

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Variabilita TLR2 receptoru u hrabošovitých
hlodavců (Arvicolidae) napříč Evropou,
v závislosti na parazitovanosti hostitele**

Bakalářská práce

Klára Charvátová

Školitelka: Mgr. Anna Mácová

Konzultantka: MVDr. Jana Kvičerová, Ph.D.

České Budějovice 2018

Bakalářská práce:

Charvátová K., 2018: Variabilita TLR2 receptoru u hrabošovitých hlodavců (Arvicolidae) napříč Evropou, v závislosti na parazitovanosti hostitele. [Variability of the TLR2receptor in arvicoline rodents (Arvicolidae) across Europe, depending on parasitisation of the host. Bc. Thesis, in Czech.] - 40 pp, Faculty of Science. University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This study investigates phylogenetic variability of the immune receptor TLR2 in arvicolid rodents from seven European countries. The variability was tested based on the presence or absence of ectoparasitic lice of the genus *Hoplopleura* and endoparasitic coccidia of the genus *Eimeria*.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů 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 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 odevzdání 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 odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 18. 4. 2018.

.....

Klára Charvátová

Poděkování

Ráda bych poděkovala hlavně své školitelce Mgr. Anně Mácové a také své konzultantce MVDr. Janě Kvičerové, Ph.D. za jejich cenné rady, připomínky, neskonale trpělivost a celkové vedení při psaní bakalářské práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině a přátelům za veškerou podporu, kterou mi po celou dobu poskytovali.

Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1	Charakteristiky daných živočichů.....	2
2.1.1	Hrabošoví (Arvicolidae)	2
2.1.2	Norník rudý (<i>Myodes glareolus</i>)	2
2.1.3	Hraboš polní (<i>Microtus arvalis</i>)	3
2.1.4	Hraboš mokřadní (<i>Microtus agrestis</i>)	3
2.1.5	Fylogeneze hostitelů	4
2.1.6	<i>Eimeria</i> spp.	4
2.1.7	Vši rodu <i>Hoplopleura</i>	5
2.2	Imunitní obrana hostitele.....	6
2.2.1	Toll-like receptory	7
2.2.2	Studie	8
3	CÍLE PRÁCE.....	12
4	METODIKA	13
4.1	Původ studovaného materiálu.....	13
4.2	Izolace DNA.....	14
4.3	PCR (Polymerase chain reaction)	14
4.3.1	Použité chemikálie a pomůcky	14
4.3.2	Postup práce	15
4.4	Elektroforéza	15
4.4.1	Použité chemikálie a pomůcky	16
4.4.2	Postup práce	16
4.5	Enzymatické čištění PCR produktů	17

4.5.1	Použité chemikálie	17
4.5.2	Postup práce	17
4.6	Příprava vzorků, sekvenování	18
4.7	Fylogenetické analýzy.....	18
5	VÝSLEDKY	20
6	DISKUZE	27
7	ZÁVĚRY	30
8	SEZNAM POUŽITÝCH INFORMAČNÍCH ZDROJŮ.....	31
9	SEZNAM PŘÍLOH	35

1 ÚVOD

Parazité jsou nesporně nedílnou součástí našich životů. Každý člověk přišel do styku s parazitem alespoň jednou za svůj život, a to vědomě nebo dokonce i nevědomky. Můžeme s nimi sdílet svůj domov, své tělo. Nepochybně z tohoto vztahu čerpají mnoho výhod, to samé ale nelze říci o jejich hostitelích. Infekce parazitem nemusí vždy hostiteli ztrpčovat život, a tak si může parazit přilepšovat bez vědomí hostitele. Ne vždy je to takto poklidné soužití. Parazité mohou život také znepríjemnit – kolik lidí se mohlo uškrábat kvůli zavšivené hlavě, muselo od sebe odhánět komáry nebo hledalo způsob, jak nejlépe odstranit klíště? Oba dva jedinci, parazit i hostitel, na sebe vzájemně působí. Jak vlastně reaguje hostitelská imunita, je-li tělo napadeno? A jak se tato imunita vlivem času a parazitismu mění a formuje? Podle Tschirren a kol. (2011) je možné, že parazité mají vliv na diverzitu a frekvenci alel v hostitelských genech pro imunitu, a to by znamenalo, že evoluční boj mezi parazity a hostiteli může mít ve výsledku pozitivní směrovou selekci na hostitelské obranné geny, a také hnát výhodné mutace k fixaci. Hlavní roli v rozpoznání různých molekul specifických pro mikroby (PAMPs) hrají tzv. pattern-recognition receptors nebo česky zvané patogeny rozpoznávající receptory (PRRs). Do skupiny těchto receptorů patří Toll-like receptory (TLRs), které byly objeveny v roce 1997, jak uvádí Tschirren (2015). Většina savců má 10 až 13 různých TLR z nichž každý rozeznává jiné patogenní struktury, což vede k iniciaci prozánětlivých reakcí (Oliveira-Nascimento a kol., 2012). Počet studií zabývajících se možnou spojitostí mezi TLR polymorfismem a infekčními onemocněními se stále zvyšuje. I tato bakalářská práce se zabývá tím, jaký vliv mají parazité na variabilitu těchto receptorů.

Hlodavci jsou známí přenašeči různých patogenů, mají celou škálu parazitů a jsou rozšířeni téměř po celém světě. Na jejich odchyt není potřeba velkých, složitých pastí. Není tedy žádným překvapením, že slouží jako objekty mnoha pozorování. Jako model pro naše pozorování jsme si vybrali tři druhy hrabošovitých hlodavců (*Mi. arvalis*, *Mi. agrestis*, *My. glareolus*), u kterých jsme zjišťovali přítomnost vnitřních parazitů (*Eimeria* spp.) i ektoparazitů (vši rodu *Hoplopleura*).

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Charakteristiky daných živočichů

Charakteristika hostitelů

2.1.1 Hrabošovítí (*Arvicolidae*)

Čeď hrabošovítých patří do skupiny hlodavců vyskytujících se v chladném a mírném pásu severní polokoule. Tato čeď se vyznačuje specifickými určovacími znaky. Jedním z nejdůležitějších morfologických znaků je způsob úponu svalu žvýkacího (*musculus masseter*). Tato čeď má myomorfní typ svalového úponu. Dalším charakteristickým znakem jsou stoličky, které jsou většinou bez kořene, s vysokými korunkami, mohou dorůstat (hypsodontní typ zubu) a jejich třecí plochy utvářejí hrbolky ve tvaru trojúhelníku. U žádného zástupce této čeledi se nenacházejí lícni torby na rozdíl od jiných skupin hlodavců. Na předních končetinách mají čtyři prsty a na zadních pět (Anděra a Horáček, 2005).

2.1.2 Norník rudý (*Myodes glareolus*)

Norník je rozšířen v Malé Asii a téměř v celé Evropě s výjimkou Pyrenejského poloostrova, Řecka, Islandu a středomořských ostrovů. Lze ho poznat zejména podle nápadně zbarvené srsti do rezava, větší velikosti ušních boltců a delšího ocasu, který má obvykle 45-60% délky těla, nežli mají jiní zástupci čeledi hrabošovítých. Břicho bývá světlejší až nažloutlé barvy, v zimním období někdy čistě bílé. Nejčastěji se vyskytuje v listnatých a smíšených lesích s podrostem, v zimě ho můžeme nalézt v obytných budovách, ke kterým se stahuje. Aktivní bývá převážně v noci. Z mechu a listů si staví hnízdo, které bývá nadzemní a ukryté mezi pařezy nebo v kořenech stromů. Na hnízdo navazuje systém nor s mnoha východy a zásobárnami. Živí se rostlinami a nejvýrazněji ze všech našich hrabošovítých i živočišnou potravou, která se skládá zejména z brouků, housenek a mrtvých živočichů. Ve vyšších počtech může škodit ohryzem kůry (Anděra a Horáček, 2005).

V posledních letech panoval poněkud nejednoznačný názor na správné taxonomické označení norníka. V roce 2005 Musser a Carleton použili označení *Myodes*, které se široce uchytilo. O pět let později ovšem Tesakov a kol. (2010) publikoval obsáhlý článek,

zdůvodňující, že správný název je (již dříve užívaný) *Clethrionomys*. Aktuálně (snad již) poslední práce (Carleton a kol., 2014) toto tvrzení vyvrací, a dokazuje, že platný latinský název je vzhledem k původní literatuře *Myodes*, kdežto ostatní používané názvy jsou jen synonyma. Proto je v textu této práce používáno jméno *Myodes*, zatímco v názvech vzorků se ještě objevuje původní *Clethrionomys*, odkazující na název platný v době sběru vzorků.

2.1.3 Hraboš polní (*Microtus arvalis*)

Hraboš polní je rozšířený téměř v celé Evropě kromě Skandinávie a Středomoří. Srst může mít od žlutošedé až po mírně narezavělou, na bříše šedobílou se žlutým nádechem. Ušní boltec je silný a menší velikosti, pokrytý chloupky. Zadní chodidla má nepigmentovaná a obvykle menší než 18 mm. Ocas má kratší než norník rudý. Vyskytuje se převážně na suchých místech otevřené krajiny. Raději se vyhýbá místům s hustým porostem. V zimním období se stahuje do sýpek, a proto patří mezi významné zemědělské škůdce. Je aktivní ve dne i v noci. Z trávy si staví hnízdo, které leží uprostřed soustavy nor, z nichž vedou východy s výhrabky. Po opuštění nory za sebou nechává vykousané a ušlapané cestičky. Jeho stravu tvoří hlavně listy a stonky, někdy hmyz, při přemnožení může docházet ke kanibalismu (Anděra a Horáček, 2005).

2.1.4 Hraboš mokřadní (*Microtus agrestis*)

Hraboš mokřadní je rozšířený na velké části Evropy vyjma Irska a Islandu. U nás se nachází v polohách od 140 m n. m. do 1600 m n. m., na rozdíl od dvou předešlých druhů, jež se vyskytují po celém území ČR (Anděra a Horáček, 2005). Málokdy se vyskytuje v teplejších oblastech (Anděra a Beneš, 2001). Je snadné si jej splést s hrabošem polním, avšak oproti němu má tmavší barvu s občasným výskytem černých chloupků v srsti. Břicho je šedavé se žlutým nádechem. Další odlišností je dvoubarevný ocas a větší blanitý ušní boltec, jež překrývají dlouhé chloupky. Spolehlivým znakem je velikost zadních chodidel, která je obvykle větší než 18 mm. Chodidla jsou naspodu tmavě pigmentovaná. V době rozmnožování se samci vyznačují charakteristickým zápachem. Nejčastěji se nalézá na vlhkých, porostlých místech jako jsou podmačené louky, rašeliniště nebo mokřady (Anděra a Horáček, 2005). Pokud by došlo k odvodnění lučních biotopů, mohlo by dojít až k úplnému vymizení tohoto druhu (Anděra a Beneš, 2001). Živí se nejčastěji travinami. Hnízda má nadzemní, sestavená z rozkousaných stébel a listů trav (Anděra a Horáček, 2005).

Hraboš mokřadní, spolu s hrabošem polním i norníkem rudým, je loven většinou druhů našich sov (Anděra a Beneš, 2001).

