



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA, KATEDRA EKOLOGIE

a



UNIVERSITÉ DE POITIERS, FRANCE
FACULTÉ DES SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUÉES

Doktorský studijní program (pod dvojím vedením)

Autoreferát disertační práce

**Genetická variabilita severoamerických druhů raků introdukovaných do
Evropy a promořenost jejich populací původcem račího moru**

LENKA FILIPOVÁ

Český školitel: Adam Petrusek
Francouzský školitel: Frédéric Grandjean

Praha, 2012



CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE, FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF ECOLOGY

and



UNIVERSITY OF POITIERS, FRANCE
FACULTY OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Ph.D. study program (joint degree)

Summary of the Ph.D. thesis

Genetic variation in North American crayfish species introduced to Europe and the prevalence of the crayfish plague pathogen in their populations

LENKA FILIPOVÁ

Czech supervisor: Adam Petrusek
French supervisor: Frédéric Grandjean

Prague, 2012

Abstrakt

Biologické invaze korýšů představují vážnou hrozbu pro původní druhy v Evropě. Ve své dizertační práci jsem se zaměřila na nepůvodní sladkovodní raky introdukované do Evropy, a jejich parazita *Aphanomyces astaci*, původce račího moru. Má práce zahrnuje čtyři publikované prvoautorské články (**kapitoly I, II, IV a V**), dva prvoautorské rukopisy (**kapitoly III a VI**) a jeden článek, jehož jsem spoluautorkou (**kapitola VII**).

První část (**kapitoly I-V**) je zaměřena na genetickou variabilitu severoamerických raků introdukovaných do Evropy. Ukázali jsme, že genetická variabilita dvou raků, kteří jsou oba úspěšnými invazními druhy v Evropě, se výrazně liší a odráží jejich odlišný způsob kolonizace kontinentu. Rak pruhovaný, *Orconectes limosus*, byl pravděpodobně do Evropy introdukován jen jednou, kdy bylo dovezeno 90 jedinců. Variabilita na úrovni mitochondriální DNA je u raka pruhovaného v Evropě mnohem nižší než v Severní Americe (**kapitola I**), ačkoli určitá míra variability byla zaznamenána na jaderných markerech v jeho středoevropských populacích (**kapitola II**). Opačným příkladem je rak signální, *Pacifastacus leniusculus*, který byl do Evropy introdukován vícekrát, mnoha jedinci. Jeho geneticky vysoce diverzifikované evropské populace patří jedinému poddruhu *P. l. leniusculus* (**kapitola III**). Ten je jedním ze tří poddruhů, které jsou známé ze severní Ameriky. Objev nových linií mitochondriální DNA v severní Americe ovšem ukazuje, že rozdělení těchto poddruhů by mělo být přezkoumáno a bude proto vhodné dále studovat raka signálního v jeho americkém areálu.

Kapitola V ukazuje, že pro přesné určení nově objevených nepůvodních druhů raků v Evropě je vhodná metoda genetického „čárového kódu“ (DNA barcoding). Ověřili jsme identifikaci (určenou na základě morfologie) u některých z těchto invazních raků (*Orconectes juvenilis*, druhový komplex raka *O. virilis*, dále *Procambarus fallax*, a komplex *P. acutus/zonangulus*). U studovaných jedinců komplexu kryptických druhů raka *Orconectes virilis* (**kapitola IV**), u raka *O. immunis* a u komplexu *P. acutus/zonangulus* jsme našli překvapivě vysokou míru genetické variability. Porovnání variability nepůvodních raků v Evropě s daty ze severní Ameriky nám tedy může pomoci odhalit důležité informace o celkové variabilitě v rámci těchto taxonů.

Kapitoly VI a VII jsou věnovány detekci račího moru u nepůvodních raků v Evropě. Původce onemocnění, oomycet *Aphanomyces astaci*, se poprvé objevil v Evropě v roce 1859 a způsobil masový úbytek populací původních druhů raků. Severoameričtí raci přítomní v Evropě mohou tento patogen přenášet a nakazit jím původní evropské druhy; stále tak způsobují úhyny těchto citlivých populací. Informace o promořenosti populací invazních druhů račím morem jsou proto nezbytné, abychom zjistili, jaké nebezpečí tyto populace představují pro původní raky. **Kapitola VI** přináší údaje o promořenosti francouzských populací raka signálního *P. leniusculus* račím morem, které byly získány kvantitativní metodou TaqMan MGB real-time PCR. Potvrdili jsme, že tento druh je ve Francii přenašečem račího moru a doufáme, že naše data přispějí k účinné ochraně původního raka bělonohého, *Austropotamobius pallipes*, v této zemi. V **kapitole VII** jsme použili stejnou metodu detekce *A. astaci*, abychom otestovali vzorky invazních raků ze střední Evropy, které byly dříve zpracovány jinou molekulární metodou. Vysoká citlivost real-time PCR nám umožnila odhalit další nakažené jedince, u kterých nebyla nákaza dříve prokázána. Potvrdili jsme tak, že tato metoda je velmi vhodná pro detekci původce račího moru, přestože je vhodné použít kombinaci více molekulárních metod.

Abstract (in English)

Biological invasions by crustaceans represent a serious threat for native species in Europe. In my thesis I focus on non-indigenous freshwater crayfish introduced to Europe and their parasite *Aphanomyces astaci*, the pathogen of the crayfish plague. The thesis consists of four already published first-author papers (**chapters I, II, IV and V**), two first-author manuscripts (**chapters III and VI**), and one paper which I co-authored (**chapter VII**).

The first part (**chapters I-V**) focuses on genetic variation in North American crayfish introduced to Europe. We showed that in two crayfish species, both successful invaders in Europe, genetic variation differs significantly, reflecting their different colonization histories on the continent. The spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* was likely introduced to Europe just once, in small numbers (90 individuals). Variation at the mitochondrial DNA (mtDNA) level in the spiny-cheek crayfish in Europe is much lower compared to North America (**chapter I**), although some variation was revealed in nuclear markers in its Central European populations (**chapter II**). In contrast, the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* was introduced to Europe several times, in large numbers. Its European populations are highly diverse genetically and belong to a single subspecies, *P. l. leniusculus*, one of the three subspecies recognised in North America (**chapter III**). The discovery of new mtDNA lineages in North America nevertheless showed that the division into subspecies should be revised and more studies from its American range are needed.

Chapter V showed the utility of DNA barcoding, in combination with morphological examinations, for accurate identification of newly established non-indigenous crayfish in Europe. We verified morphological identification of some of these invaders (*Orconectes juvenilis*, *O. virilis* complex, *Procambarus fallax*, *P. acutus/zonangulus* complex). Moreover, in studied individuals from the *Orconectes virilis* cryptic species complex (**chapter IV**), *O. immunis*, and the *Procambarus acutus/zonangulus* complex surprisingly high variation was found (**chapter V**). Comparing the patterns of variation in non-indigenous crayfish in Europe with data from their American range may therefore reveal important information on overall variation within these taxa.

Chapters VI and VII are dedicated to the detection of the crayfish plague pathogen in non-indigenous crayfish in Europe. The oomycete *Aphanomyces astaci* first appeared in Europe in 1859 and has substantially reduced native crayfish populations. North American crayfish established in Europe may carry the pathogen and transmit it to indigenous European crayfish, causing mortalities of these susceptible populations that still occur today. Information on *A. astaci* prevalence in invasive crayfish populations is therefore important for evaluation of the threat they represent to native species. **Chapter VI** provides information on the crayfish plague prevalence in French populations of the signal crayfish *P. leniusculus* obtained by a quantitative TaqMan MGB real-time PCR. We confirm that the species serves as a reservoir of the pathogen in France and we hope our data will contribute to the efficient protection of the native white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* in the country. In **chapter VII**, the same method of *A. astaci* detection was used to test samples of invasive crayfish from Central Europe which were previously analysed by another molecular method. The high sensitivity of the real-time PCR allowed discovery of infected individuals in populations where the presence of *A. astaci* was not reported before. We therefore confirm that the method is suitable for routine detection of the crayfish plague pathogen, although a combination of molecular methods is recommended.

KAPITOLY DISERTAČNÍ PRÁCE / CHAPTERS OF THE THESIS

Část první / Part 1: Genetic variation in crayfish invaders

CHAPTER I

Filipová L., Lieb D.A., Grandjean F. and Petrusek A., 2011. Haplotype variation in the spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus*: colonization of Europe and genetic diversity of native stocks. *Journal of the North American Benthological Society*, 30: 871-881.

