

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Koevoluce hlodavců a jejich ektoparazitů na populační úrovni

Michaela Matějková

Školitel: Jan Štefka, PhD

Školitel - konzultant: RNDr. Jana Martinů

Laboratoř Molekulární Fylogenetiky a Evoluce Parazitů

Parazitologický Ústav, Biologické centrum, AVČR



České Budějovice 2012

Bakalářská práce:

Matějková M., 2012, Koevoluce hlodavců a jejich ektoparazitů na populační úrovni. [Coevolution of rodents and their ectoparasites on a population level, Bachelor Thesis, in Czech] – 49 pp, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The study reconstructs phylogeographic patterns of host populations of small rodent species *Microtus agrestis*, *Microtus arvalis* and *Myodes glareolus* from European localities. These results are compared with the genetic structure of the sucking louse genus *Hoplopleura* from central Europe.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 26. 4. 2012

Michaela Matějková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Janě Martinů a Honzovi Štefkovi za všechny rady a ohromnou trpělivost. Václavu Hypšovi za jeho odbornou kritiku a smysl pro detail. Dále také Tomášovi, Filipovi a Janě za pomoc při nesnázích s počítačovými programy a zbývajícím lidem z laboratoře za úžasnou atmosféru při práci. A stejně tak Zuzce a Sašovi za morální a psychickou podporu při vytváření této práce.

Obsah:

1. Úvod	1
1.1. Fylogeografický patern Evropy	2
1.2. Genealogie vší druhu <i>Polyplax serrata</i> a rodu <i>Hoplopleura</i>	5
1.3. Glaciální refugia a současné rozšíření hlodavců druhu <i>Microtus agrestis</i> , <i>Microtus arvalis</i> a <i>Myodes glareolus</i>	6
2. Cíle práce	9
3. Materiál a metodika	10
3.1. Odchyt hlodavců, jejich ektoparazitů a odběr biologických vzorků	10
3.2. DNA extrakce	21
3.3. PCR reakce, gelová elektroforéza a sekvenace	22
3.4. Práce se sekvencemi, alignmenty a fylogenetické analýzy	23
4. Výsledky	25
4.1. Sekvence a alignmenty	25
4.2. Fylogenetické analýzy	25
5. Diskuze	36
6. Závěr	41
7. Použitá literatura	42
8. Příloha	47

1. Úvod

Díky moderním fylogenetickým metodám můžeme odhalit koevoluční vzory týkající se spojení hostitel - parazit, rekonstruovat průběh společné evoluce a vysvětlit mechanismy uplatňující se v koevoluci hostitele a parazita. Doposud byla většina koevolučních studií prováděna na fylogenetické úrovni, ale pro pochopení základních evolučních mechanismů interagujících taxonů by bylo vhodné uvážit i jejich genealogii a populační strukturu parazitů (Banks a Paterson, 2005).

Koevoluce mezi hostiteli a parazity je již dlouho uznávána jako základní hnací síla makroevolučních procesů (Nieberding a spol., 2008). Původ parazitických druhů s různými stupni hostitelské specifity je v parazitologii diskutovaným problémem (Clayton a spol., 2004) a předpokládá se působení několika odlišných evolučních procesů. V jednodušším případě dochází ke společné speciaci mezi hostitelem a jeho parazitem, když tyto dva organismi sdílejí společnou evoluční historii tak, že parazit sleduje speciální události svého hostitele (Page, 2003). Mezi další důležité procesy, které ovlivňují průběh evoluce stávajících linií a vznik linií nových, se řadí přeskoky parazita na jiného hostitele, duplikace linií, lineage sorting a neschopnost parazita speciovat spolu s hostitelem.

Stupeň hostitelské specifity přitom může snadno ovlivňovat vnitrodruhovou genetickou strukturu a vytvoření bariér genetickým tokem (Johnson a spol., 2002). Parazité pravděpodobně často podstupují proces speciace spolu s hostitelem, který do značné míry ovlivňuje jejich genetický charakter. Zároveň ale genealogie parazita neodráží přesně genetickou strukturu a evoluční historii hostitele a i blízké příbuzné linie parazita se mohou velmi lišit mírou hostitelské specifity a populační struktury, jak bylo prokázáno např. u lidských vší (*Pediculus humanus*). U těchto vší existují dvě specializované formy, hlavová a šatní (tělní), které však nejsou recipročně monofyletické (Reed a spol., 2004). Vší druhu *Pediculus humanus* byly rozděleny do 3 linií, které se mezi sebou lišily specifitou vůči různým částem těla hostitele i geografickým rozšířením. Jedna větev obsahovala jak formu hlavovou, tak šatní a pocházely z celého světa. Další větev zahrnovala pouze formu hlavovou z území střední a západní Ameriky a Evropy. Poslední větev měla také pouze formu hlavovou a to z oblasti Afriky a Nepálu (Reed a spol., 2004). Podrobnější studium genealogických vztahů odhalilo, že šatní forma vznikla několikrát nezávisle na sobě z formy hlavové, duplikačním procesem.

Duplikace parazita je považována za jeden z hlavních koevolučních procesů, které jsou základem parazito-hostitelských vztahů. Jedním mechanismem, který může duplikace

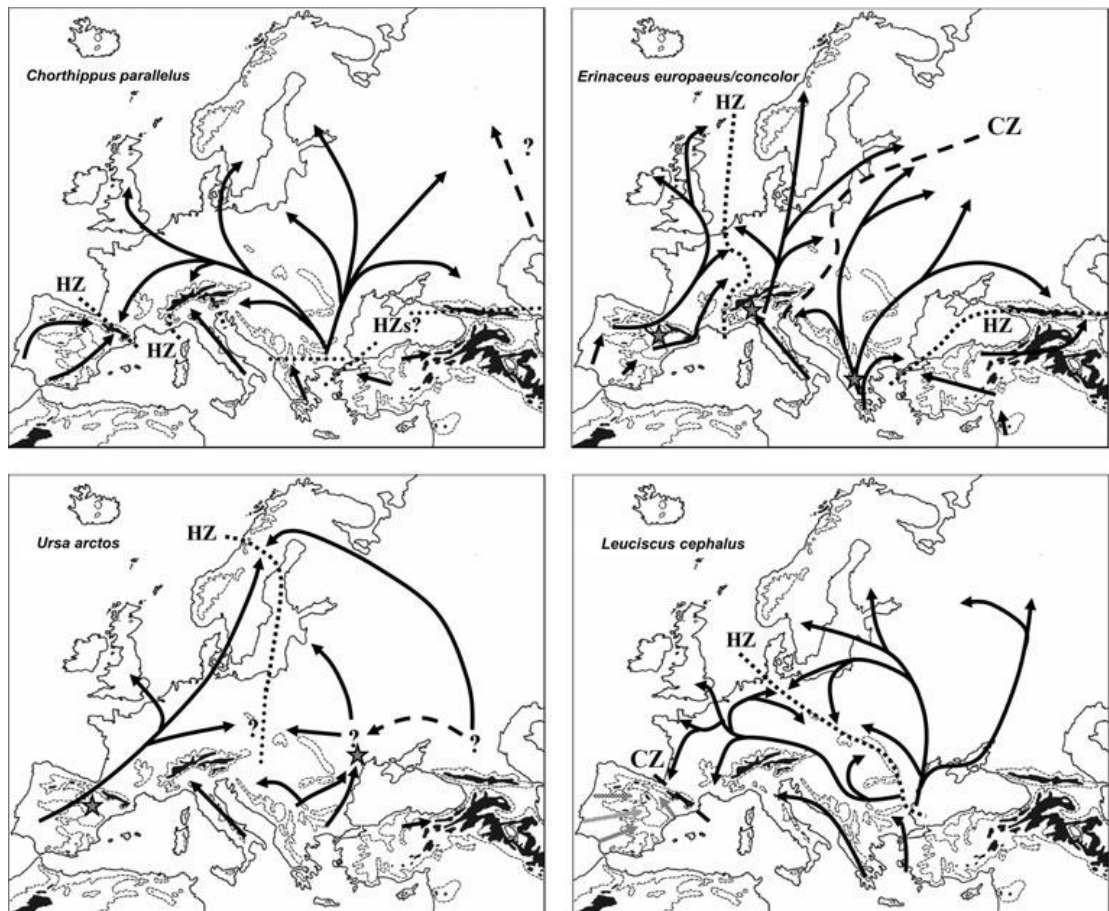
způsobovat, je přechodná roztržitost a následné sloučení hostitelské populace, kdy krátká generační doba parazita povede ke speciaci, zatímco populace hostitele zůstanou geneticky propojené (Štefka a Hypša, 2008).

1.1. Fylogeografický patern Evropy

Fylogeografie studuje procesy určující geografické rozložení genetických linií na vnitrodruhové či příbuzenské úrovni a používá se pro zjištění různých procesů, jako je rozdělení populace, speciace, adaptace či migrace cest spojených s klimatickými změnami v minulosti (Avice, 2000). Klimatické změny mají hlavní dopad na geografické rozšíření, demografii a tedy i na evoluci druhů (Hewitt, 2004). Evoluce evropských druhů živočichů během a po čtvrtohorním zalednění a jejich současné areály výskytu patří v dnešní době k velice diskutovaným tématům.

Mnoho temperátních druhů osídlilo během čtvrtohorního zalednění nižší zeměpisné šířky, takže v Evropě se jižní poloostrovy Ibérie, Itálie a Balkánu staly důležitými refugii, kde druhy přežily poslední glaciál a kolonizovaly severní části s příchodem postglaciálního oteplování (Brunsfield a spol., 2001) (**Obr. 1**). O rekolonizaci Evropy se nejvíce přičinilo balkánské refugium, poté iberské a nejméně italské. Pravděpodobně je to dáno pohořími, které sloužily jako bariéry při postglaciální kolonizaci a byly jimi Alpy a Pyreneje (Hewitt, 2011). V regionech, které působily jako glaciální refugia, je u mnoha druhů, v současné době, značná genetická rozmanitost. Tento jev je dosti patrný na Iberském poloostrově, kde byl popsán jako „refugium v refugiu“, neboť kombinuje klimatické, genetické a geologické známky, které ukazují na to, že jednotlivé linie přežily, v pohořím oddělených částech poloostrova, několik dob ledových (Hewitt, 2010).

Například ježek východní (*Erinaceus concolor*) z Balkánu se odštěpil přibližně před 4 miliony lety od ježka západního (*Erinaceus europaeus*) žijícího na Iberském poloostrově a Itálii (Seddon a spol., 2001). Dalšími druhy, s takovou pliocenní divergencí jsou kuňka rodu *Bombina* (Hofman a spol., 2007), čolek rodu *Triturus* (Babik a spol., 2005) a užovka rodu *Natrix* (Joger a spol., 2007).



Obr. 1: Možné trasy postglaciální kolonizace Evropy z refugií odvozené z genetických, klimatických a fosilních záznamů z postglaciálu získaných ze čtyř vzorových druhů - saranče obecná (*Chorthippus parallelus*), ježek západní/východní (*Erinaceus europaeus/concolor*), medvěd hnědý (*Ursus arctos*), jelec tloušť (*Leuciscus cephalus*). HZ představují hybridní zóny mezi odlišnými genomy a CZ zóny kontaktní mezi taxonomickými druhy. Převzato z Hewitt (2011).

Mnoho dalších, blíže příbuzných, druhů jednoho rodu se značně liší lokalitami refugií v Pleistocénu a vznik jednotlivých druhů může být datován různě hluboko do minulosti. Například druhy saranče obecná (*Chorthippus parallelus*) a medvěd hnědý (*Ursus arctos*) vznikly pouze před jednou či dvěma dobami ledovými (Hewitt, 2010).

Dlouho se myslelo, že evropské druhy přežily poslední glaciál pouze na jihu v blízkosti Středozemního moře (Iberský poloostrov, Itálie, Balkánský poloostrov a Kavkaz), kde bylo příznivější klima (Mayr, 1963). Nyní se ovšem ukazuje, podle studie fylogeografie mitochondriální DNA drobných savců, že dalšími možnými refugii byly oblasti centrální a východní Evropy (Jaarola a Searle, 2002).

V postglaciálním období se výrazně oteplilo a některé populace mohly expandovat a kolonizovat část severní Evropy. Jiné s nástupem ochlazení v glaciálu mohly naopak vyhynout. Při rozšiřování z refugií se často střetly odlišné genetické linie a v tomto místě se mohly vytvořit hybridní zóny. Poloha hybridních zón je poměrně stabilní a je udržována tokem genů dovnitř zóny z obou mateřských populací a sníženou fitness hybridních jedinců (Hewitt, 1988).

