

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta



**Magisterská práce**

**Parazito-hostitelská koevoluce mezi vešmi druhu *Polyplax serrata* a myšicemi rodu *Apodemus***

**Jana Martinů**

Školitel: Mgr. Jan Štefka PhD.

Laboratoř Molekulární Fylogenetiky a Evoluce Parazitů,  
Parazitologický Ústav, Biologické Centrum, AVČR



České Budějovice 2009

## ***Magisterská práce:***

Martinů, J. 2009: Parazito-hostitelská koevoluce mezi populacemi vši *Polyplax serrata* a myšicemi rodu *Apodemus* [Host-parasite coevolution between the louse specie *Polyplax serrata* and its host, the mice of the genus *Apodemus*. Mgr. Thesis, in Czech] – 35 p. Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## ***Anotace:***

The study analyzes genealogy and coevolutionary relationships between the bloodsucking louse *Polyplax serrata* (Anoplura) and its host of the genus *Apodemus* (Rodentia). It uses the tools of molecular biology and phylogenetics for interpretation of the parasite distribution in respect to the geography and host specificity.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 9.1.2009

Bc. Jana Martinů

### ***Poděkování:***

Ráda bych poděkovala především Honzovi Štefkovi a Václavu Hypšovi za obrovskou míru trpělivosti po celou dobu mého snažení v laboratoři fylogenetiky, dále i všem zbývajícím lidem z této laboratoře za cenné rady a připomínky. Práci bych nebyla schopna dokončit bez podpory svých rodičů a mého přítele, kteří občas ani nechápali, čím a proč se zabývám.

# Obsah

<b>1. Úvod</b>	1
<b>2. Cíle práce</b>	4
<b>3. Materiál a metodika</b>	5
<i>DNA extrakce, PCR a sekvenace</i>	5
<i>Alignmenty, fylogenetické a populační analýzy</i>	6
<i>Porovnání rychlostí molekulární evoluce parazita a hostitele</i>	6
<b>4. Výsledky</b>	9
<i>Sekvence a alignmenty</i>	9
<i>Fylogenetické analýzy</i>	9
<i>Populační struktura</i>	15
<i>AMOVA, DNASP</i>	15
<i>Porovnání rychlostí molekulární evoluce parazita a hostitele</i>	16
<b>5. Diskuse</b>	17
<i>Geografická a hostitelská variabilita linií <i>P. serrata</i></i>	17
<i>Struktura populací hostitele a koevoluce parazit-hostitel</i>	20
<i>Perspektivy dalšího studia modelu</i>	22
<b>6. Závěr</b>	23
<b>7. Seznam použité literatury</b>	24
<b>8. Přílohy</b>	32

## 1. Úvod

Genetická informace je stále častěji využívána k objasnění souvislostí mezi ekologií či bionomií studovaných organismů a jejich evoluční historií, k odvozování speciálních módů a rekonstrukci fylogenetických vztahů. Podobně je tomu i v parazitologických pracích, které studují koevoluci mezi hostiteli a jejich parazity pomocí rekonstrukce fylogenezí či vnitrodruhových genealogií. Mezi fylogenezemi interagujících taxonů je možné najít různé druhy vztahů, od úplné kongruence až po naprostou absenci signifikantní podobnosti dvou topologií (Page, 2003). Ačkoliv jsou kongruence mezi fylogenezemi organismů častým výsledkem koevolučních studií (Hafner a Nadler, 1990; Moran a Baumann, 1994), ve většině případů nejsou perfektní, v důsledku řady evolučních procesů, které vedou k neshodám mezi genealogiemi a fylogenezemi interagujících organismů. Předpokládá se, že inkongruence mezi fylogenezemi parazitů a hostitelů jsou způsobeny čtyřmi hlavními procesy (Page, 1994; Paterson et al., 1997; Page a Charleston, 1998; Johnson et al., 2003). (i) Při hostitelském *přeskoku* dojde k přenosu parazita zčásti nebo zcela na nového hostitele. Např. podle studie Reed et al. (2007), kteří se zabývali koevolucí primátů a vší rodu *Phtirus*, pravděpodobně před 3-4 miliony let došlo k hostitelskému přeskoku vší z linie goril (rod *Gorilla*) na linii vedoucí k člověku (rod *Homo*), tedy až po oddělení šimpanzů (rod *Pan*) a člověka (*Homo*) (Reed et al., 2007). (ii) *Duplikace* parazita, neboli speciace parazita bez současné speciace hostitele. (iii) O *sorting event* se hovoří v případě, kdy na hostiteli vymře některá z linií parazita. Může také dojít k odštěpení a speciaci nové linie hostitele z populace, která nebyla infikována parazity, jev zvaný „missing the boat“. (iv) Posledním evolučním procesem, nazývaným některými autory *kolonizace*, je recipročním případem duplikace, tedy speciace hostitele bez následné speciace parazita. Jako příklad mohou sloužit všenky *Columbicola theraseae* parazitující na dvou sesterských druzích hrdliček *Streptopelia vinacea* a *Streptopelia alpicola* s alopatrickým výskytem (Johnson et al., 2003). Jak bylo autory demonstrováno, všenky stejného druhu jsou zároveň parazity dalších druhů hrdliček *S. senegalensis* a *Oena capensis*, které žijí sympatricky s oběma alopatrickými druhy hostitelů, a parazitům slouží zřejmě jako vektor udržující genetický tok mezi těmito hostiteli.

Ačkoliv jsou výše jmenované procesy běžně používanými vysvětleními inkongruencí ve fylogenezích parazita a hostitelů, jejich rozlišení pouze na základě porovnávaných fylogenezí často není triviální. S výjimkou zmíněných příkladů navíc většinou schází ve většině takových studií detailní empiricky podložené údaje. Autoři tedy vybírají nejpravděpodobnější alternativu pouze na základě předpokládaných tendencí k jednomu určitému typu interakce, o níž se na základě bionomie parazita usuzuje, že je pro daný druh/skupinu parazitů typická. Míra fylogenetické závislosti parazita a hostitele přitom závisí vedle charakteristik reflektujících bionomii organismů i na zcela náhodných, historicky jedinečných událostech. Mezi často uvažované bionomicky podmíněné parametry patří např. hostitelská specifita parazita,

přímý/nepřímý vývojový cyklus, či přítomnost nebo absence volně žijících stádií (Clayton a Johnson, 2003; Page, 2003). U parazitů s vysokou hostitelskou specifitou bývá často pozorována shoda mezi fylogenezemi parazitů a hostitelů (např. Clayton et al., 2004; Nieberding 2004; Hosokawa et al., 2006), zatímco fylogeneze generalistů se obvykle vyvíjí nezávisle na jejich hostitelích (Althoff a Thompson, 1999; Baer et al., 2003; Joseph et al., 2002). Ani to však není pravidlem, protože i u taxonů s vysokou mírou hostitelské specifity bývají pozorovány značné inkongruence mezi hlavními liniemi parazitů a hostitelů (např. Johnson et al., 2002a; Light a Hafner, 2008). Na druhou stranu mnoho polyxenních druhů parazitů bylo po aplikaci molekulárních metod shledáno kryptickými druhy s velmi dobře rozlišenou hostitelskou specifitou (např. Johnson et al., 2002b; Smith et al., 2006). Koevoluční studie se většinou zabývají parazity s přímým vývojovým cyklem (Nieberding, 2004; Reed et al., 2004; Light a Hafner, 2008), protože u parazitů s mezihostiteli se snižuje pravděpodobnost nalezení kongruence mezi fylogenezemi i pochopení příčin neshod mezi topologiemi. Avšak i u druhů s komplexními vývojovými cykly lze, přes chybějící kofylogenetický signál, objevit značný vliv hostitelské specifity na genealogii parazita. V takovém případě je pro evoluci parazita klíčovým mezihostitel s největším selekčním tlakem pro vznik specifických adaptací (Steinauer et al., 2007; Bouzid et al., 2008).

