

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Koevoluce mezi ektoparazity a hlodavci druhů *Microtus* a
Clethrionomys na populační úrovni

Diplomová práce

Bc. Michaela Matějková

Školitel: Jan Štefka, PhD.

České Budějovice 2015

Diplomová práce:

Matějková M., 2015: Koevoluce mezi ektoparazity a hlodavci druhů *Microtus* a *Clethrionomys* na populační úrovni. [Coevolution between ectoparasites and rodents species *Microtus* and *Clethrionomys* at the population level, Mgr. Thesis, in Czech] – 64 pp, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The research reconstructs phylogeographic patterns of host populations of rodent species *Microtus agrestis*, *Microtus arvalis* and *Clethrionomys glareolus* from different European localities and the results are compared with the genetic structure of the sucking louse genus *Hoplopleura* from several localities across Europe.

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

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

V Českých Budějovicích dne 24. 4. 2015

Michaela Matějková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především Honzovi Štefkovi, že byl po celou dobu výborným školitelem, který mi pomohl a poradil vždy, když jsem potřebovala. Vacátkovi, že byl tím nejlepším vedoucím laboratoře. Evě Šochové, za rady týkající se fylogenetických programů a všem členům laboratoře, protože byli skvělý kolektiv, ve kterém jsem mohla 5 let s radostí pracovat a na který budu vždy ráda vzpomínat. Dále svým nepostradatelným spolužákům, se kterými jsme se vzájemně podporovali při psaní svých diplomových prací a užívali si krátké, volné chvílky u kávy. A Sašovi, za pomoc při grafické úpravě v době, když mi už docházely nervy.

Obsah:

1. Úvod.....	1
1.1. Fylogeografický patern Evropy	5
1.2. Glaciální refugia a současné rozšíření hlodavců druhů <i>Clethrionomys glareolus</i> , <i>Microtus agrestis</i> a <i>Microtus arvalis</i>	8
1.3. Genealogie vší druhu <i>Polyplax serrata</i> a rodu <i>Hoplopleura</i>	10
2. Cíle práce	13
3. Materiál a metodika	14
3.1. Odchyt hlodavců, odběr jejich ektoparazitů a biologických vzorků.....	14
3.2. DNA extrakce	29
3.3. PCR reakce, gelová elektroforéza a sekvenace.....	29
3.4. Práce se sekvencemi, alignmenty, fylogenetické analýzy a haplotypové sítě	31
4. Výsledky	33
4.1. Sekvence a alignmenty	33
4.2. Fylogenetické analýzy a haplotypové sítě	33
5. Diskuze	46
6. Závěr.....	53
7. Použitá literatura.....	54
8. Příloha	62

1. Úvod

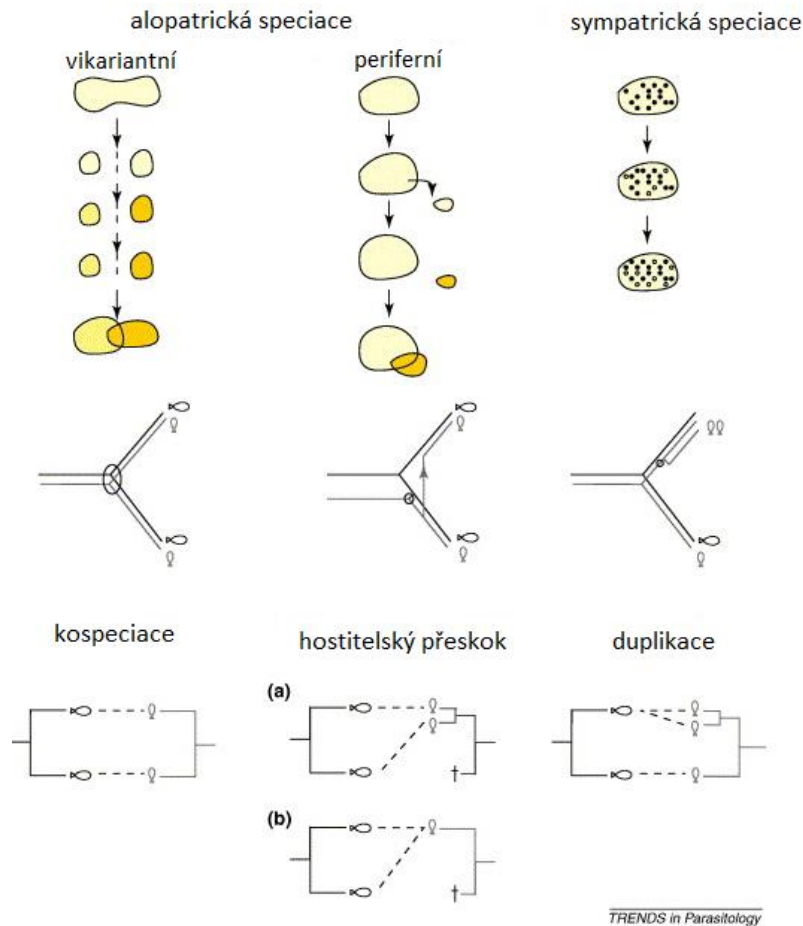
Pomocí moderních fylogenetických metod můžeme zjistit rozsah koevolučních vzorů zabývajících se spojením hostitel – parazit od velmi těsného, až po zcela oddělenou fylogenezi (Clayton a spol., 2004). Většina koevolučních prací byla založena na studiu fylogenetiky, pro pochopení základních evolučních mechanismů u systému hostitel – parazit, by ovšem bylo vhodné zahrnout také jejich genealogii a populační strukturu parazitů (Banks a Paterson, 2005).

Koevoluce mezi parazity a jejich hostiteli je dlouhou dobu uznávána jako základní hnací síla makroevolučních procesů (Page, 2003). Nicméně společnou diferenciaci může často zkreslovat geografický patern hostitelské distribuce (Nieberding a spol., 2008). Další procesy, které ovlivňují průběh evoluce a vznik nových linií jsou přeskoky parazita na jiného hostitele, duplikace linií či neschopnost parazita speciovat spolu s hostitelem (**Obr. 1**). Hlavní otázkou při studiu koevoluce je vysvětlení rozdílné hostitelské specifity (Thomson, 1994). Některé druhy parazitů mají široký hostitelský rozsah, kdežto jiní jsou vázáni pouze na jednoho či několik málo hostitelských druhů, tento rozsah a jeho omezení může být studován pomocí genetické struktury populací parazitů a to jak u jednohostitelských, tak i vícehostitelských druhů (Johnson a spol., 2002).

Vedle selekce specifických adaptací je pravděpodobně nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím míru hostitelské specifity schopnost disperze. Úroveň hostitelské specifity je z části daná schopností parazita se rozptýlit mezi více hostitelů. U parazitů s různými schopnostmi rozptylu se očekává rozdílný stupeň hostitelské specifity a v konečném důsledku také stupeň koevoluce pozorovaný mezi fylogenezemi hostitelů a parazitů (Clayton a spol., 2001). Takovéto rozdíly můžeme pozorovat i uvnitř jednotlivých parazitických skupin, například u všenek (Phthiraptera: Ischnocera), které vykazují vysoký stupeň hostitelské specifity díky tomu, že celý životní cyklus probíhá na jednom hostiteli. Z tohoto důvodu se přenos uskutečňuje v největší míře mezi rodiči a potomky hostitelů. V práci Johnson a spol. (2002) byly rozdíly mezi mírou kospeciace a hostitelské specifity u všenek rodů *Physconelloides* a *Columbicola*, parazitujících na holubech spojeny s odlišnými schopnostmi rozptylu, který byl především ovlivněn velikostí těla parazita, která koreluje s velikostí těla hostitele, a rozdílnou geografii jejich výskytu. Stejně tak zjistili, že “tělní“ druhy všenek

(body lice) parazitující na více hostitelích – (generalisté) byly ve všech případech odvozeny od hostitelsky specifických druhů tzv. specialistů. Ovšem oproti “křídelním” druhům všenek (wing lice) nebyly u tělních všenek zaznamenány změny korelující s potencionálně konkurenčními druhy. Místo toho evoluce hostitelských generalistů korelovala s ekologií jejich hostitelů. Z výsledků vyplynulo, že rozptyl mezi jednotlivými hostitelskými druhy je spojen s jejich častým kontaktem se zemí. “Tělní” všenky se uvolňovaly z těl hostitelů na zem 4 krát častěji, než všenky “křídelní”, tím se dostávaly do kontaktu s holuby pohybujícími se po zemi častěji, než všenky “křídelní”, na základě toho byla evoluce hostitelských generalistů spojena s terestrickými hostiteli a naopak “křídelní” všenky nevykazovaly takovýto charakter evoluce (Johnson a spol., 2011).

V případě všenek rodu *Menacanthus* hrají velkou roli při formování populační struktury u více hostitelských parazitů také geografie a ekologické faktory, které usnadňují hostitelské přeskoky a tak udržují genetický tok mezi nepříbuznými druhy hostitelských druhů. U *Menacanthus* spp. je rozdílnost hostitelské specifity pouze částečně shodná s ekologií jejich hostitelů (Martinů a spol., 2015). Přenos všenek aktivním rozptýlením je usnadněn při parazitování ekologicky blízkých hostitelů, kdy k přenosu dochází například při čištění peří (Johnson a spol., 2011). Podobné mechanismy mohou pomoci při rozptýlu všenek rodu *Menacanthus* mezi fylogeneticky nepříbuzné druhy hostitelů (Martinů a spol., 2015).



Obr. 1: Speciace hostitelských linií a jejich fylogenetická korelace s parazity. Důležité procesy, které ovlivňují evoluci: typy speciace – vznik nových linií; společná kospeciace v systému hostitel – parazit; přeskok parazita na dalšího hostitele a duplikace, která vzniká přechodným rozdělením a následným sloučením hostitelské populace, kdy díky krátké generační době parazita dochází ke speciaci, kdežto hostitelská populace zůstává geneticky stejná (Štefka a Hypša, 2008), (převzato z Huyse a spol., 2005).

Stupeň hostitelské specifity může ovlivňovat vnitrodruhovou genetickou strukturu a vytvoření bariér genetickému toku (Johnson a spol., 2002). Ne všichni parazité podstupující diferenciaci či speciaci musí přesně kopírovat genetickou strukturu a evoluční historii hostitele (Wickstrom a spol., 2003; Reed a spol., 2004), jako je tomu například u vší druhu *Pediculus humanus*, které se vyskytují ve dvou odlišných ekologických formách *Pediculus humanus corporis*, představující „hlavovou“ formu a *Pediculus humanus capitis*, která je formou šatní/tělní. Geneticky však *P. humanus* vytváří tři linie, které se od sebe liší geograficky i specifitou vůči různým habitatům na

svém hostiteli (Kittler a spol., 2003; Reed a spol., 2004). Monofyletická hlavová linie se vyskytuje zejména v Novém světě a Evropě, druhá linie je směsí jak formy hlavové, tak i šatní s celosvětovým rozšířením a třetí je forma hlavová zahrnující oblast Afriky.

Speciace parazitů a koevoluce hostitel – parazit může být studována na makroevoluční i mikroevoluční úrovni. Makroevoluční stupeň představuje mezidruhové geografické rozšíření a diverzitu parazitů a evoluční mechanismy, které se podílejí na formování populační struktury (Huysse a spol., 2005). Striktní kospeciace je častá v situaci, kdy je zabráněno přeskoku mezi hostiteli tím, že hostitelský druh nevykazuje intenzivní sociální chování a parazit má nízkou pohyblivost, případně postrádá vektor umožňující účinnou disperzi (Whiteman a Parker, 2004). Tento typ se vyskytuje například u hlodavců a jejich vší (Hafner a spol., 1988; Hafner a Page, 1996).

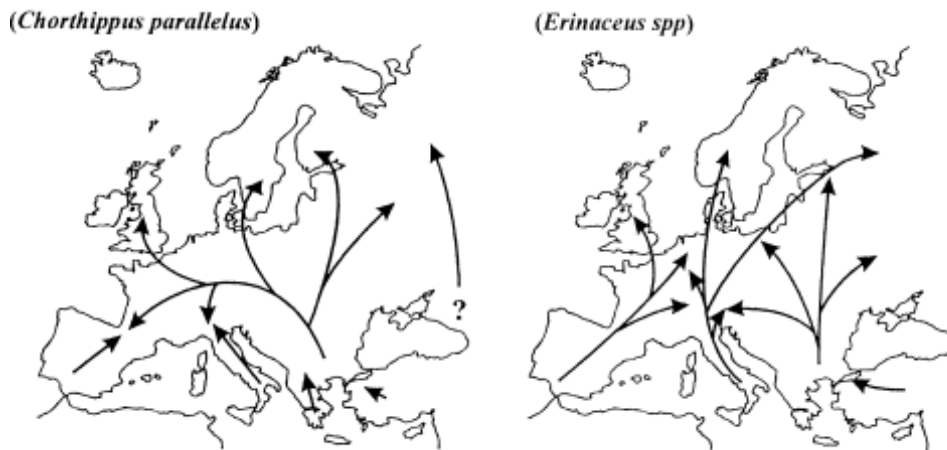
Genetická informace se hojně využívá pro rekonstrukci evoluční a demografické historie organismů. Nově se předpokládá, že genetická informace parazitů může poměrně přesně odrážet evoluční historii jejich hostitelů a v některých případech parazit poskytuje podrobnější informace, kdy díky vyšší mutační rychlosti geny parazitů umožňují lépe rekonstruovat nedávnou historii (Nieberding a Olivieri, 2007). Tento způsob byl využit při rekonstrukci genealogie a migrace *Homo sapiens*, kdy prostřednictvím helmintů (*Necator*, *Ancylostoma*, *Trichuris trichura*), kteří byli nalezeni v mumích a koproliitech v Severní a Jižní Americe, byly zjištěny nové možné trasy k prehistorickému osídlení Ameriky (Araujo a spol., 2008).

Danou informaci mohou poskytnout i ektoparazité, například studium populační struktury všenek druhu *Colpocephalum turbinatum* parazitujících galapážské káně (*Buteo galapagoensis*) umožnilo náhled do kryptické evoluční historie jejich ohroženého hostitele, případně i pomoci s návrhy vypracovanými na jeho ochranu (Whiteman a spol., 2007). Další druh parazita, všenka *Degeeriella regalis* zase umožnila sledovat tok genů hostitele a tím zjistit historii kolonizace galapážského káněte mezi jednotlivými ostrovy (Whiteman a spol., 2007). Síla vazby hostitel – parazit závisí na třech hlavních vlastnostech parazita: míře hostitelské specifity, přítomnosti nebo absenci mezihostitele a přítomnosti či absenci volně žijícího vývojového stádia (Clayton a Johnson, 2003).

1.1. Fylogeografický patern Evropy

Fylogeografie je poměrně nová disciplína, která se zabývá geografickým rozložením genetických linií, zejména u blízce příbuzných druhů (Avice, 2009). Vytváří most mezi populační genetikou a fylogenetickou systematikou, zabývá se historickými procesy populační genetiky a evolučními událostmi, jako jsou speciace, rozdělení populace, nebo migrace spojená s klimatickými změnami. Ke studiu živočichů se nejčastěji využívá mitochondriální DNA (mtDNA), která je ale méně úspěšná při studiu rostlin a dalších skupin, díky nižší evoluční rychlosti jejich chloroplastové a mitochondriální DNA, proto se zde využívá spíše jaderná DNA (Avice, 2000). Fylogeografická analýza na těchto klasických genetických markrech začíná být nahrazována jinými, například RAD tag sekvenováním, které (oproti mtDNA či mikrosatelitům) poskytuje mnohem detailnější informace pokrývající celý genom, čímž umožňuje přesnější rekonstrukci fylogeografických vztahů, než tomu bylo doposud (Emerson, 2010).

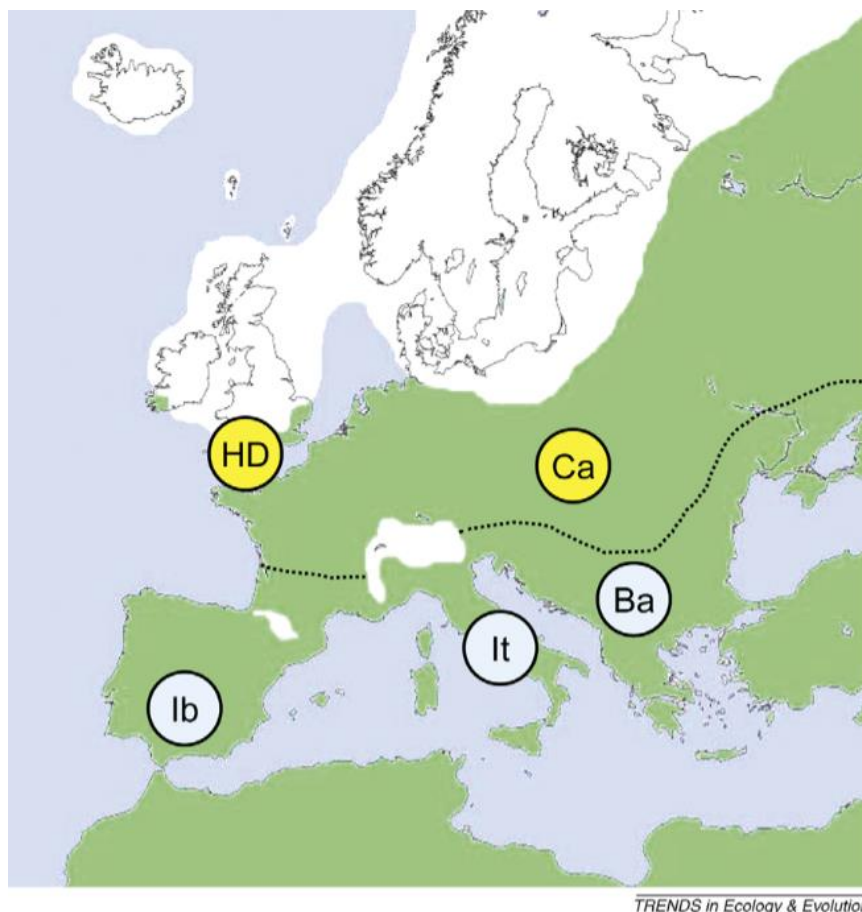
Klimatické změny mají zásadní dopad na geografické rozšíření, demografii a evoluci druhů (Hewitt, 2004). Čtvrtohorní doby ledové (před 2,6 mil. let) jsou hlavním faktorem utvářejícím novodobé rozdělení dochované fauny a flory, zejména v temperátních oblastech. Poslední glaciální období (před 23 tis. – 18 tis. let) mělo největší dopad na současné druhové rozšíření (Provan a Bennet, 2008). Místo a velikost glaciálních refugií a bariéry postglaciálního osidlování jsou důležitými faktory určujícími dnešní biogeografické paterny v Evropě (Schmitt, 2007). Palynologické i paleontologické nálezy spolu s biogeografickými daty naznačují, že mnoho druhů přežilo glaciální maxima v nižších zeměpisných šířkách, kde byly příznivější klimatické podmínky (Bennet a spol., 1991; Williams a spol., 1998). Z tohoto důvodu se v Evropě staly poloostrovy Balkán, Ibérie a Itálie důležitými refugii, kde druhy poslední glaciál přežily a odkud znovu rekolonizovaly severnější části Evropy s příchodem oteplení, které nastalo v postglaciálu (Brunsfeld a spol., 2001). O rekolonizaci Evropy se nejvíce přičinilo balkánské refugium, poté iberijské a nejméně italské, což bylo zřejmě způsobeno pohořími (Alpy a Pyreneje), které mohly sloužit jako bariéry při postglaciální rekolonizaci Evropy (Hewitt, 2011). V oblastech představující glaciální refugia je patrná genetická rozmanitost u mnoha druhů organismů. Nejvíce patrné je to na Ibérii, kde byl tento jev popsán jako “refugium v refugiu” (Hewitt, 2010).



Obr. 2: Předpokládané trasy postglaciální rekolonizace Evropy z hlavních refugií ležících na jihu Evropy odvozené z genetických, klimatických a fosilních záznamů dvou vzorových druhů – saranče obecná (*Chorthippus parallelus*) a ježka spp. (*Erinaceus spp.*) (převzato z Hewitt, 2001).

