

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Genetická struktura hybridní zóny vší *Polyplax serrata***

Bakalářská práce

**Lenka Kotěborská**

Školitel: doc. Jan Štefka, PhD.

Konzultantka: RNDr. Jana Martinů, PhD.

České Budějovice 2024

Kotěborská L., 2024: Genetická struktura hybridní zóny vší *Polyplax serrata* [Genetic structure of the *Polyplax serrata* louse hybrid zone, Bc. Thesis, in Czech] – 61 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace**

This thesis aims to extend the knowledge on co-evolution of host and their parasites by studying a hybrid zone (HZ) that arised between genetically different clusters of lice *Polyplax serrata*, parasitic on mice *Apodemus flavicollis*. A HZ transect in the northwest part of the Czech Republic was studied by a population genetic analysis, i. e. cline analysis of multiple *P. serrata* samples using mitochondrial and whole-genome data. The results revealed a narrow, tension type of the hybrid zone, with mitochondrial DNA introgressing through the HZ more easily than the nuclear genome.

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 12. dubna 2024

.....

Lenka Kotěborská

## **Poděkování**

Chtěla bych touto cestou poděkovat svému školiteli Janu Štefkovi, za vedení mé bakalářské práce, a konzultantce Janě Martinů, za všechny čas, který mi věnovala. Bez jejich cenných rad, vždy vstřícného přístupu, podpory a nesmírné trpělivosti, kterou mi vyjadřovali po celou dobu naší spolupráce, by tato bakalářská práce nemohla vzniknout. Janě Martin děkuji za terénní výjezdy, které jsme podnikly, a zaučení při získávání vzorků. Dále bych chtěla poděkovat kolegům z Laboratoře molekulární ekologie a evoluce za ochotu pomoci s bioinformatickou částí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům za obrovskou podporu, která je pro mě důležitá během celého studia.

## **Finanční podpora**

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (GAČR) v rámci projektu 21-02532S Vztahy mezi genetickou diversifikací a ekologií při sekundárním kontaktu: hybridní zóna a ekologická speciace v systému hostitel-parazit-symbiont“.

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	- 1 -
<b>1.1</b>	<b>Hybridní zóny</b> .....	- 1 -
1.1.1	Typy hybridních zón.....	- 3 -
1.1.2	Dynamika hybridních zón .....	- 4 -
1.1.3	Typy dat využívající se ke studiu hybridních zón .....	- 7 -
1.1.4	Hybridní zóny u parazitů .....	- 10 -
<b>1.2</b>	<b>Model <i>Apodemus-Polyplax</i></b> .....	- 15 -
1.2.1	Distribuce myšic r. <i>Apodemus</i> .....	- 15 -
1.2.2	Hostitelská specifita vší <i>Polyplax serrata</i> .....	- 16 -
<b>2</b>	<b>Cíle práce</b> .....	- 19 -
<b>3</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	- 20 -
<b>3.1</b>	<b>Odchyt hostitelů a směr materiálu</b> .....	- 20 -
3.1.1	Izolace hostitelské DNA .....	- 21 -
3.1.2	Spektrofotometrie, PCR a gelová elektroforéza .....	- 21 -
<b>3.2</b>	<b>Analýza struktury populace vší <i>Polyplax serrata</i></b> .....	- 23 -
3.2.1	Determinace vší .....	- 23 -
3.2.2	Molekulární zpracování DNA .....	- 23 -
3.2.3	Bioinformatické zpracování .....	- 24 -
3.2.4	Mitochondriální dataset .....	- 26 -
<b>4</b>	<b>Výsledky</b> .....	- 27 -
<b>5</b>	<b>Diskuse</b> .....	- 38 -
<b>6</b>	<b>Závěr</b> .....	- 43 -
<b>7</b>	<b>Bibliografie</b> .....	- 44 -
<b>8</b>	<b>Přílohy</b> .....	- 50 -



# 1 Úvod

## 1.1 Hybridní zóny

Hybridní zóny (HZ) byly podle Barton & Hewitt (1985) definovány jako úzké geografické oblasti, kde se setkávají geneticky odlišné populace, které se rozmnožují a produkují hybridní potomstvo. HZ mohou být i jen několik set metrů široké a zároveň několik set kilometrů dlouhé. Tvoří se u široké škály organismů; např. u myši (*Mus musculus/ domesticus*), kuněk (*Bombina bombinal variegata*), nebo různých hmyzů (*Papilio machaon*; *Gryllus pennsylvanicus/ firmus*; Barton & Hewitt, 1985; Rand & Harrison, 1989; Sperling & Harrison, 1994). HZ působí na genomy jako polopropustné membrány, které brání toku genů zapojených do reprodukční izolace a genů na ně vázaných, ale také umožňují introgresi výhodných alel. Oblasti genomu, které pronikají snadněji než genetické pozadí, nejspíše obsahují adaptivní varianty, nebo naopak podléhají slabší purifikující selekci (Zieliński et al., 2019). Migrace organismů a jejich gamet v prostředí vede pak k šíření genetických variant dovnitř HZ i případně napříč. Tok genů mezi populacemi je tedy základním evolučním procesem, který působí spolu s ostatními (přírodní výběr, genetický drift atd.) a tak definuje evoluční trajektorii populací (Gompert et al., 2017).

Z taxonomického hlediska lze hybridní zóny chápat jako kontakt populací vymezených genetickými bariérami a také jako kontakt populací udržovaných v rovnováze díky selekci (Barton & Hewitt, 1985). Biologické druhy jsou definovány jako soubory reálně nebo potenciálně se křížících populací, které jsou reprodukčně izolované od dalších skupin. Z toho vyplývá, že HZ obsahují populace reprodukčně od sebe izolované, v tom smyslu, že se při kontaktu neslučují do jedné populace. V případě druhů setkávajících se v HZ a produkujících hybridy lze říci, že se jedná o „ko-adaptivní“ druhový koncept, ve kterém druhy tvoří „harmonicky integrované komplexy genů“, jejichž vzájemná interakce maximalizuje fitness jedinců. Rozbitím těchto komplexů dochází k poklesu fitness (Barton & Hewitt, 1985). Hybridní zóny tedy dokazují, že odlišné genetické linie mohou přetrvávat navzdory probíhajícímu toku genů, což je v rozporu s tradičními interpretacemi konceptu biologických druhů (Gompert et al., 2017).

Z hlediska populační genetiky je na hybridní zóny nahlíženo jako na soubory gradientů (tj. klíny) ve frekvencích alel nebo kvantitativních rysů podél geografické linie (Barton & Gale, 1993). Na základě toho lze popsat HZ několika způsoby. Jedním z nich je

rekonstruování fylogenetických vztahů mezi různými geny v genomu, pokud jsou k dispozici sady úzce propojených markerů (např. sekvence DNA). Tam, kde je reprodukční bariéra silná, se populace může shlukovat kolem parentálních a  $F_1$  genotypů, takže řazení do různých rekombinantních typů se stává přirozenější. Rozdíl v pravděpodobnosti vzniku alel náhodně nebo s určitou selektivní výhodou postupně ustupuje v závislosti na síle selekce, která působí proti přenosu alel dalších lokusů, které jsou v silné genetické vazbě (tj. v nízké vzdálenosti na chromozomu). Frekvence různých genotypů v HZ vypovídá o celkové síle selekce, počtu zapojených genů, rychlosti individuálního šíření a schopnosti, s jakou alely přecházejí z jednoho genofondu do druhého (Barton & Gale, 1993). Pozice a tvar klin vysvětlují evoluční procesy zapojené do tvorby hybridních zón. Zda lokusy odrážejí starší nebo probíhající demografické procesy (vč. pohybu HZ a adaptivní introgrese) závisí na faktorech jako je počet bariérových lokusů a jejich distribuce v genomu, rychlost mutací a rekombinace. Bariérové lokusy jsou geny zabraňující úplnému sloučení dvou odlišných populací. K překonání efektu vazeb u více bariérových genů a způsobení toku napříč HZ musí být pozitivní selekce na jediném genu neúměrně silná (van Riemsdijk et al., 2019).

Hybridní zóny jsou pravděpodobně udržovány rovnováhou mezi selekcí a disperzí druhu (Barton, 2001). Jednak mohou existovat stabilní hybridní zóny udržované intragenomickou selekcí proti hybridům, která představuje bariéru pro tok genů mezi populacemi. Na druhou stranu může být divergence vyvolávána výhradně adaptací na proměnlivé prostředí. Ačkoli většina hybridních genotypů může být nevyhovující, mohou přispět k adaptaci buď introgresí jednotlivých alel nebo vytvořením rekombinantního genotypu. Obecně se předpokládá, že se fitness odvíjí především od přirozeného výběru, lze tedy očekávat, že produkovaní hybridní (F<sub>2</sub> populace nebo populace zpětného křížení) budou mít menší fitness než jejich rodiče. Tyto rekombinantní genotypy nikdy předtím neprošly selekcí, a proto by měly být hůře adaptovány. V některých případech však mohou být hybridní jedinci výhodnější: (Barton, 2001).

1. Hybridní populace má rozmanitou škálu genotypů, z nichž některý může být úspěšnější než rodič.
2. Linie, která spojuje původní populace, je promítána do populace F<sub>2</sub>, za předpokladu, že původní alely nebyly ztraceny díky divergenci a že parentální linie je velmi úspěšná i v současném prostředí.

3. Pokud je fitness určováno interakcemi mezi nezávislými sadami genů, pak mohou rekombinantní genomy obsahující neporušené sady alel mít fitness stejnou nebo lepší než rodič (Barton, 2001).

Studium hybridních zón v přírodě je zásadní pro pochopení evolučních procesů (speciace) a poskytuje možnost nahlédnout do postzygotických izolačních mechanismů (Pinto et al., 2019). V HZ probíhá speciace mezi odlišnými liniemi, což vede k posílení reprodukčních bariér nebo k splynutí bariér (zrušení speciace; Frayer & Payseur, 2021). Důsledky hybridních zón mohou být spojeny s vytvořením kanálu pro šíření adaptivních alel mezi druhy a s posilováním genetických inkompatibilit (Gompert et al., 2017). Reálné hybridní zóny se od teoretických modelů HZ mohou v tomto ohledu často lišit. V některých případech mohou být takové odchylky důležité, protože vedou k nepřesným odhadům parametrů. V jiných případech mohou naznačovat zásadní rozdíly od evoluční dynamiky linií popisovaných modely (Futuyma & Shapiro, 1995).

#### 1.1.1 Typy hybridních zón

Hybridní zóny mohou ojediněle vzniknout **primární** diferenciací (in situ) napříč gradientem prostředí (např. u ptáků: *Phylloscopus trochiloides*, *Cercotrichas coryphaeus*, *Zonotrichia capensis*, *Indicator indicator*; Toews & Brelsford, 2012). Především ale vznikají **sekundárním** kontaktem dříve alopatrických populací. Pro rozlišení primární či sekundární HZ je zapotřebí znát evoluční historii populací, kterou lze odvodit z genomických dat (Gompert et al., 2017; Toews & Brelsford, 2012). Podle Futuyma & Shapiro (1995) je často problematické primární a sekundární zóny spolehlivě odlišit, protože klíny mohou být studovány v oblastech s nízkou hustotou populace nebo oblastech, kde došlo k přerušení toku genů, které jsou ve vazebné nerovnováze, ale zároveň vytvářejí překážku i pro tok neutrálních alel (Futuyma & Shapiro, 1995).

Pokud HZ přetrvávají dostatečně dlouho, část nebo celý genom hybridů se přiblíží k rovnováze mezi migrací alel a selekcí proti nim. Nedávné studie HZ zahrnují celé nebo části genomu, které by se mohly odchýlit od očekávané rovnováhy migrační selekce. Současné hybridní zóny tak mohou být kombinací lokusů a jedinců, která odráží nedávnou nebo dlouholetou hybridizaci (Gompert et al., 2017).

Z hlediska ekologických interakcí může existence hybridních zón vyplývat z toho, že (Futuyma & Shapiro, 1995):

1. Hybridní jedinci mají menší fitness v důsledku interakce s jejich životním prostředím.
2. Hybridní jedinci jsou úspěšnější než rodičovské genotypy v přechodném nebo novém prostředí, kdy klina HZ odpovídá selekčním koeficientům. HZ zde závisí především na selekci, nezávisle na migraci.
3. Hybridní jedinci jsou méně zdatní, než „čistí“ jedinci kvůli vnitřní genetické inkompatibilitě, bez enviromentální složky přírodního výběru (Futuyma & Shapiro, 1995).

Na základě těchto bodů lze hybridní zóny rozdělit na HZ s **endogenní** nebo **exogenní** selekcí. Exogenní selekce probíhá, když jsou HZ udržovány adaptací na různá prostředí. Endogenní selekce nastává v případě ztráty zdatnosti hybridů uvnitř zóny bez ohledu na vnější prostředí (Barton, 2001). Hybridní zóny, které podléhají ztrátě vnitřní zdatnosti u hybridů, tj. endogenní selekci, jsou popsány tzv. modelem tenzních zón (Gompert et al., 2017). Tyto **tenzní zóny** popsané Key (1968) mají tendenci se tvořit tak, aby se minimalizovala jejich délka (hladká linie zóny kontaktu), přičemž si udržují stabilní tvar a pohybují se v prostředí (Barton & Hewitt, 1985). Předpokládá se, že tenzní zóny jsou situovány v oblastech s nízkou hustotou populace a mohou být udržovány fyzickými bariérami omezujícími migraci (Gompert et al., 2017).

Dalším typem jsou tzv. **mozaikové** hybridní zóny (Vines et al., 2003). Ty jsou velmi vázané na gradienty prostředí a vznikají mezi ekologicky odlišnými druhy hybridizujícími v síti (mozaice) habitatů, kdy časté křížení v malém měřítku, může narušit druhové rozdíly, které by jinak byly zachovány v klasické klinální hybridní zóně. Zejména zde probíhá rychlé narušování neutrální divergence stanovující horní hranici doby, po kterou mohou rozdíly v markerových lokusech přetrvávat (Vines et al., 2003). Mozaiková HZ naznačuje dvě úrovně divergence: strmé přechody mezi populacemi v rámci zóny kontaktu a širokou klinální variabilitu napříč zónou (Rand & Harrison, 1989).

### 1.1.2 Dynamika hybridních zón

Kromě výše uvedených rozdělení existují i hybridní zóny **stabilní** nebo **dynamické** (tj. přechodné nebo kolísavé v geografickém měřítku a s ohledem na genetickou dynamiku; Futuyma & Shapiro, 1995; Pinto et al., 2019). K pohybu hybridní zóny dochází, když má jeden rodičovský druh vyšší zdatnost než druhý, např. díky konkurenčním výhodám, asymetrickým hybridním efektům na fitness nebo změně prostředí

(van Riemsdijk et al., 2019). Teorie naznačují, že hybridní zóny se mohou pohybovat prostorem i v rozsahu desetiletí. Pohyb hybridních zón lze odvodit ze změny orientace introgrese neutrálních alel. Hybridní zóny se mohou pohybovat v reakci na změny prostředí, kvůli rozdílům v kondici mezi jednotlivci, změnám v hustotě populace nebo míře rozptýlení populace v prostoru (Gompert et al., 2017). Dynamické hybridní zóny mohou zahrnovat také oblasti, kde došlo k přemístění organismů kvůli lidské činnosti. Vzhledem k různorodé povaze mnoha stanovišť, je pravděpodobné, že složení současných hybridních zón může být interakcí lokusů a jedinců, která odráží nedávnou i dlouhodobou hybridizaci. Může se například jednat o areály druhů, které v historii opakovaně procházely klimatickými výkyvy (Gompert et al., 2017). Předpokládá se, že úzké hybridní zóny mohou přetrvávat tisíce let za předpokladu, že došlo ke kontaktu mezi populacemi izolovanými v pleistocenních refugiích brzy po ústupu posledního ledovce (Futuyma & Shapiro, 1995). Většina HZ vzniklých sekundárním kontaktem se vytvořila v holoarktické oblasti, přičemž epizody izolace druhu v jižních refugiích, kdy bylo klima na severu nepříznivé, se střídaly s epizodami interakce druhů v severních oblastech (Arntzen et al., 2017). Všeobecně se uznává, že pleistocenní klimatické změny ovlivnily většinu druhů obývajících mírný pás a způsobily posuny nebo fragmentaci areálů, opakovanou možnost sekundárních kontaktů, lokální vymírání nebo demografické výkyvy (Babik et al., 2005). Mimo jiné mohly vést ke vzniku zásadních změn uvnitř a mezi alopatrickými, parapatrickými i sympatrickými populacemi (Futuyma & Shapiro, 1995).

Dynamika hybridních zón je kromě demografických a enviromentálních faktorů řízena také genetickým driftem (Frayner & Payseur, 2021). Drift způsobuje diferenciaci frekvence alel mezi subpopulacemi, což vede ke strmější klině HZ, dokonce i na neutrálních lokusech. Může mít v HZ velký vliv, protože se předpokládá, že hybridní zóny budou v mnoha případech úzké. Pokud je selekce proti hybridům silná, nízká zdatnost hybridů může omezit růst populace. Hybridní zóny se obecně u volně žijících organismů vyskytují na okrajích areálů druhů (s malou hustotou populace), které mohou být navíc velmi fragmentované. Pro pochopení pozorované genetické diferenciace a vlivu driftu v hybridní zóně je pak zásadní informace o genomickém patternu. V průběhu času se uspořádání genů od předků napříč chromozomem mění, protože meiotická rekombinace štěpí segmenty zděděné z každé linie. Migrace má tendenci homogenizovat alelové frekvence mezi subpopulacemi, čímž je zpomalena genomická diferenciace, a navíc může způsobit až úplné nahrazení některého chromozomu, který byl rekombinován (Frayner & Payseur,

2021; Wright, 1931). Drift ovlivňuje rychlost, s jakou jsou části genomů předků fixovány nebo vytraceny z hybridní populace. Začlenění driftu do analytických modelů tedy lépe popisuje chování předků v hybridních populacích. Omezení migrace v metapopulaci může usnadnit tamní adaptaci, zatímco když je migrace vysoká, subpopulace se začínou projevovat jako jedna panmiktická populace. Hybridní zóny mohou zahrnovat migraci i ze zdrojových populací, která HZ doplňuje o kombinace alel z oblastí mimo zóny kontaktu (Fraye & Payseur, 2021).

Obecně platí, že pohyb HZ poskytuje přesvědčivý příklad evoluce v praxi, takže předpoklad, že jsou HZ stabilní je často milné (Gompert et al., 2017). Díky dynamice hybridních zón lze sledovat relativní role selekce a driftu při vytváření asymetrické introgrese a pomáhá vysvětlit, proč určité genomové oblasti (jako mtDNA) pronikají častěji než jiné. Dlouhé hybridní zóny nabízejí možnost pro srovnávací analýzu vzorců klinové shody napříč lokusy a transekty. HZ tak mohou informovat jak o mechanismech izolace druhů, tak o dynamice hybridních zón, např. pokud se úseky HZ liší v ekologických proměnných nebo/v načasování a prostorovém uspořádání sekundárního kontaktu, lze získat pohled na relativní role neutrálních (pasivní difúzi) a adaptivních faktorů (Arntzen et al., 2017).

Introgrese se může mezi genomickými oblastmi lišit v závislosti na síle selekce působící proti nebo ve prospěch výměny genů (Zieliński et al., 2019). Dříve se obecně předpokládalo, že oblasti genomu s vyšší diferenciací jsou méně ovlivněny introgresí, jelikož obsahují geny, které jsou různě distribuované mezi druhy, a jsou spojeny se základní reprodukční izolací. Divergované oblasti v genomu se mohou objevit v úplné izolaci v místech s nízkou rekombinací, kde selekce na propojených místech snižuje diverzitu (Zieliński et al., 2019). Podle van Riemsdijk et al. (2019) se předpokládá, že introgrese způsobená pohybem hybridních zón více ovlivňuje neutrální lokusy distribuované náhodně napříč genomem, což vede ke genetickým stopám vytlačovaných druhů v populacích šířících se druhů. Naopak při adaptivní introgresi mohou alely prostupovat přes hybridní zónu, bez ohledu na to, zda se hybridní zóna pohybuje nebo je stabilní, protože alela přenáší svůj pozitivní efekt. Adaptivní introgrese ovlivňuje lokusy, které jsou na chromozomu blízko sebe (ve fyzické vazbě), anebo lokusy funkčně interagující s jiným lokusem (funkční vazba). Adaptivní introgrese se účastní pouze zlomek genomu, zatímco pohyb hybridních zón vede k introgresi celého genomu. Vliv introgrese je větší pro úzké HZ, kde je selekce proti hybridům větší, protože v úzké HZ je

vzdálenost mezi geneticky odlišnými jedinci menší (van Riemsdijk et al., 2019). Síla i genomové vzorce introgrese se mohou v hybridní zóně lišit, takže je klíčové studovat několik transektů napříč HZ kvůli ověření struktury „genomové krajiny“ z hlediska míry introgrese, která informuje o vlivu izolace napříč areály druhů. Rozdíly v introgresi mezi transektly mohou být způsobeny rozdíly ve stáří sekundárního kontaktu, protože čím delší je uplynulá doba od kontaktu, tím větší šance je na vznik neutrální introgrese. Pokud některý druh vykazuje určitou vnitřní genetickou strukturu, budou různé evoluční linie hybridizovat v různých částech HZ podle odlišného scénáře. A pokud někteří jedinci mají méně alel nekompatibilních s alelami jiného druhu, introgrese by mohla být snazší kvůli slabší selekci proti hybridům. Vnitrodruhové diferenciace v genetické struktuře mohou tedy způsobit různou míru introgrese mezi druhy v zóně kontaktu (Zieliński et al., 2019). Podle Barton (2001) vzniká reprodukční izolace na základě speciace jako vedlejší efekt divergence, která je řízena selekcí. Postzygotická reprodukční izolace může být udržována v prostředí pouze pomocí určitého druhu genové interakce. Hybridní genotypy budou mít tendenci k nižšímu fitness ve srovnání se zdatností jejich rodičů, která je na potomky nepředatelná (Barton, 2001).