Generační doba je u většiny parazitů výrazně kratší ve srovnání s jejich hostiteli, což vede k akumulaci většího množství mutací během určitého časového úseku (Whiteman a Parker, 2005; Huysse et al., 2005). Různé poměry mutačních rychlostí parazita a hostitele určují, jaký typ evolučních událostí lze v rámci dané skupiny organismů nejlépe studovat. Organismy s krátkou generační dobou a vysokou mutační rychlostí, kterými jsou např. viry, lze využít především ve studiích zabývajících se demografickými událostmi hostitelů, protože dokáží akumulovat dostatečné množství mutací během krátkého časového úseku (Wirth et al., 2005). Bakterie s delší generační dobou a nižší mutační rychlostí umožňují studium událostí starých desetitisíce let. Takto byly např. lidský *papillomavirus* a žaludeční bakterie *Helicobacter pylori* využity pro studium genealogie a migračních cest *Homo sapiens* (Wirth et al., 2004; Wirth et al., 2005). Naproti tomu, parazitičtí červi a členovci se ukázali dobrými modelovými organismy pro porovnávání fylogenezí v řádech statisíců a milionů let stáří (Nieberding et al., 2004; Reed et al., 2004). Například Nieberding et al. (2004) identifikovali společné genetické a geografické linie hlístic *Heligmosomoides polygyrus* a myšic *Apodemus sylvaticus* na Iberském poloostrově, které na konci pleistocénu rekolonizovaly severozápadní Evropu.

Dalším důležitým faktorem v koevoluci parazita a hostitele je způsob přenosu parazita. Předpokládá se, že vertikální přenos parazitů z generace na generaci hostitelů vede k naprosté kongruenci fylogenezí (Whiteman a Parker, 2005; Wirth et al., 2004; Johnson a Clayton, 2004). Vertikální přenos je spojen s úzkou hostitelskou specifitou parazitů a lokálními adaptacemi bránícími přenosu parazitů na nové linie

hostitelů (Clayton a Johnson, 2003; Prugnolle et al., 2005). Nicméně, striktní vertikální přenos není nezbytný. Pokud jsou parazité přenášeni horizontálně pouze v rámci divergujících linií hostitele a ne mezi nimi, ani horizontální přenos nevylučuje kodivergenci parazita a hostitele (Whiteman a Parker, 2005; Wirth et al., 2004).

Z uvedené diverzity problémů týkajících se studia koevoluce parazita a hostitele je zjevné, že pro úspěšné objasnění této oblasti biologie je zapotřebí především velkého množství empirických údajů z různých skupin organismů. Zatímco existuje již značné množství koevolučních studií provedených na fylogenetické úrovni, zůstává koevoluční problematika téměř nezmapována na úrovni genealogické a populační. Tato práce si proto dává za cíl studovat evoluci hostitelské specifity, genealogií parazitů a koevoluční vztahy na populační úrovni na modelové skupině parazitů. Jako modelový systém byl vybrán vztah mezi druhem vší *Polyplax serrata* a jejími hostiteli, myšicemi rodu *Apodemus*.

Tento model poskytuje několik vlastností, které jej činí vhodným ke studiu evoluce parazito-hostitelských vztahů. Vší (Insecta: Psocodea: Anoplura), které jsou permanentními parazity placentárních savců, jsou vysoce specializovaným krevsajícím hmyzem, jehož životní cyklus je zcela závislý na jediném hostiteli. Vší se živí každé 3 hodiny krví přímo z cév hostitele (Hocking, 1971; Nelson et al., 1977) a celý životní cyklus trvá pouze 2-4 týdny (Marshall, 1981). Takto úzká vazba na hostitele vytváří prostředí pro vznik hostitelsky specializovaných linií či druhů. Navíc, zhruba dvě třetiny druhů parazitují na hlodavcích (Kim, 1988), kteří jsou díky vysoké abundanci a širokému geografickému rozšíření častým objektem populačně zaměřených studií. Podobně tomu je i v kosmopolitní čeledi Polyplacidae (Light a Hafner, 2007). Konkrétně, *Polyplax serrata* je typickým ektoparazitem myšic rodu *Apodemus*, jen příležitostně je možné *P. serrata* nalézt na jiných hlodavcích, kterými jsou např. *Clethrionomys glareolus*, *Sorex araneus* a *Mus musculus* (Křištofík a Lysý, 1992). *P. serrata* je spolu se svými hostiteli rozšířen na území celé Eurasie, což dává prostor vzniku hostitelsky i geograficky specifických linií parazita. Populace vší na jednotlivých hostitelích dosahují dostačujících počtů pro potřeby genealogicky zaměřených studií. Podle Křištofík (1994) a Light a Hafner (2008) průměrná intenzita infestace dosahuje 10 vší na hostitele a průměrná prevalence je 20%.

Myšice rodu *Apodemus* Kaup, 1829 žijí v temperátních oblastech Palearktu, kde tvoří cca 21 druhů, které jsou rozřazeny do 4 linií s překrývajícími se areály (Serizawa et al., 2000). Nejnovější fylogenetické studie se zabývají především dvěma evropskými druhy, *A. flavicollis* Melchior 1834 a *A. sylvaticus* Linnaeus 1758, z důvodu překrývající se geografické distribuce a kvůli obdobným ekologickým preferencím. Odlišení fenotypů *A. flavicollis* a *A. sylvaticus* je často bez použití molekulárních metod velice problematické (Michaux et al., 2001). Oba druhy jsou rozšířeny v mnoha zemích západní a střední Evropy kde žijí sympatricky až

syntopicky (Montgomery, 1999). Ačkoliv jsou *A. flavicollis* a *A. sylvaticus* z taxonomického hlediska blízké druhy, reagovaly podle studií mitochondriální DNA na čtvrtohorní zalednění zcela odlišným způsobem (Michaux et al., 2003; 2004; 2005). Myšice *A. flavicollis* se zřejmě nebyly schopné přizpůsobit změně klimatu na Iberském poloostrově, zatímco myšice *A. sylvaticus* z této oblasti kolonizovaly severní a západní Evropu. Naproti tomu hlavním refugiem *A. flavicollis* byla oblast Balkánu a Apeninského poloostrova, odkud se myšice po odeznění glaciálu šířily směrem na západ a sever. Dalším možným refugiem *A. flavicollis* by vzhledem k nukleotidové diverzitě a genetické divergenci sekvencí COB mohla být oblast Ukrajiny a jižního Ruska, ale pro potvrzení této hypotézy by bylo potřeba zpracování většího množství vzorků (Michaux et al., 2005). Balkánsko-apeninská oblast byla podle paleontologických a paleoklimatologických dat refugiem i pro lokální linie *A. sylvaticus* (Tzedakis et al., 1997). Tyto linie však zůstaly po ustoupení zalednění zablokovány okolními pohořími (Alpy v Itálii a pohoří na Balkánu) a nepřispěly k znovuosídlení severní a západní Evropy. Rozložení genetické variability mitochondriální DNA ve vzorcích z této oblasti naznačuje, že tamější populace *A. sylvaticus* utrpěly na rozdíl od *A. flavicollis* genetický bottleneck (Michaux et al., 2005).

