

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta tropického zemědělství



Fakulta tropického  
zemědělství

**Populační genetická struktura Euroasijských  
krtků**

Bakalářská práce

Praha 2018

**Vedoucí práce:** Mgr. Barbora Černá Bolfíková, Ph.D.

**Konzultant:** Doc. Pavel Hulva, Ph.D

**Vypracovala:** Iva Bernáthová

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Populační Genetická struktura euroasijských krtků” vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Barbory Černé Bolfikové, Phd. a s použitím literatury a zdrojů informací řádně uvedených v referencích podle Citační normy FTZ.

V Praze dne 20.04.2018

---

Iva Bernáthová

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce Báře Černé Bolfikové za spoustu trpělivosti (hlavně při zpracování dat), za pomoc a podporu, dále Mileně Jindřichové a Silvě Neradilové za asistenci a pomoc v laboratoři a při analýzách, jakožto i dalším, kteří se (třeba i náhodně) podíleli na laboratorní práci.

Za zmínku stojí také díky Doc. Pavlu Hulvovi, Ph.D. a ostatním „sběračům” z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, kteří poskytli vzorky, bez kterých by nevznikla laboratorní část.

Na závěr bych ráda poděkovala rodině a přátelům za psychickou a morální podporu.

## Abstrakt

Krtci jsou skupinou výhradně fosoriálních (pod zemí žijících) savců obývajících evropský kontinent, Asii a přilehlá souostroví. Kvůli podzemnímu způsobu života a své morfologické uniformitě jsou řídké prozkoumanou skupinou. Krtek evropský (*Talpa europea*; Eulipotyphla: Talpidae) je nejúspěšnějším druhem z celé skupiny krtků. Krtek evropský, na rozdíl od většiny podzemních savců, obývá vlhké lesy a louky mírného pásu, které byly silně ovlivněny změnami klimatu, především během pleistocénu. Cílem studie bylo zhodnocení populační struktury, variability a velikosti efektivní populace krtka evropského ve střední Evropě pomocí molekulárních metod. Celkem bylo osekvenováno 40 vzorků a do analýzy zahrnuto kontrolní oblast mtDNA, sekvence byly editovány a dále analyzovány. V datasetu byly pomocí landscape genetic nalezeny dvě populace - západní a východní. Celkově populace vykazovala vysokou haplotypovou diverzitu, počet identifikovaných haplotypů byl 23. Tvar haplotypové sítě, testy neutrality a další parametry ukazují na demografickou expanzi, která v populaci v minulosti proběhla nebo na purifikující selekci.

**Klíčová slova:** fylogeneze, genetická variabilita, krtci, mitochondriální DNA, populační genetika, *Talpa europea*

## Abstract

Moles are a group of strictly subterranean mammals occupying most of the European continent, Asia and nearby islands. Due to their fossoriality and external uniformity, the information on moles is scarce. The European mole *Talpa europea* (Eulipotyphla: Talpidae) is the most successful species of this group. The European mole prefers, unlike most fossorial mammals, humid forests and meadows which were strongly under influence of climate changes, mostly during Pleistocene. The aims of the study were to analyze population structure, variability and effective population size of European mole population in the Middle Europe using molecular methods. 274 bp long mitochondrial control region of 40 samples of *Talpa europea* was included in the analysis. Using landscape genetic method, two populations (western and eastern) in the dataset were found. Population showed high haplotype diversity, the number of identified haplotypes was 23. The structure of haplotype network, the results of neutrality tests and other parameters showed demographic expansion, which the population underwent in the past, or purifying selection.

**Key words:** genetic variability, mitochondrial DNA, moles, phylogeny, population genetics, *Talpa europea*

# Obsah

Abstrakt	1
Abstract	2
Obsah	3
Seznam obrázků	4
Seznam tabulek	6
1 Úvod	7
1.1 Taxonomické zařazení krtků	7
1.2 Fylogeneze skupiny Eulipotyphla	9
1.3 Talpidae	10
1.3.1 Vznik a rozšíření Talpidae	10
1.3.2 Tribus Scalopini	11
1.3.3 Tribus Talpini	11
1.3.4 Asijská linie Talpini	12
1.3.5 Evropská linie Talpini	17
1.3.6 Rod Talpa	18
2 Cíle práce	27
3 Materiál a metody	28
3.1 Sběr vzorků	28
3.2 Izolace DNA	31
3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	31
3.4 Purifikace amplifikovaného úseku	32
3.5 Sekvence amplifikovaného úseku	32
3.6 Analýza dat	33
4 Výsledky	35
5 Diskuze	41
6 Závěry	44
7 Reference	45

## Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Fylogenetický strom zobrazující tři hlavní linie (nadřády) placentálních savců včetně Laurasiatheria.....	8
Autor: Nery <i>et al.</i> , 2012	
Obrázek č. 2: Fylogenetické stromy tribu Talpini.....	12
Autor: He <i>et al.</i> , 2014	
Obrázek č. 3: Externí morfologie druhu Euroscaptor subanura.....	14
Autor: Kawada <i>et al.</i> , 2012	
Obrázek č. 4: Časová osa nejdůležitějších divergenčních událostí v rámci rodu Talpa vytvořená metodou BEAST.....	19
Autor: Bannikova <i>et al.</i> , 2015B	
Obrázek č. 5: Fylogenetický strom rodu <i>Talpa</i> , patrné je zde oddělení tohoto rodu od asijských krtků.....	21
Autor: Colangelo <i>et al.</i> , 2010	
Obrázek č. 6: Distribuční modely pro tři linie <i>Talpa europea</i> pro současné klimatické podmínky (Current) a poslední glaciální maximum (LGM).....	23
Autor: Nicolas <i>et al.</i> , 2017	
Obrázek č. 7: Distribuční modely pro druh <i>Talpa europaea</i> .....	24
Autor: Feuda <i>et al.</i> , 2015	
Obrázek č. 8: Mapa ukazující základní fylogenetické linie <i>Talpa europaea</i> v Evropě podle mtDNA.....	25
Autor: Nicolas <i>et al.</i> 2017	
Obrázek č. 9: Mapa vzorkování <i>Talpa europea</i> .....	28
Obrázek č. 10: Haplotypová síť pro <i>Talpa europea</i> vytvořená metodou Median-Joining.....	27
Obrázek č. 11: Analýza mismatch distribution pro <i>Talpa europea</i> vytvořený v programu DnaSp6.....	38
Obrázek č. 12: Bayesiánský skyline plot pro <i>Talpa europea</i> vytvořený na základě 40 částečných sekvencí kontrolní oblasti mtDNA.....	39

Obrázek č. 13: Mapa zobrazující výskyt populací na území České republiky vytvořená v programu Geneland na základě kontrolního úseku mtDNA.....40



## Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Vzorčky <i>Talpa europaea</i> zahrnuté ve studii.....	29
Tabulka č. 2: Složení reakční směsi pro PCR.....	31
Tabulka č. 3: Protokol pro termocycler použitý při amplifikaci.....	32
Tabulka č. 4: Složení reakční směsi pro sekvenační analýzu.....	32
Tabulka č. 5: Vzdálenosti mezi jedinci vyjádřené pomocí p-distancí.....	36
Tabulka č. 6: Analýza vnitrodruhové genetické diverzity <i>Talpa europaea</i> .....	37

# 1 Úvod

## 1.1 Taxonomické zařazení krtků

Původně byli krtci čeledi Talpidae zařazeni v taxonu Insectivora spolu s dalšími malými hmyzožravými savci náležícími do desíti vzdálených čeledí. (Douady *et al.*, 2009). Savci náležící do Insectivora byli dlouhou dobu považováni za předky, z nichž se vyvinula řada modernějších savců, což se při dalším výzkumu nepotvrdilo (Douady *et al.*, 2002). Řád Insectivora býval jedním z nejméně stabilních taxonů Eutheria, jak z hlediska fylogeneze, tak z hlediska vzájemných vztahů v taxonu a struktura taxonu byla mnohokrát diskutována (Stanhope *et al.*, 1998). Insectivora se tak stali středem zájmu nejen z hlediska pochopení vztahů mezi skupinami, ale i z hlediska výzkumu evoluce placentálních savců (Douady *et al.*, 2002).

Později byla skupina Insectivora rozdělena na dva podřády podle přítomnosti či absence slepého střeva – Menotyphla a Lipotyphla. Tento koncept rozdělení musel být však přehodnocen kvůli narůstajícímu počtu morfologických důkazů svědčících proti tomuto rozdělení (Ye *et al.*, 2006).

Dle výsledků těchto studií byly vyřazeny letuchy, tany a bércouni, původně patřící k Menotyphla. Tito živočichové byli přeřazeni do nově vytvořených samostatných řádů – Dermoptera, Scandentia a Macroscelidea (Douady *et al.*, 2002).

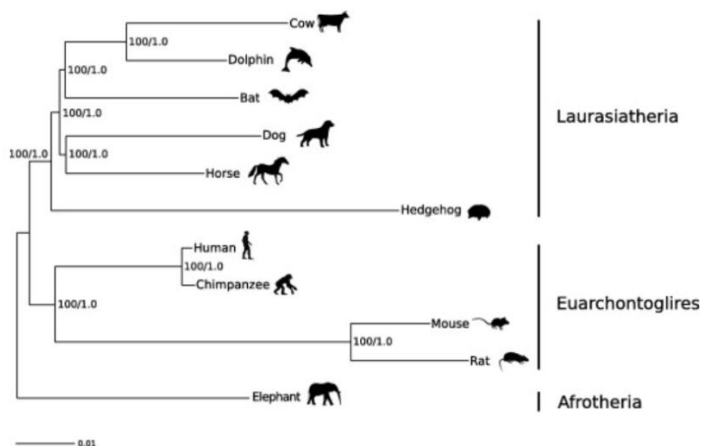
Zbývající skupiny vytvořily morfologicky monofyletický taxon Lipotyphla, do něhož náležící druhy sdílely řadu pleziomorfních primitivních znaků a adaptací (Mouchaty *et al.*, 2000).

Právě primitivnost morfologických znaků činila další výzkum evoluční historie Lipotyphla obtížnou. Další studium vzájemných vztahů uvnitř skupiny Lipotyphla umožnil rozšířený rozvoj molekulárních metod (Douady *et al.*, 2009).

Molekulární data ukázala, že Lipotyphla je ve skutečnosti polyfyletický taxon. Byl proto vytvořen samostatný řád Afrosoricida pro bodlínky a zlatokrty. Zbývající taxony vytvořily řád Eulipotyphla („praví“ hmyzožravci) (Douady *et al.*, 2002). Řád Afrosoricida je řazen do skupiny Afrotheria, který představuje placentální savce, kteří se vyvinuli v oblasti Afriky, poblíž Madagaskaru. Afričtí insektivorní savci zřejmě pocházejí z jednoho předka a vznikly adaptivní radiací během izolace Afriky v období křídý (Springer *et al.*, 1997).

Eulipotyphla, tzv. „praví“ hmyzožravci, nyní spadají do nadřádu Laurasiaheria spolu s dalšími pěti řády (Perissodactyla, Carnivora, Cetarciodactyla, Chiroptera a Pholitoda) (viz obrázek č. 1). Laurasiatheria zahrnuje savce, kteří mají původ na superkontinentu Laurasie, kde byli také původně rozšířeni (Hu *et al.*, 2012).

Laurasiatheria se začali diverzifikovat v eocénu před 1-4 miliony let (Hu *et al.*, 2012). I přes mnohé diskuze jsou Eulipotyphla považováni za bazální skupinu, tzn. že se oddělili od Laurasiatheria jako první a jsou sesterskou skupinou vzhledem k ostatním skupinám Laurasiatheria (Zhou *et al.*, 2012).



**Obrázek č. 1: Fylogenetický strom zobrazující tři hlavní linie (nadřády) placentálních savců včetně Laurasiatheria, sestavený na základě analýzy protein kódujících genů. Skupinu Eulipotyphla zde zastupuje ježek. Čísla nad jednotlivými nody odpovídají hodnotám bootstrap value a bayeským posteriorním pravděpodobnostem. Autor: Nery *et al.*, 2012**

Řád Eulipotyphla nyní zahrnuje čtyři čeledi: Erinaceidae (ježci, 2 podřády, 10 rodů, 23 druhů), Soricidae (rejsci a bělozubky, 3 podřády, 26 a 376 druhů), Solenodontidae (štětinatci, jediný rod, 4 druhy) a Talpidae (krtci, 3 podřády, 17 rodů a 39 druhů) (Douady *et al.*, 2009).