CHAPTER II

Filipová L., Kozubíková E. and Petrusek A., 2009. Allozyme variation in Czech populations of the invasive spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* (Cambaridae). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 394-395, art. no. 10.

CHAPTER III

Filipová L., Grandjean F., Kozubíková E., and Petrusek A. Genetic variation of invasive European populations of signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Unpublished manuscript, first draft.

CHAPTER IV

Filipová L., Holdich D.M., Lesobre J., Grandjean F. and Petrusek A., 2010. Cryptic diversity within the invasive virile crayfish *Orconectes virilis* (Hagen, 1870) species complex: new lineages recorded in both native and introduced ranges. *Biological Invasions*, 12: 983-989.

CHAPTER V

Filipová L., Grandjean F., Chucholl C., Soes D.M. and Petrusek A., 2011. Identification of exotic North American crayfish in Europe by DNA barcoding. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 401: art. no. 11.

Část druhá / Part 2: Crayfish plague

CHAPTER VI

Filipová L., Petrusek A., Matasová K., Delaunay C., Grandjean F. Prevalence of the crayfish plague *Aphanomyces astaci* in populations of signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in France. Unpublished manuscript, first draft.

Příloha / Appendix

CHAPTER VII

Kozubíková E., Vrålstad T., **Filipová L.** and Petrusek A., 2011. Re-examination of the prevalence of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish populations in Central Europe by TaqMan MGB real-time PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 97: 113-125.

Úvod

Raci jsou důležitou součástí sladkovodních ekosystémů. Z celého světa je jich známo přes 640 druhů, většina ze Severní Ameriky a Austrálie (Crandall a Buhay 2008). V Evropě se vyskytuje několik původních druhů raků, z nichž některé byly dříve hojně loveny, především za účelem konzumace. V roce 1859 se však na tomto kontinentě poprvé objevil parazit *Aphanomyces astaci*, původce račího moru patřící mezi oomycety, který výrazně zdecimoval populace původních raků (Alderman 1996, Souty-Grosset a kol. 2006). Při snaze o nahrazení těchto populací byli do Evropy dovezeni nepůvodní raci, pocházející převážně ze Severní Ameriky. Severoamerické druhy jsou však vůči této nemoci vysoce odolní, mohou jejího původce přenášet a nakazit jím evropské raky, čímž dále přispívají k redukci jejich populací.

Tři druhy, které byly do Evropy záměrně dovezeny, jsou zde nyní hojně rozšířené: rak pruhovaný *Orconectes limosus* (zřejmě jediná introdukce 90 jedinců v roce 1890), rak signální *Pacifastacus leniusculus* (poprvé introdukovan v roce 1959, dovezeno bylo více než 60 000 jedinců) a rak červený *Procambarus clarkii* (od roku 1973 importováno kolem 40 000 jedinců). Od poloviny 90. let pak bylo do Evropy vysazeno několik dalších druhů, které se sem dostaly zřejmě převážně s akvarijními chovy (Holdich a kol. 2009, Souty-Grosset a kol. 2006). Způsob introdukce a následná kolonizace evropských vod se u introdukovaných druhů raků liší a jsou proto zajímavým modelem pro studium biologických invazí v Evropě.

Genetická variabilita nepůvodních druhů raků v Evropě

Práce zabývající se studiem biologických invazí jsou často zaměřeny například na šíření introdukovaných druhů a jejich dopad na místní prostředí a organismy. Biologické invaze jsou však zajímavé také z pohledu zachování či ztráty genetické variability u těchto druhů během jejich introdukce na nová území.

Při vysazení malého počtu jedinců může v některých případech dojít ke značnému snížení genetické variability introdukovaných jedinců následkem tzv. bottleneck efektu. Nízká variabilita pak může mít negativní dopady na schopnost těchto populací se v novém prostředí uchytit. Nižší variabilita introdukovaných populací v porovnání s populacemi v původním areálu daného druhu však není pravidlem, neboť na zachování variability může mít vliv například tlak propagulí či mnohonásobné introdukce. Snížená variabilita také nemusí vždy snižovat invazní potenciál druhu (Roman a Darling 2007). V určitých případech, například pokud jsou populace druhu v původním areálu vysoce strukturované, může být naopak variabilita introdukované populace díky mnohonásobným introdukcím vyšší, než je tomu u populací v původním areálu (Sakai a kol. 2001).

V první části mé disertační práce mě proto zajímalo, jaká je genetická variabilita u raků, kteří jsou velmi úspěšnými invazními druhy, avšak výrazně se liší jejich způsob introdukce. Tak je tomu například u raka pruhovaného a raka signálního.

Podle literárních údajů byl rak pruhovaný, *Orconectes limosus*, do Evropy dovezen jen jednou v malém počtu jedinců. Úspěch druhu a rychlé šíření na tomto kontinentě jsou proto překvapivé v porovnání s uváděným způsobem jeho introdukce. Je tedy otázkou, zda byl tento druh do Evropy dovezen jen jednou, nebo došlo k dalším nezaznamenaným introdukcím. V takovém případě, především pokud by introdukce byly z různých zdrojových populací, by mohlo dojít k přenosu dostatečné variability z původního areálu druhu.

U raka signálního, *Pacifastacus leniusculus*, je naopak známo, že došlo k více introdukcím

mnoha jedinců. Ze Severní Ameriky jsou známy tři poddruhy tohoto raka, *Pacifastacus leniusculus leniusculus*, *P. l. trowbridgii* a *P. l. klamathensis*, které nejsou na základě morfologie snadno odlišitelné (Miller 1960). Není ovšem jasné, zda byl do Evropy introdukován jeden či více těchto poddruhů. Studie evropských populací pomocí jaderných a mitochondriálních markerů (Agerberg a Jansson 1995, Grandjean a Souty-Grosset 1997) naznačovaly, že by se v Evropě mohlo vyskytovat více poddruhů. Takový závěr by mohl být podpořen faktem, že většina jedinců introdukovaných do Evropy pocházela z jezera Tahoe v Kalifornii, kde se zřejmě nacházejí nejméně dva poddruhy raka signálního. Hobbs (1989) však uvádí, že byl do Evropy introdukován pouze *P. l. leniusculus*. Vzhledem k tomu, že Sonntag (2006) rozlišila na úrovni mitochondriální DNA (mtDNA) tři linie raka signálního ze Severní Ameriky, které by měly odpovídat třem známým poddruhům, bylo možno předpokládat, že sekvenace vhodného mitochondriálního genu může odhalit, zda evropští jedinci patří k jednomu či více poddruhům (kapitola III). Jak se však nedávno ukázalo, variabilita raka signálního může být vyšší, než se předpokládalo, neboť byly v rámci jeho populací v Americe nalezeny další divergentní mitochondriální linie (E. Larson, osobní sdělení; kapitola III).

Systematické zařazení dalších severoamerických raků, kteří byli nedávno introdukováni do Evropy, je často nejednoznačné, a jejich určení na základě morfologie se tak může stát problematickým. Důvodem může být existence kryptických druhů, či nedostatek specialistů s dostatečnými zkušenostmi s určováním raků, jindy jsou důvodem nedostatečně vyvinuté či chybějící morfologické znaky u zkoumaných jedinců. V těchto případech je tedy vhodné použít další přístupy, například identifikaci pomocí molekulárních metod, z nichž my jsme využívali tzv. DNA barcoding (kapitola V). V Evropě již v minulosti došlo k nesprávné identifikaci nově introdukovaných raků, kdy byli jedinci nalezení v severovýchodní části Francie označeni za invazní druh *Orconectes rusticus* (Daudey 2006). Později však byli raci z této populace přeurčeni jako příbuzný druh, *Orconectes juvenilis* (Chucholl a Daudey 2008). Rychlá a spolehlivá identifikace nově objevených raků v Evropě je proto nezbytná, protože jejich nesprávné určení může mít zásadní negativní dopad na vyhodnocení rizika, které představují, a na vytvoření strategií, jak s těmito raky v budoucnu zacházet. Problémy s identifikací se vyskytly také u jedinců raků z Velké Británie, kteří byli nejdříve určení jako *Orconectes limosus* a následně jako *O. virilis*. V Americe rak *O. virilis* představuje komplex kryptických druhů, v kapitole IV jsme se proto podrobně věnovali taxonomickému zařazení britských jedinců, a také dalších jedinců *O. virilis* z Nizozemí.