2.1.5 Fylogeneze hostitelů

V současnosti platné druhy hrabošovitých hlodavců nelze považovat za stálé formy. Jasně se od sebe diferencují, ale zahrnují i kryptické jedince, kteří by se v mnoha případech dali považovat za jiný samostatný druh (Jaarola a kol., 2004). Analýzy mitochondriální DNA (mtDNA) ukazují na vysoký stupeň nukleotidové diverzity v rámci jednoho druhu (Jaarola a Searle, 2002). Druh *My. glareolus* je rozdělen na osm odlišných fylogenetických větví (karpatskou, západní, východní, španělskou, italskou, balkánskou, kalábrijskou a uralskou) (Filipi a kol., 2015). U druhu *Mi. arvalis* existují čtyři linie (západní, východní, centrální, italská), přičemž o dvou z nich (východní a západní) se vedou spory. Východní linii představuje *Mi. obscurus*, západní *Mi. arvalis*. Někteří autoři tyto dvě linie považují za dva odlišné druhy, jiní uvádějí, že jsou to dvě karyotypické formy jednoho druhu (*Mi. arvalis arvalis*, *Mi. arvalis obscurus*) (Heckel a kol., 2005; Jaarola a kol., 2004). U sekvenování mtDNA druhu *Mi. agrestis* byly nalezeny tři fylogenetické linie (západní, východní, jižní). Jaarola a kol. (2004) prokázali, že jižní linie je novým morfologicky i karyotypicky kryptickým druhem. K jejich separaci došlo pravděpodobně během posledního zalednění (Jaarola a Searle, 2002).

Charakteristika parazitů

2.1.6 *Eimeria* spp.

Eimeria je vnitrobuněčný parazit a patří do skupiny nejpočetnějších a druhově nejbohatších kokcií, které spadají do kmene výtrusovců (Apicomplexa) (Volf a kol., 2007). Ve svém životním cyklu je vázána pouze na jednoho hostitele a v hostitelském těle se nalézá především ve střevním traktu. K infikaci dochází po požití sporulovaných oocyst z výkalů. V buňkách gastrointestinálního traktu poté dochází k asexuální a sexuální reprodukci parazita. Infikace může způsobit anorexii, úbytek váhy, silný průjem a smrt. Některé druhy jsou však nepatogenní (Zajac a Conboy, 2006). „Pro určení je důležité znát počet sporocyst v oocystě, počet sporozoitů ve sporocystách, morfologii oocyst a sporocyst, typ hostitele a vývojového cyklu, tkáňovou a orgánovou specifitu.“ (Volf a kol., 2007, str. 99).

Oocysty rodu *Eimeria* (viz Obr. 1) mohou být eliptického až kulovitého tvaru. „Obsahují čtyři sporocysty se stiedovými tělisky, každá sporocysta obsahuje dva sporozoity.“ (Volf a kol., 2007, str. 100). K detekci oocyst ve výkalech se používají odstředivé nebo jednoduché flotační techniky (Zajac a Conboy, 2006).

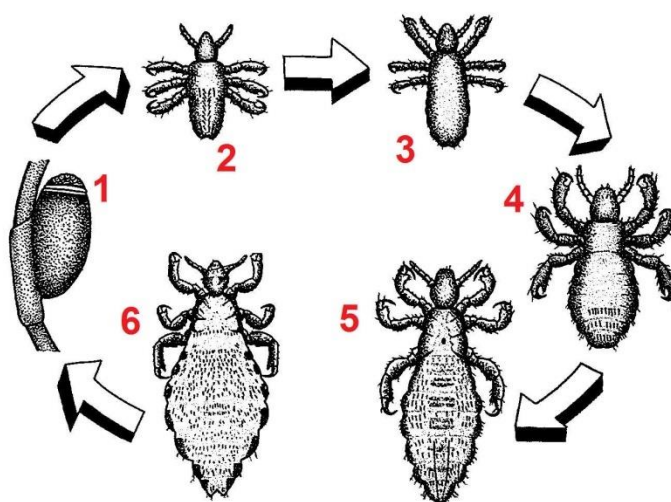


Obr. 1: Oocysta rodu *Eimeria* (Zdroj: Zoologie, online, cit. 2018-02-28).

2.1.7 Vši rodu *Hoplopleura*

Vši patří mezi bezkřídly hmyz. Jsou to ektoparazité, kteří se živí krví hostitele. K sání mají uzpůsobené ústní ústrojí, které je modifikované v bodavě sací aparát s vysunovatelným styletem. Krev sají z cévy, a to i několikrát za den. Jejich životní cyklus (viz Obr. 2) je vázán jen na jednoho hostitele. Jsou schopny přežít pouze několik hodin nebo i dnů mimo svého hostitele (Volf a kol., 2007; Zajac a Conboy, 2006). Krev sající vši (Anoplura) jsou jedním z nejmenších podřádů, nicméně mají více než 540 popsaných druhů (Dong a kol., 2014; Krčmar a Trilar, 2017). Vši bývají často sledovanými ektoparazity, protože mají velký veterinární význam. Způsobují ekonomické ztráty dobytčí produkce a některé druhy mohou přenášet patogeny na hostitele (Krčmar a Trilar, 2017). Hoplopleuridae je velmi různorodá skupina se 162 popsanými druhy a rod *Hoplopleura* je jeden z nejbohatších. Obsahuje 141 popsaných druhů u hlodavců a pišťuchovitých z řádu zajícovců, navíc tento rod spadá do odlišné fylogenetické větve než vši lidské, prasečí, koňské nebo krysí (Dong a kol.,

2014). Vši parazitující na hlodavcích má smysl zkoumat, protože lidé a hlodavci žijí v těsné blízkosti, a tudíž existuje možnost přenosu patogenů mezi nimi (Chakma a kol., 2017). Je však často obtížné je posbírat z živých hostitelů a může to být těžké také při pitvě pro jejich snadnou přehlédnutelnost při prohlídce srsti (Weaver, 2017). Ve výzkumu S. Chakmy a kol. (2017) byly nalezeny dva druhy krev sajících vší (*Polyplax* spp., *Hoplopleura* spp.), které sice neparazitují na lidech, ale přenášejí myší tyfus mezi hlodavci, a ten může být nakonec přenesen na člověka jiným hematofágním členovcem (např. klíštětem), který parazituje na hlodavcích i lidech. Krčmar a Trilar (2017) uvádí, že euroasijskou faunu podřádu Anoplura představují druhy *Hoplopleura affinis*, *Polyplax serrata* a *Haematopinus apri*. Mezi holarktické druhy patří například *Hoplopleura acanthopus*.



Obr. 2: Životní cyklus vší (Zdroj: vši.nazory.cz, online, 2018-02-28).

2.2 Imunitní obrana hostitele

Patogeny se vyznačují specifickými vzorci tzv. „pathogen associated molecular patterns“ (PAMP), které jsou rozpoznávány „patogeny rozeznávajícími receptory“ (PRR), kam patří i skupina receptorů TLR. TLR se nachází na fagocytech, buňkách imunitního systému, které jsou schopny fagocytovat (pohlcovat částice z okolí) (Jílek, 2014). Tím, že TLR rozpoznají patogen, indukují expresi prozánětlivých cytokinů (např. některých interleukinů, TNF), a tím nepřímo ovlivňují samotný proces fagocytózy. Fagocyt

(např. makrofág, dendritická buňka) pohltí cizorodou částici, zlikviduje pohlcený mikroorganismus za pomoci různých enzymů a některé fagocyty dokážou jejich malé části prezentovat na svém povrchu pomocí molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC II). Úlohou MHC II molekul je prezentovat peptidy antigenů pomocným Th lymfocytům (Th1, Th2). To, jaký Th lymfocyt se aktivuje, závisí na druhu produkovaných cytokinů (IL-12 pro stimulaci Th1, IL-4 pro stimulaci Th2), a jaké cytokiny budou produkovány prostřednictvím dendritických buněk, závisí na kombinaci receptorů přirozené imunity a na přítomnosti cytokinů a faktorů produkovaných jinými buňkami nespecifické imunity. Imunitní reakce typu Th1 je reakce zánětlivá a slouží jako ochrana před intracelulárními parazity. Po obdržení signálu spolupracují Th1 lymfocyty s makrofágy a stimulují jejich přeměnu na aktivní makrofágy. Funkcí imunitní reakce typu Th2 je ochrana před extracelulárními parazity. Tento druh lymfocytů podporuje produkci protilátek (IgE) a také spolupracuje hlavně s bazofily, eosinofily a žírnými buňkami (Hořejší a kol., 2013).

2.2.1 Toll-like receptory

Jde o skupinu receptorů, která je součástí buněk imunitního systému. Jedná se o starý a velmi účinný obranný mechanismus, díky kterému je imunitní systém schopen rozeznat nebezpečné mikroby a aktivovat fagocytózu (Jílek, 2014). Patří do multigenové rodiny, která se vyvinula genovou duplikací (Tschirren a kol., 2011). Tyto receptory se nachází jak na povrchu, tak i uvnitř buněk a jsou schopné rozeznat např. lipopolysacharid gramnegativních bakterií nebo určité posloupnosti bazí DNA a jiné součásti mikrobiálních buněk (viz Tab. I). Jinak řečeno dokážou rozpoznat typické vzory či molekuly z mikrobů a jimi poškozených buněk (PAMP). Patří tedy mezi tzv. „patogeny rozeznávající receptory“ (PRR) (Hořejší a kol., 2013; Jackson a kol., 2009; Jílek, 2014; Oliveira-Nascimento a kol., 2012; Tschirren a kol., 2011; Tschirren a kol., 2013). Tento funkční obranný mechanismus může ale někdy sloužit jako tzv. maladaptace, a to v případě absence patogenů. Jakým způsobem se hostitel bude adaptovat na přítomnost parazitů, záleží na množství vložené energie do obrany (trade-off). Při krátkodobé interakci s parazity se očekává zvýšení investic do specifické antigenní odpovědi a při dlouhodobé interakci zvýšení investic do vrozené imunity (Rynkiewicz a kol., 2013). Dnešní většina lidí a domestikovaných zvířat

bez parazitů mají silnější vrozenou imunitu než v historii, což často vede k autoimunitním poruchám (Jackson a kol., 2009).

Tab. I: Výběrový přehled TLR.

Receptor	Buněčná lokalizace	Ligand	Původ ligandu
TLR 1	povrch	triacylpeptidy	(myko)bakterie
TLR 2	povrch	zymosan, peptidoglykan, kys. lipoteichoová	plísně, gram-pozitivní bakterie
TLR 3	nitro	dvouvláknová RNA	viry
TLR 4	povrch	lipopolysacharid, fúzní protein	gram-negativní bakterie, RSV virus
TLR 5	povrch	flagellin	bakterie
TLR 6	povrch	diacyl-lipoproteiny	mykoplazmata
TLR 7	nitro	jednovláknová RNA	viry
TLR 8	nitro	jednovláknová RNA	viry
TLR 9	nitro	nemetylovaná DNA, dvouvláknová DNA	bakterie, viry
TLR 11	nitro	profilin	

Zdroj:(Hořejší a kol., 2013; Jílek, 2014)

2.2.2 Studie

Parazité ovlivňují hostitele, jejich infestace vyvolává imunitní odpověď, a proto existuje předpoklad, že mohou být hlavní spouštěče evoluce genů pro imunitu. Je snaha tento předpoklad podložit důkazy, nicméně je obtížné vysledovat změny ve frekvencích alel napříč časem, aby se dalo přímo demonstrovat parazity řízenou evoluci genů pro imunitu u zvířat žijících volně v přírodě. Důkazy jsou také nepatrné kvůli nedostatku informací o rozšíření nákazy parazitem. Všechna pozorování se ale nevztahují jen na zvířata. Je mnoho studií o TLR polymorfismu a infekčních chorobách v lidské populaci, např. studie s důkazem, že samotný nukleotidový polymorfismus v lidském TLR2 ovlivňuje náchylnost k lymfské borelióze (Tschirren a kol., 2013), nebo studie pojednávající o tom, že rozmach *Plasmodium* sp. je silným prediktorem pro alely rezistence vůči malárii (Tschirren, 2015).