## 1.2 Fylogeneze skupiny Eulipotyphla

Eulipotyphla je jednou z klíčových skupin pro studium evoluce savců. Primitivní morfologické znaky, které si skupina zachovala, nasvědčují, že se skupina diverzifikovala během rané radiace placentálních savců (Biltueva *et al.*, 2012).

Diverzifikaci skupiny Eulipotyphla pravděpodobně odstartovalo hromadné vymírání na přelomu křídý a paleogénu. Nově vzniklé ekologické niky tak mohly být obsazeny vznikajícími druhy během velmi raného paleogénu (Douady *et al.*, 2009).

Nejvyšší úroveň diverzifikace dosáhli Eulipotyphla v době před přibližně 12 miliony lety (Standler *et al.*, 2011). Historické události vedoucí ke vzniku krtčí linie jsou nejasné. Možná k němu přispěla klimatická nebo tektonická událost v pozdní křídě před 84-71 miliony let (Douady *et al.*, 2009).

Vzhledem k tomu, že krtci vykazují největší míru zachování chromozomu, tzn. že u nich došlo k nejméně změnám ve struktuře chromozomů (translokace, inverze, apod.), v porovnání s ostatními skupinami v rámci Eulipotyphla, lze předpokládat, že Talpidae jsou bazálním taxonem a oddělily se od Eulipotyphla jako první, jak bylo zmíněno výše (Biltueva *et al.*, 2012).

## 1.3 Talpidae

### 1.3.1 Vznik a rozšíření Talpidae

Pro skupinu bylo důležité období pozdních třetihor, kdy došlo k adaptivní radiaci a vývoji řady znaku, které umožnily jednotlivým druhům obsadit různá prostředí, na souši i ve vodě (Shinohara *et al.*, 2003).

Nejstarší fosilní nálezy jedinců patřících k Talpidae pocházejí z pozdního eocénu a oligocénu a byly nalezeny v Evropě a Severní Americe (Shinohara *et al.*, 2003). Talpidae mají původ ve Starém světě, odkud se rozšířili do Severní Ameriky (rody *Condylura*, *Neurotrichus*, *Parascalops* a společný předek *Scalopus* a *Scapanus*) (Shinohara *et al.*, 2003; Whidden, 2000).

Během osidlování nových oblastí se druhy skupiny Talpidae dvakrát nezávisle adaptovaly na život pod zemí. Tuto skutečnost podporuje přítomnost dvou linií - severoamerické a euroasijské. Tyto dvě linie si nejsou blízké příbuzné, výjimku tvoří pouze druh *Scapanulus* pocházející z Číny a severoameričtí krtci skupiny Scalopini (Shinohara *et al.*, 2003). Monotypický *Scapanulus* tvoří jeden tribus Scalopini (rody *Scalopus*, *Scapanus*, *Parascalops*). Zbytek euroasijských rodů (*Euroscaptor*, *Mogera*, *Talpa*, *Parascaptor*, *Scapanulus*) tvoří druhý tribus Talpini. (Bannikova *et al.*, 2015B).

Podle analýzy mtDNA (mitochondriální DNA) lze rozlišit Talpidae na sedm větví: asijské krtci (druh *Uropsilus*), severoameričtí vodní a fosoriální krtci (rod *Condylura*), severoameričtí fosoriální krtci (rody *Parascalops*, *Scalopus*, *Scapanus*), severoameričtí semifosoriální krtci (rod *Neurotrichus*), japonské semifosoriální krtci (rody *Dymecodon*, *Urotrichus*), evropské semiakvatické vychucholové (rod *Desmana*) a euroasijské fosoriální krtci (rody *Euroscaptor*, *Mogera*, *Talpa*) (Shinohara *et al.*, 2003).

Krtčí rody striktně upřednostňující život pod zemí obývají rozsáhlé oblasti Evropy, Asie, Japonska i Jižní Ameriky. Naopak druhy žijící semifosoriálně vykazují omezené rozšíření (Shinohara *et al.*, 2003).

### **1.3.2 Tribus Scalopini**

Striktně severoamerický tribus Scalopini zastupuje v Eurasii pouze monotypický *Scapanulus oweni*. Tribus se jeví jako sesterský podle morfologických analýz (tvar lebky) k tribu Talpini, což by také naznačovalo jednotný původ fosoriality, tj. úplné adaptace na podzemní prostředí, u euroasijských a severoamerických krtků. Tento sesterský vztah však nepodporují molekulární data, což naopak potvrzuje nezávislý vývoj fosoriality u těchto dvou skupin. (Bannikova *et al.*, 2015A).

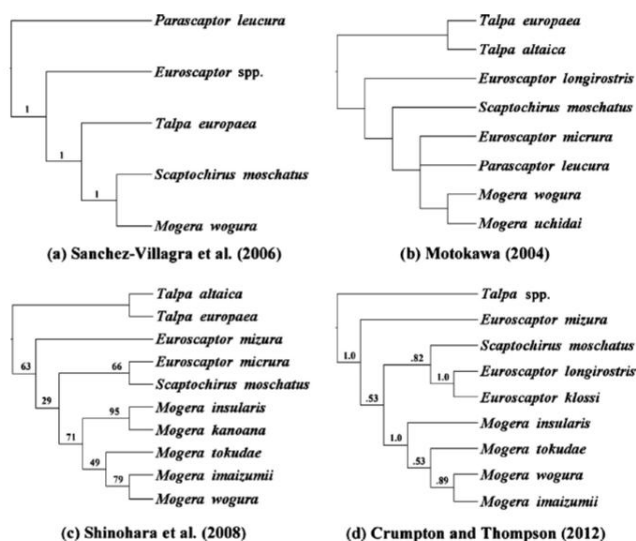
Podle fosilních nálezů mají Scalopini původ v oligocénu v Eurasii. Posléze se nezávisle rozšířili do Asie a Severní Ameriky. Předci severoamerických druhů po extenzivní radiaci v Eurasii mohli migrovat přes pevninský most v západním Atlantiku nebo Beringově moři, možná i několikrát nezávisle po sobě. Tomu nasvědčují i fosilní nálezy z Ameriky pocházející až ze středního miocénu (Bannikova *et al.*, 2015A).

V Asii poté mohli být Scalopini nahrazeni jinými liniemi, s výjimkou recentního *S. oweni*, jenž dnes obývá malý areál v centrální Číně (Gansu, Shaanxi, sever Sečuánu, východ Quinghai) (Bannikova *et al.*, 2015A).

### **1.3.3 Tribus Talpini**

Talpini je skupina (tribus) výhradně fosoriálních krtků žijících na celém území Evropy a Asie. Rody *Euroscaptor*, *Mogera*, *Parascaptor* a *Scaptochirus* jsou endemické druhy Dálného Východu, zatímco areál rozšíření rodu *Talpa* se rozkládá od západní Evropy a Asie k Sibiři (He *et al.*, 2014). Nejstarší fosilní nálezy pocházejí z Irkutska v Rusku a datují se do období miocénu asi před 20,5-16,4 miliony let (Shinohara *et al.*,

2014). Na obrázku č. 2 je srovnání fylogenetických stromů tribu Talpini založených na morfologických a molekulárních datech.



**Obrázek č. 2: Fylogenetické stromy tribu Talpini založené na morfologických studiích (a a b) a molekulárních datech (c a d). Čísla nad větvemi odpovídají hodnotám podpory větví (a), hodnotám bootstrap value (c) nebo posteriorním pravděpodobnostem (d). Autor: He *et al.*, 2014**

### 1.3.4 Asijská linie Talpini

#### 1.3.4.1 Fylogeneze a taxonomie asijské linie Talpini

Druhy endemické pro Asii se vyvinuly během rychlé radiace v průběhu pozdního miocénu, přibližně před 12,32-9,06 miliony let, kdy došlo k vyzdvižení Tibetsko-himalájské plošiny a následné změně klimatu v oblasti, tj. vyšší aridita, ochlazení a zesílení vlivu monzunů a změna vegetačního pokryvu (He *et al.*, 2014).

Asijští krtci z pevninské Asie kolonizovali Japonsko, východní Čínu a jihozápadní Čínu v pozdním miocénu a poté byli během krátké doby od sebe oddělení fyzicky (kvůli vzniklým horským masivům) a klimaticky (neobyvatelné oblasti), což umožnilo oddělený vývoj populací (He *et al.*, 2014). Japonské ostrovy naopak sloužily jako glaciální refugia a místa, kde mohly být jednotlivé východoasijské linie Talpidae uchovány po migraci z pevninské Asie. Oblasti Japonských ostrovů díky

tomu vykazují největší druhovou diverzitu ve východní Asii (Shinohara *et al.*, 2004B).

Asijská větev Talpini zahrnuje čtyři rody – *Euroscaptor*, *Mogera*, *Parascaptor* a *Scaptochirus*. Rody *Parascaptor* a *Scaptochirus* jsou monotypické a zbylé dva rody jsou polytypické (Zemlemerova *et al.*, 2013).

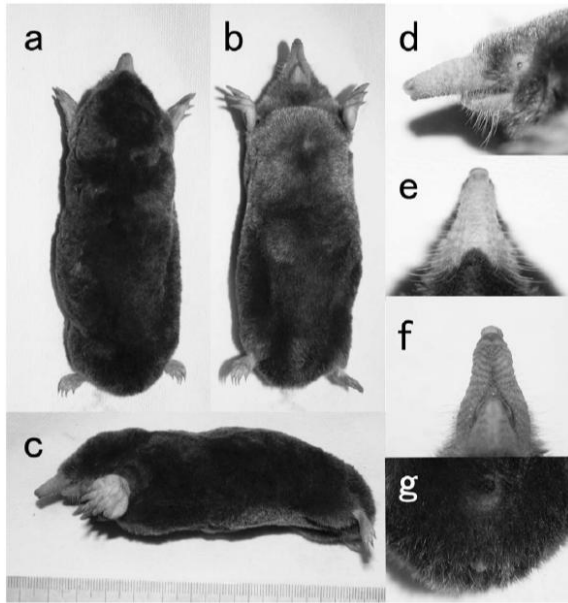
#### **1.3.4.2 Rod *Euroscaptor***

Krtci rodu *Euroscaptor* jsou rozšířeni v horských oblastech východní a jihovýchodní Asie. Zde je genetický tok omezen geologickými bariérami. Tento druh proto vykazuje vysokou míru genetické a morfologické diverzity. Vznikají tak linie se silnou geografickou vazbou lišící se nejen geneticky, ale i morfologicky (Zemlemerova *et al.*, 2016).

Ačkoli byl tento rod podroben několika genetickým i morfologickým studiím, zůstává skutečný počet druhů nejasný. Původně bylo rozlišováno pouze pět druhů rodu *Euroscaptor* - *E. grandis*, *E. klossi*, *E. longirostris*, *E. micrura*, *E. parvidens* a *E. mizura*. Později byl povýšen na druh malajský *E. malayana*, jenž byl před tím součástí druhu *E. micrura* či *E. klossi* (Zemlemerova *et al.*, 2016). Následně Kawada *et al.*, ve Vietnamu popsal nový druh *E. subanura* (viz obrázek č. 3), který je exteriérem podobný *E. parvidens*, ale svou lebkou a chrupem se více podobá *E. longirostris* (Kawada *et al.*, 2012).

*E. subanura* vykazuje nižší vnitrodruhovou variabilitu než *E. parvidens* a *E. longirostris*. Je tak pravděpodobné, že se *E. subanura* vyvinul z *E. parvidens* a je reliktním druhem, který přežil změnu klimatu (Shinohara *et al.*, 2015).





**Obrázek č. 3: Externí morfologie druhu *Euroscaptor subanura*. a) dorzální strana, b) ventrální strana, c) celkový pohled z laterální strany, d) laterální, e) dorzální a f) laterální pohled na čenich, g) oči překryté transparentní vrstvou kůže. Autor: Kawada *et al.*, 2012**

Rod *Euroscaptor* podle všeho monofyletický není (Shinohara *et al.*, 2014). Zemlemerova *et al.*, odhalila dvě monofyletické linie, do nichž lze zařadit všechny známé druhy kromě *E. mizura*. Východní linie zahrnuje druhy žijící ve Vietnamu - *E. parvidens* a *E. subanura*, zatímco do západní linie lze zařadit zbývající druhy, tj. *E. longirostris*, *E. malayana* a *E. klossi* (Zemlemerova *et al.*, 2016).

K rozdělení těchto linií došlo během kolonizace jižní Asie. Tato doba koresponduje s dobou oddělení rodů *Parascaptor* a *Scaptochirus*. Západní linie se rozšířila do rozsáhlých oblastí Číny a Malajsie v pozdním Miocénu. Jedinci z východní linie jsou potomky prvotního rozšíření, kteří přežili v refugích východní Indočíny. Další speciace byla následkem izolace populací řekami nebo vzniklými horskými masivy (Zemlemerova *et al.*, 2016).