Fylogeografické otázky můžeme řešit i s pomocí srovnávání fylogeneze taxonů ve spojitosti s ekologickým faktorem, jako je parazitismus. Ukázalo se, že míra fylogenetické shody se zvyšuje s obligátním charakterem vztahu hostitel - parazit. To může být demonstrováno na hlodavcích a jejich ektoparazitech (Hafner a spol., 2003). Proto na vnitrodruhové úrovni lze předpokládat, že se fylogeografické vzory mezi parazitem a hostitelem shodují za předpokladu, že parazit je specifický a obligátní (Price, 1980). Například studie na myšici druhu *Apodemus sylvaticus* a jejím parazitovi *Heligmosomoides polygyrus* ukázala, že parazit i hostitel mají stejnou fylogeografickou historii a jejich kontinentální evropské populace jsou rozdělené do tří hlavních geograficky a geneticky odlišných linií, které odpovídají glaciálním refugiím na Iberském poloostrově a v Itálii. Jejich izolace během glaciálu byla navíc posílena pohořím Alp, které tvořily bariéru mezi populacemi a pravděpodobně tak působí dodnes. Dalším glaciálním refugiem byl Balkán. Zde ovšem tvoří myšice stejnou genetickou linii s myšicemi z Itálie, kdežto jejich parazité jsou vzájemně odlišní a tvoří geneticky oddělenou italskou a balkánskou linii. Ovšem oba rody mají nízkou genetickou variabilitu, což mohlo být způsobeno bottleneckem během poslední doby ledové. Bottleneck zřejmě vážně postihl populace hostitelů a parazitů na Balkáně a umožnil balkánské populaci parazitů se rychle odlišit od populace italské díky nashromáždění mutací kvůli nízké efektivní velikosti populace. Zbytek balkánských populací myšic *Apodemus sylvaticus* se mohl také diferenciovat od linie italské, leč pomaleji, ale byl nahrazen později, během expanze na konci doby ledové, po přesunu balkánské populace parazitů. Právě tento scénář by mohl vysvětlit nízkou míru diverzity balkánské populace parazitů druhu *Heligmosomoides polygyrus* (Nieberding a spol., 2004). V důsledku mohl evoluční tlak, působící na genetickou strukturu parazita, mít vliv i na hostitele. Částečná kodiferenciace parazita *Heligmosomoides polygyrus* a hostitele *Apodemus sylvaticus* může být vysvětlena vysokou hostitelskou specifitou, přímým vývojovým cyklem, krátkým životním cyklem larvy parazita a omezenou schopností parazita šířit sama sebe. Proto je tok genů parazita plně závislý na pohybu a kontaktu mezi jednotlivými hostiteli. Prevalence nematoda v myšici *Apodemus sylvaticus* je maximálně 50% a tím je redukováno

nebezpečí, že by byla myšice svým parazitem vyhubena a ztratila tak svého „převozce“ (Nieberding a spol., 2004).

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

Populační struktura vši druhu *Polyplax serrata* parazitujících myšice rodu *Apodemus* je mnohem složitější, než se původně očekávalo, na základě všeobecných koevolučních principů. Přestože genealogické vztahy mezi haplotypy vši jsou ovlivněny hostitelskou fylogenezí, tak neodrážejí evoluci hostitele jednoduchým předvídatelným způsobem (Štefka a Hypša, 2008). Tři geneticky rozdílné větve se liší jak v geografickém rozšíření, tak mírou hostitelské specifity v sympatrických populacích. Rozdělení do tří odlišných větví nemusí nutně znamenat existenci tří samostatných druhů. Studie byla provedena na jednom úseku mitochondriálního genu DNA, který se dědí pouze po mateřské linii a může zachycovat informace z dávné historie. Při studii byla objevena větev, vyskytující se pouze na myšici druhu *Apodemus flavicollis*, která byla v kontrastu s větví, jejíž hostiteli byly myšice druhu *Apodemus flavicollis* i *Apodemus sylvaticus*. Poslední linie parazitovala na dalších dvou druzích myšic (*Apodemus agrarius* a *Apodemus uralensis*). Jelikož byly myšice z prvních dvou jmenovaných linií nachytány v několika případech na stejných lokalitách a nikdy nedošlo k promíchání mitochondriálních linií mezi různými hostiteli, tak genetická bariéra mezi větvemi parazita není způsobena fyzickou izolací a lze tak předpokládat, že jednotlivé větve představují kryptické druhy, které vznikly pomocí adaptivní složky evoluce.

Nejpravděpodobnější vysvětlení současné existence dvou linií s odlišnou mírou specifity poskytují dva scénáře. 1) Původně se na území Evropy vyskytovaly dvě hostitelsky specifické linie *P. serrata*. Jedna linie vši byla spojena s myšicí *Apodemus flavicollis* a druhá s *Apodemus sylvaticus*, jejíž vši následně přeskočily na *Apodemus flavicollis* a rozšířily tak své hostitelské spektrum. 2) *Apodemus flavicollis* i *A. sylvaticus* jsou původním hostitelem linie s širší specifitou a druhá, hostitelsky specifická linie se diferencovala až později v jednom z glaciálních refugií specifickém pro *A. flavicollis*. Pokud topologie stromu poskytuje několik alternativních vysvětlení vzniku odlišných linií parazita, jak tomu bylo v případě *P. serrata*, může pomoci datování událostí speciace (Hypša, 2006). K rozdílu mezi větvemi došlo kolem 1,5 milionu let (Štefka a Hypša, 2008), tedy výrazně později, než nakolik byla datována speciace hostitelů (4 mil. let) (Michaux a spol., 2005). Datování speciálních událostí tedy lépe odpovídala hypotéza 2). Studie vši *P. serrata* tak velmi dobře dokumentuje význam glaciální historie pro speciaci parazitů palearktické fauny.

Vši rodu *Hoplopleura* parazitující na hlodavcích rodu *Microtus* a nornících rodu *Myodes* jsou si morfologicky blíže příbuzné. Z tohoto důvodu byly vši parazitující na hraboších druhu *Microtus agrestis* a *Microtus arvalis* považovány za stejný druh, jako vši parazitující na nornících druhu *Myodes glareolus*. V roce 1966 byly vši parazitující na nornících popsány jako samostatný druh *Hoplopleura edentula*. Do té doby byly považovány za podlinii vši druhu *Hoplopleura acanthopus*. *Hoplopleura edentula* je boreo - alpínský druh, který je dominantní u norníků a vyskytuje se ve vyšších nadmořských výškách. V nižších nadmořských výškách je vzácnější a je zde nahrazen vešmi druhu *Hoplopleura acanthopus* (Kohn a Štěřba, 1987). V práci Terezy Marvanové (Marvanová, 2011), která studovala diverzitu populací pomocí sekvencí mitochondriální DNA, se vši rodu *Hoplopleura* (parazitující tři výše zmíněné hostitele) rozštěpily do 5 fylogeneticky rozlišených linií (linie 1, 2, 3, 4, 5). Linie 1 zahrnovala vši druhu *Hoplopleura edentula*, které byly nalezeny na *Myodes glareolus*, ze dvou lokalit (Českomoravská vrchovina a Slánské Vrchy- SR). Linie 2 zahrnovala vši z jediné lokality - Litvínov a byla hostitelsky specifická pro hraboše rodu *Microtus*. Linie 3 obsahovala vši z *Microtus agrestis* i *Microtus arvalis* ze severozápadu a západu Čech. Linie 4 byla rozšířena po celém území České republiky a zahrnovala i několik vzorků ze Slovenska. Linie byla hostitelsky specifická pro hraboše rodu *Microtus*. A poslední linie 5 obsahovala pouze vzorky z východního Slovenska z hostitelů *Microtus arvalis* a *Myodes glareolus*.

1.3. Glaciální refugia a současné rozšíření hlodavců druhu *Microtus agrestis*, *Microtus arvalis* a *Myodes glareolus*

Microtus agrestis se vyskytuje od Velké Británie až po střední Sibiř. V Evropě se jižní hranice rozšíření táhne horskými oblastmi jižní Evropy, na severu sahá až na pobřeží Severního ledového oceánu. Vyhledává podmáčené (nekosené) louky, rašeliniště a jiné mokřady. V horách hojně osidluje holiny, okrajově obývá kamenné sutě (Anděra a Horáček, 2005). *Microtus agrestis* je rozdělen, podle výsledků prací provedených na mitochondriální DNA, do tří hlavních fylogeografických skupin na západní, východní a jižní linii, s rozsáhlým alopatrickým rozšířením. Západní fylogeografická skupina se nachází v západní a centrální Evropě a rozšířila se pravděpodobně z glaciálního refugia v Karpatech. Východní skupina pokrývá rozsáhlé území od Litvy po centrální Asii s pravděpodobným původem v jihovýchodní Evropě (jižní Ural či Kavkaz). Jižní skupina zabírá místo od Portugalska

po Maďarsko s glaciálním refugiem na Iberském poloostrově (Jaarola a Searle, 2002). Tato jižní linie je dále rozdělena na dvě sublinie (Jaarola a Searle, 2004). Molekulární hodiny naznačují, že západní a východní populace *M. agrestis* se oddělily během posledního glaciálu, kdežto jižní populace se datuje do období před 0,5 - 0,9 milionů let (Jaarola a Searle, 2002).

Hraboš polní *Microtus arvalis* osidluje otevřené travnaté oblasti, suchá stanoviště i kulturní stepi a objevuje se také v Alpách v nadmořské výšce až 2000 metrů. V dobách přemnožení proniká i do prosvětlených lesů (Anděra a Horáček, 2005). Je rozšířen od pobřeží Atlantiku ve Francii po centrální Rusko i izolovanými populacemi na Iberském poloostrově. Evoluční historie a současná geografická distribuce *M. arvalis* jsou silně ovlivněny posledním glaciálním maximem a vysokými evropskými horskými pohořími. Fosilní pozůstatky potvrdily přítomnost hraboše v Evropě i před posledním glaciálním maximem (Chaline a spol., 1999) a dnes je vysoce rozšířený po celé Evropě. Hraboš polní vykazuje na základě molekulárních studií dělení do čtyř hlavních evolučních linií- západní, centrální, východní a Itálii (Heckel a spol., 2005). K rozdělení těchto evolučních linií došlo v rozdílných časových obdobích, což naznačuje složitější glaciální historii, než pouze klasické rozšíření populací z refugií na Iberii, Itálii a Balkáně. Genetické a ekologické důkazy ukazují na dodatečnou kolonizaci centrální Evropy populacemi, které přežily období glaciálu v alpském refugiu (Heckel a spol., 2005). Italská linie se mohla rozšířit na jejich území nejprve z glaciálního refugia na jihu Alp, obcházením nejvyšších horských pohoří z východu či západu. Přestože jsou horská pohoří, podobně jako u ostatních hlodavců, považována za bariéry v procesu kolonizace, fylogeografické analýzy hraboše polního překvapivě ukázaly také čtyři transalpínské kolonizační události (Braaker a Heckel, 2009). Kolébka linií hraboše polního se nalézá na západě centrální Evropy, odkud se rozšířil dále po posledním glaciálním maximu. Balkánská fyloskupina se rozléhá od centrální a východní Bosny a Hercegoviny, Černé hory a východního Srbska. Východní linie sahá od severu a západu Slovenska, přes Bosnu a Hercegovinu a Srbsko. Obě linie jsou sympatrické na jednom území v Bosně a Hercegovině (Bužan a spol., 2010).

Norník rudý (*Myodes glareolus*) je drobný hlodavec, který je v Evropě široce rozšířený od Britských ostrovů a severu Španělska po centrální Sibiř. Obývá především lesnatá území, jako jsou temperátní borovicové lesy nebo lesy smíšené (Anděra a Horáček, 2005).

Norník přečkal poslední glaciál (25 tis. - 10 tis. let) kromě hlavních refugií, kterými jsou Iberský poloostrov, Itálie a Balkán, také v blízkosti Karpat. Pro západní skupinu norníků sloužila jako refugium centrální Evropa (Rakousko, Maďarsko, Slovensko a Rumunsko). Jako možné refugium pro rekolonizaci Skandinávského poloostrova je považován Ural (Deffontaine a spol., 2005). Genetický tok ukazuje na přispívání karpatské populace ke kolonizaci Evropy po Pleistocénu.

2. Cíle práce

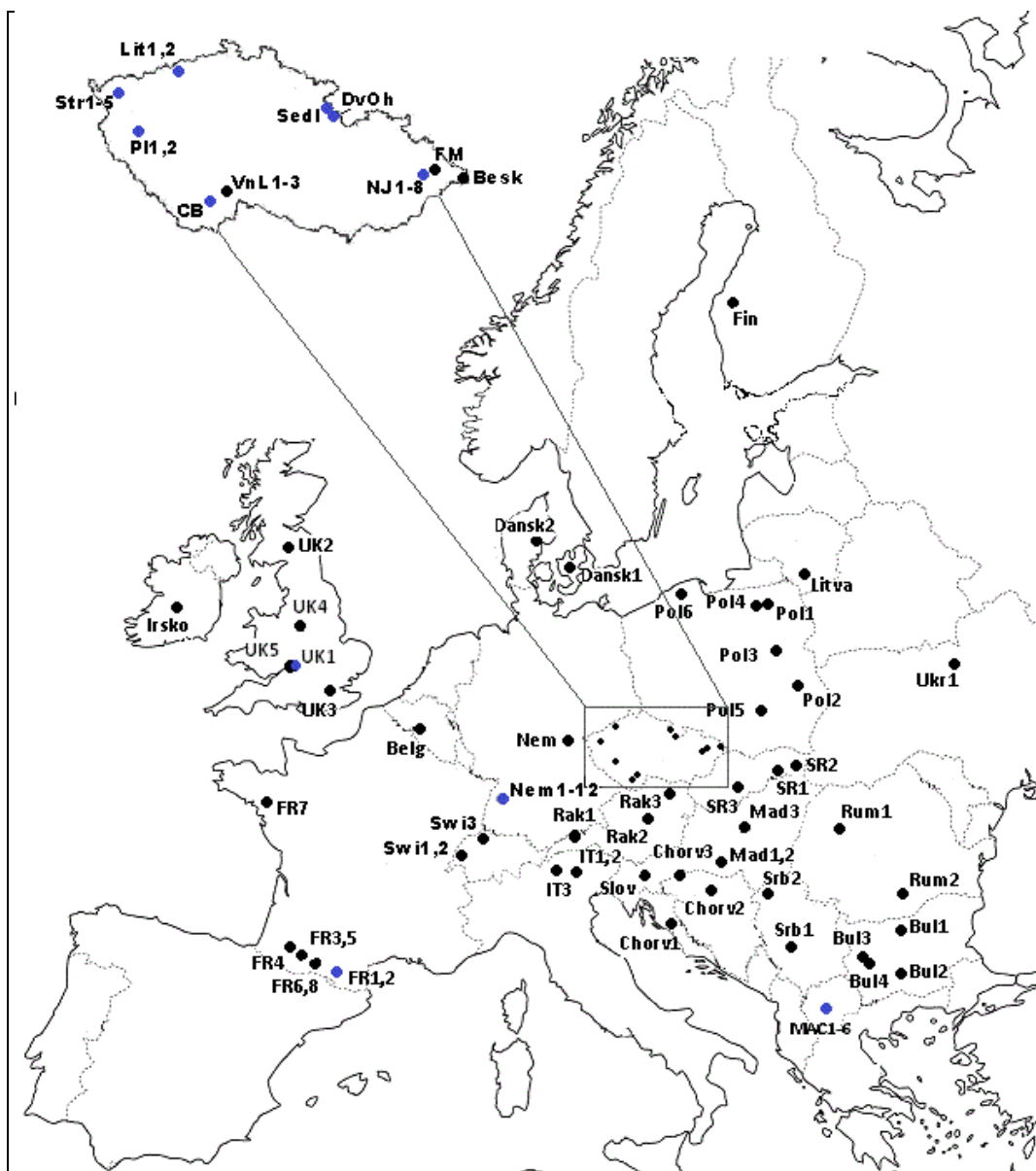
- 1) Rozšířit stávající set mitochondriálních sekvencí vší rodu *Hoplopleura* a jejich hostitelů, tří druhů hrabošovitých hlodavců (*Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Microtus agrestis*).
- 2) Rekonstruovat fylogeografické paterny populací hostitelů v jejich evropském areálu.
- 3) Obdržené výsledky porovnat s genetickou strukturou ektoparazitů na území střední Evropy.
- 4) Zjistit na jakých lokalitách je potřeba uskutečnit další sběry parazitů a hostitelů pro komplexní evoluční analýzu.

