podobných efektů, a to především prostřednictvím F statistiky a analýzy variability. Odhad N_e – efektivní velikosti populace je dalším důležitým ukazatelem, neboť z něj lze odvodit vliv genetického driftu a genového toku v populaci (Criscione a Blouin, 2005).

3.2.1. F statistika a odvozené hodnoty

Zcela zásadní vliv má v populační genetice F statistika, zavedená S. Wrightem (Wright, 1965). V původním pojetí se jedná o tři hodnoty odvozované z morfologických znaků získaných studiem rodokmenů – F_{IT} , F_{ST} a F_{IS} - vypovídající o odchylce alelického složení dané populace z důvodu její strukturalizace a vlivu inbreedingu v daných subpopulacích.

Díky existenci Wahlundova efektu, kdy v populaci klesá podíl heterozygotů přímo úměrně k míře inbreedingu (která je vztažitelná k N_e – efektivní velikosti dané subpopulace) (Wahlund, 1928) lze F statistiku měřit pomocí odchylky heterozygotity od hodnoty očekávané při panmixii (a tedy při platnosti Hardy-Weinbergovy rovnováhy). F_{IT} vypovídá o odchylce heterozygotity v celé populaci (I – individual, jedinec; T – total, celá populace), F_{IS} analogicky hodnotí jednu subpopulaci (S – subdivision, podskupina), F_{ST} pak hodnotí odlišnosti jednotlivých subpopulací. Hodnota F_{ST} je v populační genetice nejpoužívanější a rozvoj molekulárních technik umožňuje používat ji na analýzu neutrálních znaků (Weir and Hill, 2002). Protože byla navržena na analýzu dvoualelových znaků (jedenogenné morfologické znaky, jako je zbarvení), je v některých případech potřeba pozměnit algoritmus k jejímu výpočtu, takže v současné době existuje v několika úpravách (G_{ST} , R_{ST} ...). Tyto hodnoty se liší různým způsobem odvození a odhadu očekávané heterozygotity, nicméně vyjadřují podobně jako F_{ST} míru odlišnosti od stavu panmixie (Meirmans and Hedrick, 2011). Další hodnotou odvozovanou z populační struktury je úroveň migrace (migration rate; m), důležitá spolu s efektivní velikostí populace především pro posuzování míry genetického driftu (Dietrich et al., 2014).

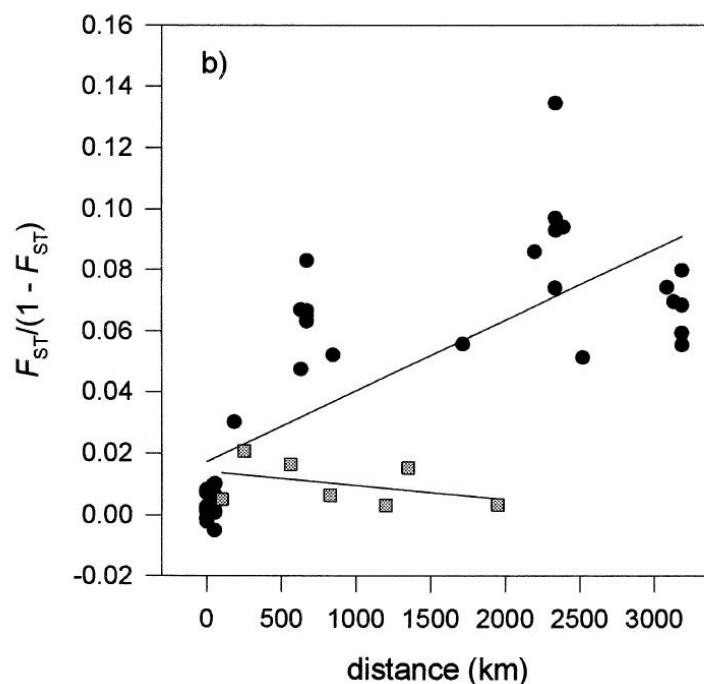
3.2.2. AMOVA

Na hodnotě odvozené od F statistiky, v tomto případě označované jako Φ_{ST} , je založená i metoda AMOVA – analysis of molecular variance, zavedená roku 1992. Jedná se v podstatě o aplikaci statistické metody ANOVA (analysis of variance; analýza variance) na molekulární data. V původní práci (Excoffier et al., 1992) byla použita na analýzu mitochondriální haplotypové variability, nicméně je aplikovatelná i na mikrosatelitová a sekvenční data. Principem metody je rozdělení studované populace na podskupiny a následně testování jejich

podílu na celkové variabilitě (zpravidla se jedná jednotlivé subpopulace, nicméně lze takto hodnotit libovolné skupiny v rámci studovaného souboru jedinců). Jedná se tedy o metodu založenou na posteriorní pravděpodobnosti, tedy testující variabilitu mezi předem danými skupinami (například příslušností do subpopulací), nikoli tyto vytvářející. V případě parazitů tak lze hodnotit jak mezipopulační rozdíly, tak variabilitu mezi jednotlivými hostiteli a v rámci nich. (Small et al., 2013). Provedení analýzy AMOVA výpočetně technickou cestou umožňuje v dnešní době software Arlequin (Schneider et al., 2000).