*Euroscaptor mizura* tvoří v rámci Japonska nejstarší samostatnou linii krteků oddělenou od ostatních taxonů asijského kontinentu, což může být následek kolonizace Japonských ostrovů v pozdním miocénu před 13,69-11,31 miliony let při poklesu hladiny moře a vzniku

pevninského mostu přes Korejskou úžinu (He *et al.*, 2014; Shinohara *et al.*, 2004A).

Druh *Euroscaptor longirostris* by mohl skrývat kryptické druhy (He *et al.*, 2014). V severním Vietnamu se vytvořily dvě fylogeneticky odlišné populace (východní a západní) izolované Rudou řekou. Právě tyto dvě populace zřejmě tvoří dva samostatné kryptické druhy (Zemlemerova *et al.*, 2016).

Geneticky blízcí druhu *E. longirostris* jsou *E. malayana* a *E. klossi* obývající západní Indočínu a Indii. K diverzifikaci těchto druhů došlo před přibližně 5,3 miliony let (Zemlemerova *et al.*, 2016).

*E. parvidens* vytváří dvě linie lišící se morfologicky (velikostí těla a lebky) - jedna obývající jižní a druhá centrální Vietnam. Tyto linie by měly být považovány za dva různé poddruhy (Zemlemerova *et al.*, 2016).

Nejbližším druhu *E. parvidens* je druh *E. subanura*. Vykazuje nízkou míru variability, přestože obývá poměrně velký areál. Tato nízká variabilita je následkem rychlého rozšíření *E. subanura* během krátké časové periody do oblastí, které již obývali jedinci druhu *E. longirostris*. Jelikož *E. longirostris* obývá především horské oblasti, mohl se v těchto místech *E. subanura* rozšířit jen do areálů v nízkých nadmořských výškách (200-300 m. n. m.). V oblastech, kde se *E. longirostris* nevyskytuje vůbec, žije *E. subanura* až do výšek 1000 m. n. m (Zemlemerova *et al.*, 2016).

#### **1.3.4.3 Rod *Mogera***

*Mogera* je monofyletickým taxonem zahrnujícím osm druhů. Jeho diverzifikace se odehrála před 8-12,6 miliony let v pevninské části svého areálu rozšíření a odtud migroval na ostrovy Japonska a Taiwan. *Mogura* je v současnosti rozšířen po celém území východní Asie (východní Čína, Taiwan, Korea, Japonsko, Primorsky kraj) a jihovýchodní Asie (jihovýchodní Čína a severní Vietnam) (Shinohara *et al.*, 2014).

Dva ze známých druhů - *M. wogura* a *M. latouchei* žijí v rozsáhlém území kontinentální východní a jihovýchodní Asie, ostatní druhy osídlily pouze menší oblasti. *M. insularis* a *M. kanoana* jsou endemické druhy žijící na Taiwanu, *M. imaizunii* žije ve východním Japonsku, *M. tokudae* pouze na ostrově Sado, *M. etigo* na planině Echigo a *M. achidai* na ostrovech Uotsuri a Senkaku (Shinohara *et al.*, 2014).

Podle morfologických studií i molekulárních analýz byl předkem *Mogera* zřejmě *Euroscaptor*. Navíc mohl nově vzniklý a vysoce vyvinutý *Mogera* vytlačit evolučně starší druhy rodu *Euroscaptor*, jako v případě *Euroscaptor parvidens* a *Mogera latouchei*, kteří sdílí stejnou ekologickou niku, ale zřídka koexistují ve stejném areálu (Kawada *et al.*, 2012).

Předci druhů *M. imaizunii*, *M. tokudae* a *M. wogura* pravděpodobně pocházejí z pevninské Asie a do Japonska migrovali se postupně z oblasti Korejského poloostrova během jednotlivých zalednění v pleistocénu (Shinohara *et al.*, 2014). Celková diverzita moderní linie *Mogera* je důsledkem právě těchto opakovaných migračních událostí, během nichž druhy z kontinentu opakovaně osidlovaly přilehlé ostrovy (Shinohara *et al.*, 2014).

Široce rozšířený druh *M. wogura* je rozlišen na dva poddruhy - *M. w. wogura* žijící na ostrovech Japonska a *M. w. robusta* z Ruska a pevninské Asie, které jsou někdy považovány za dva samostatné druhy kvůli rozdílnému karyotypu (He *et al.*, 2014). Na ostrovech Japonska vytváří čtyři fyloskupiny geograficky vázané na střední Honšú, západní Honšú a Šikoku, Kjúšú a část západního Honšú a Koreu s ruským Primorským krajem (Kirihara *et al.*, 2013).

Podobně je tomu u dalšího široce rozšířeného druhu - *M. latouchei*. Tento druh vytváří dvě morfologicky odlišné linie, jednu žijící ve Vietnamu a druhá v Číně (Shinohara *et al.*, 2014).

#### 1.3.4.4 Rod *Parascaptor* a *Scaptochirus*

Rod *Parascaptor* je považován za monotypický, ale studie (He *et al.*, 2014) ukazují, že by mohl skrývat kryptické druhy. V oblasti Číny vytváří dvě fyloskupiny, které se od sebe liší geneticky i morfologicky (He *et al.*, 2014).

Nejstarší známá fosilie druhu *Scaptochirus* je stará přibližně čtyři miliony let a pochází z provincie Shanxi v Číně (Shinohara *et al.*, 2014).

#### 1.3.5 Evropská linie Talpini

##### 1.3.5.1 Taxonomie evropské linie

Tato linie zahrnuje především rod *Talpa*, který nejúspěšnějším rodem skupiny *Talpidae*. Zahrnuje striktně fosoriální druhy obývající areály od Evropy až po Sibiř (Feuda *et al.*, 2015). Obývá zejména listnaté a smíšené lesy, jeho rozšíření dosahuje až k subalpínským loukám a boreálním lesům (Bannikova *et al.*, 2015B).

Při poslední revizi rodu bylo rozeznáváno devět druhů, další tři potencionálně kryptické druhy byly objeveny později (Nicolas *et al.*, 2017). Všechny druhy *Talpa* vytváří podle mtDNA čtyři větve se silnou geografickou vazbou. Skupina „europaea” v sobě zahrnuje šest druhů (*T. europaea*, *T. occidentalis*, *T. romana*, *T. caeca*, *T. stankovici*, *T. levantis*) obývající západní část areálu rozšíření rodu *Talpa*, na rozdíl od ostatních tří skupin, které žijí dále na východ. Skupina „caucasica” (*T. caucasica*) žije v oblasti Kavkazu, skupina „davidiana” (*T. davidiana*) ve východní Anatolii a Elbrus a skupina *T. altaica* (Bannikova *et al.*, 2015B).

Nejvíce odlišnými a bazálními druhy jsou posledně jmenované *T. altaica* a *T. caucasica*. Druh *T. altaica* bývá někdy považován za samostatný monotypický podřád *Talpa* nazvaný *Asioscalops*, nebo za samostatný řád. (Bannikova *et al.*, 2015B).

*T. talyschensis*, který se vyskytuje v oblasti jihozápadního pobřeží Kaspického moře, byl původně veden jako poddruh *T. levantis*.

Molekulární data ukazují, že jedinci od Kaspického moře se liší jak od *T. levantis*, tak od *T. caucasica*, za něž byl dříve považován. Proto by měl být *T. talyschensis* uznán jako samostatný druh, sesterský *T. davidiana*. Podle nDNA není starší než dva miliony let (Bannikova *et al.*, 2015B).

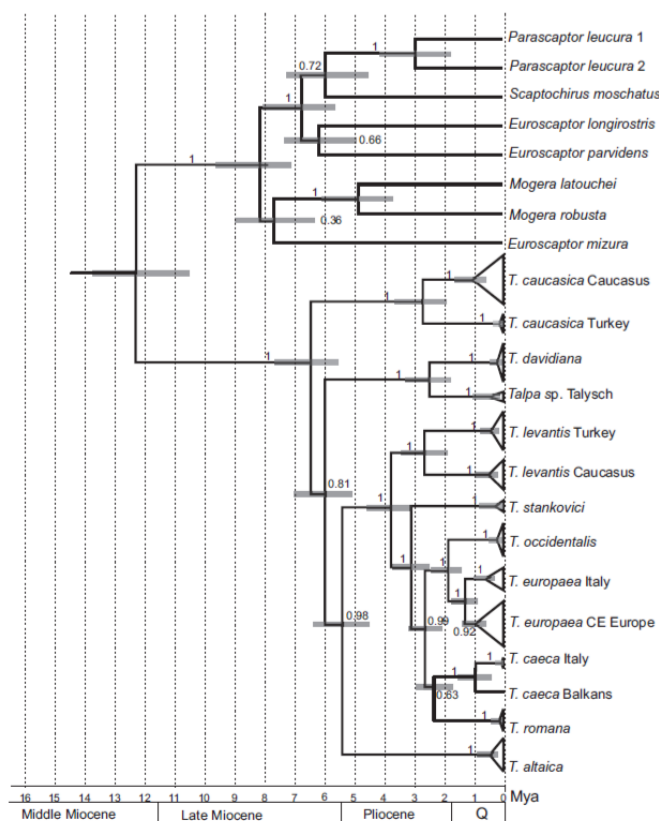
### **1.3.6 Rod *Talpa***

#### **1.3.6.1 Rozšíření a fylogeografie rodu *Talpa***

Všechny druhy jsou endemické a žijí na poměrně malých územích s výjimkou *T. europaea*, který se vyskytuje na poměrně velkém území od Pyrenejí k Uralu (Colangelo *et al.*, 2010).

Tyto druhy jsou morfologicky uniformní kvůli své adaptaci na fosoriální způsob života, zároveň je jejich karyotyp mimořádně stabilní ve srovnání s jinými podzemními savci (Colangelo *et al.*, 2010). S jinými fosoriálními druhy savců sdílí některé charakteristiky jako je vysoká míra teritoriality a kompetice nebo omezená disperzní vzdálenost (Bannikova *et al.*, 2015B).

Většina podzemních savců se vyskytuje v aridních polootevřených oblastech, druhy rodu *Talpa* však preferují humidní oblasti, jež byly silně ovlivněny změnami klimatu během pozdního neogénu a pleistocénu. Zalednění pravděpodobně přežívali v izolovaných populacích, mezi nimiž byl omezený genetický tok. Důsledkem je přítomnost silné geografické struktury v rámci této skupiny (Bannikova *et al.*, 2015). Druhy rodu *Talpa* vytváří v Evropě dvě linie - východní (*T. stankovici*, *T. levantis*) a západní (*T. europaea*, *T. romana*, *T. caeca*, *T. occidentalis*) (Colangelo *et al.*, 2010). K rozdělení na tyto větve došlo přibližně před 6 miliony let na přelomu miocénu a pliocénu (viz obrázek č. 4). Západní větev se diverzifikovala na přelomu pliocénu a pleistocénu asi před 1,8 miliony let, kdy byla většina střední a východní části evropského kontinentu pokrytá permafrostem, což vytvářelo pro krtky neobyvatelné podmínky (Tryfonopoulos *et al.*, 2010).



**Obrázek č. 4: Časová osa nejdůležitějších divergenčních událostí v rámci rodu *Talpa* vytvořená metodou BEAST, osa ukazuje časy v milionech let. Patrné je rozdělení krtků na linii asijskou a evropskou (před přibližně 12 miliony let) a poté rozdělení evropské linie na východní a západní před asi 6 miliony let. Autor: Bannikova *et al.*, 2015B**

Předpokládá se, že rod vznikl v Evropě a rozšířil se do Asie a Severní Ameriky během několika disperzí (Loy *et al.*, 2005). Molekulární data poukazují na asijský původ rodu *Talpa*, ačkoli nejstarší fosilní nález pochází z Německa a je starý přibližně 20-22 milionů let. Doba vzniku *Talpa* se datuje do mladšího miocénu. Z této doby pocházejí fosilní nálezů vyhynulých druhů *Talpa* (*T. minuta*, *T. gilothi*, *T. vallesensis*) (Colangelo *et al.*, 2010). Tři ze čtyř bazálních linií se vyskytují v Asii, což podporuje předpoklad, že v minulosti došlo k rekolonizaci Evropy druhy z Asie (Bannikova *et al.*, 2015A).