Ovšem několik novějších studií založených na fosilních záznamech nyní ukazuje, že některé druhy savců a stromů mohly přežít dobu ledovou v oblastech střední Evropy (Stewart a spol., 2001; Jaarola a Searle, 2002), pravděpodobně více rozptýleni s menší hustotou osídlení, než měly druhy na jihu, což zpochybňuje doposud uznávanou teorii, že severní oblasti Evropy byly rekolonizovány výhradně z jižních refugií. Hlavní severní refugium pro různé druhy se nachází na území Karpat, jeho existenci potvrzují studie prováděné na savcích, plazech i obojživelnících a je podpořeno i fosilními záznamy a palynologickými studiemi (Jaarola a Searle, 2002; Babik a spol., 2004; Willis a spol., 2004; Ursenbacher a spol., 2006). Velké překvapení způsobilo objevení marinního glaciálního refugia v oblasti Lamanšského průlivu. Bylo objeveno při výzkumu mořských řas, které vykazovaly vysokou genetickou diverzitu navzdory skutečnosti, že oblast mezi Anglií a Francií byla během posledního glaciálu přístupná z důvodu nízké hladiny moře (Stam a spol., 2001). Příkop Hurd v Lamanšském průlivu přetrval jako marinní jezero a sloužil jako refugium pro vodní organismy. Výzkum rejnoků (*Raja clavata*) také potvrdil vysoký stupeň genetické diversity (Chevolot a spol., 2006), (**Obr. 3**). Další studie zabývající se rozšířením drobných savců v poslední době ledové poukazuje na možnost severnějších refugií

v oblastech centrální a východní Evropy spolu s jižní částí Russian Plane, které poskytovaly vhodné podmínky pro přežití glaciálu (Floydgaard a spol., 2009).



Obr. 3: Mapa znázorňující oblasti třech hlavních jižních refugií tvořené poloostrovem Ibérie (Ib), Itálie (It) a Balkánu (Ba) a dvě kryptická refugia nacházející se v Karpatech (Ca) a příkop Hurd (HD), (převzato z Provan a Bennett, 2008).

Ačkoliv fylogeografický přístup úspěšně prokazuje vzory rekolonizace během expanzní fáze, nemůže poskytnout informace o dynamice populací během stahování druhů ze severních oblastí. Není zde jasné, zda se daný druh přemístil do refugia v reakci na klimatické změny nebo zda populace mimo území refugia jednoduše vyhynula (Provan a Bennett, 2008). Takovým příkladem je studie prováděná na polární lišce (*Alopex lagopus*), která ukazuje, že se rozšíření populace během stahování neměnilo, ale spíše zaniklo. Z čehož vyplývá, že zánik populací má při

změně území důležitější roli než migrace, což nám může poskytnout podstatné informace v návaznosti na současné klimatické změny, zvláště pro druhy adaptované na život v chladných oblastech (Dalén a spol., 2007).

Poslední výzkumy zabývající se studiem DNA temperátních druhů naznačují, že představa dlouhodobého vývoje druhů v izolovaných refugiích je mylný. Dokazují to studie prováděné na medvědu hnědém (*Ursus arctos*), který byl po dlouhou dobu považován za učebnicový příklad právě takového vývoje, ale na základě DNA z fosílií se ukázalo, že se medvědi křížili i napříč jednotlivými refugii a nejednalo se tedy jen o izolovaný vývoj. Nicméně stávající výzkum, který předpokládá vývoj druhů v rámci jednotlivého refugia je stále důležitý k poznání populační dynamiky v době ledové a postglaciálu (Leonard a spol., 2000; Valdiosera a spol., 2007).

1.2. Glaciální refugia a současné rozšíření hlodavců druhů *Clethrionomys glareolus*, *Microtus agrestis* a *Microtus arvalis*

Norník rudý (*Clethrionomys glareolus*) patří mezi naše nejběžnější drobné savce. Vyskytuje se na území celé Evropy s výjimkou velké části Iberského poloostrova, Řecka, středomořských ostrovů a Islandu. Dále na východ je rozšířen až na území rozprostírající se na střední Sibiři - Altaj a Bajkalské jezero. Obývá především lesnatá území temperátních borovicových či smíšených lesů (Anděra a Horáček, 2005). Poslední dobu ledovou (před 25 tis. – 10 tis. let) přečkal kromě hlavních refugiích v jižní části Evropy, nacházejících se na území Iberského, Italského a Balkánského poloostrova, také v blízkosti Karpat (Kotlík a spol., 2006). Z tohoto kryptického refugia byla následně rekolonizována část Skandinávského poloostrova (Norsko, Švédsko) a odtud dále Velká Británie (Filipi a spol., 2015). O rekolonizaci severní části Skandinávského poloostrova se zasloužili norníci z refugia ležícího na území Uralu. Pro západní linii norníků sloužilo jako refugium území centrální Evropy (Rakousko, Maďarsko, Slovensko a Rumunsko). Podle nejnovější studie se *C. glareolus* větví na 8 mitochondriálních linií – karpatskou, západní, východní, španělskou, italskou, balkánskou, Kalabrii a uralskou (Deffontaine a spol., 2005; Filipi a spol., 2015).

Hraboš mokřadní (*Microtus agrestis*) byl u nás zprvu považován za vzácný druh, ale později se zjistilo, že je místy zcela běžný. Obývá místa od 140 m. n. m. (Děčínsko, Mostecko) do 1600 m. n. m. (Krkonoše, Hrubý Jeseník), ale doposud nebyl zjištěn v nížinách středních a východních Čech spolu s jižní Moravou. V Evropě je rozšířen od Velké Británie a některých dalších ostrovů až po Bajkal ve střední Sibiři. Chybí v Irsku a na Islandu. Jižní hranici výskytu tvoří horské oblasti Španělska, Itálie, Slovinska a oblast Balkánu a na severu dosahuje až k pobřeží Severního ledového oceánu (Anděra a Horáček, 2005). *M. agrestis* se dělí do 6 hlavních fylogenetických skupin – východní, centrální, skandinávskou, západní, jižní, francouzskou a severní Británii. Západní linie se pravděpodobně rozšířila z refugia v Karpatech, východní skupina má pravděpodobný původ v jihovýchodní Evropě – Ural či Kavkaz a jižní linie s glaciálním refugiem na Iberském poloostrově (Herman a Searle, 2011; Jaarola a Searle, 2002). Molekulární hodiny ukazují, že západní a východní populace hraboše mokřadního se oddělily během podledního glaciálu, kdežto jižní populace je datována do období před 0,5 – 0,9 miliony let (Jaarola a Searle, 2002).

Hraboš polní (*Microtus arvalis*) je jeden z našich nejběžnějších drobných savců vyskytující se na celém území České republiky. Vyskytuje se od odlesněných horských nížin, podél silnic a cest, až po horní hranici lesa včetně vyšších nadmořských poloh (Alpy – 2000 m. n. m., Krkonoše). Obývá téměř celou Evropu, kromě Skandinávie, Finska a větší části Středomoří, až po Ukrajinu a Rusko. Izolované populace se vyskytují na některých ostrovech např. Orknejské ostrovy (Anděra a Horáček, 2005). Nynější geografické rozložení je silně ovlivněno posledním glaciálním maximem i evropskými pohořími tvořícími bariéry při opětovné kolonizaci. Fosilní nálezy potvrdily jeho přítomnost i před posledním maximem a dnes je velice rozšířený po celé Evropě (Chaline a spol., 1999). Rozděluje se do 6 hlavních evolučních linií – západní, Freiburg, centrální, východní, balkánskou a italskou (Bužan a spol., 2010). K rozdělení těchto linií došlo v různých časových obdobích, což naznačuje složitější glaciální historii. Kromě klasického rozšíření z jižních refugií na Ibérii, Itálii a Balkánu se na základě genetických a ekologických dat poukazuje na kolonizaci centrální Evropy populacemi z alpského refugia (Heckel a spol., 2005). Italská linie se mohla rozšířit na stávající území prvně z alpského refugia na jihu Alp díky tomu, že obešla pohoří ze západu nebo východu. I když jsou horská pohoří pro drobné savce považována za bariéry bránící kolonizaci, fylogenetické analýzy hraboše

polního ukázaly na čtyři transalpínské kolonizační události (Braakel a Heckel, 2009). Kolébka postglaciální expanze *M. arvalis* se nachází na západě centrální Evropy, odkud se rozšířil do zbytku území po poslední době ledové. Východní a balkánská linie jsou sympatrické na jednom území v Bosně a Hercegovině (Bužan a spol., 2010).

1.3. Genealogie vši druhu *Polyplax serrata* a rodu *Hoplopleura*

Polyplax serrata je dosud jediným zástupcem vši (Anoplura) parazitující evropské drobné hlodavce, který byl molekulárně studován na populační úrovni. *P. serrata* parazituje myšice rodu *Apodemus*, má mnohem složitější populační strukturu, než se zprvu očekávalo, i když jsou jejich genealogické vztahy mezi haplotypy ovlivněny hostitelskou fylogenezí, tak neodrážejí evoluci hostitele klasickým jednoduchým způsobem (Štefka a Hypša, 2008). Dělí se do tří geneticky odlišných větví s odlišnou geografii i mírou hostitelské specifity v sympatrických populacích. Ovšem rozdělení do odlišných větví nemusí nutně znamenat existenci tří samostatných druhů. Tato studie byla prováděna na úseku mitochondriálního genu DNA, který je děděn matriarchálně a může zachovat informace z daleké historie i po fúzi populací. První mitochondriální větev, objevená při výzkumu, byla hostitelsky specifická a vyskytovala se pouze na myšici druhu *Apodemus flavicollis* a byla v kontrastu s větví, jejíž hostiteli byly myšice druhu *Apodemus flavicollis* i *Apodemus sylvaticus*. Třetí větev parazitovala opět na dvou druzích myšic *Apodemus agrarius* a *Apodemus uralensis*. Odchyty hlodavců z prvních dvou větví byly prováděny na sympatrických lokalitách. Jelikož nedošlo k promíchání genetických linií mezi různými hostiteli, nelze předpokládat, že by genetická bariéra mezi jednotlivými větvemi byla způsobena fyzickou izolací. Z tohoto důvodu můžeme usuzovat, že jednotlivé větve představují kryptické druhy, nebo silně divergentní populace, jejichž hostitelská specifita se udržuje za pomoci adaptivní složky evoluce.

Lze postulovat dva scénáře, které podávají vysvětlení vzniku dvou linií s odlišnou mírou hostitelské specifity. První tvoří hostitelský přeskok, kdy se na území Evropy nacházely dvě hostitelsky specifické linie vši druhu *P. serrata*. Jedna z linií byla hostitelsky zaměřena na myšici druhu *A. flavicollis* a druhá byla spojena s *A. sylvaticus*. Všichni z *A. sylvaticus* přeskočily na *A. flavicollis* a tím si rozšířily své hostitelské spektrum. Druhým scénářem je duplikace, kdy *A. flavicollis* spolu

s *A. sylvaticus* jsou obě původním hostitelem *P. serrata* a hostitelsky specifitější linie se vytvořila později, v některém z glaciálních refugií specifickém pouze pro *A. flavicollis*. Přesnějším určení vzniku odlišné linie lze v tomto případě provést pomocí datování speciálních událostí parazita a hostitele (Hypša, 2006). K oddělení jednotlivých větví *P. serrata* došlo před 1,5 miliony let (Štefka a Hypša, 2008), což je mnohem později, než tomu bylo u hostitelů. Podle paleontologického záznamu došlo ke speciaci *A. sylvaticus* a *A. flavicollis* již před 4 miliony lety (Michaux a spol., 2005). Díky tomuto datování se můžeme přiklonit k druhé hypotéze vzniku odlišných linií. Studie vši druhu *P. serrata* velmi dobře zaznamenává význam glaciální historie pro diverzifikaci parazitů palearktické fauny.

Alternativní koevoluční model s podobnými rysy představují vši druhu *Polyplax arvicantis* parazitující myši rodu *Rhabdomys* žijící v jižní Africe. Nová molekulární data naznačují existenci dvou kryptických druhů *P. arvicantis*, které mají sympatrickou distribuci se čtyřmi hostitelskými druhy myši rodu *Rhabdomys*. Navzdory zdokumentované hostitelské specifitě těchto vší, byla zaznamenána nízká fylogeografická shoda a nevýrazná kofylogeneze. Namísto toho je evoluční historie hostitel – parazit charakterizována omezenou kodivergencí a několika duplikacemi, sortingem ancestrálních linií a hostitelskými přeskoky. Přestože *P. arvicantis* má vyšší mutační rychlost, nebyla její genetická struktura výraznější než u hostitelů, což může být vlivem větší efektivní velikosti populace (N_e) parazita, na kterou má podle studie vliv pohyblivost, nízká hostitelská specifita v oblastech, kde se hostitelé vyskytují sympatricky, rozsáhlé propojené hostitelské populace a dále pak sociální chování hostitele. Genetická rozdílnost je také připisována historickým biogeografickým změnám (stahování druhů ze severních oblastí a opětovná kolonizace). Je tedy zřejmé, že vztah mezi vešmi druhu *P. arvicantis* a hlodavci rodu *Rhabdomys* byl ovlivněn pohyblivostí parazita, hostitelskými faktory a biogeografií (du Toit a spol., 2013).

Vši rodu *Hoplopleura*, které parazitují na drobných hlodavcích rodu *Microtus* a *Clethrionomys* si jsou morfologicky blízké. Z tohoto důvodu byly vši parazitující na hraboších druhu *M. agrestis* a *M. arvalis* považovány za jeden společný druh jako vši parazitující na nornících druhu *C. glareolus*. Až v roce 1966 byly vši parazitující na nornících určeny za samostatný druh *Hoplopleura edentula* na základě rozdílu v tloušťce paratergálních destiček a délce a tloušťce štětín, které z nich vyrůstají, což jsou nejviditelnější a nejspolehlivější diagnostické znaky mezi danými druhy

(Beacournu, 1966). Do té doby byli zástupci *H. edentula* považováni za podlinii vši druhu *Hoplopleura acanthopus*. *H. edentula* je boreo – alpský druh, který převládá u norníků a vyskytuje se ve vyšší nadmořské výšce, kdežto v nižší nadmořské výšce je vzácnější a je zde zastoupen vešmi druhu *H. acanthopus* (Kohn a Štěřba, 1987), tento výzkum byl prováděn pouze na základě morfologických znaků vši a s omezeným počtem jedinců, proto by tomuto geografickému rozdělení neměl být přikládán velký důraz. V mé bakalářské práci zabývající se diverzitou populací prostřednictvím sekvencí mitochondriální DNA se vši rodu *Hoplopleura* z hrabošovitých hlodavců rozdělily do pěti fylogeneticky rozlišených linií (linie 1, 2, 3, 4, 5). Linie 1 obsahovala vši druhu *H. edentula*, které měly za hostitele norníka (*C. glareolus*), z území České republiky, Slovenska a Německa. Linie 2 zahrnovala vši ze severozápadu Čech – Litvínov a Stružná a vykazovala hostitelskou specifitu pro hraboše rodu *Microtus*. Linie 3 obsahovala vši z obou druhů hrabošů (*M. agrestis* a *M. arvalis*) ze západu a severozápadu Čech. Linie 4 se rozprostírala po celém území České republiky a také obsahovala několik vzorků ze Slovenska, tato linie vykazovala hostitelskou specifitu pro hraboše rodu *Microtus*. Poslední linie 5 byla rozšířena po území východního Slovenska a byla zaznamenána z hostitelů *M. arvalis* a *C. glareolus* a jeden vzorek z *A. flavicollis* (Marvanová, 2011; Matějková, 2012).

2. Cíle práce

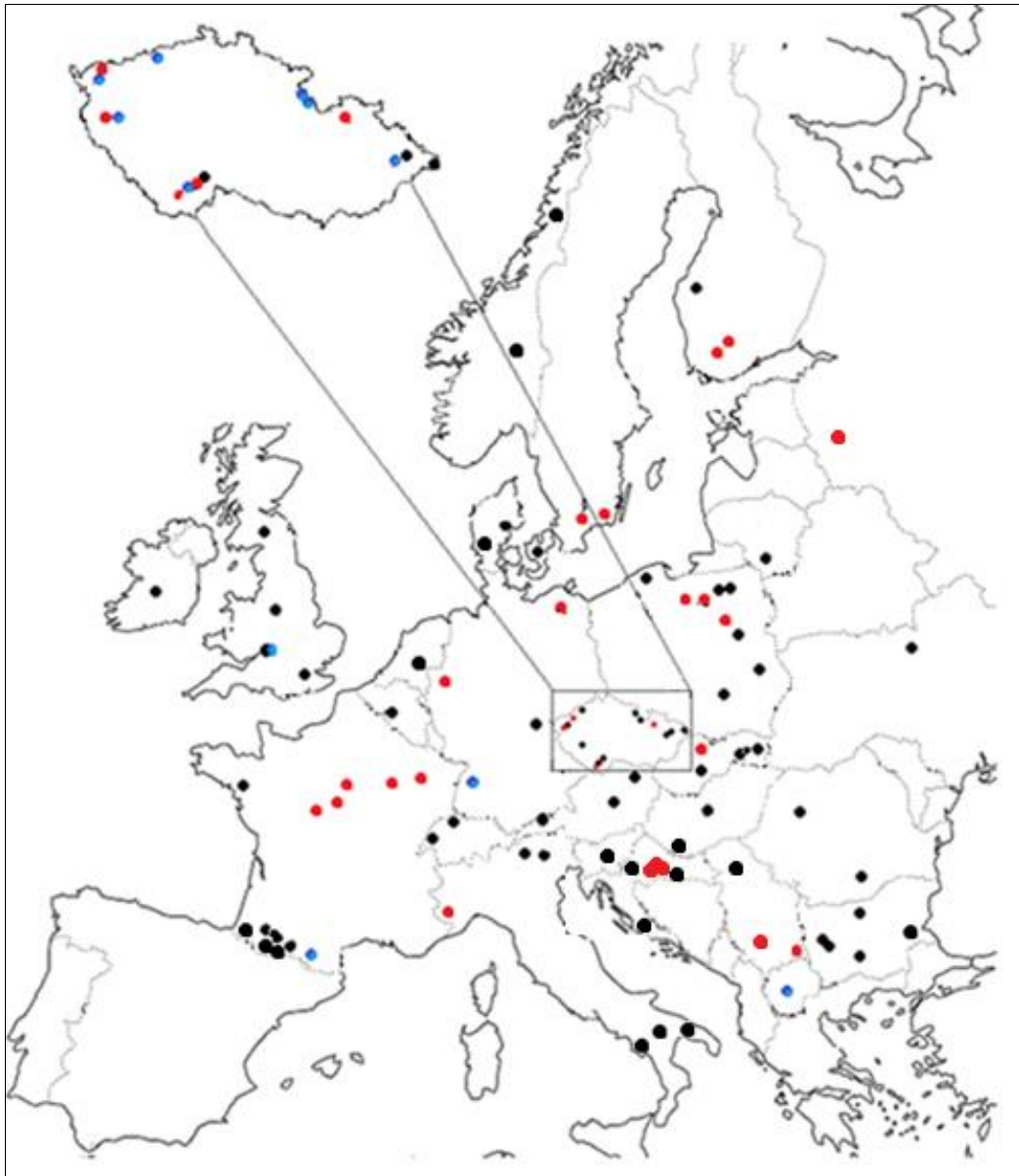
- 1.) Provést odchyty hostitelů a sběry parazitů na vhodných lokalitách v ČR a zahraničí.
- 2.) Charakterizovat populační strukturu hostitelů a ektoparazitů pomocí mitochondriální DNA.
- 3.) Rekonstruovat evoluční historii studovaných druhů a analyzovat parametry ovlivňující stávající rozložení populační struktury.

3. Materiál a metodika

3.1. Odchyt hlodavců, odběr jejich ektoparazitů a biologických vzorků

Odchyty drobných hlodavců se konaly od roku 2003 do roku 2014 na lokalitách patnácti států Evropy (Bulharsko, Česká republika, Finsko, Francie, Chorvatsko, Itálie, Maďarsko, Makedonie, Německo, Polsko, Rusko, Slovensko, Srbsko, Švédsko, Velká Británie). Hlodavci byli chytáni do dřevěných sklapovacích pastí a poté jim byly odebrány vzorky tkáně (ve většině případů prsty, výjimečně ocas nebo ucho), které byly uchovány v 96 % ethanolu. Zvířata byla vyšetřena na přítomnost ektoparazitů, kteří byli také uloženi do 96 % ethanolu. Byly odebrány vzorky trusu pro účely separátní studie zabývající se endoparazity. Všechny vzorky byly uchovávány v -20 nebo -70°C.

Mnou zpracovaní norníci druhu *Clethrionomys glareolus* a hraboši druhů *Microtus agrestis* a *Microtus arvalis* pocházeli z lokalit označených na mapách (**Obr. 4**, **Obr. 5**). Celkem jsem zpracovala 182 nových jedinců, z toho bylo 94 norníků a 88 hrabošů. V bakalářské práci jsem navázala na magisterskou práci Terezy Marvanové týkající se populační struktury a genealogie vši rodu *Hoplopleura*, kterou jsem nyní rozšířila o 43 vzorků z lokalit vyznačených na **Obr. 6** a v **Tab. III**.