3.2.3. Genetická vzdálenost

Z hodnoty F_{ST} lze odvodit i odhad takzvané genetické vzdálenosti (genetic distance) mezi populacemi, odpovídající zhruba hodnotě $F_{ST}/(1 - F_{ST})$. Pro sekvenční data lze genetickou vzdálenost měřit i jako prostý počet substitucí mezi dvěma homologickými sekvencemi (Blouin et al., 1995). Vynesemím grafu závislosti genetické a geografické vzdálenosti mezi populacemi lze zjistit, jestli na jejich genetické odlišení má vliv izolace vzdáleností (isolation by distance). Čím vyšší je směrnice výsledné funkce (tedy čím rychleji genetická vzdálenost roste s geografickou), tím vyšší je vliv izolace vzdáleností (např. McCoy et al., 2003, obr. 5).



Obr. 5: ukázka zhodnocení vlivu izolace vzdáleností (isolation by distance) na příkladu dvou hostitelských ras u klíštěte *Ixodes uriae*

na ose x geografická vzdálenost, na ose y odhad genetické vzdálenosti mezi lokalitami (každý bod znázorňuje vztah dvou lokalit).

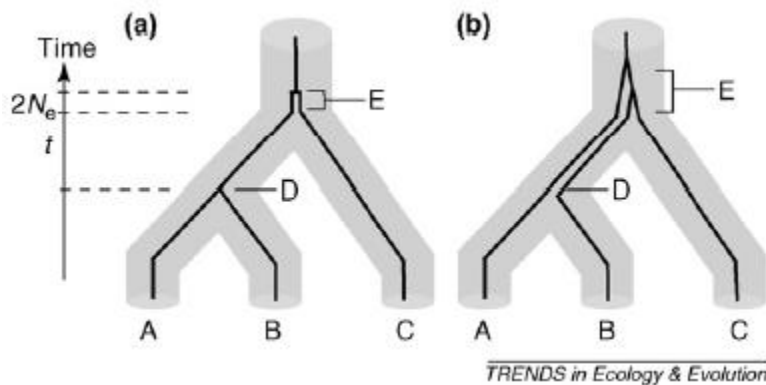
Populace pocházející z racků tříprstých (*Rissa tridactyla*; černá kolečka) vykazuje na rozdíl od populace z papuchalků (*Fratecula arctica*; šedé čtverce) vliv isolation by distance (výsledná závislost má kladnou směrnici)

Z McCoy et al. (2003)

4. Srovnání populační struktury s hostitelem

Srovnání evoluční historie parazitů a jejich hostitelů má řadu využití. Jedním z nich je využití parazitů pro zpřesnění informací o evoluční a geografické historii hostitele (Nieberding et al., 2004), případně pomocí nich podpořit některou z fylogenetických hypotéz (Hugot, 2003). Dalším směrem výzkumu je využití populační struktury z pohledu epidemiologie, například vlivu plošné aplikace antiparazitik (Betson and Sousa-Figueiredo, 2013; Small et al., 2013). V neposlední řadě slouží populačně genetické metody k odhalení obecnějších evolučních faktorů ve vztahu k parazitickému způsobu života (Lu et al., 2009).

Základní myšlenkou, která předchází použití parazitů k odhalení populační struktury je postřeh, že z pohledu hostitele se genealogie parazita podobá genealogii jednotlivých genů (Page, 1988) a za předpokladu úzké hostitelské specifity se chová podobně (Nieberding a Olivieri, 2007). Fylogeneze jednotlivých genů (a analogicky i parazitů, včetně jejich genů) je do jisté míry na kladogenezi hostitele nezávislá (Nichols, 2001), což může vysvětlovat některé zdánlivé neshody mezi kladogenezí hostitele a parazita (v rámci populace hostitelů může docházet k divergencím linií parazitů, čímž vzniká polymorfismus nezávisle na hostiteli –obr.6; Nieberding a Olivieri, 2007).



Obr. 6: Vliv ancestrálního polymorfismu na výslednou koevoluční strukturu

Šedá – fylogeneze hostitele, černá – fylogeneze parazita. Vlevo: k primární divergenci parazitů (E) došlo před divergencí hostitele, jeho kladogeneze nakonec odpovídá hostiteli
vpravo: vlivem divergencí nezávislých na hostiteli došlo k nahromadění ancestrálního polymorfismu a následně v bodě (E) k neúplnému třídění linií (incomplete lineage sorting) parazita při divergenci hostitelů. Díky tomu jsou si paraziti sesterských hostitelů A a B méně příbuzní než parazité linií B a C
z (Nieberding and Olivieri, 2007)

4.1. Efektivní velikost populace

Dostí důležitým znakem, který ovlivňuje charakter populační struktury je již výše zmíněná hodnota efektivní velikosti populace (effective population size; N_e). N_e je odhad ideálního počtu jedinců, který by v panmiktické populaci odpovídal dané populaci za podmínek

stejného genetického složení (Criscione and Blouin, 2005). Tato hodnota mnohem lépe odráží pravděpodobnost genetického driftu než absolutní velikost populace.

Hodnotu N_e v rámci parazitů nejvíce ovlivňuje rozdělení populace do malých subpopulací. Týká se to těch druhů, u kterých dochází k rozmnožování v malých populacích v rámci jednotlivých hostitelů. Jedná se například o většinu parazitických hlístů (Nematoda) a dokonce i u některých silně hostitelsky specializovaných ektoparazitů (například vši). U takových druhů jsou rozmnožující se populace menší, dochází v nich tedy k vyšší intenzitě inbreedingu a vzrůstá pravděpodobnost fixace některých alel genetickým driftem. Lze u nich očekávat snažší vznik výrazné populační struktury, což je také v některých případech pozorováno (Blouin et al., 1995)

Efektivní velikost populace snižuje u některých parazitických organismů i možnost nepohlavního množení, či samooplození (například u motolic) (Criscione and Blouin, 2005)