3. Materiál a metodika

3.1. Odchyt hlodavců, jejich ektoparazitů a odběr biologických vzorků

Sběry drobných hlodavců byly prováděny v letech 2007 - 2011 na území České republiky, Slovenska, Německa, Francie, Anglie a Makedonie. Hlodavci byli odchytáváni do dřevěných sklapovacích pastí a následně jim byly odebrány vzorky tkáně (prsty nebo špička ocasu), které byly poté uloženy do 96% ethanolu. Odchycená zvířata byla vyšetřena na přítomnost ektoparazitů (především vší a roztočů), kteří byli opět uchováni v 96% ethanolu. Všechny vzorky byly skladovány ve 4°C.

Hraboši druhu *Microtus arvalis* a *Microtus agrestis* a norníci *Myodes glareolus*, jejichž vzorky jsem zpracovala v této bakalářské práci, pocházeli z oblastí vyznačených na mapách (**Obr. 2**, **Obr. 3** a **Obr. 4**). Celkem bylo odchyceno a mnou osekvenováno 52 jedinců, z toho bylo 41 norníků druhu *Myodes glareolus*, 10 hrabošů druhu *Microtus arvalis* a 1 hraboš druhu *Microtus agrestis*, sekvence zbylých jedinců byly převzaty z genové banky. Popis jednotlivých lokalit vyšetřených zvířat je uveden v tabulkách **Tab. I** a **Tab. II** a jejich přesná lokalizace je zobrazena na mapách **Obr. 2** a **Obr. 3**. Dále jsem navázala na magisterskou práci Terezy Marvanové týkající se populační struktury a genealogie vší rodu *Hoplopleura* (Marvanová, 2001) a doplnila ji o nové vzorky vší z lokalit uvedených na **Obr. 4** a v **Tab. III**.



Obr. 2: Mapa lokalit odchycených norníků druhu *Myodes glareolus*, jejichž sekvence byly vybrány z genové banky (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>). Modře jsou označeny lokality, z nichž jsem získala sekvence cytochromu b a černě lokality sekvencí získaných z genové banky (názvy lokalit jsou uvedené v **Tab. I**).

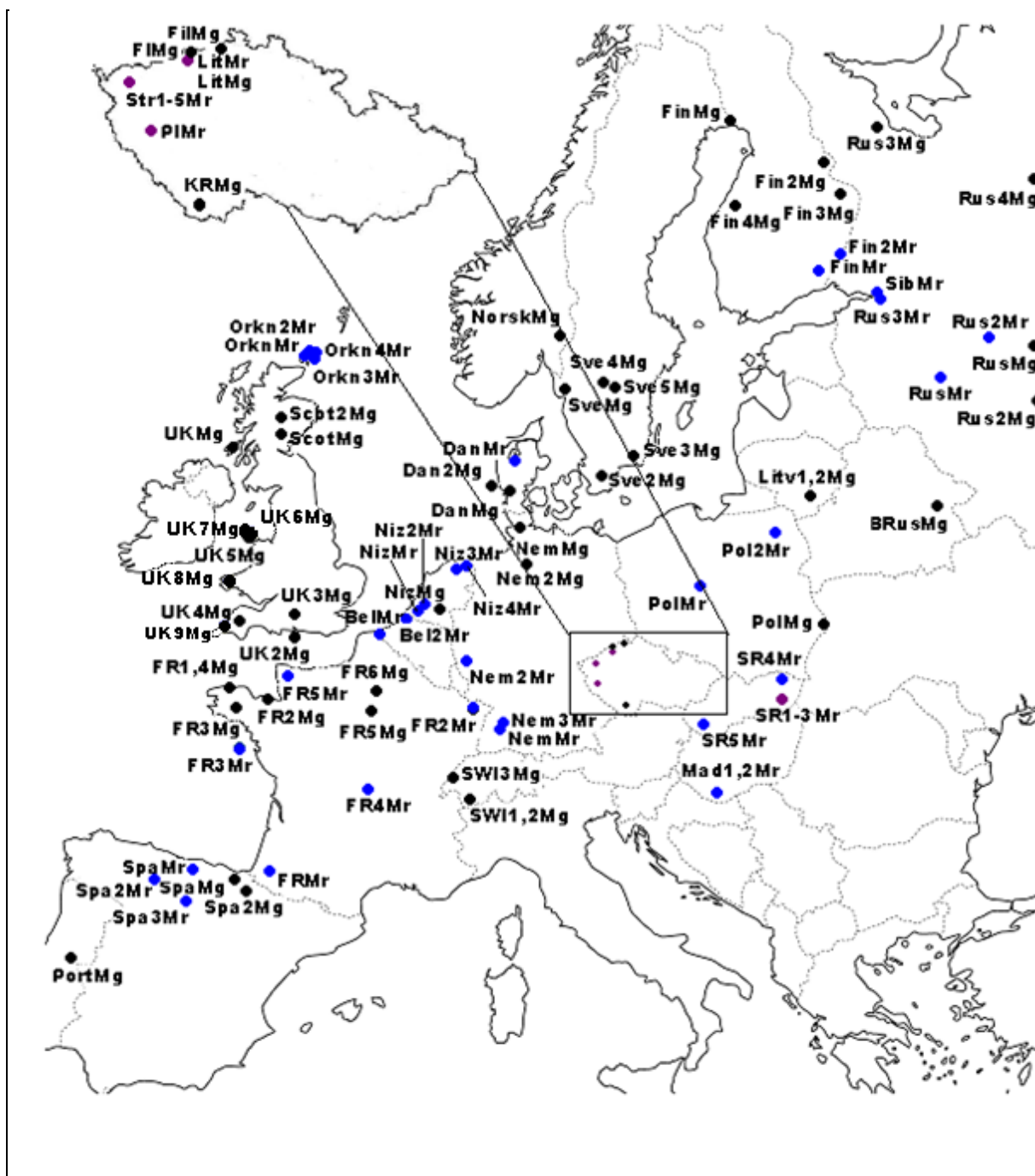
Tab. I: Přehled lokalit, na kterých byli odchyceni norníci druhu *Myodes glareolus*. Barevně jsou vyznačeny lokality, odkud pocházejí tkáňové vzorky norníků, ze kterých jsem získala sekvence cytochromu b a černou barvou jsou vyznačeny lokality norníků, jejichž sekvence jsem získala z genové banky (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>).

označení	lokalita	ze mě
Bul1	Balkan Mountains	Bulharsko
Bul2	Rhodopi Mountains	Bulharsko
Bul3	Vitosha Mountains	Bulharsko
Bul4	Rila Mountains	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
SLOV	Dol pri Ljubljani	Slovinsko
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
Nem	Kubelhof	Německo
UK	Stroud	Velká Británie
UK2	Kielder	Velká Británie
UK3	Surrey, Castle Green	Velká Británie
UK4	Wilshire, Corsham	Velká Británie
UK5	Derbyshire, Ambe gate	Velká Británie

UK6	Wilshire, Corsham	Velká Británie
Irsko	Portumna	Irsko
IT1	Trentino	Itálie
IT2	Trentino	Itálie
IT3	Trento	Itálie
Po11	Strzalowo	Polsko
Po12	Lublin	Polsko
Po13	Urwitalt	Polsko
Po14	Białowieża	Polsko
Po15	Polichno	Polsko
Po16	Kobylnica	Polsko
MAD1	Nagycsany	Maďarsko
MAD2	Nagycsany	Maďarsko
MAD3	Ocsa	Maďarsko
SR1	Rozhanovce	Slovensko
SR2	Remetské Hámre	Slovensko
SR3	Domaníky	Slovensko
Chorv1	Gracac	Chorvatsko
Chorv2	Nova Gradiška	Chorvatsko
Chorv3	Jastrebarsko	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
Dansk1	Sjaelland	Dánsko
Dansk2	Arhus	Dánsko
MAC1	Kruševo	Makedonie

MAC2	Kruševo	Makedonie
MAC3	Kruševo	Makedonie
MAC4	Kruševo	Makedonie
MAC5	Kruševo	Makedonie
MAC6	Kruševo	Makedonie
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
Besk	Beskydy	Česká republika
Pl1	Plzeň	Česká republika
Pl2	Plzeň	Česká republika
DvOh	Deštné v Orlických horách	Česká republika
Sed1	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
VnL	Veselí nad Lužnicí	Česká republika
FM	Frydek- Místek	Česká republika



Obr. 3: Mapa lokalit odchycených hrabošů *Microtus arvalis* (označeny modře) a *Microtus agrestis* (označeny černě), jejichž sekvence byly vybrány z genové banky (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>). Fialově jsou označeni hraboši, ze kterých jsem získala sekvence cytochromu b (názvy lokalit jsou uvedeny v **Tab. II**).

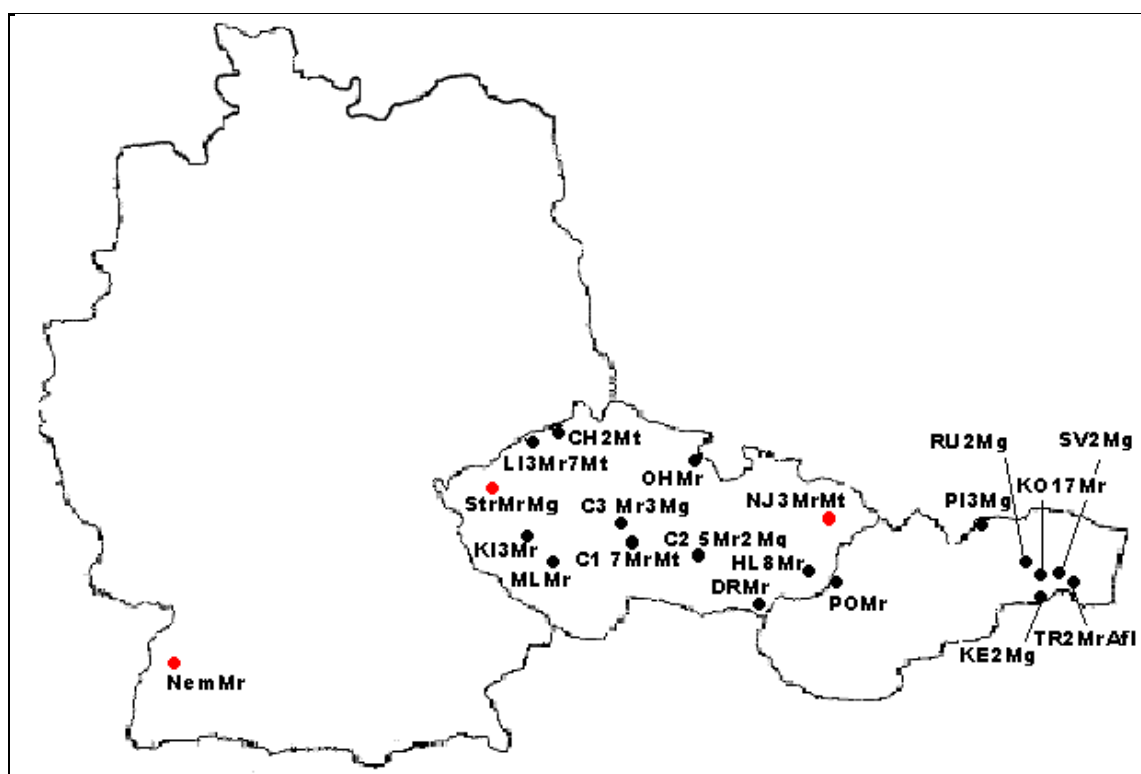
Tab. II: Přehled lokalit, na kterých byli odchyceni hraboši druhu *Microtus agrestis* (Mag) a *Microtus arvalis* (Mar). Barevně jsou vyznačeny lokality, odkud pocházejí tkáňové vzorky hrabošů, ze kterých jsem získala sekvence cytochromu b a černou barvou jsou vyznačeny lokality hrabošů, jejichž sekvence jsem získala z genové banky (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>).

označení	lokality	ze země
FRMar	Armendarits	Francie
FR2Mar	Otterswiller	Francie
FR3Mar	Ile d'Yeu	Francie
FR4Mar	Clermont- Ferrand	Francie
FR5Mar	St. Maridu Mont, Normandie	Francie
NemMar	Wolfach	Německo
Nem2Mar	Wolfach	Německo
Nem3Mar	Alflen	Německo
Nem4Mar	Schiltach	Německo
BelMar	Veurne	Belgie
Bel2Mar	Stalhille	Belgie
NizMar	Oostburg	Nizozemí
Niz2Mar	Dintelord	Nizozemí
Niz3Mar	Wonseradeel	Nizozemí
Niz4Mar	Lauwersoog	Nizozemí
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
DanMar	Hjere Hede	Dánsko
GruzMar	Ninotsminda	Gruzie
ArmenMar	Sisian	Arménie
Pol1 Mar	Wilcza Gora	Polsko