Komplexní a nejednotná kvartérní evoluce hostitelů zcela jistě ovlivnila i populační historii permanentních parazitů, kterými jsou vši *P. serrata*. Podle Štefka a Hypša (2008) je model *Polyplax-Apodemus* vhodný pro studium evoluce hostitelské specifity, populační genetiky a genealogie. Štefka a Hypša (2008) našli ve střední a východní Evropě 3 linie vší *P. serrata*, které se lišily fylogeograficky, hostitelskou distribucí a stupněm hostitelské specifity.

## 2. Cíle práce

Cílem této práce je posoudit vliv sdílené demografické historie parazita *P. serrata* a jeho hostitelů na evoluci genetických linií parazita a takto identifikovat faktory, které se podílejí na speciaci parazitů (geografická izolace, hostitelská specifita a přeskoky) Konkrétní cíle jsou následující:

1. Rozšířit studovaný vzorek parazitů o nové sběry v rámci dříve studovaných populací i o nové lokality v západní Evropě. Rekonstruovat genealogii evropských populací vší *P. serrata* a jejich dvou nejčastějších hostitelů *Apodemus flavicollis* a *A. sylvaticus*.
2. Porovnat distribuci genetických linií parazita s fylogenezemi a geografickým rozšířením hostitelů.
3. Porovnat rychlost evoluce mitochondriální DNA parazita a hostitele.



### 3. Materiál a metodika

Zpracovaný materiál vši druhu *Polyplax serrata* pochází ze sběrů prováděných v průběhu let 2001-2008. Vši byly nasbírány z 5 druhů myšic (*Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. microps*, *A. peninsulae*), které byly odchyceny na lokalitách znázorněných na mapě (Obr.1). Počty jedinců *Polyplax serrata* analyzovaných pro jednotlivé lokality a hostitele jsou uvedeny v Tab.1. Nasbíraný materiál parazitů a tkáňové vzorky hostitele (několik článků prstů ze zadní končetiny) byly pro molekulárně biologické účely konzervovány v 96% etanolu a skladovány při 4°C.

#### DNA extrakce, PCR a sekvenace

Pro izolaci DNA byly vši vyjmuty z etanolu, rozříznuty skalpelem mezi thoraxem a abdomenem a vysušeny pomocí vakuové centrifugy SpeedVac (KNF Neuberger). Genomová DNA byla extrahována izolačním kitem DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Pro zvýšení výtěžnosti DNA byl extrakční protokol výrobce upraven. Extrakční pufr byl v prvním kroku izolace nahrazen pufrům následujícího složení: ddH<sub>2</sub>O (885μl), 1x PCR pufr s MgCl<sub>2</sub> (100μl), 1%Tween 20 (10μl) a proteináza K o koncentraci 100μg/ml (5μl). Ke vzorku bylo přidáno 25μl upraveného extrakčního pufru, na 15 minut byl zmražen na -70°C, pak byl inkubován při 55°C 8 hodin. Nakonec byl 15 minut inkubován při 98°C. Poté byla extrakce DNA dokončena podle protokolu výrobce kitu (Qiagen). Chitinový exoskelet parazitů byl po extrakci DNA uchován pro případ zpětné morfologické determinace. Extrakce DNA z tkáně hostitelů byla provedena standardním způsobem pomocí DNeasy Tissue Kit (Qiagen).

K získání fragmentu z mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidasu podjednotku I (COI) dlouhého 381bp byly použity primery L6625/H7005 (Hafner et al., 1994), PCR byla provedena s Taq polymerázou (TopBio). Sekvence COI byly získány přímým sekvenováním s PCR primery (Macrogen, Korea). Pro rekonstrukci genealogických vztahů 2 hostitelských druhů, myšice lesní *A. flavicollis* a myšice křovištní *A. sylvaticus*, byl vybrán úsek mitochondriálního genu pro cytochrom b (COB) dlouhý 752bp u *A. flavicollis* a 740bp u *A. sylvaticus*. Při použití univerzálních primerů L7 a H6 pro COB (Kocher et al., 1989) byly obdrženy sekvence směsí PCR produktů mitochondriálního genu pro COB a jeho nukleárních pseudogenů. Proto byly pro *A. flavicollis* podle sekvencí dostupných v databázi GenBank navrženy a otestovány primery specifické pro mitochondriální produkt, MITOAF(5'-TTTGGCTCCCTCTTAGGAATC-3')/COBR(5'-CGGAATATTAKRCTDCGTTGTTT-3'), pro *A. sylvaticus* byla použita kombinace primerů MITOL (Michaux, pers. comm.)(TTCGGCTCATTGCTAGGAATC)/COBR. PCR reakce byla provedena s Taq Polymerázou (TopBio). Sekvence byly získány přímým sekvenováním s PCR

primery (Macrogen, Korea). Pro práci se sekvencemi byly použity programy SeqMan, EditSeq a Megalign (DNASTAR). Identifikace sekvencí a jejich porovnání s publikovanými sekvencemi parazita i hostitelů bylo provedeno pomocí programu BLAST, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