Tschirren a kol.

V roce 2011 vydal časopis *Evolution* článek od B. Tschirren a kol. (2011) na téma diverzita TLR2 u hlodavců. Pozorování bylo prováděno na dvou sympatrických druzích hlodavců (*Apodemus flavicollis*, *Myodes glareolus*). Pracuje se s hypotézou, že populační genetické analýzy genů pro imunitu mohou objasnit selekci zprostředkovanou parazitem, a jeho roli ve vytváření diverzity uvnitř i napříč populacemi. Vzorky byly nasbírány v roce 2008 v jižním Švédsku. Analyzován byl úsek bazí, který obsahoval funkčně relevantní místa spojená s rozpoznáváním patogenu a heterodimerizací TLR2-TLR1. Během evoluce se v tomto úseku vlivem pozitivní selekce také formovaly kodony. Vliv na diverzitu TLR mohou mít samozřejmě neutrální procesy jako např. efekt zakladatele, drift nebo migrace, a proto byly k analýze použity mikrosatelity. Ve výsledku byla zjištěna menší diverzita u myšice lesní (*A. flavicollis*) – pouze 6 polymorfních míst, oproti tomu norník (*My. glareolus*) měl 37 polymorfních míst. Existuje možnost, že tyto rozdíly jsou projevem odchytu druhů v odlišných stádiích TLR2 evoluce. Nicméně výsledky poukazyvaly na to, že selekce TLR2 u norníků je prostorově heterogenní, a že rozdíly v tlaku selekce narůstají se zvětšující se geografickou vzdáleností mezi populacemi (Tschirren a kol., 2011).

O dva roky později vyšel článek s podobným zaměřením, tentokrát zkoumající spojitost mezi TLR2 polymorfismem a vlivem borelie (*Borrelia afzelii*) u norníka rudého (*My. glareolus*). Tento druh hraboše má 15 odlišných TLR2 haplotypů, které se uskupují do tří klastřů (TLR2_{c1}, TLR2_{c2}, TLR2_{c3}). V pozorování Tschirren a kol. (2013) byl u klastru c2 nejnižší rozmach borelie. Dospělci s těmito typy haplotypů byli třikrát méně infikováni než jedinci s haplotypy klastru c1. Ukázala se také spojitost mezi TLR2 genotypem a věkovou kategorií. Větší rozmach borelie se objevil u dospělců než u juvenilů, ale lze předpokládat, že mladí jedinci byli pouze kratší čas vystaveni možnosti infekce. Dospělí samci byli více infikováni borelií než samice. To může být vlivem větší pohybové aktivity nebo také vyšší hladiny testosteronu, což negativně ovlivňuje kontrolu nad parazity. Navzdory těmto rozdílům u pohlaví byl vztah mezi TLR2 genotypem a infekcí *B. afzelii* v celkovém výsledku shodný u obou pohlaví. V tomto výzkumu lze tedy hlavně prokázat korelaci TLR2_{c2} s nízkou infikací borelií (Tschirren a kol., 2013).

O další dva roky později vedla Tschirren (2015) výzkum o formování vrozených imunitních genů norníka rudého (*My. glareolus*) vlivem parazita *Borrelia burgdorferi*. Je nesnadné zjistit údaje o rozšíření borelie v hlodavčí populaci, a tak byla v tomto výzkumu použita data o evropském rozšíření lymfské boreliózy (LB) u lidí. Samozřejmě tato data sloužila pouze jako hrubý odhad, protože mnoho faktorů může ovlivnit informace o rozšíření LB, jako například správná diagnostika, životní styl, a také fakt, že některé druhy borelií neinfikují hlodavce. Ve výsledku pozorování se ukázala pozitivní souvislost mezi frekvencí TLR2_{c2} a rozšířením LB. V zemích s absencí LB chyběly i TLR2_{c2}. Bez rizika nákazy by stála přítomnost těchto receptorů zbytečné náklady (trade-off) (Tschirren, 2015; Rynkiewicz a kol., 2013). Pro další pozorování je nutné sledovat nevýhody rezistence při absenci patogenu. Podle Tschirren (2015) byla u norníků s TLR2_{c2} větší pravděpodobnost, že nebudou infikováni borelií, což je další důvod proč považovat hypotézu, že borelií zprostředkovaná selekce formuje evoluci TLR2 hlodavců, za pravdivou.

Jackson a kol.

Jaká je souvislost mezi imunosupresivními parazity a odpovědí přes tumory nekrotizující faktor alfa (TNF α) zprostředkovaný TLR, zajímalo Jacksona a kol. (2009). Ten si za svého modelového hostitele vybral *Apodemus sylvaticus* a sledování ektoparazitů byli například *Ixodes trianguliceps*, *Polyplax serrata*, z endoparazitů například *Brachylaemus recurvum*, *Calodium hepaticum*, *Eimeria* spp., *Heligmosomoides polygyrus*. Populace bez imunosupresivních parazitů mohou mít nepřírozeně zvýšenou hladinu aktivity vrozené imunity, která může vést ke zvýšenému riziku imunopatologických procesů. V tomto článku se dozvíme, že nejsilnější odpověď na ligandy měly v experimentu TLR2 a TLR9. Nejsilnější odezva byla zaznamenána u vši (*P. serrata*). Bylo zredukováno 50% TLR2 a TLR9 odpovědí. Existuje domněnka, že veš slouží pouze jako vektor a imunosupresorem je mikrobiální patogen. U většiny parazitů v tomto výzkumu byla zaznamenána negativní korelace s TLR, tzn. inhibice imunitních odpovědí. U *Eimeria* spp. však byla zjištěna pozitivní asociace s odpověďmi TLR7, TLR9 a TIR (toll-interleukin 1 receptor) (Jackson a kol., 2009).

Zhou a kol.

Výzkum TLR samozřejmě neprobíhá jen na hlodavcích. Ve svém pozorování se Zhou a kol. (2013) zaměřil na hospodářsky hojně využívaný kur domácí infikovaný kokcidií *Eimeria tenella*. Důvod zaměření jeho práce je kvůli velkým ekonomickým ztrátám, které způsobují kokcidiózy. Snaha o vytvoření vakcíny vedla ke sledování imunitních odpovědí hostitele. Vyvolání imunitní odpovědi probíhalo stimulací teplem zabitých sporozoitů *E. tenella* in vitro. Po této stimulaci se výrazně zvýšila exprese mRNA pro všechny TLR (kromě TLR21) u makrofágů a heterofilních granulocytů. Je známo deset kuřecích TLR, z nichž pět se nachází i u člověka a myši. Unikátní TLR15 se nachází pouze u ptáků. A právě tento typ TLR měl spolu s TLR4 a MyD88 nejvýrazněji zvýšenou expresi v experimentu. Výsledky tedy jasně prokazují, že se tyto tři receptory zapojují do rozpoznávání sporozoitů *Eimeria tenella* a do následného přenosu signálu (Zhou a kol., 2013).

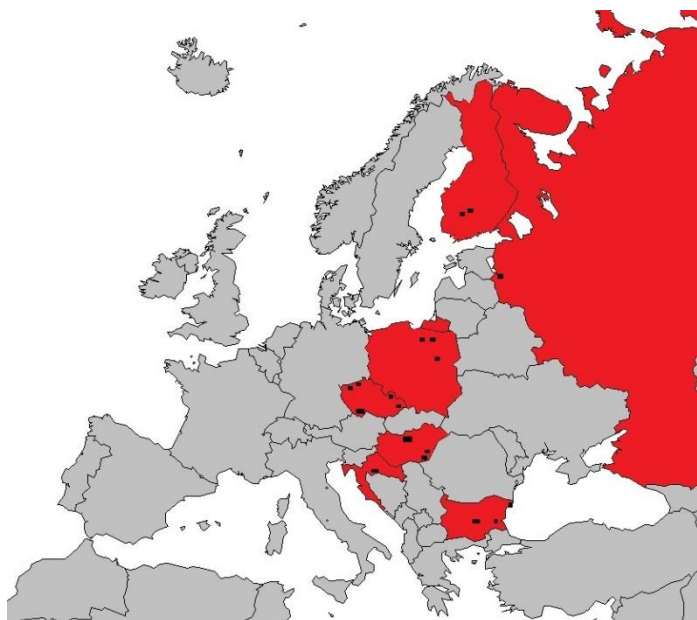
3 CÍLE PRÁCE

- Na již vyizolované DNA z přibližně 200 hrabošovitých hlodavců provést PCR se specifickými primery amplifikujícími gen pro TLR2 a získané sekvence použít pro fylogenetické a populačně-genetické analýzy.
- Ověřit druhovou determinaci hostitelů (hrabošovitých hlodavců) molekulárními metodami.
- Zjistit variabilitu toll-like receptoru 2 (TLR2) u různých populací tří druhů hrabošovitých hlodavců odchycených na různých lokalitách Evropy.
- Porovnat výsledný pattern s daty o parazitovanosti hostitele – zda byl daný hlodavec napaden ektoparazity (vši, roztoči), či endoparazity (kokcidie, nematoda), a jak se tato skutečnost odráží v genetické struktuře či variabilitě TLR2 receptoru.

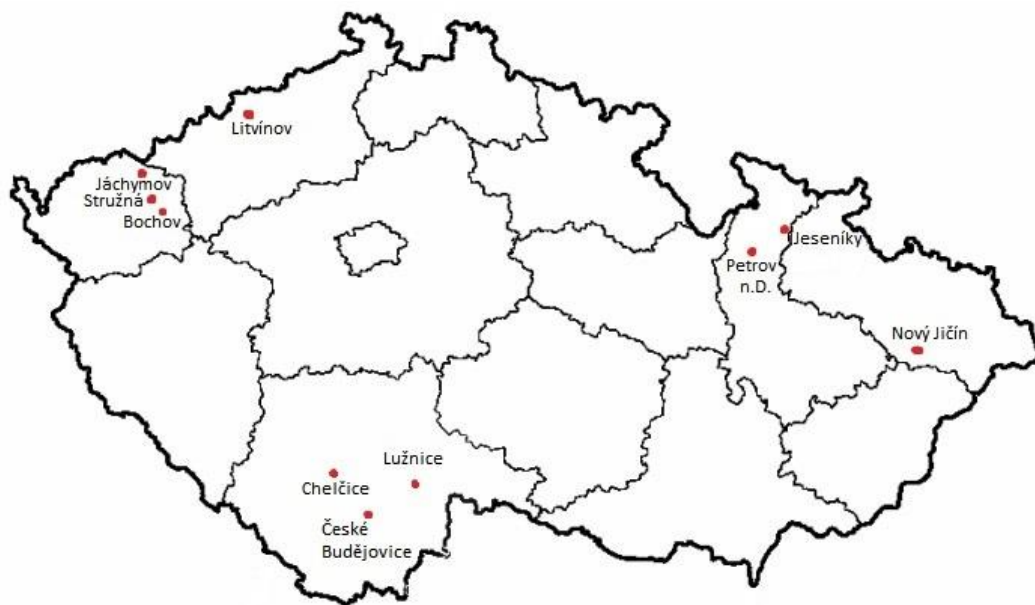
4 METODIKA

4.1 Původ studovaného materiálu

Materiál ke zpracování byl získán ze sedmi evropských zemí – Bulharska, České republiky, Finska, Chorvatska, Maďarska, Polska a Ruska (Obr. 3). V České republice vzorky pocházely z oblasti jižních Čech, severní Moravy a severozápadních Čech (Obr. 4). Z ostatních zemí byly vzorky také z několika lokalit (Tab. V). Sběry prováděli členové laboratoře profesora Hypši v období červen – listopad, 2010 – 2015.