Pol2Mar	Polkowo	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
PIMar	Plzeň	Česká republika
Str1Mar	Stružná	Česká republika
Str2Mar	Stružná	Česká republika
Str3Mar	Stružná	Česká republika
Str4Mar	Stružná	Česká republika
Str5Mar	Stružná	Česká republika
Lit6Mar	Litvínov	Česká republika
LitMag	Litvínov	Česká republika
FIMag	Filipov, Česká kamenice	Česká republika
FIMag	Fláje	Česká republika
KRMag	Kladenské Rovné	Česká republika
FR1Mag	Bretagne, Trebeurden	Francie
FR2Mag	Bretagne, St. Malo	Francie
FR3Mag	Bretagne, Gaurin	Francie
Fr4Mag	Bretagne, Trebeurden	Francie
FR5Mag	Conches sur Gondoire	Francie
FR6Mag	Picardie, Abbeville	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
ScotMag	Gask, Perth	Velká Británie
Scot2Mag	Leet Moss, Grampian	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
Litva	Vilnius	Litva
Litv2Mag	Vilnius	Litva
NizMag	Heteren	Nizozemí
FinMag	Tornio	Finsko
Fin2Mag	Kuhmo	Finsko
Fin3Mag	Lieksa	Finsko
Fin4Mag	Lapua	Finsko
RusMag	Penza region	Rusko
Rus2Mag	Chernogolovka, Moscow region	Rusko
Rus3Mag	Pertozero, Karelia	Rusko
Rus4Mag	Velsk	Rusko
SpaMag	Azpeitia, Gipuzkoa	Španělsko
Spa2Mag	Eugui, Navarra	Španělsko
PortMag	Serra da Estrela	Portugalsko
NorskMag	Varaldskogen	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



Afl... *Apodemus flavicollis*

Mg... *Myodes glareolus*

Mr... *Microtus arvalis*

Mt... *Microtus agrestis*

Obr. 4: Mapa lokalit odchyťů hrabošů, norníků a myšic, u kterých byly nalezeny vši rodu *Hoplopleura*. Červeně jsou vyznačeny lokality, ze kterých jsem zpracovala vši, černě jsou vyznačeny vši dříve zpracované Terezou Marvanovou (názvy lokalit jsou uvedené v **Tab. III**).

Tab. III: Prevalence vší rodu *Hoplopleura* na jednotlivých hostitelích a lokalitách (počet hlodavců, u kterých byly nalezeny vší/počet odchylených hlodavců určitého druhu na lokalitě). Barevně jsou zobrazeny lokality nově zpracovaných vzorků.

Označení	Lokalita	Prevalence vší na daném hostiteli			
		<i>M. arvalis</i>	<i>M. agrestis</i>	<i>M. glareolus</i>	<i>A. flavicollis</i>
C2	Českomoravská vrchovina, lokalita 2, ČR	5/15		2/4	
C3	Českomoravská vrchovina, lokalita 3, ČR	1/8		3/3	
KO	Košice, SR	17/42			
PO	Pováží, SR	1/3			
DR	Drholec, ČR	1/5			
HL	Horní Lapač, ČR	8/22			
TR	Trebišov, SR	2/12			1/10
LI	Litvínov, ČR	3/18	7/12		
ML	Milevsko, ČR	1/5			
CH	Chlumecko, ČR		2/6		
KL	Klabava, ČR	3/5			
OH	Deštné v Orlických horách, ČR	1/1			
SV	Slánské Vrchy, SR			2/3	
KE	Kechnec, SR			2/2	
PI	Pieniny, SR			3/3	
RU	Ružín, SR			2/3	
Nem	Baiersbronn, Něm	2/3		3/5	
Str	Stružná, ČR	4/26		1/14	
NJ	Nový Jičín, ČR	3/8		2/2	

3.2. DNA extrakce

Tkáňové vzorky hlodavců jsem vyjmula z ethanolu a přes noc nechala vysušit při pokojové teplotě. Vší jsem nejprve pod binolupou rozřízla skalpelem mezi thoraxem a abdomenem a také ponechala přes noc k vysušení. Genomovou DNA jsem extrahovala pomocí izolačního kitu QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) v případě vší a DNeasy Tissue Kit (Qiagen) v případě hlodavců. Extrakce DNA jsem provedla podle návodu výrobce.

3.3. PCR reakce, gelová elektroforéza a sekvenace

Pro rekonstrukci fylogeneze hrabošů *Microtus arvalis* a *Microtus agrestis* a norníků *Myodes glareolus* na populační úrovni jsem vybrala úsek mitochondriálního genu pro cytochrom b oxidázu (CYB) dlouhý 1020 bp pro norníky a 1143 bp pro hraboše. U hrabošů jsem uvedený úsek získala pomocí 3 dvojic primerů L14727-SP, H15348A-SP a H15915-SP (Jaarola a Searle, 2002), L15162Marv a L15408Marv (Haynes a spol., 2003) a H15497-SP (Jaarola a spol., 2004). U norníků jsem k získání fragmentu mitochondriálního genu použila primery Mgl_cytb_F a Mgl_cytb_R (Kotlík a spol., 2006).

U vši rodu *Hoplopleura* jsem získala fragment mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu podjednotku I (COI) dlouhý 575 bp. Pro PCR reakci jsem použila dvojici primerů LCO 1940 a HCO 2198 (Hafner a spol., 1994).

Všechny PCR reakce jsem namíchala do celkového objemu 20 μ l a obsahovaly následující složky: 25 mM $MgCl_2$ (2 μ l), 0,1 mM forward a reverse primerů (1 μ l), 10 mM nukleotidů (0,4 μ l), 10x Taq Buffer (2 μ l), extrahovanou DNA (1 μ l), ddH₂O (12,4 μ l) a 5U/ μ l Tag DNA polymerázy (0,2 μ l) (TopBio) v případě hrabošů a norníků, v případě vši jsem použila 5U/ μ l polymerázu High Fidelity PCR Enzyme Mix (0,2 μ l) (Fermentas).

PCR reakce u *Microtus arvalis* a *Microtus agrestis*:

1. Denaturace	94°C	3 min	
2. Denaturace	94°C	1 min	
3. Annealing	52°C	1 min	
4. Elongace	72°C	2 min	30 cyklů
5. Extenze	72°C	10 min	
6. Chlazení	4°C		

PCR reakce u *Myodes glareolus*:

7. Denaturace	94°C	3 min	
8. Denaturace	94°C	1 min	
9. Annealing	52,5°C	1 min	
10. Elongace	72°C	2 min	30 cyklů
11. Extenze	72°C	10 min	
12. Chlazení	4°C		

PCR reakce u vší rodu *Hoplopleura*:

13. Denaturace	94°C	3 min	
14. Denaturace	94°C	1 min	
15. Annealing	55°C	1 min	
16. Elongace	72°C	2 min	30 cyklů
17. Extenze	72°C	10 min	
18. Chlazení	4°C		

Výsledek PCR reakcí jsem vizualizovala pomocí elektroforézy při napětí 100 V na 1% agarózovém gelu s použitím barviva Sybr Green a 100 bp DNA Ladder (GeneRuler™) nebo 2 - Log DNA Ladder (GeneRuler™). 1% agarózový gel jsem vyrobila smícháním 2 g agarózy (AGAROSE I™) 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.

Úspěšně vizualizované PCR produkty jsem přečistila pomocí enzymů 0,2 µl Exo I (exonuclease I z *E. Coli*) a 0,2 µl CIP (calf intestinal alkaline phosphatase) (New England Biolabs®Inc) a poté poslala na sekvenaci do komerční laboratoře Macrogen (Nizozemí).

3.4. Práce se sekvencemi, alignmenty a fylogenetické analýzy

K zpracování a úpravě sekvencí jsem použila programy Seqman, MegAling (DNASTAR) a Bioedit 7 (Hall, 1999). Identifikace sekvencí a jejich porovnání s publikovanými sekvencemi jsem provedla pomocí programu BLAST, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

K alignování sekvencí jsem v programu BioEdit 7 (Hall, 1999) použila algoritmus Clustal W Multiple Alignment (Thomson a spol., 1994) a následně jsem výsledky sama přezkontrolovala.

Pro fylogenetické analýzy jsem jako outgroup použila sekvence myšice druhu *Apodemus agrarius* a hrabošika *Microtus subterraneus* pro dataset hrabošů, sekvence hrabošů druhu *Microtus agrestis* a *Microtus arvalis* pro dataset norníků a vší druhu *Polyplax serrata* pro dataset vší . Pro rekonstrukci fylogenetických vztahů všech výše uvedených datasetů jsem použila metody maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) a bayesiánskou analýzu (MB).

MP analýzy byly provedeny v programu TNT (Goloboff a spol., 2004) s poměry tranzicí ku transverzím (Ts/Tv) 1/1, TBR algoritmem s 10 replikacemi a náhodným přidáváním sekvencí (random sequence addition). Striktní konsensus jsem získala ze všech MP stromů. Bootstrapová podpora byla spočtena s 1000 replikacemi, byl použit TBR algoritmus s poměrem tranzicí ku transverzím (TS/TV) 1/1.

ML analýzy jsem provedla pomocí programu PhyML (Guindon a Gascuel, 2003) s použitím modelu TPM3uf+I+G u norníků a TIM1+I+G u hrabošů. Modely jsem získala pomocí programu jModelTest 0.1 (Posada a Crandall, 1998) s parametry odhadnutými z dat. ML analýzu u vší jsem provedla v programu PhyML v online verzi (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) s modelem HKY85+I+G, který byl nejbližší získanému modelu v programu jModelTest 0.1 s parametry odhadnutými z dat. Se stejnými modely jsem provedena bootstrapovou analýzu s 1000 replikacemi dat.

Bayesiánská analýza byla provedena v programu MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck a spol., 2001) s 10 miliony generací, počet odstraněných stromů ze začátku analýzy (burnin) u norníků byl 1872, u hrabošů 1500 a 1680 u vší. Opět byly využity modely získané v programu jModelTest 0.1.

Získané fylogenetické stromy jsem vizualizovala v programu TreeView (Page, 1996). Grafickou úpravu stromů jsem provedla v programu Adobe Illustrator Artwork 15.0.

4. Výsledky

4.1. Sekvence a alignmenty

Ze 41 jedinců druhu *Myodes glareolus* jsem získala sekvence cytochromu b oxidázy o délce 1020 bp, z 10 jedinců rodu *Microtus arvalis* sekvence cytochromu b oxidázy o délce 1143 bp, z 1 jedince rodu *Microtus agrestis* sekvenci cytochromu b oxidázy o délce 1143 bp. Z 11 jedinců rodu *Hoplopleura*, kteří rozšířili dostupnou sbírku 64 vzorků zpracovaných Terezou Marvanovou (Marvanová, 2011), jsem získala sekvence genu cytochromu c oxidázy podjednotky I o délce 575 bp. Alignment normíků jsem doplnila o 56 sekvencí *Myodes glareolus* a alignment hrabošů o 36 sekvencí *Microtus arvalis* a 49 sekvencí *Microtus agrestis* z genové banky (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>). Seznam převzatých sekvencí je uveden v Příloze č. 1.

4.2. Fylogenetické analýzy

Výsledkem všech provedených analýz (ML, MP, MB) datasetu vzorků rodu *Microtus* byly 3 monofyletické linie druhů *Microtus agrestis*, *Microtus arvalis* a *Microtus subterraneus* (**Obr. 5**). Jejich vzájemná pozice se ovšem lišila s použitými metodami. Větev *Microtus subterraneus* se u ML a MP odštěpila na bázi, zatímco podle výsledné topologie MB analýzy tvořila linie *Microtus subterraneus* sesterskou linii s *Microtus arvalis* a větev *Microtus agrestis* byla na bázi. Na vnitrodruhové úrovni se větev *Microtus agrestis* dále členila na 2 dobře rozlišené linie (linie 1, 2). Přestože se geografická rozšíření jednotlivých linií z části překrývala, byly patrné značné rozdíly v geografickém rozšíření linií. Linie 1 obsahovala velký počet vzorků z rozsáhlého území celé Evropy. Vnitřní členění ukázalo větší geografickou specifikaci, zatímco linie 2 byla tvořena pouze 5 vzorky ze 3 lokalit Iberijského poloostrova a Švýcarska.