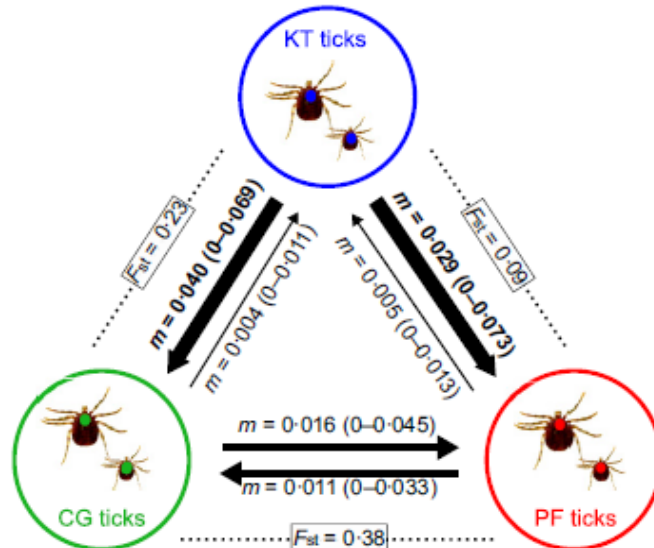
4.2. Hostitelské přeskoky

Specifikem parazitické evoluce oproti evoluci sekvencí je možnost hostitelských přeskoků. Pokud však v koevoluci daného systému převáží, znesnadňují rekonstrukci populační historie (Huysse a Volckaert, 2005). Na druhou stranu mohou hostitelské přeskoky v malém množství mít velkou výpovědní hodnotu, a naopak přispět k porozumění hostitelské struktury. Takovým příkladem je genetická struktura lidských vší (*Pediculus humanus*). Molekulárně genetická práce (Reed et al., 2004) předpokládá na základě analýzy několika mitochondriálních genů divergenci severoamerické a starosvětové linie před cca 1,2 milionu let, tedy v době dávno před vznikem moderní linie *Homo sapiens*. Nejpravděpodobnějším vysvětlením takové populační struktury je přímý kontakt moderních lidí s reliktními populacemi *Homo erectus* v Asii při migraci do Severní Ameriky a hostitelský přeskok vší z *H. erectus* na *H. sapiens*.

4.3. Hostitelská specifita a její východiška

Důležitým aspektem při studiu koevoluce je otázka hostitelské specifiity. Jen v systémech vykazujících těsnou vazbu na hostitele může mít parazitická evoluce výraznou výpovědní hodnotu o průběhu hostitelské evoluce. Těsná asociace s hostitelem může v zásadě vznikat dvěma mechanismy – prvním z nich je kodivergence s hostitelem, druhým pak morfologická a biochemická adaptace na hostitele po jeho kolonizaci po hostitelském přeskoku (Kvičerová a Hypša, 2013). Pro koevoluční studium je nejlepší takový modelový systém, kde se dá předpokládat vysoká míra kodivergencí. Jedná se o systémy, kde je například z ekologických

důvodů omezena možnost hostitelských přeskoků, jako jsou podzemní pytlouši (*Geomys* a příbuzné rody) a jejich vši (*Geomydoecus* a *Thomomydoecus*) (Page et al., 1995), jednohostitelští endoparaziti – např. roupi u primátů (Hugot 1999), případně ostrovní systémy – ektoparaziti galapážské káně *Buteo galapagoensis* (Whiteman et al., 2007a). V posledních letech hojně zkoumaným systémem je cirkumpolárně rozšířené klíště *Ixodes uriae* parazitující na mláďatech mořských ptáků při jejich hnízdění. Jeho životní cyklus zahrnuje 4 stadia s krmením a následným svlekem jen jednou ročně (McCoy 2003). Vzhledem ke způsobu života, kdy se oblast výskytu omezuje jen na ptačí hnízdiště a okolí, tento druh vytváří hostitelsky specializované linie (McCoy et al., 2003). Jedná se zároveň o jeden z mála hostitelsko-parazitických systémů, u kterých byla hostitelská specializace ověřena experimentálně transplantačním pokusem (Dietrich et al., 2014). Jedinci příslušící ke třem hostitelským druhům byli přeneseni do hnízd jednoho z nich (racka tříprstého *Rissa tridactyla*). Jedinci původem z jiných druhů vykazovali signifikantně nižší úspěšnost při parazitaci a vyšší mortalitu, což spolu se zjištěnou vysokou mírou odlišnosti mezi jednotlivými hostitelskými rasami (zjištěnou na základě analýz mikrosatelitových lokusů, obrázek 7) podporuje hypotézu o jejich dlouhodobé specializaci na dané hostitele.



Obr. 7: Molekulární odlišnosti mezi jednotlivými hostitelskými rasami u druhu *Ixodes uriae*

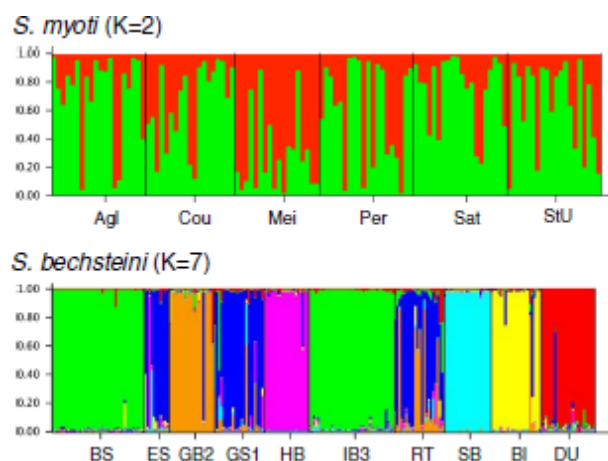
F_{st} – inbrední koeficient, m – migrační intenzita; KT – populace specializovaná na racka tříprstého (*Rissa tridactyla*), PF na papuchalka (*Fratecula arctica*), CG na alkouna úzkozobého (*Uria aalge*) z (Dietrich et al., 2014)