Z výše uvedeného vyplývá, že rozsah divergence je dalším faktorem definujícím hybridní zóny (Gompert et al., 2017). Neplatí, že sexuálně vzniklé zygoty se náhodně stanou hybridy; naopak jsou hybridy výsledkem křížení rodičů z různých linií. Důsledkem tohoto křížení je fakt, že HZ budou obsahovat více heterozygotních jedinců a více lokusů se střední frekvencí alel s atypickou vazebnou nerovnováhou (linkage disequilibrium), což je párová asociace mezi lokusy. Spolu s fyzicky nespojenými lokusy je vazebná nerovnováha genu charakteristickým rysem HZ (Gompert et al., 2017).

### 1.1.3 Typy dat využívající se ke studiu hybridních zón

Pomineme-li starší typy dat (zahrnující např. alozymová, jednogenová nebo mikrosatelitní data) lze při studiu hybridní zóny metodami high-throughput sekvenování použít tři typy genomických dat lišících se informací, kterou poskytují (Gompert et al., 2017). 1. Genomická data typu I: zahrnují velký dataset jednonukleotidových polymorfismů (tj. tisíce až stovky tisíc variant; SNP), které jsou analyzovány buď bez referenčního genomu nebo s pomocí velice fragmentovaného genomu. Tento způsob je typický pro genotypování pomocí sekvenování nebo podobné soubory dat (např. RAD sekvenování) generované pro organismy, pro které není k dispozici dobře poskládaný

genom. Do této kategorie spadá i selektivní sekvenování vybraných částí genomu (např. exomy), pro jejichž analýzu je nutné mít pouze referenční transkriptom. Tento typ dat poskytuje dostatečné množství informací k přesnému odhadu klíčových parametrů hybridizace, jako jsou hybridní indexy, frekvence mísení linií a k měření míry a variability introgrese. 2. Genomická data typu II jsou velké datasety SNP, které byly získány namapováním na referenční genom obsahující dlouhé scaffoldy nebo dokonce celé chromozomy. Tato data umožňují přiřadit různé části genomu k parentálním liniím u hybridů a odhadnout míru introgrese a vliv selekce na různá místa v genomu. 3. Genomická data typu III jsou celogenomová resekvenovaná data namapovaná na velmi dobře poskládaný referenční genom, ideálně i dobře anotovaný. Data poskytují kromě výše popsaného i informace o hranicích mezi částmi chromozomů zděděných od parentálních linií a snižují riziko opomenutí některých zásadních evolučních mechanismů ovlivňujících HZ z důvodu nízké chybovosti dat (Gompert et al., 2017).

Spolu s jaderným genomem se při studiu HZ vědci často zaměřují i na strukturu mtDNA dat, která se oproti jadernému genomu liší v mnoha dalších ohledech jako je: ploidie, způsob přenosu, stupeň rekombinace (u většiny živočichů však neprobíhá), efektivní velikost populace, rychlost mutace, opravné mechanismy genomu apod. (Ballard & Whitlock, 2004). Z hlediska populační genetiky je hlavní rozdíl v tom, že je mtDNA haploidní a obvykle se dědí pouze maternálně. To znamená, že existuje jen jedna kopie mtDNA na každou samici, která je předávána do další generace. Naproti tomu jaderný genom má čtyři kopie autosomální DNA (diploidní samci a samice), takže celková efektivní velikost populace mtDNA je čtvrtinová. Dále selekce na mitochondrie působí mnohem mírněji než na jaderný genom a zároveň je míra mutací obecně vyšší než u jaderného genomu, což umožňuje malým populacím akumulovat škodlivé mitochondriální mutace (Ballard & Whitlock, 2004).

Změny v mtDNA genomu hrají zásadní roli při hybridizaci, protože se změny mohou projevit nižší zdatností celého organismu (Ballard & Whitlock, 2004). Účinky mitochondriální zdatnosti jsou závislé na prostředí, ve kterém se organismus nachází, a na jaderném genotypu v organismu. Protože je mtDNA částečně závislá i na jaderném genomu, mohou mutace na proteinech importovaných do mitochondrie zásadně ovlivnit chování mtDNA. Selektce jaderných genů může ovlivnit sledovanou rychlost evoluce v mitochondriích a potenciálně i frekvenci haplotypů mtDNA v populacích (Ballard & Whitlock, 2004).



Kombinace jaderných markerů a mitochondriální DNA poskytuje širší pohled na studované fylogenetické a fylogeografické hypotézy (Toews & Brelsford, 2012). MtDNA se používá k řešení otázek v širším časovém rámci týkající se např. struktury populace, kde je časové měřítko kratší, anebo fylogeneze, kde je časové měřítko mnohem delší. Díky mtDNA lze určit příbuznost sesterských druhů, zejména u sympatrických populací (Ballard & Whitlock, 2004). Také pomáhá sledovat dynamiku HZ, kdy se haplotypy mtDNA nacházejí na různých genetických pozadích jednotlivých linií napříč transektem (Hofman & Szymura, 2007).

Mezi mitochondriálním a jaderným genomem se mohou vytvořit genetické odchylky (Ballard & Whitlock, 2004): Během období geografické izolace (např. v glaciálních refugiích) mohly separované populace akumulovat mutace ve svých mitochondriích i jaderných genomech, které se pomocí selekce nebo genetického driftu rozšířily. Protože dynamika klimatických cyklů není symetrická, nemusí se symetricky projevovat ani změny v genomu v reakci na změny prostředí. Po sekundárním kontaktu tak mohla vzniknout hybridní zóna v důsledku odlišné míry toku genů mezi těmito dvěma genomy. Nejběžnějším projevem těchto inkompatibilit je asymetrická introgrese mtDNA (Melo-Ferreira et al., 2012; Toews & Brelsford, 2012). Vzhledem k tomu, že mtDNA je více náchylná k introgresi než jaderný genom, měla by data odhalovat vzácné hybridizační události, ale už nemusí vypovídat o rozsahu toku genů (Good et al., 2015). Podle Ballard & Whitlock (2004) existují dva hlavní faktory způsobující častější introgresi u mtDNA: selekce a drift. 1. Selekce způsobí introgresi v případě, že fixace alely v jedné populaci způsobené selekcí povede k fixaci stejné alely v druhé populaci. To platí zejména v případě, kdy tyto dvě populace kolonizovaly úplně nové prostředí odlišné od habitatu společného předka. 2. Genetický drift může způsobit fixaci lehce škodlivých alel v malé populaci, což se projeví sníženou fitness oproti jiné příbuzné sympatricky se vyskytující populaci. Selekce pak povede k introgresi mtDNA u populace s vyšší fitness na úroveň druhé populace s nižší fitness.

Inkompatibility mezi mitochondriálním a jaderným genomem mohou být způsobeny adaptivními procesy, pokud selekce upřednostňuje výhodné mitochondriální varianty (Toews & Brelsford, 2012). Demografické rozdíly mohou způsobit inkompatibilitu, pokud mezi dvěma druhy existují velké rozdíly ve velikosti nebo rozšíření populací nebo pokud je u druhu vychýlen poměr pohlaví. Např. je-li poměr pohlaví vychýlen k samicím, bude více podporována introgrese mtDNA kvůli rozdílné produkci potomků. Inkompatibility

může způsobovat i pohyb (dynamika) hybridní zóny, kdy většina jaderných markerů bude následovat geografický posun a mtDNA za sebou zanechá stopu („gene surfing“). U hmyzu má důležitou roli při vzniku inkompatibilit infekce bakteriemi rodu *Wolbachia* (tj. infikované samice křížené s neinfekčním samcem vykazují menší ztráty na kondici; Toews & Brelsford, 2012). Na inkompatibilitu v jaderném nebo mtDNA genomu mohou působit i vnitřní faktory, jako jsou cytonukleární interakce nebo mozaikový vývoj reprodukčního izolačního mechanismu (Reid et al., 2010).

Analýza genetické struktury hybridních populací a modelů zobrazujících distribuci segmentů genomu (a jejich asociací) v prostoru umožňují kvantitativní hodnocení sil působících v hybridních zónách. Hybridní zóny také poskytují pohled na dlouhodobé účinky hybridizace a rekombinace štěpící ko-adaptované genové komplexy, což je proces usnadňující introgresi a zabraňující diferenciaci (Hofman & Szymura, 2007).

#### 1.1.4 Hybridní zóny u parazitů

Dle Boecklen & Howard (1997) jsou hybridní zóny ideální oblasti, ve kterých lze zkoumat mimo jiné i evoluční mechanismy, které jsou základem pro interakce hostele a parazita. Parazité jsou v přírodě všudypřítomní, někteří jsou velmi hostitelsky specifíční a mají těsný koevoluční vztah se svými hostiteli. Vyvíjejí na své hostitele různé selekční tlaky, a tím vznikají různě velké nároky na fitness hostitele (Cozzarolo et al., 2018; Theodosopoulos et al., 2019). Když jsou hostitelské populace na nějaký čas izolovány, divergují jak hostitelé, tak jejich parazité a při sekundárním kontaktu může vzniknout HZ u parazita i hostitele. Častým znakem vysoce specifických parazitů jsou absence volně žijícího stádia a absence mezhospitele. V takovém případě by hybridizace měla proběhnout u parazita stejně jako u volně žijících organismů: podporovat divergenci a odhalovat bariéry toku genů, umožňovat přenos adaptivních vlastností, homogenizovat genotypová uskupení apod. HZ parazitů by měla být však užší než zóna hostitele, protože kratší generační doba parazitů umožňuje větší divergenci (Goüy de Bellocq et al., 2018; Wasimuddin et al., 2016). Hybridní zóny tedy v souvislosti s evolucí hostitele a parazita mohou hrát velkou roli při utváření druhových reprodukčních bariér v oblasti možného křížení a poskytují ideální model pro studium vlivu parazitů na speciaci hostitelů (Cozzarolo et al., 2018). Dopady parazitů na druhové bariéry hostitele, lze také sledovat díky pochopení eko-imunologie, ekologie společenstva parazitů a časoprostorových změn napříč populacemi (Theodosopoulos et al., 2019).

Evoluční historie a způsob života parazita, tj. míra hostitelské specifity, způsob přenosu, složitost životního cyklu a míra prevalence, hrají zásadní roli při utváření genetické struktury v HZ (Goüy de Bellocq et al., 2018). Hostitele většinou parazituje více parazitů najednou (koinfekce), takže je nutné zohlednit i jejich interakce závislé na stavu a imunitě hostitele (Theodosopoulos et al., 2019). Na hybridní zónu lze tedy také nahlížet jako na „sešité“ areály pro podmnnožinu komunity parazitů. Fluktuace prostředí v dlouhodobém horizontu vystavuje mnoho druhů cyklům izolace i hybridizace, které umožňují vznik i takto „sešitých“ areálů pro společenství organismů spojených s hostitelem – holobiontem (hostitel + jeho symbionti/parazit; Goüy de Bellocq et al., 2018). Komunity parazitů se mění s migrací a geografickou distribucí hostitele, danou ekologickými podmínkami v krajině. V lokálním měřítku se parazité mohou přesouvat sezonně a mohou se lišit v závislosti na životním cyklu hostitele. Studium interakcí mezi hostitelem a parazitem v lokálním a regionálním měřítku má největší smysl v případě HZ, které pokrývají velkou geografickou oblast nebo se pohybují v čase (jsou dynamické), což by mohlo vysvětlit variabilitu v interakcích hostitel-parazit nebo přímé a nepřímé vztahy mezi parazity v rámci jednoho hostitele i mezi více hostiteli. Porovnání hybridů a rodičovských organismů následně vede k určení struktury společenstva parazitů a zjištění rychlosti hybridizace a fitness hybridů (Theodosopoulos et al., 2019).

Stále více se ukazuje, že imunitu utvářejí zejména ekologické interakce u volně žijících organismů. U živočichů je imunitní systém nejdůležitější linií obrany proti infekcím způsobených parazity. Imunitní systém je velmi dynamický a rozdíly v síle imunity mohou mít zásadní dopady na fitness a přežití hostitele i přenos parazitů mezi hostiteli. Změny v imunitním systému mohou být způsobeny genetickými rozdíly nebo fenotypovou plasticitou v závislosti na prostředí (Theodosopoulos et al., 2019). Účinek parazitů na druhové bariéry závisí na tom, do jaké míry ovlivňují zdatnost hostitele, což je dáno mj. virulencí parazitů. Virulence se může lišit např. na základě ročního období, genotypu parazita a ekologického kontextu. V případech, kde je virulence parazita příliš nízká, nemusí být selekce proti parazitismu dostatečně silná, aby narušila druhové bariéry: hybridní jedinci nebudou dostatečně zdatní a tok genů mezi rodičovskými populacemi bude omezený. Na druhou stranu, rychle se šířící varianty genomu mohou přednostně obsahovat výhodné (neznámé) geny pro oslabení imunitního systému hostitele. V případech s vysokou virulencí u rodičovských populací, by selekce mohla upřednostnit hybridy, kteří jsou méně ovlivněni parazitem (například díky větší diverzitě imunogenů),

což by potenciálně vedlo ke zpětnému křížení hybridů a toku genů (Goüy de Bellocq et al., 2018; Theodosopoulos et al., 2019).

V oblastech, kde hybridizují odlišné hostitelské linie, by rekombinace napříč generacemi hybridů mohla narušit shluky ko-adaptovaných genů, čímž by se snížila zdatnost hybridů vzhledem k rodičovským genotypům. Také pokud existuje silná specifita mezi parazity a genomem hostitele, může se u hostitele vyvinout specifická rezistence. V tomto případě parazité dále snižují již narušenou životaschopnost hybridních hostitelů, takže hybridy by měli být náchylnější k infekci parazity od obou rodičovských druhů, protože by postrádali odolnost, kterou si rodičovské druhy vyvinuly ke svým specifickým parazitům (Goüy de Bellocq et al., 2018).

Naopak v některých případech mají hybridy prospěch z hybridizace, což se projevuje např. menší infekcí parazitů nebo nižšími náklady na parazitismus. Heterozygotní jedinci mají dostupnost k širšímu spektru rezistentních alel a k tzv. transgresivním vlastnostem, takže hybridy rané generace mohou mít lepší imunitu než rodičovské druhy (tj. hybridní vitalita). Hybridní hostitelé také mívají větší diverzitu MHC alel a další projevy transgresivních znaků souvisejících např. s velikostí těla, svalovou hmotou, a proto jsou schopni lépe bojovat s určitými parazity (Cozzarolo et al., 2018; Theodosopoulos et al., 2019). Ekologický kontext však může hybridy vystavit naopak větší rozmanitosti parazitů, zvýšenému riziku infekce parazity a snižování jejich schopnost reakce na infekci. Dále mohou být hybridy náchylnější vůči parazitismu kvůli kombinaci dalších fyziologických stresorů a omezení zdrojů, může být u nich zaznamenáno snížení kognitivních schopností, metabolismu a atraktivity pro potencionální partnery. Pokud je divergence mezi hybridizujícími druhy vysoká, je pravděpodobné, že vliv parazitismu na hybridy v kombinaci s dalšími mechanismy, které jsou základem pro zdatnost hybridů, povedou ke snížení toku genů mezi rodičovskými druhy a druhové bariéry zůstanou zachovány (Theodosopoulos et al., 2019).

Je také důležité vzít v úvahu toleranci vůči parazitismu (Theodosopoulos et al., 2019). Tolerantní jedinci mohou být velmi parazitováni, a přesto se u nich nemusí neprojevit nepříznivé účinky na fitness. Tolerance může být ovlivněna ekologickými interakcemi a nemusí být konzistentní napříč populacemi. Zároveň pomáhá vysvětlit některé časoprostorové odchylky pozorované v reakci hybridních hostitelů na parazitismus. Selektce vyvolaná parazitismem může podporovat narušení nebo udržování druhové

bariéry díky toku genů mezi rodičovskými druhy nebo nemusí mít žádný vliv na dynamiku HZ. Podle review publikace Theodosopoulos et al. (2019) parazité často usnadňují tok genů mezi rodičovskými druhy hostitelů, což vede k rozpadu druhové bariéry (41 %), ale také omezují tok genů a udržují druhové bariéry (37 %). Nejvíce náchylné druhy na narušení druhové bariéry jsou ptáci, ryby a obojživelníci (Theodosopoulos et al., 2019).

Hostitelé se při sekundárním kontaktu potkají tam, kde prostředí umožní souběžný výskyt obou populací, takže často kolonizují stejné areály jako před izolací (vznik sympatrie; Goüy de Bellocq et al., 2018). Životním prostředím pro parazity jsou však jejich hostitelé. Při kontaktu s více hostiteli mají parazité potenciálně přístup ke dvěma velmi odlišným prostředím v závislosti na divergenci hostitelů a jejich „ko-divergenci“ s parazity. Parazit kolonizující takový nově dostupný prostor („host switching“) by mohl mít výrazně lepší dopad na jeho potomstvo. Pokud se během izolace u parazita vyvine alela rušící účinek genu hostitele, ke kterému je jiný hostitel lhostejný, lze očekávat rychlé rozšíření a introgresi nebo se jedná o adaptaci na nové hostitelské prostředí a konkurenci s již přítomnými parazity, přizpůsobenými tomuto prostředí (Goüy de Bellocq et al., 2018). V případě mimořádně velké divergence mohou parazité různě speciovat v systému, kde jejich hostitelé stále hybridizují při sekundárním kontaktu. Ve fázi sekundárního kontaktu parazitů jsou jeho následující generace buď konkurenčně vyloučeny, udržují koexistenci nebo následují hostitele. Tento extrém je důležitý pro odhad ko-fylogeneze hostitele/parazita (Goüy de Bellocq et al., 2018). Účinky parazitismu se obecně liší v závislosti na komunitě parazitů a časoprostorovému uspořádání v rámci hybridní zóny (Theodosopoulos et al., 2019). Pokud se hostitelé žijící sympatricky vyskytují na stejných místech jako před izolací (geografickou i časovou), může být narušen vysoce specifický vztah mezi hostitelem a druhem parazita. Sympatrie tedy není vždy vhodným indikátorem pravděpodobnosti průchodu parazita přes HZ hostitele (Wasimuddin et al., 2016).

Identifikace funkčních znaků, jako jsou rezistentní alely, které budou pravděpodobně podléhat introgresi v hybridní zóně nebo změni výsledné fitness infikovaných jedinců, tak odhalí druhové bariéry (Theodosopoulos et al., 2019). Promíchání v genomech hybridních organismů může vést k variabilitám mimo jiné v jejich imunologické funkci (např. rekombinace alel imunitního genu) a ekologických interakcích (např. využívání stanovišť, kompetice o zdroje). Taková variabilita může mít výrazně ovlivnit reakce hostitele na parazitismus (Theodosopoulos et al., 2019). Odpověď genotypu parazita na genotyp hostitele může být hodnocena podél genetického kontinua (hybridní index). Lze vytvářet

a testovat lineární a nelineární modely, které zachycují základní biologické rysy pro hypotézy založené na jednoduchých kategoriích (Boecklen & Howard, 1997)

Selekce proti hybridům je nezbytná pro udržení vazebné nerovnováhy a šířky klíny, přičemž hostitel je jedním z hlavních faktorů pro odhadnutí prevalence a diverzity (Cozzarolo et al., 2018). Tvar klíny hybridní zóny parazita bývá také strmější než jejich hostitele, což naznačuje, že hybridizace parazita může být omezenější než hybridizace hostitele. Omezení hybridizace parazitů zřejmě vyplývají z kombinace faktorů, tj. vnitřní selekce proti hybridům spojená se selekcí parazita a vnějšího prostředí, kterou uplatňují jejich hostitelé, interakce s ostatními holobionty, vnější bariéry působící na hostitele, přičemž všechny vnitřní bariéry holobionta mohou podléhat genetickým vazebným silám (Goüy de Bellocq et al., 2018).