Větev *Microtus arvalis* se členila na 3 oddělené, fylogeneticky stabilní linie (linie 1b, 2b, 3b). Obsahovala linii 1b se vzorky z území západní Evropy, linie 2b se rozláhala na 8 lokalitách od Dánska po střední Evropu až do Finska a Ruska. Vnitřně se dělila na 3 sublinie, z nichž 2 byly geograficky specifické. První se rozláhala na území Nizozemí a Dánska a druhá byla specifická pro Českou republiku, ovšem třetí specifická geograficky

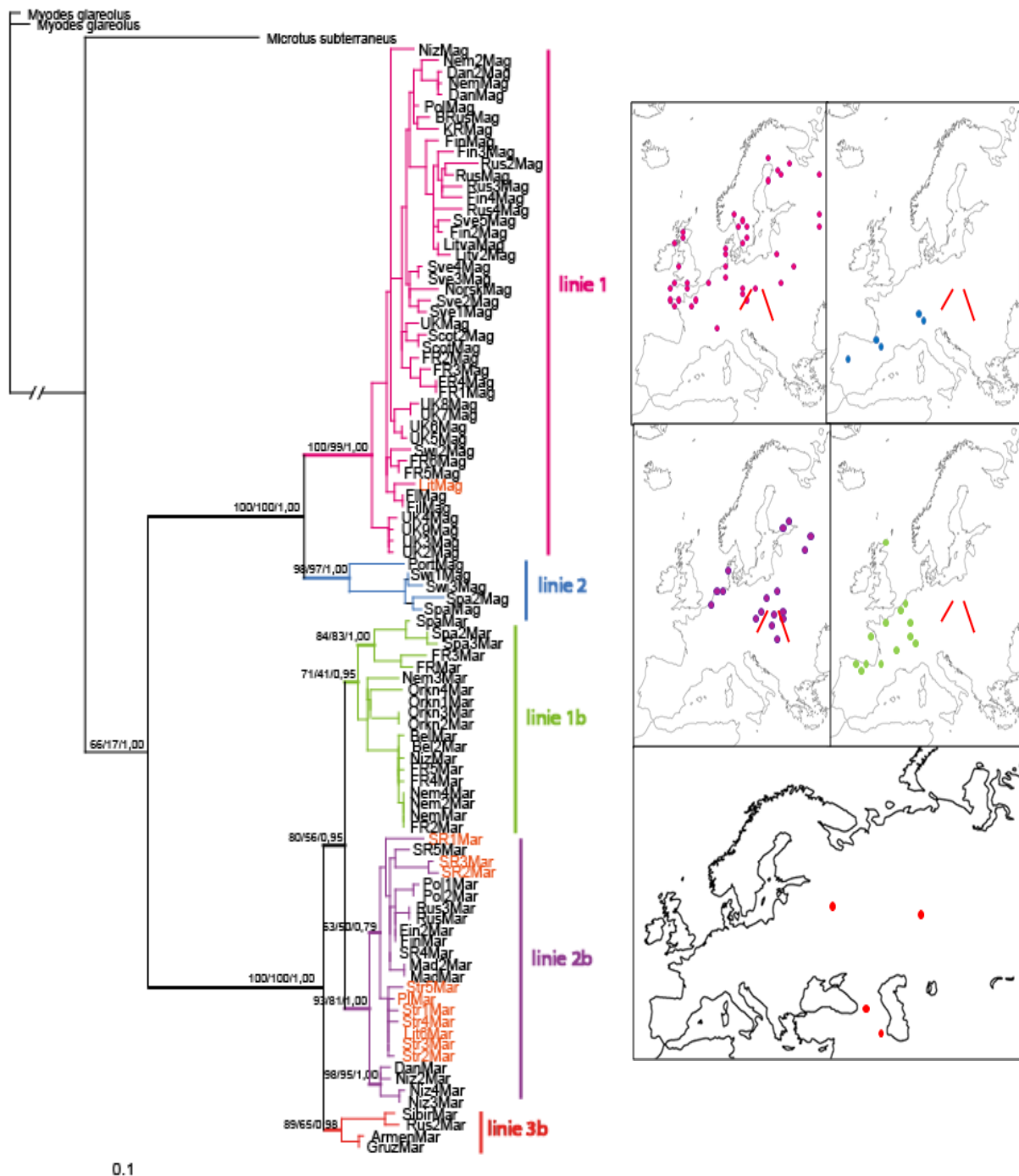
nebyla. Poslední, linie 3b obsahovala 4 vzorky hrabošů z východní Evropy a Asie, lze ji tedy považovat za geograficky specifickou.

Vnitrodruhová fylogeneze druhu *Myodes glareolus* byla shodně u všech analýz (ML, MP, MB) rozdělena do 6 rozlišených linií (linie 1, 2, 3, 4, 5, 6), jejichž vzájemné postavení se neměnilo s použitými metodami (**Obr. 6**), až na linii 5, která se v analýze MB rozpadla na dvě větve podle geografického původu - Makedonie a Francie. Geografické rozšíření jednotlivých linií se ovšem značně lišilo. Linií 1 tvořily vzorky pocházející ze střední Evropy, s linií 2 měla společnou lokalitu nacházející se v jihozápadním Německu. Linie 2 tvořila západní linii a střetávala se s linií 1 v severozápadních Čechách, jinak se rozláhala v západní Evropě a na malém území střední Evropy. Následující linie 3 obklopovala střední Evropu a Velkou Británii a tvořila s linií 1 centrální linii. Linie 4 obsahovala vzorky z Bakánského poloostrova a Francie, obdobně jako linie 5, jejíž vzorky pocházely z Makedonie a Francie. Geografické rozšíření obou linií se překrývalo na území Makedonie. Poslední linie nebyla nijak geograficky specifická, obývala lokality v různých částech Evropy.

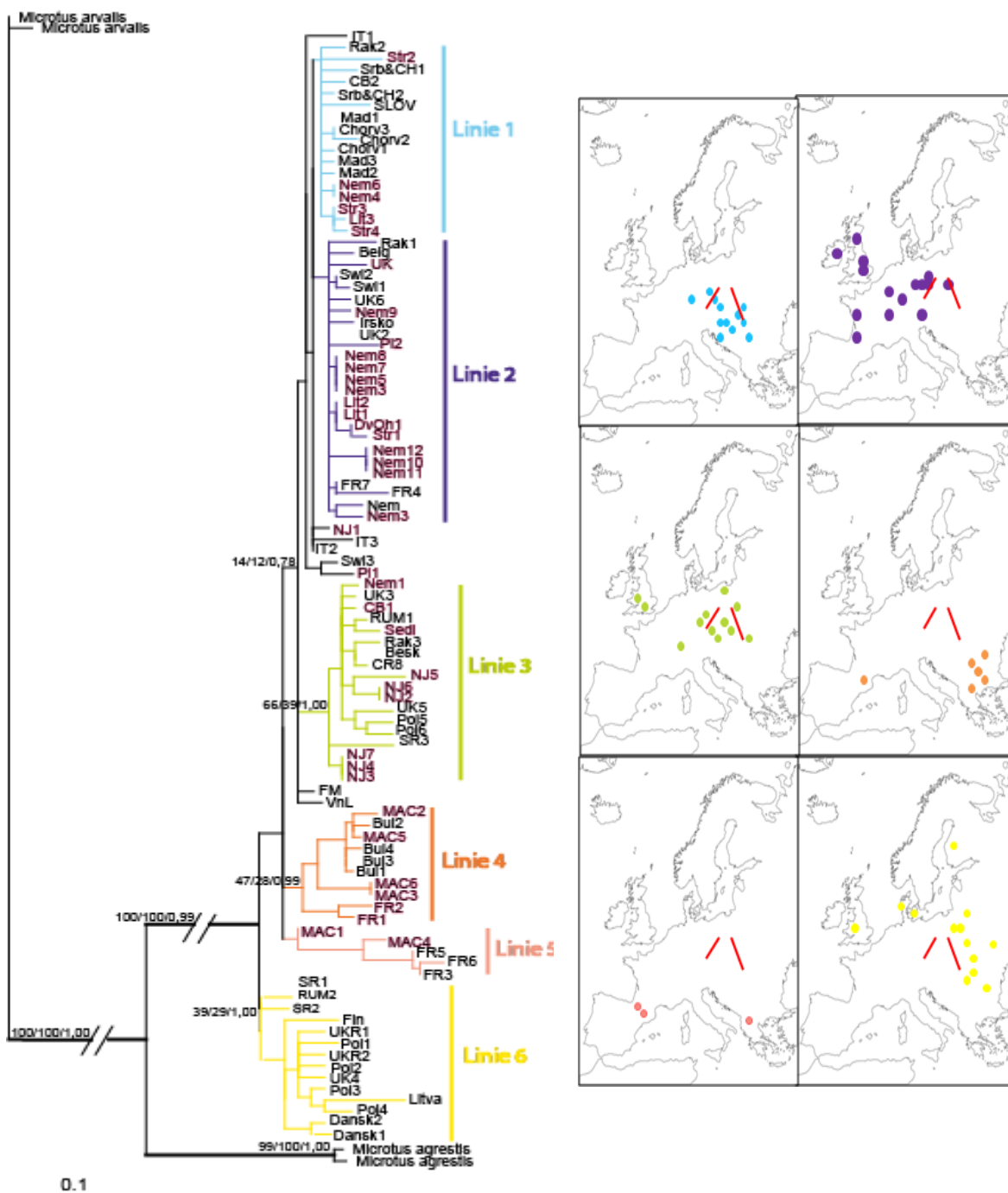
Výsledkem všech analýz (ML, MP, MB) byly 4 rozlišené linie (linie 1, 2, 3, 4) druhu *Hoplopleura acanthopus* a jedna linie (linie 5) druhu *Hoplopleura edentula*, jejichž pozice se s použitými metodami neměnily (**Obr. 7**). Na bázi se odštěpila linie 5 složená z 9 vzorků vši druhu *Hoplopleura edentula*. Linie byla hostitelsky specifická a vyskytovala se na jediném hostiteli *Myodes glareolus*. Pocházela ze 3 lokalit ležících ve středních Čechách, Slovensku a jižním Německu. Na bázi větve *Hoplopleura acanthopus* byla linie 4 složená z 9 vzorků vši druhu parazitujících na hraboších druhu *Microtus agrestis* a *Microtus arvalis*, linii lze tedy považovat za hostitelsky specifickou pro rod *Microtus*. Vzorky pocházely ze západních Čech a jihozápadního Německa, tvořila tedy západní linii vši druhu *Hoplopleura*. Linie 3 obsahovala 6 vzorků vši druhu *Hoplopleura acanthopus* z hrabošů rodu *Microtus* a norníků druhu *Myodes glareolus* ze severozápadních a západních Čech. Linie 2 čítající 25 vzorků nebyla hostitelsky specifická, vši parazitovaly na hlodavcích druhu *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis* a *Apodemus flavicollis*. Naproti tomu byla patrná u této linie geografická specifita, protože všechny vzorky pocházely z východního Slovenska. Poslední, linie 1, obsahovala vzorky vši druhu *Hoplopleura acanthopus* na lokalitách ležících po celé České republice a západního i východních Slovenska. Ve srovnání se sesterskou linií 2 nebyla linie 1 geograficky specifická. Hostiteli vši z této linie byli hraboši rodu *Microtus* (*Microtus arvalis* a *Microtus agrestis*) a norníci druhu *Myodes glareolus*. Geografické rozšíření linií 1 a

2 se překrývalo na území severozápadních, středních a severních Čech a východním Slovensku (**Obr 8 - 9**).

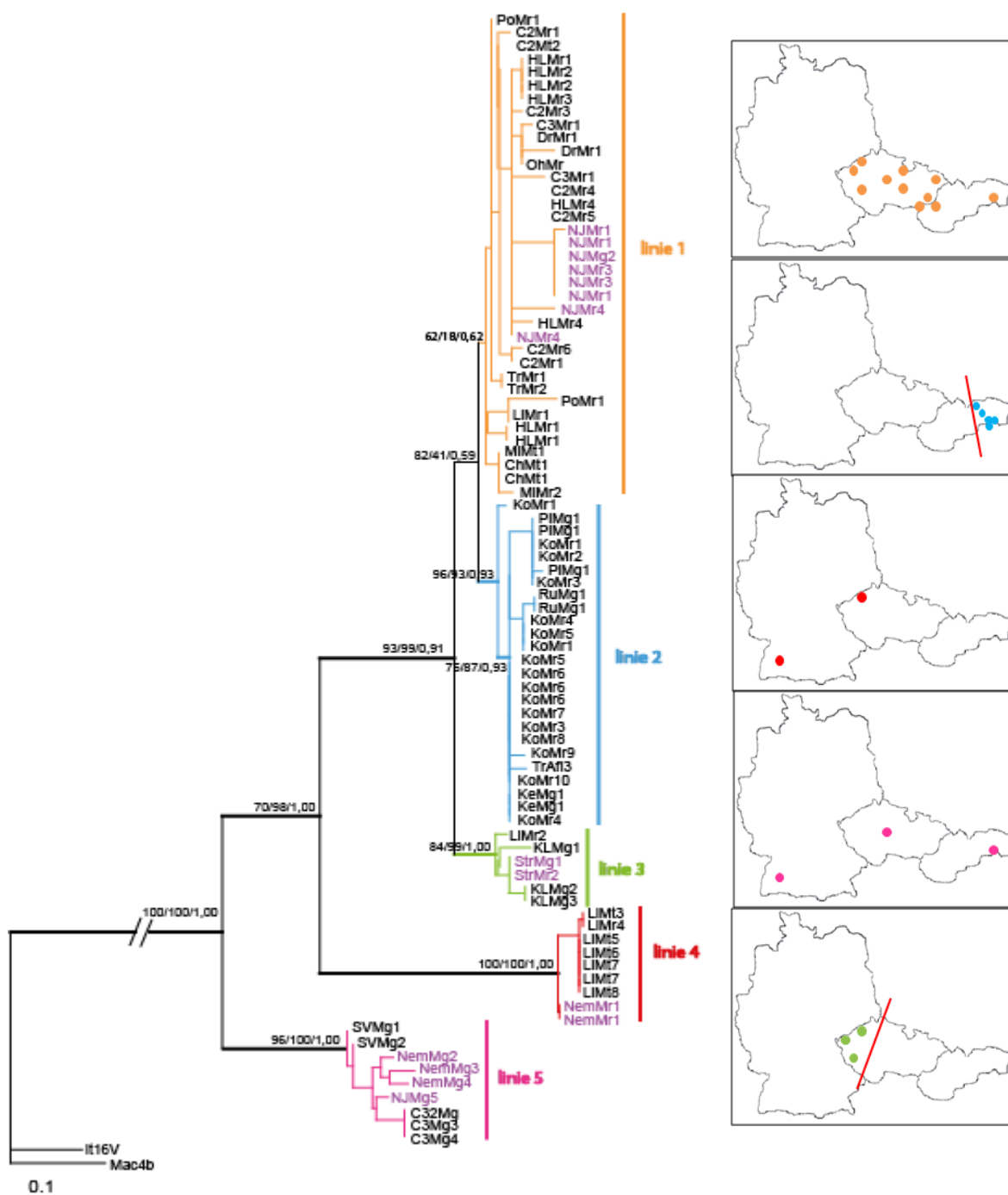
Vynesení geografické distribuce jednotlivých linií hostitelských hlodavců (*Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Microtus agrestis*) do map (**Obr. 10 - 12**) znázornilo, že se v některých případech prolínaly s liniemi vši rodu *Hoplopleura* (**Obr. 8 - 9**). Dobře to bylo viditelné u *Microtus arvalis* v linii 2b, jejíž jedna podlinie se prolínala jak s vešmi z linie západní (linie 2), tak i s linií východní (linie 3), stejně tak linie 1 u *Microtus agrestis*, která obléhala velké území Evropy a tím pádem zahrnovala i obě linie vši. U norníků druhu *Myodes glareolus* byly překryvy s liniemi vši přesnější a lépe viditelné. Souvisely i s rozšířením linií hostitelských, kde se linie východní (linie 6) překrývala s východní linií vši a linie západní (linie 2) se západní linií vši. Linie 1 a linie 3 u norníků, které se nacházely ve střední Evropě zasahovaly do obou linií vši.