Račí mor

Druhým tématem mé disertační práce je detekce původce račího moru v populacích invazních raků v Evropě. Přestože se parazit *Aphanomyces astaci* poprvé objevil v Evropě již ve druhé polovině 19. století, je stále na tomto kontinentě přítomen. Severoameričtí raci navíc dál napomáhají jeho šíření a přenosu na citlivé evropské druhy, které pak masově hynou. V posledních několika letech se podařilo vyvinout molekulární metody, které umožňují detekovat *A. astaci* u jedinců, u nichž je množství DNA patogenu často poměrně nízké. Je tedy možné detekovat původce račího moru i u bezpříznakových přenašečů a zjistit promořenost jejich populací, případně kvantifikovat množství DNA patogenu přítomného v jednotlivých vzorcích. Metoda real-time PCR (podle Vrålstad a kol. 2009) se ukázala být v současnosti nejvhodnější metodou pro detekci račího moru u nepůvodních raků (Tuffs a Oidtmann 2011). V porovnání se semi-nested PCR (podle Oidtmann a kol. 2006), která byla použita v několika studiích na katedře ekologie PřF UK, je tato

metoda také výrazně citlivější (kapitola VII).

Ve Francii je ohroženým druhem především původní rak bělonohý *Austropotamobius pallipes*, jehož populace v posledních letech výrazně ubývají. Jedním z důvodů jsou právě úhyny na následky račího moru (Bramard a kol. 2006). V několika případech byly masové úhyny raka bělonohého spojovány s přítomností raka signálního a pravděpodobným přenosem *A. astaci* z tohoto invazního druhu (Bramard a kol. 2006, Collas a Salek 2002, Neveu 2002). Rak signální obývá podobný habitat jako rak bělonohý, mezi těmito druhy tedy může často dojít ke kontaktu (Collas a kol. 2007). Je proto vhodné dozvědět se více o promořenosti populací raka signálního, aby bylo možné stanovit, které jeho populace jsou nejnakaženější a mohou tak představovat vyšší riziko přenosu račího moru na původní raky. Na toto téma jsem se zaměřila v kapitole VI.

Cíle práce

Část první

Kapitola I Studovali jsme genetickou variabilitu evropských a amerických jedinců raka pruhovaného *Orconectes limosus*, abychom otestovali, zda mohl být tento druh do Evropy introdukován jen jednou, a pokusili jsme se také identifikovat původ dovezených jedinců. Analýza jedinců z původního areálu nám také umožnila vyhodnotit, do jaké míry by mohla ztráta místních ohrožených populací ovlivnit celkovou vnitrodruhovou variabilitu tohoto druhu.

Kapitola II V této kapitole jsme zkoumali vybrané české populace raka pruhovaného pomocí alozymové elektroforézy, abychom vyhodnotili míru variability v rámci těchto populací i mezi nimi. Pokusili jsme se také zjistit, zda tyto výsledky korelují se způsobem invaze tohoto druhu na naše území.

Kapitola III Analyzovali jsme genetickou variabilitu (na úrovni mitochondriální DNA) evropských populací dalšího invazního druhu, raka signálního *Pacifastacus leniusculus*, a výsledky byly následně porovnány s daty ze Severní Ameriky. Cílem bylo zjistit, zda se v Evropě vyskytuje jeden či více jeho poddruhů, které jsou v současnosti rozeznávány. Chtěli jsme také zjistit, jaká je variabilita v introdukovaných populacích.

Kapitola IV Studovali jsme jedince z relativně nedávno objevených britských a nizozemských populací nepůvodních raků, kteří byli určeni jako rak *Orconectes virilis*, abychom zjistili, jaká je jejich pozice v rámci linií druhového komplexu raka *O. virilis*, které jsou známé ze Severní Ameriky.

Kapitola V V této kapitole jsme se zaměřili na relativně nedávno nalezené nepůvodní druhy raků v Evropě a u některých z nich jsme se pokusili ověřit, zda byli na základě morfologických znaků správně identifikováni. Chtěli jsme také poukázat na to, že metoda DNA barcoding je vhodným nástrojem při určování těchto invazních druhů.

Část druhá

Kapitola VI Zkoumali jsme, jaká je míra promořenosti francouzských populací invazního raka signálního račím morem, a které populace tohoto druhu jsou z hlediska přenosu *A. astaci* nebezpečné pro původní druhy ve Francii. Otestovali jsme také několik jedinců jiných, v této zemi nepůvodních druhů.

Kapitola VII Analýzou vzorků jsem přispěla ke studii, jejímž cílem bylo přezkoumat pomocí metody real-time PCR výsledky promořenosti střeoevropských populací raka pruhovaného a raka signálního račím morem, které byly dříve analyzovány pomocí semi-nested PCR (Kozubíková a kol. 2009, 2010).

Materiál a metodika

Raci byli loveni ručně, při potápění, či pomocí elektrického proudu, a jejich končetiny/klepeta či celí jedinci byli dále uchováni v 96% etanolu.

Pro studium genetické variability nepůvodních druhů raků v Evropě byly využity tkáň z jedné končetiny či klepeta. Z tohoto materiálu byla vyizolována celková DNA, následovala purifikace a příprava na sekvenaci. Pomocí amplifikace univerzálních LCO 1490 a HCO 2198 primerů (Folmer a kol. 1994) během PCR pak byly získány sekvence podjednotky I cytochrom *c* oxidázy (COI) mitochondriální DNA u analyzovaných jedinců. Výsledky pak byly zpracovány převážně pomocí programu MEGA (Tamura a kol. 2007, 2011).

Pro analýzu promořenosti nepůvodních raků račím morem byli získáni celí jedinci a uloženi v 96% etanolu. Z každého jedince pak byla sterilními nástroji vypitvána a dále zpracovávána kutikula z jedné poloviny abdomenu (kapitola VI a VII), případně také jeden uropod (kapitola VI a někteří jedinci v kapitole VII). Přestože tím dochází k zachycení jen určité části DNA původce račího moru a reálná promořenost může být vyšší než naměřené hodnoty, uropod byl vyhodnocen u raka signálního jako část těla, kde bylo zachyceno nejvíce DNA *Aphanomyces astaci* v porovnání s dalšími částmi těla (Vrålstad a kol. 2011). Značná část jedinců nakažených račím morem by tedy touto metodou měla být přesto zachycena. Vypitvaný materiál byl následně drcen a byla z něj izolována DNA. Přítomnost DNA patogenu v izolátech pak byla testována pomocí TaqMan MGB real-time PCR (Vrålstad a kol. 2009).

Výsledky a diskuse

Genetická variabilita nepůvodních druhů raků v Evropě

Genetická variabilita v evropských populacích raka *Orconectes limosus* byla výrazně nižší než variabilita tohoto druhu v Severní Americe (kapitola I). V jeho evropských populacích byl nalezen jeden dominantní haplotyp COI, pouze u čtyř jedinců z jedné populace (z celkového počtu 91 testovaných jedinců z 25 populací) jsme pak detekovali druhý haplotyp. Americké populace byly naopak značně variabilní, a distribuce haplotypů mezi populacemi a oblastmi se často podstatně lišila. Tyto výsledky podporují domněnku, že byl *O. limosus* do Evropy introdukován pouze jednou, a to malým počtem jedinců. Určení zdrojové populace evropských raků pruhovaných však nebylo na základě našich dat možné. V Severní Americe se pak nejvíce haplotypů COI vyskytovalo v oblasti jihovýchodní Pensylvánie a severního Marylandu. Diverzita haplotypů v jiných částech areálu, převážně tam, kde je druh nepůvodní, pak byla výrazně nižší.

Analýza českých populací raka pruhovaného odhalila, že variabilita alozymových markerů je poměrně vysoká (kapitola II). I přes počáteční bottleneck při introdukci tak zřejmě byla u raka pruhovaného zachována dostatečná variabilita (kapitola II), jak potvrzuje i analýza mikrosatelitových markerů ve třech středoevropských populacích (Hulák a kol. 2010). Vysoká invazní schopnost a úspěšné šíření tohoto druhu po Evropě mohlo být také usnadněno jeho reprodukční strategií. Nedávno totiž bylo zjištěno, že rak pruhovaný je schopen fakultativního partenogenetického rozmnožování (Buřič a kol. 2011). Bude ovšem zapotřebí dalších studií, aby byla tato domněnka ověřena.