Mladší a střední miocén se vyznačoval vlhkým a teplým klimatem, které mohlo napomoci prvnímu většímu rozšíření rodu *Talpa* a následné diverzifikaci (Loy *et al.*, 2005). Na konci miocénu se klima (před 14,8

miliony let) změnilo, klesla průměrná roční teplota a zvýšila se aridita, což mělo za následek vymírání teplomilných obratlovců v Evropě, včetně krtků. Prudce klesly počty jedinců v populacích a diverzita *Talpidae* v Evropě (Bannikova *et al.*, 2015B).

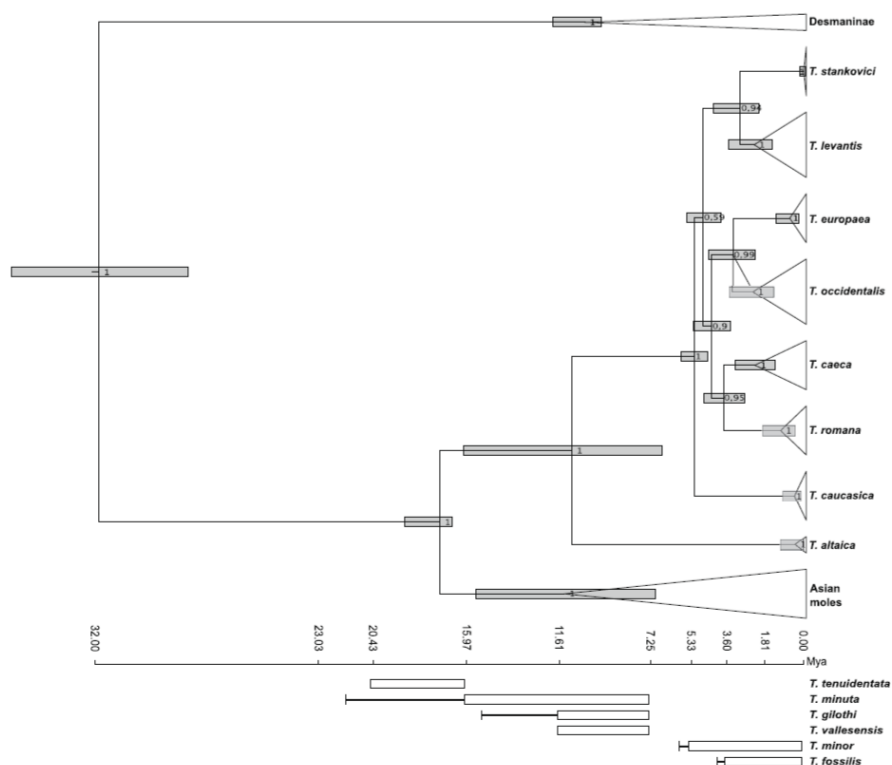
Tato klimatická změna také vytlačila většinu talpidů na východ do Asie, s výjimkou vychucholů a krtků rodu *Talpa* (Loy *et al.*, 2005). Horské oblasti Anatolie, Kavkazu a západního Íránu jim poskytovaly podmínky vhodné pro přežití klimatických změn (především dostatek vláhy). Z těchto míst pocházejí linie „caucasica” a „davidiana”, pravděpodobně i západní linie a *T. altaica* (Bannikova *et al.*, 2015B). Následný nástup humidního klimatu umožnilo další diverzifikaci v pliocénu a vznik dnešních druhů (Colangelo *et al.*, 2010).

### **1.3.6.2 Speciace rodu *Talpa***

Oddělení rodu *Talpa* od asijské linie se datuje do raného až středního miocénu před 16-17 miliony let (viz obrázek č. 5)(Colangelo *et al.*, 2010).

Pomalá evoluce morfologických znaků má za následek vysokou míru kryptické diverzity u krtků (Bannikova *et al.*, 2015B).

Druhy *T. romana* a *T. stankovici* se od sebe oddělily v mladším pliocénu, nesdílejí proto společnou evoluční historii (Colangelo *et al.*, 2010). Rozšíření těchto dvou druhů napovídá tomu, že k jejich speciaci došlo na základě izolace jejich refugií během nejchladnějšího období na Italském, Apeninském a Balkánském poloostrově (Loy *et al.*, 2005).



**Obrázek č. 5: Fylogenetický strom rodu *Talpa*, patrné je zde oddělení tohoto rodu od asijských krtků. Na vodorovné ose čas v milionech let (Mya - million years ago). Hodnoty nad větvemi odpovídají jednotlivým posteriorním pravděpodobnostem. Šedé pruhy vyjadřují 95% HPD (Highest Posterior Density) odhadovaného stáří nodu. Pod stromem je zobrazeno šest fosilních druhů a rozpětí známého výskytu jejich fosilních nálezů (bílé pruhy). Autor: Colangelo *et al.*, 2010**

V případě *T. caeca*, malého druhu žijícího endemicky v jižní Evropě v malých fragmentovaných populacích, přichází v úvahu jiný scénář. Tento druh je adaptovaný na chladné podnebí a obývá nejvyšší nadmořské výšky (až 2500 m. n. m.) z evropských druhů *Talpa*. V oblasti Alp a Apenin nahrazuje *T. europaea* a *T. romana*. Původ *T. caeca* je tedy zřejmě vázán na alpské stepi, které se rozšířily během posledního zalednění v pleistocénu a představuje tak reliktní druh po zalednění. Geneticky je nejvíce podobný hypotetickému předku skupiny (Loy *et al.*, 2005).

Kvůli geografickým bariérám tvoří *T. caeca* rozdílné fyloskupiny, které jsou taxonomicky vedeny jako poddruhy, vzhledem k malému množství vzorků není možné potvrdit jejich status jako samostatných



druhů. *T. c. caeca* žije v Apeninách ve střední Itálii, *T. c. augustana* ve Švýcarských Alpách (Švýcarsko, sever Itálie), *T. c. steini* v Černé hoře a *T. c. hercegoviensis* na Balkánu v Bosně a Hercegovině. Podle analýz mtDNA i jaderné DNA, tvoří jedinci z Apenin a Švýcarských Alp západní linii a jedinci z Balkánu východní linii. Doba vzniku těchto linií se datuje do raného pleistocénu (před asi 1,1 milionem let) (Bannikova *et al.*, 2015B).

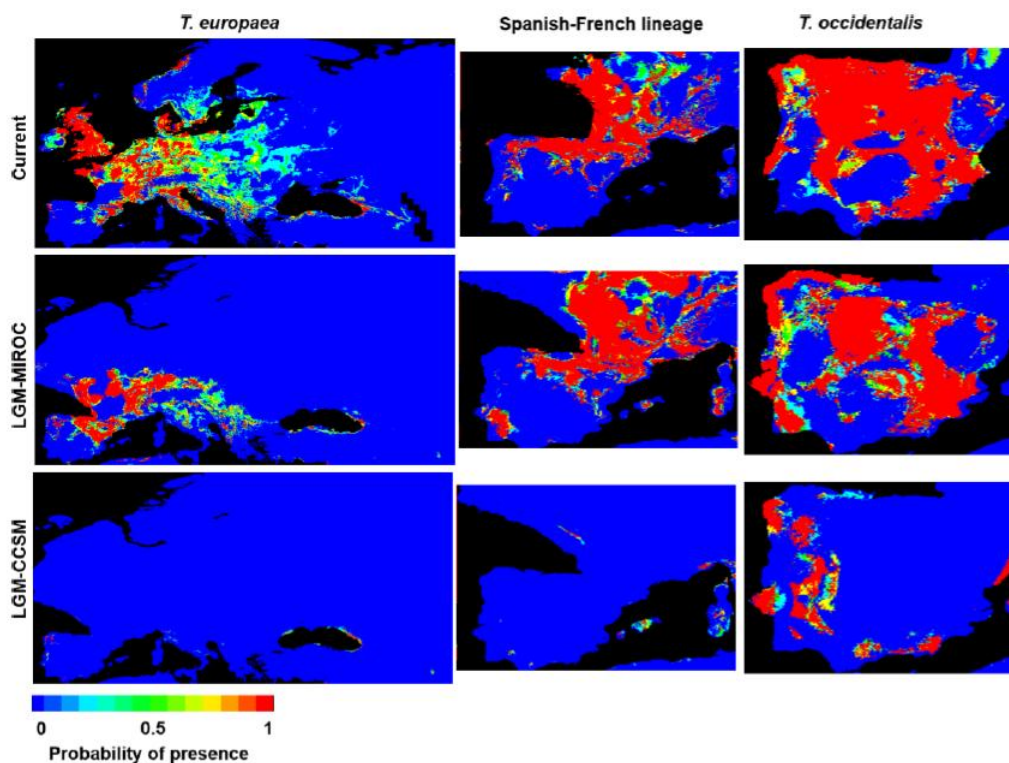
*T. caucasica* zahrnuje dva poddruhy *T. c. caucasica* a *T. c. orientalis*, jež tvoří severní linii druhu žijící na severním Kavkazu. Jižní linie se naopak velmi blízká *T. ognevi*. Doba rozdělení *T. caucasica* a *T. ognevi* se datuje do druhé poloviny pliocénu před 2,5-3 miliony let (Bannikova *et al.*, 2015B).

Také *T. levantis* se před více než dvěma miliony let rozdělil na dvě linie. Východní linie je rozšířena na Kavkazu a na severovýchodu Turecka, zatímco západní linie obývá velkou část Turecka (pobřeží Černého moře). Taxonomický status těchto linií je stále nejasný (Bannikova *et al.*, 2015B).

*T. stankovici* vytváří podle mtDNA tři fyloskupiny - Gravia, Peloponés a S-SZ Řecko. Je možné, že ve středním Řecku se vyskytuje na stejném území více skupin, pokud by se však areály jednotlivých skupin nepřekrývaly, dalo by se předpokládat, že skupiny vznikly na základě vikariantní speciace. Bariéra rozdělující populaci mohla vzniknout během izolace poloostrova Peloponés během pliocénu před 4-3 miliony let. Peloponés byl během pleistocénu opakovaně odříznut od středního Řecka následkem fluktuace hladiny moří během glaciálů a interglaciálů (Tryfonopoulos *et al.*, 2009).

Naposledy došlo k propojení před 18 tisíci lety při posledním zalednění a poklesu mořské hladiny. Avšak kvůli nedostatku fosilních nálezů z oblasti středního Řecka není jasné, zda žil *T. stankovici* ve středním a jižním již Řecku před izolací Peloponésu, nebo se do této oblasti rozšířil později během propojení. (Tryfonopoulos *et al.*, 2009).

*T. occidentalis* na Iberském poloostrově tvoří geograficky vázané mitochondriální linie, zřejmě jsou důsledkem alopatrické diferenciaci během pleistocénu. Současný výskyt linií napovídá, že během posledního glaciálního maxima byly pro *T. occidentalis* vhodné podmínky v Katalánsku, Andalusii, Kantábrii a Portugalsku a tyto lokality tak sloužily jako refugia (viz obrázek č. 6) (Nicolas *et al.*, 2017).



**Obrázek č. 6: Distribuční modely pro tři linie *Talpa europaea* pro současné klimatické podmínky (Current) a poslední glaciální maximum (LGM) za pomoci paleoklimatických modelů MIROC (Model for Interdisciplinary Research on Climate) a CCSM (Community Climate System Model). Teplejší barva znamená vyšší pravděpodobnost výskytu. Autor: Nicolas *et al.*, 2017**

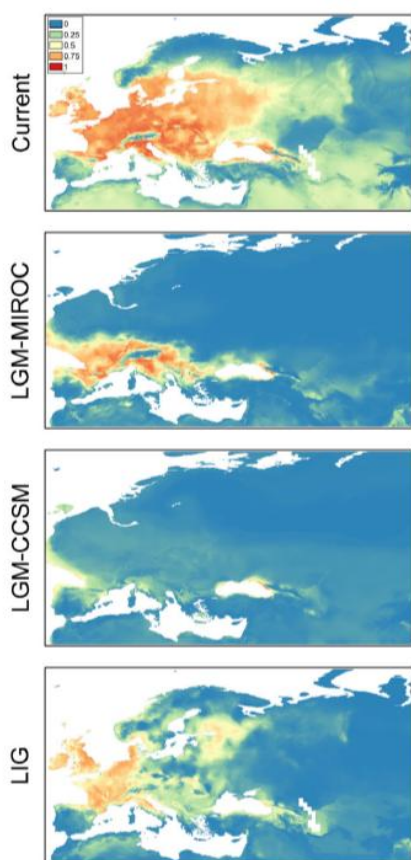
### 1.3.6.3 Vnitrodruhová diverzita druhu *Talpa europaea*

Na diverzitu *T. europaea* měly také vliv oscilace klimatu během pliocénu a pleistocénu, kdy byly populace zatlačeny do refugií a poté se opět rozšířily během interglaciálů (Loy *et al.*, 2005). Jižní Evropa vykazuje vyšší molekulární diverzitu, jelikož tyto oblasti sloužily jako útočiště pro živočišné druhy v době posledního glaciálního maxima, kdy se většina území stala pro krtky neobyvatelnou kvůli permafrostu a

nedostatku potravních zdrojů. Jižní šířky byly nejrychleji kolonizované, a proto je zde efekt hrdla lahve méně výrazný (Feuda *et al.*, 2015).