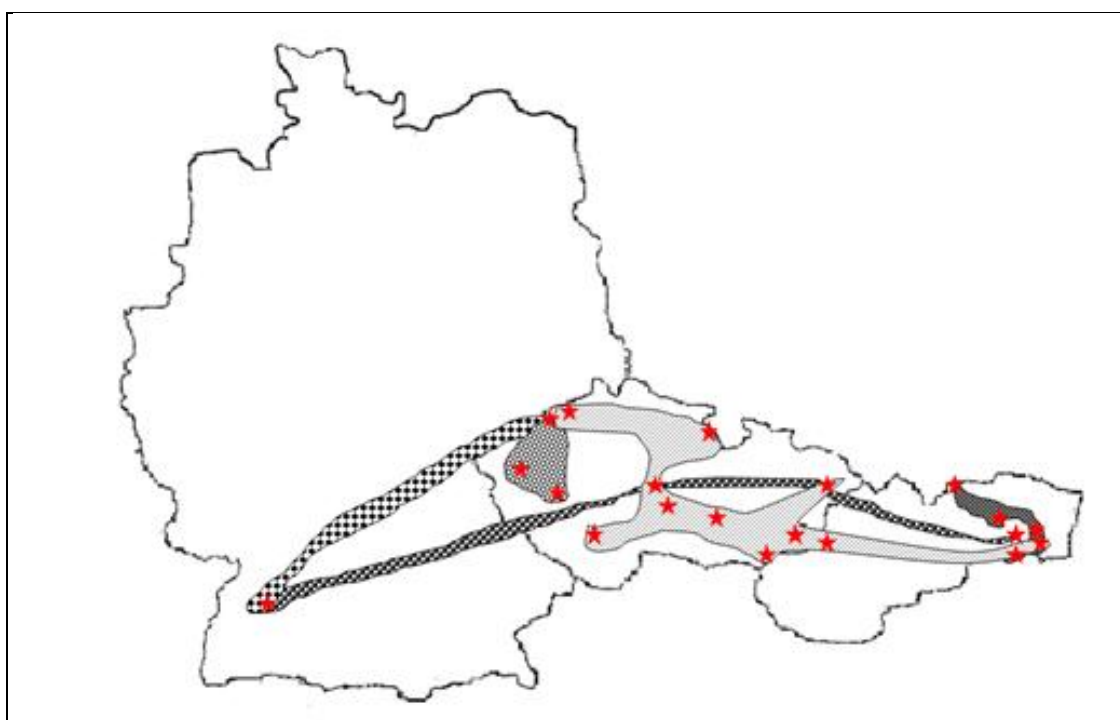
Obr. 5: ML strom sekvencí *Microtus agrestis* a *Microtus arvalis*. Bootstrapové hodnoty (ML/MP/MB) jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Striktní konsenzus všech ML stromů je znázorněn tučně. Oranžově jsou uvedené mnou zpracované sekvence a černě sekvence převzaté z genové banky. Začátky zkratk znázorňují lokality vzorků (podrobně jsou uvedené v **Tab. II**) a druhou část tvoří názvy hlodavců Mar (*Microtus arvalis*) Mag (*Microtus agrestis*). Vedle fylogenetického stromu jsou jednotlivé linie vyznačeny na mapách (společné dvojice jsou označeny stejnou barvou). Červené čáry na mapách znázorňující hranice rozšíření linií vší rodu *Hoplopleura*.








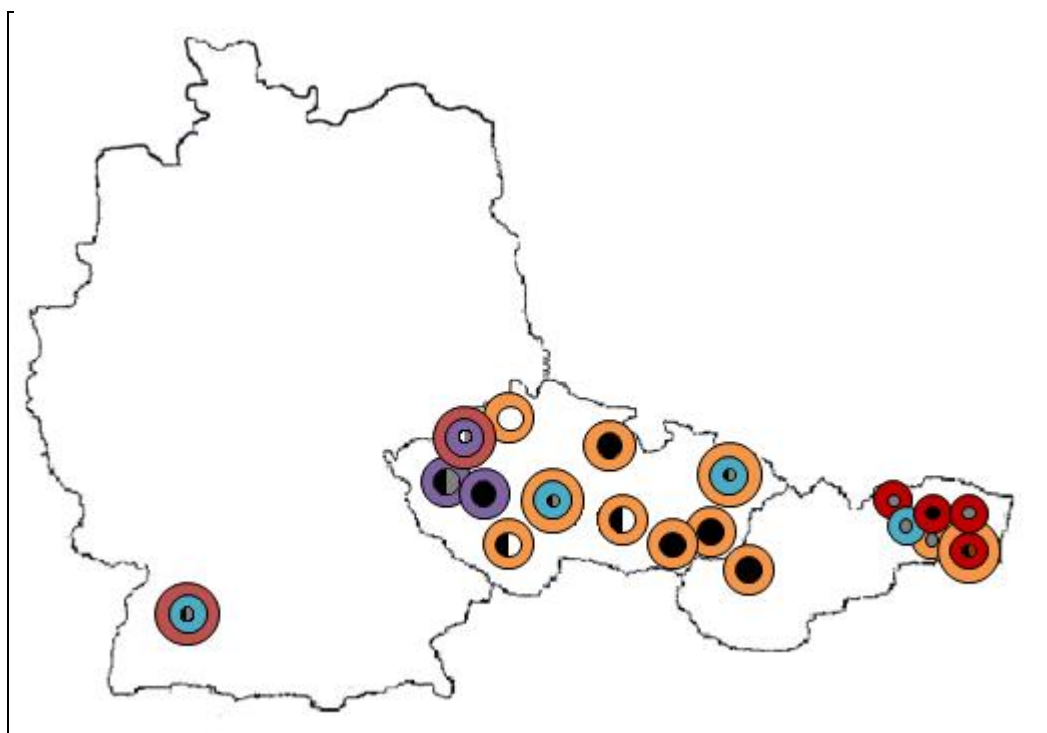
Obr. 6: ML strom sekvencí *Myodes glareolus*. Bootstrapové hodnoty (ML/MP/MB) jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Striktní konsenzus všech ML stromů je znázorněn tučně. Fialově jsou uvedené mnou zpracované sekvence a černě sekvence převzaté z genové banky. Zkratky znázorňují lokality vzorků (podrobně jsou uvedené v **Tab. III**). Vedle fylogenetického stromu jsou jednotlivé linie vyznačeny na mapách (společné dvojice jsou označeny stejnou barvou). Červené čáry na mapách znázorňují hranice rozšíření linií vší rodu *Hoplopleura*.



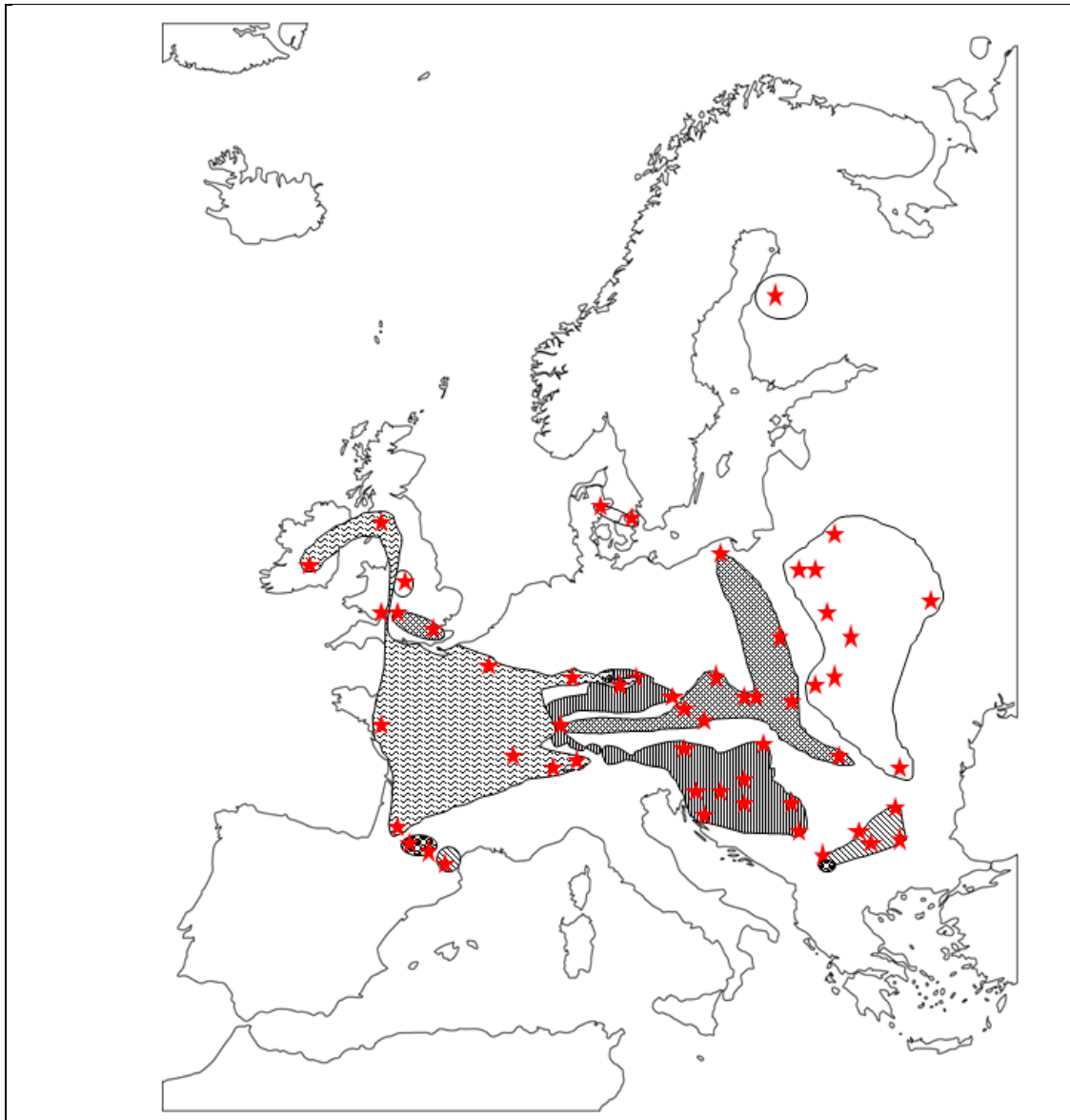
Obr. 7: ML strom sekvencí *Hoplopleura*. Bootstrapové hodnoty (ML/MP/MB) jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Striktní konsenzus všech ML stromů je znázorněn tučně. Fialově jsou uvedené mnou zpracované sekvence a černě sekvence převzaté z genové banky. Zkratky znázorňují lokality vzorků (podrobně jsou uvedené v **Tab. IV**). Vedle fylogenetického stromu jsou jednotlivé linie vyznačeny na mapách (společné dvojice jsou označeny stejnou barvou). Červené čáry na mapách znázorňují hranice rozšíření linií vší rodu *Hoplopleura*. Zkratky *It16V* a *Mac4b* znázorňují outgroup (*Polyplax serrata*).









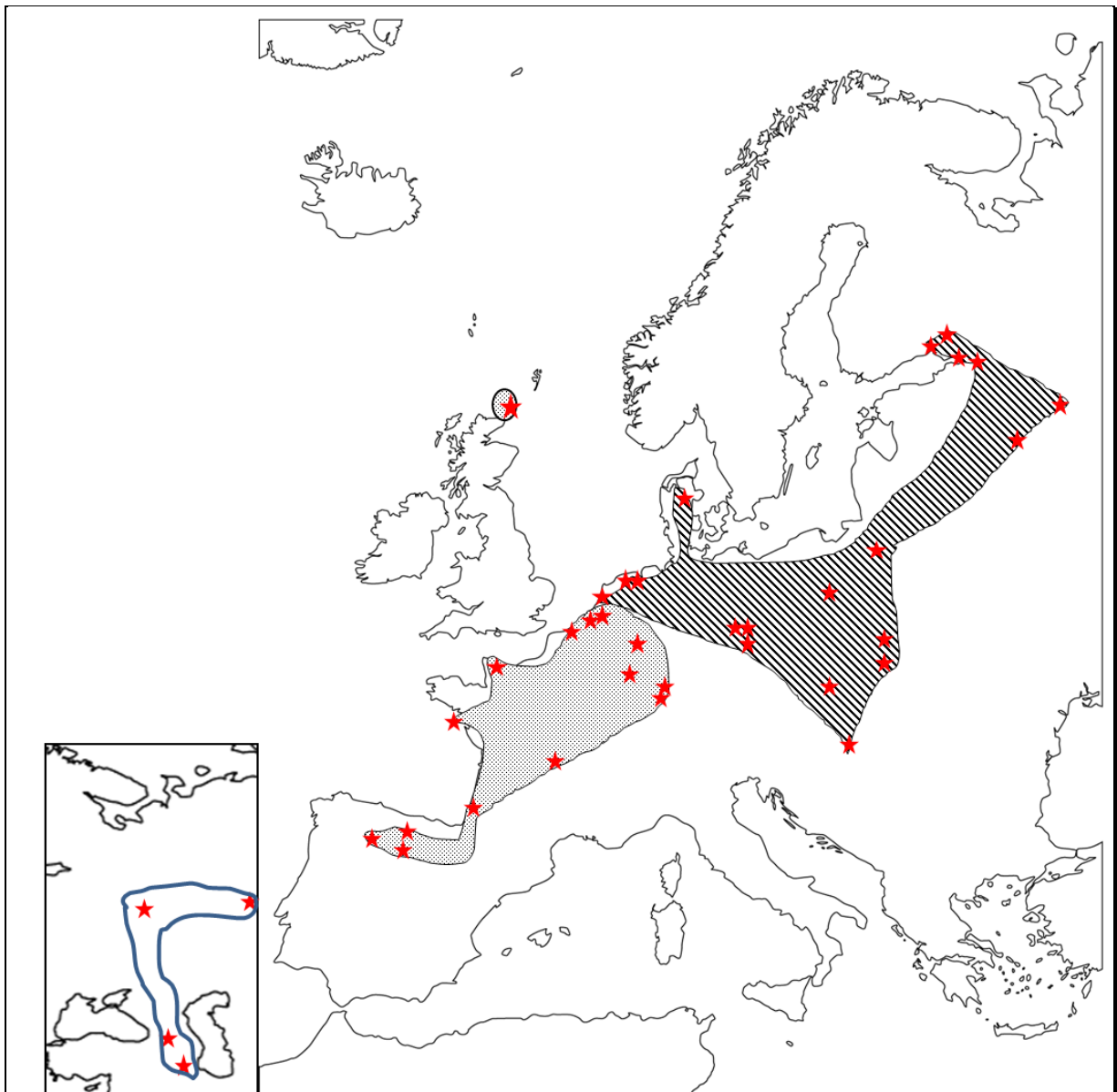
Obr. 8: Mapa znázorňující rozšíření linií vši rodu *Hoplopleura* s vyznačenými konkrétními lokalitami.  linie 1, lokality - Pováží (SR), Třebíšov (SR), Košice (SR), Litvínov, Horní Lapač, Chlumeč, Milevsko, Českomoravská vrchovina, Nový Jičín, Drnholec, Deštné v Orlických horách.  linie 2, lokality na Slovensku - Košice, Pieniny, Kechnec, Třebíšov, Ružín.  linie 3, lokality - Plzeň, Litvínov, Stružná.  linie 4, lokality - Litvínov, Baiersbronn (Něm).  linie 5, lokality - Slánské Vrchy (SR), Českomoravská vrchovina, Baiersbronn (Něm).