Na příkladu celosvětově rozšířené tasemnice *Ligula intestinalis* ukazují (Bouzig et al., 2008), že se oba principy mohou v koevoluci kombinovat. *Ligula intestinalis* je tasemnice s

tříhostitelským životním cyklem obsahujícím planktonní korýše, kaprovité ryby a vodní ptáky; tato studie se zaměřila na rybí mezihostitele. *Ligula intestinalis* tvoří dvě izolované linie, jejichž oddělení se patrně shoduje s bazální divergencí kaprovitých ryb (čemuž odpovídá i jejich hostitelské spektrum), zatímco koncové linie jsou geneticky velmi homogenní, především díky vysokému genovému toku způsobenému přenosem pomocí silně pohyblivých definitivních hostitelů.

4.4. Vliv způsobu života hostitele

Vysoká míra strukturalizace parazitické populace může vzniknout i nezávisle na genetické struktuře hostitele, například díky způsobu života. (van Schaik et al., 2014). popisuje u dvou druhů roztočů (*Spiturnix myoti* a *S.bechsteini*) parazitujících na netopýrech *Myotis myotis* a *M.bechsteini* genetickou strukturu, která odpovídá způsobu života obou hostitelských druhů. Oba druhy se od sebe liší v několika klíčových faktorech: *M. myotis* tvoří větší kolonie, odchovávající samice se vyznačují vysokou mírou filopatrie, letní kolonie využívají zpravidla jeden úkryt opakovaně a hibernující zvířata jsou pohromadě na otevřených plochách stropu jeskynní. *M.bechsteini* má tyto charakteristiky opačné. Životní styl hostitele má z pohledu parazita vliv hlavně na míru genetického driftu a genového toku (možnosti šíření mezi hostiteli). V menších koloniích je intenzita genetického driftu vyšší, při hibernaci samostatných zvířat nemůže docházet k příliš velkému genovému toku. Tomuto předpokladu odpovídají i výsledky genetické studie těchto dvou druhů – populace *S.bechsteini* se vyznačuje vysokou mírou strukturalizace, zatímco u *S. myoti* nikoli (Obr. 8). U obou druhů netopýrů se rozdíly v populačně genetické struktuře nevyskytují.



Obr. 8 – výsledky klastrovačí analýzy pro druhy *Spiturnix myoti* a *S.bechsteini*. Zkratky označují jednotlivé lokality, barvy označují příslušnost k danému haplotypu, hodnota K označuje maximální počet haplotypů, které lze z daného souboru dat vytvořit podle van Schaik 2014, upraveno

4.5. Vliv mobility a horizontálního přenosu parazitů

Jak už bylo poznamenáno výše, vysoká pohyblivost hostitelů, i případných volně žijících stadií parazitů snižuje míru genetické strukturalizace jejich populací. Je to díky tomu, že usnadňuje jejich (horizontální) přenos mezi vzájemně nepříbuznými hostiteli a tak zvyšuje intenzitu genového toku mezi populacemi parazitů. V případě parazitů s výrazně pohyblivými stadii nemusí být populační struktura vůbec zachytitelná, jak dokazuje studie na příkladu parazitického kraba *Dissodactylus primitivus*, kdy je za disperzi na velkou vzdálenost zodpovědné stadium planktonní larvy (Jossart et al., 2013). Baer et al., (2004) dospěl ke stejnému výsledku u lumčíka *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera:Aphidiidae). Příkladem přinášejícím možnost srovnání efektů různé úrovně mobility a přenosu mezi hostiteli je hostitelsko – parazitický systém káně galapážské (*Buteo galapagoensis*) a tři jejich ektoparazitů – kloše *Icosta nigra*, luptouše *Colpocephalum turbinatum* (Amblycera: Menoponidae) a peřovku *Degeeriella regalis* (Ischnocera: Philopteridae) (Whiteman et al., 2007b). *Icosta nigra* se vyznačuje vysokou mírou pohyblivosti a schopností šíření pomocí okřídlených stadií prakticky nezávisle na svém hostiteli. *Colpocephalum turbinatum* se šíří převážně kontaktem dospělých hostitelů, jedná se tedy o horizontálně přenášeného parazita, zatímco *D. regalis* je přenášena majoritně během hnízdění z rodičů na potomstvo, tedy vertikálně.

Genetická analýza mitochondriálních markerů (I. podjednotka cytochrom C oxidázy– COI a mitochondriální ribozomální 12S rDNA) u těchto tří druhů podporuje předpoklady odvozené z jejich způsobu šíření. V analýze 8 ostrovních populací nejlépe s hostitelskou populační strukturou korelovala populační struktura druhu *D. regalis*, méně už v případě *C. turbinatum*. U silně mobilního druhu *I. nigra* nebyla prokázána žádná korelace.