Obr. 3: Sběry vzorků v Evropě (Upraveno z: Mapa Evropy, online, 2018-02-05).



Obr. 4: Sběry vzorků v ČR (Upraveno z: Památky UNESCO ČR thinglink, online, 2018-02-05).

4.2 Izolace DNA

K izolaci DNA byl použit Blood & Tissue Kit (Qiagen). Jako zdroj DNA sloužil kus tkáně hostitele, většinou dva prsty ze zadní tlapky. Izolace byla provedena podle protokolu od výrobce.

4.3 PCR (Polymerase chain reaction)

Pro amplifikaci určité části DNA (zajištěno specifickými primery amplifikujícími geny pro TLR2 receptor podle Tschirren a kol. (2011); Forward: 5'-CATCCATCACCTGACCCTTC-3'; Reverse: 5'-CCAGTAGGAATCCTGCTCG-3') byla použita metoda PCR.

4.3.1 Použité chemikálie a pomůcky

- Pufr (10x buffer)
- Vyizolovaná DNA
- Nukleotidy (dNTPs)
- Primery (F; R)
- Taq polymeráza (Roche)

- PCR H₂O
- Mikropipety
- Mikrozkušavky typu Eppendorf

4.3.2 Postup práce

1. Na jeden analyzovaný vzorek bylo použito 2,5 µl pufru, 0,5 µl nukleotidů, 0,5 µl primeru F, 0,5 µl primeru R, 0,25 µl Taq polymerázy (Roche) a 18,75 µl PCR vody.
2. Směs těchto látek byla přidána ke 2 µl vyizolované DNA pomocí mikropipet různých nastavitelných objemů (2,5 µl; 10 µl; 20 µl; 200 µl) do mikrozkušavek typu Eppendorf. Pipetování probíhalo na ledu.
3. Následně byly vzorky vloženy do termocykleru a byl spuštěn program Roche test (Tab. II).

Tab. II: Průběh PCR.

Proces	Teplota	Doba trvání
úvodní denaturace	94°C	2 min
denaturace*	94°C	30 s
annealing*	55°C	30 s
elongace*	68°C	3 min
finální elongace	68°C	7 min

*procesy označené hvězdičkou se opakují 35 krát

4.4 Elektroforéza

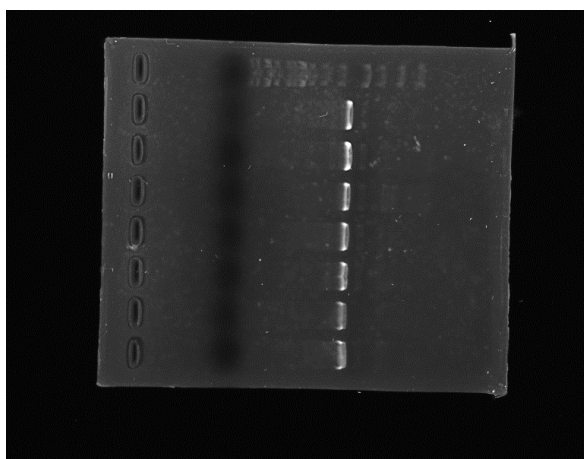
Agarózová elektroforéza je standardní metoda pro separaci nukleových kyselin. Elektroforetická mobilita závisí na odlišné hmotnosti molekul a elektrickém náboji (Westermeier, 2001). Pomocí gelové elektroforézy byly separovány amplifikované fragmenty DNA.

4.4.1 Použité chemikálie a pomůcky

- Agaróza
- Pufir TAE 1x
- SYBR Green
- Ladder (1 kb)
- Erlenmeyerova baňka
- Elektroforetické příslušenství (vana, vaničky, hřeben, utěsnění boků, zdroj napětí)
- Parafilm

4.4.2 Postup práce

1. Na předvážkách bylo naváženo 0,2g agarózy a v odměrném válci bylo odměřeno 20 ml pufiru. (Na přípravu většího gelu bylo použito 0,5g agarózy a 50 ml pufiru.)
2. Tyto dvě složky byly smíchány v Erlenmeyerově baňce a následně zahřívány v mikrovlnné troubě po dobu přibližně 30 sekund.
3. Po zahřátí byla baňka mírně zchlazena pod studenou tekoucí vodou.
4. Roztok byl následně přelit do elektroforetické vaničky s vloženým elektroforetickým hřebenem. Roztok se nechal tuhnout po dobu 30 minut.
5. Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforetické vany a zalit pufrem tak, aby všechny jamky byly přelity.
6. Na parafilm byly aplikovány 4 μ l PCR produktů a ke každému přidána kapka barviva SYBR Green, následně bylo vše rozpipetováno do jamek agarózového gelu. Pro kontrolu bylo do první jamky napipetováno 4 μ l obarveného ladderu.
7. Elektroforéza byla spuštěna přibližně na 20 minut při 100 V.
8. Po dokončení elektroforézy byl gel prosvícen pod UV světlem kvůli vizualizaci rozdělených fragmentů DNA (Obr. 5).



Obr. 5: UV vizualizace PCR produktů (Zdroj: autor práce, 2017).

4.5 Enzymatické čištění PCR produktů

Pro odstranění (degradaci) nezačleněných nukleotidů a primerů bylo použito enzymatické čištění.

4.5.1 Použité chemikálie

- Enzym FastAP (termosensitivní alkalická fosfatáza)
- Enzym Exonukleáza I

4.5.2 Postup práce

1. Do každého PCR produktu bylo přidáno 0,2 μ l FastAP a 0,2 μ l Exo I pomocí mikropipety. Pipetování bylo prováděno na ledu.
2. Následně byly vzorky vloženy do termocykleru a zpracovány v programu s názvem Enzclean (Tab. III).

Tab. III: Průběh enzymatického čištění PCR produktů.

Proces	Teplota	Doba trvání
inkubace	37°C	15 min
inaktivace	85°C	15 min

Zdroj: Thermo Fisher Scientific Inc., online, 2018-01-20

4.6 Příprava vzorků, sekvenování

1. Z každého přečištěného PCR produktu bylo odebráno 10 μ l.
2. K 5 μ l produktu bylo přidáno 5 μ l primeru F a k dalším 5 μ l produktu bylo přidáno 5 μ l primeru R. Pipetovalo se do mikrozkušavek typu Eppendorf, které byly opatřeny zámkem.
3. Následně byly takto ošetřené produkty poslány na sekvenování do společnosti SEQme (www.seqme.eu).

4.7 Fylogenetické analýzy

Získané sekvence byly následně podrobeny fylogenetickým analýzám v různých počítačových programech.

1. Sekvence byly zkontrolovány v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pro správnost určení druhu hostitele.
2. Všechny sekvence byly jednotlivě vloženy do programu SeqScanner v1.0 (Applied Biosystems). Zde byl vybrán úsek smysluplných bází.
3. Vybraný úsek bází byl následně zpracován v programu Editseq v5.05 (DNASTAR Inc.) pro kontrolu úplnosti tripletů vybraného úseku a správnosti čtecího rámce. Kontrola probíhala pomocí translace do proteinů.
4. Sekvence vzorků s primerem F a sekvence vzorků s primerem R bylo nutno spojit v jednu sekvenci (tzv. kontig) pomocí programu Seqman v5.05 (DNASTAR Inc.).
5. Spojené sekvence byly manuálně upraveny v programu Bioedit v7.0.5.3 (Hall, 1999). Tento program sloužil k odstranění mezer mezi bázemi a k sjednocení délek sekvencí. Po upravení těchto nedostatků byl v tomto programu vytvořen výsledný alignment.
6. Ke konstrukci fylogenetických stromů a výpočtu podpor jednotlivých uzlů bylo použito více programů k porovnání výsledků. Byly použity Phyml v2.4.3 (Guindon a Gascuel, 2003) a MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck a Ronquist, 2001). Pro MrBayes bylo zapotřebí překonvertovat soubor do formátu nexus za pomoci programu Seaview4 (Gouy a kol., 2010). Analýzy v programu MrBayes byly počítány pro 10 mil. generací.

7. V programu Treeview v1.6.6 (Page, 1996) byl zobrazen fylogenetický strom, který byl následně upraven v programu Inkscape v0.92. Jako outgroup byla vždy použita sekvence z *Apodemus flavicollis*.
8. Fylogenetická síť byla vytvořena pomocí PopART v1.7 (Bandelt a kol., 1999).

5 VÝSLEDKY

Odchycené druhy *Mi. arvalis*, *Mi. agrestis* a *My. glareolus* byly vyšetřeny na přítomnost parazitů, v této práci zaměřených na kokcidie rodu *Eimeria* a vši rodu *Hoplopleura*. Přítomnost či absence těchto parazitů je zaznamenána v Tab. IV.

Tab. IV: Parazitovanost odchycených druhů hrabošovitých hlodavců.

Druh	Celk. počet	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>	E+H	Negativní
<i>My. glareolus</i>	94	45	7	5	37
<i>Mi. arvalis</i>	71	27	13	7	24
<i>Mi. agrestis</i>	30	15	1	3	11

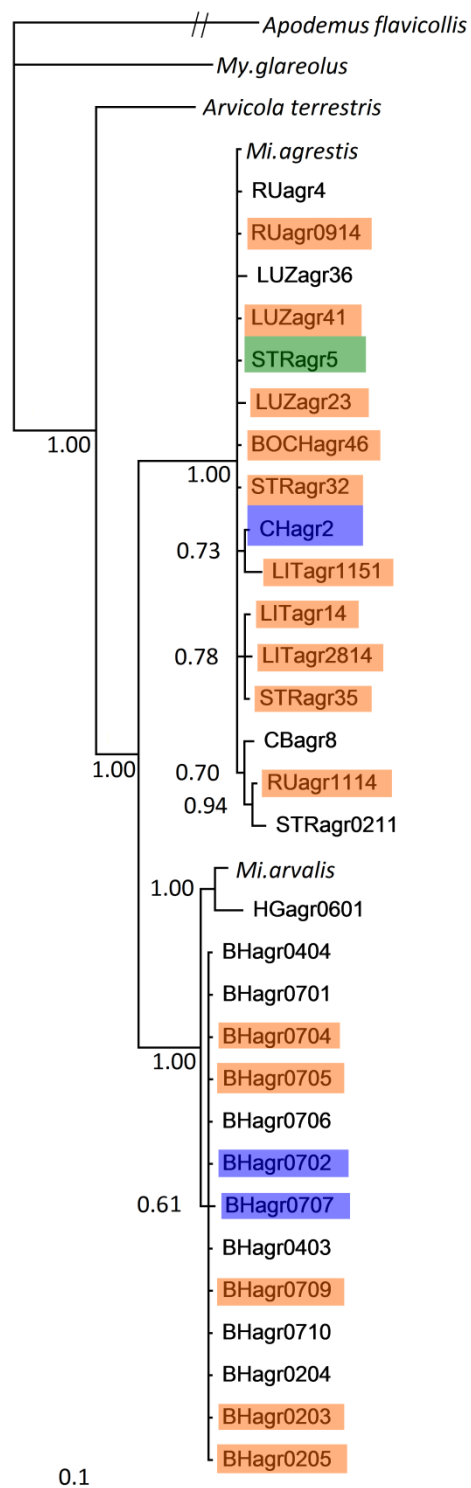
Zkratky: E- *Eimeria*, H- *Hoplopleura*

Nejvíce odchycených hrabošovitých hlodavců bylo v roce 2014. V rámci zemí, kde probíhaly sběry studovaného materiálu, byla Česká republika společným místem pro všechny tři sledované druhy a nejmenší počet různých českých lokalit měl *Mi. agrestis*. Od tohoto druhu bylo odchyceno nejméně jedinců (Obr. 10). Ve Finsku byli odchyceni pouze jedinci druhu *My. glareolus*, ne všichni byli stejnou měrou parazitováni, ale i ti kteří měli shodné typy parazitů, se ve fylogenetickém stromě nepřihřadili k sobě (Obr. 8). *Mi. agrestis* má ve fylogenetickém stromu dvě skupiny. Bulharská je naprosto kompaktní, druhá má uvnitř drobné členění (Obr. 6). *My. glareolus* má podobné rozdělení, většina vzorků je v polytomii, ale odděluje se i několik malých klastrů (Obr. 8), což je jasně viditelné i na Obr. 9. Naproti tomu *Mi. arvalis* je homogenní skupina, kde je naprostá většina vzorků v polytomii (Obr. 7). Většina vzorků sdílí v rámci druhu stejný haplotyp, ale vlivem genových mutací se vždy několik větví u každého druhu oddělilo (Obr. 10).