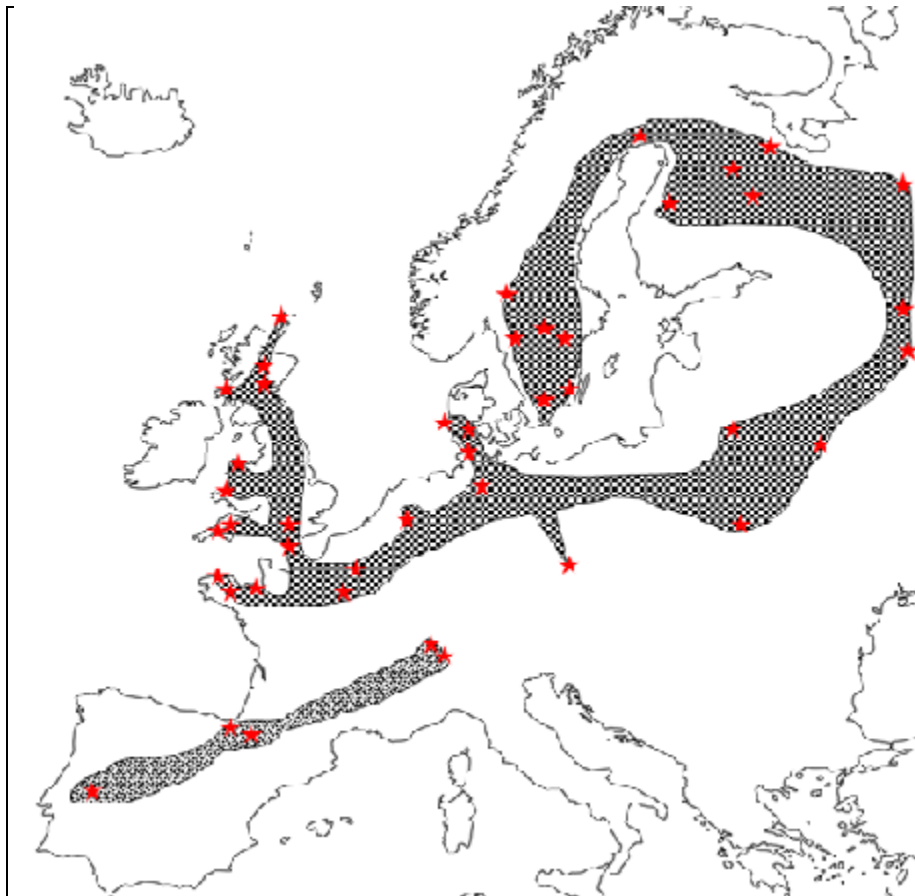
Obr. 9: Mapa znázorňující jednotlivé linie vší rodu *Hoplopleura* s vyznačenými konkrétními lokalitami. ■ linie 1, lokality - Pováží (SR), Třebišov (SR), Košice (SR), Litvínov, Horní Lapač, Chlumeč, Milevsko, Českomoravská vrchovina, Nový Jičín, Drnholec, Deštné v Orlických horách. ■ linie 2, lokality na Slovensku - Košice, Pieniny, Kechnec, Třebišov, Ružín. ■ linie 3, lokality - Litvínov, Stružná, Milevsko. ■ linie 4, lokality - Baiersbronn Litvínov. ■ linie 5, lokality - Slánské Vrchy (SR), Českomoravská vrchovina, Baiersbronn (Něm). ● *Microtus arvalis*. ○ *Microtus agrestis*. ● *Myodes glareolus*. ● *Apodemus flavicollis*.




Obr. 10: Mapa znázorňující jednotlivé linie norníků rodu *Myodes glareolus* s vyznačenými konkrétními lokalitami.  linie 1, lokality - Rakousko, Německo, Česká republika, Chorvatsko, Srbsko a Černá hora, Maďarsko, Slovinsko.  linie 2, lokality - Česká republika, Německo, Rakousko, Belgie, Švýcarsko, Velká Británie, Irsko a Francie.  linie 3, lokality - Německo, Velká Británie, Rakousko, Polsko, Česká republika, Slovensko, Rumunsko.  linie 4, lokality - Makedonie, Bulharsko a Francie.  linie 5, lokality - Francie, Makedonie.  linie 6, lokality - Velká Británie, Dánsko, Litva, Polsko, Slovensko, Rumunsko, Finsko a Ukrajina.



Obr. 11: Mapa znázorňující jednotlivé linie hrabošů rodu *Microtus arvalis* s vyznačenými konkrétními lokalitami.  linie 1b, lokality - Španělsko, Francie, Orkneje, Belgie, Nizozemí, Německo.  linie 2b, lokality - Slovensko, Polsko, Rusko, Finsko, Maďarsko, Česká republika, Dánsko, Nizozemí.  linie 3b - Arménie, Gruzie, Rusko, Sibiř.



Obr. 12: Mapa znázorňující jednotlivé linie hrabošů rodu *Microtus agrestis* s vyznačenými

konkrétními lokalitami.  linie 1, lokality - Nizozemí, Německo, Dánsko, Polsko, Bělorusko, Česká republika, Finsko, Rusko, Švédsko, Norsko, Velká Británie, Francie,

Švýcarsko.  linie 2, lokality - Portugalsko, Španělsko, Švýcarsko.

5. Diskuze

Na základě molekulárních analýz sekvencí CYB z norníků druhu *Myodes glareolus* bylo nalezeno 6 jasně oddělených, fylogeneticky stabilních linií, které se značně lišily geografickým rozšířením. Při porovnání s publikovanými studii (Deffontaine a spol., 2005, 2009; Kotlík a spol., 2006; Ledevin a spol., 2010; Wojcik a spol., 2010) byly nalezeny 3 shodné linie- balkánská, kterou zde tvořila linie 4, západní, představována linií 2 a východní, kterou byla linie 6. Počty linií identifikovaných v jednotlivých publikacích se sice lišily, ovšem linie západní, východní, balkánská, italská a španělská byly nalezeny shodně ve všech pracích, narozdíl od linie uralské, baskické a karpatské, které byly dohromady popsány pouze v podrobnější publikaci (Deffontaine a spol., 2009). Linie 2 se shodovala ve svých lokalitách s dřívějšími pracemi, stejně tak i linie 6 souhlasila s výskytem popsaným v literatuře (Wojcik a spol., 2010; Deffontaine a spol., 2005, Kotlík a spol., 2006), až na jednu lokalitu ležící ve Velké Británii. Také linie 4 byla shodná s původními pracemi, kromě lokality ve Francii (Wojcik a spol., 2010; Deffontaine a spol., 2005). Mezi vzorky zpracovanými v této práci nebyly ostatní linie nalezeny z důvodů chybějících vzorků z jiho- a západoevropských lokalit. Naopak byly nalezeny 2 linie zahrnující centrální Evropu (linie 1 a linie 3). Linie 1 se nacházela spíše v jižní části centrální Evropy, kdežto linie 3 většinou v části severní. Linie 5 zůstala v místech svých glaciálních refugií (Hewitt, 2011) na jihu Evropy.

U hrabošů druhu *Microtus agrestis* bylo výsledkem molekulárních analýz sekvencí CYB rozlišení dvou samostatných fylogeneticky stabilních linií. Při srovnání s odbornými pracemi (Jaarola a Searle, 2002, 2004; Herman a Searle, 2011) se našla jediná shodná linie a tou byla jižní- linie 2, která odpovídala i danými lokalitami (Jaarola a Searle, 2002). Východní a západní linie nebyly určeny. Místo nich byla zjištěna linie, která nebyla geograficky rozlišená a zahrnovala celou Evropu, i když obsahovala lokality, které byly v nedávno publikované studii rozlišeny do jednotlivých linií (Herman a Searle, 2011). Studie se také lišily v počtu jednotlivých linií, většinou popisovaly pouze ty základní- jižní, jejíž glaciální refugium leželo na Iberském poloostrově, východní s refugiem v Karpatech a Uralu a západní, která měla glaciální refugium na Balkáně (Jaarola a Searle, 2002). Pouze nejnovější práce (Herman a Searle, 2011) s nejširším samplingem popisovala podrobně 6 linií- východní, centrální, Skandinávií, západní, Francií a severní Británií. Linie 1 se dělila do několika větví, které byly geograficky specifičtější, jako například severní podlinie zahrnující Skandinávií, západní podlinie či 2 větve podliníí pro Velkou Británii, které byly

popsány již dříve. První větev byla zcela omezena na severní část hlavního ostrova Velké Británie a přilehlé malé ostrovy, kdežto větev druhá obsahovala lokality na jihu a patřila k západní linii. Podle autorů muselo k takto omezenému rozšíření první větve dojít souhrou několika událostí. Zaprvé, linie musela vzniknout koncem doby ledové, kdy se rychle oteplilo (cca před 15 000 lety). Zadruhé, větev musela vzniknout před oddělením ostrova od zbytku kontinentu vzhledem k holocévnímu zvedání hladiny moře před 8400 let (Lambeck, 1995).

Molekulární analýzy sekvencí CYB u hrabošů druhu *Microtus arvalis* rozlišily 3 fylogeneticky stabilní linie. V porovnání se studii (Braaker a Heckel, 2009; Bužan a spol., 2010) byly získány 2 linie - západní a východní. Studie se lišily v počtu linií, shodovaly se v Itálii, západní, východní a centrální linii, ale podrobnější studie dále uváděla linii balkánskou a Freiburg. Mnou určená západní linie (linie 1b) obsahovala více lokalit - Nizozemí, Orkneje, Španělsko a Belgie, než bylo uvedeno v předchozí práci (Braaker a Heckel, 2009). Její vnitřní dělení odpovídalo především jednotlivým státům. Východní linie 2b se celá lišila svým výskytem oproti porovnávané studii, ve které se linie rozprostírala na území Polska, Slovenska, České republiky, Německa a Ap. Ostatní linie, které byly uvedeny v publikacích jsem nemohla v této práci určit, kvůli tomu, že jsem neměla žádné vzorky z lokalit Balkánu, Itálie ani Freiburgu.