Obr. 4: Mapa lokalit norníků druhu *Clethrionomys glareolus*. Černě jsou označeny vzorky použité z genové banky (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), modře jsou zobrazeny vzorky, z nichž jsem získala sekvence cytochromu b, a byly použity v bakalářské práci. Červené jsou nové lokality s odchycenými zvířaty (názvy lokalit jsou uvedeny v **Tab. I**).

Tab. I: Přehled lokalit analyzovaných normíků druhu *Clethrionomys glareolus*. Modře jsou vyznačeny lokality použité v bakalářské práci a červeně jsou označeny nově zpracované vzorky, ze kterých jsem získala sekvence cytochromu b. Černou barvou jsou zobrazeny lokality normíků, jejichž sekvence jsem použila z genové banky (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

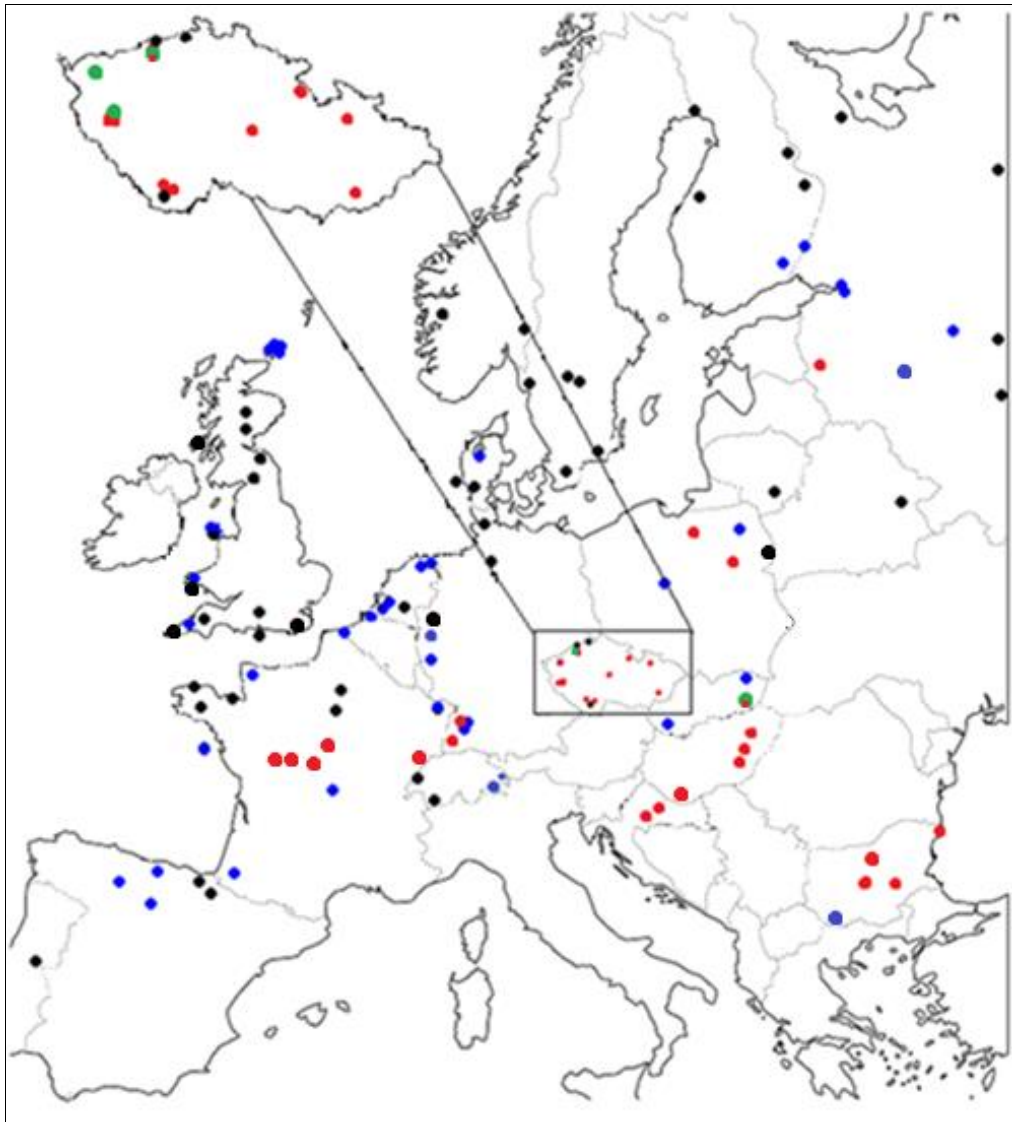
označení	lokalita	země
Bul1	Balkan Mountains	Bulharsko
Bul2	Rhodopi Mountains	Bulharsko
Bul3	Vitosha Mountains	Bulharsko
Bul4	Rila Mountains	Bulharsko
Bul5	Solnik	Bulharsko
UKR1	Kiev	Ukrajina
UKR2	Britavka	Ukrajina
RUM1	Cluj - Napoca	Rumunsko
RUM2	Bukurešť	Rumunsko
Srb&CH1	Kopaonik Mountains	Srbsko a Černá Hora
Srb&CH2	Sremski Karlovci	Srbsko a Černá Hora
SRB	Stara Planina	Srbsko
SRB2	Stara Planina	Srbsko
SRB3	Stara Planina	Srbsko
SRB4	Kopaonik Mountains	Srbsko
SRB5	Kopaonik Mountains	Srbsko
SLOV	Dol pri Ljubljani	Slovinsko
Niz	Dieren	Nizozemí
FR1	Guchen	Francie
FR2	Guchen	Francie
FR3	Ponson- Debat	Francie
FR4	Tourch	Francie
FR5	Ponson- Debat	Francie
FR6	Neouvielle	Francie
FR7	Ferel	Francie
FR8	Neouvielle	Francie
FR9	Armendarits	Francie
FR10	Armendarits	Francie
FR11	Armendarits	Francie
FR12	Hautes - Pyrénées	Francie
FR13	Neouvielle	Francie
FR14	Ponson-Debat	Francie
FR15	Greux	Francie
FR16	Braucourt	Francie

FR17	Braucourt	Francie
FR18	Douchy	Francie
FR19	Douchy	Francie
FR20	St-Pere-sur-Loire	Francie
UK	Stroud	Velká Británie
UK2	Kielder	Velká Británie
UK3	Surrey, Castle Green	Velká Británie
UK4	Wilshire, Corsham	Velká Británie
UK5	Derbyshire, Ambegate	Velká Británie
UK6	Wilshire, Corsham	Velká Británie
Irsko	Portumna	Irsko
IT1	Trentino	Itálie
IT2	Trentino	Itálie
IT3	Trento	Itálie
IT4	Sila	Itálie
IT5	Sila	Itálie
IT6	Sila	Itálie
IT7	Sila	Itálie
IT8	Apulia	Itálie
IT9	Catena Costiera	Itálie
IT10	S.Anna di Valdieri	Itálie
IT11	S.Anna di Valdieri	Itálie
IT12	S.Anna di Valdieri	Itálie
Pol1	Strzalowo	Polsko
Pol2	Lublin	Polsko
Pol3	Urwitalt	Polsko
Pol4	Bialowieza	Polsko
Pol5	Polichno	Polsko
Pol6	Kobylnica	Polsko
Pol7	Pultusk	Polsko
Pol8	Pultusk	Polsko
Pol9	Nowy Zyzdrój	Polsko
Pol10	Nowy Zyzdrój	Polsko
Pol11	Nowy Zyzdrój	Polsko
Pol12	Gierzwald	Polsko
Pol13	Gierzwald	Polsko
Pol14	Gierzwald	Polsko
Pol15	Gierzwald	Polsko
MAD1	Nagycsany	Maďarsko
MAD2	Nagycsany	Maďarsko
MAD3	Ocsa	Maďarsko

SR1	Rozhanovce	Slovensko
SR2	Remetské Hámre	Slovensko
SR3	Domaníky	Slovensko
SR4	Rozhanovce	Slovensko
SR5	Liptovský Mikuláš	Slovensko
Chorv1	Gracac	Chorvatsko
Chorv2	Nova Gradiška	Chorvatsko
Chorv3	Jastrebarsko	Chorvatsko
Chorv4	Veliko Svinjicko	Chorvatsko
Chorv5	Veliko Svinjicko	Chorvatsko
Chorv6	Veliko Svinjicko	Chorvatsko
Chorv7	Jamarica	Chorvatsko
Chorv8	Jamarica	Chorvatsko
Chorv9	Jamarica	Chorvatsko
Chorv10	Jamarica	Chorvatsko
Chorv11	Jamarica	Chorvatsko
Chorv12	Sunja	Chorvatsko
Belg	Beaumont	Belgie
Litva	Alytus	Litva
Rak1	Ginzling	Rakousko
Rak2	Lunz am See	Rakousko
Rak3	Stockerau	Rakousko
Swi1	Gros- de- Vaud	Švýcarsko
Swi2	Gros- de- Vaud	Švýcarsko
Swi3	Ardes	Švýcarsko
Fin	Ilmajoki	Finsko
Fin2	Isojärvi	Finsko
Fin3	Isojärvi	Finsko
Fin4	Isojärvi	Finsko
Fin5	Isojärvi	Finsko
Fin6	Nokia	Finsko
Fin7	Nokia	Finsko
Nor1	Ringebu	Norsko
Nor2	Rana	Norsko
Dansk1	Sjaelland	Dánsko
Dansk2	Arhus	Dánsko
Dansk3	Ribe	Dánsko
MAC1	Kruševo	Makedonie
MAC2	Kruševo	Makedonie
MAC3	Kruševo	Makedonie
MAC4	Kruševo	Makedonie

MAC5	Kruševo	Makedonie
MAC6	Kruševo	Makedonie
Nem	Kubelhof	Německo
Nem1	Baiersbronn	Německo
Nem2	Baiersbronn	Německo
Nem3	Baiersbronn	Německo
Nem4	Baiersbronn	Německo
Nem5	Baiersbronn	Německo
Nem6	Baiersbronn	Německo
Nem7	Baiersbronn	Německo
Nem8	Baiersbronn	Německo
Nem9	Baiersbronn	Německo
Nem10	Baiersbronn	Německo
Nem11	Baiersbronn	Německo
Nem12	Baiersbronn	Německo
Nem13	Baiersbronn	Německo
Nem14	Baiersbronn	Německo
Nem15	Baiersbronn	Německo
Nem16	Baiersbronn	Německo
Nem17	Baiersbronn	Německo
Nem18	Wesel	Německo
Nem19	Wesel	Německo
Nem20	Wesel	Německo
Nem21	Wesel	Německo
Nem22	Wesel	Německo
Nem23	Neuglobsow	Německo
Nem24	Neuglobsow	Německo
Nem25	Neuglobsow	Německo
Nem26	Neuglobsow	Německo
Nem27	Neuglobsow	Německo
Besk	Beskydy	Česká republika
VnL	Veselí nad Lužnicí	Česká republika
FM	Frydek- Místek	Česká republika
PI1	Plzeň	Česká republika
PI2	Plzeň	Česká republika
PI3	Plzeň	Česká republika
PI4	Plzeň	Česká republika
PI5	Plzeň	Česká republika
DvOh	Deštné v Orlických horách	Česká republika
Sedl	Sedloňov	Česká republika
NJ1	Nový Jičín	Česká republika

NJ2	Nový Jičín	Česká republika
NJ3	Nový Jičín	Česká republika
NJ4	Nový Jičín	Česká republika
NJ5	Nový Jičín	Česká republika
NJ6	Nový Jičín	Česká republika
NJ7	Nový Jičín	Česká republika
Str1	Stružná	Česká republika
Str2	Stružná	Česká republika
Str3	Stružná	Česká republika
Str4	Stružná	Česká republika
Lit1	Litvínov	Česká republika
Lit2	Litvínov	Česká republika
Lit3	Litvínov	Česká republika
CB1	České Budějovice	Česká republika
CB2	České Budějovice	Česká republika
CK	Český Krumlov	Česká republika
CK2	Český Krumlov	Česká republika
CK3	Český Krumlov	Česká republika
J	Jáchymov	Česká republika
J2	Jáchymov	Česká republika
PD	Petrov nad Desnou	Česká republika
L	Lužnice	Česká republika
L2	Lužnice	Česká republika
Sv1	Harasjömala	Švédsko
Sv2	Harasjömala	Švédsko
Sv3	Harasjömala	Švédsko
Sv4	Gillesnäs	Švédsko
Sv5	Gillesnäs	Švédsko
Rus	Pskov	Rusko
Rus2	Pskov	Rusko
Rus3	Pskov	Rusko
Rus4	Pskov	Rusko
Rus5	Pskov	Rusko
Rus6	Pskov	Rusko
Rus7	Pskov	Rusko
Rus8	Pskov	Rusko
Rus9	Pskov	Rusko



Obr. 5: Mapa lokalit hrabošů druhu *Microtis arvalis* (znázorněny modře) a *Microtus agrestis* (znázorněny černě), jejichž sekvence byly použity z genové banky (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Zeleně jsou vyznačeny lokality hrabošů zpracované v bakalářské práci. Červeně jsou označeni hraboši, ze kterých jsem nově získala sekvence cytochromu b (názvy lokalit jsou uvedeny v **Tab. II**).

Tab. II: Přehled lokalit odchycených hrabošů druhu *Microtus agrestis* a *Microtus arvalis*. Modře jsou vyznačeny lokality použité v bakalářské práci a červeně jsou označeny nově zpracované vzorky, ze kterých jsem získala sekvence cytochromu b. Černou barvou jsou zobrazeny lokality hrabošů, jejichž sekvence jsem použila z genové banky (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Zkratky v názvech značí jednotlivé druhy Mar – *M. arvalis*, Mag – *M. agrestis*, Moec – *M. oeconomus*, Mlev – *M. levis*, Msub – *M. subterraneus*.

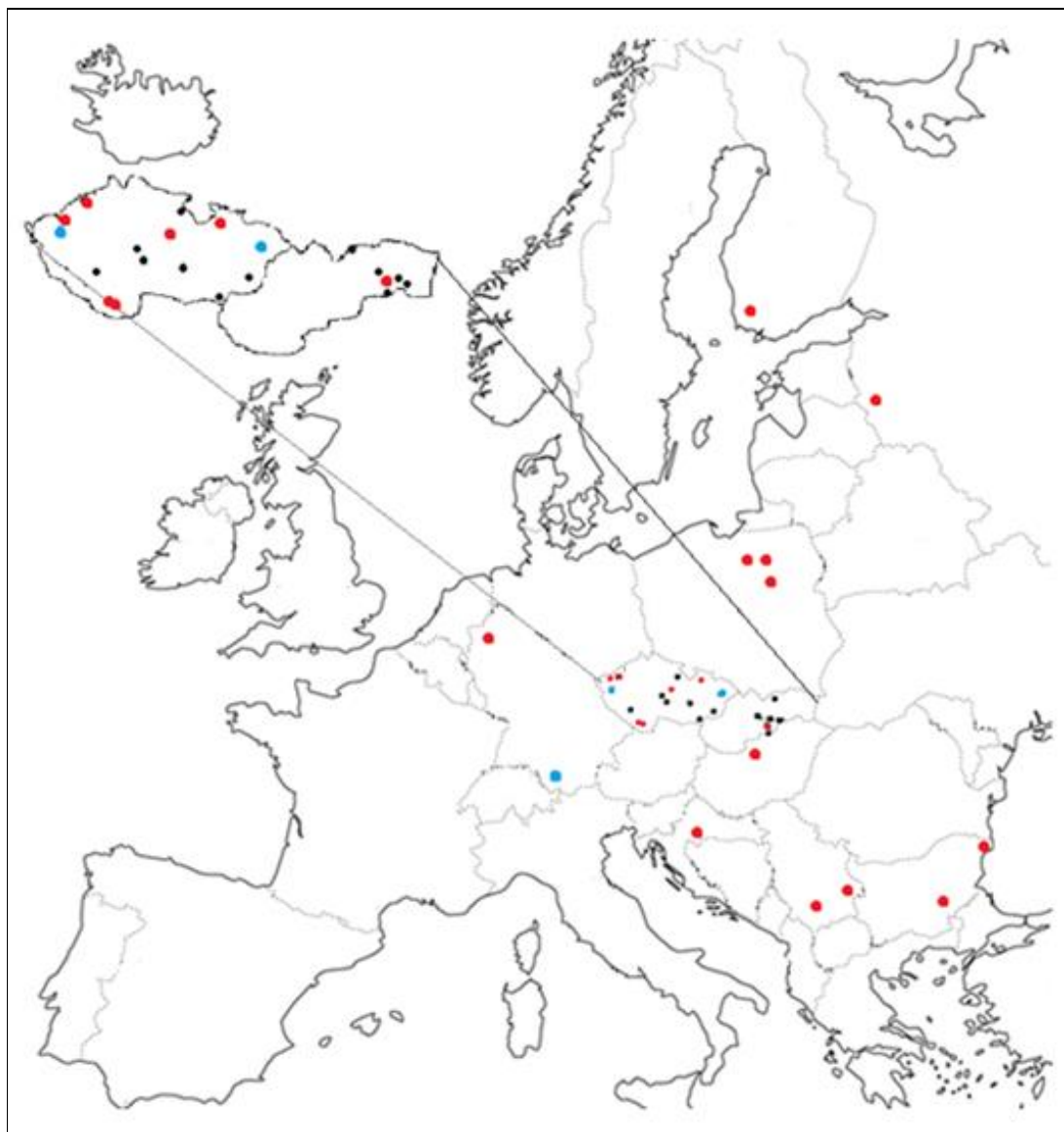
označení	lokality	země
FRMar	Armendarits	Francie
FR2Mar	Otterswiller	Francie
FR3Mar	Ile d'Yeu	Francie
FR4Mar	Clermont- Ferrand	Francie
FR5Mar	St. Maridu Mont, Normandie	Francie
FR6Mar	Braire	Francie
NemMar	Wolfach	Německo
Nem2Mar	Wolfach	Německo
Nem3Mar	Alflen	Německo
Nem4Mar	Schiltach	Německo
Nem5Mar	Freiburg	Německo
Nem6Mar	Freiburg	Německo
Nem7Mar	Freiburg	Německo
Nem8Mar	Wesel	Německo
Nem9Mar	Baiersbronn	Německo
Nem10Mar	Baiersbronn	Německo
Nem11Mar	Baiersbronn	Německo
BelMar	Veurne	Belgie
Bel2Mar	Stalhille	Belgie
NizMar	Oostburg	Nizozemí
Niz2Mar	Dintelord	Nizozemí
Niz3Mar	Wonseradeel	Nizozemí
Niz4Mar	Lauwersoog	Nizozemí
SwiMar	Stampa	Švýcarsko
Swi2Mar	Sent	Švýcarsko
SpaMar	Burgos	Španělsko
Spa2Mar	Vega de Infanzones, Leon	Španělsko
Spa3Mar	Fuentes de Nava	Španělsko
FinMar	Luumaki	Finsko
Fin2Mar	Nuijamaa	Finsko
MadMar	Nagycsány	Maďarsko
Mad2Mar	Nagycsány	Maďarsko

Mad3Mar	Kovaacsicstanya u Nyírbogát	Maďarsko
Mad4Mar	Medgyesegyháza	Maďarsko
Mad5Mar	Medgyesegyháza	Maďarsko
Mad6Mar	Medgyesegyháza	Maďarsko
Mad7Mar	Medgyesegyháza	Maďarsko
Mad8Mar	Medgyesegyháza	Maďarsko
Mad9Mar	Medgyesegyháza	Maďarsko
Mad10Mar	Medgyesegyháza	Maďarsko
Mad11Mar	Korosladány	Maďarsko
Mad12Mar	Korosladány	Maďarsko
Mad13Mar	Korosladány	Maďarsko
Mad14Mar	Korosladány	Maďarsko
Mad15Mar	Korosladány	Maďarsko
Mad16Mar	Korosladány	Maďarsko
Mad17Mar	Korosladány	Maďarsko
Mad18Mar	Alsonémedi	Maďarsko
Mad19Mar	Alsonémedi	Maďarsko
DanMar	Hjere Hede	Dánsko
CHMar	Veliko Svinjicko	Chorvatsko
CH2Mar	Veliko Svinjicko	Chorvatsko
CH3Mar	Veliko Svinjicko	Chorvatsko
CH4Mar	Veliko Svinjicko	Chorvatsko
GruzMar	Ninotsminda	Gruzie
ArmenMar	Sisian	Arménie
BulMar	Mohyla Kosmatka	Bulharsko
Bul2Mar	Ljetnica	Bulharsko
PolMar	Wilcza Gora	Polsko
Pol2Mar	Polkowo	Polsko
Pol3Mar	Pultusk	Polsko
Pol4Mar	Pultusk	Polsko
Pol5Mar	Gierzwald	Polsko
RusMar	Zvenigorod	Rusko
Rus2Mar	Vladimir	Rusko
Rus3Mar	Dyakov Forest	Rusko
SibirMar	Neiva River	Rusko
Orkn1Mar	Westray	Velká Británie
Orkn2Mar	Quoyloo	Velká Británie
Orkn3Mar	Birsay	Velká Británie
Orkn4Mar	Burness	Velká Británie
SR1Mar	Košice	Slovensko
SR2Mar	Košice	Slovensko