Nejnižší genetickou diverzitu vykazují populace ve střední a východní Evropě, což je zřejmě následek nedávné kolonizace malým počtem jedinců, výjimkou je populace z jihovýchodu Ukrajiny, která projevuje jistou míru odlišnosti. Tato populace přežila zalednění v oblastech kolem Černého moře. Naopak nejvyšší diverzita je na Balkánském poloostrově, který byl jedním z refugií a odkud pocházejí populace, které kolonizovaly Evropu během interglaciálů (Feuda *et al.*, 2015).

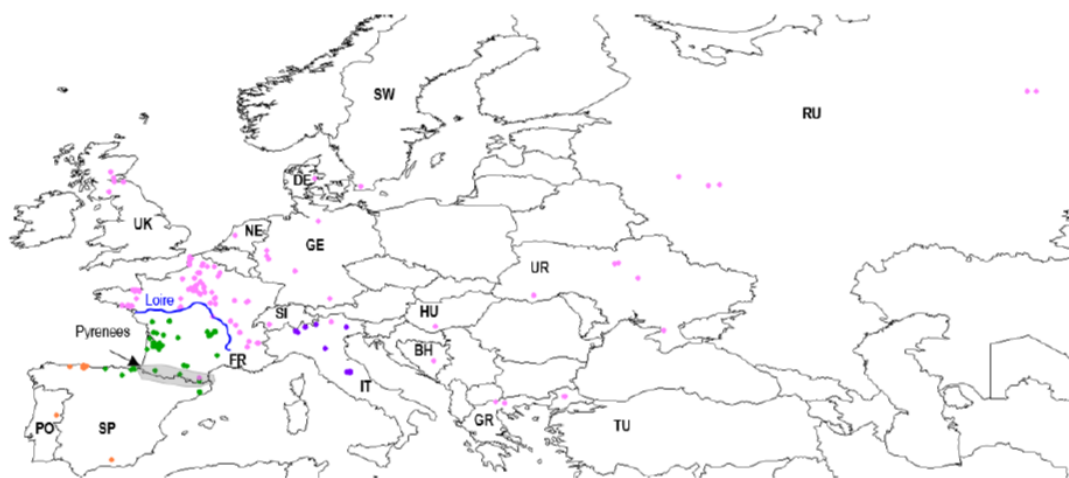
Obrázek č. 7 ukazuje model areálu rozšíření krtka evropského v Evropě v současnosti, během posledního interglaciálu a během LGM (poslední glaciální maximum); zde jsou patrná jeho pravděpodobná glaciální refugia.



**Obrázek č. 7: Distribuční modely pro druh *Talpa europaea* pro současné klimatické podmínky (Current), poslední glaciální maximum (LGM) za pomoci paleoklimatických modelů MIROC (Model for Interdisciplinary Research on**

Climate) a CCSM (Community Climate System Model) a pro poslední interglaciál (LIG). Teplejší barva znamená vyšší pravděpodobnost výskytu. Autor: Feuda *et al.*, 2015

Po ústupu ledovce v pozdním pleistocénu došlo k sekundárnímu kontaktu přeživších populací ze západních, jižních a východních refugií a ke zpětnému křížení jedinců z těchto populací (Loy *et al.*, 2005). Druh *T. europaea* zahrnuje v Evropě tři hlavní linie: evropskou, italskou a španělsko-francouzskou (viz obrázek č. 8) (Nicolas *et al.*, 2017).



**Obrázek č. 8: Mapa ukazující základní fylogenetické linie *Talpa europaea* v Evropě podle mtDNA: *T. occidentalis* (oranžová); *T. europaea* (růžová: evropská linie, fialová: italská linie, zelená: španělsko-francouzská linie). Zkratky názvů zemí: BH: Bosna a Hercegovina, DE: Dánsko, FR: Francie, GR: Řecko, HU: Maďarsko, IT: Itálie, NE: Nizozemí, PO: Portugalsko, RU: Rusko, SI: Švýcarsko, SP: Španělsko, SW: Švédsko, UK: Velká Británie, UR: Ukrajina Šedou barvou je vyznačen současný areál rozšíření. Modře je vyznačena řeka Loira a šedě pohoří Pyreneje. Autor: Nicolas *et al.* 2017**

Evropská i italská linie je monofyletická, obě tyto linie vznikly asi před 667 tisíci lety. Od obou linií se mnohem dříve oddělila španělsko-francouzská, přibližně před 2,82 miliony let (Nicolas *et al.*, 2017). Španělsko-francouzská linie je dle mitochondriálních dat blíže příbuzná druhu *T. occidentalis* než *T. europaea* a tvoří s *T. occidentalis* monofyletickou větev (Feuda *et al.*, 2015). Z tohoto důvodu se druh *T. europaea* jeví jako parafyletický (Nicolas *et al.*, 2017).

Pro vznik španělsko-francouzské linie jsou možné dva scénáře. Prvním je přenos mtDNA mezi druhy při zpětném křížení populací obou druhů, jako tomu bylo u zajíců (Melo-Ferreira *et al.*, 2005) či rejšků (Dubey *et al.*, 2006). Druhou možností je existence neprozkoumané taxonomické jednotky na severu Španělska, což je pravděpodobnější než první možnost (Feuda *et al.*, 2015). Jedinci náležící k španělsko-francouzské linii tak pravděpodobně náležejí spíše k druhu *T. occidentalis* nebo nejpravděpodobněji k úplně nové taxonomické jednotce. (Nicolas *et al.*, 2017).

Španělsko-francouzská linie tvoří další čtyři sublinie, alespoň tři z nich vznikly alopatrickou speciací v různých refugiiích během pleistocénu. Na hranicích Francie a Španělska se vyskytují hned tři mtDNA linie. Pyreneje zde tak mohly být geografickou bariérou rozdělující populace či sloužily jako refugia, v nichž se druhy mohly vyvíjet odděleně během glaciálů (Nicolas *et al.*, 2017). Od *T. occidentalis* se španělsko-francouzská linie oddělila přibližně před 2,47 miliony let (Nicolas *et al.*, 2017).

Mezi liniemi italskou a evropskou jsou poměrně velké genetické rozdíly napovídající delší izolaci obou linií. Vzhledem k odhadované době rozdělení linií (viz výše), k tomuto rozdělení došlo ještě před posledním glaciálním maximem, pravděpodobně v období středního pleistocénu. Po kolonizaci Apeninského poloostrova zůstala populace *T. europaea* na tomto poloostrově izolována a vyvíjela se odlišně ve srovnání se zbytkem populace v Evropě (Feuda *et al.*, 2015). Ke kontaktu mezi populacemi a potenciálnímu genetickému mohlo docházet během interglaciálů (Nicolas *et al.*, 2017).

Italská linie se rozpadá na další tři sublinie, což napovídá tomu, že v oblasti severní Itálie existovalo během vícečetných zalednění v pleistocénu dlouhodobé refugium pro několik druhů. Oblast zdejších refugií nebyla z hlediska obyvatelnosti homogenní (např. různé množství dostupné potravy), proto došlo k rozčlenění na subpopulace, jež se vyvíjely odlišně (Nicolas *et al.*, 2017).

## 2 Cíle práce

Cílem rešerše bylo popsat taxonomii, fylogenezi a fylogeografii krtků z čeledi Talpidae a jejich vnitrodruhovou diverzitu. Laboratorní část zahrnovala zhodnocení vnitrodruhové variability populace druhu *Talpa europaea* (krtek evropský) na území střední Evropy, populační genetické struktury *Talpa europaea* v rámci České republiky a vývoj efektivní velikosti populace tohoto druhu v čase.

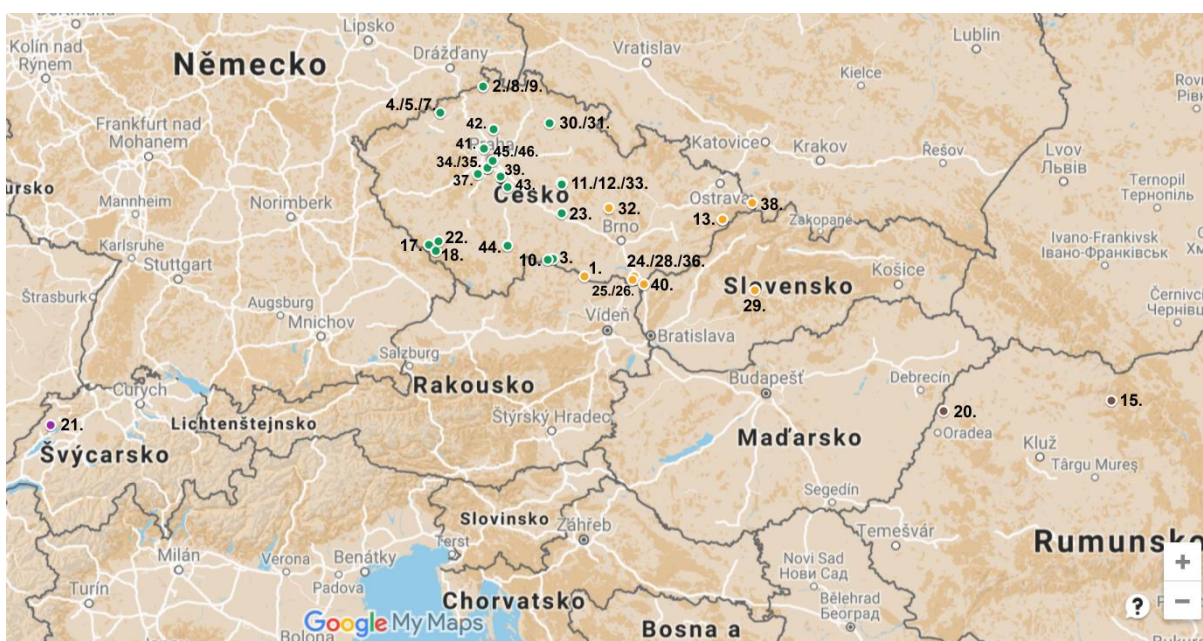


## 3 Materiál a metody

### 3.1 Sběr vzorků

Sběr vzorků tkání druhu *Talpa europea* probíhal v letech 2007 až 2014 ve spolupráci s Přírodovědeckou fakultou Univerzity Karlovy v Praze. Vzorky pocházejí z jedinců uhynulých při pohybu či migraci nad zemí. Jedná se především o části končetin, ocasu, kůže, případně celé jedince. Odebrané vzorky byly fixovány 96% ethanolem, v případě celých jedinců byli tito jedinci vysušeni a uchováni při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Tímto způsobem byly odebrány vzorky 45 jedinců, u každého jedince bylo zaznamenáno datum sběru, lokalita sběru a později také zeměpisné souřadnice (viz tabulka č. 1). Vzorkování bylo zaměřeno na Českou republiku a Slovensko, mapa vzorkování je na obrázku č. 9.