#### *Alignmenty, fylogenetické populační analýzy*

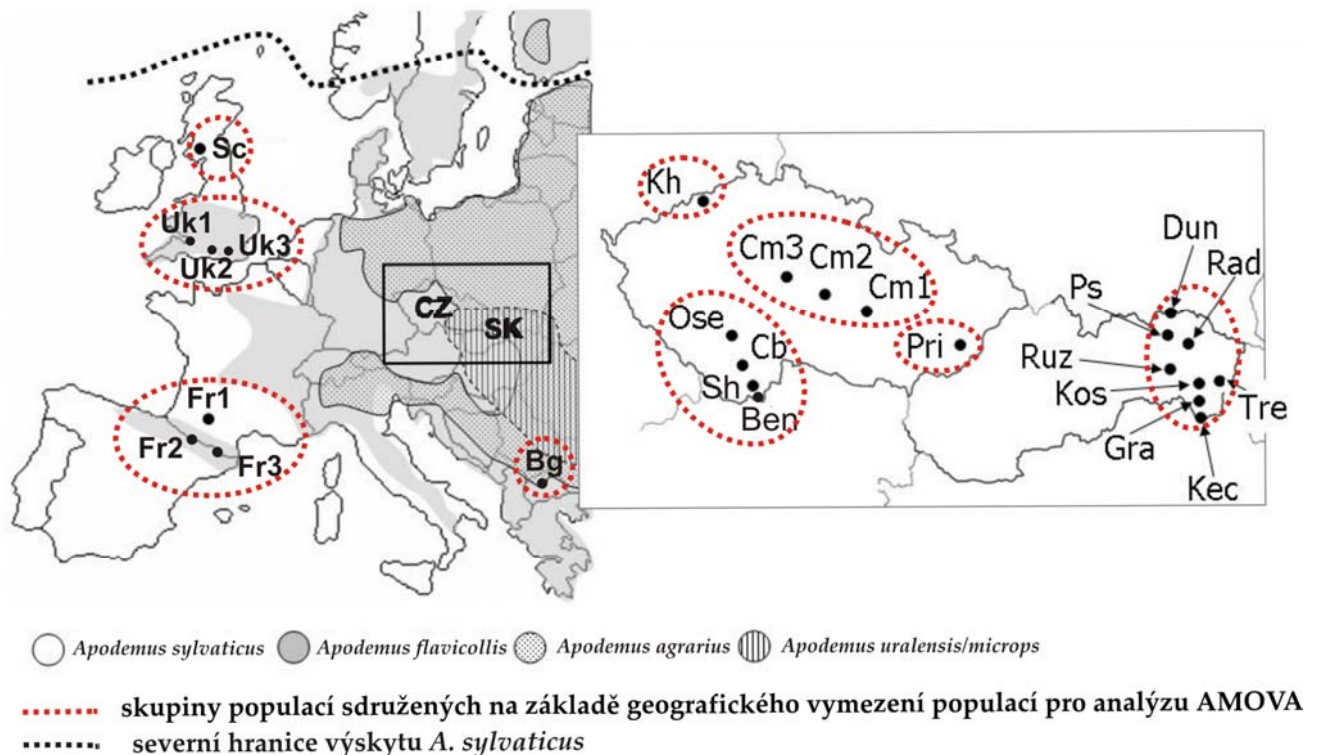
Alignmenty sekvencí byly sestaveny v programu BioEdit 7 (Hall, 1999) bez nutnosti introdukce delecí a insercí. COI a COB fragmenty byly kolabovány do jednotlivých haplotypů pomocí programu Collapse 1.2 (Posada, 2006). K zjištění genealogických vztahů mezi haplotypy byly použity metody maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML), neighbour joining (NJ) a rekonstrukce haplotypové sítě v programu TCS (Clement et al., 2000). MP analýzy byly provedeny v programu TNT (Goloboff et al., 2004) s poměry tranzicí ku transverzím (Ts/Tv) 1/1, byl použit TBR algoritmus s 10 replikacemi a náhodným přidáváním sekvencí (random sequence addition). Sekvence druhů *Polyplax spinulosa* a *Hoplopleura acanthopus* dostupné v GenBank byly použity jako outgroup v analýze vší *P. serrata*. Sekvence druhu *A. flavicollis* (haplotyp AfRU405) byla použita jako outgroup pro dataset myšic druhu *A. sylvaticus* a naopak sekvence druhu *A. sylvaticus* (haplotyp As0807) jako outgroup myšic *A. flavicollis*. Striktní konsensus byl získán ze všech MP stromů. Bootstrapová podpora byla zhotovena s 1000 replikacemi, byl použit TBR algoritmus s poměrem tranzicí ku transverzím (TS/TV) 1/1. ML analýza byla provedena v programu Phyml (Guindon and Gascuel, 2003) s použitím modelu GTR a parametry odhadnutými z dat. Se stejným modelem byla provedena bootstrapová analýza s 1000 replikacemi dat. NJ analýza byla provedena v programu PAUP (Swofford, 1998).

Genetická variabilita jednotlivých linií *P. serrata* byla vyhodnocena v programu DNASP (Rozas et al., 2003) pomocí koeficientů nukleotidové ( $P_i$ ) a haplotypové ( $H$ ) diverzity. Charakter populační struktury byl dále kvantifikován pomocí analýzy molekulární variance (AMOVA) v programu ARLEQUIN (Schneider et al., 2000). Tato metoda umožňuje odhadnout podíl genetické variability vázaný na různých hierarchických úrovních populační struktury. Analýza byla provedena na třech úrovních: 1) mezi 4 hlavními liniemi *P. serrata*, 2) uvnitř evropských linií *P. serrata*, mezi skupinami populací sdružených na základě geografického rozšíření 3) mezi populacemi uvnitř geografických oblastí (viz Obr. 1).

#### *Porovnání molekulárních rychlostí parazita/hostitele*

Pro zjištění poměru evolučních rychlostí vší *P. serrata* a myšic rodu *Apodemus* byly vytvořeny matice distančních vzdáleností linií parazita a hostitele tak, aby byly zachyceny odpovídající si uzly větvení v topologiích parazita a hostitele. Z jednotlivých linií vší A, C a Baj1 bylo vybráno vždy po jedné sekvenci COI.

V případě linie B s jasnou vnitřní strukturou byly vybrány dvě sekvence; reprezentující sublinii 1 a 2 (Obr. 2). V případě myšic *A. sylvaticus* a *A. flavicollis* byly vybrány sekvence COB myšic, které odpovídaly výše zmíněným vším (sekvence myšic, na kterých byly nalezeny vybrané vši). Sekvence COB druhů *A. agrarius* (linie vši C) a *A. peninsulae* (linie vši Baj1) byly doplněny z GenBank. Sekvence parazitů a hostitelů byly alignovány v programu BioEdit 7, poté byly spočítány vzdálenosti mezi sekvencemi v programu PAUP (model Juke-Cantor). Výsledné vzdálenosti byly použity pro výpočet lineární regrese v programu Free Statistics Software (Wessa, 2008).



Obr. 1. Mapa rozšíření hostitelských druhů a lokality sběrů *P. serrata* uvedené v Tab. 1.

Tab. 1. Seznam lokalit *P. serrata* a hostitelských druhů

Stát	Zkratka	Lokalita	Počet vší na 1 druhu hostitele COI (381bp)					
			Af	As	Aa	Am	Ap	Cg
CZ	Kh	Krušné Hory, Česká Republika	26/15/7	2/2/0				
	Ose	Osek, Česká Republika		1/0/0				
	CB	České Budějovice, Česká Republika	5/0/0	6/2/5				
	Sh	Slepičí Hory, Česká Republika	1/0/0					
	Cm1	Českomoravská vrchovina, lokalita 1, Česká Rep.	15/5/4	2/2/0				
	Cm2	Českomoravská vrchovina, lokalita 2, Česká Rep.	8/0/7					
	Cm3	Českomoravská vrchovina, lokalita 3, Česká Rep.	10/0/3	7/4/3				
	Pri	Přílepy, Česká Republika	2/0/1		5/0/0			
	Ben	Benešov nad Černou, Česká Republika	2/0/0	1/0/0				
	SK	Dun	Dunajec-Prielom, Slovensko	10/0/0				
Ruz		Ružin, Slovensko	4/0/0		1/0/0			2/0/0
Rad		Radvanovske Skalky	1/0/0		4/0/0			
Gra		Grajciar, Slovensko			6/0/0			
Kec		Kechnec, Slovensko	4/0/0		5/0/0	2/0/0		
Kos		Košice, Slovensko			3/0/0			
Tre		Trebišov, Slovensko	1/0/0		4/0/0			
Ps		Plávečské štrkoviská, Slovensko				4/0/0		
RU		Bai	jezero Bajkal, Rusko					4/0/0
UK	Sc	Glasgow, Skotsko		5/0/2				
	Uk1	Stroud, Velká Británie	3/3/1	5/5/6				
	Uk2	Royal Tunbridge Wells, Velká Británie	2/2/1					
	Uk3	Ashford, Velká Británie		6/6/4				
FR	Fr1	Toulouse, Francie		7/3/4				
	Fr2	Guchen, Francie	6/6/4	12/11/8				
	Fr3	Pyrenés, Francie		1/1/1				
BG	Bg	Sofie, Bulharsko			3/3/0			