SR3Mar	Košice	Slovensko
SR4Mar	Velké Kosiky	Slovensko
SR5Mar	Stebník	Slovensko
SR6Mar	Šebastovce	Slovensko
SR7Mar	Šebastovce	Slovensko
SR8Mar	Šebastovce	Slovensko
SR9Mar	Šebastovce	Slovensko
PIMar	Plzeň	Česká republika
PI2Mar	Plzeň	Česká republika
PI3Mar	Plzeň	Česká republika
Str1Mar	Stružná	Česká republika
Str2Mar	Stružná	Česká republika
Str3Mar	Stružná	Česká republika
Str4Mar	Stružná	Česká republika
Str5Mar	Stružná	Česká republika
Lit1Mar	Litvínov	Česká republika
Lit2Mar	Litvínov	Česká republika
Lit3Mar	Litvínov	Česká republika
Lit4Mar	Litvínov	Česká republika
Lit5Mar	Litvínov	Česká republika
Lit6Mar	Litvínov	Česká republika
Lit7Mar	Litvínov	Česká republika
Lit8Mar	Litvínov	Česká republika
Lit9Mar	Litvínov	Česká republika
ChelMar	Chelčice	Česká republika
Chel2Mar	Chelčice	Česká republika
Chel3Mar	Chelčice	Česká republika
Chel4Mar	Chelčice	Česká republika
HLINMar	Hlinsko	Česká republika
CBMar	České Budějovice	Česká republika
CB2Mar	České Budějovice	Česká republika
CB3Mar	České Budějovice	Česká republika
CB4Mar	České Budějovice	Česká republika
DMar	Doupov	Česká republika
DvOhMar	Deštné v Orlických horách	Česká republika
PDMar	Petrov nad Desnou	Česká republika
NJMar	Nový Jičín	Česká republika
NJ2Mar	Nový Jičín	Česká republika
NJ3Mar	Nový Jičín	Česká republika
UHMar	Uherské Hradiště	Česká republika
UH2Mar	Uherské Hradiště	Česká republika

UH3Mar	Uherské Hradiště	Česká republika
UH4Mar	Uherské Hradiště	Česká republika
FilMag	Filipov, Česká kamenice	Česká republika
FIMag	Fláje	Česká republika
KRMag	Kladenské Rovné	Česká republika
LitMag	Litvínov	Česká republika
Lit2Mag	Litvínov	Česká republika
Lit3Mag	Litvínov	Česká republika
CBMag	České Budějovice	Česká republika
FR1Mag	Bretagne, Trebeurden	Francie
FR2Mag	Bretagne, St. Malo	Francie
FR3Mag	Bretagne, Gourin	Francie
FR4Mag	Bretagne, Trebeurden	Francie
FR5Mag	Conches sur Gondoire	Francie
FR6Mag	Picardie, Abbeville	Francie
FR7Mag	Braucourt	Francie
FR8Mag	Douchy	Francie
FR9Mag	Douchy	Francie
FR10Mag	Braire	Francie
FR11Mag	Braire	Francie
FR12Mag	St - Pere - sur - Loire	Francie
FR13Mag	St - Pere - sur - Loire	Francie
FR14Mag	Beaugency	Francie
UKMag	Islay, Keills	Velká Británie
UK2Mag	Isle of Wight, Thorley	Velká Británie
UK3Mag	Hampshire	Velká Británie
UK4Mag	Devon	Velká Británie
UK5Mag	Anglesey, Malltraeth	Velká Británie
UK6Mag	Anglesey, Malltraeth	Velká Británie
UK7Mag	Caernarvon, Bangor	Velká Británie
UK8Mag	Pembrokeshire	Velká Británie
UK9Mag	Cornwall	Velká Británie
UK10Mag	Cumbria, Brampton	Velká Británie
ScotMag	Gask, Perth	Velká Británie
Scot2Mag	Leet Moss, Grampian	Velká Británie
Scot3Mag	Edinburg	Velká Británie
SwiMag	Sion, Valais	Švýcarsko
Swi2Mag	Sion, Valais	Švýcarsko
Swi3Mag	Vellée de Joux, Swiss Jura Mts	Švýcarsko
DanskMag	Ribe, Mando	Dánsko
Dansk2Mag	Ribe, Norre Farub	Dánsko

BRUSMag	Berezina	Bělorusko
PolMag	Bialowieza	Polsko
LitvaMag	Vilnius	Litva
Litva2Mag	Vilnius	Litva
NizMag	Heteren	Nizozemí
FinMag	Tornio	Finsko
Fin2Mag	Kuhmo	Finsko
Fin3Mag	Lieksa	Finsko
Fin4Mag	Lapua	Finsko
SveMag	Nattraby	Švédsko
RusMag	Penza region	Rusko
Rus2Mag	Chernogolovka, Moscow region	Rusko
Rus3Mag	Pertozero, Karelia	Rusko
Rus4Mag	Velsk	Rusko
Rus5Mag	Pskov	Rusko
Rus6Mag	Pskov	Rusko
Rus7Mag	Pskov	Rusko
Rus8Mag	Pskov	Rusko
Rus9Mag	Pskov	Rusko
Rus10Mag	Pskov	Rusko
SpaMag	Azpeitia, Gipuzkoa	Španělsko
Spa2Mag	Eugui, Navarra	Španělsko
PortMag	Serra da Estrela	Portugalsko
NorMag	Varaldskogen	Norsko
Nor2Mag	Hordaland, Eidjord	Norsko
SveMag	Saltkallan	Švédsko
Sve2Mag	Degeberga	Švédsko
Sve3Mag	Nattraby	Švédsko
Sve4Mag	Hova	Švédsko
Sve5Mag	Motala	Švédsko
NemMag	Schleswig- Halstein, Katinger Watt	Německo
Nem2Mag	Niedersachsen, Emden	Německo
Nem3Mag	Bonn	Německo
RusMoec	Pskov	Rusko
Rus2Moec	Pskov	Rusko
Rus3Moec	Pskov	Rusko
BulMlev	Kamen Brjag	Bulharsko
Bul2Mlev	Kabile	Bulharsko
Bul3Mlev	Kabile	Bulharsko
CHMsub	Jamarica	Chorvatsko



Obr. 6: Mapa lokalit odchycených hrabošů, norníků a jedné myšice, u kterých byly nalezeny vši rodu *Hoplopleura*. Modře jsou vyznačeny lokality s výskytem vši použité v bakalářské práci, červeně jsou znázorněny nové lokality a černě jsou vyznačeny vši dříve zpracované Terezou Marvanovou (názvy lokalit jsou uvedené v **Tab. III**).

Tab. III: Prevalence vší rodu *Hoplopleura* na daném hostiteli a lokalitě (množství infikovaných hlodavců/ celkové množství chycených hlodavců jednotlivého druhu na určité lokalitě). Modře jsou zobrazeny lokality použité v bakalářské práci a červeně jsou označeny nově zpracované vzorky, černě jsou vyznačeny vzorky zpracované Terezou Marvanovou.

Označení	Lokalita	Prevalence vší na daném hostiteli				
		<i>M. arvalis</i>	<i>M. agrestis</i>	<i>C. glareolus</i>	<i>A. flavicollis</i>	<i>M. levis</i>
C2	Českomoravská vrchovina, lokalita 2	5/15		2/4		
C3	Českomoravská vrchovina, lokalita 3	1/8		3/3		
Seb	Šebastovce, SR	18/42				
Drn	Drnholec	4/6				
HL	Horní Lapač	8/22				
TR	Třebišov, SR	2/12			1/10	
Lit	Litvínov	5/18	7/12			
ML	Milevsko	1/5				
OH	Deštné v Orlických horách	1/1				
SV	Slánské Vrchy, SR			2/3		
KE	Kechnec, SR			2/2		
Pi	Pieniny, SR			3/3		
RU	Ružín, SR			2/3		
Nem1	Baiersbronn, Německo	2/3		3/5		
Nem2	Wesel, Německo	1/2				
Str	Stružná	5/26		1/14		
NJ	Nový Jičín	3/8		2/2		
Pol	Pultusk, Polsko			2/6		
Pol2	Nowy Zyzdrój, Polsko			1/11		
Pol3	Gierzwald, Polsko			2/6		
Rus	Pskov, Rusko			1/19		
Fin	Nokia, Finsko			1/2		
Srb	Kopaonik, Srbsko			1/2		
Mad	Alsonémedi, Maďarsko	2/3				
Chorv	Veliko Svinjicko, Chorvatsko	4/5				
Bul	Kamen Brjag, Bulharsko		1/6			1/1

Bul2	Kabile, Bulharsko		2/12			1/1
Chel	Chelčice	4/7				
HL	Hlinsko	1/1				
J	Jáchymov			2/7		
CB	České Budějovice	4/8				
PD	Petrov nad Desnou	1/2				
Mil	Milíkovice	3/9				
Cer	Černýš	1/4				

3.2. DNA extrakce

Vzorky tkání hlodavců fixované v ethanolu jsem vyjmula, nastříhala na malé části a nechala přes noc vysušit při pokojové teplotě. Vši jsem po vyjmutí z ethanolu nejdříve nařízla skalpelem pod binolupou a poté nechala 10 min. vysušit. Genomovou DNA jsem extrahovala izolačním kitem DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen) u hlodavců a DNeasy® Mikro Kit (Qiagen) u vší. Extrakci DNA jsem provedla dle návodu výrobce.

3.3. PCR reakce, gelová elektroforéza a sekvenace

Fylogenezi *Microtus agrestis* spolu s norníky druhu *Clethrionomys glareolus* rekonstruovala pomocí úseku mitochondriálního genu pro cytochrom oxidázu b (CYB) o délce 1020 bp u norníků a 1143 bp u hrabošů. K získání sekvence mitochondriálního genu jsem u hrabošů použila 2 dvojice primerů L14727-SP + H15915-SP (Jaarola a Searle, 2002) a vlastní navržené vnitřní sekvenční primery F_Microt_vnitri (TCA CAC GAT TCT TYG CCT T) + R_Microt_vnitri (GTG TTG AGT GGA TTT GCA GG), abych získala kvalitnější sekvence 5' a 3' konců daného fragmentu. U norníků jsem k získání dané sekvence použila primery Mgl_cytb_R + Mgl_cytb_F (Kotlík a spol., 2006).

U vší rodu *Hoplopleura* jsem získala úsek mitochondriálního genu pro cytochrom oxidázu c podjednotku I (COI) dlouhý 968 bp pomocí dvojice primerů L1490 a H7005 (Hafner a spol., 1994), který byl pro analýzu následně zkrácen na

575 bp, aby se shodoval s délkou sekvencí zpracovaných v magisterské práci Terezy Marvanové (Marvanová, 2011).

Všechny PCR reakce jsem namíchala do celkového objemu 20 μ l s následujícími složkami: 10x PCR Buffer (2 μ l), 25 mM MgCl₂ (2 μ l), 0,1 mM forward a reverse primer (1 μ l), 10 mM nukleotidy (0,4 μ l), ddH₂O (12,4 μ l), 5U/ μ l HotStarTag® polymeráza (0,2 μ l), (QIAGEN) a extrahovaná DNA (1 μ l).

Genomová DNA vši měla po extrakci nízkou koncentraci, z toho důvodu jsem ji musela zmnožit amplifikačním kitem (illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kits), abych měla vyšší výtěžek PCR amplifikace. DNA amplifikaci jsem provedla podle návodu výrobce.

Tab. IV: PCR reakce u a) *Clethrionomys glareolus*, b) *Microtus arvalis* a *Microtus agrestis* a c) *Hoplopleura*.

1. Denaturace	94°C	15 min		
2. Denaturace	94°C	1 min		
3. Annealing	a) 50°C, b) 52, 5°C, c) 53°C	1 min		
4. Elongace	72°C	2 min	30	cyklů
5. Extenze	72°C	10 min		
6. Chlazení	4°C			

Výsledky PCR reakcí jsem vizualizovala pomocí elektroforézy při napětí 100 V na agarózovém gelu s použitím barviva Sybr Green a 1 kb 0'GeneRuler Ladder. 1% gel jsem připravila smícháním 2 g agarózy (AGAROSE ITM) s 20 ml 0,5x TAE pufru (50 ml TAE – pufr doplněný deionizovanou vodou do 5 l) nebo 4 g agarózy se 40 ml 0,5x TAE.

Dobře vizualizované PCR produkty jsem přečistila enzymy 0,2 μ l Exo I (exonuclease I z *E. coli*) a 0,2 μ l FastAP (Thermosensitive alkaline phosphatase), (New England Biolabs®Inc) a poté jsem produkty hlodavců poslala na sekvenaci do

komerční laboratoře Macrogen (Nizozemí) a produkty vší do laboratoře Seqme (Česká republika).

3.4. *Práce se sekvencemi, alignmenty, fylogenetické analýzy a haplotypové sítě*

Pro zpracování a úpravu sekvencí jsem použila program Geneious 7.0.6. Identifikaci vlastních sekvencí jsem provedla v programu BLAST a pro získání sekvencí z předchozích publikací jsem použila databázi NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Alignování sekvencí jsem provedla v programu Geneious 7.0.6, použila jsem pro něj algoritmus Clustal W Multiple Alignment a následně jsem výsledky sama překontrolovala.

Pro fylogenetické analýzy jsem jako outgroup použila sekvence myšice druhu *Apodemus agrarius* a hrabošika *Microtus subterraneus* pro dataset hrabošů, sekvence hrabošů druhu *M. agrestis* a *M. arvalis* pro dataset normíků a vší druhu *P. serrata* pro dataset vší. Pro rekonstrukci fylogenetických vztahů všech výše uvedených datasetů jsem použila metody maximum likelihood (ML), neighbor - joining (NJ) a bayesiánskou analýzu (MB).

ML analýzy jsem provedla pomocí programu PhyML 3.0 online verzi (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) s použitím modelu GTR+I+G u normíků, GTR+I+G u hrabošů a HKY85+I+G u vší a s bootstrapovou analýzou s 1000 replikacemi dat u všech tří analýz. Použité modely jsem vybrala pomocí programu PartitionFinder (Lanfear a spol., 2014).

NJ analýzu jsem provedla v programu Geneious 7.0.6, Geneious Tree Builder s HKY korekcí distancí pro vší a Tamura – Nei korekcí pro hraboše a normíky. Analýzy jsem provedla s 1000 replikacemi a konsensus jsem získala ze všech NJ stromů.

Bayesiánská analýza byla provedena v programu MrBayes 3.2.2 (Huelsenbeck a spol., 2001) s 5 miliony generací u hrabošů, vší i normíků, počet odstraněných stromů ze začátku analýzy (burnin) byl u normíků, hrabošů a vší 20% z celkového počtu stromů (50 000). Bylo použito odlišných modelů pro jednotlivé kodonové pozice. Pro hraboše byly navrženy modely - K80+I+G, F81+I, GTR+G; pro normíky - K80+I+G,

F81+I+G, GTR+I+G a pro vši - SYM+G, F81+G, HKY+G. Opět byly využity modely získané v programu PartitionFinder.

Haplotypové sítě jsem vytvářela v programu TCS 1.21. (Clement a spol., 2000) s parametry calculate 95 % connection limit a gaps = missing. Požadované matice jsem konvertovala do potřebného formátu v online programu ALTER (<http://sing.ei.uvigo.es/ALTER/>) a vytvořené sítě jsem upravila funkcí spring tree v programu TCS a převedla je do PDF pomocí programu online PDF – Converter (<https://online2pdf.com/convert-ps-to-pdf>).

Získané fylogenetické stromy jsem vizualizovala v programu FigTree 1.4.2. (Rambaut a Drummond, 2012). Grafickou úpravu stromů a haplotypových sítí jsem provedla v programu Inkscape.

4. Výsledky

4.1. Sekvence a aligmenty

Celkem jsem nově analyzovala 97 norníků, z toho bylo 79 vlastních vzorků a 18 sekvencí z genomové banky, doplnila jsem dataset o 16 sekvencí pseudogenů z genové banky a alignovala s datasetem z bakalářské práce (41 vlastních sekvencí + 56 sek. z genové banky). Dále jsem osekvenovala 64 hrabošů *M. arvalis*, které jsem doplnila o 8 sekvencí s genové banky a 17 hrabošů *M. agrestis*, ke kterým jsem přidala 4 sekvence z genové banky. Nové sekvence jsem alignovala s datasetem z bakalářské práce, ve kterém bylo 10 vzorků *M. arvalis* doplněných o 37 sekvencí z genové banky a 1 sekvence *M. agrestis* s 50 sekvencemi z genové banky. V bakalářské práci jsem navázala na magisterskou práci Terezy Marvanové týkající se populační struktury a genealogie vší rodu *Hoplopleura*, kterou jsem dříve rozšířila o 10 vzorků a nyní o 43 nových sekvencí. Seznam převzatých sekvencí z genové banky je uveden v **Příloze**.

4.2. Fylogenetické analýzy a haplotypové sítě

Výsledkem provedených analýz (ML, NJ, MB) vzorků *Clethrionomys glareolus* bylo 8 mitochondriálně rozlišených linií (linie 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), jejichž vzájemná pozice se s použitými metodami lišila, kromě pozice pseudogenů, linie 1 a linie 2, které se spolu objevovaly ve všech analýzách na bázi stromu. Bootstrapová hodnota je téměř u všech větví nízká, což u vnitrodruhové fylogeneze není neobvyklé, tudíž se i změna pozice u jednotlivých větví dala očekávat. Pro znázornění jsem vybrala ML fylogenetický strom s namapovanými statistickými podporami z ostatních analýz (**Obr. 7**). Geografické rozšíření jednotlivých linií se značně lišilo. Některé linie byly geograficky specifické, jako linie 1 zabírající lokalitu v severnější části Norska a linie 2 ležící na území Kalábrie na jihu Itálie. Linie 4 leží ve Francii při hranici se Španělskem. Linie 5 se rozprostírá na území Itálie a linie 6 na Balkánském poloostrově, konkrétně v Bulharsku a Makedonii. Dále se objevují linie, které se v určité oblasti spolu střetávají. Linie 3 obsahuje vzorky především z východní Evropy, dále Dánsko, Německo a Velkou Británií. S linií 7 se střetává ve stejných lokalitách na severu Německa a Polska a na západě Ruska (Pskov). Linie 7 se

rozprostírá především v centrální Evropě, ale obsahuje i vzorky ze Skandinávie, Velké Británie a Balkánu. Poslední linie 8, která je geograficky nespécifická, se rozprostírá téměř po celé Evropě a překrývá se tak geograficky s linií 3 a 7.

Výsledkem všech analýz (ML, NJ, MB) datasetu vzorků rodu *Microtus* bylo 5 monofyletických linií druhů *Microtus agrestis*, *Microtus arvalis*, *Microtus subterraneus*, *Microtus oeconomus* a *Microtus levis* (**Obr. 8**). Vzájemná pozice jednotlivých druhů se u použitých analýz lišila. Větev *M. levis* tvořila sesterskou linii s *M. arvalis* v ML analýze, kdežto u MB utvořila sesterskou linii s *M. agrestis* a při NJ se zařadila na bázi pod *M. subterraneus*. Pozice jednotlivých linií *M. arvalis* a *M. agrestis* byla v analýzách ML a MB shodná, ale lišila se v NJ.

Vnitrodruhová fylogeneze druhu *M. agrestis* se členila na 7 rozlišených linií (linie 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Jsou zde patrné rozdíly v geografickém členění a linie netvoří téměř žádné překryvy. Linie 1 se nachází ve 4 lokalitách západní Evropy a dále zasahuje do jižní části Velké Británie, překrývá se s linií 7 na území Francie (Douchy). Linie 2 se rozléhá ve Skandinávii – Norsko, Švédsko. Linie 3 je rozšířena na dvou lokalitách v severní části východní Evropy a Skandinávii – Švédsko, Finsko, s linií 1 se protínají v severovýchodních Čechách (Litvínov). Linie 4 obsahuje vzorky ze severní části centrální Evropy od Dánska po západní Rusko. Linie 5 se nachází v jižní části Evropy, konkrétně v Portugalsku, Španělsku a jihu Francie. Následující dvě linie jsou geograficky specifické, linii 6 tvoří pouze vzorky ze severu Anglie a linii 7 vzorky ze severu Francie.