Podobné srovnání spojené s hostitelskou mobilitou přináší práce zaměřená na hlísty kopytníků (Blouin et al., 1995). Porovnává populační strukturu čtyř druhů parazitů – *Ostertagia ostertagi* a *Haemonchus placei* parazitující skot, *Haemonchus contortus* a *Teladorsagia circumcincta* z ovcí a druh *Mazamastrongylus odocoilei* z jelence (*Odocoileus virginianus*) za použití mtDNA. Parazité domestikovaných hostitelů nevykazují žádné signifikantní odlišnosti mezi jednotlivými populacemi, zatímco subpopulace druhu *M. odocoilei* parazitujícího volně žijícího hostitele vykazují vysokou míru strukturalizace a zároveň velký vliv izolace vzdáleností, nedetekovaný u ovčích a hovězích hlístů (v tomto případě je genetická vzdálenost měřena prostým počtem substitucí v mitochondriální sekvenci). Všechny druhy vykazovaly podobnou míru genové diverzity ve sledovaném lokusu, absenci populační struktury u parazitů domestikantů proto nelze přisoudit nedostatku alel. Vysvětlením pro

takovou populační strukturu je právě mobilita hostitelů, v tomto případě zprostředkovaná člověkem. Z pohledu genového toku mají domestikanti, díky dálkovým transportům v rámci chovu, povahu extrémně mobilních živočichů. Práce dále rozvíjí epidemiologické důsledky tohoto charakteru populační struktury. Vysoký genový tok v kombinaci s velkou genovou diverzitou u parazitů výrazně urychluje rozšíření rezistentních genotypů selektovaným díky plošné aplikaci antiparazitik ve veterinární medicíně.

4.6. Vliv životního cyklu

Neméně důležitým faktorem ovlivňujícím charakter koevoluce parazitických asociací je komplexita životního cyklu (Nadler, 1995). Pro studium hostitelské evoluce jsou nejvíce vypovídající jednohostitelští paraziti (Page et al., 1995, van Schaik et al., 2014), kteří se vyznačují nejtěsnější asociací s hostitelem.

Paraziti s vícehostitelským cyklem vyžadují z pohledu koevoluční historie opatrnější hodnocení (jak již bylo výše naznačeno na příkladu tasemnice *Ligula intestinalis*; Štefka and Hypša, 2009). Na velmi vhodném modelovém systému popisují vliv různě komplexních životních cyklů Criscione and Blouin (2004). Popisují populační strukturu tří sympatricky se vyskytujících motolic u severoamerických lososovitých ryb rodu *Oncorhynchus*. Jedná se o druh *Deropegus aspira* s jednoduchým životním cyklem a tříhostitelský druh *Plagioporus shawi* s vodním cyklem zahrnujícím jako mezihostitele plže a následně rybami predované planktonní korýše. Třetím druhem je *Nanophyeteus salmincola* s mezihostitelským vodním plžem, který produkuje cercárie pronikající do ryb přes kůži. Jeho definitivními hostiteli jsou vodní ptáci a rybožraví savci. Na základě analýzy AMOVA aplikované na mitochondriální data skutečně vykazuje největší míru populační strukturalizace jednohostitelský druh *D. aspira*, méně strukturovaná je pak populace tříhostitelského druhu *P. shawi*. U mololice *N. salmincola* se suchozemským definitivním hostitelem nejsou odlišnosti mezi subpopulacemi signifikantní. Tento výsledek odpovídá teorii allogenických a autogenických hostitelských cyklů formulované už roku 1988 (Esch et al., 1988), podle které by měly být populace parazitů s allogenickým cyklem (tedy hostiteli obývající jak suchozemské, tak vodní prostředí) homogennější než populace s ryze vodním (autogenickým) hostitelským cyklem. Jedním z možných vysvětlení tohoto efektu je zvýšení míry genového toku, neboť suchozemští hostitelé propojují jednotlivá vodní prostředí, ve kterých se v případě ryze vodních cyklů vytvářejí lokální formy.

5. Závěr

Populační genetika parazitických organismů může za jistých okolností přinést jemnější náhled na evoluční historii jejich hostitelů (Nieberding and Olivieri, 2007). Její studium má však oproti populační genetice volně žijících organismů řadu specifíků, a to jak metodických, tak biologických.

Z metodických specifíků sem patří především statistický aparát používaný pro vzájemné porovnání hostitelských a parazitických struktur a modelování koevoluční historie mezi nimi (Page 1994).

Biologických specifíků, která by se dala pro tak širokou ekologickou strukturu zobecnit, mnoho není, většinu efektů, se kterými se v rámci hostitelsko – parazitických struktur setkáváme, lze vysvětlit některou z vlastností konkrétního parazitického vztahu, jako je životní styl hostitelů, jejich ekologie a způsoby přenosu parazitů. Zásadním faktorem ovlivňujícím koevoluční historii parazitických asociací je i hostitelská specifita, ovlivňující míru koevoluce v dané parazitické asociaci a tudíž i vhodnost daného systému pro studium populační struktury hostitele. Pro účely studia koevoluce lze obecně predikovat, že nejvhodnější jsou ty druhy, které se vyznačují vysokou hostitelskou specifitou, nízkou mobilitou jak hostitelů, tak parazitických stadií a nízkou frekvencí hostitelských přeskoků.

Jedním z důvodů pro řešení tématu této práce bylo seznámení se s metodami a jejich potenciálem při studiu řasníků (Insecta:Strepsiptera) rodu *Stylops*. Zejména z pohledu jejich jednohostitelského životního cyklu a vysoké hostitelské specifity se jeví pro koevoluční studium jako dobrý model.(Júzová, 2009, Júzová a kol.)