Af-*Apodemus flavicollis*; As-*Apodemus sylvaticus*; Aa-*Apodemus agrarius*; Am-*Apodemus microps*; Ap-*Apodemus peninsulae*; Cg-*Clethrionomys glareolus*. Čísla pro jednotlivé hostitele a lokality označují: celkový počet nasbíraných vší/ nově zpracované vzorky vší (červeně)/nově zpracované vzorky myši (červeně).

## 4. Výsledky

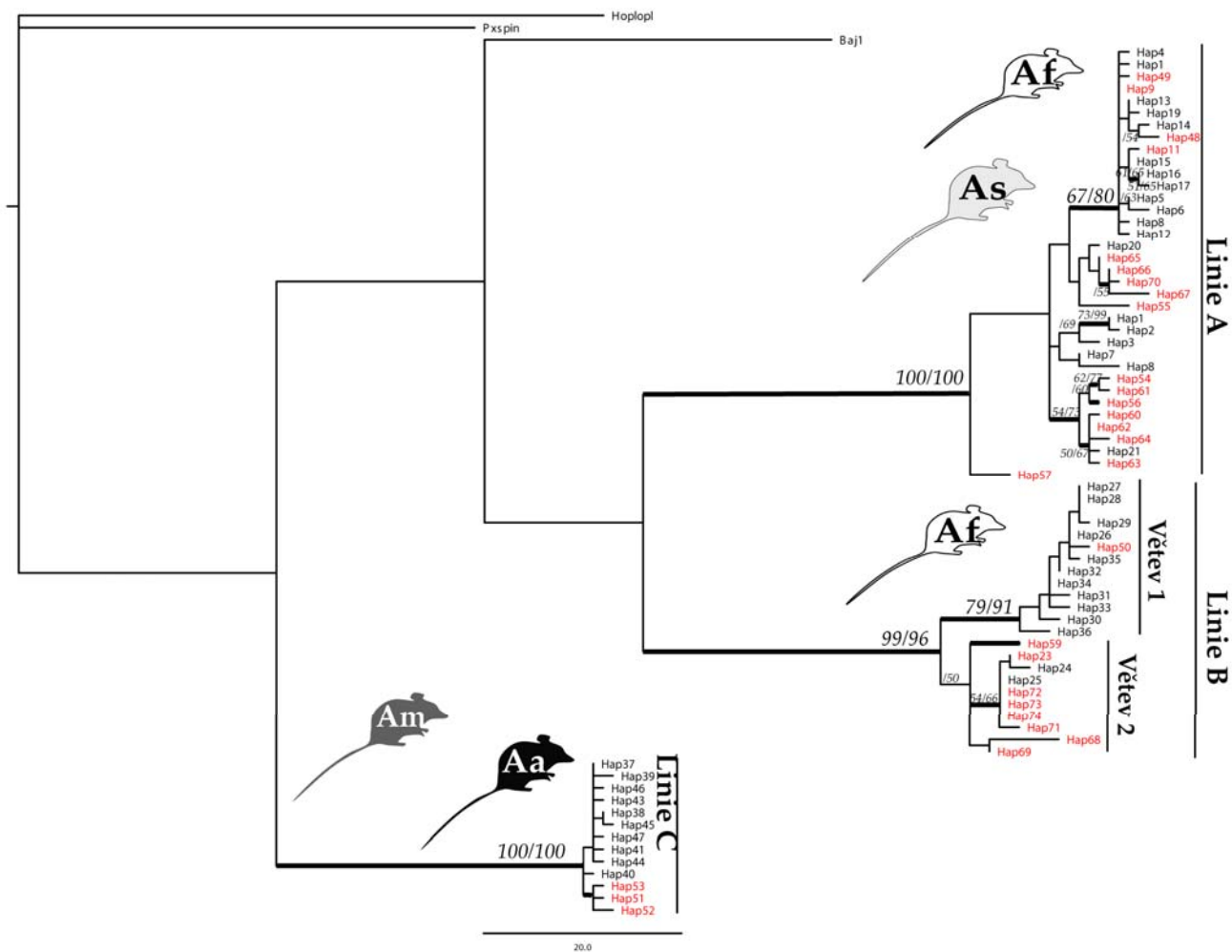
### *Sekvence a alignmenty*

Byly získány sekvence části genu pro COI dlouhé 381bp ze 72 jedinců *P. serrata* nasbíraných na 3 druzích myšic rodu *Apodemus* (*A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. agrarius*). Alignment byl doplněn o 126 sekvencí COI z *P. serrata* dlouhých 381bp (Štefka a Hypša, 2008) dostupných v GenBank. Po zkolabování 198 sekvencí do haplotypů bylo vygenerováno 75 unikátních haplotypů (Tab. 4). Z tohoto počtu bylo 28 haplotypů nových (Hap 48-74), 48 haplotypů (Hap1-47, Baj1) popsal Štefka a Hypša (2008). Distribuce haplotypů mezi sekvencemi výrazně kolísala; zatímco většina haplotypů byla reprezentována 1-8 sekvencemi *P. serrata*, haplotypy Hap9, Hap25, Hap27 a Hap37 byly reprezentovány 10, 12, 21 a 26 jedinci. Některé již dříve nalezené haplotypy byly rozšířeny o nové jedince, Hap9 byl rozšířen o 3 nové jedince, Hap25 o 10, Hap27 o 5 a Hap37 o 2 jedince.