Příkladem hybridní zóny ve vztahu hostitele a parazita je HZ tvořená *Mus musculus domesticus* (myši západoevropskou) a *Mus musculus musculus* (myši střeoevropskou), a několika parazitickými organismy s různou mírou hostitelské specifity (Kváč et al., 2013). Poddruhy myši ve střední Evropě vytvářejí HZ se silnou centrální bariérou pro tok genů a několik studií se věnovalo struktuře parazitů napříč transektem svých hostitelů. Studie myšního cytomegaloviru (MCMV) a kryptosporidií druhu *Cryptosporidium tyzzeri* odhalily vyšší míru diverzifikace parazita oproti hostitelům; existenci dvou odlišných linií parazita, kdy každá z nich infikovala jiný poddruh myši (Čížková et al., 2018; Kváč et al., 2013). Navíc nebyla prokázána hybridizace parazitů uvnitř HZ, přestože se v laboratorních podmínkách povedlo úspěšně zkřížit *C. tyzzeri* z obou linií. Odlišnou populační strukturu parazita objevili Wasimuddin et al. (2016), kteří se zabývali hostitelsky vysoce specifickou hlísticí *Trichuris muris* ve stejné oblasti HZ poddruhů myši domácí. Přestože by se dalo očekávat, že parazit s přímým hostitelským cyklem a nepohyblivým volně žijícím stádiem, který infikuje nové hostitelé, bude ko-speciovat se svým hostitelem, nenásledoval parazit v tomto případě svého hostitele, ale genetický tok mezi oběma poddruhy myši napříč HZ byl udržován pomocí alternativních hostitelů (především myšic rodu *Apodemus*; (Wasimuddin et al., 2016). Existenci hybridní zóny u dvou parazitických organismů napříč HZ myši domácí detekovali Goüy de Bellocq et al. (2018). U houby *Pneumocystis murina* a hlístice *Syphacia obvelata* zjistili, že díky vyšší mutační rychlosti parazitů je jejich HZ signifikantně užší oproti HZ jejich hostitelů (Goüy de Bellocq et al., 2018).

Dalším příkladem je HZ tvořená lesňáčky *Setophaga coronata coronata* a *S. c. auduboni* ve Skalnatých horách (USA), u kterých byly zkoumány hemosporidie (*Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon*) a jejich vliv na hybridní jedince, rodičovské poddruhy a vytváření postzygotických reprodukčních bariér (Cozzarolo et al., 2018). Bylo zjištěno, že prevalence, intenzita ani diverzita parazitů se významně nelišila napříč HZ hostitelů. Jako významný faktor ovlivňující parazitěmii se ukázala nadmořská výška (Cozzarolo et al., 2018).

## 1.2 Model *Apodemus-Polyplax*

### 1.2.1 Distribuce myšic r. *Apodemus*

Myšice rodu *Apodemus* jsou běžně se vyskytujícími druhy hlodavců v Evropě (palearktické oblasti), přičemž nejrozšířenějšími jsou myšice *Apodemus sylvaticus* a *Apodemus flavicollis* (Martinů et al., 2018). Tyto dva fylogeneticky (odděleny před 4 mil. let) i ekologicky velice příbuzné druhy se liší svou čtvrtohorní evoluční historií. Během posledního glaciálního období tyto druhy odlišně reagovaly na klimatické oscilace a uchýlily se do odlišných refugií. Konkrétně *A. sylvaticus* prošel výrazným hrdlem lahve („bottleneck“) během zalednění a usadil se v refugiu na Pyrenejském poloostrově a v oblasti Apeninského a Balkánského poloostrova, zatímco *A. flavicollis* se uchýlil do několika velkých refugií, které se nacházely na území Apeninského a Balkánského poloostrova, dnešního Turecka a na Blízkém východě. Po oteplení oba druhy rekolonizovaly Evropu, kdy *A. sylvaticus* migroval zejména z Pyrenejského poloostrova (ostatní populace byly izolovány pohořími) a *A. flavicollis* se rozšířil hlavně z oblasti Apeninského a Balkánského poloostrova (Michaux et al., 2005).

Na základě fylogeografické analýzy (Martinů et al., 2018) vytvářejí myšice *A. flavicollis* dvě mitochondriální linie, jejichž geografická distribuce se z velké části překrývá a často se vyskytují sympatricky na identických lokalitách. Multilokusové analýzy ukázaly, že po sekundárním postglaciálním kontaktu následoval frekventovaný tok genů, a rekolonizované populace se promíchaly napříč Evropou. Na území severozápadních Čech pak utvořily panmiktickou populaci (nepublikovaná SNP data kolegů). Druh *A. sylvaticus* se podle mtDNA analýz rozdělil do tří geneticky odlišných klastrů (Martinů et al., 2018), jejichž bližší popis není nutné zde uvádět vzhledem k tomu, že tento druh myšice není hostitelem podílejícím se na vzniku HZ linií parazita studovaného v této práci (viz níže).

### 1.2.2 Hostitelská specifita vší *Polyplax serrata*

Veš *Polyplax serrata* je trvalým (permanentním) krev sajícím parazitem s vysokou hostitelskou specifitou (Martinů et al., 2020). Přenáší se téměř výhradně při fyzickém kontaktu hostitelů a vykazují velmi vysokou úroveň koevoluce se svým hostitelem. Genealogie linií vší *P. serrata* a jejich hostitelských druhů rodu *Apodemus* je velice komplexní a závisí na mnoha ekologických rysech (Martinů et al., 2018). Především nejednotná evoluční historie nejběžnějších evropských druhů *A. sylvaticus*, *A. flavicollis* a *A. agrarius* měla dopad na genealogie jejich parazitů, včetně endoparazitických helmintů a ektoparazitů, jako jsou vší *P. serrata*. V důsledku různých generačních dob, a tedy i rychlosti molekulární evoluce, mohou populace hostitele a parazita dospět do různých stupňů genetické diferenciace během své separace (např. v refugiích; Martinů et al., 2018).

Fylogenetická analýza založená na mtDNA fragmentu pro cytochrom oxidázu I (COI) ukázala, že se vší *P. serrata* rozdělily do několika linií s odlišnou mírou hostitelské specifity (Martinů et al., 2018; Štefka & Hypša, 2008). Za prvé na linii Aa parazitující na *A. agrarius* a *A. uralensis*. Za druhé linie Asp parazitující *A. peninsulae*. Tyto dvě linie se vyskytují spíše na Blízkém východě a centrální Asii, nicméně jejich areály zasahují i do střední Evropy. Dále na linii N (nespecifickou), která parazituje jak *A. sylvaticus*, tak *A. flavicollis* na celém území Evropy. Považuje se za více generalistickou a také by měla mít vyšší úroveň toku genů, protože má více příležitostí na nalezení vhodného hostitele (Martinů et al., 2018). Poslední mitochondriální linií je linie S (specifická), parazitující pouze *A. flavicollis*. V linii S se projevuje nízká genetická diverzita a vyšší úroveň izolace (Martinů et al., 2018). Zároveň u linie S vznikla zajímavá situace. Navzdory obecným předpokladům o distribuci parazita následující svého hostitele, při postglaciální rekolonizaci linie S neutvořila jednotlivou populaci napříč Evropou jako její hostitel, ale vytvořily se dva geneticky odlišné klastry (mitochondriální sublinie) se vzájemně exkluzivní distribucí a úzkou zónou kontaktu. Tyto dvě haplotypové sublinie, SW (specifická západní) a SE (specifická výhodní), se neprolnuly v místě sekundárního kontaktu narozdíl od svého hostitele *A. flavicollis* (Martinů et al., 2018, 2020).

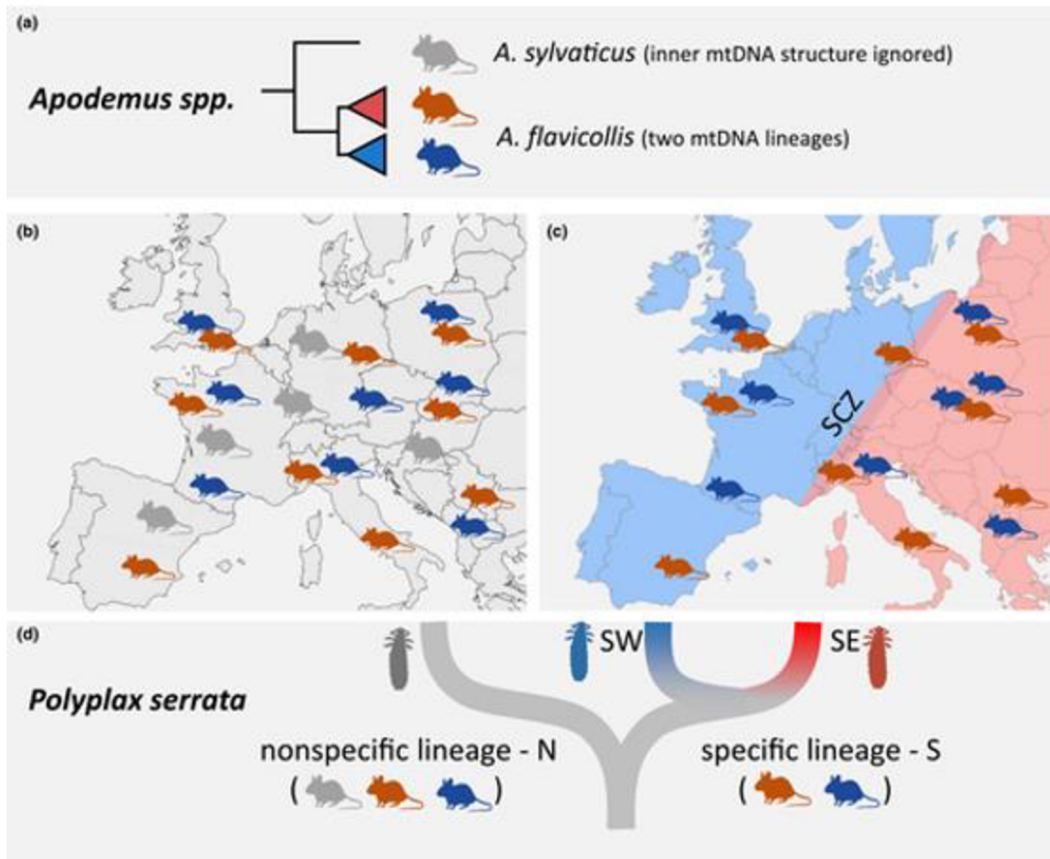
K získání první představy o projevu sekundárního kontaktu na evoluci vší *P. serrata* byly analyzovány Martinů et al. (2020) tři druhy metagenomických dat: 1. Jaderné SNP. 2. Kompletní mitochondriální genomy, které jsou u vší *P. serrata* rozděleny do 11 minichromozomů. 3. Kompletní genomy symbiotické bakterie *Legionella polyplacis*.



Neschopnost dvou populací překročit sekundární zónu kontaktu naznačuje, že během rekolonizace sehrály roli i jiné faktory než distribuce hostitele nebo diferenciace genomu parazita uvnitř refugia. Zdatnost anebo reprodukce krev sajícího hmyzu často závisí na různých bakteriálních symbiontech (jako je *L. polyplacis* u vši *P. serrata*). Těsnost vztahu hostitele a symbionta může v těchto situacích vést k metabolické spolupráci mezi jejich genomy. Dlouhodobá izolace v refugiích by tak mohla vyústit ve specifické adaptace genomu vši a symbionta, které by znamenaly nekompatibilitu jejich genomů při sekundárním kontaktu (Martinů et al., 2018). Genomy *L. polyplacis* podle Martinů et al. (2020) odhalily fylogenetickou strukturu shodnou s mtDNA u linií SW a SE.

Vznik hybridní zóny u specifické linie vši *P. serrata* lze obecně nejlépe vysvětlit hypotézou, kdy během separace během čtvrtohorního zalednění dosáhly obě linie (SW a SE) výrazné genetické diferenciace, což mělo za následek vznik silné (ale ne absolutní) postzygotické bariéry při sekundárním kontaktu. V důsledku křížení mezi liniemi SW a SE jsou produkováni hybridi, u nichž se předpokládá snížená životaschopnost (Martinů et al., 2020). Navíc relativně nízká prevalence (9 %) vši *P. serrata* má za následek malou efektivní velikost populace, což urychluje genetický drift a fragmentaci populací. Parazité bez volně žijících stádií a mezihostitelů mají obecně také vychýlený poměr pohlaví směrem k samicím, což může ovlivnit proces introgrese po sekundárním kontaktu (Martinů et al., 2018). Schopnost šíření parazitů je do velké míry dán sociálním uspořádáním a disperzí hostitele. Parazitické vši mají po celý život jako jediné životní prostředí svého hostitele, takže jejich možnosti šíření jsou omezeny na přímý kontakt mezi hostitelskými jedinci (Martinů et al., 2018). Z pohledu hostitele HZ parazita funguje v mikroevolučním měřítku jako zóna přesunu parazitů („parasite turnover zone“), kdy hostitelští jedinci „volně přecházejí“ z jedné oblasti do oblasti druhé, ale SE a SW linie zůstávají v jedné nebo druhé oblasti (Martinů et al., 2020).

Model *Apodemus-Polyplax*, s několika druhy hostitelů a liniemi parazita s odlišnou preferencí hostitelů a evoluční historií tedy poskytuje výčet důkazů o tom, že i mírný posun v hostitelské specifitě (N vs. S) se může promítat v rozdílné genetické charakteristice populace parazitů (Martinů et al., 2018). Shrnutí modelu *Apodemus-Polyplax* je vyobrazeno na Obr. 1.



Obr. 1: Shrnutí vztahů modelových organismů: myšic r. *Apodemus* a vší *Polyplax serrata*. Převzato z: <https://doi.org/10.1111/mec.15653>. (a) Hlavní fylogenetické vztahy myšic r. *Apodemus*. (b) Sympatrická distribuce myšic r. *Apodemus* v Evropě. (c) Dvě mitochondriální linie hostitele *A. flavicollis* a distribuce specifických linií vší *P. serrata* (modrá plocha – SW; červená plocha – SE). Oblast sekundárního kontaktu hostitelů (SCZ) a hybridní zóna linie S (fialový pruh). (d) Sesterské linie vší *P. serrata* (S, N) s odlišnou mírou hostitelské specifity a bližší uspořádání linie S (rozdělené na SW a SE linii).

## 2 Cíle práce

Tato práce je zaměřena na evoluční model koevoluce hostitele a parazita, kde jsou modelovými organismy myšice *Apodemus flavicollis* (jako hostitel) a veš *Polyplax serrata* (jako parazit). Jedna ze sesterských linií vší *P. serrata* vytvořila hybridní zónu v oblasti sekundárního kontaktu jejího hostitele.

Pro studium hybridní zóny linie S vší *P. serrata* byly vytyčeny následující cíle:

1. Vypracování stručné literární rešerše o hybridních zónách a shrnutí modelu *Apodemus-Polyplax*.
2. Určení typu hybridní zóny.
3. Odhadnutí geografické šířky hybridní zóny pro jaderné a mitochondriální lokusy.

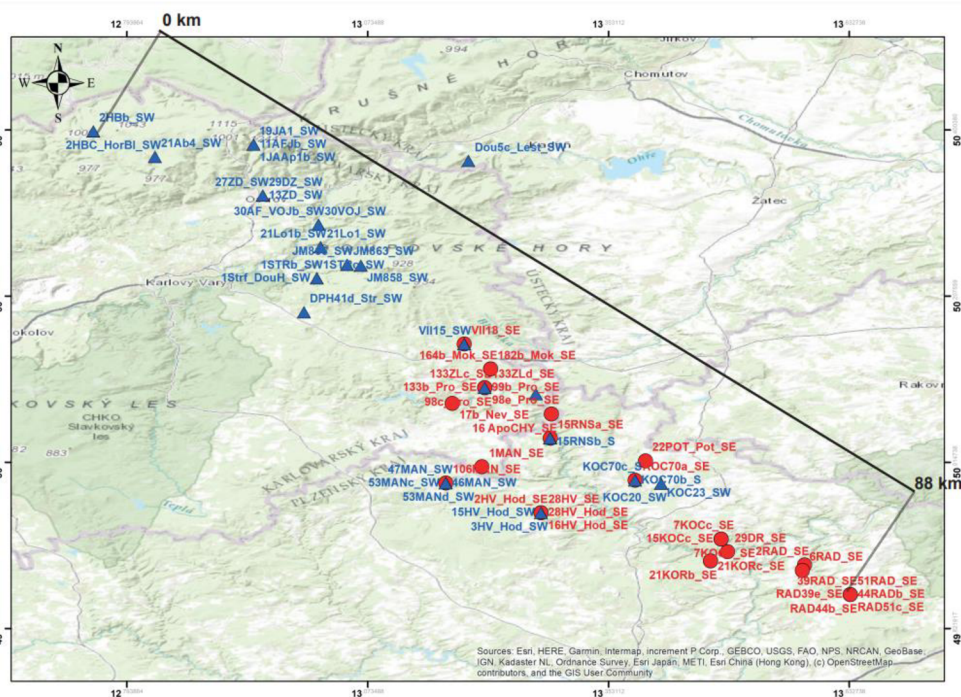
Splnění těchto cílů zahrnovalo:

- Sběr vzorků v terénu
- Molekulární zpracování dat
- Bioinformatické zpracování dat (pro SNP dataset, mtDNA a jaderné kontigy)
- Zjištění frekvence linií SW a SE napříč transektem
- Zjištění struktury hybridní zóny
- Porovnání jaderného a mitochondriálního genomu

### 3 Materiál a metody

#### 3.1 Odchyt hostitelů a směr materiálu

K získání vši *Polyplax serrata* ze specifické linie bylo nejprve nutné odchytil jejich hostitele, myšice lesní (*Apodemus flavicollis*). Odchytové lokality byly stanoveny na základě předchozích studií (Martinů et al., 2018, 2020) v oblasti nejpravděpodobnějšího výskytu hybridní zóny napříč Evropou. Tato práce je zaměřena na oblast severo-západní části České republiky a zahrnuje celkem 23 lokalit (Obr. 2). Myšice *A. flavicollis* byly na lokalitách chytány do klasických dřevěných sklapovacích (tj. mrtvochytných) pastí a z lokalit do laboratoře přemístěny v papírových sáčcích. V laboratoři byly nejprve z hostitelů získány enviromentální stěry z kůže. Následně byli z myšic vyčesáni a odebráni ektoparazité pomocí zubního kartáčku, pinzety a filtračního papíru a uchováni v 1,5 ml mikrozskumavkách (Eppendorf) se 100 % ethanolem. Nejčastějšími ektoparazity byla klíšáta, roztoči, blechy a v neposlední řadě vši. Vzhledem k nemožnosti určení myšic *A. flavicollis* a *A. sylvaticus* do druhu na základě morfologických znaků, byl dále pro potřeby pozdější molekulární determinace odebrán kus tkáně hostitele (prsty) a pro potřeby další studie jim byla vypreparována slezina. Veškeré tkáně byly uloženy do čistého lihu a uchovány v -20°C. Autorka této práce se účastnila 4 terénních výjezdů a v laboratoři se podílela na molekulárním určení 20 myšic do druhu a mitochondriální determinaci 20 jedinců *P. serrata*.



Obr. 2: Studovaný transekt na SZ Čech v oblasti hybridní zóny.

### 3.1.1 Izolace hostitelské DNA

Pro druhové určení hostitelů byl použit 0,5 cm velký kus tkáně. Při práci s hostitelskou tkání byly v každém kroku sterilizovány laboratorními nástroje pomocí ethanolu a sterilizátoru nástrojů (Schuett Solaris). Kvůli odstranění nadbytečného ethanolu byla odstřižená tkáň umístěna na 30 min. do vakuového koncentrátoru (Eppendorf). Samotná izolace DNA byla provedena pomocí izolačního kitu DNeasy Blood & Tissue Kit od společnosti QIAGEN podle přiloženého protokolu *Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)*.

Pro zvýšení efektivity izolace byl protokol upraven ve dvou bodech: Po přidání ATL pufru (180 µl) byl kus tkáně rozstříhán nůžkami na menší kusy. Dále namísto 200 µl elučního pufru AE bylo použito 80 µl a inkubační doba pro eluci DNA přes kolonku byla prodloužena z 1 min. na 5 min. při pokojové teplotě.

### 3.1.2 Spektrofotometrie, PCR a gelová elektroforéza

U vyzolované DNA byla ověřena čistota a dostatečná koncentrace pomocí vysoce citlivého spektrofotometrického měření v přístroji NanoPhotometer P330 (Implen). Pro kalibraci přístroje byl použit 1 µl elučního AE pufru. Při koncentraci vyšší než 100 µl bylo nutné izoláty rozředit v poměru 1:9 (DNA:PCR ultračistá voda od firmy Top-Bio).

Dle (Michaux et al., 2001) byla pro molekulární rozlišení dvou hostitelských druhů (*A. flavicollis*, *A. sylvaticus*) použita nukleotidová sekvence části mitochondriálního genu pro cytochrom b (265–290 bp) (viz. Tab. I.). K namnožení části genu sloužila polymerázová řetězová reakce (PCR). Reakční směs o celkovém objemu 25 µl byla namíchána z reagensů uvedených v Tab. II. Spolu se vzorky byla vždy namíchána negativní kontrola, což byla stejná reakční směs, jaká je uvedena v Tab. II., ale bez vzorku DNA. DNA *A. flavicollis* a *A. sylvaticus* byla použita jako pozitivní kontrola PCR reakce.

Tab. I. Sekvence PCR primerů pro determinaci hostitelů.