6. Použitá literatura

- Abaie, M.R., Foley, D.H., and McManus, D.P. (1995). Electrophoretically-detected allozyme variation reveals only moderate differentiation between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. *Acta Trop.* 60, 101–108.
- Abe'i, T., Gilles, A., Megléc, E., Blanquart, H., Duthoy, S., Costedoat, C., Dubut, V., Pech, N., Castagnone-Sereno, P., Délye, C., et al. (2011). High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 638–644.
- Alacs, E.A., Spencer, P.B.S., Tores, P.J. de, and Krauss, S.L. (2011). Population genetic structure of island and mainland populations of the quokka, *Setonix brachyurus* (Macropodidae): a comparison of AFLP and microsatellite markers. *Conserv. Genet.* 12, 297–309.
- Alexander, B., Wittelsbürger, U., Ramos-Onsins, S.E., and Lercher, M.J. (2014). PopGenome: an efficient swiss army knife for population genomic analyses in R. *Mol. Biol. Evol.* msu136.
- Andras, J.P., and Ebert, D. (2013). A novel approach to parasite population genetics: Experimental infection reveals geographic differentiation, recombination and host-mediated population structure in *Pasteuria ramosa*, a bacterial parasite of *Daphnia*. *Mol. Ecol.* 22, 972–986.
- Avise, J.C. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution* (Springer).
- Baer, C.F., Tripp, D.W., Bjorksten, T.A., and Antolin, M.F. (2004). Phylogeography of a parasitoid wasp (*Diaeretiella rapae*): no evidence of host-associated lineages. *Mol. Ecol.* 13, 1859–1869.
- Betson, M., and Sousa-Figueiredo, J.C. (2013). New insights into the molecular epidemiology and population genetics of *Schistosoma mansoni* in ugandan pre-school children and mothers. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2561.
- Bhargava, A., and Fuentes, F.F. (2010). Mutational dynamics of microsatellites. *Mol. Biotechnol.* 44, 250–266.
- Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H., and Dame, J.B. (1995). Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics* 141, 1007.
- Bouzig, W., Štefka, J., Hypša, V., Lek, S., Scholz, T., Legal, L., Hassine, O.K.B., and Loot, G. (2008). Geography and host specificity: Two forces behind the genetic structure of the freshwater fish parasite *Ligula intestinalis* (Cestoda: Diphyllbothriidae). *Int. J. Parasitol.* 38, 1465–1479.
- Brante, A., Fernández, M., and Viard, F. (2011). Microsatellite evidence for sperm storage and multiple paternity in the marine gastropod *Crepidula coquimbensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 396, 83–88.

- Brooks, D.R. (1981). Hennig's parasitological method: a proposed solution. *Syst. Zool.* 30, 229–249.
- Brooks, D.R. (1990). Parsimony analysis in historical biogeography and coevolution: methodological and theoretical update. *Syst. Zool.* 39, 14–30.
- Busvine, J.R. (1978). Evidence from double infestations for the specific status of human head lice and body lice (Anoplura). *Syst. Entomol.* 3, 1–8.
- Criscione, C.D., and Blouin, M.S. (2004). Life Cycles Shape Parasite Evolution: Comparative Population Genetics of Salmon Trematodes. *Evolution* 58, 198–202.
- Criscione, C.D., and Blouin, M.S. (2005). Effective sizes of macroparasite populations: a conceptual model. *TRENDS Parasitol.* 21, 212–217.
- Dakin, E.E., and Avise, J.C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504–509.
- Davies, C.M., and Webster, J.P. (1999). Host-parasite population genetics: a cross-sectional comparison of *Bulinus globosus* and *Schistosoma haematobium*. *Parasitology* 119 (Pt 3), 295–302.
- Dietrich, M., Lobato, E., Boulinier, T., and McCoy, K.D. (2014). An experimental test of host specialization in a ubiquitous polar ectoparasite: a role for adaptation? *J. Anim. Ecol.* 83, 576–587.
- Doležel, D., Koudela, B., Jirků, M., Hypša, V., Oborník, M., Votýpka, J., Modrý, D., Šlapeta, J.R., and Lukeš, J. (1999). Phylogenetic analysis of *Sarcocystis* spp. of mammals and reptiles supports the coevolution of *Sarcocystis* spp. with their final hosts. *Int. J. Parasitol.* 29, 795–798.
- Dowling, A.P.G. (2002). Testing the accuracy of TreeMap and Brooks parsimony analyses of coevolutionary patterns using artificial associations. *Cladistics* 18, 416–435.
- Dubut, V., Grenier, R., Meglecz, E., Chappaz, R., Costedoat, C., Danancher, D., Descloux, S., Malausa, T., Martin, J.-F., Andersen, N.M., et al. (2010). Development of 55 novel polymorphic microsatellite loci for the critically endangered *Zingel asper* L. (Actinopterygii: Perciformes: Percidae) and cross-species amplification in five other percids. *Eur. J. Wildl. Res.* 56, 931–938.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.* 5, 435–445.
- Esch, G.W., Kennedy, C.R., Bush, A.O., and Aho, J.M. (1988). Patterns in helminth communities in freshwater fish in Great Britain: alternative strategies for colonization. *Parasitology* 96, 519–532.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., and Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.