Porovnání mnou získaných sekvencí hostitelů s databází GenBank ukázalo, že ne všechny druhy hrabošů byly správně určeny. Přibližně 13 % z celkového počtu vzorků (195) bylo na základě molekulárních metod determinováno jako jiný druh. Fylogenetické analýzy u všech druhů měly podporu větvení (posterior probabilities) vždy větší než 0, 50. V rámci jednoho druhu se vyšší fylogenetická diverzita objevila u *Mi. agrestis* (větev s jedinci z Bulharska se na základě analýzy v programu MrBayes výrazně oddělila od ostatních jedinců, viz Obr. 6, což ale není patrné na haplotypové síti vytvořené programem PopART).

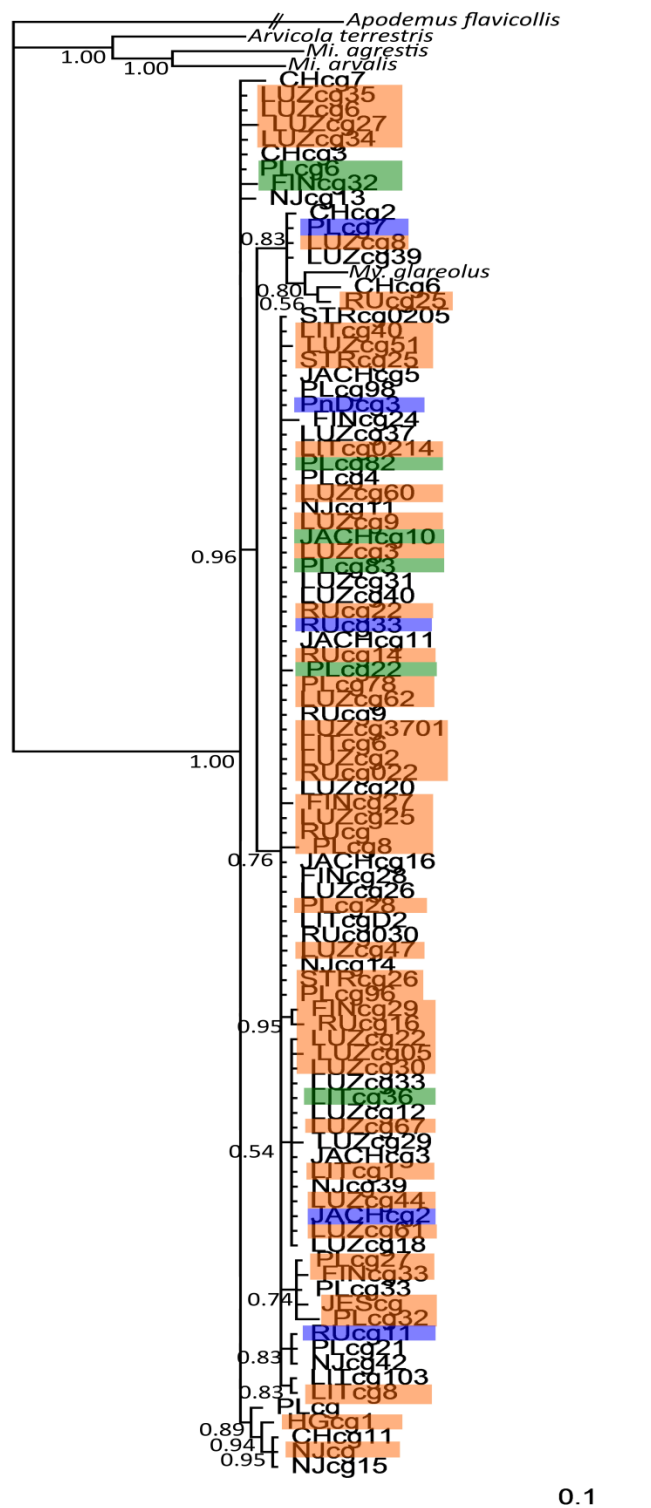
Pro přehlednější orientaci a porovnání byly do analýz použity také modelové sekvence TLR2 receptoru (z GenBank) dalších zástupců hrabošovitých hlodavců. Jednalo se o druhy *Apodemus flavicollis* (JN674551.1), *Arvicola terrestris* (HM215599.1), *Myodes glareolus* (KM979286.1), *Microtus arvalis* (HM215597.1) a *Microtus agrestis* (HM215596.1).

V závislosti na přítomnosti a druhu parazitů (viz Tab. IV) se neprojevila značná diverzita.



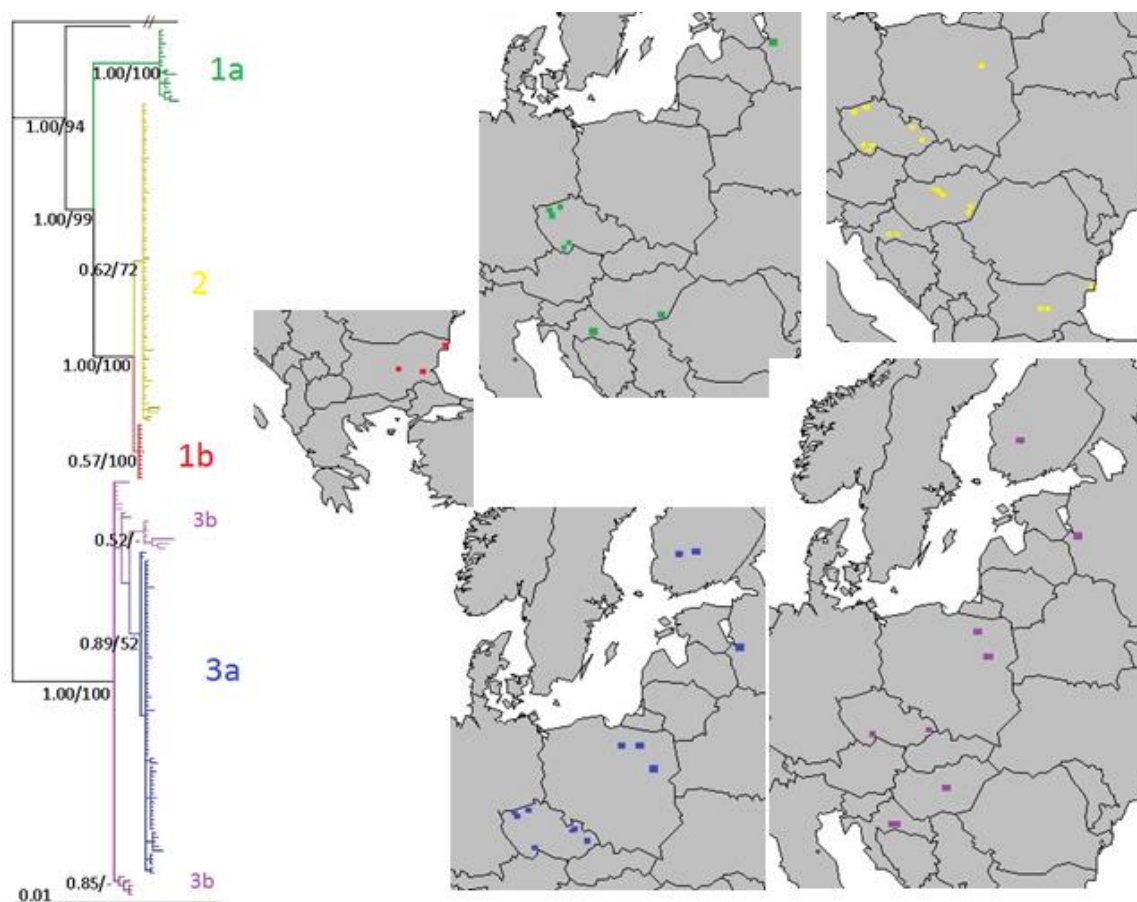
Obr. 6: Bayesian inference tree pro *Mi. agrestis* s hodnotami posterior probabilities u jednotlivých uzlů.

Druhy parazitů: oranžová- *Eimeria*, zelená- *Hoplopleura*, modrá- *Eimeria* + *Hoplopleura*, žádná- bez parazitů



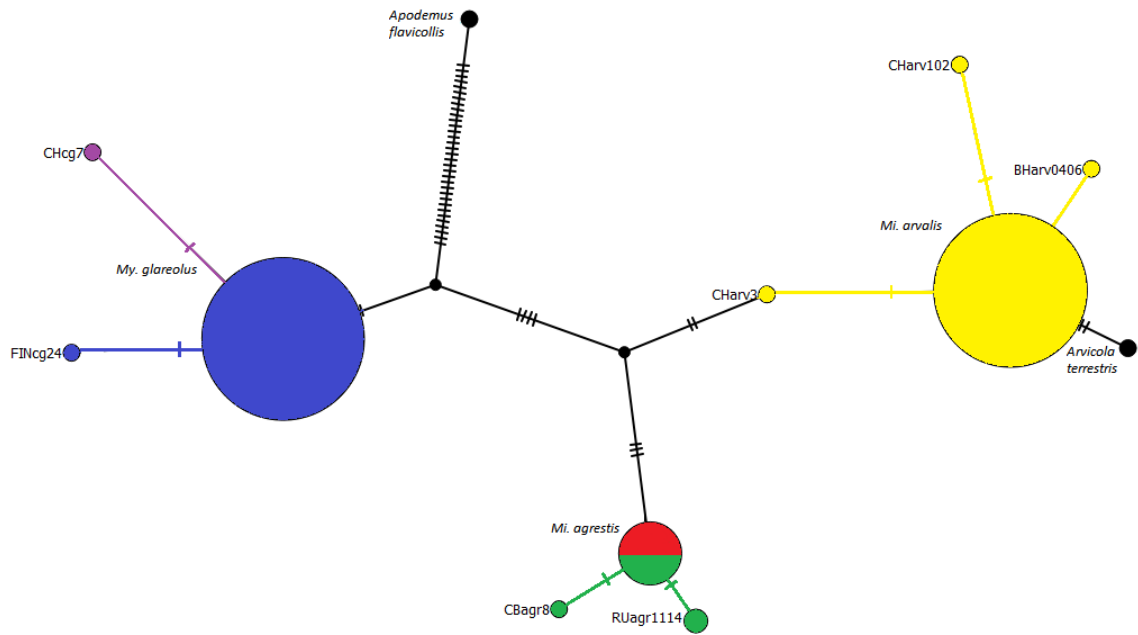
Obr. 8: Bayesian inference tree pro *My. glareolus* s hodnotami posterior probabilities u jednotlivých uzlů.