Hostitel	Primer	Sekvence
<i>Apodemus flavicollis</i>	FlaUP (forward)	5'-AGCTACACTAACACGTTTC-3'
<i>Apodemus flavicollis</i>	FlaDN (reverse)	5'-GCGTATGCAAATAGGAAGTAC-3'
<i>Apodemus sylvaticus</i>	SylUP (forward)	5'-GAGGAGGATTCTCAGTAGAC-3'
<i>Apodemus sylvaticus</i>	SylDN (reverse)	5'-TTAATATGGGGTGGGGTGTTA-3'

Tab. II. PCR reagencie pro determinaci hostitelů.

<b>Množství (μl)</b>	<b>Reagencie</b>
12,5	2× PPP Master Mix (Top-Bio): buffer, polymeráza, MgCl <sub>2</sub> , dNTPs
9,5	PCR ultračistá voda (Top-Bio)
1	forward-primer (10μM)
1	reverse-primer (10μM)
1	izolovaná hostitelská DNA (10 ng/μl)

PCR reakce probíhala v přístroji Mastercycler X50s (Eppendorf). Časy jednotlivých fází PCR a počty cyklů byly nastaveny dle doporučení v protokolu výrobce PPP Master Mixu (viz. Tab. III.). Dále byla nastavena teplota nasedání primerů podle (Michaux et al., 2001).

Tab. III. Fáze PCR programu.

<b>Fáze cyklu</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>	<b>Počet cyklů</b>
Počáteční denaturace	95 °C	5 min	1
Denaturace	94 °C	20 s	
Nasedání primerů	52 °C	30 s	33
Syntéza DNA	72 °C	1 min	
Konečná syntéza DNA	72 °C	10 min	1
Udržovací teplota	10 °C		

Úspěšnost PCR reakce byla ověřena pomocí gelové elektroforézy. Na přípravu 1 % agarózového roztoku bylo použito 0,4 g agarózy, 40 ml TE-pufry a 1 μl barviva GelRed (Biotum). Barviva bylo použito méně (2 μl na 50 ml), než je doporučeno výrobcem, ale bylo zcela dostatečné. K určení přibližné velikosti PCR fragmentů byl do první jamky ztuhlého gelu přidán 1 μl 100 bp Plus DNA Ladder (GeneRuler 100bp Plus) (Thermo Scientific), do dalších jamek v gelu bylo napipetováno 4-5 μl PCR produktu a také pozitivní a negativní kontrola z předchozího kroku. Poté byla provedena fotodokumentace gelu pod UV světlem za pomoci programu Alliance 4.7 a dokumentačního systému UVITEC (Uvitec Cambridge). Podle přítomnosti nebo absence PCR produktů o odpovídající velikosti fragmentů s dvojicemi Syl a Fla primerů byly vzorky přiřazeny k příslušnému hostitelskému druhu (*Apodemus flavicollis* nebo *Apodemus sylvaticus*).

## 3.2 Analýza struktury populace vší *Polyplax serrata*

### 3.2.1 Determinace vší

Pomocí stereomikroskopu Nikon SMZ745T byly vší vyříděny od ostatních ektoparazitů a dále na základě morfologie určeny do druhu (Ferris et al., 1923; Smetana et al., 1965; Wegner et al., 1974). Následně byly vybrány vší *Polyplax serrata*, změřeny a vyfotografovány pomocí softwaru Motic Images Plus (Motic). Při manipulaci s parazity bylo pracováno se sterilními nástroji stejně jako při manipulaci s hostitelskou tkání.

### 3.2.2 Molekulární zpracování DNA

Pro určení příslušnosti jedinců *P. serrata* do Specifické (S) nebo Nespecifické (N) linie bylo z důvodu absence morfologických odlišností nutné podrobit jednotlivé vší molekulárnímu zpracování. Extrakce DNA vší probíhala obdobně jako tomu bylo u izolace hostitelské DNA. Při izolaci byl použit izolační kit QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN) a protokol *Isolation of Genomic DNA from Tissues*. DNA byla izolována do 25 µl AE pufru. Reakční směs pro PCR o objemu 25 µl byla připravena z reagensů uvedených v Tab. IV.

Tab. IV. PCR reagensie pro determinaci vší.

Množství (µl)	Reagensie
12,5	2× PPP Master Mix (Top-Bio): buffer, polymeráza, MgCl <sub>2</sub> , dNTPs
9,5	PCR ultračistá voda (Top-Bio)
1	forward-primer (10µM)
1	reverse-primer (10µM)
1	izolovaná DNA vší (0,5-1 ng/µl)

Byla amplifikována část mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu I (COI; 379 bp) podle Hafner et al., (1994) (viz. Tab. V.). Starší izolát DNA vší stejného druhu byl použit jako pozitivní kontrola. Byla namíchána i negativní kontrola.

Tab. V. Sekvence PCR primeru pro amplifikaci DNA vší.

Primer	Sekvence
forward L6625	5'-CCGGATCCTTYTGRTTYTTYGGNCAAYCC-3'
reverse H7005	5'-CCGGATCCACNACRTART ANGTRTCRTG3'



Program použitý k průběhu PCR byl podobný jako v předchozí kapitole, v tomto případě ale byla teplota nasedání primerů snížena na 50 °C. Úspěšný průběh PCR byl ověřen pomocí gelové elektroforézy. PCR produkty o správné velikosti byly dále enzymaticky přečištěny, aby došlo k odstranění nežádoucích krátkých produktů PCR a primerů. Enzymatická směs ExoCleanUp FAST (VWR) obsahovala termolabilní exonukleázu I (HL-ExoI) a rekombinantní alkalickou fosfatázu z krevet (rSAP). Přidaný objem směsi byl oproti protokolu od výrobce (2 µl ExoCleanUp FAST na 5 µl PCR produktu) upraven na 4 µl ExoCleanUp FAST na 20 µl PCR produktu. Takto přečištěné vzorky byly odeslány na celogenomové sekvenování firmě SEQme (<https://www.seqme.eu/en/sanger-sequencing/>). Většina vzorků byla získána a zpracována v předchozích etapách týmem podílejícím se na GAČR projektu. V rámci této práce autorka provedla izolaci DNA a molekulární určení 20 vší *Polyplax serrata*.

### 3.2.3 Bioinformatické zpracování

Data získaná ze sekvenace byla v programu Geneious Prime (<https://www.geneious.com/>) zařazena do celoevropského datasetu, který zahrnoval vší *Polyplax serrata* z linie specifické (SE, SW) i nespecifické (N), získaného v předchozích fázích výzkumu. Na základě haplotypové sítě vytvořené v programu PopART (<https://popart.maths.otago.ac.nz/>), ze které bylo možné určit příslušnost každého vzorku k jednotlivým liniím, v tomto případě konkrétně k linii SE nebo SW, bylo napříč sledovaným transektem vybráno 100 vhodných jedinců, jejichž genomy byly odeslány na resekvenaci do Roy J. Carver Biotechnology Center (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA; <https://research.illinois.edu/researchunit/roy-j-carver-biotechnology-center>).

Analýzy metagenomických dat bylo nutné provést pomocí bioinformatické pipeline (Martinů et al., 2020) instalované na výpočetním serveru Katedry parazitologie. Nejprve program Bowtie2 (<https://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/manual.shtml>) namapoval ready každého ze 100 resekvenovaných vzorků na referenční genom *Polyplax serrata*. Jako referenční genom byl použit genom jedince z linie N, protože nespecifická linie je sesterským druhem S linie a geneticky stejně vzdálená jak k linii SE (specifická východní), tak k linii SW (specifická západní; (Martinů et al., 2020). Pomocí programu Qualimap (<http://qualimap.conesalab.org/>) bylo ověřeno správné namapování jednotlivých vzorků na referenci a dostatečné pokrytí všech kontigů. Následně byl pomocí programu SAMtools



(<https://www.htslib.org/>) dataset zbaven duplicitních sekvencí, které vznikají při PCR nebo chybou sekvenčního přístroje, a byly vytvořeny indexy pro jednotlivé vzorky umožňující další zpracování dat. V programu GATK4 (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>) bylo následně provedeno genotypování jednotlivých vzorků, sloučení všech vzorků do jednoho datasetu a vyhledání variabilních pozic (SNPs) napříč genomickými lokusy. Pomocí programu VCFtools (<https://vcftools.sourceforge.net/>) bylo zjištěno procentuální množství chybějících dat napříč jednotlivými vzorky. Filtrování SNPs bylo provedeno v programu PLINK (<https://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>). Dataset byl nejprve podroben tzv. MAF filtrování odstraňující varianty s nízkou frekvencí alel, která byla nastavena na 0,05 (5 %). Pro další analýzu bylo nutné odstranit SNPs ve vazebné nerovnováze (Linkage disequilibrium – určující nenáhodnou asociaci mezi geny). Pro vyjádření vazebné nerovnováhy byla v programu PLINK použita hodnota  $r^2$  ( $r^2$  value). Výsledná hodnota  $r^2$  byla stanovena na 0,2, což je standartně používaná hodnota a dataset byl tímto způsobem profiltrován na SNPs ve vazebné rovnováze a bialelické lokusy.

Populační struktura S linie byla vyhodnocena pomocí několika různých přístupů. Profiltrovaný dataset byl analyzován programem Admixture, který metodou maximum likelihood odhadl původ každého jedince a optimální množství K, které lze chápat jako počet genetických klastrů (populací). Celkem bylo provedeno 5 nezávislých běhů pro hodnoty K1-K10. Další použitou analýzou byla PCA neboli analýza hlavních komponent, která umožňuje transformovat počet dimenzí mnohorozměrných dat. PCA analýza pro celogenomový dataset (SNP) byla provedena v RStudios s balíky programů gdsfmt, SNPRelate, ggplot2, ggrepel a GWASTools.

Jedním ze způsobů, jak nahlédnout na detailnější strukturu hybridní zóny je klinální analýza. V tomto případě byla klinální analýza provedena pomocí softwarového balíčku HZAR v programu RStudio. Ve vstupním souboru byla pro každý vzorek uvedena geografická vzdálenost podél osy hybridní zóny (Obr. 2), výsledné frekvence původu vzorků z analýzy softwaru Admixture pro K2 a příslušnost ke genetickým klastrům SE, SW nebo hybridí (určené dle výsledků analýz Admixture a PCA). V HZAR byla nejprve metodou maximum likelihood zjištěna nejpravděpodobnější podoba klíny kombinací 15 různých parametrů (scaling= "none", "fixed", "free" a tails= "none", "right", "left", "mirror", "both"). Dále byla dvakrát optimalizována výsledná podoba klíny, která nejlépe

odpovídala rozložení vstupních dat. Na bioinformatickém zpracování dat se autorka podílela v plném rozsahu.

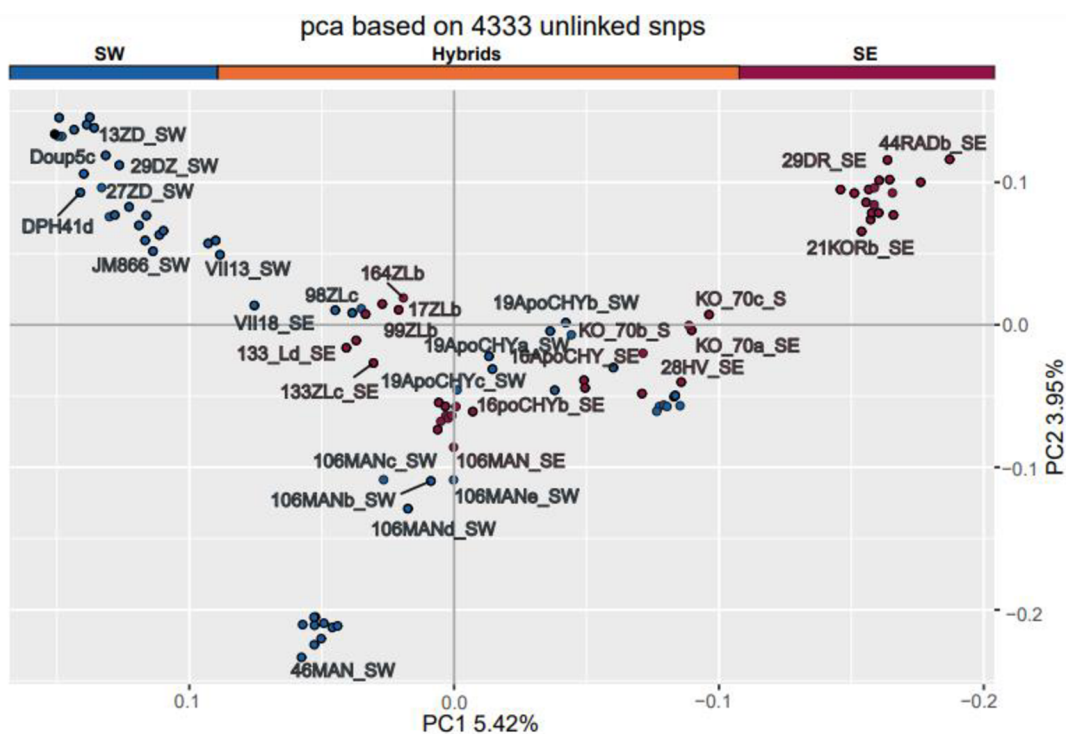
#### 3.2.4 Mitochondriální dataset

Ke studiu struktury hybridní zóny byl kromě jaderného datasetu použit i mitochondriální dataset *Polyplax serrata*. K analýze byly použity všechny sekvence COI (gen pro podjednotku cytochrom oxidázy I, 379 bp) z S linie získané k určení vší *P. serrata* do S a N linie (kap. 1.2.2) ze stejné oblasti, z které byla získána metagenomická data. Podobně jako u celogenomového datasetu byla i v tomto případě vytvořena v programu PopART haplotypová síť, podle níž bylo možné jednotlivé vzorky přiřadit do příslušné linie (SE nebo SW). Do mtDNA datasetu bylo použito celkem 151 vhodných jedinců. Podle počtu SE a SW vzorků na každé lokalitě byla vypočítána frekvence zastoupení linií po lokalitách a ty následně vyneseny do grafu vytvořeného v Structure plot V2.0. Zjištěné frekvence byly dále analyzovány softwarem HZAR (RStudio) stejným způsobem jako jaderné SNP (kap. 3.2.3).

## 4 Výsledky

Celkem bylo napříč transektem odchyceno 987 myšic (r. *Apodemus*), z čehož 441 myšic bylo molekulárně určeno jako druh *Apodemus flavicollis*. U 56 myšic *A. flavicollis* bylo celkem nalezeno 212 vší *Polyplax serrata*, takže prevalence činila 12,2 %. Z toho bylo na základě molekulárního určení přiřazeno 197 vší k linii S a 15 vší k linii N. Následně bylo 60 vší stanoveno jako linie SE a 101 jako linie SW na základě mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu I (COI; 379 bp).

Po bioinformatickém zpracování datasetu z celogenomového resequencingu bylo získáno 4 878 614 jaderných SNP pro 100 vybraných jedinců (Tab. VI.). Pak bylo metodou PCA v programu R analyzováno 4 333 nezávislých SNP. Grafický výstup PCA analýzy je zobrazen na Obr. 3.



Obr. 3: Výsledek PCA.

Tab. VI. Seznam vzorků pro SNP dataset.

Vzorek	Lokalita (zkratka)	Z. šířka	Z. délka	Vzdálenost na ose (km)	Genetická linie
2HBb_SW	Horní Blatná (HB)	50.3977	12.759836	0	SW
2HBc	Horní Blatná (HB)	50.3977	12.759836	0	SW

**Pokračování Tab. VI.**

<b>21Ab4_SW</b>	Albertamy (AB)	50.369558	12.82884	3.2	SW
<b>19JA1_SW</b>	Jáchymov (JACH)	50.390639	12.903343	14.24	SW
<b>11AFJb_SW</b>	Jáchymov (JACH)	50.390639	12.903343	14.24	SW
<b>1JAAp1b_SW</b>	Jáchymov (JACH)	50.390639	12.903343	14.24	SW
<b>27ZD_SW</b>	Dolní Žďár (DZ)	50.323875	12.951385	17.8	SW
<b>29DZ_SW</b>	Dolní Žďár (DZ)	50.323875	12.951385	17.8	SW
<b>13ZD_SW</b>	Dolní Žďár (DZ)	50.323875	12.951385	17.8	SW
<b>30AF_VOJb_SW</b>	Vojkovice (VOJ)	50.289979	13.0161919	24.2	SW
<b>30VOJ_SW</b>	Vojkovice (VOJ)	50.289979	13.0161919	24.2	SW
<b>21Lo1_SW</b>	Lomnice (LOM, LO)	50.263955	13.018557	25.3	SW
<b>21Lo1b_SW</b>	Lomnice (LOM, LO)	50.263955	13.018557	25.3	SW
<b>1STRf</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	26.7	SW
<b>DPH41d</b>	Stružná (DouH)	50.188426	12.99591	27.1	SW
<b>JM858_SW</b>	voj. prostor Doupov (JM)	50.24375	13.049256	28.5	SW
<b>JM863_SW</b>	voj. prostor Doupov (JM)	50.24375	13.049256	28.5	SW
<b>JM866_SW</b>	voj. prostor Doupov (JM)	50.24375	13.049256	28.5	SW
<b>1STRb_SW</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>1STRc_SW</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>Doup5c</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>VII15_SW</b>	Verušičky (VII)	50.151525	13.185241	42.4	Hyb
<b>VII14_SW</b>	Verušičky (VII)	50.151525	13.185241	42.4	Hyb
<b>VII12_SW</b>	Verušičky (VII)	50.151525	13.185241	42.4	Hyb
<b>VII13_SW</b>	Verušičky (VII)	50.151525	13.185241	42.4	Hyb
<b>VII18_SE</b>	Verušičky (VII)	50.151525	13.185241	42.4	Hyb
<b>17ZLb</b>	Nevděk (ZL)	50.083267	13.16342	46	Hyb
<b>98ZLd</b>	Protivec (ZL)	50.10091	13.209159	46	Hyb
<b>98ZLc</b>	Protivec (ZL)	50.10091	13.209159	46	Hyb
<b>98ZLe</b>	Protivec (ZL)	50.10091	13.209159	46	Hyb
<b>99ZLb</b>	Protivec (ZL)	50.10091	13.209159	46	Hyb
<b>133ZLb</b>	Protivec (ZL)	50.10091	13.209161	46	Hyb
<b>133_Ld_SE</b>	Protivec (ZL)	50.10091	13.209161	46.3	Hyb

**Pokračování Tab. VI.**

<b>133ZLc_SE</b>	Protivec (ZL)	50.10091	13.209161	46.3	Hyb
<b>182ZLb</b>	Mokrá (ZL)	50.122264	13.216168	46.3	Hyb
<b>164ZLb</b>	Mokrá (ZL)	50.122264	13.216168	46.3	Hyb
<b>53MANc_SW</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.163822	48	Hyb
<b>53MANa_SW</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.163822	50.2	Hyb
<b>53MANb_SW</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.163822	50.2	Hyb
<b>53MAND_SW</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.163822	50.2	Hyb
<b>46MANb_SW</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.16382	50.2	Hyb
<b>46MAN_SW</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.16382	50.2	Hyb
<b>46MAND_SW</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.16382	50.2	Hyb
<b>46MANc_SW</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.16382	50.2	Hyb
<b>47MAN_SW</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.16382	50.2	Hyb
<b>47MANb_SW</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.16382	50.2	Hyb
<b>106MANc_SW</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.163823	50.2	Hyb
<b>106MAND_SW</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.163823	50.2	Hyb