Analýza evropských populací raka signálního a následné porovnání s referenčními

sekvencemi tří poddruhů ze Severní Ameriky (Sonntag 2006) ukázaly, že v testovaných vzorcích z Evropy se nachází zástupci pouze jednoho poddruhu, *P. l. leniusculus* (kapitola III). V Evropě bylo nalezeno 27 haplotypů, které však nevykazovaly žádné výrazné tendence ve svém geografickém rozmístění, což odpovídá častým sekundárním introdukcím raků signálních na tomto kontinentu. Analýza několika populací ze Severní Ameriky však odhalila přítomnost další divergentní linie v rámci raka signálního, jeho diverzita tak může být vyšší než se předpokládalo (kapitola III), což potvrzují také zatím nepublikované výsledky E. Larsona (os. sdělení).

Pomocí metody DNA barcoding se pak podařilo potvrdit identifikaci jedinců z relativně nedávno objevených populací nepůvodních raků v Evropě, kteří byli dříve určeni na základě morfologie. Těmito raky byli *Orconectes juvenilis* a *O. immunis* z východní Francie, *O. virilis* z Velké Británie a Nizozemí, *Procambarus fallax* z Německa a *P. acutus/zonangulus* z Nizozemí (kapitola V). U raků *O. virilis*, *O. immunis* a *Procambarus acutus/zonangulus* byla zaznamenána překvapivě vysoká míra variability. U jednoho z těchto raků, u raka *Orconectes virilis* odhalila analýza jeho jedinců z Evropy a Severní Ameriky přítomnost dvou odlišných linií (jedna z Evropy a druhá z Iowy, USA). Tyto linie nebyly dosud v rámci tohoto komplexu kryptických druhů zaznamenány, což potvrzuje velkou variabilitu tohoto komplexu kryptických druhů. Přestože naše data neumožňují určit původ jedinců *O. virilis* nalezených v Evropě (ve Velké Británii a v Nizozemí), nedávné studie ukazují, že oba evropské haplotypy byly nalezeny také v Kansasu (B. Williams, os. sdělení), mohou být ovšem mnohem rozšířenější.

Račí mor

Výsledky promořenosti raků signálních ve Francii račím morem ukázaly, že 20% jedinců (z 513 testovaných) bylo nakaženo račím morem (kapitola VI). Tito nakažení jedinci se vyskytovali ve více než polovině analyzovaných populací. Promořenost v jednotlivých populacích byla velmi rozdílná, od 0% až po 80% nakažených jedinců. V některých regionech (Limousin, Rhône-Alpes, Basse-Normandie) se vyskytovaly silně infikované populace, zatímco v jiných oblastech (Lorraine, Champagne-Ardenne, Languedoc-Rousillon) byla zjištěna promořenost velmi nízká nebo zde nebyli žádní nakažení raci nalezeni. Analýza několika jedinců jiných nepůvodních druhů raků, *Orconectes immunis* a *Procambarus clarkii*, pak ukázala, že i tyto druhy jsou ve Francii přenašeči původce račího moru (kapitola VI).

Studie promořenosti invazních raků (*O. limosus* a *P. leniusculus*) ze střední Evropy pak ukázala, že výsledky real-time PCR z velké části potvrzují data získaná pomocí semi-nested PCR (Kozubíková a kol. 2009, 2010). Díky real-time PCR byl navíc odhalen vyšší počet nakažených jedinců a potvrdilo se tak, že je tato metoda vysoce specifická. Celková promořenost ve vzorcích tak stoupla z 23% (semi-nested PCR) na 32% (real-time PCR), konkrétně u raka signálního dokonce ze 3% na 21% (kapitola VII).

Závěry

První část mé práce ukazuje, že molekulární metody nám mohou poskytnout zajímavé informace o nepůvodních racích v Evropě. S jejich pomocí můžeme raky snáze identifikovat, či zkoumat způsob jejich introdukce a následnou kolonizaci invadovaného území.

Studie genetické variability nepůvodních raků, raka pruhovaného a raka signálního, kteří jsou oba úspěšnými invazními druhy, ukazují, že se může jejich variabilita v invadovaném areálu

výrazně lišit a odrážet jejich velmi rozdílný způsob introdukce na tento kontinent (kapitola I a III).

U raka pruhovaného jsme ukázali, že i přes počáteční bottleneck efekt během introdukce a jeho nízkou variabilitu nebyl zřejmě jeho invazní potenciál příliš potlačen (kapitola I). Jediná introdukce relativně malého počtu jedinců tohoto druhu proto může představovat vážné nebezpečí pro invadovaný ekosystém. Toto je potřeba mít na paměti, pokud chceme s těmito invazními druhy jakkoli zacházet.

Naopak vysoká diverzita haplotypů byla nalezena u raka signálního, který byl do Evropy dovezen několikrát, mnoha jedinci (kapitola III). Naše výsledky, které ukazují, že se ve studovaných evropských populacích raka signálního nacházejí zástupci pouze jednoho poddruhu, *P. l. leniusculus*, jsou odlišné od předchozích studií (Agerberg a Jansson 1995, Grandjean a Souty-Grosset 1997), jejichž autoři navrhovali, že by se v Evropě mohlo vyskytovat více poddruhů. Rozdělení druhu *P. leniusculus* na tři poddruhy, ani jejich taxonomický status však nejsou jednoznačné (Sonntag 2006) a bude proto potřeba detailněji prostudovat populace raka signálního v jeho americkém areálu.

Ukázali jsme také, že pokud se zajímáme o introdukované druhy, které nejsou ve svém původním areálu příliš studovány, analýza jedinců z obou areálů, invadovaného i původního, může odhalit zajímavé informace o genetické diverzitě v rámci daného taxonu (kapitola V). Pomocí metody DNA barcoding tak byla u raků *Orconectes virilis*, *O. immunis* a *Procambarus acutus/zonangulus* nalezena vysoká míra variability. Bude proto jistě zajímavé studovat tyto druhy detailněji i v jejich původním americkém areálu. Metoda DNA barcoding, samozřejmě nejlépe v kombinaci s morfologickým určením, navíc může pomoci rychle a přesně určit nově objevené druhy raků (kapitola V).

Druhá část mé práce přináší informace o promořenosti 45 populací raka signálního ve Francii račím morem. Naše výsledky ukázaly, že je tento druh přenašečem původce račího moru v této zemi a představuje tak hrozbu pro původní druhy, především raka bělonohého. Nález *A. astaci* u několika jedinců raka *Orconectes immunis* a u raka *Procambarus clarkii* ukazuje, že i tyto druhy se mohou podílet na přenosu račího moru ve Francii. Studie promořenosti v populacích těchto i jiných introdukovaných druhů proto budou významné pro ochranu původních druhů ve Francii. Aktivní ochranný management by se mohl například zaměřit na oblasti, kde byla promořenost nepůvodních raků vysoká a zároveň se v blízkosti nacházejí populace původních druhů, a kde je proto vysoké riziko přenosu patogenu.

Důležité je však zmínit, že pokud nebyla ve vzorku či v jedincích z určité populace nalezena DNA patogenu, nemůžeme jedince či populaci považovat za nenakažené, neboť byla zpracována jen část kutikuly a izolátu, a to jen u několika jedinců z dané populace. Přesto jsou však naše výsledky hodnotné, neboť poskytují první informace o rozšíření *A. astaci* v populacích raka signálního ve Francii a mohou tak posloužit k účinnější ochraně původních raků v této zemi. Detailní výsledky naší studie pak budou předány francouzské organizaci ONEMA, která se zabývá kvalitou vod a ochranou biodiverzity ve francouzských vodách, abychom tak umožnili jejich následné praktické využití.

Analýza středoevropských invazních raků pomocí real-time PCR potvrdila, že se jedná o vysoce citlivou a specifickou metodu (kapitola VII). Především výrazný nárůst počtu infikovaných jedinců raka signálního po použití této metody ukazuje, že výběr metody může zásadně ovlivnit vyhodnocení, jaké nebezpečí představují konkrétní populace, a také jejich následný management.

Introduction

Crayfish are important components of freshwater ecosystems. More than 640 crayfish species are known from the whole world, most of them from North America and Australia (Crandall and Buhay 2008). Several native crayfish species are present in Europe and some of them used to be frequently harvested, especially for consumption. But in 1859, a parasitic oomycete *Aphanomyces astaci*, pathogen of the crayfish plague, first appeared in Europe and wiped out numerous native crayfish populations (Alderman 1996, Souty-Grosset et al. 2006). To substitute for lost native crayfish populations, several non-indigenous crayfish species were introduced to Europe, originating mostly in North America. North American species are highly resistant to the disease, they may serve as carriers of the pathogen and transmit it to European crayfish species, further contributing to the reduction of their populations.