- Ferreira, V.S., Aguiar, C.M.L., Oliveira, E.J.F., Costa, M.A., Santos, G.M.M., and Silva, J.G. (2013). Mitochondrial DNA variability in populations of *Centris aenea* (Hymenoptera, Apidae), a crop-pollinating bee in Brazil. *Genet. Mol. Res.* *12*, 830–837.
- Grandjean, F., Vrålstad, T., Diéguez-Uribeondo, J., Jelić, M., Mangombi, J., Delaunay, C., Filipová, L., Rezinciuc, S., Kozubíková-Balcarová, E., Guyonnet, D., et al. (2014). Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. *Vet. Microbiol.* *170*, 317–324.
- Hennig, W. (1966). *Phylogenetic Systematics* (University of Illinois Press).
- Hert, D.G., Fredlake, C.P., and Barron, A.E. (2008). Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: a comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis* *29*, 4618–4626.
- Hugot, J.P. (1999). Primates and their pinworm parasites: the Cameron hypothesis revisited. *Syst. Biol.* *48*, 523–546.
- Hugot, J.P. (2003). New evidence for hystricognath rodent monophyly from the phylogeny of their pinworms. *Tangl. Trees Phylogeny Cospeciation Coevol.* 144–173.
- Huyse, T., and Volckaert, F.A.M. (2005). Comparing host and parasite phylogenies: Gyrodactylus flatworms jumping from goby to goby. *Syst. Biol.* *54*, 710–718.
- Jarne, P., and Lagoda, P.J.L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* *11*, 424–429.
- Jossart, Q., David, B., De Bruyn, C., De Ridder, C., Rigaud, T., Wattier, R.A., and others (2013). No evidence of host specialization in a parasitic pea-crab exploiting two echinoid hosts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *475*, 167–176.
- Jůzová, K. (2009). *Hostitelská specializace u řasníků (Strepsiptera)* (Praha: Přírodovědecká fakulta UK).
- Jůzová, K., Straka, J., and Nakase, Y. (in prep.): Host specialisation and species diversity in the genus *Stylops* (Strepsiptera: Stylopidae) revealed by molecular phylogenetic analysis.
- Kvičerová, J., and Hypša, V. (2013). Host-parasite incongruences in rodent eimeria suggest significant role of adaptation rather than cophylogeny in maintenance of host specificity. *PloS One* *8*, e63601.
- Leo, N.P., Campbell, N.J.H., Yang, X., Mumcuoglu, K., and Barker, S.C. (2002). Evidence from mitochondrial DNA that head lice and body lice of humans (Phthiraptera: Pediculidae) are conspecific. *J. Med. Entomol.* *39*, 662–666.
- López-Uribe, M.M., Santiago, C.K., Bogdanowicz, S.M., and Danforth, B.N. (2013). Discovery and characterization of microsatellites for the solitary bee *Colletes inaequalis* using Sanger and 454 pyrosequencing. *Apidologie* *44*, 163–172.
- Lu, D.-B., Wang, T.-P., Rudge, J.W., Donnelly, C.A., Fang, G.-R., and Webster, J.P. (2009). Evolution in a multi-host parasite: Chronobiological circadian rhythm and population genetics

- of *Schistosoma japonicum* cercariae indicates contrasting definitive host reservoirs by habitat. *Int. J. Parasitol.* *39*, 1581–1588.
- Lynch, M., and Milligan, B.G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* *3*, 91–99.
- McCoy, K.D., Boulinier, T., Tirard, C., and Michalakis, Y. (2003). Host-Dependent Genetic Structure of Parasite Populations: Differential Dispersal of Seabird Tick Host Races. *Evolution* *57*, 288–296.
- Meirmans, P.G., and Hedrick, P.W. (2011). Assessing population structure: FST and related measures. *Mol. Ecol. Resour.* *11*, 5–18.
- Merkle, D., Middendorf, M., and Wieseke, N. (2010). A parameter-adaptive dynamic programming approach for inferring cophylogenies. *BMC Bioinformatics* *11*, S60.
- Minárik, G., and Bazsalovicsová, E. (2014). Development and characterization of multiplex panels of polymorphic microsatellite loci in giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae), using next-generation sequencing approach. *Mol. Biochem. Parasitol.*
- Morgante, M., and Olivieri, A. m. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* *3*, 175–182.
- Mueller, U.G., and Wolfenbarger, L.L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* *14*, 389–394.
- Mulvey, M., Aho, J.M., Lydeard, C., Leberg, P.L., and Smith, M.H. (1991). Comparative population genetic structure of a parasite (*Fascioloides magna*) and its definitive host. *Evolution* 1628–1640.
- Mundt, C.C., and McDonald, B.A. (2001). Using restriction fragment length polymorphisms to assess temporal variation and estimate the number of ascospores that initiate epidemics in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* *91*, 1011–1017.
- Nadler, S.A. (1995). Microevolution and the genetic structure of parasite populations. *J. Parasitol.* 395–403.
- Nichols, R. (2001). Gene trees and species trees are not the same. *Trends Ecol. Evol.* *16*, 358–364.
- Nieberding, C.M., and Olivieri, I. (2007). Parasites: proxies for host genealogy and ecology? *Trends Ecol. Evol.* *22*, 156–165.
- Nieberding, C., Morand, S., Libois, R., and Michaux, J.R. (2004). A parasite reveals cryptic phylogeographic history of its host. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *271*, 2559–2568.
- Oshaghi, M.A., Shemshad, K., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Pedram, M., Vatandoost, H., Abaie, M.R., Akbarzadeh, K., and Mohtarami, F. (2007). Genetic structure of the malaria vector *Anopheles superpictus* in Iran using mitochondrial cytochrome oxidase (COI and COII) and morphologic markers: A new species complex? *Acta Trop.* *101*, 241–248.