**Pokračování Tab. VI.**

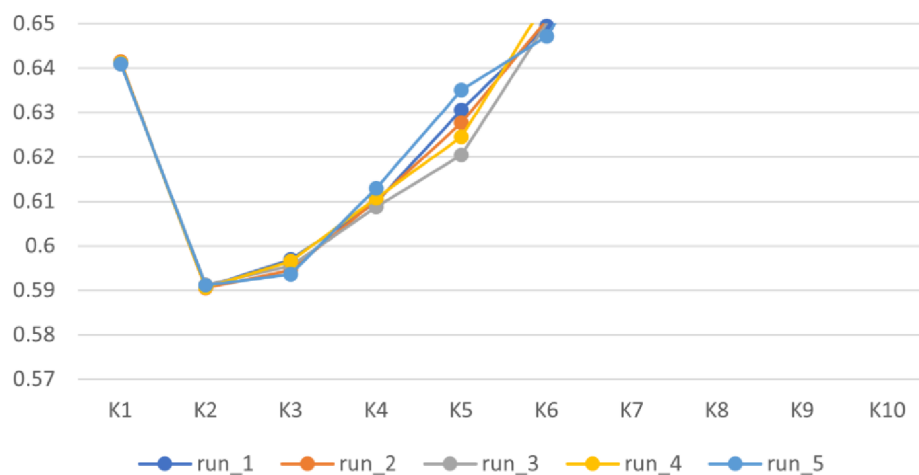
<b>106MANb_SW</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.163823	50.2	Hyb
<b>106MANe_SW</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.163823	50.2	Hyb
<b>106MAN_SE</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.163823	50.2	Hyb
<b>1MAN_SE</b>	Manětín (MAN)	49.991085	13.215867	50.2	Hyb
<b>16poCHYb_SE</b>	Dvorec (CHY)	50.069557	13.287068	51	Hyb
<b>16ApoCHY_SE</b>	Dvorec (CHY)	50.069557	13.287068	51	Hyb
<b>19ApoCHYa_SW</b>	Poříčí, okres KV (CHY)	50.093586	13.26867	51	Hyb
<b>19ApoCHYb_SW</b>	Poříčí, okres KV (CHY)	50.093586	13.26867	51	Hyb
<b>19ApoCHYc_SW</b>	Poříčí, okres KV (CHY)	50.093586	13.26867	51	Hyb
<b>11RNSa_S</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.28939	54	Hyb
<b>11RNSd_SE</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.28939	54	Hyb
<b>11RNSb_S</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.28939	54	Hyb
<b>11RNSc_SE</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.28939	54	Hyb
<b>15RNSa_SE</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.2894	54	Hyb
<b>15RNSc_SE</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.2894	54	Hyb
<b>15RNSd_SE</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.2894	54	Hyb
<b>15RNSb_S</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.2894	54	Hyb
<b>22POT_SE</b>	Potvorov (POT)	50.016008	13.395606	63.5	Hyb
<b>15HV_SW</b>	Hodovíz (HV)	49.955631	13.274451	63.7	Hyb
<b>3HV_SW</b>	Hodovíz (HV)	49.955631	13.27445	63.7	Hyb
<b>28HV_SE</b>	Hodovíz (HV)	49.955631	13.274453	63.7	Hyb
<b>2HV_SE</b>	Hodovíz (HV)	49.955631	13.274449	64	Hyb
<b>16HV_SE</b>	Hodovíz (HV)	49.955631	13.274452	64	Hyb
<b>KO_36d_SW</b>	Potvorov – Bukovina (KOR)	49.989676	13.413877	64	Hyb
<b>KO_36b_SW</b>	Potvorov – Bukovina (KOR)	49.989676	13.413877	64	Hyb

**Pokračování Tab. VI.**

<b>KO_36c_SW</b>	Potvorov – Bukovina (KOR)	49.989676	13.413877	64	Hyb
<b>KO_36a_SW</b>	Potvorov – Bukovina (KOR)	49.989676	13.413877	66.2	Hyb
<b>KO_14_SW</b>	Potvorov – Bukovina (KOR)	49.989676	13.413873	66.2	Hyb
<b>KO_20_SW</b>	Potvorov – Bukovina (KOR)	49.989676	13.413874	66.2	Hyb
<b>KO_20c_SW</b>	Potvorov – Bukovina (KOR)	49.989676	13.413874	66.2	Hyb
<b>KO_20b_SW</b>	Potvorov – Bukovina (KOR)	49.989676	13.413874	66.2	Hyb
<b>KO_23_SW</b>	Potvorov – Bukovina (KOR)	49.989676	13.413875	66.2	Hyb
<b>KO_70a_SE</b>	Řemešín (KOR)	49.993582	13.383746	66.2	Hyb
<b>KO_70b_S</b>	Řemešín (KOR)	49.993582	13.383746	66.2	Hyb
<b>KO_70c_S</b>	Řemešín (KOR)	49.993582	13.383746	66.2	Hyb
<b>7KOCc_SE</b>	Kočín (u Kralovic) (KOC)	49.925264	13.483384	74	SE
<b>7KOC_SE</b>	Kočín (u Kralovic) (KOC)	49.925264	13.483384	74	SE
<b>7KOCb_SE</b>	Kočín (u Kralovic) (KOC)	49.925264	13.483384	74	SE
<b>15KOCc_SE</b>	Kočín (u Kralovic) (KOC)	49.925264	13.483385	74	SE
<b>15KOCb_SE</b>	Kočín (u Kralovic) (KOC)	49.925264	13.483385	74	SE
<b>15KOC_SE</b>	Kočín (u Kralovic) (KOC)	49.925264	13.483385	74	SE
<b>21KORb_SE</b>	Koryta u Kralovic (KOC)	49.899712	13.471053	74.4	SE
<b>21KORc_SE</b>	Koryta u Kralovic (KOC)	49.899712	13.471053	74.4	SE
<b>29DR_SE</b>	Dolní Hradiště (DR)	49.910474	13.491038	75.1	SE
<b>2RAD_SE</b>	Chockov (RAD)	49.895155	13.580371	82.2	SE
<b>6RAD_SE</b>	Lhotka u Radnic (RAD)	49.89315	13.593359	82.2	SE
<b>51RAD_SE</b>	Chomle (RAD)	49.860663	13.633592	82.6	SE
<b>RAD51c_SE</b>	Chomle (RAD)	49.860663	13.633592	82.6	SE
<b>RAD39e_SE</b>	Chomle (RAD)	49.860663	13.63359	87.6	SE
<b>39RAD_SE</b>	Chomle (RAD)	49.860663	13.63359	87.6	SE
<b>RAD44b_SE</b>	Chomle (RAD)	49.860663	13.633591	87.6	SE
<b>44RADb_SE</b>	Chomle (RAD)	49.860663	13.633591	87.6	SE

Barevné označení bodů vzorků SE (červeně) a SW (modře) na Obr. 3 odpovídá zařazení do mitochondriálních linií určených pomocí PCR (viz. kap. 3.2.2). Lišta v horní části grafu znázorňuje čisté linie SW (modře) a SE (červeně) na základě výsledků PCA analýzy jaderných SNP podél osy PC1 vysvětlující 5,42 %. Uprostřed se nacházejí hybridní jedinci Hybrids (oranžovou barvou) zahrnující směs SE a SW vzorků. Získaný graf zobrazuje plynulý přechod z SW linie vší *Polyplax serrata* k linii SE na základě genetických diferenciací a zároveň geografických vzdáleností (viz Obr. 2).

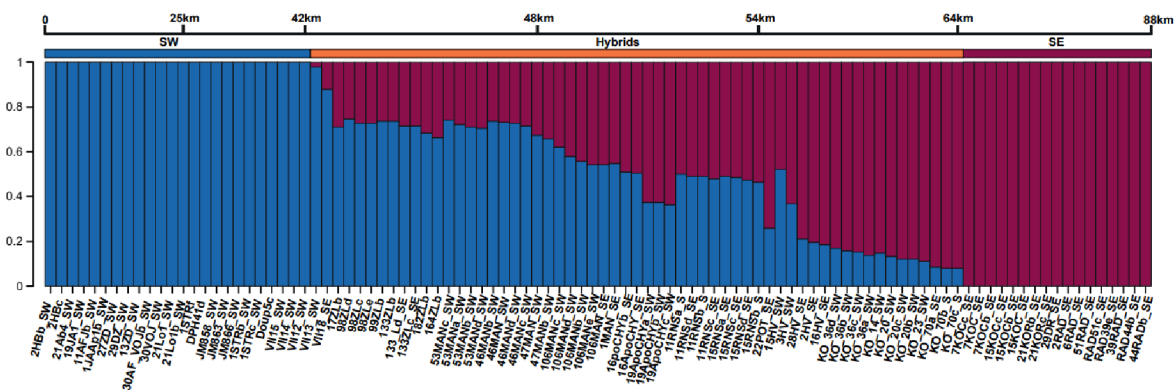
Původní dataset se 4 878 614 jadernými SNP byl pro účely zpracování dat dalšími softwary profiltrován programem PLINK 1.9 stejným způsobem jako u PCA analýzy a uložen v požadovaném formátu. Následně bylo pomocí softwaru Admixture provedeno 5 nezávislých cyklů analýzy pro K1-K10. Výsledky všech běhů se výrazně nelišily. Podle cross-validation value se jako nejpravděpodobnější rozdělení dat ukázala hodnota K2 (Obr. 4), tedy 2 genetické klastry, které odpovídají parentálním genomům (viz kap. 3.2.3).



Obr. 4: Výsledky cross-validation value pro K1-K10 pěti nezávislých cyklů (run\_1-run\_5) v programu Admixture.

Grafické zobrazení frekvencí zastoupení obou genetických klastrů u každého jedince bylo vytvořeno pomocí Structure plot V2.0. (Obr. 5).

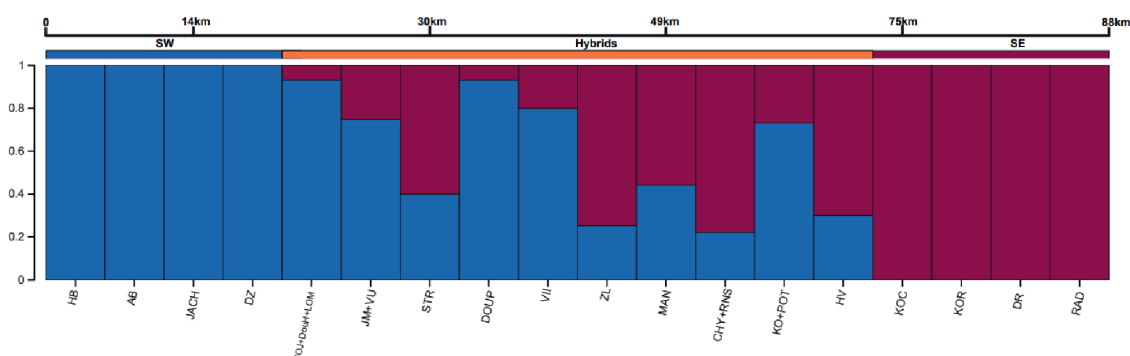




Obr. 5: Grafické zobrazení frekvencí jaderného genomu.

Graf ukazuje jednotlivé vzorky seřazené geograficky podél osy transektu (0-88 km, viz Obr. 2). Stejně jako u předchozí PCA analýzy lišta v horní části obrázku označuje čisté SE (červeně) a SW (modře) linie a hybridy (Hybrids – označeny oranžově). Je zde opět patrný plynulý přechod linie SW k linii SE s jejich hybridy uprostřed, přičemž se hybridní zóna pohybuje od 42. do 64. kilometru.

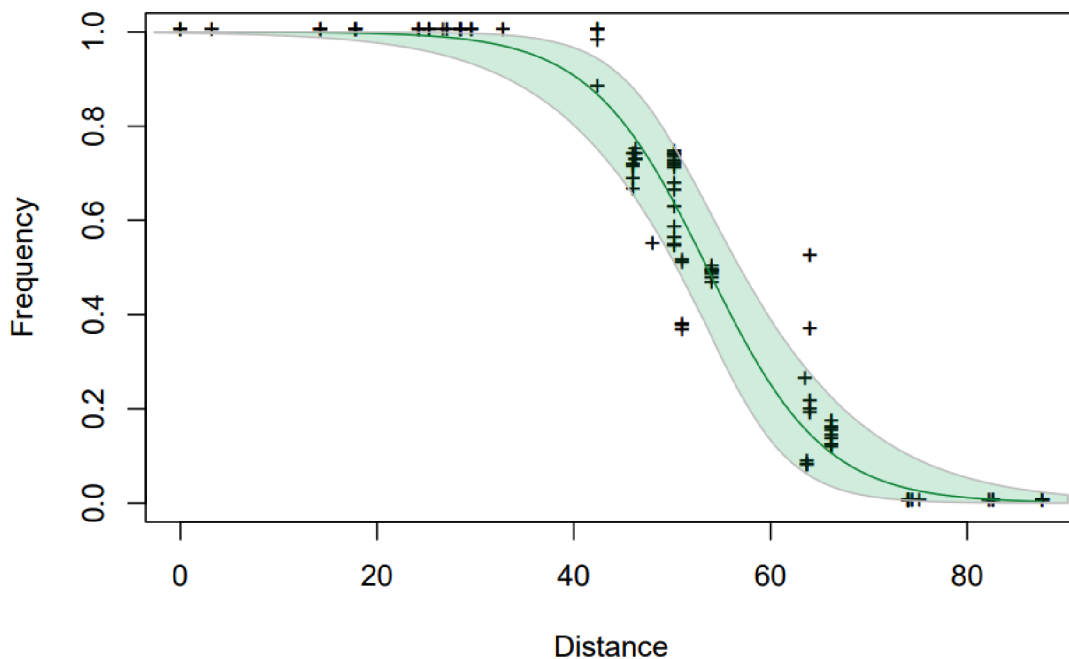
Aby bylo možné porovnat vývoj hybridní zóny mezi jaderným a mitochondriálním datasetem, byl vytvořen obdobný graf frekvencí zastoupení SE a SW linií i pro mitochondriální data zahrnující COI sekvence (získané primárně pro účely rozdělení vši do S a N linií – viz kap. 3.2.2) Protože každý jedinec dědí mitochondrii pouze maternálně a má tedy buď SE nebo SW mitochondrii, frekvence pro mtDNA dataset byly vypočítány podle počtu získaných jedinců s SW nebo SE mitochondrií na každé lokalitě podél osy transektu (viz Obr. 2). Graf byl také vytvořen pomocí Structure plot V2.0 (Obr. 6).



Obr. 6: Grafické zobrazení frekvencí mitochondriálního genomu.

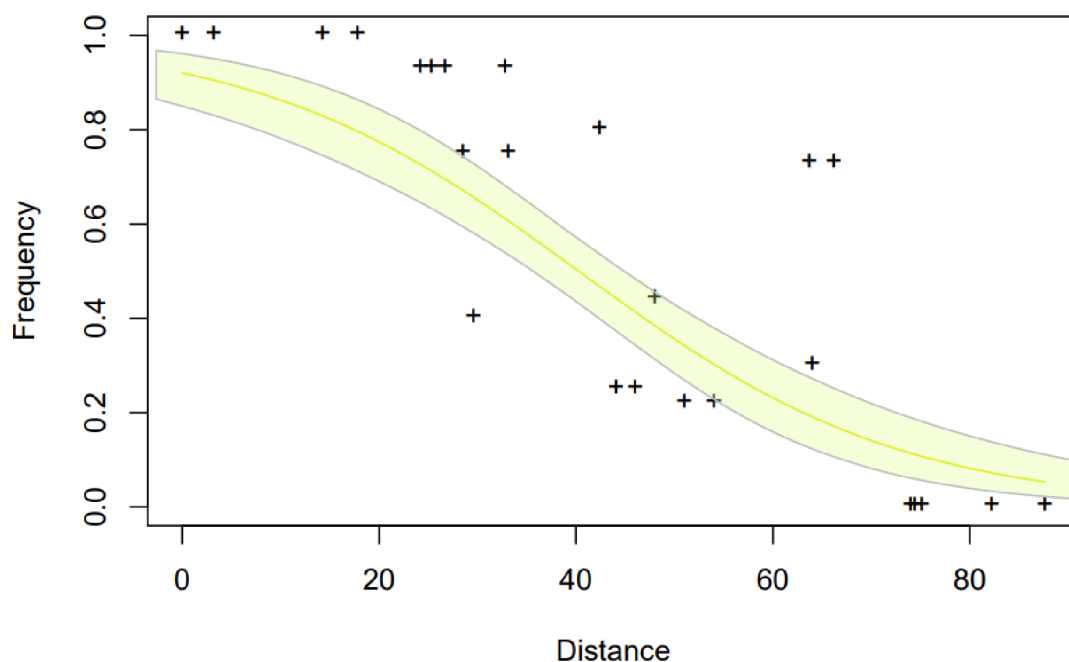
Graf na Obr. 6 ukazuje frekvence zastoupení SE a SW mitochondrií na lokalitách seřazených geograficky podél osy transektu podle vzdálenosti lokalit (0-88 km; viz Obr. 2). Rovněž je zde patrný plynulý přechod od lokalit zastoupených pouze SW (modrá) jedinci k lokalitám s jedinci SE (červená), ovšem s mírnými odchylkami. Hybridní zóna (lokality

s SW i SE jedinci) se pohybuje v rozmezí od 15. do 70. kilometru. Grafický výstup softwarového balíčku HZAR v programu R umožnil bližší nahlédnutí do struktury hybridní zóny. Jako nejpravděpodobnější podoba klíny pro jaderný (SNP) dataset se ukázala křivka kombinací parametrů `scaling= "fixed"` a `tails= "none"`. Výsledné optimální proložení klíny jadernými daty je zobrazeno na Obr. 7.



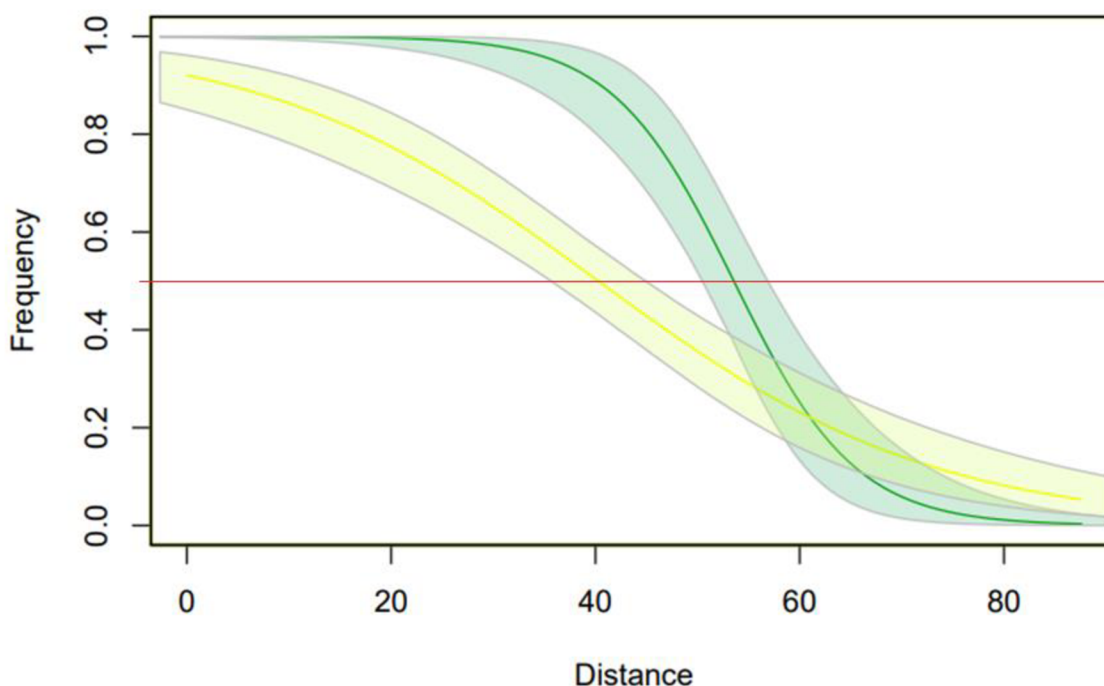
Obr. 7: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro SNP dataset.

Stejného softwaru bylo použito pro i mtDNA dataset, který byl získán stejným způsobem jako v předchozím kroku (kap. 3.2.3). Jako nejpravděpodobnější byla v balíčku HZAR vyhodnocena podoba klína s parametry `scaling= "none"` a `tails= "none"` a grafický výstup optimalizované křivky pro mitochondriální data je zobrazen na Obr. 8.



Obr. 8: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro mtDNA dataset.

Kliny na Obr. 7 (zelená) a Obr. 8 (žlutá) znázorňují podobu hybridní zóny napříč osou transektu v km (Distance). Druhé osy grafů (Frequency) popisují frekvenční zastoupení parentálních genotypů jednotlivců u Obr. 7, respektive zastoupení linií SE a SW na lokalitě u Obr. 8 (SW=1.0, SE =0.0). Křížky jsou označeny jednotlivé vzorky (Obr. 7), popřípadě zastoupení linií na každé lokalitě (Obr. 8) a světlejší barvou ohraničený pruh podél kliny je konfidenční interval popisující pravděpodobnost distribuce dat. Pro lepší názornost rozdílů mezi klinami mitochondriálního (žlutá) a jaderného datasetu (zelená), byly obě křivky sloučeny do jednoho grafu (Obr. 9), ze kterého je patrný pozvolnější přechod hybridní zóny u mitochondriálního datasetu, než je tomu u jaderného genomu (Obr. 7). Podle mitochondriálního datasetu se hybridní zóna rozkládá cca od 5. km do 80. km, zatímco podle jaderného datasetu se pohybuje od 35. do 75. km.



Obr. 9: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro mtDNA i SNP dataset.

Pro bližší analýzu jednotlivých kontigů bylo z metagenomického datasetu vyfiltrováno 20 nejdelších kontigů (kontigy delší než 700kbp), uvedených v Tab. VII. S vybranými kontigy bylo provedeno filtrování v programu PLINK a následně byl každý kontig analyzován softwarem Admixture a softwarovým balíkem HZAR stejným způsobem jako v kap. 3.2.3. Rozhodujícími kritérii, podle kterých byly vybrány vhodné kontigy pro analýzu, byla délka a počet vyfiltrovaných SNP (nad 200 SNP), protože u nižšího počtu SNP klesala i relevance výsledných dat (vyřazené kontigy byly v Tab. VII. označeny červeně).

Tab. VII. 15 nejdelších kontigů zahrnutých do analýzy a 5 vyřazených kontigů (ozn. červeně).