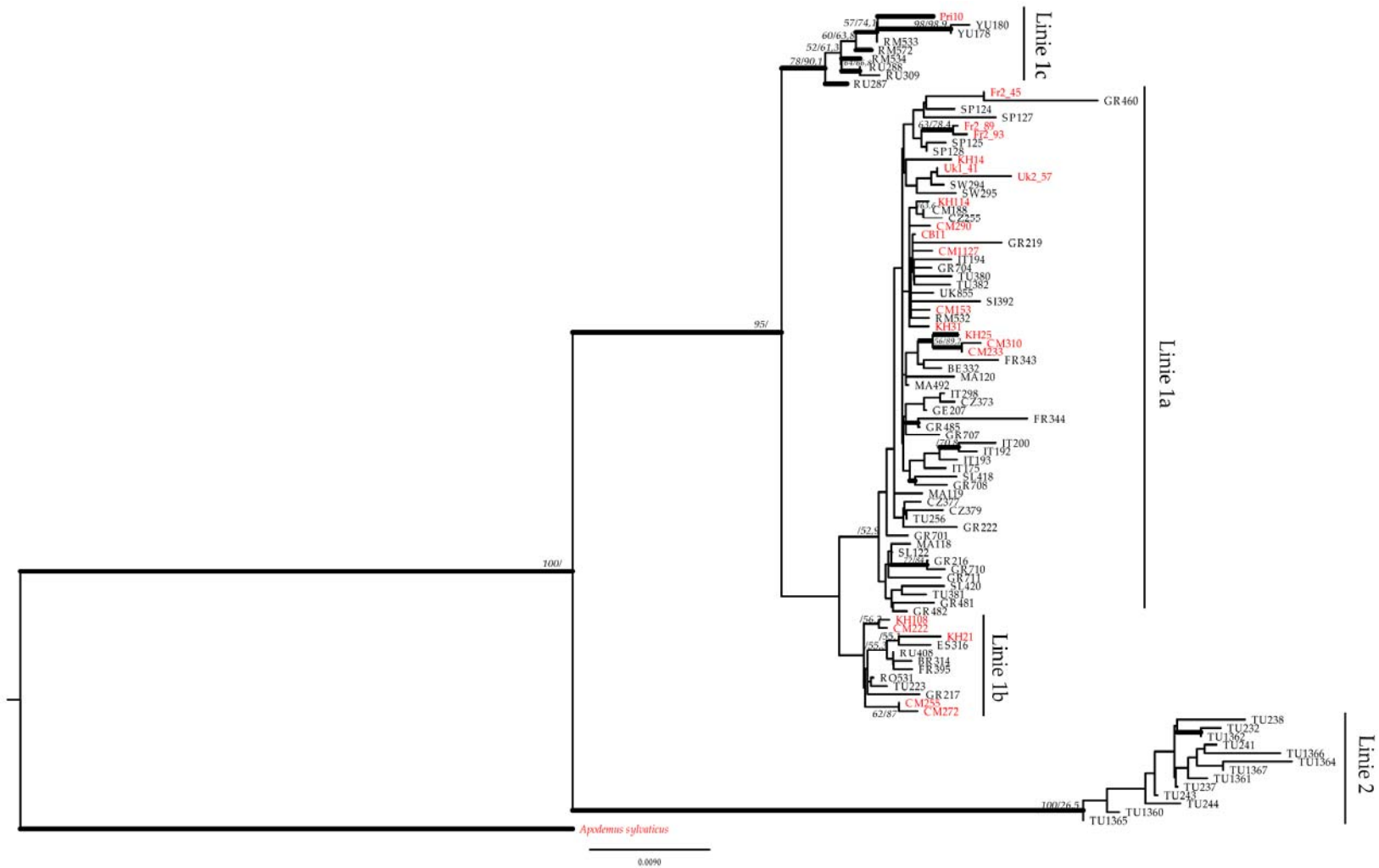
U 29 myšic druhu *Apodemus flavicollis* a 33 myšic druhu *A. sylvaticus* byl osekvenován fragment genu pro COB o délce 752 a 740bp. Alignmenty byly doplněny 92 sekvencemi *A. flavicollis* a 95 sekvencemi *A. sylvaticus* z GenBank (Michaux et al., 2005). Po zkolabování do haplotypů bylo vygenerováno 97 haplotypů u *A. flavicollis* (Tab. 5) a 102 haplotypů u *A. sylvaticus* (Tab. 6). Z tohoto počtu bylo ve srovnání s předchozími pracemi (Michaux et al., 1996, 1998, 2001, 2002, 2003, 2005) identifikováno u *A. flavicollis* 22 a u *A. sylvaticus* 26 nových haplotypů. Haplotypy byly reprezentovány 1-6 sekvencemi.

### *Fylogenetické analýzy*

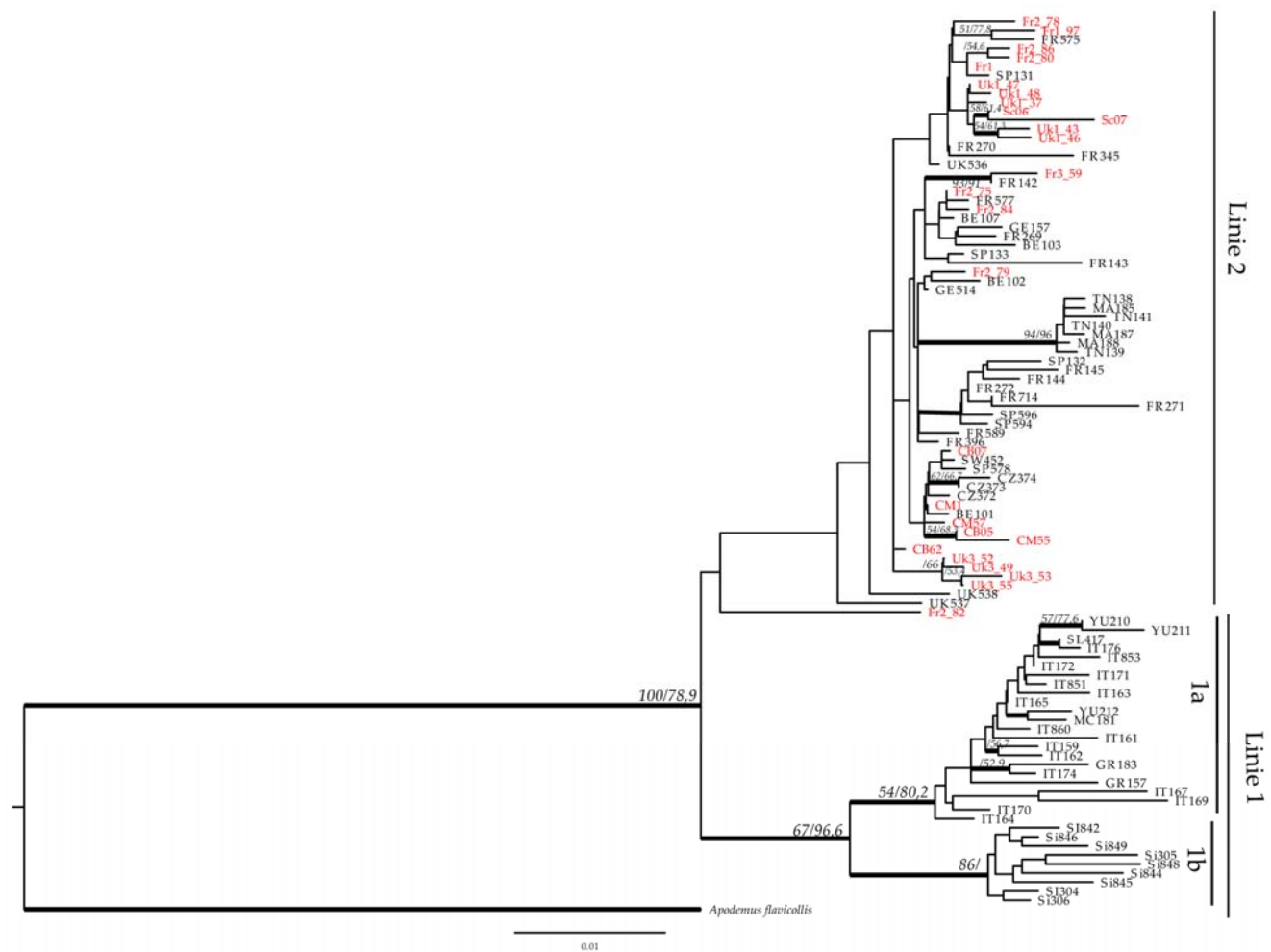
Ve shodě s dřívějšími daty (Štefka a Hypša, 2008) byly výsledkem všech analýz (MP, ML a NJ) 4 jednoznačně rozlišené linie *P. serrata*: A, B, C a Baj1 (Obr. 2). Zatímco skladba haplotypů uvnitř jednotlivých linií se neměnila s použitými analýzami, vzájemná pozice linií A, B, C a Baj1 nebyla u všech analýz shodná. V striktním konsensu MP analýzy linie A, B, C a Baj1 tvořily polytomii bez rozlišené topologie. Výsledkem NJ a ML analýzy byla topologie, která spojovala linie A a B jako nejodvozenější, směrem k bázi stromu se nejprve odštěpila linie Baj1 následovaná linií C zcela na bázi (Obr. 2). Zatímco linie Baj1 zahrnovala 4 jedince z geograficky vzdáleného území a hostitele, který se nevyskytuje v Evropě, geografická distribuce ostatních linií se ze značné části překrývala. I přesto se linie A, B a C vzájemně lišily stupněm hostitelské specifiity, hostitelské distribuce a z části i geografickým rozšířením. Linie A zahrnovala vši, které byly nalezeny na 2 druzích myšic, *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*, ve střední (ČR, SK) a západní Evropě (FR, UK). Naproti tomu vši z linie B vykazovaly vyšší hostitelskou