Větev *M. arvalis* se členila na 7 mitochondriálně odlišných linií (linie 1b, 2b, 3b, 4b, 5b, 6b, 7b), které jsou z velké části geograficky specifické. Linie 1b obsahuje vzorky z Gruzie, Arménie a Sibiře. Linie 2b se nachází v západní Evropě, od Španělska po západní Německo a na Orknejích. Linie 3b obsahuje pouze vzorky z Bulharska a linie 4b ze Švýcarska a Itálie. Linie 5b se rozprostírá na čtyřech lokalitách centrální Evropy. Poslední dvě linie nejsou geograficky tolik specifické a překrývají se na velké části území. Linie 6b se nalézá v jižní části východní Evropy od České republiky po Bosnu a Hercegovinu a linie 7b se rozprostírá především v severní části východní Evropy od České republiky po Rusko a zasahuje i do Chorvatska a Maďarska. Společný geografický překryv je v severovýchodních Čechách (Litvínov), Slovensku, Chorvatsku a Maďarsku.

Výsledkem analýz (ML, NJ, MB) vší rodu *Hoplopleura* parazitujících na hrabošovitých hlodavcích bylo 6 rozlišených linií (linie 1b, 2b, 3, 4, 5, 6) vší druhu *H. acanthopus* a 2 linie vší druhu *H. edentula* (linie 1, 2), jejich pozice se u jednotlivých metod lišily (**Obr. 9**).

Linie *H. edentula* tvořily sesterskou linii v NJ analýze a při MB metodě se odštěpily pod sebou na bázi stromu. Na bázi leží linie 1 zahrnující vzorky ze čtyř lokalit – Německo, Českou republiku, Slovensko a Srbsko. Linie 2 je geograficky specifická, obsahuje vzorky ze tří lokalit ležících ve východní Evropě – Finsko, Polsko a Rusko. Obě linie jsou hostitelsky specifické k jedinému hostiteli *C. glareolus*.

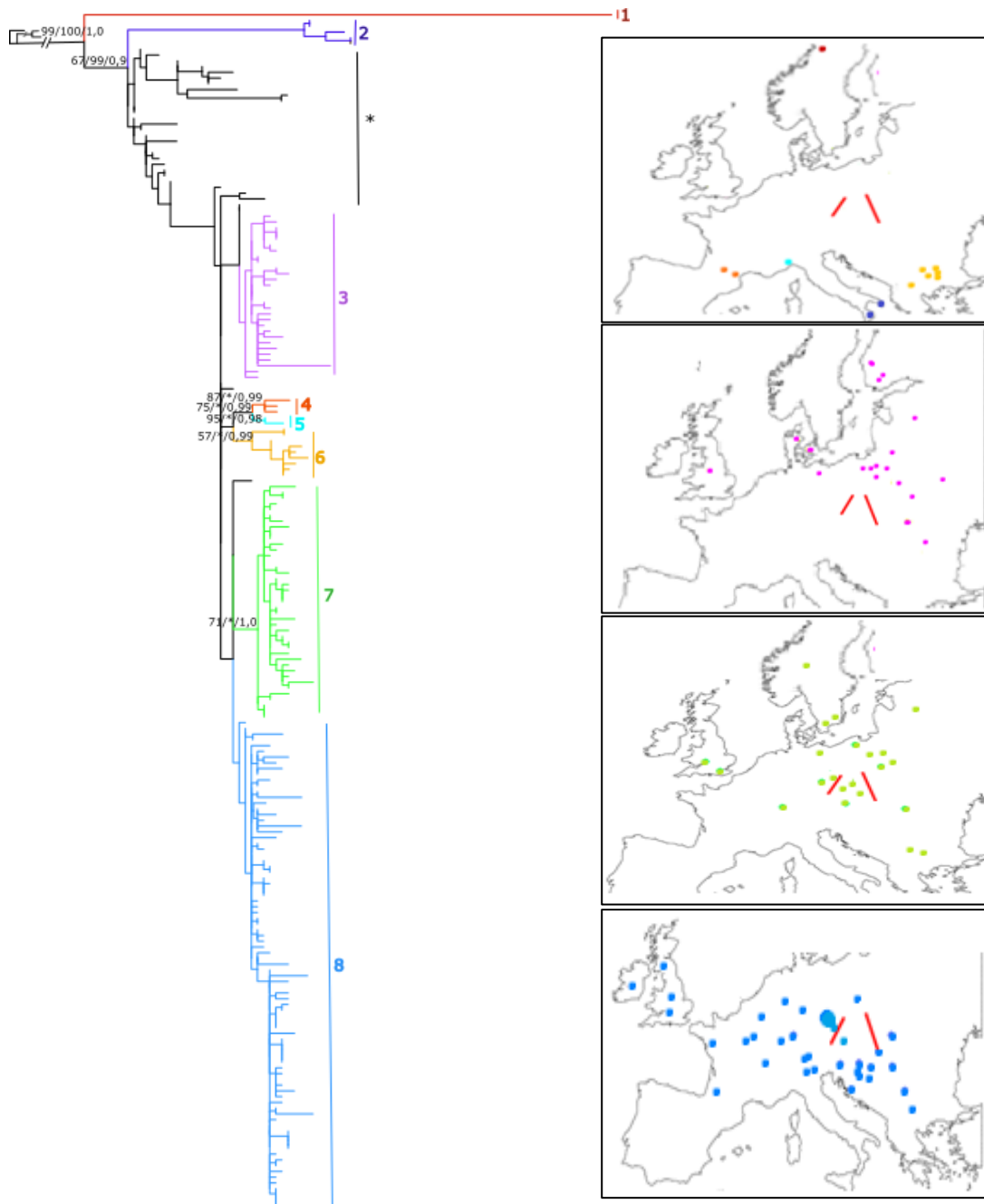
Linie 1b se nachází na bázi větve *H. acanthopus*, je složená z deseti vzorků vší parazitujících na hraboších druhu *M. agrestis* a *M. arvalis*, pocházejících ze severozápadních Čech a jižního Německa. Linie 2b se nachází v severozápadních Čechách, kde se střetává s linií 1b a není hostitelsky specifická, parazituje na *M. arvalis* a *C. glareolus*. Linie 3 se skládá pouze z 2 vzorků vší z jižního Německa parazitujících na *M. arvalis*. Linie 4 obsahuje 3 vzorky z Bulharska, jejichž hostiteli jsou hraboši druhu *M. agrestis* a *M. levis*. Linie 5 se rozprostírá na území Chorvatska, Maďarska a Slovenska, není hostitelsky specifická, parazituje na hostitelích druhů *M. arvalis*, *C. glareolus* a *A. flavicollis*. Poslední, linie 6 obsahuje vzorky vší z lokalit ležících po celé České republice a východním Slovensku. Hostiteli jsou hraboši rodu *M. arvalis* a norníci druhu *C. glareolus*.

Vyznačení geografického rozšíření linií hostitelských hlodavců (*M. agrestis*, *M. arvalis* a *C. glareolus*) do jednotlivých map (**Obr. 7, 8**) ukázalo, že se v některých případech prolínaly s liniemi vší rodu *Hoplopleura* (**Obr. 9**). Velmi dobře to je viditelné u *C. glareolus* v linii 2, která se prolíná se západní linií vší a liniemi 6 zahrnující centrální Evropu spolu s linií 7, která se táhne od Anglie po západní a centrální Evropu až na Balkán, které se prolínají jak s východní, tak západní linií vší. U hrabošů druhu *M. agrestis* je to patrné na linii 1 zabírající západní část Evropy a překrývající se se západní linií vší a linií 3 představující východní linii spolu s východní linií vší. U hrabošů druhu *M. arvalis* tyto překryvy vznikly u linie 5b ze vzorků ze západní Evropy, jenž se překrývá se západní linií vší, u linie 6b z východní Evropy, která zabírá území východní linie vší a linie 7b, která se rozprostírá na velké části Evropy, překrývající se s oběma liniemi vší.

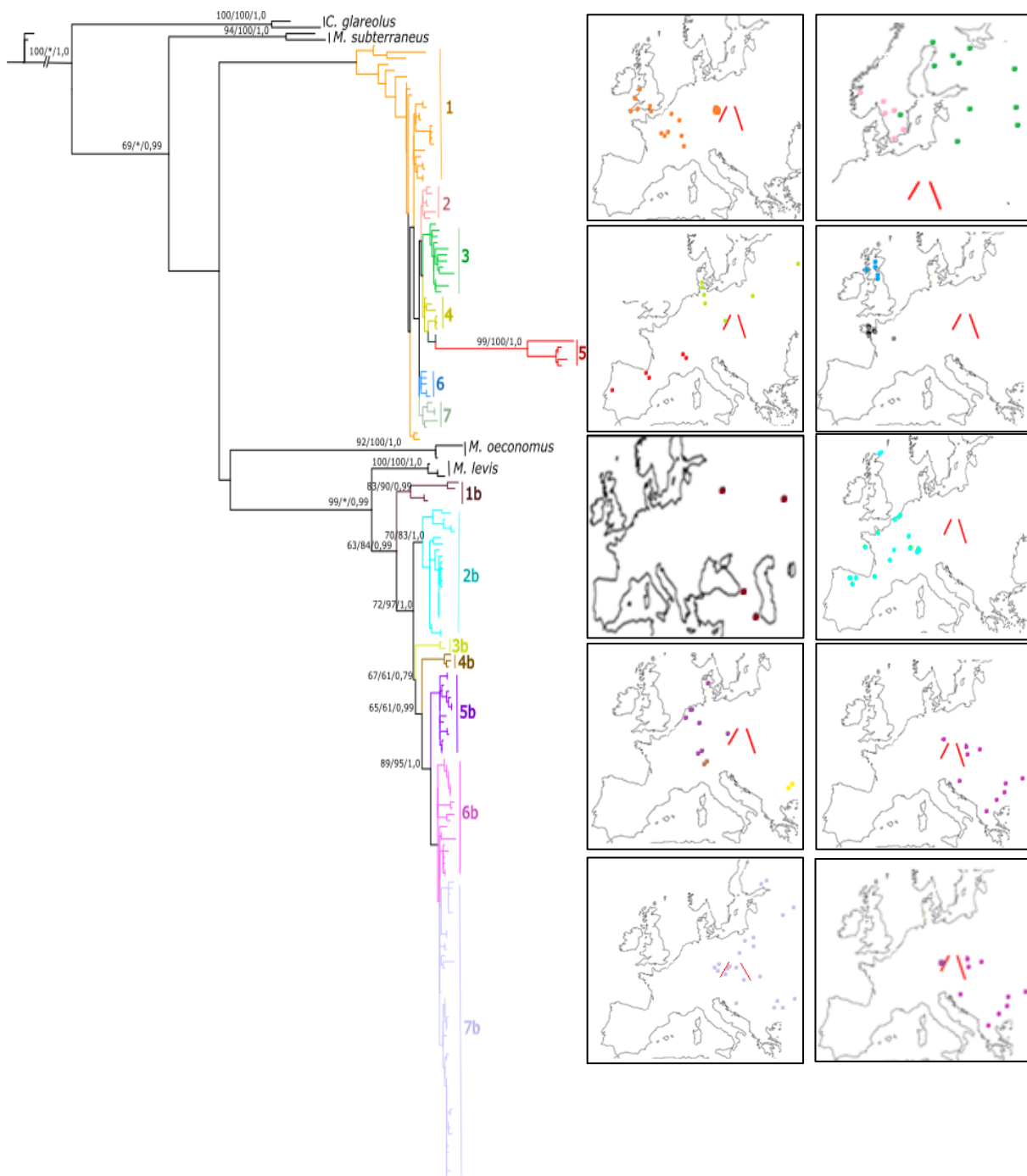
Výsledky získané z haplotypových sítí hostitelů slouží především k lepší vizualizaci vztahů uvnitř jednotlivých linií, protože velikosti, počty a vzájemné překryvy haplotypů jsou pouze orientační, z důvodů obtížné dohledatelnosti všech jedinců v genové bance (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). První čtyři sítě (**Obr. 11**) zobrazují norníky druhu *C. glareolus* a jsou barevně sjednoceny s liniemi ve fylogenetickém stromě (**Obr. 7**). Vlevo nahoře je znázorněna haplotypová síť linie 3 (fialová) s geograficky neprolínajícími se haplotypy a velkým počtem mutací oddělujícím haplotyp Litva od zbytku haplotypů, což je dobře viditelné i na fylogenetickém stromě. Vpravo nahoře je zobrazena síť tvořená liniemi 4, 5 a 6 (oranžová, modrá, žlutá), u kterých nedochází k prolínání haplotypů. Síť se rozdělila do dvou haplotypových rodin, které spolu nekomunikují, ovšem kvůli nízkému počtu haplotypů nelze popsat detailnější vnitřní strukturu. Vlevo dole je znázorněna linie 7 (zelená), u níž haplotypy opět nejsou sdíleny mezi lokalitami, ovšem již netvoří geograficky oddělené shluky. Vpravo dole je znázorněna poslední linie 8 (modrá), která je rozdělena do dvou haplotypových rodin mezi kterými je malý počet mutací a v obou rodinách dochází ke geografickému mísení haplotypů. V první rodině mezi Maďarskem a Německem, zde je také vidět velký počet mutací oddělující jeden haplotyp Francie, a ve druhé mezi Anglií, Českou republikou a Německem. Následující tři haplotypové sítě (**Obr. 12**) zobrazují hraboše druhu *M. agrestis*, jež jsou barevně sjednoceny s liniemi vyznačenými ve fylogenetickém stromě (**Obr. 8**). Vlevo nahoře je zobrazena linie 1 (oranžová), u které nedochází k prolínání haplotypů, ovšem je dobře geograficky oddělená. U jednoho haplotypu Francie je vidět velký počet mutací, stejně je tomu u haplotypů Anglie. Vpravo nahoře je znázorněna linie 2 (růžová) a linie 4 (sv. zelená), nedochází zde k míchání haplotypů a jsou geograficky oddělené. Dole je zobrazena linie 3 (zelená), u níž nedochází k prolínání haplotypů a nejsou ani geograficky oddělené. Všechny sítě obsahují malá množství haplotypů, z toho důvodu nemohou poskytovat dostatek informací. Poslední trojice sítí (**Obr. 13**) zobrazuje hraboše druhu *M. arvalis* a je barevně sjednocena s liniemi fylogenetického stromu (**Obr. 8**). Vlevo nahoře je zobrazena linie 5b (fialová), u jejíž haplotypů nedochází k prolínání ani geografickému oddělení a obsahuje malý počet haplotypů pro další informace. Vpravo nahoře je zobrazena linie 2 (tyrkysová), u které dochází k prolínání haplotypů mezi Francií a Německem a haplotypy jsou i geograficky oddělené. Dole jsou zobrazeny linie 6b (růžová) a linie 7b (sv. fialová), které se mezi

sebou prolínají a tvoří jednu společnou haplotypovou rodinu. Dochází k prolínání mezi haplotypy Srbska a Maďarska a haplotypy nejsou geograficky oddělené.

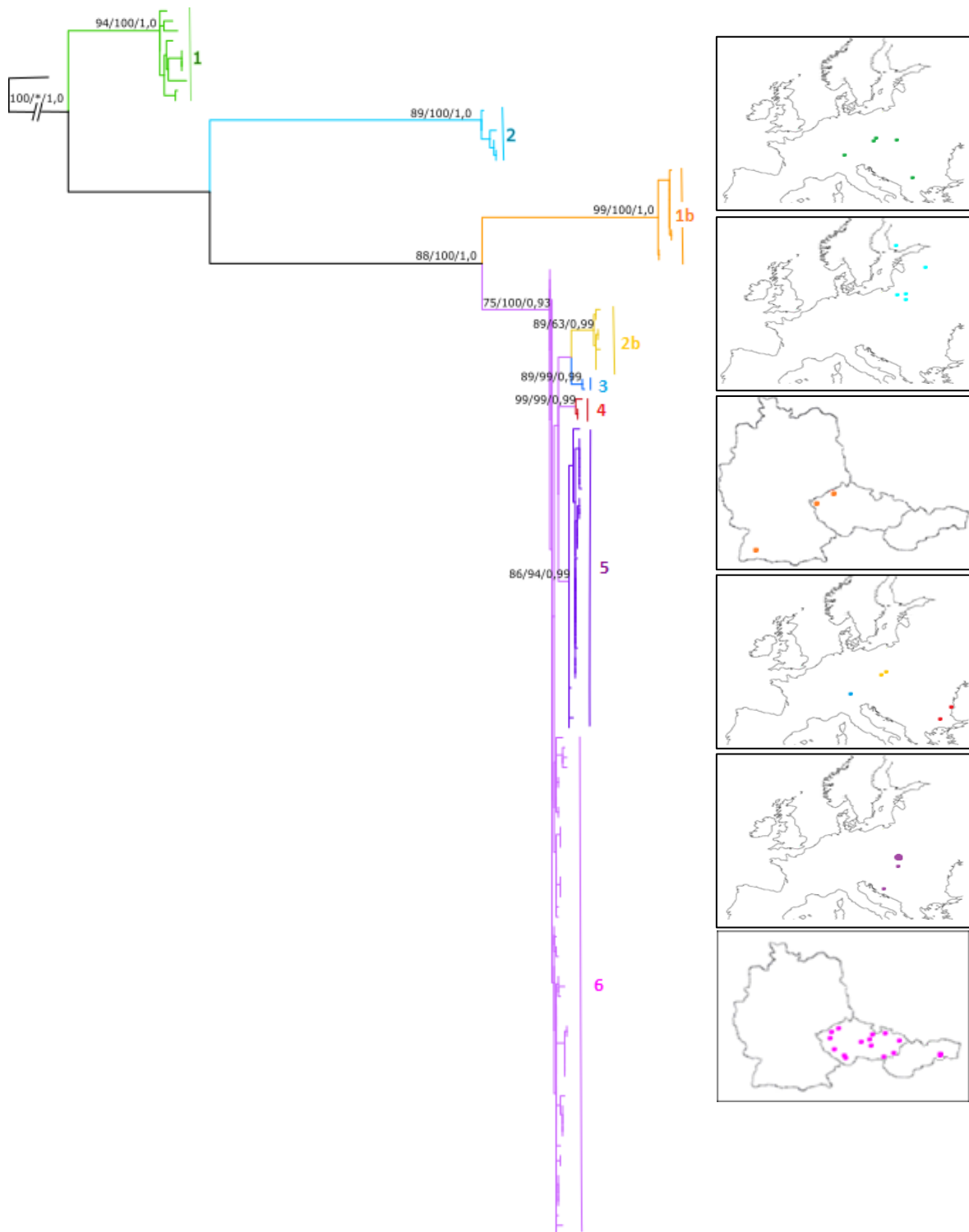
Haplotypové sítě parazita (**Obr. 14**) poskytují představu o populační struktuře a prostřednictvím frekvence jednotlivých haplotypů v populacích i o demografické historii. První síť znázorňuje vší druhu *H. acanthopus*. Vyznačená linie 5 (fialová) tvoří první haplotypovou rodinu a linie 6 (růžová) tvoří druhou haplotypovou rodinu, mezi nimi je vidět velký počet mutací. Většina haplotypů je oddělená, ale dochází k mísení mezi haplotypy z České republiky a Slovenska v linii 6 a haplotypy Slovenska a Chorvatska v linii 5. Linie 5 také nese známky populačního bottlenecku, kdy většina sekvencí je seskupena do dvou haplotypů. Druhá haplotypová síť znázorňuje vší druhu *H. edentula*. Barevně je sjednocena s linií 1 (zelená na **Obr. 9**). Nedochozí zde ke sdílení haplotypů a jednotlivé haplotypy jsou geograficky oddělené.