Druhy parazitů: oranžová- *Eimeria*, zelená- *Hoplopleura*, modrá- *Eimeria* + *Hoplopleura*, žádná- bez parazitů



Obr. 9: Fylogenetický strom s rozšířením druhů (hodnoty post. probabilities/bootstrap MrBayes/Phyml). (Mapy upraveny z: Mapa Evropy, online, 2018-02-05).

1a– *Mi. agrestis*: Č. Budějovice, Lužnice, Stružná, Bochoř, Litvínov (CZ), Pskov (RU), Veliko Svinjicko (HR), Medgyesegyháza (H), (zelená); **1b**– *Mi. agrestis*: Mohyla Kosmatka, Kamen Brjag, Kabile (BG), (červená); **2**– *Mi. arvalis*: Č. Budějovice, Stružná, Litvínov, Nový Jičín, Chelčice, Petrov nad Desnou, Lužnice (CZ), Ljetnica, Mohyla Kosmatka, Kamen Brjag (BG), Alsonémedi, Sári, Kecskeméti Utca, Korosladány, Medgyesegyháza (H), Pultusk (PL), Veliko Svinjicko, Jamarica (HR), (žlutá); **3a**– *My. glareolus*: Litvínov, Stružná, Jáchymov, Lužnice, Nový Jičín, Petrov nad Desnou, Jeseníky (CZ), Pskov (RU), Pultusk, Nowy Zyzdrój, Gierzwald (PL), Isojärvi, Ylöjärvi (FIN), (modrá); **3b**– *My. glareolus*: Nový Jičín, Lužnice (CZ), Nowy Zyzdrój, Pultusk (PL), Sári (H), Sunja, Veliko Svinjicko, Jamarica (HR), Pskov (RU), Ylöjärvi (FIN), (fialová). **Zkratky států:** BG- Bulharsko, CZ- Česká republika, FIN- Finsko, HR- Chorvatsko, H- Maďarsko, PL- Polsko, RU- Rusko



Obr. 10: Haplotypové síť na základě 195 získaných sekvencí TLR2 z odchycených hrabošovitých hlodavců [barvy odpovídají liniím ve fylogenetickém stromu (Obr. 9)].

6 DISKUZE

Studie TLR mají význam pro pochopení reaktivity hostitelské imunity, a také toho, jak velký faktor představují parazité. Zabývat se tímto tématem znamená mapovat oblasti imunologie, ale i evolučního vývoje dvou navzájem se ovlivňujících druhů. Problematika TLR není tak dobře prostudována jako MHC. Při zadání hesla MHC do portálu Web of Science (<https://webofknowledge.com>) najdeme 18 800 odkazů a při zadání hesla TLR jen 3 755.

Tato práce se nezaměřuje pouze na jeden druh parazita, ale naopak zahrnuje zástupce ektoparazitů i endoparazitů. Tato volba je velmi výhodná z hlediska větší jistoty u správnosti výsledků. Jinými slovy, kombinací těchto rozdílných skupin parazitů získáváme jistotu, že hostitelská imunita byla nějakým způsobem ovlivněna. Pokud bychom zvolili pouze zástupce ektoparazitů, nemohli bychom si být zcela jisti mírou zasažení do systému hostitele. K infestaci parazitem mohlo dojít ve velmi krátkém časovém úseku, a tak by jakýkoli vliv nemusel být patrný, navíc po smrti hostitele, která nastává při některých odchycích, mají tendenci opustit tělo hostitele, a tak by jejich přítomnost nebyla zaznamenána. Všichni jsou vhodnými parazity pro sledování, protože jsou to parazité permanentní na rozdíl od roztočů, kteří parazitují krátkou dobu. Jejich přítomnost nemusí být však vždy zaznamenána, protože se při prohlídce srsti snadno přehlédnou díky své malé velikosti. Endoparazité nám vnášejí do studie více jistoty.

Parazitovanost se mezi jednotlivými druhy studovaných hlodavců nijak výrazně neliší. Nicméně si lze povšimnout, že infekce vši rodu *Hoplopleura* je procentuálně vyšší u *Mi. arvalis* než u *My. glareolus*. Mohla by s tím souviset míra sociálnosti druhů, a tudíž i snazší přenos parazitů mezi jedinci. Z těchto dvou druhů je *Mi. arvalis* sociálnější (Laakkonen a kol., 1998). Infekce kokcidiemi *Eimeria* spp. je procentuálně vyšší u *Mi. agrestis* než u zbývajících druhů. Vlhké prostředí, ve kterém se tento druh často vyskytuje, poskytuje oocystám lepší podmínky pro přežití než prostředí suché (Vance a Duszynski, 1985). Vzorky použité v této práci nebyly vybrány náhodně. Z našich sběrů a lokalit byly účelově vybrány tak, aby každá lokalita obsahovala vzorky, kde byly jak vši, tak i eimerie, a aby z každého místa bylo zastoupeno alespoň 10 hostitelů.

Získané sekvence TLR nevykazují žádný pattern závislý na parazitovanosti hostitele, ale odrážejí spíše fylogenezi hostitele. Pro lepší vizualizaci byl dataset rozdělen na části odpovídající jednotlivým druhům hostitelů. U *Microtus agrestis* můžeme vidět zřetelné odlišení bulharské větve jedinců od skupiny jedinců z ostatních zemí. Tento druh hraboše se dělí na tři mitochondriálně odlišné linie (západní, východní, jižní). Větev jedinců z různých zemí bychom mohli přiřadit podle Jaarola a Searle (2002) na pomezí západní a východní linie, bulharskou větev na pomezí západní a jižní linie. Není zde vidět žádná diverzita závislá na parazitech. Ve fylogenetickém stromu *Mi. agrestis* je poněkud zvláštní větvení jednoho vzorku z Maďarska (HGagr0601), který se od ostatních vzorků více přiblížil k *Mi. arvalis*. Tento vzorek byl vícekrát analyzován a pokaždé molekulárně vyhodnocen jako *Mi. agrestis*, tudíž se větvení nevztahuje ke špatnému určení. Mohlo by to být v důsledku odlišné mtDNA. Tento vzorek by mohl spadat do jižní linie druhu na rozdíl od ostatních vzorků. U *Microtus arvalis* není vidět žádné výrazné větvení, jedinci pocházejí ze stejné mitochondriální linie. Hraboš polní se dělí na čtyři linie a vzorky materiálu z odchycených jedinců v této práci odpovídají dle Heckel a kol. (2005) východní linii. U *Myodes glareolus* existuje osm linií, v našich výsledcích lze pozorovat nepatrné větvení do dvou linií. Skupina označovaná jako 3b v barevně vyznačeném fylogenetickém stromě (Obr. 9) spadá podle Filipi a kol. (2015) na rozhraní západní, karpatské a východní linie. Skupina označovaná jako 3a spadá na rozhraní východní a karpatské linie. Je zajímavé, že větve 3a a 3b jsou si velmi podobné až na to, že 3b obsahuje navíc vzorky z Chorvatska. Přesto, že obsahuje také vzorky z Finska a Ruska, má spíše jižnější charakter. Tyto linie vznikaly díky ledovým dobám, kdy jednotlivé populace byly v glaciálních refugiích, v místech, kde bylo příznivější klima. Dlouhé roky nebyly v kontaktu a alopatickou speciací se u nich nahromadily jiné mutace než v jiných populacích. V interglaciálu se zase tyto skupiny vrátily do původně zaledněných oblastí. Stále to byli jedinci, kteří nejsou geneticky daleko od sebe, takže se stále mohli křížit mezi sebou, ale odlišné mutace v genomu zůstávají a předávají se dál (matrilinéární dědičnost mitochondriální DNA), a tak se refugia dají takto zpětně geneticky vystopovat. Většina fylogenetických stromů neukazuje přílišné větvení, přestože se jedná o sekvence z hostitelů odchycených v různých oblastech napříč Evropou, tedy pocházejících z různých populací, které se logicky geneticky liší. Výsledný pattern je dán tím, že TLR (například oproti mitochondriálním či jaderným genům) není gen, který by vykazoval

dostatečnou vnitrodruhovou variabilitu, a byl by tedy standardně používán tímto způsobem. V analýze programu PopART nejsou linie *Mi. agrestis* zcela odděleny. TLR není marker pro fylogenezi, a tudíž není fylogenetická síť zcela přesná, ale stojí za ukázkou. Oproti tomu program MrBayes je v tomto ohledu přesnější, jelikož se jedná o rozsáhlou analýzu s 10 mil. generací, které jsou podpořené vysokými hodnotami posterior probabilities.

Správnost morfologické determinace jednotlivých druhů byla potvrzena molekulárním určením všech zde zkoumaných vzorků hrabošovitých hlodavců. Toto určení ukázalo na nesprávné zařazení několika hrabošů do druhu při odchytu. Tyto omyly však nejsou nijak překvapivé. Všechny tři druhy zde pozorovaných hrabošovitých hlodavců jsou si velmi podobné vzhledem i místy výskytu a člověk je snadno zamění (viz kapitola Literární přehled). Pro ukázkou diverzity čeledi byly do analýz zařazeny i některé další druhy hlodavců (viz kapitola Výsledky). Celkem bylo zpracováno 217 vzorků DNA, ale v konečné fylogenetické analýze už jen 195 (Tab. VI). Ne všechny vzorky vyšly během PCR a elektroforetického zpracování (zřetelné na UV vizualizaci), a to i přestože byly zpracovány vícekrát. Důvodem může být nízká koncentrace DNA, poškozená DNA z důvodu stáří vzorku, možné fragmentace (a tedy znehodnocení DNA), kvůli opakovanému používání vzorků i k jiným analýzám ostatních členů laboratoře (DNA byla opakovaně rozmrazována a zmrazována, což má vliv na její kvalitu.).

Existuje velké množství vědeckých prací, které prokázaly vztah aktivity TLR s přítomností patogenů. Nicméně je důležité v těchto výzkumech pokračovat a dále prohlubovat znalosti v oblastech imunologie a fylogeneze. V této práci (která je spíše pilotní studií na dané téma) se sice nepodařilo tuto hypotézu potvrdit, ale zatím byly k analýzám použity jednodušší počítačové programy, které zcela jasně nemohou prokázat větší variabilitu mezi jedinci parazitovanými buď kokcií *Eimeria* spp. nebo vši rodu *Hoplopleura*, mezi jedinci infikovanými oběma druhy a mezi jedinci bez parazitů. Z tohoto důvodu bude v budoucích analýzách vzorků TLR2 u hrabošů použit mnohem sofistikovanější program (PHASE), který by měl přinést kýžené výsledky pro potřebný podklad naší studie. To bude plánem mé magisterské práce, kdy pro zpracování dat použiji i set připravených sekvencí TLR2 receptoru z myšice temnopásé (*Apodemus agrarius*), a pokusím se tyto výseče jejich imunologických profilů porovnat mezi sebou.

7 ZÁVĚRY

- V průběhu práce jsem si osvojila některé laboratorní techniky a nastudovala problematiku tématu interakce hostitel – parazit.
- Díky molekulární analýze byla zajištěna správnost určení odchycených druhů hrabošovitých hlodavců.
- Na variabilitě TLR2 receptoru se neprojevil vliv žádného ze studovaných parazitů (*Eimeria* spp. a *Hoplopleura* spp.), a to ani jejich prostá přítomnost/absence, či společný výskyt.
- Variabilitu TLR nelze prokázat jednoduchými počítačovými analýzami.
- Získala jsem nová data, která budou použita v dalších rozšířených analýzách.