Three North American species which were intentionally introduced to Europe are now particularly abundant on the continent: the spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* (introduced probably just once in 1890, by 90 individuals), the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (first brought in 1959, in total more than 60 000 individuals imported) and the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (since 1973 about 40 000 individuals introduced). Since the 1990s, other non-indigenous crayfish species were introduced to Europe, most likely through aquarium trade (Holdich et al. 2009, Souty-Grosset et al. 2006). These species differ by their history of introduction and colonization of the continent and they therefore provide an interesting model for studies of biological invasions in Europe.

Genetic variation in non-indigenous crayfish species in Europe

Publications dealing with biological invasions are often focused e.g., on the spread of introduced species and their impact on local environment and organisms. However, biological invasions are interesting also for their relation to the maintenance or loss of genetic variation in these species during their introduction to new territories.

When limited numbers of individuals are introduced, the colonization bottleneck may in some cases lead to reduced genetic variation in these introduced individuals. Low variation may then have a negative effect on the ability of establishment of these populations. However, introduced populations do not always have lower variation, as variation may be maintained due to different factors such as high propagule pressure and multiple introductions. Moreover, reduced variation in introduced populations of some organisms does not necessarily mean an obstruction for their success when colonizing new habitats (Roman and Darling 2007). In certain cases, e.g., when the species is highly structured in its original range, multiple introductions may even lead to higher variation in introduced than native populations (Sakai et al. 2001).

In the first part of my thesis I was therefore interested in the amount of genetic variation in crayfish which are successful invaders, but their history of introduction differs significantly. This is the case of the spiny-cheek crayfish and the signal crayfish.

According to the literature data, the spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* was introduced to Europe just once, by small number of individuals. The success of the species in Europe and quick colonization of new habitats seemed therefore surprising given the history of its introduction. We have therefore asked if the species was brought to Europe just once or if other unrecorded introduction events took place. In this case, especially if individuals were introduced from different

source populations, this might have assured that more variation was brought from the original range.

Very different was the introduction of signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*, which was imported several times, by large numbers of individuals. Three subspecies of this crayfish are known from North America: *Pacifastacus leniusculus leniusculus*, *P. l. trowbridgii* and *P. l. klamathensis*, which are difficult to distinguish by their morphology (Miller 1960). It is not clear if one or more of these subspecies were introduced to Europe. Studies based on nuclear and mitochondrial markers (Agerberg and Jansson 1995, Grandjean and Souty-Grosset 1997) suggested that several subspecies are probably present in Europe. Such conclusion might be supported also by the fact that most introduced individuals came from the Lake Tahoe in California where at least two subspecies seem to be present. Despite this, Hobbs (1989) mentioned that only *P. l. leniusculus* was introduced to Europe. As Sonntag (2006) detected three lineages at the mitochondrial DNA (mtDNA) level in signal crayfish from North America, which seem to correspond to the three subspecies, we presumed that sequencing of a suitable mitochondrial gene could reveal if European individuals belong to one or more subspecies (chapter III). Nevertheless, it was recently shown that the variation within the signal crayfish may be higher than expected, as new distinct lineages were detected in North America (E. Larson, pers. comm.; chapter III).

Systematics of other North American crayfish species recently introduced to Europe is often confused and their morphological identification may therefore be problematic. This may be caused by the existence of cryptic species, by the lack of experts with experience in their identification or by lack of necessary morphological features in examined specimens. In these cases, other approaches may be useful, in particular identification using molecular methods, such as the DNA barcoding (chapter V). A case of an erroneous identification was already recorded in Europe, when individuals found in northeastern France were considered a highly invasive crayfish *Orconectes rusticus* (Daudey 2006). Later, individuals from this population were re-examined and identified as a related species, *Orconectes juvenilis* (Chucholl a Daudey 2008). Fast and reliable identification of newly recorded invasive crayfish populations is important, as misidentification of invaders may have negative consequences for risk assessment and future management strategies. Problems with identification were encountered also in the case of crayfish individuals from Great Britain, first identified as *Orconectes limosus* and later as *O. virilis*. In America, *O. virilis* represents a cryptic species complex. In chapter IV, we have therefore investigated the taxonomic position of British and also Dutch individuals of *O. virilis* within the complex.

Crayfish plague

The second part of my thesis deals with the detection of the crayfish plague pathogen in populations of invasive crayfish in Europe. Although the parasite *Aphanomyces astaci* first appeared in Europe already in the second half of the 19th century, it is still present on the continent. North American crayfish species further facilitate its spread and transmission to susceptible native crayfish, causing their mass mortalities. In the last few years, several molecular methods for *A. astaci* detection in crayfish have been developed; which are suitable also for the detection in individuals where the pathogen load is relatively low. It is now therefore possible to detect the pathogen of the crayfish plague also in non-symptomatic carriers and to investigate plague prevalence in their populations, with possible quantification of the pathogen load in each sample. Real-time PCR according to Vrålstad et al. (2009) showed to be the most suitable method at present

for the detection of the crayfish plague pathogen in non-indigenous crayfish (Tuffs and Oidtmann 2011). In comparison with conventional semi-nested PCR (Oidtmann et al. 2006) which was used in several studies at the Department of Ecology (Faculty of Science, Charles University in Prague), the real-time PCR also proved to be more sensitive (chapter VII).

In France, the native white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* is highly endangered, with its populations dramatically declining during the last few years. Mortalities caused by the crayfish plague are among prominent reasons for this decline (Bramard et al. 2006). In several cases, mass mortalities of white-clawed crayfish were supposedly related to the presence of signal crayfish, and possible transmission of *A. astaci* from this invasive species (Bramard et al. 2006, Collas and Salek 2002, Neveu 2002). The white-clawed crayfish overlaps in habitat requirements with signal crayfish and both species may therefore often get in contact (Collas et al. 2007). Thus, it is important to learn more about the prevalence of the signal crayfish populations to determine which of them are more infected and may therefore represent higher threat of plague transmission to native crayfish. I have focused on this topic in chapter VI.

Aims of the study

Part 1

Chapter I Genetic diversity of European and American *O. limosus* individuals was studied in order to test whether the species was brought to Europe just once; we also tried to identify the origin of introduced individuals. Analyses of *O. limosus* from its original range also allowed us to evaluate to what extent losses of threatened local populations may impact overall intraspecific genetic diversity.

Chapter II In this chapter, we analysed selected Czech populations of the spiny-cheek crayfish by allozyme electrophoresis to evaluate the level of intra- and among-population genetic variation and to relate it to the process of its invasion in our country.

Chapter III Genetic variation (at mtDNA level) of European populations of another invasive species *Pacifastacus leniusculus* was analysed, and results were compared with data from North America to test whether one or more currently recognised subspecies are present in Europe and to investigate variation in introduced populations.

Chapter IV We studied specimens from relatively recently discovered non-indigenous crayfish populations from Britain and the Netherlands, which were identified as the virile crayfish *Orconectes virilis*, to assess their position within other known lineages of *O. virilis* species complex known from its North American range (chapter IV).

Chapter V In this chapter we focused on recently established non-native crayfish species in Europe, and we tried to verify morphological identification of some of the studied species. We also wanted to show that the usefulness of DNA barcoding for identifying new crayfish invaders.

Part 2

Chapter VI We investigated the crayfish plague prevalence in French populations of the invasive signal crayfish, and we tried to evaluate the danger these populations represent for native crayfish in France. We have also tested several individuals of other non-indigenous crayfish species in this country.

Chapter VII By analysing samples I contributed to a study which re-evaluated the crayfish plague prevalence in Central European populations of spiny-cheek and signal crayfish, previously analysed by the semi-nested PCR (Kozubíková et al. 2009, 2010).

Material and methods

Crayfish were captured by hand, while scuba-diving, or by electro-fishing, and samples (legs/claws or entire specimens) were then stored in 96% ethanol.

Tissues from one leg or a claw were used for analyses of genetic variation of non-indigenous crayfish in Europe. Total DNA was then isolated from this material, followed by purification and preparation for sequencing. Using universal LCO 1490 and HCO 2198 primers (Folmer et al. 1994) in the PCR we amplified and then sequenced fragments of the mitochondrial gene for cytochrome *c* oxidase subunit I (COI). Results were processed mostly in the software MEGA (Tamura et al. 2007, 2011).