**Obrázek č. 9: Mapa vzorkování *Talpa europea*. Názvy lokalit jsou uvedeny v tabulce č. 1.**

**Tabulka č. 1: Vzoroky *Talpa europaea* použité ve studii.**

<b>označení</b>	<b>lokalita</b>	<b>zeměpisné souřadnice</b>	<b>datum sběru</b>
<b>1</b>	Podyjí, Šobes	N48,82 E15,98	20.4.2014
<b>2</b>	Janov	N50.86 E14.26	16.6.2014
<b>3</b>	Staré Hobzí	N49,00 E15,45	18.6.2014
<b>4</b>	Janov, most	N50,59 E13,56	18.6.2014
<b>5</b>	Janov, most	N50,59 E13,56	19.6.2014
<b>6</b>	Janov	N50,86 E14,26	19.6.2014
<b>7</b>	Janov, most	N50,59 E13,56	20.6.2014
<b>8</b>	Janov	N50,86 E14,26	21.6.2014
<b>9</b>	Janov	N50,86 E14,26	21.6.2014
<b>10</b>	Slavonice	N48,99 E15,35	22.6.2014
<b>11</b>	Běstvína	N49,84 E15,59	3.7.2014
<b>12</b>	Běstvína	N49,84 E15,59	3.7.2014
<b>13</b>	Horní Bečva	N49,43 E18,29	15.7.2014
<b>14</b>	Horní Bečva	N49,43 E18,29	16.7.2014
<b>15</b>	Rodna, RO	N47,42 E24,81	2014
<b>17</b>	Křemelná	N49,16 E13,36	5.9.2014
<b>18</b>	Srní	N49,08 E13,47	5.9.2014
<b>20</b>	Romina, RO	N47,31 E21,99	2013
<b>21</b>	Combe Grede, CH	N47,14 E7,02	21.9.2013
<b>22</b>	Janovice	N49,20 E13,51	6.7.2013
<b>23</b>	Štoky	N49,50 E15,58	6.7.2013
<b>24</b>	Lednice, park	N48,81 E16,81	20.5.2012
<b>25</b>	Lednice, Mlýnský rybník	N48,79 E16,81	18.5.2012
<b>26</b>	Hlohovec	N48,77 E16,78	25.5.2011
<b>27</b>	Lednice, Apollo	N48,79 E16,83	26.5.2011
<b>28</b>	Lednice, park	N48,81 E16,81	22.5.2011
<b>29</b>	Slaská, SK	N48,66 E18,83	27.5.2011
<b>30</b>	Železnice	N50,47 E15,37	1.7.2010



<b>31</b>	Železnice	N50,47 E15,37	1.7.2010
<b>32</b>	Olešnice, Rovečné	N49,56 E16,38	10.7.2010
<b>33</b>	Spačice, Doubrava	N49,82 E15,59	29.6.2010
<b>34</b>	Radotín	N49,99 E14,34	2010
<b>35</b>	Radotín	N49,99 E14,34	2010
<b>36</b>	Lednice	N48,81 E16,81	2010
<b>37</b>	Karlštejn	N49,93 E14,18	28.6.2009
<b>38</b>	Nýdek, Filipka	N49,61 E18,79	6.5.2009
<b>39</b>	Skuheř	N49,90 E14,56	8.4.2013
<b>40</b>	Lanžhot	N48,72 E16,97	22.5.2011
<b>41</b>	Holubice	N50,20 E14,29	26.2.2015
<b>42</b>	Liběchov, areál ÚŽFG	N50,41 E14,45	2007
<b>43</b>	Benešov	N49,78 E14,68	11.6.2013
<b>44</b>	Ruda	N49,15 E14,69	21.4.2012
<b>45</b>	Praha	N50,07 E14,43	
<b>46</b>	Praha	N50,07 E14,43	

### 3.2 Izolace DNA

Genomická DNA byla izolována pomocí DNA Tissue Kit (GeneAid) podle protokolu dodaného výrobcem. V posledním kroku byla DNA promyta 100  $\mu$ l pufru Elution předeřátého na 60°C. Kontrola koncentrace a čistoty izolované DNA byla provedena pomocí spektrofotometrické analýzy na přístroji Nanodrop 2000 při  $\lambda=240$ -300 nm. Získaná DNA byla uchována při teplotě -20°C.

### 3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Vzhledem ke geografickému a fylogenetickému zaměření a rozsahu studie byla jako marker zvolena část kontrolního úseku mitochondriální DNA s vysokou mutační rychlostí.

K amplifikaci vybraného úseku byla použita kombinace primerů DtlpF (5'-CCA CCA CCA ACA CCC AAA GCT-3') a DtlpR (5'-GGT GGT TAT CAA GAA ATA ACC C-3'). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 2. Pro reakci byl použit předpřipravený PCR Master Mix „1.25 mL PCR Master Mix (2X)” (ThermoFisher Scientific). Samotná PCR reakce probíhala v termocyclerech BIO RAD T-100 Thermo Cycler, protokol pro reakci s použitými teplotami a časováním je uveden v tabulce č. 3. Efektivita PCR amplifikace byla ověřována pomocí gelové elektroforézy na 1% či 2% agarovém gelu v 10 $\times$  naředěném TBE pufru. Elektroforéza probíhala na přístroji BIO RAD PowerPac Basic při 120 V/400 mA po dobu 40 minut.

**Tabulka č. 2: Složení reakční směsi pro PCR**

<b>PCR Master Mix</b>	12,5 $\mu$ l
<b>Nuclease Free H<sub>2</sub>O</b>	8,5 $\mu$ l
<b>Primer F</b>	1 $\mu$ l
<b>Primer R</b>	1 $\mu$ l
<b>DNA</b>	2 $\mu$ l

**Tabulka č. 3: Protokol pro termocycler použitý při amplifikaci.**

<b>cyklus/opakování</b>	<b>krok</b>	<b>teplota (°C)</b>	<b>čas (min)</b>
1 (1×)	1	94	3
2 (30×)	1	94	1
	2	56	1
	3	72	1
3 (1×)	1	72	1
4 (1×)	1	12	for ever

### **3.4 Purifikace amplifikovaného úseku**

Amplifikované úseky mtDNA byly purifikovány pomocí kitu QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) podle protokolu od výrobce. V posledním kroku byla DNA vymyta z membrány 30  $\mu$ l pufru AE. Koncentrace čistého PCR produktu byla změřena spektrofotometrem Nanodrop 2000. Purifikovaný PCR produkt byl skladován při teplotě -20°C.

### **3.5 Sekvenace amplifikovaného úseku**

Sekvenační analýza byla provedena jednosměrně s primerem DtlpF. Sekvenační reakce probíhala v laboratoři sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 4.

**Tabulka č. 4: Složení reakční směsi pro sekvenační analýzu.**

<b>PCR produkt</b>	2 $\mu$ l
<b>Primer</b>	0,5 $\mu$ l
<b>Nuclease Free H<sub>2</sub>O</b>	do objemu 8 $\mu$ l

### 3.6 Analýza dat

Celkem bylo získáno 40 sekvencí. Osekvenované kontrolní úseky mtDNA byly editovány v programu Geneious v10.2.2 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012), alignovány pomocí ClustalW metody a zkráceny na stejnou délku - 274 bazí. Upravené a alignované sekvence byly vyexportovány a podrobeny další analýze.

Pro výpočet p-distancí byl použit program MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). V rámci analýzy byl porovnán každý jedinec s každým a výsledné p-distance byly zaznamenány do tabulky.

Pro odhad vývoje efektivní velikosti populace byla provedena analýza mismatch distribution v programu DnaSp v6 (Rozas *et al.*, 2017). Tato analýza porovnává pozorované frekvence párových distancí s frekvencemi očekávanými podle demografického modelu. Unimodální distribuce ukazuje na exponenciální růst populace, vícevrcholová distribuce naopak na blížící se rovnováhu mezi driftem a mutacemi.

Data byla otestována pomocí programu Jmodeltest (Darriba *et al.*, 2012, Guindon *et al.*, 2003). Na základě výsledku byl vybrán jako nejvhodnější model HKY, pomocí něhož byl vytvořen Bayesiánský skyline plot pomocí programu BEAST v1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012), výsledek byl sumarizován v programu Tracer v1.6 (Drummond *et al.*, 2005). Skyline plot mapuje vývoj velikosti populace v minulost, čas se měří v tzv. mutačních jednotkách.

Demografické procesy, které v populaci v minulosti proběhly byly charakterizovány pomocí sumárních statistik. V programu DnaSp v6 (Rozas *et al.*, 2017) byly vypočteny tyto parametry: haplotypová diverzita ( $H_d$ ), počet variabilních míst ( $N_p$ ), nukleotidová diverzita ( $\pi$ ) a raggedness statistika ( $r$ ). Parametr  $r$  počítá odchylky okolo křivky mismatch distribution a pokud je nesignifikantní, značí to, že v datech není podpora pro stabilní velikost populace.

Dále provedeny testy neutrality a zaznamenány hodnoty Tajimova  $D$ , Fuova  $F_s$ ,  $R^2$ , opět pomocí DnaSp v6 (Rozas *et al.*, 2017). Tyto

parametry testují demografickou expanzi v populaci; záporné statisticky signifikantní hodnoty značí expanzi nebo purifikující selekci, kladné hodnoty naopak značí stabilní populaci.

Pro vizualizaci vztahů mezi haplotypy byla vytvořena v programu Network 5.0.0.3 (fluxus-engineering.com, Bandelt *et al.*, 1999) haplotypová síť metodou Median-Joining. Jedinci č. 26, 27 a 46 byli z této analýzy vyřazeni kvůli nekompletním sekvencím, byl proto použito pouze 37 sekvencí.

V programu Geneland v4.0.5 (Guillot *et al.*, 2005), který pracuje metodou tzv. landscape genetic, byla otestována struktura populace na reálném geografickém pozadí, tzn., že se při analýze berou v úvahu geografická i genetická data. Výsledky byly graficky znázorněny v mapě. Z této analýzy byli vyřazeni jedinci č. 26, 27 a 46 kvůli nekompletním sekvencím a jedinci č. 15, 20, 21 kvůli své geografické poloze, bylo použito 34 sekvencí.

## 4 Výsledky

Celkem bylo získáno 40 sekvencí z části kontrolního úseku mtDNA druhu *Talpa europea* o délce 274 bází. Vzdálenosti mezi jedinci jsou ilustrovány pomocí p-distancí, jejichž hodnoty jsou zaznamenány v tabulce č. 5.



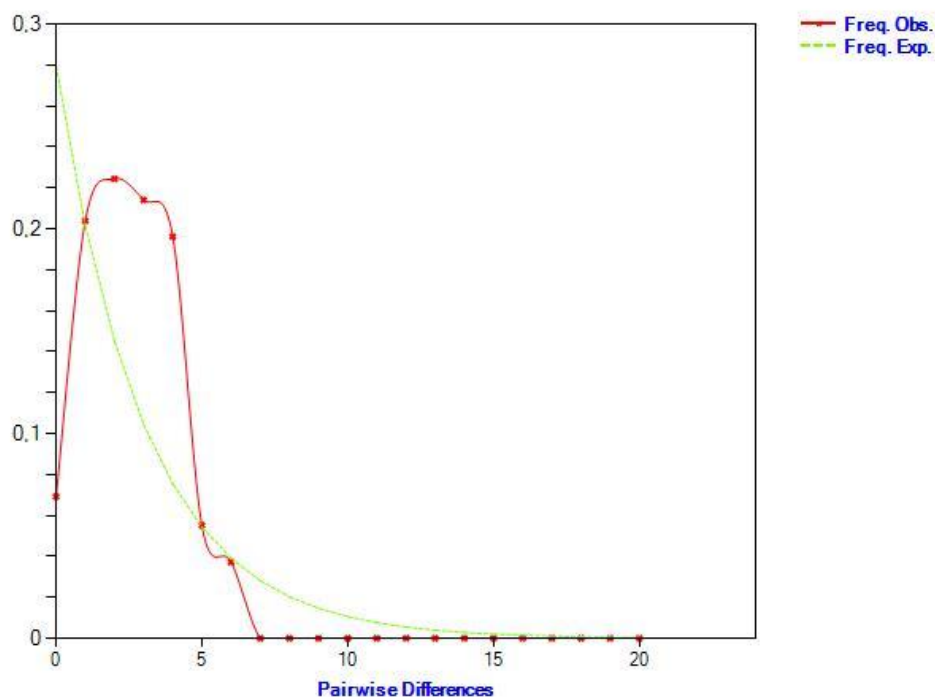
nukleotidová diverzita ( $\pi$ ), ragedness statistika ( $r$ ) a testů neutrality (Tajimovo  $D$ , Fuova  $F_s$ ,  $R^2$ ). Hodnoty Tajimova  $D$ , Fuova  $F_s$  a  $R^2$  byly statisticky významné. Při této analýze bylo identifikováno 21 haplotypů.