8 SEZNAM POUŽITÝCH INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

Anděra M., Beneš B., 2001: Atlas rozšíření savců v České republice: IV. HLODAVCI (Rodentia) - část 1. Křečkovití (Cricetidae), hrabošovité (Arvicolidae), plchovití (Gliridae). 1. Praha: Národní muzeum. ISBN 80-7036-124-7.

Anděra M., Horáček I., 2005: Poznáváme naše savce. 2. Praha: Sobotáles. ISBN 80-86817-08-3.

Bandelt H., Forster P., Röhl A., 1999: Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16:37-48.

Carleton M. D., Gardner A. L., Pavlinov I. Y., Musser G. G., 2014: The valid generic name for red-backed voles (Muroidea: Cricetidae: Arvicolinae): restatement of the case for *Myodes* Pallas, 1811. *Journal of Mammalogy*. 95: 943-959.

Dong W.-G., Song S., Guo X.-G., JIN D.-C., Yang Q., Barker S. C., Shao R., 2014: Fragmented mitochondrial genomes are present in both major clades of the blood-sucking lice (suborder Anoplura): evidence from two *Hoplopleura* rodent lice (family Hoplopleuridae). *BMC Genomics*. 15: 1-13.

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.

Gouy M., Guindon S., Gascuel O., 2010: SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic treebuilding. *Molecular Biology and Evolution*. 27:221-224.

Guindon S., Gascuel O., 2003: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*. 52: 696-704.

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.

Heckel G., Burri R., Fink 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.

- Hořejší V., Bartůňková J., Brdička T., Špišek R., 2013: Základy imunologie. 5. Praha/Kroměříž: Triton. ISBN 978-80-7387-713-2.
- Huelsenbeck J. P., Ronquist F., 2001: MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 17: 754-755.
- Chakma S., Picard J., Duffy R., Constantinoiu C., Gummow B., 2017: A survey of zoonotic pathogens carried by non-indigenous rodents at the interface of the wet tropics of North Queensland, Australia. *Transboundary and Emerging Diseases*. 64:185-193.
- 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., Martínková N., Gunduz I., Brunhoff C., Zima J., Nadachowski A., Amori G., Bulatova N. S., Chondropoulos B., Fragedakis-Tsolis S., González-Esteban J., López-Fuster M. J., Kandaurov A. S., Kefelioğlu H., Mathias M. da L., Villate I., Searle J. B., 2004: Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 33: 647-663.
- Jackson J. A., Friberg I. M., Bolch L., Lowe A., Ralli C., Harris P. D., Behnke J. M., Bradley J. E., 2009: Immunomodulatory parasites and toll-like receptor-mediated tumour necrosis factor alpha responsiveness in wild mammals. *BMC Biology*. 7: 1-13.
- Jílek P., 2014: Imunologie stručně, jasně, přehledně. 4. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4822-1.
- Krčmar S., Trilar T., 2017: The blood sucking lice (Phthiraptera: Anoplura) of Croatia: review and new data. *Turkish Journal of Zoology*. 41: 329-334.
- Laakkonen J., Oksanen A., Soveri T., Henttonen H., 1998: Dynamics of intestinal coccidia in peak density *Microtus agrestis*, *Microtus oeconomus* and *Clethrionomus glareolus* populations in Finland. *Ecography*. 21: 135-139.
- Musser G. G., Carleton M. D., 2005: Superfamily Muroidea. In: Wilson, D. E., Reeder D. M.: *Mammal Species of the World*, 3. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 894-1531.

- Oliveira-Nascimento L., Massari P., Wetzler L. M., 2012: The role of TLR2 in infection and immunity. *Frontiers in Immunology*. 3: 1-17.
- Page R.D.M., 1996: TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. 12: 357-358.
- Rynkiewicz E. C., Hawlena H., Durden L. A., Hastriter M. W., Demas G. E., Clay K., 2013: Associations between innate immune function and ectoparasites in wild rodent hosts. *Parasitology Research*. 112: 1763-1770.
- Tesakov A. S., Lebedev V. S., Bannikova A. A., Abramson N. I., 2010: *Clethrionomys Tilesius*, 1850 is the valid generic name for red-backed voles and *Myodes* Pallas, 1811 is a junior synonym of *Lemmus* Link, 1795. *Russian Journal of Theriology*. 9: 83-86.
- Tschirren B., 2015: *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection pressure shapes innate immune gene evolution in natural rodent populations across Europe. *Biology Letters*. 11: 1-3.
- Tschirren B., Andersson M., Scherman K., Westerdahl H., Mittl P. R. E., Råberg L., 2013: Polymorphisms at the innate immune receptor TLR2 are associated with *Borrelia* infection in a wild rodent population. *Proceedings of the Royal Society*. 280: 1-8.
- Tschirren B., Andersson M., Scherman K., Westerdahl H., Råberg L., 2011: Contrasting patterns of diversity and population differentiation at the innate immunity gene toll-like receptor 2 (TLR2) in two sympatric rodent species. *Evolution*. 66: 720-731.
- Vance T. L., Duszynski D. W., 1985: Coccidian parasites (Apicomplexa: Eimeriidae) of *Microtus* spp. (Rodentia: Arvicolidae) from the United States, Mexico, and Japan, with descriptions of five new species. *Journal of Parasitology*. 71: 302-311.
- Volf P., Horák P., Čepička I., Flegr J., Lukeš J., Mikeš L., Svobodová M., Vávra J., Votýpka J., 2007: *Paraziti a jejich biologie*. 1. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-008-9.
- Weaver H. J., 2017: Three new species of the sucking louse genus *Hoplopleura* (Phthiraptera: Anoplura: Hoplopleuridae) from rodents (Mammalia: Rodentia: Muridae) in northern Australia. *Zootaxa*. 4247: 31-44.
- Westermeier R., 2001: *Electrophoresis in Practice*. 3. Weinheim: WILEY-VCH. ISBN 3-527-30300-6.

Zajac A. M., Conboy G. A., 2006: Veterinary clinical parasitology. 7. Iowa: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1734-7.

Zhou Z., Wang Z., Cao L., Hu S., Zhang Z., Qin B., Guo Z., Nie K., 2013: Upregulation of chicken TLR4, TLR15 and MyD88 in heterophils and monocyte-derived macrophages stimulated with *Eimeria tenella* in vitro. Experimental Parasitology. 133: 427-433.

Internetové zdroje

DNASTAR Inc. [online]. [2018-10-14]. Dostupné z: <https://www.dnastar.com/t-seqmanpro.aspx>

DNASTAR Inc. [online]. [2018-10-14]. Dostupné z: <https://www.dnastar.com/t-editseq.aspx>

Inkscape [online]. [2018-03-25]. Dostupné z: <https://inkscape.org/en/>

Lucie Vondřejcová. Památky UNESCO ČR thinglink [online]. [2018-02-05]. Dostupné z: <https://www.thinglink.com/scene/885803308223037440>

Mapa Evropy [online]. [2018-02-05]. Dostupné z: <http://www.mapaevropy.com/slepa-mapa-evropy>

National Center for Biotechnology Information [online]. [2017-10-15]. Dostupné z: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch

Specializovaný portál o všich [online]. [2018-02-28]. Dostupné z: <http://vsi.nazory.cz/foto.html>

Thermo Fisher Scientific. Applied Biosystems [online]. [2017-10-15]. Dostupné z: <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600583&tab=Overview>

Thermo scientific [online]. [2018-01-20]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012007 Exonuclease I Exo I UG.pdf>

Web of Science [online]. [2018-03-14]. Dostupné z: <https://webofknowledge.com>

Zoologie [online]. [2018-02-28]. Dostupné z: <http://www.zoologie.frasma.cz/mmp%200102%20Chromalveolata/Chromalveolata.html>

9 SEZNAM PŘÍLOH

Tab. V: Lokality evropských zemí odchyty.

Země	Lokalita
Bulharsko	Ljetnica, Mohyla Kosmatka, Kamen Brjag, Kabile
Chorvatsko	Veliko Svinjicko, Jamarica, Sunja
Finsko	Isojärvi, Ylöjärvi
Maďarsko	Alsonémedi, Sári, Kecskeméti Utca, Korosladány, Medgyesegyháza
Polsko	Pultusk, Nowy Zyzdrój, Gierzwald
Rusko	Pskov

Zdroj: autor práce, 2018

Tab. VI: Zpracované vzorky DNA.

Název	Druh	Lokalita	Endoparazité	Ektoparazité
BHagr0203	<i>Mi.agrestis</i>	Bulharsko	<i>Eimeria</i>	x
BHagr0204	<i>Mi.agrestis</i>	Bulharsko	x	x
BHagr0205	<i>Mi.agrestis</i>	Bulharsko	<i>Eimeria</i>	x
BHagr0403	<i>Mi.agrestis</i>	Bulharsko	x	x
BHagr0404	<i>Mi.agrestis</i>	Bulharsko	x	x
BHagr0701	<i>Mi.agrestis</i>	Bulharsko	x	x
BHagr0702	<i>Mi.agrestis</i>	Bulharsko	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
BHagr0704	<i>Mi.agrestis</i>	Bulharsko	<i>Eimeria</i>	x
BHagr0705	<i>Mi.agrestis</i>	Bulharsko	<i>Eimeria</i>	x
BHagr0706	<i>Mi.agrestis</i>	Bulharsko	x	x
BHagr0707	<i>Mi.agrestis</i>	Bulharsko	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
BHagr0709	<i>Mi.agrestis</i>	Bulharsko	<i>Eimeria</i>	x
BHagr0710	<i>Mi.agrestis</i>	Bulharsko	x	x
BOCHagr46	<i>Mi.agrestis</i>	Bochov	<i>Eimeria</i>	x
CBagr8	<i>Mi.agrestis</i>	ČB	x	x
HGagr0601	<i>Mi.agrestis</i>	Maďarsko	x	x
CHagr2	<i>Mi.agrestis</i>	Chorvatsko	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
LITagr11514	<i>Mi.agrestis</i>	Litvínov	<i>Eimeria</i>	x
LITagr14	<i>Mi.agrestis</i>	Litvínov	<i>Eimeria</i>	x