Entire crayfish bodies were obtained and stored in 96% ethanol for analyses of the crayfish plague prevalence in non-indigenous crayfish. The cuticle from one half of abdomen (chapter VI and VII) and from one uropod (chapter VI and some individuals in chapter VII) was dissected using sterile tools and further processed. Although this means that only a part of the pathogen DNA is detected and the real prevalence may be higher than observed values, the uropod was evaluated as the part of the signal crayfish body where most *A. astaci* DNA was detected in comparison with other parts of the body (Vrålstad et al. 2011). Most of infected individuals within the population should therefore be detected from this body part. The dissected material was crushed, followed by a DNA isolation step. The presence of the pathogen DNA was tested by the TaqMan MGB real-time PCR (Vrålstad et al. 2011).

Results and discussion

Genetic variation in non-indigenous crayfish species in Europe

Genetic variation detected in *O. limosus* populations from Europe was much lower in comparison with that found in North America (chapter I). One dominant haplotype was present in European populations of the spiny-cheek crayfish, while the second detected haplotype was found in only four analysed individuals from one population (out of 91 tested individuals from 25 populations). This supports the scenario of a single introduction to Europe by a small number of individuals. However, based on our results identification of the source area for European populations of the species was not possible. In North America, most haplotypes were found in southeastern Pennsylvania and northern Maryland. In other parts of the American range, especially in areas where the species is not native, the diversity of haplotypes was significantly lower.

Analysis of Czech populations of the spiny-cheek crayfish revealed a relatively high variability of allozyme markers. Despite the bottleneck effect during its introduction, substantial variation was probably maintained (chapter II), as was also shown for microsatellite markers in three Central European populations (Hulák et al. 2010). The high invasiveness of the species and its successful spread in Europe might have been also facilitated by its strategy of reproduction. It was recently demonstrated that the spiny-cheek crayfish is capable of facultative parthenogenetic reproduction (Buřič et al. 2011). However, more studies are needed to test this hypothesis.

Analysis of European populations of the signal crayfish and subsequent comparison with reference sequences of three subspecies from North America (Sonntag 2006) shows that only one subspecies *P. l. leniusculus* is present in analysed European samples. In Europe, 27 haplotypes were found, but these did not show any obvious geographical pattern, corresponding to numerous

secondary translocations of signal crayfish across Europe. However, analysis of a few populations from North America revealed an existence of another distinct lineage within signal crayfish. The diversity within this taxon may therefore be higher than expected (chapter III), as unpublished results of E. Larson (pers. comm.) also suggest.

DNA barcoding allowed us to confirm the morphological identification of non-indigenous North American crayfish which were discovered in Europe relatively recently. These were *Orconectes juvenilis* and *O. immunis* from eastern France, *O. virilis* from Great Britain and the Netherlands, *Procambarus fallax* from Germany, and *P. acutus/zonangulus* from the Netherlands (chapter V). In *Orconectes virilis*, *O. immunis* and *P. acutus/zonangulus*, surprisingly high levels of genetic variation were observed. In one of these, *Orconectes virilis*, our analysis of individuals from Europe and North America revealed the presence of two distinct lineages (one in Europe, the other in Iowa, USA). These lineages were not reported from its American range so far, suggesting much higher variation within this cryptic species complex (chapter IV). Although we did not have any data that could allow speculating about the origin of the individuals found in Europe (in the UK and the Netherlands), recent studies show that the two haplotypes detected in this lineage occur in Kansas (B. Williams, unpublished results), but they might possibly be more widespread.

Crayfish plague

Our results of the *A. astaci* prevalence in signal crayfish populations in France show that 20% of 513 analysed individuals were infected by the parasite. These infected individuals were present in more than half of analysed populations. The plague prevalence in populations was variable, ranging from 0% to 80% of infected individuals. Some of the studied regions were heavily infected (Limousin, Rhône-Alpes, Basse-Normandie), while in other areas populations showed little or no infection (Lorraine, Champagne-Ardenne, Languedoc-Rousillon). Analysis of several individuals of other non-indigenous crayfish species, *Orconectes immunis* and *Procambarus clarkii*, showed that these species from France also harbour the pathogen of the plague (chapter VI).

Study of the plague prevalence in Central European invasive crayfish (*O. limosus* and *P. leniusculus*) showed that the real-time PCR largely confirmed results previously obtained by the conventional semi-nested PCR by Kozubíková et al. (2009, 2010). Moreover, the higher number of samples testing positive by the real-time PCR suggests this method has a higher specificity. The overall prevalence in the dataset increased from 23% (semi-nested PCR) to 32% (real-time PCR), in signal crayfish this was from 3% up to 21% (chapter VII).

Conclusions

The first part of the thesis shows that molecular analyses may provide interesting information on non-indigenous crayfish in Europe. These methods allow easier identification of invaders or investigating their introduction history and subsequent colonization of the invaded territory.

Genetic variation in the invaded range of two non-indigenous crayfish, the spiny-cheek crayfish and the signal crayfish, both very successful invasive species, varies significantly, reflecting their different colonization histories on the continent (chapters I and III).

The analysis of the spiny-cheek crayfish populations showed that despite the bottleneck

effect during the introduction and low variation in the species in Europe (chapter I), the invasion success of *O. limosus* does not seem to be significantly reduced. Even a single introduction of a relatively low number of individuals of the species may therefore be dangerous for the invaded ecosystem. This must be kept in mind when dealing with new invaders.

In contrast, high variation was found in European populations of signal crayfish, which was introduced several times, in large numbers (chapter III). Our finding that all studied European individuals belong to a single subspecies *P. l. leniusculus* contrasts with previous studies (Agerberg and Jansson 1995, Grandjean and Souty-Grosset 1997) that suggested the presence of several subspecies in Europe. However, the division of *P. leniusculus* into three subspecies and their taxonomic status are not clear (Sonntag 2006) and detailed studies of signal crayfish in its American range are therefore needed.

I also showed that when studying genetic variation in introduced species which were not investigated in detail in their native range, analysis of individuals from both native and introduced range may provide interesting information on variation within the taxon in general (chapter V). DNA barcoding revealed high variation in *Orconectes virilis*, *O. immunis* and *Procambarus acutus/zonangulus*. It will therefore be interesting to further study these species also in their native American range of distribution. DNA barcoding seems useful in fast and accurate identification of new invaders, preferably in combination with morphological examinations (chapter V).

The second part of my thesis brings information on the crayfish plague prevalence in 45 signal crayfish populations in France. Our results show that the species serves as the reservoir of this pathogen in the country and represents therefore a serious threat for native species, especially the white-clawed crayfish. Detection of *A. astaci* in several individuals of *Orconectes immunis* and *Procambarus clarkii* confirms that these species may also contribute to the transmission of the plague in France. Further studies of plague prevalence in populations of these and other non-indigenous crayfish species will therefore be crucial for conservational management of native crayfish in France. Conservational management may focus e.g., on regions where the plague prevalence in non-indigenous crayfish is high but populations of native species are in proximity and the risk of the transmission of the pathogen is high.

It must be kept in mind that if no *A. astaci* DNA was detected in the sample or in individuals from a population, this does not mean that the individuals or populations are plague-free. Only certain parts of the cuticle and DNA isolate were analysed, and only a limited number of individuals per population were tested. However, our results are highly valuable, as they give us the first idea of the *A. astaci* distribution in signal crayfish populations in France and may be applied in a more efficient management of native crayfish in the country. Detailed results of our study will be provided to French organisation ONEMA involved in water quality surveys and protection of biodiversity in French waters, to enable further practical use of the data.

Analysis of Central European invasive crayfish species by the real-time PCR proved that the method is highly sensitive and specific (chapter VII). In particular, the significant increase of signal crayfish individuals testing positive for *A. astaci* shows that the choice of the detection method may have serious implications for assessment of the threat particular populations represent, and their subsequent management.