**Tabulka č. 6: Analýza vnitrodruhové genetické diverzity *Talpa europaea*.**

**Analýza zahrnovala všech 40 jedinců.  $n$  = počet jedinců,  $N$  = počet haplotypů,  $H_d$  = haplotypová diverzita,  $N_p$  = počet variabilních míst  $\pi$  = nukleotidová diverzita,  $D$  = Tajimovo  $D$ ,  $F$  = Fuova  $F_s$ ,  $r$  = ragedness statistika.**

$n$	$N_h$	$H_d$	$N_p$	$\pi$	$D$	$R^2$	$F_s$	$r$
40	21	0,931	27	0,01011	*-2,08153	*0,0432	*-15,625	0,040562

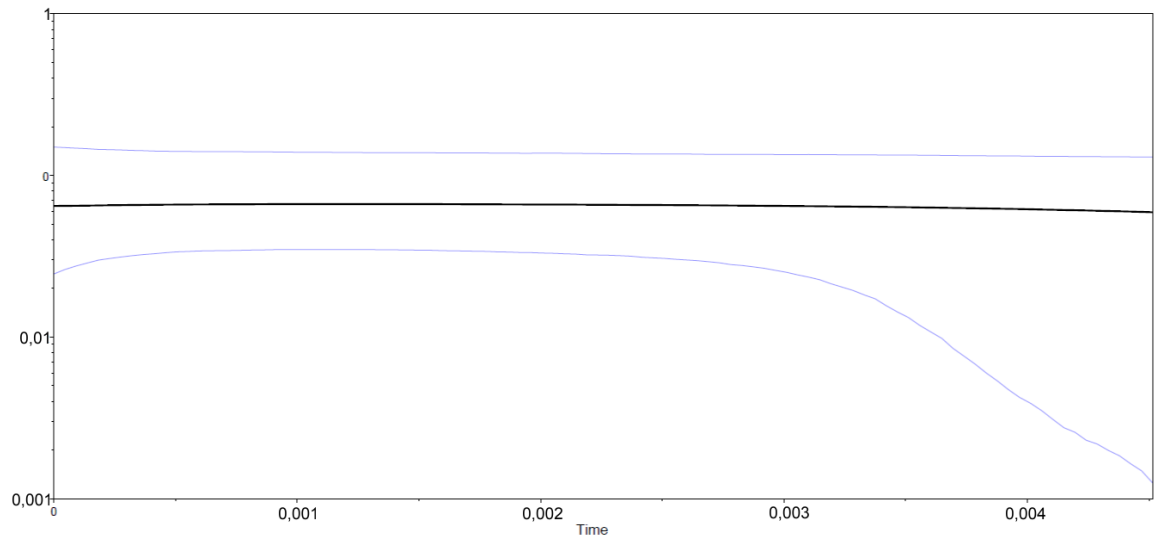
Analýza mismatch distribution (viz obrázek č. 10) měla jednovrcholový (unimodální) průběh.



**Obrázek č. 10: Analýza mismatch distribution pro *Talpa europaea* vytvořený v programu DnaSp6. Červená linka znázorňuje pozorované frekvence párových distancí a zelená linka očekávané frekvence párových distancí podle demografického modelu.**

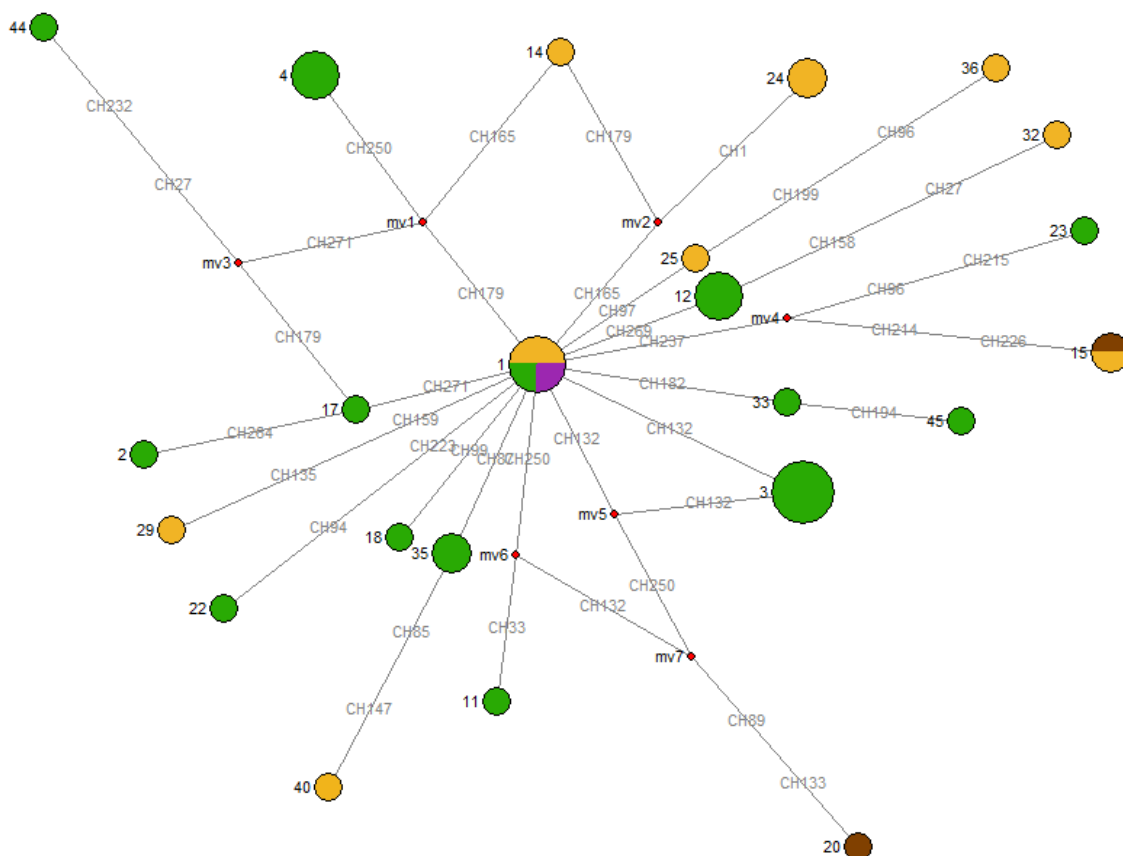
Bayesiánský skyline plot (viz obrázek č. 11) zobrazuje vývoj velikosti efektivní populace ( $N_e$ ).





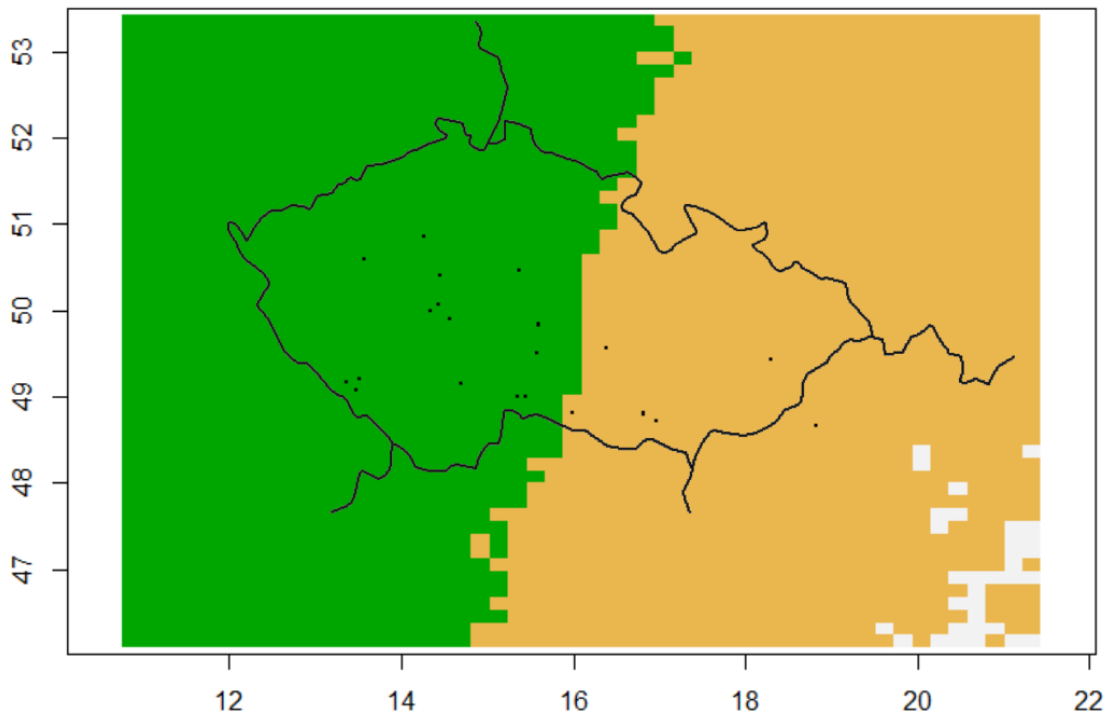
**Obrázek č. 11: Bayesiánský skyline plot pro *Talpa europea* vytvořený na základě 40 částečných sekvencí kontrolní oblasti mtDNA. Osa x znázorňuje čas v mutačních jednotkách a osa y korelát velikosti populace. Černá linie znázorňuje medián odhadované velikosti efektivní populace ( $N_e$ ), fialové linky ohraničují 95% konfidenční interval.**

V rámci jedinců zahrnutých v analýze ( $n=37$ ) bylo identifikováno 23 haplotypů. Haplotypová síť zobrazující vztahy mezi identifikovanými haplotypy je na obrázku č. 12. Barevné označení jedinců v haplotypové síti odpovídá barevnému značení populací v mapě na obrázku č. 9. Haplotypy se od sebe odlišovaly jednou až dvěma mutacemi.



**Obrázek č. 12: Haplotypová síť pro *Talpa europaea* vytvořená metodou Median-Joining. Jednotlivé haplotypy jsou znázorňeny barevnými kruhy, velikost kruhů proporčně odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem. Barevné značení koresponduje s oblastem výskytu jedince (viz obr. č. 13). Červené kruhy označují hypotetické haplotypy. Na spojnicích jsou označena místa mutací.**

Na obrázku č. 13 je zobrazena mapa rozšíření populací, které byly identifikovány na základě analýzy dat metodou landscape genetic v programu Geneland. Data se rozdělila západovýchodně na dvě populace.



**Obrázek č. 13: Mapa zobrazující výskyt populací na území České republiky vytvořená v programu Geneland na základě kontrolního úseku mtDNA. Černé tečky zobrazují místa sběru vzorků, barevný podklad označuje jednotlivé populace. Čísla na osách označují geografické souřadnice území.**

## 5 Diskuze

Pairwise distance se pohybovaly v rozmezí od 0 do 0,029. Takto nízké hodnoty naznačují, že mezi jedinci existují minimální rozdíly. Z tohoto důvodu data neposkytla dostatečně silný signál a nebylo tak možné sestavit fylogenetický strom.

Haplotypová diverzita byla vysoká, hodnota činila 0,931. Hodnota nukleotidové diverzity byla velmi nízká (0,01011) kvůli nízkým hodnotám p-distancí, počet variabilních míst byl 27.

Statisticky signifikantní záporné hodnoty Tajimova  $D$  a Fuova  $F_s$  a statisticky signifikantní hodnota  $R^2$  také geografickou či demografickou expanzi.

Analýza mismatch distribution měla unimodální průběh, což taktéž nasvědčuje tomu, že populace v minulosti prošla expanzí. Statisticky nevýznamná hodnota raggedness statistiky nepodporuje v datech existenci stabilní populace.

Protože se Česká republika nenachází na okraji areálu krtek evropského, pravděpodobně zde nedochází k migraci a tudíž ani ke geografické expanzi, ale spíše ke geografické expanzi, tzn. zvyšuje se počet jedinců v populaci. Ve zvětšování velikosti populace by mohly hrát roli mírnější zimy, které poskytují krtkům příznivé podmínky po celý rok, jelikož půda nepromrzá.

Ačkoli samice mívají jeden vrh ročně o 5-7 mláďatech, existují však i případy, kdy měly samice dva vrhy (MacDonald, 2009). Právě pozdější nástup zimy by poskytoval podmínky pro přežití obou vrhů. To by mohlo způsobovat rychlejší růst populace. Populaci také již není ohrožována odchycem jedinců kvůli prodeji jejich kožešiny, který byl dříve oblíbený nejen v Evropě (MacDonald, 2009).

Naopak podle Bayesiánského skyline plotu je populace stabilní a její efektivní velikost se výrazně nemění. Stabilita by mohla být udržována redukcí mláďat, ať už úhynem, nebo emigrací z populace a také faktem, že jsou krtci likvidováni jako škůdce.

Vzhledem k výsledkům skyline plotu, který naznačuje stabilní populaci, a výsledkům dalších analýz (mismatch distribution, testy neutrality, atd.), by se mohlo jednat spíše o purifikující selekci (tj. výskyt mutace v kódující části mtDNA poblíž kontrolního úseku, která jedince znevýhodňuje) v populaci, než o demografickou expanzi. V tomto případě by byly signály expanze pouze důsledkem této selekce.

V sekvenačních datech byly landscape genetic metodou identifikovány dvě populace žijící na území České republiky - západní a východní. Předěl mezi populacemi se táhne skrz Českomoravskou vrchovinu a východní část Krkonoš. Vzhledem k nedostatečnému počtu vzorků z oblasti Slezska a severní Moravy není možné s jistotou určit, zda jedinci žijící v této oblasti skutečně náleží k východní populaci, nebo ve skutečnosti k západní.