U vši rodu *Hoplopleura* bylo výsledkem molekulárních analýz sekvencí COI 5 samostatných stabilních linií. Toto uspořádání linií bylo v souladu s výsledky Terezy Marvanové (Marvanová, 2011) a nynější studie přinesla rozšíření vzorků a tím i více informací o charakteru populací. Vši mezi liniemi se lišily svým geografickým rozšířením a hostitelskou specifitou. Byly nalezeny dvě geograficky specifické linie: linie 2, která se vyskytovala pouze na Slovensku a tvořila východní linii a linie 3, která se rozkládala na území severozápadních Čech a byla rozšířena o další území (Stružná). Linie 3 se spolu s linií 4 vyskytovala v západní části studovaného území. Hostitelsky specifické byly linie 4, která se vyskytovala pouze na hlodavcích rodu *Microtus* (*Microtus agrestis* a *Microtus arvalis*) a linie 5, které vykazovaly hostitelskou afinitu k norníkovi druhu *Myodes glareolus* a která se nacházela na bázi stromu a tvořily ji vši druhu *Hoplopleura edentula*. Linie 4 byla rozšířena o novou lokalitu v jiho-východním Německu, z tohoto důvodu už nebyla striktně vázána pouze na území Krušných hor, jak tomu bylo v předešlé práci. K bližší specifikaci, zda- li bude rozšíření směrem na západ větší, či bude linie geograficky specifičtější, je potřeba dalších odchytů. Linie 1 byla rozšířena o lokalitu Nový Jičín a přestala tak být hostitelsky specifická pro rod *Microtus*, ale nyní obsahovala také norníky druhu *Myodes*

glareolus. Podle Skyline plotu pro linii *Microtus* vytvořeného v programu BEAST byla zjištěna změna velikosti populace u hostitelsky specifické linie 4, která vykazovala nárůst populace a nebyla nalezena žádná zřetelná vazba mezi genetickou strukturou a geografickým rozšířením (Marvanová, 2011). Z hlediska geografického rozšíření i hostitelského spektra linií rodu *Hoplopleura* je zajímavé porovnání s vešmi druhu *Polyplax serrata*, které parazitují myšice rodu *Apodemus* a které vykazují podobné hranice areálu (Štefka a Hypša, 2008). Genealogická studie *Polyplax serrata* byla prováděna na 126 jedincích vši *P. serrata*, ze kterých byly získány sekvence COI. Výsledkem fylogenetických analýz byly 3 jednoznačně oddělené linie (linie A, B, C,) a linie bajkalská (linie Baikal Lake), která se při ML vyčlenila mimo evropský klastr. Linie A obsahovala 22 haplotypů a rozkládala se na území zabírající východní Slovensko, Českou republiku, Francii a Skotsko, tvořila západní linii, a parazitovala na myšicích druhů *Apodemus sylvaticus* a *Apodemus flavicollis*. Linie B se skládala ze 14 haplotypů z lokalit ležících především v České republice a jedné lokalitě na východním Slovensku. Tato linie byla hostitelsky specifická a vyskytovala se pouze na druhu *Apodemus flavicollis*. Linie C rozléhající se pouze ve východním Slovensku byla geograficky specifická, tvořila východní linii, a jejími hostiteli byly *Apodemus agrarius* a *Apodemus uralensis* (Štefka a Hypša, 2008). Tato studie byla doplněna o další vzorky z nových lokalit z území Bulharska, Francie a jihu Británie (Martinů, 2009). V populacích vši rodu *Polyplax serrata* procházely územím střední Evropy hranice, oddělující východní a západní linie, stejně tak jako tomu zde bylo u vši rodu *Hoplopleura*.

Z výsledků je patrné, že biogeografické členění populací živočichů, zkoumaných v této práci, se většinou dělí na jednotlivé linie ve shodě s obecným paternem společným pro většinu organismů v Evropě (Hewitt, 2011). To je dáno rekolonizací kontinentu z glaciálních refugií, které byly umístěny na jihu Evropy, díky jejich lepším klimatickým podmínkám. Těmito refugii byly především Iberský poloostrov, Balkán a Itálie (Hewitt, 2011). Některé údaje však naznačují, že společenstva mírných druhů byly schopny přežít poslední glaciál i směrem dále na sever tj. ve střední Evropě. *Myodes glareolus* je jedním z druhů, pro který takovéto severní refugium bylo nejlépe zdokumentováno. Toto údajné severní glaciální refugium se nacházelo v blízkosti Karpat (Kotlík a spol., 2006), čímž lze zpochybnit tvrzení (Haynes a spol., 2003), které naznačovalo, že východní linie *Microtus arvalis*, vyskytující se na území Maďarska, Slovenska, Polska, Finska, Ukrajiny a Ruska, se rozšířila z glaciálního refugia na Balkáně, což bylo způsobeno nedostatečným sběrem vzorků. Až podrobnější sampling ukázal na možnost severního refugia (Bužan a spol., 2010). Rozdělení na západní a

jižní linii u hraboše druhu *Microtus agrestis* se neshoduje se vzory, které jsou obvykle spojeny s postglaciálním rozšířením linií v rámci druhu v Evropě (Hewitt, 2011). Ve skutečnosti může neobvyklé geografické rozdělení jižní linie svědčit o tom, že se izolované populace přizpůsobily prostředí Středozemního moře, včetně horských oblastí. Přítomnost jižní linie na Iberském poloostrově naznačuje, že zde přeživala v průběhu posledního zalednění. Naopak západní linie pravděpodobně obsadila glaciální refugium v Karpatech. Pokud by tyto dvě linie patřily ke stejnému druhu a úspěšně kolonizovaly sever Evropy na konci posledního glaciálu, tak by se očekávalo západní a východní rozšíření. Místo toho však mají tyto dvě linie relativně jižní a severní rozdělení. Tento model by se dal očekávat v případě, že se západní linie rozšířila nejprve přes střední Evropu s následným vysídlením jižních oblastí oddělenými druhy, které poté tvořily jižní linii, a které byly lépe přizpůsobeny podmínkám typickým pro Středomoří (Jaarola a Searle, 2002). Omezený geografický rozsah balkánské linie *Microtus arvalis* nasvědčuje tomu, že obsadila glaciální refugium na jihozápadním Balkáně a odtud se jen málo geograficky rozšířila. Tato oblast se vyznačuje vysokou mírou endemismu a je to hot-spot v evropské rozmanitosti savců. Endemité se zde vyskytují v drsné horské krajině západního Balkánu, kde byla jejich genetická jedinečnost spuštěna v různých čase díky střídání glaciálu - interglaciálu a byla formována různými bio geografickými filtry a bariérami (Kryštufek a spol., 2007).

Získaná data ukazují na to, že další odchvy norníků druhu *Myodes glareolus*, které by daly přesnější obraz fylogeografické struktury populací parazitů a jejich koevoluci s hostiteli během kvartérního zalednění, by se měly uskutečnit v oblastech, kde by mohlo docházet k překryvům mitochondriálních linií a to především ve střední Evropě (**Obr. 10**). Konkrétně v Německu, Rakousku, Polsku, Maďarsku, Slovensku a České republice, kde by linie mohly tvořit hybridní zóny a dále také na většině území Balkánského poloostrova. Ze zanesení fylogenetických paternů *Microtus arvalis* do map vyplývá, že by mohla západní linie tvořit hybridní zónu s linií 2b v oblasti od Beneluxu a Německa po Českou republiku (**Obr. 11**), proto by se měly další odchvy provádět zejména na těchto lokalitách.

Pro tuto práci, kdy jsem zkoumala především fylogeografickou distribuci genetických linií, stačila práce s mitochondriálními geny předávaným v maternální linii. Abychom se dozvěděli více o recentní populační dynamice a struktuře linií hostitelů a parazitů, bude v budoucnu potřeba použít multilokusové metody (např. AFLP nebo mikrosatelity), které jsou více informativní. Metoda AFLP byla u těchto organismů

aplikována například ve studii zabývající se zkoumáním lokální adaptace drobných hlodavců (*Microtus arvalis*) ve vysoké nadmořské výšce, kdy byly porovnány dvě populace hrabošů z různých nadmořských výšek (Fischer a spol., 2011). Mikrosatelity byly zase použity při studiu transalpinské kolonizace *Microtus arvalis*, jejichž analýzou se v Alpách odhalilo několik geneticky odlišných klastřů (Braaker a Heckel, 2009).

6. Závěr

- ❖ Z výsledků vyplývá, že na základě molekulárních analýz sekvencí CYB z norníků druhu *Myodes glareolus* bylo nalezeno 6 jasně oddělených, fylogeneticky stabilních linií, které se značně lišily geografickým rozšířením. U hrabošů druhu *Microtus agrestis* bylo výsledkem molekulárních analýz sekvencí CYB rozlišení dvou samostatných fylogeneticky stabilních linií. Větev *Microtus arvalis* se členila na 3 oddělené, fylogeneticky stabilní linie (linie 1b, 2b, 3b). U vši rodu *Hoplopleura* bylo výsledkem molekulárních analýz sekvencí COI 5 samostatných stabilních linií. Toto uspořádání linií bylo v souladu s výsledky Terezy Marvanové (Marvanová, 2011) a nynější studie přinesla rozšíření vzorků a tím i více informací o charakteru populací.
- ❖ Bude potřeba uskutečnit další odchyty hlodavců a jejich vší především v oblastech Beneluxu, střední Evropy a Balkánu, aby se zjistilo, zda u linií dochází k mitochondriálním překryvům
- ❖ Pro tuto studii postačila práce s mitochondriálními geny, ovšem pro podrobnější studii recentní dynamiky populací, bude potřeba použít informativnějších markerů (AFLP, mikrosatelity, MHC).

7. Použitá literatura

- Anděra M., Horáček I., 2005: Poznáváme naše savce. 2. vydání. Sobotáles, Praha.
- Avise, J., C., 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press.
- Babik, W., Branicki, W., Crnobrnja - Isailovi, J., Cogalniceanu, D., Sas, I., Olgun, K., Poyarkov, N., A., Garcia- Paris, M., Arntzen, J., W., 2005. Phylogeography of two European newt species- discordance between mtDNA and morphology. *Molecular Ecology* 14: 2475 – 2491.
- Banks, J., C., Paterson, A., M., 2005. Multi - host parasite species in cophylogenetic studies. *International Journal for Parasitology* 35: 741 – 746.
- 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.
- 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.
- Clayton, D., H., Bush, S., E., Johnson, K., P., 2004. Ecology of congruence: past meets present. *Systematic biology* 53: 165 - 173.
- 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.

Deffontaine, V., Ledevin, R., Fontaine M., C., Quere, J-P., Renaud, S., Libois, R., Michaux, J., R., 2009. A relict bank vole lineage highlights the biogeographic history of the Pyrenean region in Europe. *Molecular Ecology* 18: 2489 – 2502.

Fischer, M., Foll, M., Excoffier, L., Heckel, G., 2011. Enhanced AFLP genome scans detect local adaptation in high-altitude populations of a small rodent (*Microtus arvalis*). *Molecular Ecology* 20: 1450 - 1462.

Goloboff, P. A., Farris, J. S., Nixon, K., 2004. TNT: Tree analysis using new technology. Program and documentation, available from the authors and at <http://www.zmuc.dk/public/phylogeny>.

Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 2003, 52 (5): 696 - 704.

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., Demastes, J., W., Spradling, T., A., Reed, D., L. 2003. Cophylogeny between pocket gophers and chewing lice. In *Tangled trees: phylogeny, cospeciation, and coevolution*: 195 – 220.

Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95 - 98.

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* 278: 3601 - 3607.

- Hewitt, G., M., 1988. Hybrid zones- Natural laboratories for Evolutionary Studies. *Tree* 7.
- Hewitt, G., M., 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *The royal society: publish online* 14. 1. 2004.
- Hewitt, G., M., 2010. Mediterranean Peninsulas—the evolution of hotspots. Springer (in press).
- Hewitt, G., M., 2011. Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica*: DOI 10.1007: 10709-011-9547-3.
- Hofman, S., Spolsky, C., Uzzell, T., Cogalniceanu, D., Babik, W., Szymura, J., M., 2007. Phylogeography of the fire-bellied toads *Bombina*: independent Pleistocene histories inferred from mitochondrial genomes. *Molecular Ecology* 16: 2301 – 2316.
- Huelsensbeck, J. P., Ronquist, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754 – 755.
- 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.
- Jaarola, M., Searle, J. B., 2002. Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* 11: 2613 – 2621.
- Jaarola, M., Searle, J., B., 2004. A highly divergent mitochondrial DNA lineage of *Microtus agrestis* in southern Europe. *Heredity* 92: 228 - 234.
- Jaarola, M., Martínková, N., Gündüz I., Brunhoff, C., Zima, J., Nadachowski, A., 2004. Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* inferred from mitochondrial sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33:(3): 647 - 663.
- Joger, U., Fritz, U., Guicking, D., Kalyabina-Hauf, K., Nagy, Z., T., Wink, M., 2007. Phylogeography of western Palaearctic reptiles – Spatial and temporal speciation patterns. *Zoologischer Anzeiger* 246: 293 – 313.
- 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.

- Kohn, M., Šterba, J., 1987. A comparison of some diagnostic features of *Hoplopleura acanthopus* and *H. edentula* (Anoplura: Hoplopleuridae) under scanning electron microscope. *Folia Parasitologica* 34: 183 - 187.
- Kotlík, D., Deffontaine, V., Mascheretti, S., Zima, J., Michaux, J. R., Searle, J. B., 2006. A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *PNationall Academi Scient USA* 103: 14860 - 14864.
- Kryštufek, B., Buzan, E., V., Hutchinson, W., F., Hanfling, B., 2007. Phylogeography of the rare Balkan endemic Martino's vole, *Dinaromys bogdanovi*, reveals strong differentiation within the western Balkan Peninsula. *Molecular Ecology* 16: 1221 - 1232.
- 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.
- 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.
- 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.
- Marvanová, T., 2011. Populační struktura a genealogie vší rodu *Hoplopleura*. Diplomová práce. Laboratoř Molekulární Fylogenetiky a Evoluce Parazitů Parazitologický Ústav, Biologické centrum, AVČR.
- Mayr, E., 1963. *Animal species and evolution*. Belknap Press of Harvard university Press.
- 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., Morand, S., Libois R., Michaux, J., R., 2004. A parasite reveals cryptic phylogeographic history of its host. *The Royal Society Published online* 6. 12. 2004.

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*. The University of Chicago Press.

Page, R., D., M., 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12, pp. 602 - 604.

Posada, D., Crandall, K. A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817 – 818.

Price, P., W., 1980. *Evolutionary biology of parasites*. Princeton University Press.

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.

Seddon, J., M., Santucci, F., Reeve, N., J., Hewitt, G., M., 2001. DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E. concolor* : Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Molecular Ecology* 10: , 2187–2198.

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 Res.* 22, pp. 4673 - 4680.

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 *Myodes glareolus* převzaté z genové banky.

<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	Dan1	HQ288363
UK5	FJ640941	Dan2	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		

Sekvence cytochrom oxidázy b z *Microtus arvalis* a *Microtus agrestis* převzaté z genové banky (Mag= *Microtus agrestis*, Mar= *Microtus arvalis*).

<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	FIMag	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	GGU190622	UK4Mag	GU563276
BellMar	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
		PortMag	AY167186
		NorskMag	AY167202

SwiMag	AY167160
Swi2Mag	AY167161
Swi3Mag	AY167159
SveMag	AY167211
Sve2Mag	AY167203
Sve3Mag	AY167209
Sve4Mag	AY167207
Sve5Mag	AY167206
NemMag	GU563296
Nem2Mag	GU563292