Použitá literatura / References

- Agerberg A., Jansson H., 1995. Allozymic comparisons between three subspecies of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana), and between populations introduced to Sweden. *Hereditas*, 122: 33-39.
- Alderman D.J., 1996. Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 15: 603-632.
- Bramard M., Demers A., Trouilhe M.-C., Bachelier E., Dumas J.-C., Fournier C., Broussard E., Robin O., Souty-Grosset C., Grandjean F., 2006. Distribution of non-indigenous and non-indigenous crayfish populations in the Poitou-Charentes region (France): evolution over the past 25 years. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 380-381: 857-866.
- Buřič M., Hulák M., Kouba A., Petrušek A., Kozák P., 2011. A successful crayfish invader is capable of facultative parthenogenesis: a novel reproductive mode in decapod crustaceans. *PLoS ONE*, 6: e20281.
- Chucholl C., Daudey T., 2008. First record of *Orconectes juvenilis* (Hagen, 1870) in eastern France: update to the species identity of a recently introduced orconectid crayfish (Crustacea: Astacida). *Aquatic Invasions*, 3: 105-107.
- Collas M., Julien C., Monnier D., 2007. Note technique. La situation des écrevisses en France. Résultats des enquêtes nationales réalisées entre 1977 et 2006 par le Conseil Supérieur de la pêche [Technical note. Situation of the crayfish in France. Results of the national surveys performed between 1977 and 2006 by the Conseil Supérieur de la pêche (CSP)]. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 386: 01-38.
- Collas M., Salek X., 2002. Description d'un cas de peste ou *Aphanomycose* dans le département des Vosges [Description of an outbreak of crayfish plague or aphanomycosis in Vosges department]. *L'Astaciculteur de France*, 70: 2-6.
- Crandall K.A., Buhay J.E., 2008. Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae – Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 295-301.
- Daudey T., 2006. Diagnostic des peuplements astacicoles de la vallée du Dessoubre. Master thesis QTEBV, Université de Franche-Comté, Fédération de Pêche du Doubs, pp 65.
- 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: 294-299.
- Grandjean F., Souty-Grosset C., 1997. Preliminary results on the genetic variability of mitochondrial DNA in the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana. *Life Sciences*, 320: 551-556.
- Hobbs H.H., 1989. An illustrated checklist of the American crayfishes (Decapoda: Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 480.
- Holdich D.M., Reynolds J.D., Souty-Grosset C., Sibley P.J., 2009. A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 394-395: art. no. 11.
- Hulák M., Kašpar V., Kozák P., Buřič M., Filipová L., Petrušek A., 2010. Cross-species amplification of microsatellite markers in the invasive spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*): assessment and application. *Journal of Applied Genetics*, 51: 73-78.
- Kozubíková E., Filipová L., Kozák P., Ďuriš Z., Martín M.P., Diéguez-Uribeondo J., Oidtmann B., Petrušek A., 2009. Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in invasive American crayfishes in the Czech Republic. *Conservation Biology*, 23: 1204-1213.
- Kozubíková E., Puky M., Kiszely P., Petrušek A., 2010. Crayfish plague pathogen in invasive North American crayfish species in Hungary. *Journal of Fish Diseases*, 33: 925-929.
- Miller G.C., 1960. The taxonomy and certain biological aspects of the crayfish of Oregon and Washington. Master's thesis, Oregon State College, Corvallis, pp 216.
- Neveu A., 2002. *Pacifastacus leniusculus*. In: Les espèces animales et végétales susceptibles de proliférer dans les milieux aquatiques et subaquatiques. Fiches - espèces animales [Animal and plant species capable to proliferate in aquatic and submerged areas. Files – animal species]. Rapport de DESS, Agence de l'Eau Artois-Picardie

(Douai), 87-91.

- Oidtmann B., Geiger S., Steinbauer P., Culas A., Hoffmann R.W., 2006. Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*, 72: 53-64.
- Roman J., Darling J.A., 2007. Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 454-464.
- Sakai A.K., Allendorf F.W., Holt J.S., Lodge D.M., Molofsky J., With K.A., Baughman S., Cabin R.J., Cohen J.E., Ellstrand N.C., McCauley D.E., O'Neil P., Parker I.M., Thompson J.N., Weller S.G., 2001. The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32: 305-332.
- Sonntag M.M., 2006. Taxonomic standing of the three subspecies of *Pacifastacus leniusculus*, and their phylogeographic patterns in the Klamath Basin area. Brigham Young University, pp 71.
- Souty-Grosset C., Holdich D.M., Noël P.Y., Reynolds J.D., Haffner P., 2006. Atlas of crayfish in Europe. *Patrimoines naturels*, 64. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. doi:10.1093/molbev/msr121
- Tuffs S., Oidtmann B., 2011. A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology*, 153: 343-353.
- Vrålstad T., Johnsen S.I., Fristad R.F., Edsman L., Strand D., 2011. Potent infection reservoir of crayfish plague now permanently established in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, 97: 75-83.
- Vrålstad T., Knutsen A.K., Tengs T., Holst-Jensen A., 2009. A quantitative TaqMan MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology*, 137: 146-155.

- ŽIVOTOPIS -

NAROZENÁ 23. září 1982 v Brandýse nad Labem

VZDĚLÁNÍ

od 2008 doktorské studium, doktorát pod dvojím vedením: Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze a Université de Poitiers (Francie)
2002-2008 magisterské studium, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
obor: biologie odborná, specializace: hydrobiologie
1998-2002 Gymnázium Špitálská

ZAMĚSTNÁNÍ

2003, 2005-8 lektorka anglického jazyka - Jazykový Institut Praha, Agentura Hermés (individuální i skupinová výuka anglického jazyka pro firmy)
2005 mapování výskytu raků na území ČR, Agentura pro ochranu přírody a krajiny, Praha
2002 asistentka v redakci internetového časopisu o cestování - Treknet

STUDIUM V ZAHRANIČÍ

2008 - 2012 tři půlroční studijní pobyty v laboratoři Ekologie, Evoluce, Symbióza (EES) při Univerzitě v Poitiers (Francie) v rámci doktorátu pod dvojím vedením
červenec 2010 týdenní terénní výjezd, Pensylvánie (USA) - lov raků pruhovaných pro následné analýzy
říjen 2010 dvoutýdenní stáž v institutu PIA v Montpellier (Francie) - vývoj mikrosatelitových markerů pro původce račího moru *Aphanomyces astaci* a raka signálního *Pacifastacus leniusculus*
duben 2009 dvoutýdenní stáž v Norském veterinárním institutu v Oslu (Norsko) - seznámení se s metodikou detekce račího moru pro její následné zavedení v laboratoři EES v Poitiers; detekce *A. astaci* u vzorků invazních raků ze střední Evropy
srpen 2007 půlroční studium na Univerzitě v Poitiers (Francie) v rámci programu Erasmus, v kombinaci
- únor 2008 s prací na diplomové práci v Laboratoři genetiky a biologie populací korýšů (nyní laboratoř EES) při této univerzitě; účast na konferenci Petit Pois Dérivé (27.-30.8. 2007)
léto 2006 dvouměsíční stáž v Laboratoři genetiky a biologie populací korýšů při Univerzitě v Poitiers

ČLENSTVÍ VE VĚDECKÝCH SPOLEČNOSTECH

od 2011 ČSPE (Česká společnost pro ekologii)
od 2005 IAA (International Association of Astacology)

JAZYKOVÉ ZNALOSTI

aktivně: angličtina – pokročilá (2002 - certifikát FCE; 2008 - certifikát TOEIC),
francouzština – pokročilá (2008 - certifikát DELF B2; 2011 - certifikát DALF C1)
pasivně: němčina

DALŠÍ ZNALOSTI

základy práce s programem ArcGIS - Geografický informační systém (GIS)
řidičské oprávnění skupiny B
potápěčská kvalifikace AOWD (pokročilá úroveň)

OCENĚNÍ

- 2010 Cena za druhou nejlepší studentskou přednášku na konferenci „European Crayfish: Food, Flagships and Ecosystem services“, Poitiers, Francie, 26.-29. října 2010.
- 2009 Cena za nejlepší studentskou přednášku na konferenci „European Crayfish Workshop: Future of Native Crayfish in Europe“, Písek, 7.-10. září 2009.
- 2008 Cena za nejlepší přednášku/projekt na konferenci „17. Symposium International Association of Astacology (IAA)“, Kuopio, Finsko, 4.-8. srpna 2008.