Na východní populaci žijící v oblasti tzv. Panonie by mohl mít vliv zdejší typ ekosystému a podnebí. Oblast Panonské nížiny se vyznačuje sušším klimatem, nejrozšířenějším ekosystémem je zde step. Vzhledem k tomu, že krtek evropský nejčastěji vyhledává vlhké lesy a louky, krtci žijící v oblasti Panonské nížiny a okolí mohou být více přizpůsobeni prostředí stepí vyhledávat, což by je odlišovalo i na úrovni genetické jako samostatnou populaci.

Signál pro tuto analýzu nebyl příliš silný. Výsledky mohla zkreslit nejistota určení souřadnic jednotlivých vzorků a malý počet vzorků. Pro další analýzy je potřeba podrobnější a přesnější sampling.

V datasetu bylo identifikováno 23 haplotypů, což je poměrně vysoké číslo na počet vzorků v datasetu ( $n=40$ ). Haplotypy se odlišovaly jednou až dvěma mutacemi. Nejpočetnějším byl haplotyp 3, který sdílelo 5 jedinců pocházejících ze dvou oblastí vzdálených Čech. U vzorku č. 21 ze Švýcarska byl identifikován stejný haplotyp jako u dalších tří vzorků z České republiky, které pocházely z jižní Moravy severních Čech. Vzorek č. 15 z Rumunska měl haplotyp shodný se vzorkem z východní Moravy.

Haplotypová síť nebyla příliš rozlišená a neposkytla další větší signál, což může být dáno malým množstvím mutací mezi jednotlivými haplotypy nebo nejistotou některých souřadnic. Nebyly identifikovány žádné haploskupiny, struktura sítě neodhalila přítomnost mitochondriálních linií v populaci.

Celkově síť jeví hvězdicovitou strukturu (tzv. star-like phylogeny), což také ukazuje na geografickou populační expanzi, při které se během migrace vytvářejí z původní populace menší izolované populace s rozdílnými haplotypy.

Vznik velkého množství haplotypů, jako v tomto případě, může být dáno omezenou migrační vzdáleností krtka a omezeným genovým tokem mezi populacemi. V městských zástavbách mohou migraci bránit uměle vytvořené překážky a ještě více omezit tok genů, než v přírodě.

## 6 Závěry

Názor nejen na taxonomické zařazení krtek, ale i na skupinu Insectivora se během posledních let měnil. Podle nejnovějších studií je řazen do řádu Eulipotyphla a čeledi Talpidae.

Nejstarší fosilní nálezy jedinců patřících k Talpidae pocházejí z pozdního eocénu a oligocénu. Talpidae mají původ ve Starém světě, odkud se rozšířili do Severní Ameriky (Shinohara *et al.*, 2003). Během osidlování nových oblastí se druhy skupiny Talpidae dvakrát nezávisle adaptovaly na život pod zemí, což podporuje existence dvou linií krtek - asijské a evropské. Pomalá evoluce jejich morfologických znaků má za následek vysokou míru kryptické diverzity u krtek (Bannikova *et al.*, 2015B).

Evropská linie zahrnuje také rod *Talpa* s devíti druhy žijícími v Evropě a západní Asii (Bannikova *et al.*, 2015B).

Na diverzitu *T. europaea* měly vliv oscilace klimatu během pliocénu a pleistocénu, kdy byly populace zatlačeny do refugií a poté se opět rozšířily během interglaciálů (Loy *et al.*, 2005). Jižní Evropa vykazuje vyšší molekulární diverzitu, jelikož tyto oblasti sloužily jako útočiště pro živočišné druhy v době posledního glaciálního maxima (Feuda *et al.*, 2015).

Ve střeoevropské populaci byla zjištěna vysoká haplotypová diverzita, která je z části daná malou pohyblivostí krtek a omezeným genovým tokem mezi populacemi.

Podle výsledků analýz populace prošla demografickou expanzí nebo je pod vlivem purifikující selekce.

V data byla západovýchodně rozdělena na dvě populace. Kvůli nedostatečnému množství vzorků z některých oblastí není možné určit, do které populace jedinci z daných oblastí náleží.

Pro další analýzy a závěry je potřeba podrobnější vzorkování a přesnější určení souřadnic, případně další mapování výskytu.

## 7 Reference

- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 37-48
- Bannikova AA, Zemlemerova E D, Lebedev VS, Aleksandrov DY, Fang F, Sheftel BI. 2015A. Phylogenetic Position of the Gansu Mole *Scapanulus oweni* Thomas, 1912 and the Relationships between Strictly Fossorial Tribes of the family Talpidae. *General Biology* **464**: 230-234.
- Bannikova AA, Zemlemerova ED, Calangelo P, Sözen M, Sevindik M, Kidov AA, Dzuev RI, Kryštufek B, Lebedev VS. 2015B. An underground burst of diversity - a new look at the phylogeny and taxonomy of the genus *Talpa* Linnaeus, 1758 (Mammalia: Talpidae) as revealed by nuclear and mitochondrial genes. *Zoological Journal of the Linnean Society* **175**: 930-948.
- Biltueva L, Vorobieva N. 2012. Chromosome Evolution in Eulipotyphla. *Cytogenetic and Genome Research* **137**: 154-164.
- Colangelo P, Bannikova AA, Kryštufek B, Lebedev VS, Annesi F, Capanna E, Loy A. 2010. Molecular systematics and evolutionary biogeography of the genus *Talpa* (Soricomorpha: Talpidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **55**: 372-380.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**: 772.
- Douady CJ, Chatelier IP, Madsen O, de Jong WW, Catzeflis F, Springer MS, Stanhope MJ. 2002. Molecular phylogenetic evidence confirming the Eulipotyphla concept and in support of hedgehogs as the sister group to shrews. *Molecular Phylogenetics and evolution* **25**: 200-209.



Douady CJ; Douzery EJ P. 2009. Hedgehogs, shrews, moles, and solenodons (Eulipotyphla). *The Timetree of life*: 495-498.

Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. 2005. Skyline Coalescent. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 1185-1192.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology And Evolution* **29**: 1969-1973.

Dubey S, Zaitsev M, Cosson J-F, Abdukadier A, Vogel P (2006) Pliocene and Pleistocene diversification and multiple refugia in a Eurasian shrew (*Crocidura suaveolens* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 635-647.

Feuda R, Bannikova AA, Zemlemerova ED, Febbraro M di, Loy A, Hutterer R, Aloise G, Zykov A E, Annesi F, Colangelo P. 2015. Tracing evolutionary history of the mole, *Talpa europaea*, through mitochondrial DNA phylogeography and species modelling. *Biological Journal of the Linnean Society* **114**: 495-512.

Guillot G, Mortier F, Estoup A. 2005. Geneland: a computer package for landscapegenetics. *Molecular Ecology Notes* **5**: 712-715.

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

He K, Shinohara A, Jiang X-L, Campbell KL. 2014. Multilocus phylogeny of talpine moles (Talpini, Talpidae, Eulipotyphla) and its implications for systematics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **70**: 513-521.

Hu J, Zhang Y, Yu L. 2012. Summary of Laurasiatheria (Mammalia) Phylogeny. *Zoological Research* **33**: 65-74.

Kawada S-I, Son N T, Can D N. 2012. A new species of mole of the genus *Euroscaptor* (Soricomorpha, Talpidae) from northern Vietnam. *Journal of Mammalogy* **93**: 839-850.

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S., Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton, Mentjies P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**: 1647-1649.

Kirihara T, Shinohara A, Tsuchiya K, Harada M, Kryukov AP, Suzuki H. 2013. Spatial and Temporal Aspects of Occurrence of Moger species in the Japanese Islands Inferred from Mitochondrial and Nuclear Gene Sequences. *Zoological Science* **30**: 267-281.

Kumar S, Stecher G, and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**: 1870-1874.

Loy A, Colangelo P, Capanna E. 2005 Origin and Evolution of Western European moles (genus *Talpa*, Insectivora): a multidisciplinary approach. *Mammal Study* **30**: 13-17.

MacDonald DW (ed). 2009. *The Encyclopedia of mammals*. Oxford University Press, Oxford

Madsen O, Scally M, Douady CJ, Kao D J, DeBry RW, Adkins R, Amrine HM, Stanhope MJ, Jong WW de, Springer M S. 2001. Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals. *Letters to Nature* **409**: 610-614.

Melo-Ferreira J, Boursot P, Suchentrunk F, Ferrand N, Alves PC. 2005. Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular Ecology* **14**: 2459-2464.

Mouchaty KS, Gullberg A, Janke A, Arnason U. 2000. The Phylogenetic Position of the Talpidae Within Eutheria Based on Analysis of Complete Mitochondrial Sequences. *Molecular Biology and Evolution* **17**: 60-67.

Narita Y, Oda S, Takenaka O, Kageyama T. 2001. Phylogenetic Position of Eulipotyphla Inferred from the cDNA Sequences of Pepsinogens A and C. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**: 32-42.

Nicolas V, Martínez-Vargas J, Hugot J-P. 2017. Molecular data and ecological niche modelling reveal the evolutionary history of the common and Iberian moles (Talpidae) in Europe. *Zoologica Scripta* **46**: 12-26.

Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-Del Barrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution* **34**: 3299-3302.

Shinohara A, Campbell KL, Suzuki H. 2003. Molecular phylogenetic relationships of moles, shrew moles and desmans from the new and old worlds. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**: 247-258.

Shinohara A, Suzuki H, Tsuchiya K, Zhang Y-P, Luo J, Jiang XL, Wang YX, Campbell KL. 2004A. Evolution and Biogeography of Talpid Moles from Continental East Asia and the Japanese islands from Mitochondrial and Nuclear genes. *Zoological Science* **21**: 1177-1185.

Shinohara A, Kawada S-I, Yasuda, Liat L B. 2004B. Phylogenetic position of the Malaysian mole, *Euroscaptor micrura* (Mammalia: Eulipotyphla), inferred from three gene sequences. *Mammal Study* **29**: 185-189.

Shinohara A, Kawada S-I, Son NT, Koshimoto, Endo H, Can DN, Suzuki H. 2014. Molecular Phylogeny of East and Southeast Asian fossorial moles (Lipotyphla, Talpidae). *Journal of Mammalogy* **95**: 455-466.

Shinohara A, Kawada S, Son N T, Can, D N, Sakamoto S H, Koshimoto C. 2015. Molecular phylogenetic relationships and intra-species diversities of three Euroscaptor spp. (Talpidae: Lipotyphla: Mammalia) from Vietnam. *Raffles Bulletin of Zoology* **63**: 266-375.

Springer M S, Cleven GC, Madsen O, de Jong WW, Waddell VG, Amrine HM, Stanhope MJ. 1997. Endemic African mammals shake the phylogenetic tree. *Nature* **388**: 61-64.

Stanhope MJ, Waddell VG, Madsen O, de Jong W, Hedges S B, Cleven GC, Diana Kao, Springer MS. 1998. Molecular evidence for multiple origins of Insectivora and for a new order of endemic African insectivore mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 9967-9972.

Tryfonopoulos GA, Thanou EG, Fragedakis-Tsolis SE, Chondropoulos BP. 2010. New data on the distribution and genetic structure of Greek moles of the genus *Talpa* (Mammalia, Talpidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **48**: 188-193.

Ye J, Biltueva L, Huang L, Nie W, Wang J, Jing M, Su W, Vorobieva N V, Jiang X, Graphodatsky A L, Yang F. 2006. Cross-species chromosome painting unveils cytogenetic signatures for the polyphyly of Insectivora. *Chromosome Research* **14**: 151-159.

Whidden HP. 2000. Comparative Myology of Moles and the Phylogeny of the Talpidae (Mammalia, Lipotyphla). *American Museum Novitates* **3294**: 1-53.

Zemlemerova ED, Bannikova AA, abramov AV, Lebedev VS, Rozhnov. 2013. New Data on Molecular Phylogeny of the East Asian Moles. *General Biology* **451**: 707-710.

Zemlemerova ED, Bannikova AA, Lebedev VS, Rozhnov VV, Abramov AV. 2016. Secrets of the underground Vietnam: An underground

species diversity of Asia moles (Lipotyphla: Talpidae: *Euroscaptor*).  
Proceedingd of the Zoological Institute RAS **320**: 193-220.

Zhou X, Xu S, Xu J, Chen B, Zhou K, Yang G. 2012. Phylogenomic  
Analysis Resolves the Interordinal Relationships and Rapid  
Diversification of the Laurasiatherian Mammals. *Systematic Biology* **61**:  
150-164.