**Obr. 2.** NJ strom haplotypů *P. serrata*. Bootstrapové podpory vyšší než 50% (MP/ML, 1000 replikací) jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Striktní konsensus všech MP stromů je znázorněn tučně. Černě, haplotypy převzaté z Štefka a Hypša (2008); červeně, nová data. Seznam vzorků tvořících haplotypy je uveden v Příloze 1.



**Obr. 3.** NJ strom haplotypů *A. flavicollis*. Bootstrapové podpory vyšší než 50% (MP/ML, 1000 replikací) jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Striktní konsensus všech MP stromů je znázorněn tučně. Černě, zkratky názvů haplotypů převzaté z Michaux et al. (2004, 2005); červeně, zkratky populací podle Tab. 1. Seznam vzorků tvořících haplotypy je uveden v Příloze 3.



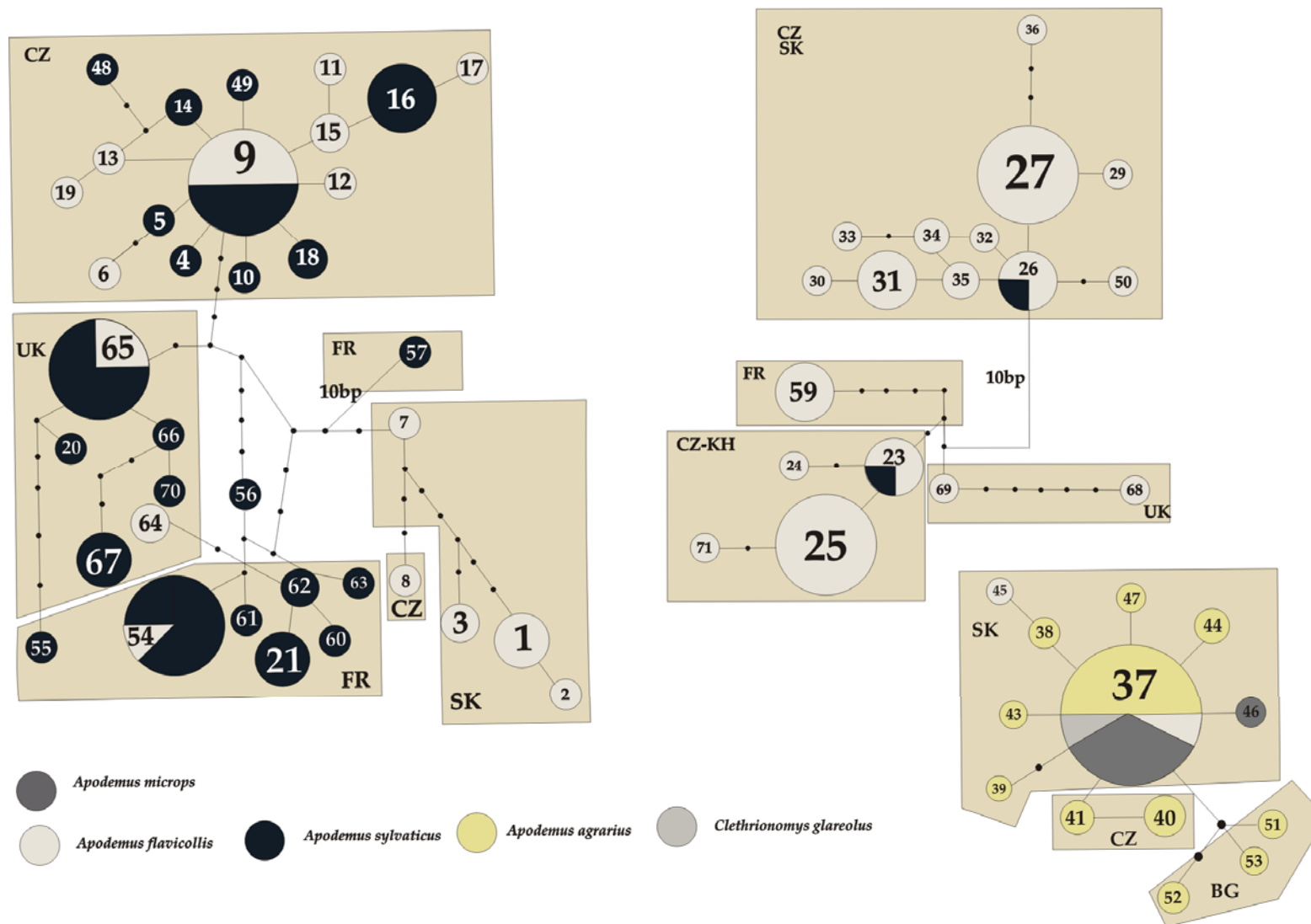
**Obr. 4.** NJ strom haplotypů *A. sylvaticus*. Bootstrapové podpory vyšší než 50% (MP/ML, 1000 replikací) jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Striktní konsensus všech MP stromů je znázorněn tučně. Černě, zkratky názvů haplotypů převzaté z Michaux et al. (2003); červeně, zkratky populací podle Tab. 1. Seznam vzorků tvořících haplotypy je uveden v Příloze 3.



specifitu v porovnání s linií A, přestože území, na kterých byly vši z obou linií nalezeny, se překrývala. U linie B bylo patrné vnitřní větvení; větev 1 zahrnovala vzorky z Čech a Slovenska a větev 2 vzorky z Krušných hor, Francie a Velké Británie. Linie B se vyznačovala silnou afinitou k hostiteli *A. flavicollis*, ze kterého bylo sesbíráno 70 vší. Pouze 2 vši byly nalezeny na hostiteli *A. sylvaticus*. Linie C, která je svým rozšířením limitovaná především na východ Evropy (Slovensko+východ ČR a Balkán), zahrnuje převážně vši nasbírané na myšicích *A. agrarius*. Dále zde bylo zastoupeno několik jedinců z *A. microps* ze Slovenska a po dvou nálezech na nornících rudých *Clethrionomys glareolus* a *A. flavicollis* opět ze Slovenska.