- CURRICULUM VITAE -

BORN ON 23rd September 1982 in Brandýs nad Labem

EDUCATION

since 2008 Doctoral studies, programme „co-tutelle“ partly at the Charles University in Prague, Faculty of Science, partly at the University of Poitiers (France)
2002-2008 Master studies, Charles University in Prague, Faculty of Science
branch: biology, specialization: hydrobiology
1998-2002 high school Špitálská

EMPLOYMENT

2003, 2005-8 English language teacher - Jazykový Institut Praha, Agentura Hermés
(education of individuals or groups, education in companies)
2005 crayfish distribution surveys in the Czech Republic, Nature Conservation Agency of the
Czech Republic, Prague
2002 assistant in the editorial office of a magazine about travelling – Treknet

STUDYING ABROAD

2008 - 2012 three 6-month stays in the Laboratory Ecology, Evolution, Symbiosis (EES) at the University
of Poitiers (France) during the joint Ph.D. study
July 2010 field trip (1 week) in Pennsylvania (USA) - crayfish sampling for future analyses
October 2010 study stay (2 weeks) at the Institute PIA in Montpellier (France) - development of
microsatellite markers for *Aphanomyces astaci*, pathogen of the crayfish plague, and for
signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*
April 2009 study stay (2 weeks) at the Norwegian Veterinary Institute in Oslo (Norway) - learning the
technique of the crayfish plague detection for its subsequent establishment in the Laboratory
EES in Poitiers; detection of *A. astaci* in invasive crayfish from Central Europe
August 2007 Erasmus Programme - studies at the University of Poitiers (6 months), in combination with
- Feb. 2008 work on the Master thesis in the Laboratory of Genetics and Biology of Crustacean
Populations (now Laboratory EES) at this university; participation at a conference Petit Pois
Dérivé (August 27-30, 2007)
summer 2006 study stay (2 months) in the Laboratory of Genetics and Biology of Crustacean Populations
at the University of Poitiers

MEMBERSHIP IN SCIENTIFIC ASSOCIATIONS

since 2011 Czech Ecological Society
since 2005 International Association of Astacology

LANGUAGE SKILLS

Active: English - advanced (2002 - FCE certificate; 2008 - TOEIC certificate 975 points/990)
French - advanced (2008 - DELF B2 certificate; 2011 - DALF C1 certificate)
Passive: German

OTHER SKILLS

Basic use of the ArcGIS programme – Geographic Information System (GIS)
driving licence (group B)
advanced scuba-diving qualification AOWD (Advanced Open Water Diver)

AWARDS

- 2010 Price for the second best student presentation at the conference "European Crayfish Food, Flagships and Ecosystem services", Poitiers, France, October 26-29, 2010.
- 2009 Price for the best student presentation at the conference "European Crayfish Workshop: Future of Native Crayfish in Europe", Písek, Czech Republic, September 7-10, 2009.
- 2008 Price for the best presentation/project at the conference "17th Symposium of the International Association of Astacology (IAA)", Kuopio, Finland, August 4-8, 2008.

SEZNAM PUBLIKACÍ / LIST OF PUBLICATIONS

Recenzované publikace / Peer-reviewed Publications

- Filipová L.**, Lieb D.A., Grandjean F., Petrusek A., 2011. Haplotype variation in the spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus*: colonization of Europe and genetic diversity of native stocks. *Journal of the North American Benthological Society*, 30: 871-881.
- Filipová L.**, Grandjean F., Chucholl C., Soes D.M., Petrusek A., 2011. Identification of exotic North American crayfish in Europe by DNA barcoding. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 401: art. no. 11.
- Kozubíková E., Vrålstad T., **Filipová L.**, Petrusek A., 2011. Re-examination of the prevalence of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish populations in Central Europe by TaqMan MGB real-time PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 97: 113-125.
- Filipová L.**, Holdich D.M., Lesobre J., Grandjean F., Petrusek A., 2010. Cryptic diversity within the invasive virile crayfish *Orconectes virilis* (Hagen, 1870) species complex: new lineages recorded in both native and introduced ranges. *Biological Invasions*, 12: 983-989.
- Filipová L.**, Kozubíková E., Petrusek A. 2009. Allozyme variation in Czech populations of the invasive spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* (Cambaridae), *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 394-395, art. no. 10.
- Hulák M., Kašpar V., Kozák P., Buřič M., **Filipová L.**, Petrusek A., 2010. Cross-species amplification of microsatellite markers in the invasive spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*): assessment and application (*Short communication*). *Journal of Applied Genetics*, 51: 73-78.
- Kozubíková E., **Filipová L.**, Kozák P., Ďuriš Z., Martín M.P., J. Diéguez-Urbeondo, Oidtmann B., Petrusek A., 2009. Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in invasive American crayfishes in the Czech Republic. *Conservation Biology*, 23: 1204-1213.
- Petrusek A., **Filipová L.**, Ďuriš Z., Horká I., Kozák P., Polícar T., Štambergová M., Kučera Z., 2006. Distribution of the invasive spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*) in the Czech Republic - past and present. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 380-381: 903-917.

Kapitoly v monografii / Book Chapters

- Filipová L.**, Kozubíková E., Petrusek A., 2006. *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817). In: Mlíkovský J., Stýblo P. (eds), *Nepůvodní druhy fauny a flóry ČR [Alien species in fauna and flora of the Czech Republic]*. ČSOP, Prague, 237-239 (in Czech)
- Filipová L.**, Petrusek A., Kozák P., Polícar T., 2006. *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). In: Mlíkovský J., Stýblo P. (eds), *Nepůvodní druhy fauny a flóry ČR [Alien species in fauna and flora of the Czech Republic]*. ČSOP, Prague, 239-240 (in Czech)

PREZENTACE NA KONFERENCÍCH / *CONFERENCE PRESENTATIONS*

* prezentující autor / *presenting author*

Filipová L.*, Grandjean F., Crandall K.A., Lieb D.A., Kozubíková E., Sonntag M., Petrusek A., 2010. Genetic variation of European populations of two North American invasive crayfish with contrasting introduction histories. (přednáška / oral presentation) International Association of Astacology (IAA). Missouri, USA, 17.-23.7. 2010.

Filipová L.*, Grandjean F., Crandall K.A., Kozubíková E., Sonntag M., Petrusek A., 2010. Genetic variation in European populations of signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. (přednáška / oral presentation) European Crayfish: Food, Flagship and Ecosystem services. Poitiers, France, 26.-29.10. 2010.

Kozubíková E.*, Vrålstad T., **Filipová L.**, Petrusek A., 2009. Detection of the crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*): Comparison of molecular approaches. (přednáška / oral presentation) Regional European Crayfish Workshop: Future of Native Crayfish in Europe. Písek, Czech Republic, 7.-10.9. 2009.

Filipová L.*, Grandjean F., Petrusek A., 2009. Genetic variability in European non-indigenous crayfish. (přednáška / oral presentation) European Crayfish Workshop: Future of Native Crayfish in Europe. Písek, Czech Republic, 7.-10.9. 2009.

Filipová L., Grandjean F.*, Lieb A.D., Petrusek A., 2008. Haplotype variation of European populations of the spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*). (přednáška / oral presentation) International Association of Astacology (IAA). Kuopio, Finland, 4.-8.8. 2008.

Filipová, L.*, Kozubíková E., Petrusek A., Oidtmann B., 2006. Intrapopulation genetic variation of the American spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* vs. the infection by the crayfish plague: first results. (poster) Neobiota - From Ecology to Conservation. Wien, Austria, 27.-29.9. 2006.

Ďuriš Z., Horká I., Kozák P., Polícar T., **Filipová L.***, Štambergová M., Petrusek A., 2005. Distribution of the invasive spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*) in the Czech Republic - history and present. (poster) CRAYNET - Final Conference. Florence, Italy, 2.-5.5. 2005.

Filipová L.*, Petrusek A., Kozák P., Polícar T., 2006. Distribuce raka pruhovaného (*Orconectes limosus*) v České republice [Distribution of the spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*) in the Czech Republic]. (přednáška / oral presentation) Zoologické dny. Brno, Czech Republic, 9.2. 2006.

Další prezentace / *Other Presentations*

Filipová L.*, Grandjean F., Crandall K.A., Lieb D.A., Kozubíková E., Sonntag M., Petrusek A., 2011. Rak signální a pruhovaný v Evropě: rozdílný způsob introdukce a jejich genetická variabilita [The signal crayfish and the spiny-cheek crayfish in Europe: different ways of introduction and their genetic variation]. (poster) Konference ČSPE. Kostelec nad Černými Lesy, Czech Republic, 21.-23.10. 2011.

Filipová L.*, Petrusek A., Matasová K., Delaunay C., Grandjean F., 2011. Détection de la peste de l'écrevisse dans les populations d'écrevisses non-indigènes en France [Detection of the crayfish plague in non-indigenous crayfish populations in France]. (poster) Toulouse, France, 29.-31.8. 2011.