LITagr2814	<i>Mi. agrestis</i>	Litvínov	<i>Eimeria</i>	x
LUZagr23	<i>Mi. agrestis</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZagr36	<i>Mi. agrestis</i>	Lužnice	x	x
LUZagr41	<i>Mi. agrestis</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
RUagr0914	<i>Mi. agrestis</i>	Rusko	<i>Eimeria</i>	x
RUagr1114	<i>Mi. agrestis</i>	Rusko	<i>Eimeria</i>	x
RUagr4	<i>Mi. agrestis</i>	Rusko	x	x
STRagr0211	<i>Mi. agrestis</i>	Stružná	x	x
STRagr32	<i>Mi. agrestis</i>	Stružná	<i>Eimeria</i>	x
STRagr35	<i>Mi. agrestis</i>	Stružná	<i>Eimeria</i>	x
STRagr5	<i>Mi. agrestis</i>	Stružná	x	<i>Hoplopleura</i>
BHarv0101	<i>Mi. arvalis</i>	Bulharsko	<i>Eimeria</i>	x
BHarv0206	<i>Mi. arvalis</i>	Bulharsko	x	x
BHarv0207	<i>Mi. arvalis</i>	Bulharsko	<i>Eimeria</i>	x
BHarv0405	<i>Mi. arvalis</i>	Bulharsko	<i>Eimeria</i>	x
BHarv0406	<i>Mi. arvalis</i>	Bulharsko	x	x
CBarv01	<i>Mi. arvalis</i>	ČB	x	x
CBarv08	<i>Mi. arvalis</i>	ČB	<i>Eimeria</i>	x
CBarv1	<i>Mi. arvalis</i>	ČB	x	x
CBarv2	<i>Mi. arvalis</i>	ČB	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
CBarv3	<i>Mi. arvalis</i>	ČB	x	<i>Hoplopleura</i>
CBarv4	<i>Mi. arvalis</i>	ČB	<i>Eimeria</i>	x
CBarv5	<i>Mi. arvalis</i>	ČB	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
CBarv6	<i>Mi. arvalis</i>	ČB	<i>Eimeria</i>	x
CBarv7	<i>Mi. arvalis</i>	ČB	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
HGarv0501	<i>Mi. arvalis</i>	Maďarsko	x	x
HGarv0601	<i>Mi. arvalis</i>	Maďarsko	<i>Eimeria</i>	x
HGarv0602	<i>Mi. arvalis</i>	Maďarsko	<i>Eimeria</i>	x
HGarv0603	<i>Mi. arvalis</i>	Maďarsko	<i>Eimeria</i>	x
HGarv1401	<i>Mi. arvalis</i>	Maďarsko	x	<i>Hoplopleura</i>
HGarv1402	<i>Mi. arvalis</i>	Maďarsko	x	x
HGarv1403	<i>Mi. arvalis</i>	Maďarsko	x	<i>Hoplopleura</i>
HGarv1408	<i>Mi. arvalis</i>	Maďarsko	<i>Eimeria</i>	x
HGarv1409	<i>Mi. arvalis</i>	Maďarsko	x	x
HGarv4	<i>Mi. arvalis</i>	Maďarsko	<i>Eimeria</i>	x
HGarv5	<i>Mi. arvalis</i>	Maďarsko	x	x
HGarv7	<i>Mi. arvalis</i>	Maďarsko	<i>Eimeria</i>	x
CHarv1	<i>Mi. arvalis</i>	Chorvatsko	x	<i>Hoplopleura</i>
CHarv102	<i>Mi. arvalis</i>	Chorvatsko	x	x

CHarv2	<i>Mi. arvalis</i>	Chorvatsko	x	<i>Hoplopleura</i>
CHarv3	<i>Mi. arvalis</i>	Chorvatsko	x	x
CHarv4	<i>Mi. arvalis</i>	Chorvatsko	x	<i>Hoplopleura</i>
CHarv9	<i>Mi. arvalis</i>	Chorvatsko	<i>Eimeria</i>	x
CHELarv1	<i>Mi. arvalis</i>	Chelčice	x	<i>Hoplopleura</i>
CHELarv13	<i>Mi. arvalis</i>	Chelčice	x	x
CHELarv2	<i>Mi. arvalis</i>	Chelčice	x	<i>Hoplopleura</i>
CHELarv3	<i>Mi. arvalis</i>	Chelčice	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
CHELarv6	<i>Mi. arvalis</i>	Chelčice	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
CHELarv8	<i>Mi. arvalis</i>	Chelčice	x	x
LITarv1	<i>Mi. arvalis</i>	Litvínov	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
LITarv10	<i>Mi. arvalis</i>	Litvínov	x	<i>Hoplopleura</i>
LITarv11	<i>Mi. arvalis</i>	Litvínov	x	x
LITarv2	<i>Mi. arvalis</i>	Litvínov	x	x
LITarv3	<i>Mi. arvalis</i>	Litvínov	<i>Eimeria</i>	x
LITarv4	<i>Mi. arvalis</i>	Litvínov	<i>Eimeria</i>	x
LITarv6	<i>Mi. arvalis</i>	Litvínov	x	x
LITarv7	<i>Mi. arvalis</i>	Litvínov	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
LITarv8	<i>Mi. arvalis</i>	Litvínov	x	x
LUZarv11	<i>Mi. arvalis</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZarv17	<i>Mi. arvalis</i>	Lužnice	x	x
LUZarv26	<i>Mi. arvalis</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZarv27	<i>Mi. arvalis</i>	Lužnice	x	x
LUZarv32	<i>Mi. arvalis</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZarv3315	<i>Mi. arvalis</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZarv3515	<i>Mi. arvalis</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZarv4815	<i>Mi. arvalis</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZarv5615	<i>Mi. arvalis</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
NJarv12	<i>Mi. arvalis</i>	Nový Jičín	x	x
NJarv19	<i>Mi. arvalis</i>	Nový Jičín	x	<i>Hoplopleura</i>
NJarv32	<i>Mi. arvalis</i>	Nový Jičín	x	<i>Hoplopleura</i>
NJarv88	<i>Mi. arvalis</i>	Nový Jičín	x	x
PLarv11	<i>Mi. arvalis</i>	Polsko	x	x
PLarv13	<i>Mi. arvalis</i>	Polsko	x	x
PnDarv2	<i>Mi. arvalis</i>	Petrov n. Desnou	x	<i>Hoplopleura</i>
STRarv0208	<i>Mi. arvalis</i>	Stružná	x	x
STRarv0209	<i>Mi. arvalis</i>	Stružná	<i>Eimeria</i>	x
STRarv2	<i>Mi. arvalis</i>	Stružná	<i>Eimeria</i>	x

STRarv37	<i>Mi. arvalis</i>	Stružná	<i>Eimeria</i>	x
STRarv39	<i>Mi. arvalis</i>	Stružná	<i>Eimeria</i>	x
STRarv41	<i>Mi. arvalis</i>	Stružná	<i>Eimeria</i>	x
STRarv43	<i>Mi. arvalis</i>	Stružná	x	x
STRarv44	<i>Mi. arvalis</i>	Stružná	x	<i>Hoplopleura</i>
FINcg24	<i>My. glareolus</i>	Finsko	x	x
FINcg27	<i>My. glareolus</i>	Finsko	<i>Eimeria</i>	x
FINcg28	<i>My. glareolus</i>	Finsko	x	x
FINcg29	<i>My. glareolus</i>	Finsko	<i>Eimeria</i>	x
FINcg32	<i>My. glareolus</i>	Finsko	x	<i>Hoplopleura</i>
FINcg33	<i>My. glareolus</i>	Finsko	<i>Eimeria</i>	x
HGcg1	<i>My. glareolus</i>	Maďarsko	<i>Eimeria</i>	x
CHcg11	<i>My. glareolus</i>	Chorvatsko	x	x
CHcg2	<i>My. glareolus</i>	Chorvatsko	x	x
CHcg3	<i>My. glareolus</i>	Chorvatsko	x	x
CHcg6	<i>My. glareolus</i>	Chorvatsko	x	x
CHcg7	<i>My. glareolus</i>	Chorvatsko	x	x
JACHcg10	<i>My. glareolus</i>	Jáchymov	x	<i>Hoplopleura</i>
JACHcg11	<i>My. glareolus</i>	Jáchymov	x	x
JACHcg16	<i>My. glareolus</i>	Jáchymov	x	x
JACHcg2	<i>My. glareolus</i>	Jáchymov	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
JACHcg3	<i>My. glareolus</i>	Jáchymov	x	x
JACHcg5	<i>My. glareolus</i>	Jáchymov	x	x
JEScg	<i>My. glareolus</i>	Jeseníky	<i>Eimeria</i>	x
LITcg0214	<i>My. glareolus</i>	Litvínov	<i>Eimeria</i>	x
LITcg1	<i>My. glareolus</i>	Litvínov	<i>Eimeria</i>	x
LITcg103	<i>My. glareolus</i>	Litvínov	x	x
LITcg36	<i>My. glareolus</i>	Litvínov	x	<i>Hoplopleura</i>
LITcg40	<i>My. glareolus</i>	Litvínov	<i>Eimeria</i>	x
LITcg6	<i>My. glareolus</i>	Litvínov	<i>Eimeria</i>	x
LITcg8	<i>My. glareolus</i>	Litvínov	<i>Eimeria</i>	x
LITcgD2	<i>My. glareolus</i>	Litvínov	x	x
LUZcg05	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg12	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	x	x
LUZcg18	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	x	x
LUZcg2	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg20	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	x	x
LUZcg22	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg25	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x

LUZcg26	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	x	x
LUZcg27	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg29	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	x	x
LUZcg3	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg30	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg31	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	x	x
LUZcg33	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	x	x
LUZcg34	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg35	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg37	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	x	x
LUZcg3701	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg39	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	x	x
LUZcg40	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	x	x
LUZcg44	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg47	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg51	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg6	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg60	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg61	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg62	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg67	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg8	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
LUZcg9	<i>My. glareolus</i>	Lužnice	<i>Eimeria</i>	x
NJcg	<i>My. glareolus</i>	Nový Jičín	<i>Eimeria</i>	x
NJcg11	<i>My. glareolus</i>	Nový Jičín	x	x
NJcg13	<i>My. glareolus</i>	Nový Jičín	x	x
NJcg14	<i>My. glareolus</i>	Nový Jičín	x	x
NJcg15	<i>My. glareolus</i>	Nový Jičín	x	x
NJcg39	<i>My. glareolus</i>	Nový Jičín	x	x
NJcg42	<i>My. glareolus</i>	Nový Jičín	x	x
PLcg	<i>My. glareolus</i>	Polsko	x	x
PLcg21	<i>My. glareolus</i>	Polsko	x	x
PLcg22	<i>My. glareolus</i>	Polsko	x	<i>Hoplopleura</i>
PLcg27	<i>My. glareolus</i>	Polsko	<i>Eimeria</i>	x
PLcg28	<i>My. glareolus</i>	Polsko	<i>Eimeria</i>	x
PLcg32	<i>My. glareolus</i>	Polsko	<i>Eimeria</i>	x
PLcg33	<i>My. glareolus</i>	Polsko	x	x
PLcg4	<i>My. glareolus</i>	Polsko	x	x
PLcg6	<i>My. glareolus</i>	Polsko	x	<i>Hoplopleura</i>

PLcg7	<i>My. glareolus</i>	Polsko	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
PLcg78	<i>My. glareolus</i>	Polsko	<i>Eimeria</i>	x
PLcg8	<i>My. glareolus</i>	Polsko	<i>Eimeria</i>	x
PLcg82	<i>My. glareolus</i>	Polsko	x	<i>Hoplopleura</i>
PLcg83	<i>My. glareolus</i>	Polsko	x	<i>Hoplopleura</i>
PLcg96	<i>My. glareolus</i>	Polsko	<i>Eimeria</i>	x
PLcg98	<i>My. glareolus</i>	Polsko	x	x
PnDcg3	<i>My. glareolus</i>	Petrov n. Desnou	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
RUcg	<i>My. glareolus</i>	Rusko	<i>Eimeria</i>	x
RUcg022	<i>My. glareolus</i>	Rusko	<i>Eimeria</i>	x
RUcg030	<i>My. glareolus</i>	Rusko	x	x
RUcg11	<i>My. glareolus</i>	Rusko	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
RUcg14	<i>My. glareolus</i>	Rusko	<i>Eimeria</i>	x
RUcg16	<i>My. glareolus</i>	Rusko	<i>Eimeria</i>	x
RUcg22	<i>My. glareolus</i>	Rusko	<i>Eimeria</i>	x
RUcg25	<i>My. glareolus</i>	Rusko	<i>Eimeria</i>	x
RUcg33	<i>My. glareolus</i>	Rusko	<i>Eimeria</i>	<i>Hoplopleura</i>
RUcg9	<i>My. glareolus</i>	Rusko	x	x
STRcg0205	<i>My. glareolus</i>	Stružná	x	x
STRcg25	<i>My. glareolus</i>	Stružná	<i>Eimeria</i>	x
STRcg26	<i>My. glareolus</i>	Stružná	<i>Eimeria</i>	x

Zdroj: autor práce, 2018