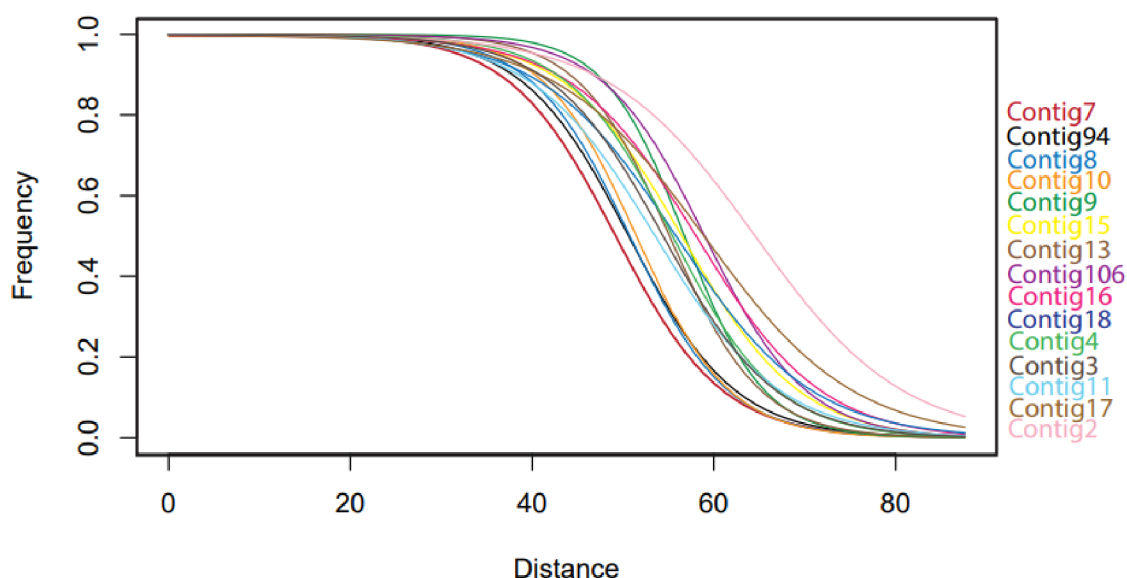
Název kontigu	Délka	Vyfiltrované SNPs
contig_7	17593167	2911
contig_94	16973083	2697
contig_8	15336852	2519
contig_10	14210786	2824
contig_9	13306208	2036
contig_15	12305159	2533
contig_13	11319348	1941
contig_106	7773422	1073
contig_16	4782382	879
contig_18	4003603	1087
contig_4	3083604	408

**Pokračování Tab. VII.**

contig_3	2947097	450
contig_54	2935054	281
contig_11	1863162	526
contig_105	1563018	155
contig_17	1355913	211
contig_2	1262447	213
contig_101	1243842	127
contig_107	724293	100
contig_53	717164	80

Pro porovnání s celojaderným genomem byla jako první provedena analýza v programu Admixture, kde nejpravděpodobnější rozdělení dat odpovídalo K2, tedy dvěma genetickým klastrům. Na základě hodnot pro K2 byla jednotlivým vzorkům opět předělena genetická příslušnost k linii SW, SE nebo jejich hybridům. Pro oba genetické klastry bylo vytvořeno grafické zobrazení frekvencí pomocí Structure plot V2.0 stejně jako v předchozím kroku.

Pro jednotlivé kontigy byly provedeny i analýzy pomocí softwaru HZAR v programu R, kde bylo pracováno s nejpravděpodobnějším rozdělením dat na základě kombinací parametrů scaling a tails, podle kterých byly vyneseny grafy. Proložení výsledných klin je zobrazeno na Obr. 10, kde jsou jednotlivé kontigy rozlišeny barvou. Výsledky pro všechny jednotlivé kontigy jsou k nahlédnutí v kap. **8 Přílohy**.



Obr. 10: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro 15 vybraných kontigů.

## 5 Diskuse

Studie zabývající se interakcemi hostitele a parazita v hybridních zónách byly dosud zaměřeny na případy geneticky variabilních hostitelů, přičemž změny v genomu parazitů byly považovány za predikovatelné v tom smyslu, že evoluce parazita kopíruje evoluční změny hostitele (Wasimuddin et al., 2016). Ve spojitosti s HZ tak byly parazité zmiňováni pouze v souvislosti s hybridizací hostitelů nebo jejich sekundárním kontaktem (Theodosopoulos et al., 2019). Tato práce se zaměřila na koevoluční vztah hostitele (*A. flavicollis*) a parazita (*P. serrata*). V tomto modelu se hostitelé při posledním glaciálu stáhli do refugií, kde se diferencovali do dvou mitochondriálních linií, které se při následné rekolonizaci Evropy vzájemně promíchaly. Jejich parazit, resp. specifická linie *S Polyplax serrata*, také divergoval do dvou linií, západní a východní, které se ale nepromíchaly stejně jako jejich hostitelé naopak zachovaly si v Evropě vzájemně exkluzivní distribuci (viz kap. 1.2.2; Martinů et al., 2020).

Jedinečnost tohoto systému spočívá v tom, že parazité vytvořili hybridní zónu nezávisle bez odpovídající populační struktury hostitele, a bylo tedy možné HZ studovat čistě z pohledu jejich genetické struktury jako důsledku inkompatibility rodičovských genomů, například prostřednictvím tzv. Bateson-Muller-Dobzhansky modelu (REF; Presgraves, 2010), kdy alely po smíšení genomů vytváří negativní epistatické interakce a snižuje se tak fitness hybridů. Martinů et al. (2020) naznačili, že by se takovéto hybridní zóny parazitů, udržované nezávisle na současné populační struktuře hostitele, mohly vyskytovat v přírodě častěji (zejména u parazitů s kryptickou speciací a zároveň životním cyklem vázaným na jednoho hostitele). Avšak tento jev není dostatečně prozkoumán, protože se obecně předpokládá, že genetické změny hostitelsky specifických parazitů kopírují změny v populační historii hostitele (Wasimuddin et al., 2016).

Hlavním cílem práce bylo zjištění typu hybridní zóny a odhadnutí její šířky. Splnění těchto cílů lze nejlépe demonstrovat na grafickém výstupu analýzy se softwarem HZAR zobrazující strukturu HZ na základě jaderného genomu (viz Obr. 7), který ukazuje pozvolné přelévání jednoho genomu do druhého na základě genetických inkompatibilit, přičemž čím je klína strmější, tím je větší izolace rodičovských genomů. Tvar klíny jaderného genomu zde odpovídá klasické tenzní zóně, což podporuje i definice, podle níž jsou tenzní zóny utvářeny rovnováhou mezi migrací a selekcí proti hybridům, která se projevuje sigmoidním tvarem klíny ve frekvenci alel (Fraye & Payseur, 2021). Podle

grafu (na Obr. 7) se hybridní zóna pohybuje od 25. do 75. km, takže lze její šířku odhadnout na 40-50 km. Šířka hybridní zóny specifických parazitů je dána především disperzí jejich hostitele (Wasimuddin et al., 2016). Myšice *Apodemus flavicollis* dispergují na vzdálenosti okolo 1 km za generaci, přičemž samci jsou schopni se šířit na větší vzdálenosti (Stradiotto et al., 2009). Úzké hybridní zóny, jako je tato, podle (Arntzen et al., 2017) nemohou být výsledkem pouze neutrálních procesů. V úzkých HZ hrají naopak roli právě vnitřní genetické inkompatibility, vytvářející silnou genetickou bariéru pro tok genů mezi populacemi (REF; Arntzen et al., 2017; Goüy de Bellocq et al., 2018).

Dále výsledky naznačují, že mitochondriální genom prochází odlišnou introgresí oproti jadernému genomu napříč hybridní zónou, čemuž odpovídají i hypotézy v některých studiích (např. Ballard & Whitlock, 2004; Good et al., 2015; Melo-Ferreira et al., 2012; Melo-Ferreira et al., 2014; Toews & Brelsford, 2012). První analogie s těmito hypotézami si lze všimnout při porovnání grafických výstupů pro mtDNA (viz Obr. 6) a jaderných SNP (viz Obr. 5), kde je patrné, že se hybridní zóna u mitochondrií projevuje podstatně dříve, než je tomu u jaderného genomu. Bylo tak možné předpokládat, že dochází k většímu posunu SE mtDNA, na západní straně hybridní zóny, na lokalitách STR, JM, DOUP, oproti jaderným genům. Zároveň na grafu (Obr. 6) není přechod hybridní zónou tak plynulý jako na Obr. 5. Mírné odchylky mohou být způsobeny nevyrovnaným počtem vzorků na lokalitu vzhledem k tomu, že byl graf vytvořen na základě frekvencí mtDNA na lokalitách, což vyžaduje větší počet jedinců než multilokusová jaderná data. Zároveň však do určité míry může skutečně docházet k lokálním výkyvům ve frekvencích mtDNA vzhledem k malé populační hustotě vši a obecně nižší efektivní velikosti mtDNA vůči jaderné DNA. Do budoucna by bylo vhodné dataset doplnit o další vzorky napříč transektem a získat tak přesnější obrázek o transektu hybridní zóny pro mtDNA.

Další analogii s hypotézami o posunu mtDNA ukazuje klina na grafickém výstupu analýzy se softwarem HZAR zobrazující frekvence mtDNA napříč transektem (viz Obr. 8), která je na první pohled plošší než u jaderného datasetu. Větší zploštění klíny zde znamená větší introgresi do rodičovských populací na obou stranách HZ, takže výsledky klinální analýzy pro mitochondriální genom skutečně potvrzují, že u mitochondrií dochází k odlišné míře introgrese na rozdíl od jaderného genomu. Obecně se ukazuje, že mitochondrie jsou více náchylné k vyšší introgresi oproti jadernému genomu, což může být umocněno i nižší intenzitou selekce, která působí na mitochondriální genom (Ballard & Whitlock, 2004). V extrémních případech může u mitochondrií proběhnout úplná

introgrese, zatímco jaderný genom nemusí vykazovat žádné nebo jen minimální známky introgrese (Good et al., 2015; Nietlisbach et al., 2013). Introgrese mitochondriální DNA a posun mtDNA genomu může být usnadněna také vychýleným poměrem pohlaví směrem k samicím, který nastává i u vší *P. serrata*, takže mitochondrie snadněji prostupují populací (Martinů et al., 2018; Melo-Ferreira et al., 2014). Výjimečně může u živočichů dojít i k introgresi cizí mtDNA nebo její části (Toews & Brelsford, 2012). Podobný ojedinělý záchyt byl zmíněn v Martinů et al. (2018), kdy mitochondrie z linie N prošla introgresí do linie S. Ačkoli zde šlo o ojedinělou událost zachycenou pouze u jedné populace a v jednom roce opakovaného vzorkování na dané lokalitě (Litvínov, CZ), přenos mitochondrie N linie do populace S linie ilustruje poměrně dobrou kompatibilitu mitochondrií *P. serrata* i mezi evolučně vzdálenějšími liniemi než SW a SE. To znamená, že mitochondrie jsou schopny překonat i daleko větší bariéru.

Introgrese jaderného genomu napříč hybridní zónou je tedy mnohem menší oproti mtDNA. A pokud dochází k větší introgresi u některých úseků genomu, týká se introgrese nejspíš pouze jednotlivých genů. Případnou identifikaci konkrétních genů, které jsou adaptivní a které podléhají introgresi do obou populací, lze v budoucnu testovat kombinací Fst outlier metod a klinální analýzou v „plovoucím okně“ na jednotlivých kontizích, což ale vyžaduje dostatečné množství SNP dat.

Při porovnání obou klin na Obr. 9 si lze všimnout nejen rozdílného zploštění klin, ale i posunu středu hybridní zóny, kde u jaderné kliny je střed vychýlen více na východ a u mtDNA kliny je střed posunut více na západ. Podle Arntzen et al. (2017) může být tento posun způsoben posunem hybridní zóny v prostoru (tj. dynamikou). Tento fakt nabízí tři možná vysvětlení procesů, které v hybridní zóně probíhají s ohledem na její dynamiku. 1. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je, že se hybridní zóna pohybuje směrem na východ a mtDNA má zpoždění za jaderným genomem. Arntzen et al. (2017) toto časoprostorové zpoždění mtDNA vysvětluje konceptem „gene surfing“, ve kterém mtDNA může reagovat na pohyb hybridní zóny (viz kap. 1.1.3). 2. Hybridní zóna se pohybuje směrem na západ, ale mtDNA předbíhá jaderný genom. 3. Posun mtDNA nesouvisí s dynamikou hybridních zón, ale je projevem asymetrické introgrese, která se odchyluje od prostorově stabilního středu, přičemž mtDNA line SE (východní) se více promítá do mtDNA line SW (západní).



Při výběru nejdelších kontigů (viz Tab. VII.) se vyskytla odchylka u contig\_54, u kterého se vyfiltrovalo méně SNP navzdory očekávání vzhledem k jeho poměrně velké délce, takže nebyl zahrnut do dalších analýz. Jednou z teorií, která může pomoci vysvětlit tuto odchylku je, že by se mohlo jednat o pohlavní chromozom (Štefka J., os. konzultace). Good et al. (2015) uvádí, že pohlavně vázané lokusy mohou být v studiích zaměřených na hybridizaci zvláště zajímavé, protože pohlavní chromozomy mají zásadní vliv na reprodukční izolaci. Anotace kontigů asemblovaného genomu *P. serrata* (Martinů et al., 2024) do chromozomů dosud nebyla provedena, takže na podrobnější průzkum vlivu pohlavních chromozomů na průběh HZ si teprve budeme muset počkat. Výsledky klinální analýzy pro vybraných 15 nejdelších segmentů genomu (viz Obr. 10) pak poskytují stejný obrázek struktury hybridní zóny s výjimkou contig\_2, což je shodou okolností nejmenší z vybraných kontigů, takže jeho nižší počet použitých SNP už nemusí být tolik vypovídající.

Výsledky práce přispívají ke studiu koevoluce hostitele a parazita v tom smyslu, že parazité nenásledují nutně evoluci svého hostitele, a dokonce mohou vytvářet hybridní zóny nezávisle na hybridizaci hostitele. Při studiu HZ parazita bylo možné nahlédnout do její struktury a příp. odhadnout její dynamiku. Došlo k potvrzení rozdílné introgrese pro různé části genomu. Byl zde sledován tok genů, který může při vzniku genetických bariér eskalovat v reprodukční izolaci. V neposlední řadě, i když zde byla nalezena spíše plošší klina pro mtDNA, výsledky studia asymetrické introgrese mohou poukázat na vznik inkompatibilit mezi mitochondriálním a jaderným genomem, které mohou vzniknout hybridizací a mají zásadní dopad v evolučním měřítku. Některé studie, např. Ballard & Whitlock (2004) doporučují zaměřit se na obecnou biologii mitochondrie, její genetické a biochemické procesy k odhalení těchto inkompatibilit. Zjištění konkrétních příčin tohoto nesouladu může být předmětem navazujícího výzkumu. Dále by bylo vhodné zjistit, zda frekvence linií bakteriálního symbionta *L. polyplacis* v HZ kopíruje schéma mtDNA, nebo dochází k odchylkám způsobeným vyšší, či nižší mírou selekce.

Získané výsledky by v budoucnu také bylo dobré ověřit na jiném, nezávislém transektu HZ (tedy mimo disperzní vzdálenost hostitele v řádu stovek generací čili 100 a více km daleko). Porovnání dat dvou transektů umožní zobecnění patternu vyšší introgrese mtDNA na obě strany, a především posunu středu zóny mezi jaderným genomem a mtDNA. V různých částech areálu obou linií se mohou projevit rozdíly v populační struktuře a genetické diverzitě parazita, které se mohou projevit jinou mírou introgrese a šířky klíny.

Porovnání s druhým transektem by mohlo také umožnit rozhodnutí mezi možnými scénáři prostorově stabilní či dynamické HZ.

## 6 Závěr

Tato práce se soustředila na odhalení evolučních vztahů parazita a hostitele v oblasti sekundárního kontaktu, kdy genetické linie S parazita (vši *P. serrata*) nenásledovaly postglaciální smíšení populací svého hostitele (myšice *A. flavicollis*). Tento systém je unikátní v tom, že parazité vytvořili hybridní zónu nezávisle na svých hostitelích, což poskytuje potenciál pro výzkum v mnoha ohledech. Zde byl na základě několika bioinformatických analýz zjištěn typ hybridní zóny, který odpovídá klasické tenzní zóně, a šířka hybridní zóny měřící cca 40 km. Dále se ukázalo, že mitochondriální genom prochází v hybridní zóně odlišnou introgresí oproti jadernému genomu, což některé studie považují za běžný jev v hybridních zónách. U jaderného genomu podléhají odlišné introgresi buď žádné, nebo jen malé části genomu, což bylo naznačeno klinální analýzou pro jednotlivé segmenty.

## 7 Bibliografie

Arntzen, J. W., de Vries, W., Canestrelli, D., & Martínez-Solano, I. (2017). Hybrid zone formation and contrasting outcomes of secondary contact over transects in common toads. *Molecular Ecology*, 26(20), 5663–5675. <https://doi.org/10.1111/mec.14273>

Babik, W., Branicki, W., Crnobrnja-Isailović, J., Cogălniceanu, D., Sas, I., Olgun, K., Poyarkov, N. A., Garcia-Paris, M., & Arntzen, J. W. (2005). Phylogeography of two European newt species—discordance between mtDNA and morphology. *Molecular Ecology*, 14(8), 2475–2491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02605.x>

Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, 13(4), 729–744. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x>

Barton, N. H. (2001). The role of hybridization in evolution. *Molecular ecology*, 10(3), 551–568. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2001.01216.x>

Barton, N. H., & Gale, K. S. (1993). Genetic analysis of hybrid zones. *Hybrid zones and the evolutionary process*, 13–45. <https://www.ucl.ac.uk/taxome/lit/Barton&Gale%201993.pdf>

Barton, N. H., & Hewitt, G. M. (1985). Analysis of hybrid zones. *Annual review of Ecology and Systematics*, 16(1), 113–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.16.110185.000553>

Boecklen, W. J., & Howard, D. J. (1997). Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markers and power of resolution. *Ecology*, 78(8), 2611–2616. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1997\)078\[2611:GAOHZN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1997)078[2611:GAOHZN]2.0.CO;2)

Cozzarolo, C., Jenkins, T., Toews, D. P. L., Brelsford, A., & Christe, P. (2018). Prevalence and diversity of haemosporidian parasites in the yellow-rumped warbler hybrid zone. *Ecology and Evolution*, 8(19), 9834–9847. <https://doi.org/10.1002/ece3.4469>

Ferris, G. F. (1923). OBSERVATIONS ON THE CHERMIDAE (HEMIPTERA; HOMOPTERA).: PART I. *The Canadian Entomologist*, 55(11), 250–256. <https://doi.org/10.4039/Ent55250-11>

Frayser, M. E., & Payseur, B. A. (2021). Demographic history shapes genomic ancestry in hybrid zones. *Ecology and Evolution*, 11(15), 10290–10302. <https://doi.org/10.1002/ece3.7833>

Futuyma, D. J., & Shapiro, L. H. (1995). *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. JSTOR. <https://doi.org/10.2307/2410309>

Gompert, Z., Mandeville, E. G., & Buerkle, C. A. (2017). Analysis of population genomic data from hybrid zones. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48, 207–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110316-022652>

Good, J. M., Vanderpool, D., Keeble, S., & Bi, K. (2015). Negligible nuclear introgression despite complete mitochondrial capture between two species of chipmunks. *Evolution*, 69(8), 1961–1972. <https://doi.org/10.1111/evo.12712>

Goüy de Bellocq, J., Wasimuddin, Ribas, A., Bryja, J., Piálek, J., & Baird, S. J. E. (2018). Holobiont suture zones: Parasite evidence across the European house mouse hybrid zone. *Molecular Ecology*, 27(24), 5214–5227. <https://doi.org/10.1111/mec.14938>

Hofman, S., & Szymura, J. M. (2007). Limited mitochondrial DNA introgression in a *Bombina* hybrid zone. *Biological Journal of the Linnean Society*, 91(2), 295–306. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00795.x>

Key, K. H. L. (1968). The concept of stasipatric speciation. *Systematic Biology*, 17(1), 14–22. <https://doi.org/10.1093/sysbio/17.1.14>

Kváč, M., McEvoy, J., Loudová, M., Stenger, B., Sak, B., Květoňová, D., Ditrich O., Rašková V., Moriarty E., Rost M., Macholán M., & Piálek, J. (2013). Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *International Journal for Parasitology*, 43(10), 805–817. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.04.007>

Martinů, J., Hypša, V., & Štefka, J. (2018). Host specificity driving genetic structure and diversity in ectoparasite populations: Coevolutionary patterns in *Apodemus mice* and their lice. *Ecology and evolution*, 8(20), 10008–10022. <https://doi.org/10.1002/ece3.4424>

Martinů, J., Štefka, J., Poosakkannu, A., & Hypša, V. (2020). “Parasite turnover zone” at secondary contact: A new pattern in host–parasite population genetics. *Molecular Ecology*, 29(23), 4653–4664. <https://doi.org/10.1111/mec.15653>

Martinů, J., Tarabai, H., Štefka, J., & Hypša, V. (2024). Highly resolved genomes of two closely related lineages of the rodent louse *Polyplax serrata* with different host specificities. *Genome Biology and Evolution*, evae045. <https://doi.org/10.1093/gbe/evae045>

Melo-Ferreira, J., Boursot, P., Carneiro, M., Esteves, P. J., Farelo, L., & Alves, P. C. (2012). Recurrent introgression of mitochondrial DNA among hares (*Lepus spp.*) revealed by species-tree inference and coalescent simulations. *Systematic biology*, 61(3), 367. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr114>

Melo-Ferreira, J., Seixas, F. A., Cheng, E., Mills, L. S., & Alves, P. C. (2014). The hidden history of the snowshoe hare, *Lepus americanus*: extensive mitochondrial DNA introgression inferred from multilocus genetic variation. *Molecular ecology*, 23(18), 4617–4630. <https://doi.org/10.1111/mec.12886>

Michaux, J. R., Kinet, S., Filippucci, M., Libois, R., Besnard, A., & Catzefflis, F. (2001). Molecular identification of three sympatric species of wood mice (*Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. alpicola*) in western Europe (Muridae: Rodentia). *Molecular Ecology Notes*, 1(4), 260–263. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00100.x>

Michaux, J. R., Libois, R., & Filippucci, M. G. (2005). So close and so different: comparative phylogeography of two small mammal species, the Yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Heredity*, 94(1), 52–63. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800561>

Nietlisbach, P., Wandeler, P., Parker, P. G., Grant, P. R., Grant, B. R., Keller, L. F., & Hoeck, P. E. A. (2013). Hybrid ancestry of an island subspecies of Galápagos mockingbird explains discordant gene trees. *Molecular phylogenetics and evolution*, 69(3), 581–592. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.07.020>

Pinto, B. J., Titus-McQuillan, J., Daza, J. D., & Gamble, T. (2019). Persistence of a geographically-stable hybrid zone in Puerto Rican dwarf geckos. *Journal of Heredity*, 110(5), 523–534. <https://doi.org/10.1093/jhered/esz015>

Presgraves, D. The molecular evolutionary basis of species formation. *Nat Rev Genet* 11, 175–180 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrg2718>

Rand, D. M., & Harrison, R. G. (1989). Ecological genetics of a mosaic hybrid zone: mitochondrial, nuclear, and reproductive differentiation of crickets by soil type. *Evolution*, 43(2), 432–449. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb04238.x>

Reid, N., Hird, S., Schulte-Hostedde, A., & Sullivan, J. (2010). Examination of nuclear loci across a zone of mitochondrial introgression between *Tamias ruficaudus* and *T. amoenus*. *Journal of Mammalogy*, 91(6), 1389–1400. <https://doi.org/10.1644/09-MAMM-A-082.1>

Smetana, A. (1965). Vši z území Československa. *Acta Rerum Naturalis Musei Nationalis Slovenici*, 11(1), 30–83.