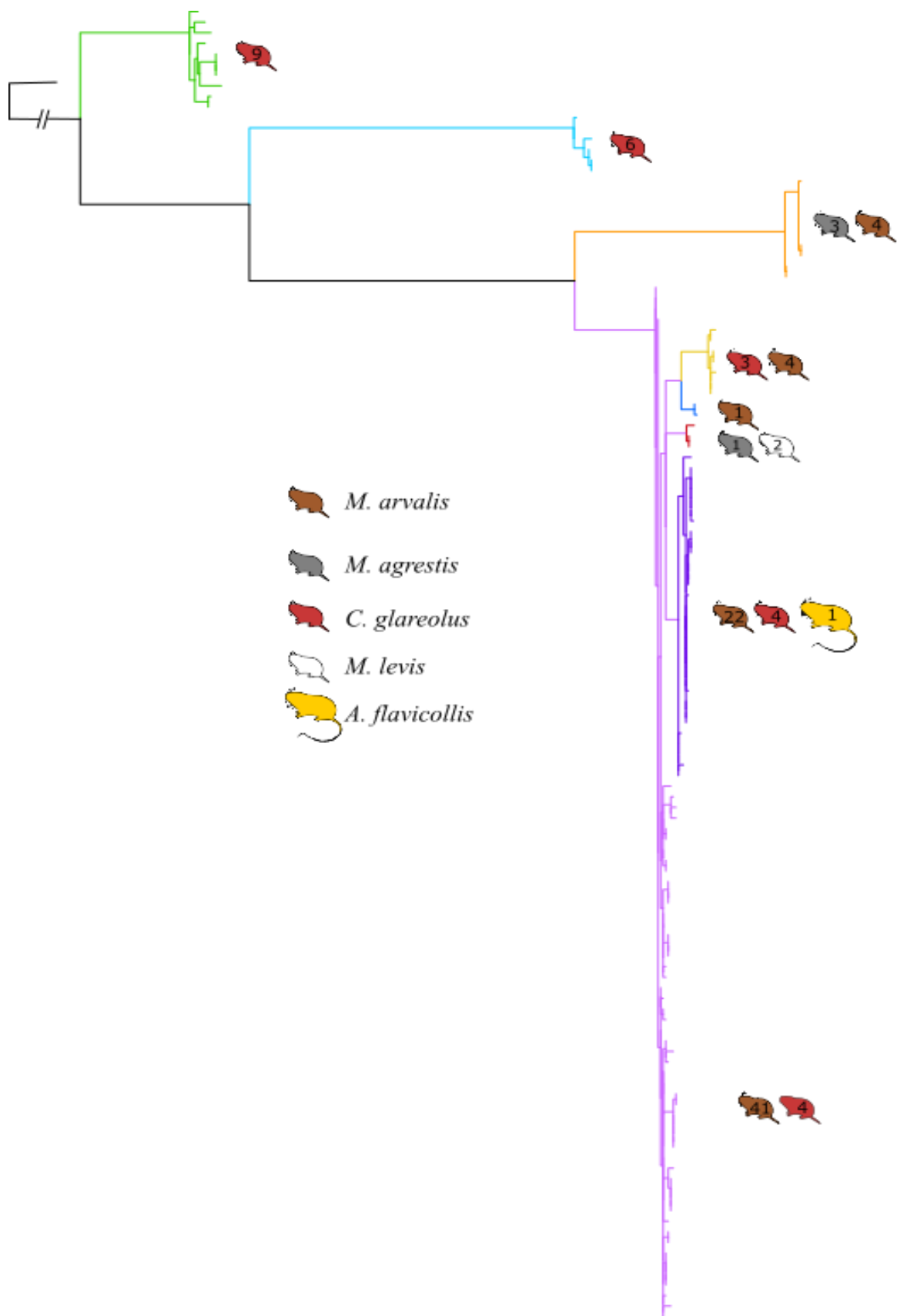
Obr. 7: ML strom sekvencí *Clethrionomys glareolus*. Bootstrapové hodnoty (ML, NJ, MB) jsou znázorněny u jednotlivých uzlů. Vedle fylogenetického stromu jsou jednotlivé linie vyznačeny na mapách, barvy lokalit se shodují s jednotlivými liniemi (podrobně jsou uvedeny v **Tab. I**). Červené čáry na mapách znázorňují hranice rozšíření linií vši rodu *Hoplopleura* z hrabošovitých hlodavců identifikované v bakalářské práci. Hvězdička značí sekvence pseudogenů identifikované podle Filipi a spol. (2015).



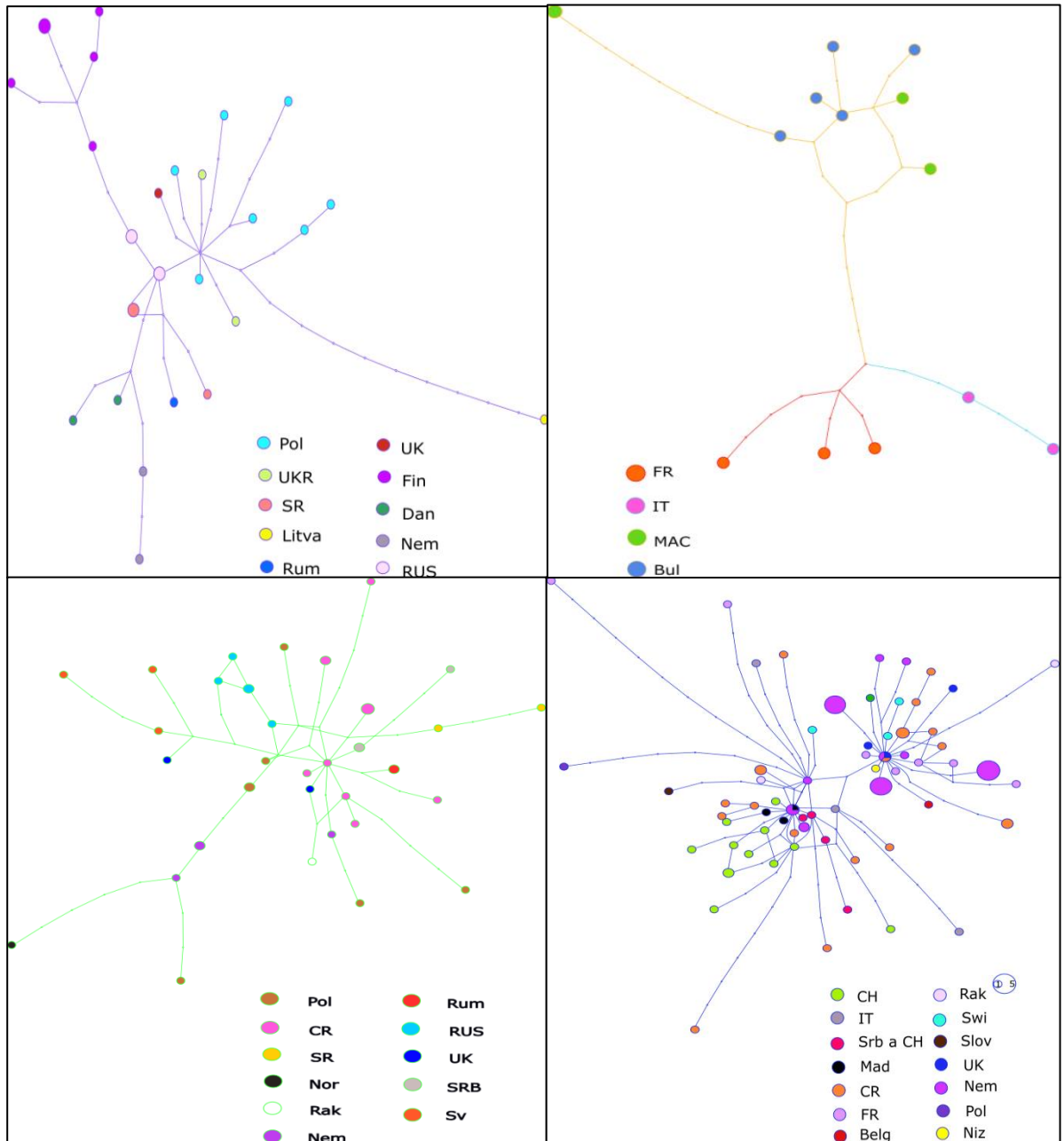
Obr. 8: ML strom sekvencí *Microtus agrestis* a *Microtus arvalis*. Bootstrapové hodnoty (ML, NJ, MB) jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. První část tvoří sekvence z *M. agrestis* a druhou sekvence z *M. arvalis*. Vedle fylogenetického stromu jsou jednotlivé linie vyznačeny na mapách, barvy linií se shodují s barvami lokalit (podrobně jsou uvedeny v **Tab. II**). Červené čáry na mapách znázorňují hranice rozšíření linií vši rodu *Hoplopleura* z hrabošovitých hlodavců.



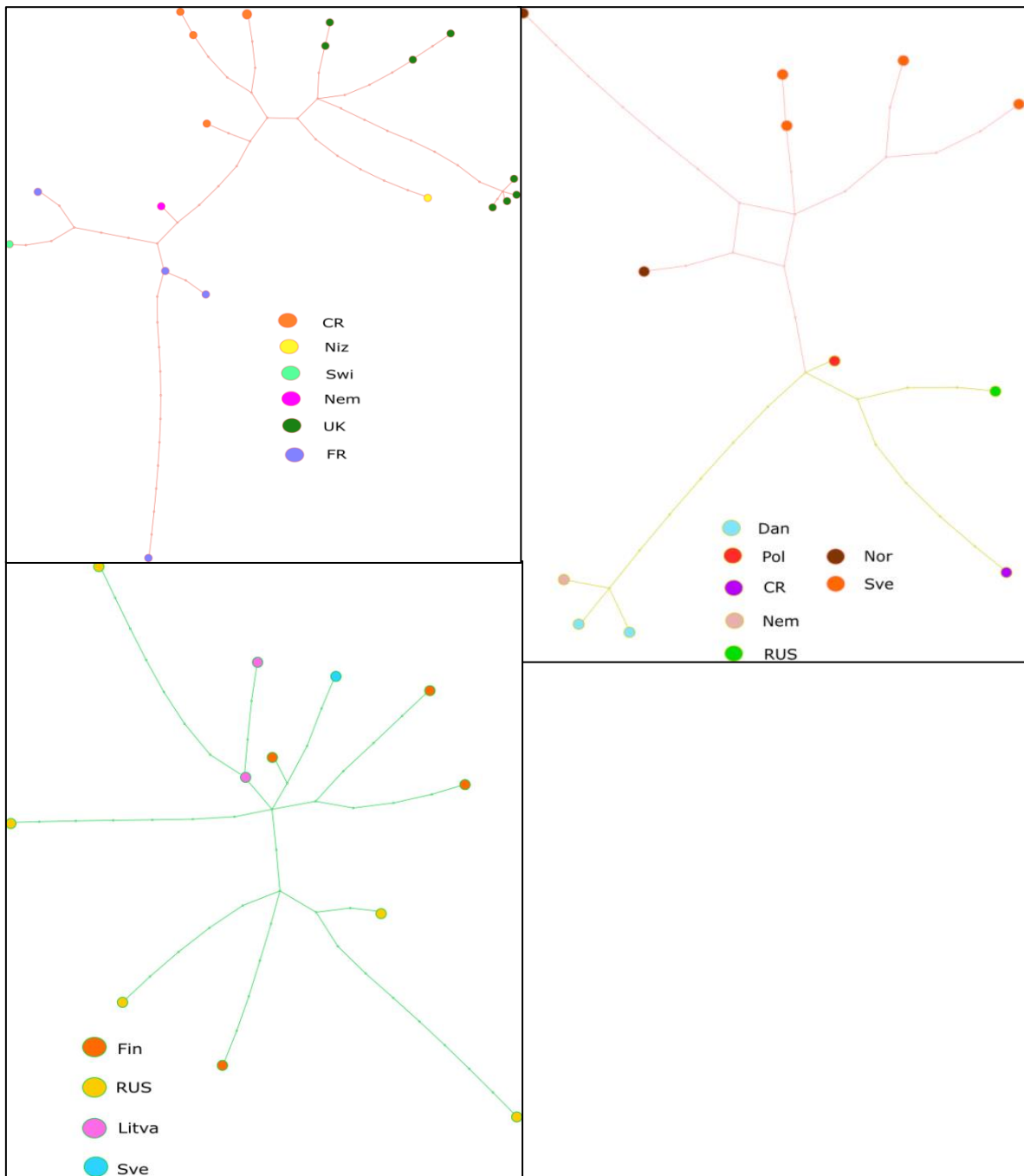
Obr. 9: ML strom sekvencí *Hoplopleura*. Bootstrapové hodnoty (ML, NJ, MB) jsou zobrazeny u jednotlivých uzlů. Vedle fylogenetického stromu jsou jednotlivé linie označeny na mapách, barvy lokalit odpovídají barvám linií (podrobně jsou uvedeny v **Tab. III**).



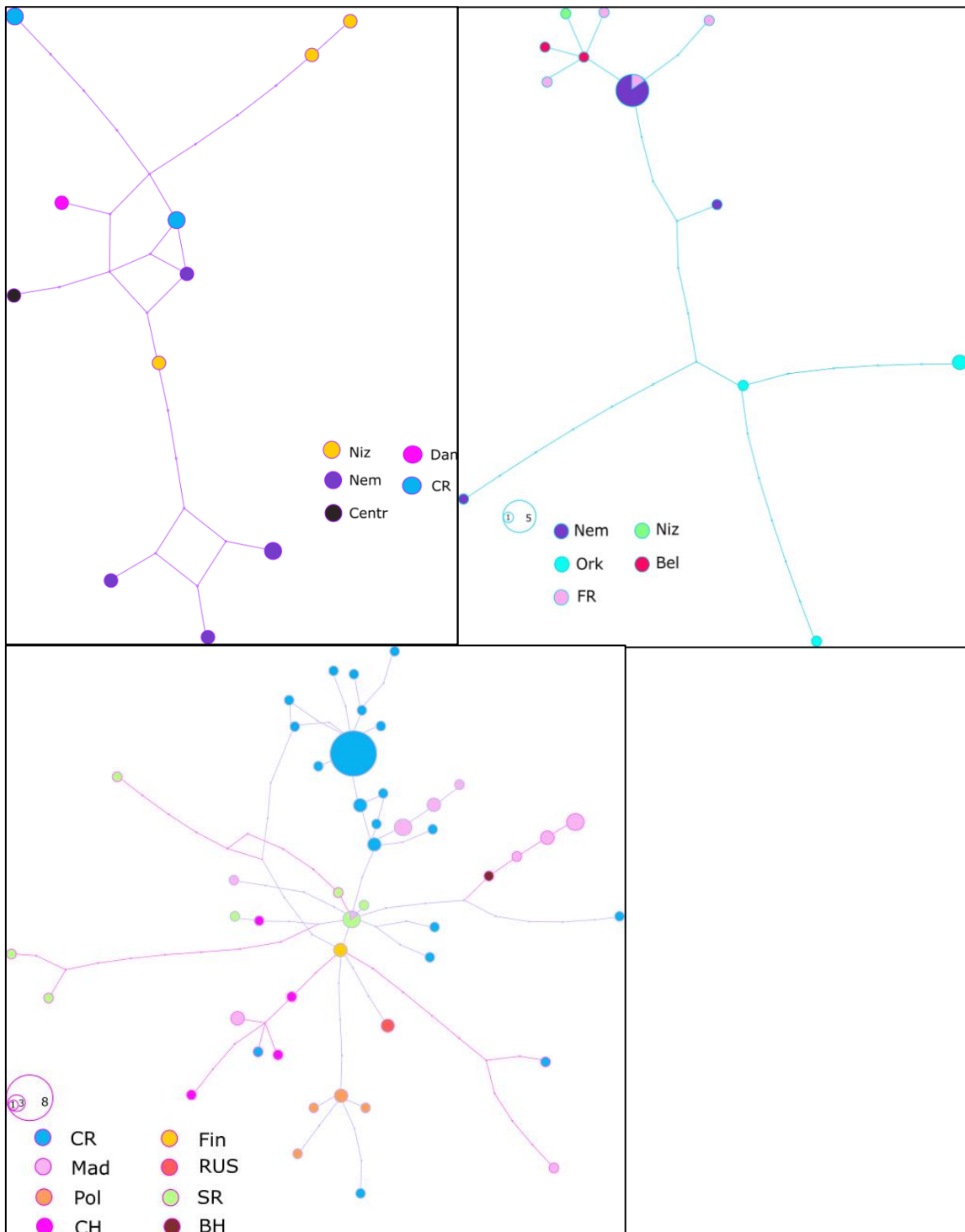
Obr. 10: ML strom sekvencí *Hoplopleura* znázorňující hostitelskou specifitu jednotlivých linií vší. Čísla označují počet hostitelů, ze kterých byly dané vši získány.



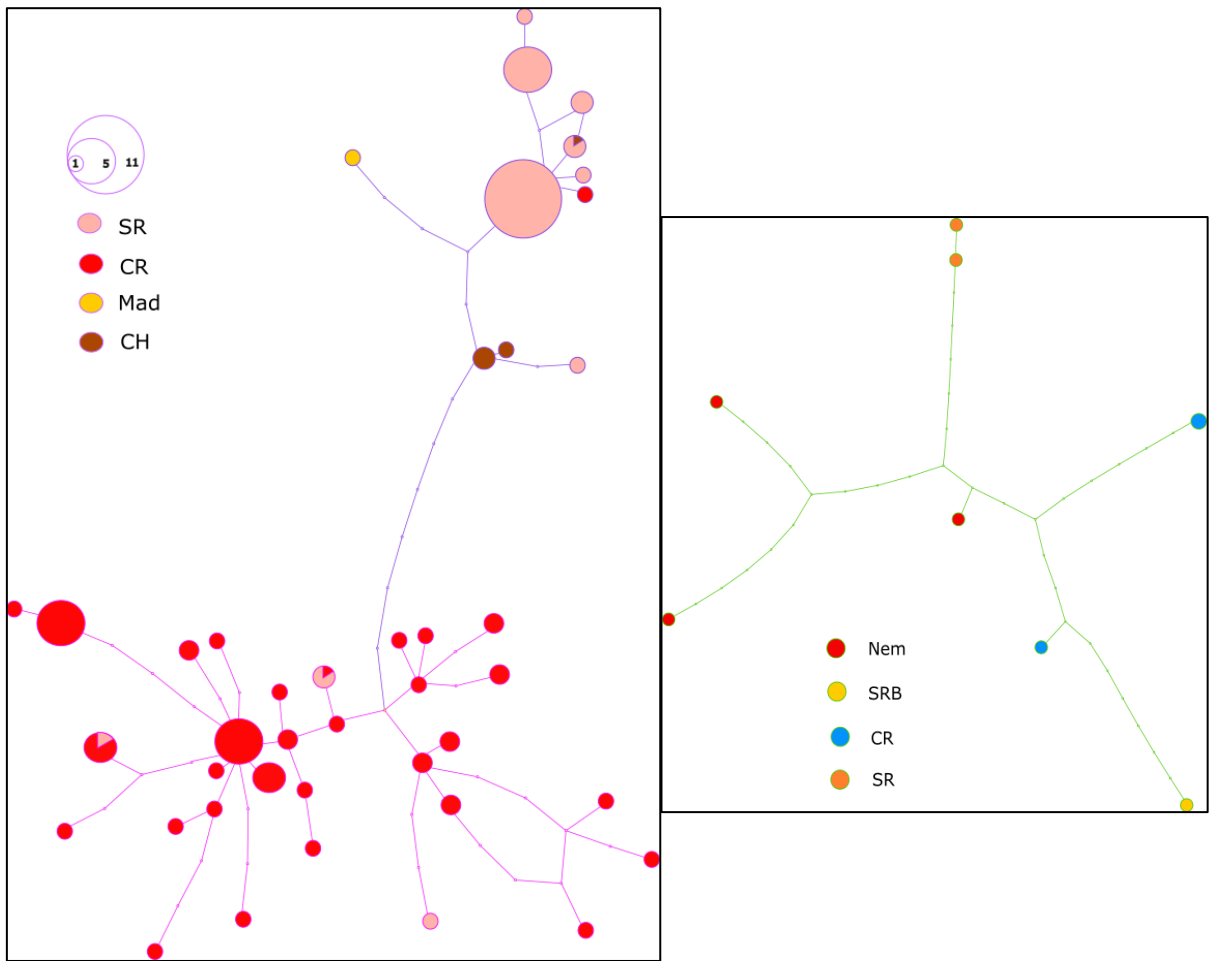
Obr. 11: Haplotypové sítě znázorňující normíky druhu *Clethrionomys glareolus*, které jsou barevně sjednoceny s danými liniemi ve fylogenetickém stromě (**Obr. 7**).



Obr. 12: Haplotypové sítě znázorňující hraboše druhu *Microtus agrestis*, které jsou barevně sjednocené s danými liniemi ve fylogenetickém stromě (**Obr. 8**).



Obr. 13: Haplotypová síť znázorňující hraboše druhu *Microtus arvalis*, které jsou barevně sjednoceny s danými liniemi fylogenetického stromu (**Obr. 8**).



Obr. 14: (vlevo) Haplotypová síť znázorňující vší druhu *Hoplopleura acanthopus* a (vpravo) haplotypová síť znázorňující vší druhu *Hoplopleura edentula*. Barevně jsou sjednoceny s liniemi ve fylogenetickém stromě (**Obr. 9**).