- Page, R.D. (1988). Quantitative cladistic biogeography: constructing and comparing area cladograms. *Syst. Biol.* 37, 254–270.
- Page, R.D. (1994a). Parallel phylogenies: reconstructing the history of host-parasite assemblages. *Cladistics* 10, 155–173.
- Page, R.D.M. (1994b). Parallel Phylogenies: Reconstructing the History of Host-Parasite Assemblages. *Cladistics* 10, 155–173.
- Page, R.D.M., and Charleston, M.A. (1995). TreeMap program. Availab. [Http://taxonomy.Zool.Gla Ac Ukrodtreemap Html](http://taxonomy.zool.gla.ac.uk/krodtreemap.html).
- Page, R.D.M., Price, R.D., and Hellenthal, R.A. (1995). Phylogeny of *Geomydoecus* and *Thomomydoecus* pocket gopher lice (Phthiraptera: Trichodectidae) inferred from cladistic analysis of adult and first instar morphology. *Syst. Entomol.* 20, 129–143.
- Paterson, A.M., Palma, R.L., and Gray, R.D. (2003). Drowning on arrival, missing the boat, and x-events: How likely are sorting events. *Tangl. Trees Phylogeny Cospeciation Coevol.* 287–309.
- Perez, T., Albornoz, J., and Dominguez, A. (1998). An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Mol. Ecol.* 7, 1347–1357.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Queller, D.C., Strassmann, J.E., and Hughes, C.R. (1993). Microsatellites and kinship. *Trends Ecol. Evol.* 8, 285–288.
- Reed, D.L., Smith, V.S., Hammond, S.L., Rogers, A.R., and Clayton, D.H. (2004). Genetic analysis of lice supports direct contact between modern and archaic humans. *PLoS Biol.* 2, e340.
- Richard, G., and Paques, F. (2000). Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Rep.* 1, 122–126.
- Ronquist, F. (2002). Parsimony analysis of coevolving species associations.
- Ronquist, F. (2008). TreeFitter 1.3 computer program and manual available by anonymous FTP from Uppsala University.
- Van Schaik, J., Kerth, G., Bruyndonckx, N., and Christe, P. (2014). The effect of host social system on parasite population genetic structure: comparative population genetics of two ectoparasitic mites and their bat hosts. *BMC Evol. Biol.* 14, 18.
- Schmid-Hempel, P. (2011). *Evolutionary parasitology: the integrated study of infections, immunology, ecology, and genetics* (Oxford University Press New York).
- Schneider, S., Roessli, D., and Excoffier, L. (2000). Arlequin: a software for population genetics data analysis. *User Man. Ver 2*, 2496–2497.

- Siddall, M.E., and Perkins, S.L. (2003). Brooks Parsimony Analysis: a valiant failure. *Cladistics* 19, 554–564.
- Siva, N. (2008). 1000 Genomes project. *Nat. Biotechnol.* 26, 256–256.
- Small, S., Ramesh, A., Bun, K., Reimer, L., Thomsen, E., Baea, M., Bockarie, M.J., Siba, P., Kazura, J.W., Tisch, D.J., et al. (2013). Population genetics of the filarial worm *Wuchereria bancrofti* in a post-treatment region of Papua New Guinea: insights into diversity and life history. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2308.
- Smee, M.R., Pauchet, Y., Wilkinson, P., Wee, B., Singer, M.C., French-Constant, R.H., Hodgson, D.J., and Mikheyev, A.S. (2013). Microsatellites for the marsh fritillary butterfly: de novo transcriptome sequencing, and a comparison with amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *PLoS ONE* 8, e54721.
- Solano, P., Duvallet, G., Dumas, V., Cuisance, D., and Cuny, G. (1997). Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Acta Trop.* 65, 175–180.
- Štefka, J., and Hypša, V. (2009). Interplay of host specificity and biogeography in the population structure of a cosmopolitan endoparasite: microsatellite study of *Ligula intestinalis* (Cestoda). *Mol. Ecol.* 18, 1187–1206.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* 15, 199–203.
- Tóth, G., Gáspári, Z., and Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* 10, 967–981.
- Turčeková, L., Šnábel, V., D'Amelio, S., Busi, M., and Dubinský, P. (2003). Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Trop.* 85, 223–229.
- Valade, R., Kenis, M., Hernandez-Lopez, A., Augustin, S., Mari Mena, N., Magnoux, E., Rougerie, R., Lakatos, F., Roques, A., and Lopez-Vaamonde, C. (2009). Mitochondrial and microsatellite DNA markers reveal a Balkan origin for the highly invasive horse-chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* (Lepidoptera, Gracillariidae). *Mol. Ecol.* 18, 3458–3470.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., and Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407–4414.
- Wahlund, S. (1928). Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* 11, 65–106.
- Weigel, D., and Mott, R. (2009). The 1001 genomes project for *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol* 10, 107.
- Weir, B.S., and Hill, W.G. (2002). Estimating F-statistics. *Annu. Rev. Genet.* 36, 721–750.
- Whiteman, N.K., Kimball, R.T., and Parker, P.G. (2007a). Co-phylogeography and comparative population genetics of the threatened Galápagos hawk and three ectoparasite

species: ecology shapes population histories within parasite communities. *Mol. Ecol.* *16*, 4759–4773.

Whiteman, N.K., Kimball, R.T., and Parker, P.G. (2007b). Co-phylogeography and comparative population genetics of the threatened Galápagos hawk and three ectoparasite species: ecology shapes population histories within parasite communities. *Mol. Ecol.* *16*, 4759–4773.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* *18*, 6531–6535.

Wolf, C., Rentsch, J., and Hübner, P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chem.* *47*, 1350–1355.

Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 395–420.

Zikmundová, J., Georgieva, S., Faltýnková, A., Soldánová, M., and Kostadinova, A. (2014). Species diversity of Plagiorchis Lühe, 1899 (Digenea: Plagiorchiidae) in lymnaeid snails from freshwater ecosystems in central Europe revealed by molecules and morphology. *Syst. Parasitol.* *88*, 37–54.