Sperling, F. A. H., & Harrison, R. G. (1994). Mitochondrial DNA variation within and between species of the *Papilio machaon* group of swallowtail butterflies. *Evolution*, 48(2), 408–422. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1994.tb01320.x>

Stradiotto, A., Cagnacci, F., Delahay, R., Tioli, S., Nieder, L., & Rizzoli, A. (2009). Spatial organization of the yellow-necked mouse: effects of density and resource availability. *Journal of mammalogy*, 90(3), 704–714. <https://doi.org/10.1644/08-MAMM-A-120R1.1>

Štefka, J., & Hypša, V. (2008). Host specificity and genealogy of the louse *Polyplax serrata* on field mice, *Apodemus* species: a case of parasite duplication or colonisation? *International journal for parasitology*, 38(6), 731–741. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.011>

Theodosopoulos, A. N., Hund, A. K., & Taylor, S. A. (2019). Parasites and host species barriers in animal hybrid zones. *Trends in Ecology & Evolution*, 34(1), 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.09.011>

Toews, D. P. L., & Brelsford, A. (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular ecology*, 21(16), 3907–3930. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x>

van Riemsdijk, I., Butlin, R. K., Wielstra, B., & Arntzen, J. W. (2019). Testing an hypothesis of hybrid zone movement for toads in France. *Molecular Ecology*, 28(5), 1070–1083. <https://doi.org/10.1111/mec.15005>

Vines, T. H., Kohler, S. C., Thiel, M., Ghira, I., Sands, T. R., MacCallum, C. J., Barton, N. H., & Nurnberger, B. (2003). The maintenance of reproductive isolation in a mosaic hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*. *Evolution*, 57(8), 1876–1888. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00595.x>

Wasimuddin, Bryja, J., Ribas, A., Baird, S. J. E., Piálek, J., & Goüy de Bellocq, J. (2016). Testing parasite ‘intimacy’: the whipworm *Trichuris muris* in the European house mouse hybrid zone. *Ecology and Evolution*, 6(9), 2688–2701. <https://doi.org/10.1002/ece3.2022>

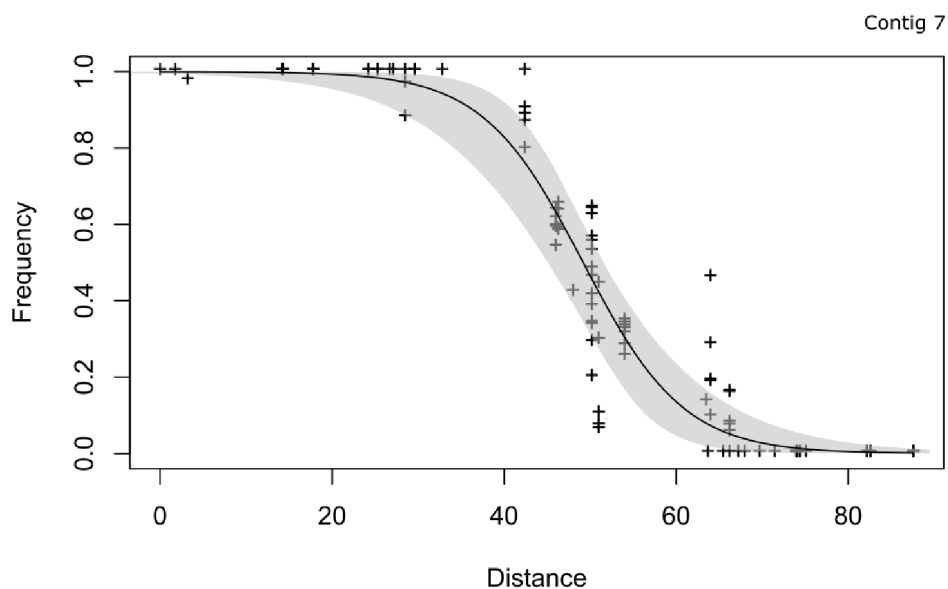
Wegner, Z. (1974). *A morphological analysis of Polyplax serrata (Burmeister, 1839)* (Arthropoda, Anoplura). *Acta Parasitologica Polonica*, 22 (18), 203–217.

Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian Populations. *Genetics*, 16(2), 97. [10.1093/genetics/16.2.97](https://doi.org/10.1093/genetics/16.2.97)

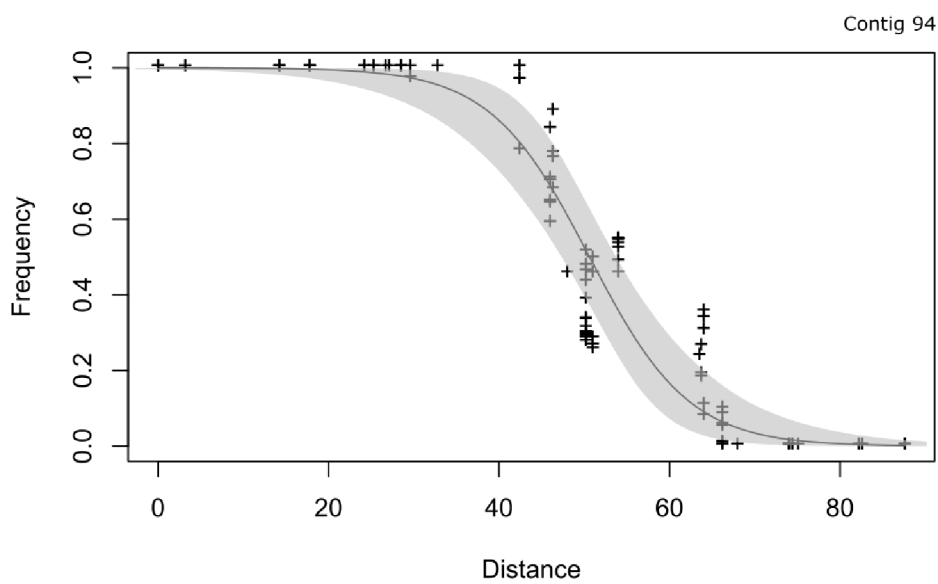


Zieliński, P., Dudek, K., Arntzen, J. W., Palomar, G., Niedzicka, M., Fijarczyk, A., Liana, M., Cogălniceanu, D., & Babik, W. (2019). Differential introgression across newt hybrid zones: evidence from replicated transects. *Molecular Ecology*, 28(21), 4811–4824. <https://doi.org/10.1111/mec.15251>

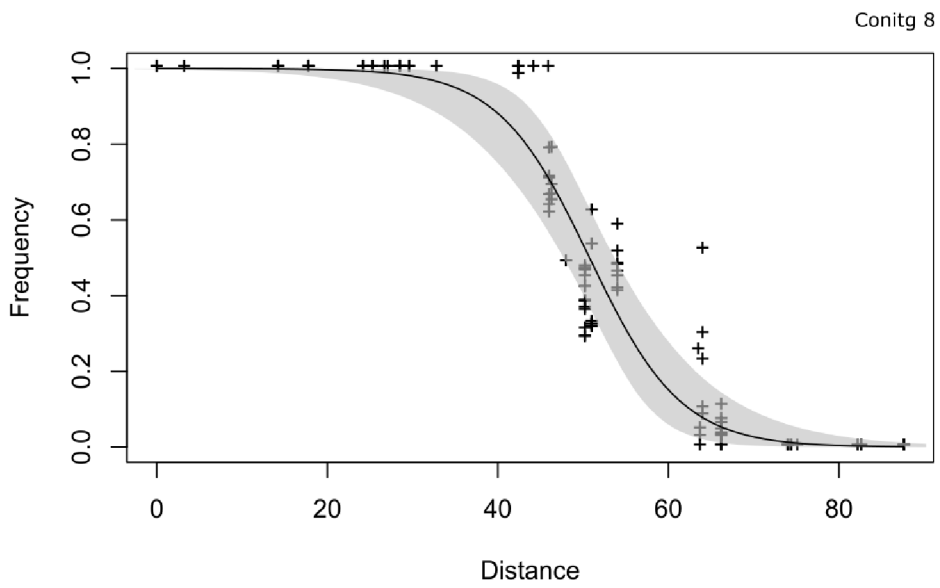
## 8 Přílohy



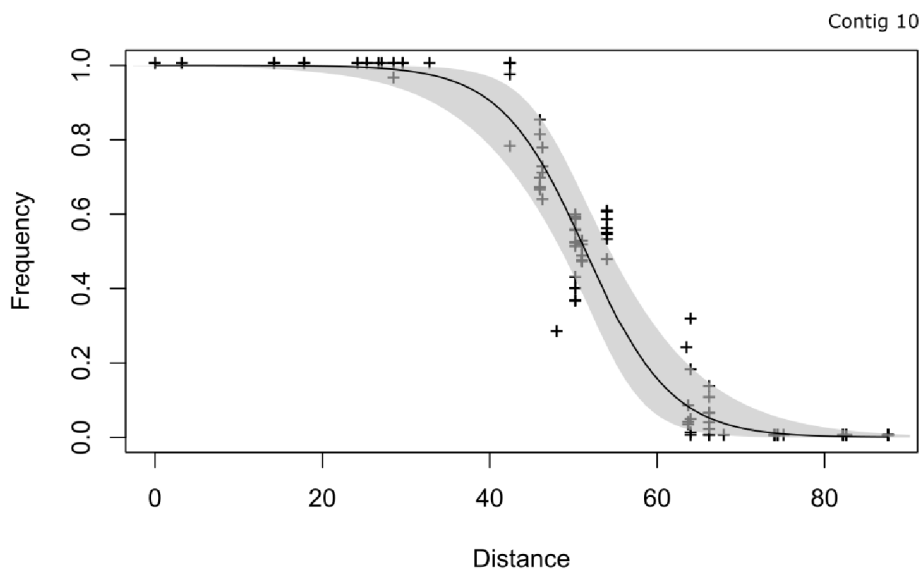
Obr. 11: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 7.



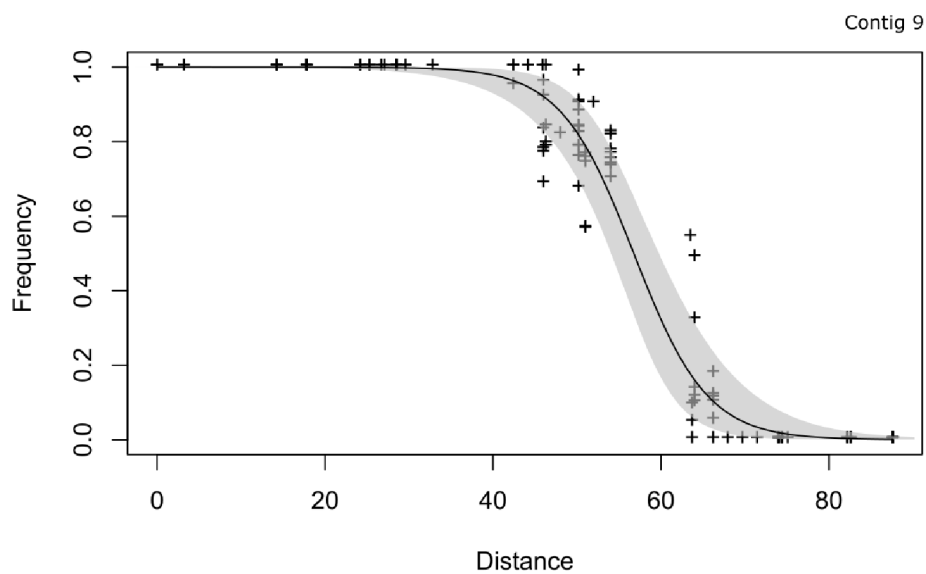
Obr. 12: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 94.



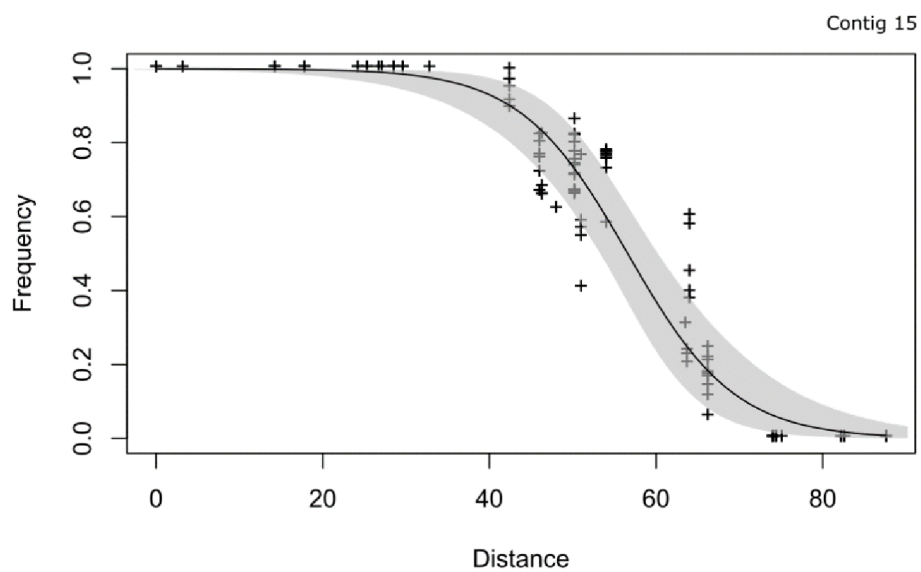
Obr. 13: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 8.



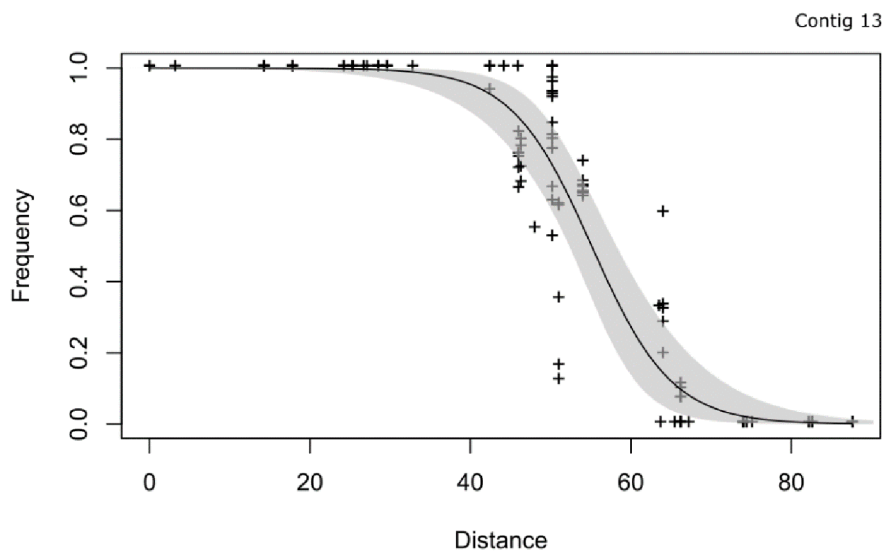
Obr. 14: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 10.



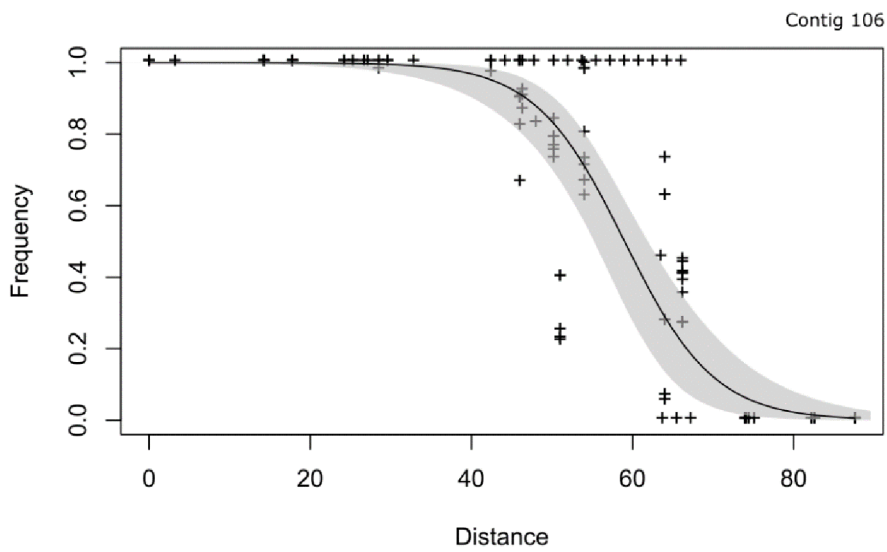
Obr. 15: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 9.



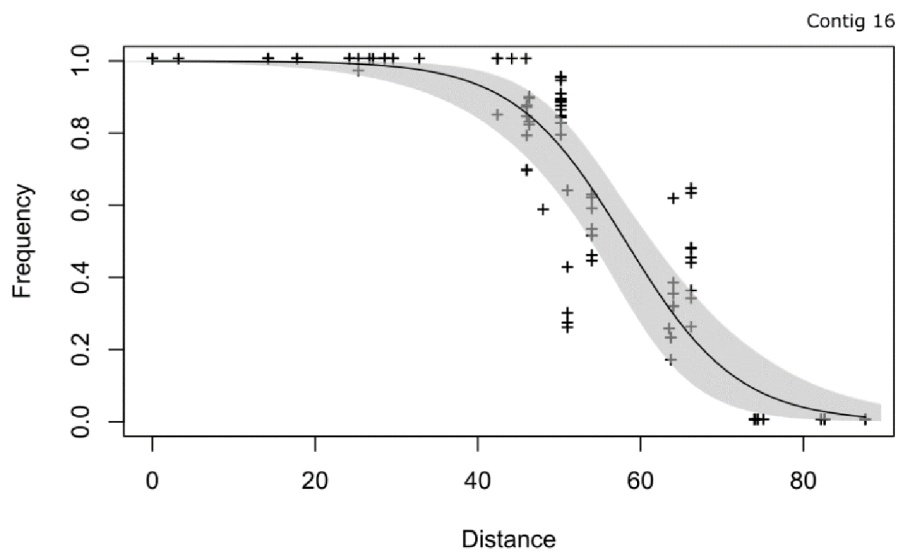
Obr. 16: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 15.