5. Diskuze

Na základě provedených molekulárních analýz sekvencí úseku mitochondriálního genu pro cytochrom b oxidázu (CYB) z norníků druhu *Clethrionomys glareolus* bylo detekováno 8 mitochondriálně oddělených linií, které měly rozdílné geografické rozšíření a byly následně porovnány se čtyřmi nejnověji publikovanými studiemi (Ledevin a spol., 2010; Wojcik a spol., 2010; Colangelo a spol., 2012; Filipi a spol., 2015). Počet linií se mezi jednotlivými publikacemi lišil v závislosti na množství analyzovaného materiálu, shodně byly nalezeny pouze linie západní a východní. Dalšími liniemi, které byly popsány v jednotlivých studiích, jsou balkánská, karpatská, italská, španělská (Ledevin a spol., 2010, Wojcik a spol., 2010), dále Kalábrie a baskická linie (Colangelo a spol., 2012; Filipi a spol., 2015), jejíž sekvence byly následně určeny za pseudogeny (Filipi a spol., 2015) a v nejnovější, zatím nejdetailnější publikaci byla určena linie uralská. Lišilo se i jednotlivé pořadí daných linií, které ovšem nebyly silně podpořeny bootstrapovými hodnotami, až na nejnovější studii (Filipi a spol., 2015), která má 100% bootstrapovou podporu u všech větví ML fylogenetického stromu z důvodů osekvenování celého mitochondriálního genomu *C. glareolus*, kdežto sekvence v ostatních publikacích mají délku okolo 1000 bp. Z tohoto důvodu se budu při porovnání svých výsledků zaměřovat na poslední studii.

V mé práci bylo nalezeno 8 samostatných linií – uralská, Kalábrie, východní, španělská, italská, balkánská, karpatská a západní, které se shodovaly s danou studií. Pořadí větví daných linií se lišilo od publikované studie Filipi a spol. (2015), ale nemělo silnou bootstrapovou podporu. Uralská linie, kterou zde tvořila linie 1, se zobrazila shodně na bázi fylogenetického stromu. Byla následována linií 2, která představovala Kalábrii a skupinou pseudogenů, kam se přiřadily některé vlastní vzorky z Makedonie a vzorky z Itálie a z Francie získané z genové banky. Linie 3 představující východní linii jsem rozšířila o nové lokality v Polsku, Finsku, Rusku, Rumunsku, Německu, Anglii, Ukrajině a Litvě, čímž jsem zjistila překryvy s karpatskou linií v lokalitách jižního Německa, Polska a západního Ruska (Pskov). Španělská linie byla tvořena linií 4 a byla totožná s publikací stejně jako italská linie představovaná linií 5. Linie 6 byla shodná s balkánskou linií v lokalitách Bulharska a mnou byla doplněna o vlastní vzorky z Makedonie. Karpatskou linii tvořila linie 6, která byla rozšířena o nové vlastní vzorky z České republiky, Srbska, Polska a Švédska a poté vzorky z genové banky z Rakouska a Rumunska. Poslední linie 8 představovala

západní linii, ke které přibyly vlastní vzorky z Chorvatska, Německa, Srbska, České republiky a Francie a vzorky z Rakouska, Belgie, Irska a Itálie z genové banky, díky tomuto rozšíření vznikly překryvy s karpatskou i východní linií v oblasti jižního Německu a v severovýchodních Čechách a Srbsku pouze s karpatskou linií.

Výsledkem molekulárních analýz sekvencí CYB u hrabošů *Microtus agrestis* bylo rozdělení na 7 samostatných linií. Při srovnání se třemi odbornými studii (Jaarola a Searle, 2002; Herman a Searle, 2011; Herman a spol., 2014) byly shodně nalezeny pouze dvě linie – západní a východní, jinak se počet linií lišil. V jediné práci se objevila jižní linie (Jaarola a Searle, 2002) a dále byly popsány linie centrální, francouzská, severní Británie a Skandinávie (Herman a Searle, 2011; Herman a spol., 2014). Téměř všechny větve měly silnou bootstrapovou podporu. V mé práci byly obsaženy všechny doposud publikované linie, což je 7 mitochondriálních linií s velmi rozdílnou geografickou velikostí pokryvu, neměly ovšem tak silné bootstrapové podpory.

Podle molekulárních hodin byla expanze všech populací tvořících šest samostatných linií (vyjma jižní linie) spojena s bottleneckem posledního glaciálního maxima a obdobím cca před 10 000 lety (mladší dryas), (Herman a spol., 2014). Linie 1 odpovídala západní linii, kterou jsem doplnila o nové, vlastní vzorky z Francie a České republiky. Linie Skandinávie byla shodná s linií 2, je všeobecně uznávané, že severní část Skandinávie byla kolonizována ze severu a východu přes Rusko a Finsko a z jihu přes Dánsko, které bylo se Skandinávií spojeno pevninským mostem (Herman a spol., 2014). Linie 3 představovala východní linii, kterou jsem rozšířila o vlastní vzorky z jedné lokality v Rusku. Centrální linie byla zastoupena linií 4 a byla doplněna o lokalitu z Ruska získanou z genové banky. Linie 5 odpovídala jižní linii a linie 6 představovala severní Británii. Velká Británie je kolonizována dvěma mitochondriálně odlišnými a fylogeneticky stabilními liniemi – západní, která se vyskytuje na jihu země a linií severní Británie, zabírající sever země. Omezené rozmístění linie na severu Británie je v literatuře vysvětlováno dvěma geofyzickými a klimatickými událostmi. 1) větev musela vzniknout před méně než 15 tisíci lety na konci posledního glaciálního maxima, v době, kdy se rychle oteplilo (Steffensen a spol., 2008). 2) větev musela vzniknout ještě před oddělením Velké Británie od zbytku Evropy v období Holocénu přibližně před 8400 lety (Lambeck, 1995). Poslední linie 7 představuje francouzskou linii, kterou jsem rozšířila o vlastní vzorek z jedné lokality Francie.

U hrabošů druhu *Microtus arvalis* bylo výsledkem molekulárních analýz sekvencí CYB sedm mitochondriálně rozlišených, samostatných linií. Byly porovnány se čtyřmi publikacemi (Haynes a spol., 2003; Fink a spol., 2004; Tougard a spol., 2008; Bužan a spol., 2010). Linie v daných publikacích neměly silnou bootstrapovou podporu, takže se u jednotlivých prací lišilo jejich umístění ve fylogenetickém stromě. Shodně bylo popsáno pět linií – „obscurus“ (někdy popisována jako samostatný druh *Microtus obscurus* (Fink a spol., 2004)), italská, východní, západní a centrální (Haynes a spol., 2003), linie Freiburg byla popsána u zbylých publikací (Fink a spol., 2004; Tougard a spol., 2008) a balkánská linie byla uvedena pouze v doposud nejmladší publikaci (Bužan a spol., 2010). V mé práci bylo popsáno shodně 6 linií, vzorky z lokality Freiburg se zařadily do západní linie a navíc vyšla linie geograficky specifická pro Bulharsko. Na bázi byla shodně linie 1b představující linii „obscurus“, která byla totožná ve složení vzorků s uvedenými publikacemi. Linie 2b představuje linii západní, která byla rozšířena o vlastní vzorek z Francie. Do této linie patří vzorky z oblasti Orknejí, které byly hraboši zřejmě osídleny díky jejich zavlečení lidmi z jihozápadní Evropy v období Neolitu, ovšem je potřeba další výzkum, k potvrzení této teorie (Haynes a spol., 2003). Linii 3b v mé práci tvořila nová linie, která byla složena ze dvou vlastních vzorků z odlišných lokalit Bulharska. Italskou linii tvořila linie 4b, složená ze vzorků z Itálie a Švýcarska. Centrální linie se shodovala s linií 5b a byla rozšířena o vlastní vzorky z několika lokalit Německa a severozápadu České republiky. Linie 6b představovala balkánskou linii, kterou jsem rozšířila o vlastní vzorky ze Slovenska, severovýchodních Čech, Chorvatska a různých lokalit Maďarska, díky tomu byl zjištěn překryv s centrální linií v severovýchodních Čechách. Východní linie byla tvořena linií 7b, která byla rozšířena o vlastní vzorky z oblastí Slovenska, Maďarska a Chorvatska. V lokalitách Chorvatska a Maďarska se překrývala s balkánskou linií. Byl zjištěn společný překryv pro centrální, balkánskou a východní linii v oblasti severovýchodních Čech.

Molekulární analýzy sekvencí cytochrom oxidázy c podjednotky I (COI) vší rodu *Hoplopleura* parazitující na hrabošovitéch hlodavcích rozlišily 8 samostatných linií. Dané linie byly porovnány s výsledky diplomové práce T. Marvanové, která identifikovala 5 samostatných linií. Jednu linii tvořily vší druhu *Hoplopleura edentula* a zbylé čtyři linie zahrnovaly vší druhu *Hoplopleura acanthopus* (Marvanová, 2011). Současná práce přispěla rozšířením vzorků o různé lokality z mnoha nových zemí,

díky tomu bylo možno získat více informací o daných populacích. V mé práci se oddělily 2 linie zastupující vši druhu *H. edentula*, z nichž jedna se shodovala s předchozí prací, ale byla doplněna o nové vzorky z lokalit v Německu a Srbsku. Linie 2 se odštěpila nově a byla tvořena vzorky z Finska, Polska, Ruska. Obě linie byly hostitelsky specifické a parazitovaly pouze na nornících druhu *C. glareolus*.

Linie 1b se odštěpila na bázi větve vši druhu *H. acanthopus*. Nově byla rozšířena o vzorky z Německa a severozápadu Čech (Stružná), takže již nevykazovala geografickou specifitu pro Litvínov a byla hostitelsky specifická pro hraboše druhu *M. agrestis* a *M. arvalis* oproti předešlé práci, kde vykazovala hostitelskou specifitu pouze pro *M. agrestis*. Tato linie představovala západní větev. Linie 2b byla shodná s předchozí studií a v mé bakalářské práci byla rozšířena o lokalitu Stružná, linie vykazovala geografickou specifitu pro severovýchodní Čechy a nebyla hostitelsky specifická, vši parazitovaly stejnou měrou na hraboších i nornících. Linie 3 a linie 4 byly nově určeny, linie 3 byla tvořena pouze dvěma vzorky z Německa parazitujícími na *M. arvalis* a linie 4 byla tvořena třemi vzorky z Bulharska a obsahovala vši parazitující na hraboších druhu *M. agrestis* a *M. levis*. Linie 5 se shodovala s předchozí studií a byla rozšířena o území Chorvatska a Maďarska, linie nebyla zcela hostitelsky specifická, hostiteli byli vedle *M. arvalis* v menší míře i *C. glareolus* a *A. flavicollis*. Tato linie představuje východní větev. Poslední linie 6 byla shodná s předchozí studií a rozprostírala se po téměř celém území České republiky a na lokalitách z východního Slovenska. Linie byla rozšířena o velké množství lokalit z České republiky a vykazuje sníženou hostitelskou specifitu, hostitele zde tvoří vedle *M. arvalis* i *C. glareolus*.

Z hlediska geografického rozšíření i hostitelského spektra linií rodu *Hoplopleura* parazitujících na hrabošovitých hlodavců je zajímavé porovnání s vešmi druhu *P. serrata*, které parazitují myšice rodu *Apodemus* a které vykazují podobné hranice areálu (Štefka a Hypša, 2008). Genealogická studie *P. serrata* byla prováděna na 126 jedincích vši, ze kterých byly získány sekvence COI. Fylogenetické analýzy ukázaly 3 mitochondriálně oddělené linie (linie A, B, C) a bajkalskou linii, která byla při ML analýze vyčleněna mimo evropský klast. Linie A obsahovala 22 haplotypů a zabírala území východního Slovenska, České republiky, Francie a Skotska, tvořila tím západní linii a jejími hostiteli byly myšice druhu *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*. Linie B byla složena ze 14 haplotypů z lokalit nacházejících se především ve východním Slovensku. Linie byla hostitelsky specifická a jediným hostitelem byla *A. flavicollis*.

Linie C byla geograficky specifická a rozkládala se ve východním Slovensku, parazitovala na myšicích druhu *A. agrarius* a *A. uralensis* (Štefka a Hypša, 2008). Daná studie byla doplněna o nové vzorky z dalších lokalit nacházejících se na území Bulharska, jižní Británie a Francie (Martinů, 2009). V populacích vši druhu *P. serrata* procházely střední Evropou hranice, které oddělovaly linii východní a západní, jako tomu bylo i u vši rodu *Hoplopleura* parazitujících na hrabošovitých hlodavcích, u kterých se hranice nezměnily ani po přidání nových vzorků. Druh *H. edentula* se vyskytoval od Balkánu, přes střední Evropu, až po Finsko. Díky rozdělení do dvou samostatných linií, můžeme předpokládat přečkání glaciálu ve dvou různých refugii. Linie 1 mohla přežít v refugiu ležícím v centrální Evropě a linie 2 mohla přežít v karpatském refugiu. Přesto jde o hostitelsky specifický druh, zatímco u *H. acanthopus* existuje více linií, které se liší v míře hostitelské specifity, zejména vůči druhu *C. glareolus*. Je pravděpodobné, že se oba druhy (*H. edentula* a *H. acanthopus*) od sebe oddělily již před čtvrtihorním zaledněním, což bude nutné ověřit pomocí molekulárních hodin. U *H. acanthopus* mohlo nastat, podobně jako u *P. serrata*, rozdělení populací a přečkání glaciálu v odlišných refugii. Tím mohlo dojít k dlouhodobé izolaci na jednom či více hostitelích, kdežto jiná linie mohla zůstat v kontaktu s více hostitelskými druhy. Na rozdílný osud populací *H. acanthopus* poukazují i výsledky haplotypových sítí, ve kterých slovenská populace linie 7 (**Obr. 14**) vykazuje patern typický pro populace po bottlenecku, kdežto tvar sítě české populace představované linií 8 se podobá spíše populacím v rovnováze.

I když data pro ektoparazity nejsou natolik bohatá jako pro jejich hostitele, podařilo se shromáždit sekvence zástupců rodu *Hoplopleura* z podstatné části druhových areálů. Výsledky ukazují, že biogeografické členění populací hlodavců a jejich ektoparazitů studovaných v této práci se rozděluje na dané linie, jak podle obecného paternu, který je společný pro většinu organismů v Evropě (Hewitt, 2011), tak v souladu s existencí kryptických refugii v severnějších oblastech Evropy (Kotlík a spol., 2006; Colangelo a spol., 2012; Filipi a spol., 2015).

Díky lepším klimatickým podmínkám se většina glaciálních refugii nacházela na jihu Evropy, mezi ty hlavní patřil Balkán, Ibérie a Itálie (Hewitt, 2011). Italské refugium je považováno za "hotspot" biodiverzity. Díky mnoha fylogeografickým analýzám linií *C. glareolus* v oblasti Itálie bylo zjištěno, že toto refugium pravděpodobně nesehrálo důležitou roli při rekolonizaci, nízká variabilita tohoto druhu

na italském poloostrově naznačuje významnější roli kryptického refugia ležícího ve střední Evropě (Colangelo a spol., 2012). Španělská a italská populace *M. arvalis* navíc vykazuje vysoký stupeň endemismu, což bylo dáno dlouhodobou izolací (Bilton a spol., 1998), z tohoto důvodu nemohly přispět k rozsáhlé rekolonizaci severního území Evropy. Zato střední Evropa sehrála důležitější roli, protože nebyla pouze kolébkou linií *M. arvalis*, ale také centrem rozptylu těchto hlodavců. Její roli potvrzují i kombinace fosilních, genetických a biogeografických záznamů. Předpokládá se, že malé izolované populace hrabošů druhu *M. arvalis* vyskytující se na území západní části centrální Evropy dopomohly k rekolonizaci zbytku Evropy spíše, než populace ze severních či jižních refugií. Také jižní linie *M. agrestis* na Iberijském poloostrově potvrzuje toto refugium v průběhu posledního glaciálu, ovšem západní linie opět potvrzuje pravděpodobné obsazení refugia v Karpatech.

Glaciální refugia na severu byla potvrzena v oblasti Karpat a střední Evropy (Tougaard a spol., 2008; Filipi a spol., 2015). Nalezení kryptického refugia v Karpatech zpochybnilo tvrzení (Haynes a spol., 2003), že východní linie *M. arvalis* vyskytující se na území Maďarska, Slovenska, Polska, Ukrajiny, Ruska a Finska se rozšířila z balkánského refugia, což bylo zřejmě způsobeno nedostatečným množstvím vzorků, zato jedna ze studií (Bužan a spol., 2010) naznačuje, že linie měla refugium na severu Balkánu a/nebo v Karpatech. Na jihozápadě Balkánu se rozprostíralo několik malých endemických oblastí, které měly malý geografický rozptyl, tato oblast byla označena za “hotspot” diversity evropských savců (Kryštufek a Reed, 2004). Karpatské refugium je nejlépe zdokumentované u druhu *C. glareolus* (Kotlík a spol., 2006; Filipi a spol., 2015). Karpatská linie se rozšířila z okolí Karpat přes Skandinávii (Norsko, Švédsko) až do Velké Británie, kde se vyskytuje spolu s linií západní, která měla refugium v podhůří Alp, což dělá z *C. glareolus* jednoho z dobře studovaných živočichů, u kterého byl zaznamenán proces kolonizace Británie jak ze severního, tak i jižního refugia (Kotlík a spol., 2006). Britská a skandinávská populace se oddělily přibližně před 8 tisíci lety, kdy byly spojeny pevninskými mosty (Jaarola a spol., 1999). Karpatská linie se nyní na ostrově vyskytuje pouze v severní a jižní části. Většinou část zabírá linie západní, což bylo v nejnovější studii zabývající se mitogenomickou fylogenetikou *C. glareolus* (Filipi a spol., 2015) připisováno funkční změně proteinu pro hemoglobin, která mohla mít pozitivní vliv na antioxidantní účinek červených krvinek (Kotlík a spol., 2014). To by kompetičně zvýhodnilo

západní populaci nad karpatskou populací, ovšem jejich výzkum toto tvrzení nepotvrdil (Filipi a spol., 2015).

V této práci jsem se zaměřila především na fylogeografické rozmístění genetických linií, z toho důvodu mi postačily informace získané z mitochondriální DNA (mtDNA), která je předávána po maternální linii. K zjištění detailnější struktury a populační dynamiky recentních linií hostitelů a jejich parazitů by bylo zapotřebí použít mikrolokusové metody (SNP, AFLP, mikrosatelity, atd.), které poskytují více informací. Ovšem navzdory vzrůstajícímu využívání a oblibě těchto metod, mtDNA používaná při výzkumu fylogeografických hypotéz či evolučních scénářů je stále užitečná, zejména, je-li použit celý mitochondriální genom oproti krátkým úsekům sekvenčních dat. Díky plně osekvenovanému mitochondriálnímu genomu u *C. glareolus* byla nalezena linie tvořená pseudogeny, která byla následně rozšířena o další pseudogeny nalezené v genové bance. Ukázalo se, že v jaderném genomu pravděpodobně došlo k více mitochondriálním insercím a alespoň jedné duplikaci (Filipi a spol., 2015). Díky přesnějším datům, která tyto celogenomové sekvence poskytnou, by mohlo být možné prověřit údaje nahrané v genových databázích a získat tak v budoucích studiích mnohem přesnější výsledky fylogenetických stromů a tím zpřesnit fylogeografické údaje a postglaciální rekolonizaci Evropy u *C. glareolus* a dalších druhů.

6. Závěr

- Z výsledků vyplývá, že na základě molekulárních analýz sekvencí CYB z norníků druhu *Clethrionomys glareolus* bylo nalezeno 8 mitochondriálně odlišných a fylogeneticky stabilních linií, které se lišily svým geografickým rozšířením a bylo nalezeno několik linií skládajících se z pseudogenů. Výsledkem molekulárních analýz sekvencí CYB u hrabošů druhu *Microtus agrestis* bylo nalezení 7 samostatných linií s distinktním geografickým rozlišením. Větev *Microtus arvalis* se rozčlenila na 7 fylogeneticky stabilních linií, které se také lišily geografickým rozdělením. U vši rodu *Hoplopleura* parazitujících na hrabošovitých hlodavcích bylo výsledkem molekulárních analýz sekvencí COI osm samostatných stabilních linií, které byly porovnány se studií T. Marvanové (Marvanová, 2011). Současná studie našla nové linie, rozšířila počet lokalit a vzorků a tím přinesla více informací o charakteru populací.
- Bylo zjištěno, že jednotlivé linie se v určitých místech překrývají. U *C. glareolus* to byl překryv v jedné lokalitě na jihu Německa, kde se střetávala východní, západní a karpatská linie a karpatská linie spolu s jižní tvořily další překryv na území severního Německa, Polska a jedné lokality v západním Rusku. V případě hrabošů druhu *M. agrestis* se objevil překryv západní a karpatské linie v lokalitě Litvínov a stejně tak tomu bylo i u východní a balkánské linie hrabošů druhu *M. arvalis*, k té ale přibýly ještě překryvy v oblasti na Slovensku, Chorvatsku a Maďarsku.
- Jednotlivé linie rodu *Hoplopleura* se lišily stupněm hostitelské specifity. Zatímco *H. edentula* zůstává úzce specifická i přes vyšší počet studovaných sekvencí oproti dřívějším studiím. U druhu *H. acanthopus* bylo nalezeno několik linií s odlišným stupněm specifity.