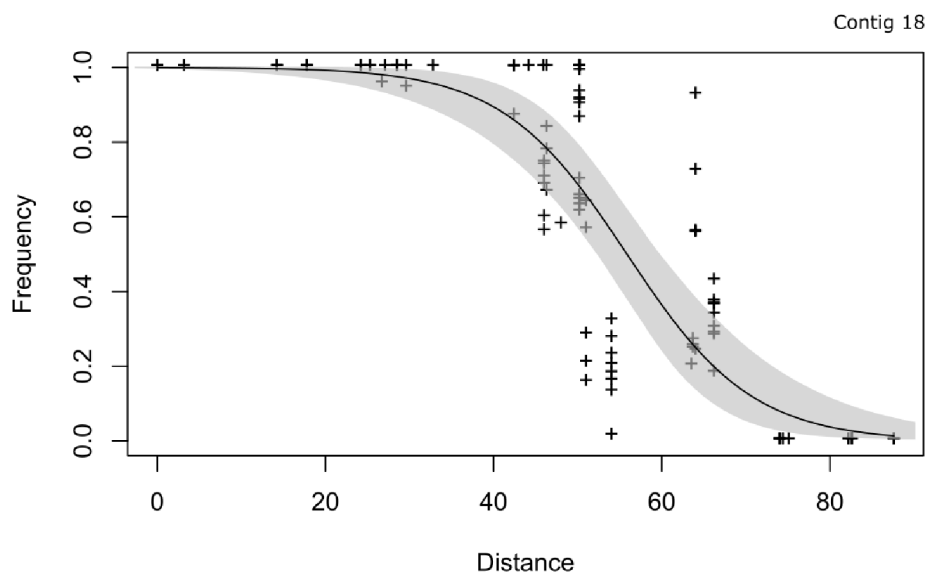
Obr. 17: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 13.



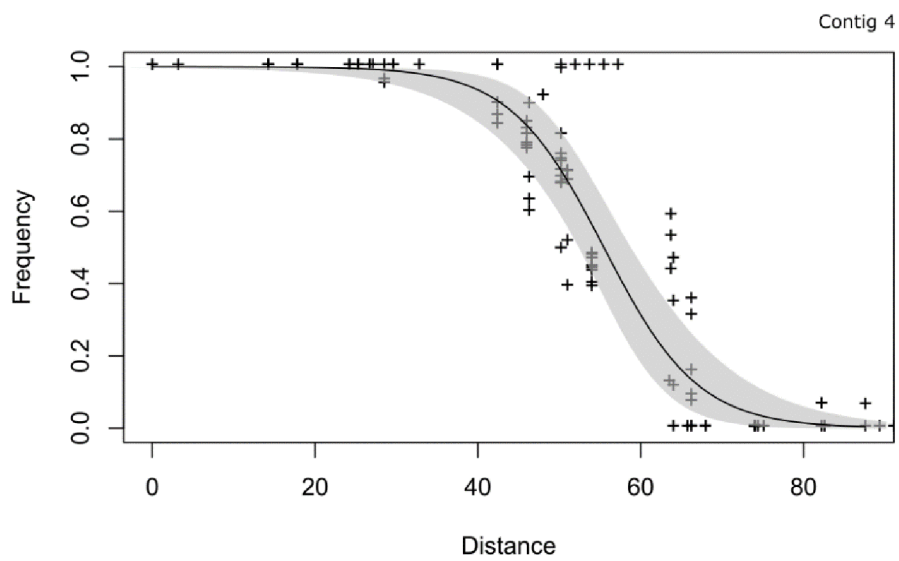
Obr. 18: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 106.



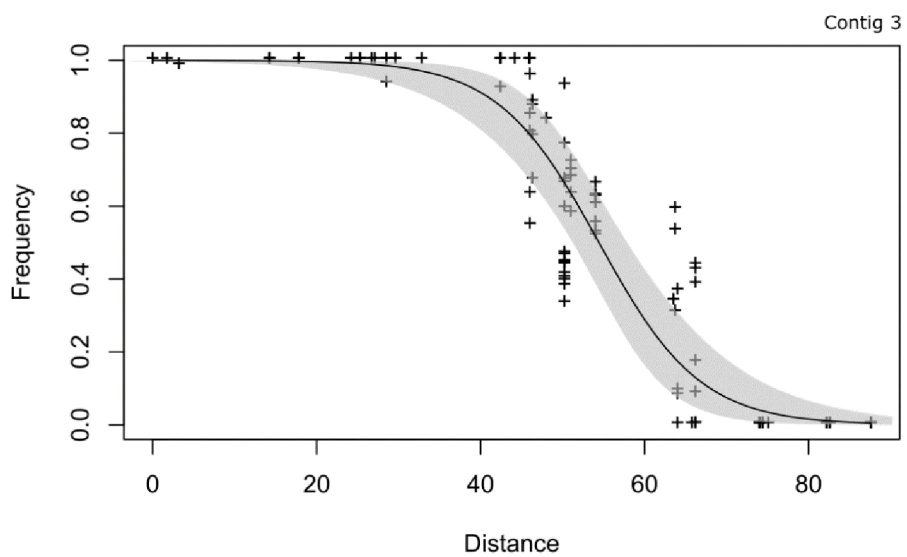
Obr. 19: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 16.



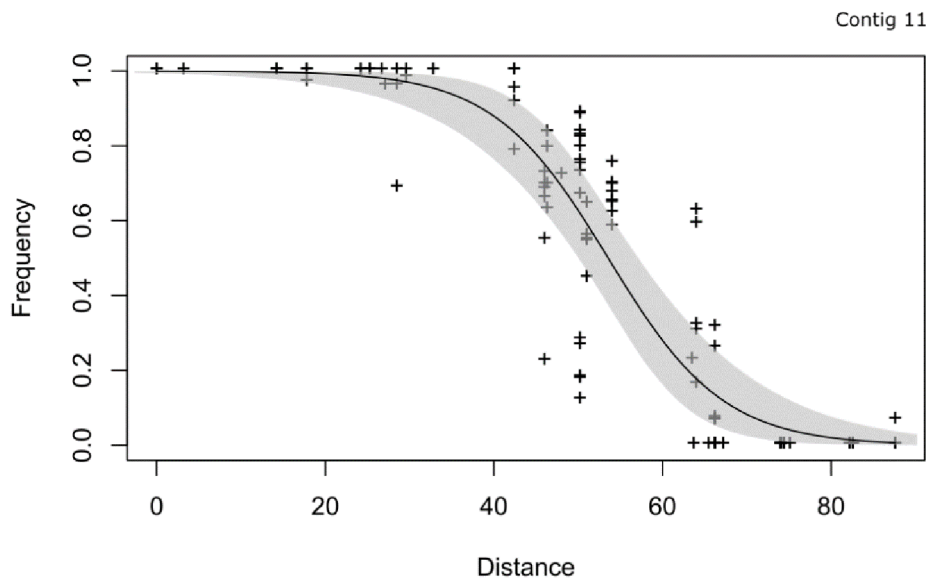
Obr. 20: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 18.



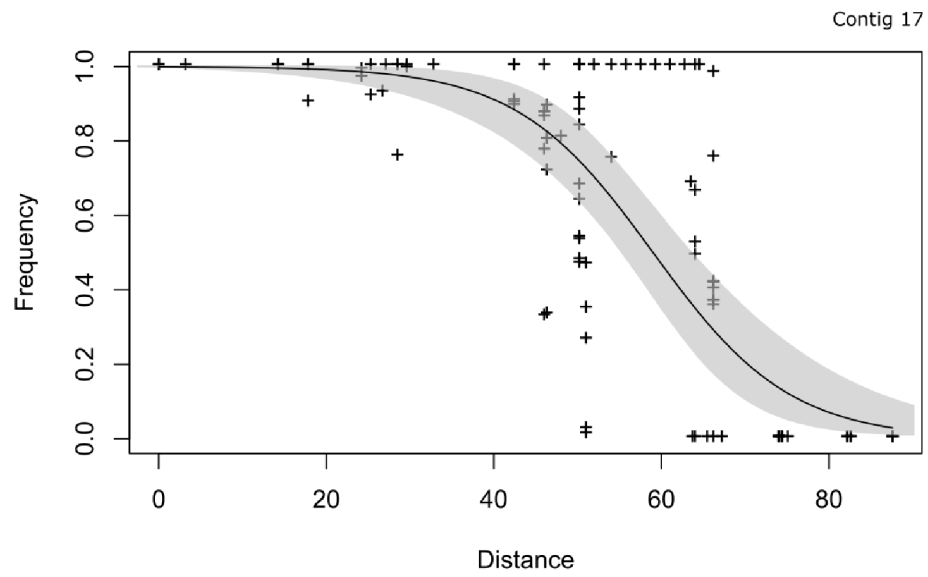
Obr. 21: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 4.



Obr. 22: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 3.

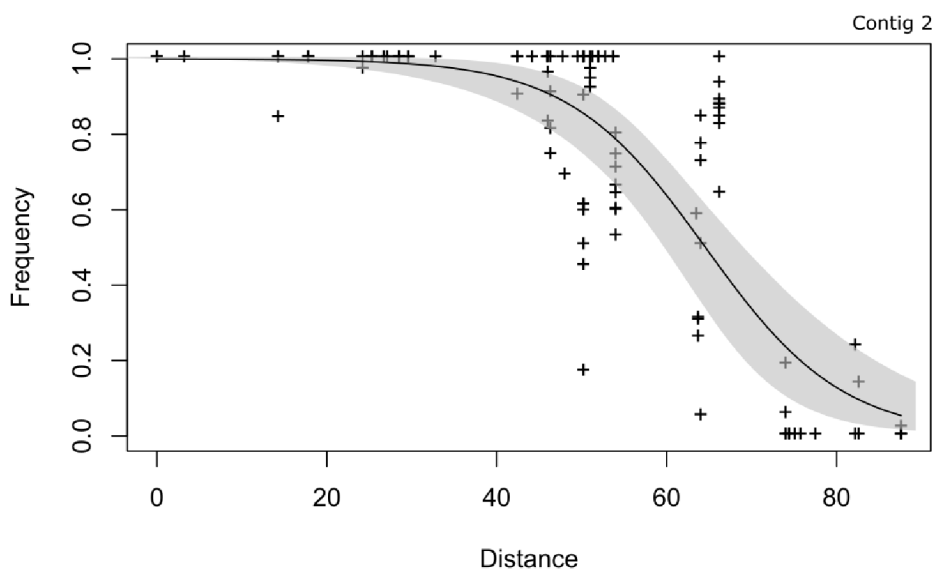


Obr. 23: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 11.



Obr. 24: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 17.





Obr. 25: Grafický výstup analýzy se softwarem HZAR pro kontig 2.

Tab. VIII. Seznam vzorků použitých pro mtDNA dataset.

Vzorek	Lokalita (zkratka)	Z. šířka	Z. délka	Vzdálenost na ose (km)	Genetická linie
<b>2HBb</b>	Horní Blatná (HB)	50.3977	12.759836	0	SW
<b>2HBb_</b>	Horní Blatná (HB)	50.3977	12.759836	0	SW
<b>2HB1_</b>	Horní Blatná (HB)	50.3977	12.759836	0	SW
<b>AB4</b>	Albertamy (AB)	50.369558	12.82884	3.2	SW
<b>CZJachA4_</b>	Jáchymov (JACH)	50.390639	12.903343	14.24	SW
<b>CZJachB4_</b>	Jáchymov (JACH)	50.390639	12.903343	14.24	SW
<b>CZJachA1_</b>	Jáchymov (JACH)	50.390639	12.903343	14.24	SW
<b>CZJachB1_</b>	Jáchymov (JACH)	50.390639	12.903343	14.24	SW
<b>CZJachC1_</b>	Jáchymov (JACH)	50.390639	12.903343	14.24	SW
<b>CZJachD1_</b>	Jáchymov (JACH)	50.390639	12.903343	14.24	SW
<b>CZJach3J_</b>	Jáchymov (JACH)	50.390639	12.903343	14.24	SW
<b>CZJachA3_</b>	Jáchymov (JACH)	50.390639	12.903343	14.24	SW
<b>Str10a4</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>Str10b6</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>Str10d4</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>Str10a5</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>Str10a12</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>Str10c12</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>12JStr_</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW

**Pokračování Tab. VIII.**

<b>CZStr10a10_</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>CZStr10b10_</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>1DouHr_</b>	Doupovské Hradiště (DouH)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>CZStr10a3_</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>CZStr10b12_</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>CZStr10b3_</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>CZStr10b5_</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>CZStr10a6_</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>Str10c4</b>	Doupovské Hradiště (DZ)	50.230416	13.014954	26.7	SW
<b>Str10a39</b>	voj. prostor Doupov (JM)	50.24375	13.049256	28.5	SW
<b>CZStr10b39_</b>	voj. prostor Doupov (JM)	50.24375	13.049256	28.5	SW
<b>CZStr10c39_</b>	voj. prostor Doupov (JM)	50.24375	13.049256	28.5	SW
<b>39JStr_</b>	voj. prostor Doupov (JM)	50.24375	13.049256	28.5	SW
<b>41DStr_</b>	voj. prostor Doupov (JM)	50.24375	13.049256	28.5	SW
<b>72JStr_</b>	Komárov (STR)	50.040819	13.062588	29.6	SW
<b>79JStr_</b>	Komárov (STR)	50.040819	13.062588	29.6	SW
<b>Str10a19</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>CZStr10a26_</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>CZStr1025_</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>CZStr10a15_</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>CZStr10b15_</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>CZStr10c15_</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>CZStr10b19_</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>Str10c19</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>Str10a20</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>Str10b20</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>Str10c20</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>Str10a29</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>Str10b29</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>16JStr_</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>15JStr_</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>21JStr_</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>20Str_</b>	Stružná (STR)	50.188426	12.99591	29.6	SW
<b>Str10b1</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>Str10c1</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>Str10c13</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW

Pokračování Tab. VIII.					
<b>Str10b14</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>Str10a16</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>Str10b16</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>1STRc_</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>13Str_</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>7bStr_</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>CZStr10b7_</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>CZStr10c7_</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>CZStr10a13_</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>CZStr10b13_</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>CZStr10a14_</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>CZStr10a7_</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>1Strb_</b>	Žalmanov (STR)	50.188525	12.98715	29.6	SW
<b>30VOJb_</b>	Vojkovice (VOJ)	50.289979	13.0161919	32.8	SW
<b>21Lo1b_</b>	Lomnice (LOM, LO)	50.263955	13.018557	32.8	SW
<b>CZDou0992_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>CZDou09b12_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>CZDou0917_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>CZDou09b21_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>CZDou09b22_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>CZDou0991_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>CZDou09a12_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>CZDou09c14_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>CZDou09a21_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>CZDou09a22_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>CZDou0993_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>CZDou09a14_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>CZDou0919_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>CZDou09c21_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>CZDou09c22_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>5DOUPOV_</b>	Lestkov (DOUP)	50.364145	13.190289	32.8	SW
<b>Str10a21</b>	Vojenský újezd Hradiště (VU)	50.185206	13.080543	33.1	SW
<b>Str10b21</b>	Vojenský újezd Hradiště (VU)	50.185206	13.080543	33.1	SW
<b>CZStr10a11_</b>	Vojenský újezd Hradiště (VU)	50.185206	13.080543	33.1	SW
<b>CZStr10b11_</b>	Vojenský újezd Hradiště (VU)	50.185206	13.080543	33.1	SW
<b>22JStr_</b>	Vojenský újezd Hradiště (VU)	50.185206	13.080543	33.1	SW
<b>11Str_</b>	Vojenský újezd Hradiště (VU)	50.185206	13.080543	33.1	SW
<b>36JStr_</b>	Vojenský újezd Hradiště (VU)	50.185206	13.080543	33.1	SW
<b>46JStr_</b>	Vojenský újezd Hradiště (VU)	50.185206	13.080543	33.1	SW
<b>CZStr10b36_</b>	Vojenský újezd Hradiště	50.185206	13.080543	33.1	SW

**Pokračování Tab. VIII.**

<b>CZStr1040_</b>	Vojenský újezd Hradiště (VU)	50.185206	13.080543	33.1	SW
<b>Str10c21</b>	Vojenský újezd Hradiště (VU)	50.185206	13.080543	33.1	SW
<b>VII13_</b>	Verušičky (VII)	50.151525	13.185241	42.4	Hyb
<b>VII12_</b>	Verušičky (VII)	50.151525	13.185241	42.4	Hyb
<b>VII15_</b>	Verušičky (VII)	50.151525	13.185241	42.4	Hyb
<b>VII14_</b>	Verušičky (VII)	50.151525	13.185241	42.4	Hyb
<b>VII18_</b>	Verušičky (VII)	50.151525	13.185241	42.4	Hyb
<b>16CHYb_</b>	Dvorec (CHY)	50.069557	13.287068	43.7	Hyb
<b>177ZL_</b>	Nevděk (ZL)	50.083267	13.16342	44.1	Hyb
<b>133ZLd_</b>	Protivec (ZL)	50.10091	13.209161	46	Hyb
<b>98ZL_</b>	Protivec (ZL)	50.10091	13.209159	46.3	Hyb
<b>182ZL_</b>	Mokrá (ZL)	50.122264	13.216168	47.5	Hyb
<b>164ZL_</b>	Mokrá (ZL)	50.122264	13.216168	47.5	Hyb
<b>133ZL_</b>	Protivec (ZL)	50.10091	13.209161	47.5	Hyb
<b>99ZL_</b>	Protivec (ZL)	50.10091	13.209159	47.5	Hyb
<b>133ZLc_</b>	Protivec (ZL)	50.10091	13.209161	47.5	Hyb
<b>106MAND</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.163823	49	Hyb
<b>106MANf_</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.163823	49	Hyb
<b>106MANe_</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.163823	49	Hyb
<b>106MAND_</b>	Nová Doubravice (Nečtiny) (MAN)	49.990235	13.163823	49	Hyb
<b>19CHYb_</b>	Poříčí, okres KV (CHY)	50.093586	13.26867	51	Hyb
<b>19CHYc_</b>	Poříčí, okres KV (CHY)	50.093586	13.26867	51	Hyb
<b>11RNSd</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.28939	54	Hyb
<b>11RNSe</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.28939	54	Hyb
<b>15RNSe</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.2894	54	Hyb
<b>11RNSc</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.28939	54	Hyb
<b>15RNSc</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.2894	54	Hyb
<b>15RNSf</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.2894	54	Hyb
<b>11RNSb_</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.28939	54	Hyb
<b>15RNSb_</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.2894	54	Hyb
<b>15RNSd</b>	Rabštejn nad Střelou (RNS)	50.04219	13.2894	54	Hyb
<b>22POT</b>	Potvorov (POT)	50.016008	13.395606	63.5	Hyb
<b>70KOC</b>	Řemešín (KOR)	49.993582	13.383746	63.7	Hyb
<b>15HV_16</b>	Hodovíz (HV)	49.955631	13.274451	64	Hyb

<b>Pokračování Tab. VIII.</b>					
<b>3HV<sub>a</sub>_14</b>	Hodovíz (HV)	49.955631	13.27445	64	Hyb
<b>2HV<sub>a</sub></b>	Hodovíz (HV)	49.955631	13.274449	64	Hyb
<b>28HV</b>	Hodovíz (HV)	49.955631	13.274453	64	Hyb
<b>22HVP</b>	Hodovíz (HV)	49.955631	13.274453	64	Hyb
<b>2HVN</b>	Hodovíz (HV)	49.955631	13.274453	64	Hyb
<b>16HV_24</b>	Hodovíz (HV)	49.955631	13.274452	64	Hyb
<b>23KOC</b>	Potvorov – Bukovina (KOR)	49.989676	13.413874	66.2	SE
<b>20KOC</b>	Potvorov – Bukovina (KOR)	49.989676	13.413874	66.2	SE
<b>36KOC</b>	Potvorov – Bukovina (KOR)	49.989676	13.413874	74	SE
<b>15KOC<sub>a</sub></b>	Kočín (u Kralovic) (KOC)	49.925264	13.483385	74	SE
<b>7KOC<sub>b</sub>_</b>	Kočín (u Kralovic) (KOC)	49.925264	13.483384	74	SE
<b>7KOC<sub>b</sub></b>	Kočín (u Kralovic) (KOC)	49.925264	13.483384	74	SE
<b>7KOC<sub>a</sub></b>	Kočín (u Kralovic) (KOC)	49.925264	13.483384	74	SE
<b>21KOR<sub>c</sub></b>	Koryta u Kralovic (DR)	49.899712	13.471053	74.4	SE
<b>KOR21<sub>a</sub></b>	Koryta u Kralovic (DR)	49.899712	13.471053	74.4	SE
<b>KOR21<sub>b</sub></b>	Koryta u Kralovic (DR)	49.899712	13.471053	74.4	SE
<b>RAD2<sub>a</sub></b>	Chockov (RAD)	49.895155	13.580371	82.2	SE
<b>RAD6<sub>a</sub></b>	Lhotka u Radnic (RAD)	49.89315	13.593359	82.2	SE
<b>RAD51<sub>a</sub></b>	Chomle (RAD)	49.860663	13.633592	82.6	SE
<b>RAD51<sub>c</sub></b>	Chomle (RAD)	49.860663	13.633592	82.6	SE
<b>RAD44<sub>a</sub></b>	Chomle (RAD)	49.860663	13.633591	87.6	SE
<b>RAD39<sub>e</sub></b>	Chomle (RAD)	49.860663	13.63359	87.6	SE