7. Použitá literatura

- Anděra, M., Horáček, I., 2005: Poznáváme naše savce. 2. Vydání. Sobotáles, Praha.
- Araujo, A., Reinhard, K., J., Ferreira, L., F., Gardner, S., L., 2008. Parasites as probes for prehistoric human migration. *Trends in Parasitology* 24: 112 – 115.
- Avise, J., C., 2000. *Phylogeography. The history and formation species.* Harvard University Press.
- Avise, J., C., 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3 – 15.
- Babik, W., Branicki, W., Sandera, M., Litvinchuk, S., Borkin, L., J., Irwin, J., T., Rafinski, J., 2004. Mitochondrial phylogeography of the moor frog, *Rana arvalis*. *Molecular Ecology* 13: 1469 – 1480.
- Banks, J., C., Paterson, A., M., 2005. Multi - host parasite species in cophylogenetic studies. *International Journal for Parasitology* 35: 741 – 746.
- Beacournu, 1966. *Hoplopleura edentula* Fahrenholz, 1916 (*Anoplura*), parasite spécifique de *Clethrionomys glareolus*, est une bonne espece. *Acta Parsit. Polon.* 14: 127 – 131.
- Bennet, K., D., Tzedakis, P., C., Willis, K., J., 1991. Quartery refugia of North European trees. *Journal of Biogeography* 18: 103 – 115.
- Bilton, D., T., Mirol, P., M., Mascheretti, S., Fredga, K., Zima, J., Searle, J., B., 1998. Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial conization. *Proceeding of the Royal Society B: Biological science* 265: 1219 – 1226.
- Braaker, S., Heckel, G., 2009. Transalpine colonisation and partial phylogeographic erosion by dispersal in the common vole (*Microtus arvalis*). *Molecular Ecology* 18: 2518 - 2531.
- Brunsfeld S., J., Sullivan, J., Soltis, D., E., Soltis, P., E., 2001. Comparative phylogeography of north-western North America: a synthesis. *Integrating ecology and evolution in a spatial context.*

- Bužan, E., V., Forster, D., W., Searle, J., B., Kryštufek, B., 2010. A new cytochrome b phylogroup of the common vole (*Microtus arvalis*) endemic to the Balkans and its implications for the evolutionary history of the species. *Biological Journal of the Linnean Society* 100: 788 – 796.
- Clayton, D., H., Drown, D., M., 2001. Critical evaluation of five methods for quantifying chewing lice (Insecta: Phthiraptera). *Journal of Parasitology* 87: 1291 – 1300.
- Clayton, D., H., Johnson, K., P., 2003. Linking coevolutionary history to ecological proces: Doves and lice. *Evolution* 57: 2335 – 2341.
- Clayton, D., H., Bush S., E., Johnson, K., P., 2004. Ecology of congruence: Past meets present. *Systematic Biology* 53:165-173.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K., A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657-1659.
- Colangelo, P., Aloise, G., Franchini, P., Annesi, F., Amori, G., 2012. Mitochondrial DNA reveals hidden diversity and an ancestral lineage of the bank vole in the Italian peninsula. *Journal of Zoology* 287: 41 – 52.
- Dalén, L., Nystrom, V., Valdiosera, C., Germonpré, C., Sablin, M., Turner, E., Angerbjorn, A., Arsuaga, J., L., Gotherstrom, A., 2007. Ancient DNA reveals lack of postglacial habitat tracking in the arctic fox. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 104: 6726 – 6729.
- Deffontaine, V., Libois, R., Kotlík, P., Sommer, R., Nieberding, C., Paradis, E., Searle, J., B., Michaux, J., R., 2005. Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology* 14: 1727 - 1739.
- du Toit, N., van Vuuren, B., J., Matthee, S., Matthee, C., A., 2013. Biogeography and host – related factors trump parasite life history: limited congruence among the genetic structures of specific ectoparasitic lice and their rodent hosts. *Molecular Ecology* 22: 5185 – 5204.

- Emerson, K., J., Merz, C., R., Catchen, J., M., Hohenlohe, P., A., Cresko, W., A., Bradshaw, W., E., Holzapfel, Ch., M., 2010. Resolving postglacial phylogeography using high – throughput sequencing. PNAS 107: 16196 – 16200.
- Filipi, K., Marková, S., Searle, J., B., Kotlík, P., 2015. Mitogenomic phylogenetics of the bank vole *Clethrionomys glareolus*, a model system for studying end – glacial colonization of Europe. Molecular Phylogenetics and Evolution 82: 245 – 257.
- Fink, S., Excoffier L., Heckel, G., 2004. Mitochondrial gene diversity in the common vole *Microtus arvalis* shaped by historical divergence and local adaptations. Molecular Ecology 13: 3501 – 3514.
- Flojgaard, C., Normand, S., Skov, F., Svenning, J. – Ch., 2009. Ice age distributions of European small mammals: insights from species distribution modelling. Journal of Biogeography 36: 1152 – 1163.
- Hafner, M., Nadler, S., A., 1988. Phylogenetics trees support the coevolution of parasites and their hosts. Nature 332: 258 – 259.
- Hafner, M., S., Sudman , P., D., Villablanca, F., X., Spradling, T., A., Demastes, J., V., Nadler, S., A., 1994. Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. Science 365: 1087 - 1090.
- Hafner, M., S., Page, D., M., 1995. Molecular phylogenies and host – parasite cospeciation: gophers and lice a model system. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci. 349: 77 – 83.
- Haynes, S., Jaarola, M., Searle, J. B., 2003. Phylogeography of the common vole (*Microtus arvalis*) with particular emphasis on the colonization of the Orkney archipelago. Molecular Ecology 12: 951 – 956.
- Heckel, G., Burri, R., Finks, S., Desmet, J – F., Excoffier, L., 2005. Genetic structure and colonization processes in European populations of the common vole *Microtus arvalis*. Evolution 59: 2231 – 2242.
- Herman, J., S., Searle, J., B., 2011. Post- glacial partitioning of mitochondrial genetic variation in the field vole. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 278: 3601 - 3607.

- Herman, J., S., McDevitt, A., D., Kawalko, A., Jaarola, M., Wójcik, J., M., Searle, J., B., 2014. Land – bridge calibration of molecular clocks and the post – glacial colonization of Scandinavia by the Eurasian field vole *Microtus agrestis*. PLoS ONE 9, e103949.
- Hewitt, G., M., 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – of seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10: 537 – 549.
- Hewitt, G., M., 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 359: 183 – 195.
- Hewitt, G., M., 2011. *Mediterranean Peninsulas - the evolution of hotspots*. Springer: 123 - 147.
- Hewitt, G., M., 2011. Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica*: DOI 10.1007: 10709-011-9547-3.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754 – 755.
- Huyse, T., Poulin, R., Théron, A., 2005. Speciation in parasites: a population genetics approach. *TRENDS in Parasitology* 21: 469 – 475.
- Hypša, V., 2006. Parasite histories and novel phylogenetic tools: alternative approaches to inferring parasite evolution from molecular markers. *International Journal for Parasitology* 36: 141 – 155.
- Chaline, J., Brunet- Lecomte, P., Montuire, S., Viriot, L., Courant, F., 1999. Anatomy of the arvicoline radiation (*Rodentia*): paleogeographical, palaeoecological history and evolutionary data. *Annales Zoologici Fennici* 36: 239 - 267.
- Chevolot, M., Hoarau, G., Rijnsdorp, A., D., Stam, W., T., Olsen, J., L., 2006. Phylogeography and population structure of thornback rays (*Raja clavata* L., *Rajidae*). *Molecular Ecology* 12: 3693 – 3705.
- Jaarola, M., Tegelstrom, H., Fredga, K., 1999. Colonization history in Fennoscandian rodents. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 113 – 127.

- Jaarola, M., Searle, J. B., 2002. Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* 11: 2613 – 2621.
- Johnson, K., P., Williams, B., L., Drown, D., M., Adams, R., J., Clayton, D., H., 2002. The population genetics of host specificity: genetic differentiation in dove lice. *Molecular Ecology* 11: 25 - 38.
- Johnson, K., P., Weckstein, J., D., Bush, S., E., Clayton, D., H., 2011. The evolution of host specificity in dove body lice. *Parasitology* 138: 1730 – 1736.
- Kittler, R., Kayser, M., Stoneking, M., 2003. Molecular evolution of *Pediculus humanus* and the origin of clothing. *Current Biology* 13: 1414–1417.
- Kohn, M., Šterba, J., 1987. A comparison of some diagnostic features of *Hoplopleura acanthopus* and *Hoplopleura edentula* (*Anoplura: Hoplopleuridae*) under scanning electron microscope. *Folia Parasitologica* 34: 183 - 187.
- Kotlík, P., Deffontaine, V., Mascheretti, S., Zima, J., Michaux, J., R., Searle, J., B., 2006. A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *PNAS* 103: 14860 - 14864.
- Kotlík, P., Marková, S., Vojtek, L., Stratil, A., Šlechta, V., Hyršl, P., Searle, J., B., 2014. Adaptive phylogeography: functional divergence between haemoglobins derived from different glacial refugia in the bank vole. *Proceedings of the Royal Society B* 281, 20140021.
- Kryštufek, B., Reed, J., M., 2004. Pattern and process in Balkan biodiversity – an overview. In: Griffiths H., I., Kryštufek, B., Reed, J., M., eds. *Balkan biodiversity: pattern and process in the European hotspot*. Kluwer Academic Publishers: 1 – 8.
- Lambeck, K., 1995. Late Devensian and Holocene shorelines of the British Isles and North Sea from models of glacio-hydro-isostatic rebound. *Journal of the Geological Society London* 152: 437 - 448.
- Lanfear, R., Calcott, B., Kainer, D., Mayer, C., Stamatakis, A., 2014. Selecting optimal partitioning schemes for phylogenomic datasets. *BMC Evolutionary Biology* 14: 82.

- Ledevin, R., Michaux J., R., Deffontaine, V., Henttonen, H., Renaud, S., 2010. Evolutionary history of the bank vole *Myodes glareolus*: a morphometric perspective. *Biological Journal of the Linnean Society* 100: 681 - 694.
- Leonard, J., A., Wayne, R., K., Cooper, A., 2000. Population genetics of Ice Age brown bears. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 97: 1651 – 1654.
- Martinů, J., 2009. Parazito-hostitelská koevoluce mezi vešmi druhu *Polyplax serrata* a myšicemi rodu *Apodemus*. Diplomová práce. Laboratoř Molekulární Fylogenetiky a Evoluce Parazitů Parazitologický Ústav, Biologické centrum, AVČR.
- Martinů, J., Sychra, O., Literák, I., Čapek, M., Gustafsson, L., Štefka, J., 2015. Host generalists and specialists emerging side by side: an analysis of evolutionary patterns in the cosmopolitan chewing louse genus *Menacanthus*. *International Journal for Parasitology* 45: 63 – 73.
- Marvanová, T., 2011. Populační struktura a genealogie vší rodu *Hoplopleura*. Diplomová práce. Laboratoř Molekulární Fylogenetiky a Evoluce Parazitů Parazitologický Ústav, Biologické centrum, AVČR.
- Matějková, M., 2012. Koevoluce hlodavců a jejich ektoparazitů na populační úrovni. Bakalářská práce. Laboratoř Molekulární Fylogenetiky a Evoluce Parazitů Parazitologický Ústav, Biologické centrum, AVČR.
- 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 Wood-mouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Heredity* 94: 52 - 63.
- Nieberding, C., M., Olivieri, I., 2007. Parasites: proxies for host genealogy and ecology? *TRENDS in Ecology and Evolution* 22: 156 – 165.
- Nieberding, C., M., Durette-Desset, M., C., Vanderpoorten, A., Casanova, J., C., Ribas, A., Deffontaine, V., Feliu, C., Morand, S., Libois, R., Michaux, J., R., 2008. Geography and host biogeography matter for understanding the phylogeography of a parasite. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 538 – 554.

- Page, R., D., M., 2003. Tangled Trees: Phylogeny, Cospeciation, and Coevolution. University of Chicago Press.
- Provan, J., Bennett, K., D., 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. Trends in Ecology & Evolution 23: 564 – 571.
- Rambaut, A., Drummond, A., J., 2012. FigTree version 1.4 available at: tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree.
- Reed, D., L., Smith, V., S., Rogers, A., R., Hammond, S., L., Clayton, D., H., 2004. Molecular genetic analysis of human lice supports direct contact between modern and archaic humans. Plos Biology 2: 340.
- Schmitt, T. 2007. Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. Frontiers of Zoology 4: 11.
- Stam, W., T., et al., 2001. Post glacial recolonisation and biogeographic patterns in the North Atlantic. Phycologia 40: 46.
- Steffensen, J., P., et al., 2008. High – resolution Greenland ice core data show abrupt climate change happens in few years. Science 321: 680 – 684.
- Stewart, J., R., Lister, A., M., 2001. Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. Trends in Ecology & Evolution 16: 608 – 613.
- 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: 731 - 741.
- Thomson, J. D., Higgins, D. G., Gibson T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap, penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673 - 4680.
- Tougaard, Ch., Renvoisé, E., Petitjean, A., Quéré, J. – P., 2008. New Insight into the Colonization Processes of Common Voles: Inferences from Molecular and Fossil Evidence. PLoS ONE 3: e3532.

- Ursenbacher, S., Carlsson, M., Helfer, V., Tegelstrom, H., Fumagalli, L., 2006. Phylogeography and Pleistocene refugia of the Adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology* 15: 3425 – 3437.
- Valdiosera, C., García, N., Anderung, C., Dalén, L., Crégut, E., Kahlke, R. – D., 2000. Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears. *Molecular Ecology* 16: 5140 – 5148.
- Whiteman, N., K., Parker, P., G., 2004. Effects of host sociality on ectoparasite population biology. *Journal of Parasitology* 90: 939 – 947.
- Whiteman, N., K., Kimball, R., T., Parker, P., G., 2007. Co-phylogeography and comparative population genetics of the threatened Galápagos hawk and three ectoparasite species: ecology shapes population histories within parasite communities. *Molecular Ecology* 16: 4759 – 4773.
- Wickstrom, L., M., Haukisalmi, V., Hantula, J., Fedorov, V., B., Henttonen, H., 2003. Phylogeography of the circumpolar *Paranoplocephala arctica* complex (Cestoda: Anoplocephalidae) parasitizing collared lemmings (*Dicrostonyx* spp.). *Molecular Ecology* 12: 3359 – 3371.
- Willis, K., J., van Andel, T., H., 2004. Trees or no Trees? The environments of central and eastern Europe during the Last Glacial. *Quaternary Science Reviews* 23: 2369 – 2387.
- Wojcik, J., M., Kawalko, A., Marková, S., Searle, J., B., Kotlík, P., 2010. Phylogeographic signatures of northward post-glacial colonization from high-latitude refugia: a case study of bank voles using museum specimens. *Journal of Zoology*: Print ISSN 0952-8369.

8. Příloha

Sekvence cytochrom oxidázy b z *Clethrionomys glareolus* + outgroup *Microtus* z genové banky (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

<i>zkratka vzorku</i>	<i>číslo z genové banky</i>	<i>zkratka vzorku</i>	<i>číslo z genové banky</i>
M. agrestis	FJ619765	SR1	DQ472316
M. agrestis	AY167188	SR2	DQ472276
M. arvalis	UAM24466	SR3	DQ472264
M. arvalis	UAM30029	Chorv1	HQ288345
FM	DQ472286	Chorv2	DQ472330
VnL	DQ472290	Chorv3	DQ472326
Besk	HQ288347	Belg	HQ288334
Nem	DQ472319	Litva	HQ288401
FR3	HQ288390	Rak1	HQ288330
FR4	HQ288396	Rak2	DQ472334
FR5	HQ288389	Rak3	DQ472338
FR6	HQ288385	Swi1	HQ288417
FR7	HQ288382	Swi2	HQ288418
UK2	HQ288367	Swi3	DQ472343
UK3	FJ640870	Fin	HQ288369
UK4	FJ640941	Dansk1	HQ288363
UK5	FJ640941	Dansk2	HQ288354
UK6	FJ640942	Bul1	HQ288338
Irsko	EF378948	Bul2	HQ288340
IT1	HQ288398	Bul3	DQ472240
IT2	HQ288399	Bul4	DQ472234
IT3	DQ472244	UKR1	DQ472230
Pol1	FJ881429	UKR2	DQ472246
Pol2	HQ288405	RUM1	DQ472274
Pol3	FJ881489	RUM2	DQ472246
Pol4	FJ881487	Slov	DQ472323
Pol5	FJ881483	MAD1	DQ472248
Pol6	FJ881491	MAD2	DQ472250
Srb&CH1	DQ472302	MAD3	DQ472345
Srb&CH2	DQ472298	SR4	DQ472316
FR9	HQ288376	Bul5	AJ639704
FR10	HQ288378	IT4	HE604965
FR11	HQ288377	IT5	HE604967
FR13	HQ288383	NOR1	KM892836

FR14	HQ288389	NOR2	KM892835
Dansk3	KM892822	Niz	KM892826

Sekvence cytochrom oxidázy b z *M. arvalis* (Mar) a *M. agrestis* (Mag) + outgroup *C. glareolus* převzaté z genové banky (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

<i>zkratka vzorku</i>	<i>číslo z genové banky</i>	<i>zkratka vzorku</i>	<i>číslo z genové banky</i>
M. glareolus	AY309421	FilMag	AY167152
M. glareolus	AY309419	FlMag	AY167151
SR4Mar	AY220767	KRMag	AY167212
SR5Mar	AY220768	FRMag	GU563290
FR1Mar	GY190634	FR2Mag	GU563288
FR2Mar	AM991085	FR3Mag	GU563286
FR3Mar	GU190633	FR4Mag	GU563290
FR4Mar	GU190628	FR5Mag	GU563284
FR5Mar	GU190570	FR6Mag	GU563289
Nem1Mar	GU190626	UKMag	GU563227
Nem2Mar	GU190624	UK2Mag	GU563280
Nem3Mar	GU190616	UK3Mag	GU563282
Nem4Mar	GU190622	UK4Mag	GU563276
Bel1Mar	GU190544	UK5Mag	GU563260
Be2Mar	GU190536	UK6Mag	GU563786
Niz1Mar	GU190535	UK7Mag	GU563784
Niz2Mar	GU190530	UK8Mag	GU563782
Niz3Mar	GU190506	UK9Mag	GU563780
Niz4Mar	AY220778	ScotMag	AY167181
Spa1Mar	GU190646	Scot2Mag	AY167182
Spa3Mar	AY220788	DanMag	GU563298
Fin1Mar	AY220770	Dan2Mag	GU563297
MAD1Mar	AY220769	BrusMag	AY167155
DanMar	AY220776	LitvaMag	AY167177
GruzMar	AY220760	Litv2Mag	AY167178
ArmenMar	AY220761	NizMag	AY167183
Pol1Mar	AY220773	FinMag	AY167198
Pol2Mar	AY220772	Fin2Mag	AY167205
RUS1Mar	AY220762	Fin3Mag	AY167169
RUS2Mar	AY220771	Fin4Mag	AY167199
RUS3Mar	AY220763	PolMag	AY167185

SibirMar	AY220765	RusMag	AY167174
Orkn1Mar	AY220786	Rus2Mag	AY167165
Orkn2Mar	AY220779	Rus3Mag	AY167213
Orkn3Mar	AY220784	Rus4Mag	AY167156
Orkn4Mar	AY220785	SpaMag	AY167162
centrMar	FJ790031	PortMag	AY167186
BHMar	GU187384	NorskMag	AY167202
ITMar	FJ790009	SwiMag	AY167160
SwiMar	FJ790008	Swi2Mag	AY167161
Swi2Mar	FJ790007	Swi3Mag	AY167159
Nem5Mar	FJ790017	SveMag	AY167211
Nem6Mar	FJ789987	Sve2Mag	AY167203
Nem7Mar	FJ789989	Sve3Mag	AY167209
Nem3Mag	AY167210	Sve4Mag	AY167207
Nor2Mag	KF218853	Sve5Mag	AY167206
UK10Mag	GU563244	NemMag	GU563296
Skot3Mag	GU563239	Nem2Mag	GU563292