V analýze haplotypů myšice *A. flavicollis* (metodami ML, MP a NJ) byly identifikovány 4 hlavní linie: 1a, 1b, 1c a 2 (Obr.3). Haplotypové složení linií 1a, 1b a 1c odpovídá genealogii evropských populací *A. flavicollis* podle Michaux et al. (2005.). Linie 2 obsahovala haplotypy z geograficky izolované oblasti předního východu (Turecko). Vzájemná pozice linií se lišila s použitými metodami. Výsledkem MP a NJ byla topologie spojující linie 1b a 1a, zatímco linie 2 byla lokalizována na bázi. Ve výsledcích ML analýzy byly linie 1c a 2 seskupeny do společné větve. Linie se mezi sebou lišily geografickým rozšířením. Linie 1b a 1c zahrnovaly haplotypy ze severní, východní a jihovýchodní Evropy. Linie 1a, která byla tvořena v porovnání s ostatními liniemi šestinásobně více haplotypy, zahrnovala západní palearktickou oblast (Michaux et al.,2005). Většina zde studovaných populací *A. flavicollis* se zařadila do nejpočetnější linie 1a. Část haplotypů z území ČR se však začlenila dovnitř linie 1b se severo-východním areálem (CZ, FR, RU, BR, ES, RO, GR, TU). Pouze 1 haplotyp, AF0566 (lokalita CZ Pri), klastroval uvnitř linie B s východním rozšířením (RU, YU, RM).

Výsledkem analýz haplotypů myšice *A. sylvaticus* byly linie 1 a 2 (Obr. 4). Výsledky všech analýz podpořily další členění na větve 1a a 1b. Linie 1a byla tvořena haplotypy z Itálie a Balkánu, zatímco vzorky linie 1b pocházely ze Sicílie. Linie 2 zahrnovala haplotypy ze střední a západní Evropy (ČR, UK, FR, SP) a dobře odlišenou vnitřní větev obsahující haplotypy ze severní Afriky. Distribuce haplotypů mezi linie 1 a 2 i vnitřní členění linie 1 odpovídalo topologii linií 1 a 2 podle Michaux et al. (2004). Všechny zde studované populace *A. sylvaticus* haplotypově odpovídají svým geografickým původem západoevropské linii 2. Překvapivý je nález haplotypu As0782 (lokalita Fr2), který utvořil v rámci linie 2 vlastní poměrně vzdálenou větev, která rozšířila genetickou variabilitu pozorovanou u *A. sylvaticus* oproti dřívějším datům (Michaux et al. 2003). Pozice této větve je však nejistá, je tvořena pouze jedním haplotypem z jednoho jedince *A. sylvaticus* a v MP analýzách byla včleněna na bázi linie 1.



Obr. 5. Haplotypová síť populací *P. serrata* linií A, B, C. Velikost haplotypů odpovídá počtu vzorků. Geografický původ haplotypů je uveden v Tab. 1.

## Populační struktura

Pomocí statistické parsimonie byly v programu TCS vytvořeny haplotypové sítě pro jednotlivé linie vší *Polyplax serrata*. Limit 8 mutací, odvozený pro parsimoniální propojení haplotypů uvnitř linií, byl překročen u linií A a B. Haplotyp 57 (lokality FR) a haplotyp 7 (CZ) uvnitř linie A byly vzdáleny 12 mutací a haplotyp 26 (lokality Sh, Ben, CM2) dělilo 10 mutací od haplotypů z Kh, Fr a Uk v rámci linie B (Obr. 5). Haplotypy byly ve většině případů propojeny jedinou větví, pouze 3 „síťové komponenty“ (haplotypy 13, 26 a 35) byly spojeny s dvěma dalšími haplotypy. Struktura linie C a části linie A (lokality CZ) byla hvězdicovitého tvaru s centrálním haplotypem. Linie B a zbylá část linie A vytvářely komplexnější strukturu bez zřetelného centrálního haplotypu. Přestože uvnitř linií A a B bylo možné najít haplotypy ze stejných lokalit (např. Hap 67 a Hap 69), které patří do odlišných genetických sublinií, byla z haplotypových sítí patrná jasná souvislost mezi genetickými vztahy a geografickým rozšířením (Obr. 5).

U několika vzorků (CM1Af2, CM1Af8, CM3As6, UkAf39, UkAs43, UkAs47, UkAs49, UkAs55, Uk Af57, FrAf 94, FrAs76) byla prozkoumána míra haplotypové variability vší *P. serrata* sebraných na jednom hostitelském jedinci. Zatímco u vzorků, kde bylo k dispozici jen po dvou až třech jedincích *P. serrata* (UkAs43, UkAs49, UkAs55, UkAf57, FrAf94, FrAs76, CM1Af2, CM1Af8) byl většinou nalezen jen 1 haplotyp. Pouze u vzorku UkAs47 byly ze 2 jedinců získány 2 haplotypy, které spadaly do linie A. Naproti tomu z 5 jedinců vší sekvenovaných ze vzorku CM3As6 bylo nalezeno 5 odlišných haplotypů, z nichž všechny spadaly do linie A. Takováto variabilita ukazuje, že infrakomunita některých hostitelů může dosahovat poměrně velké genetické variability. Překvapivě, ve vzorku 3 vší UkAf39 byl nalezen kromě 1 haplotypu spadajícího do linie A (Hap 64) i dva haplotypy náležející do linie B (Hap 68, Hap69).

## AMOVA, DNASP

Hodnoty nukleotidové i haplotypové diverzity vyhodnocené v programu DNASP vykazovaly výrazně nižší hodnoty pro linii C v porovnání s liniemi A a B (Tab. 3). Tyto nízké hodnoty poukazují na výrazně menší efektivní velikost populací linie C. Podíl genetické variability na jednotlivých úrovních genetické struktury *P. serrata* byl kvantifikován v programu ARLEQUIN pomocí procentuálně vyjádřené variance. Výsledky dokumentují velmi vysokou úroveň divergence mezi hlavními liniemi A, B a C (Tab. 2). Na druhou stranu, i uvnitř těchto linií existuje struktura tvořená geograficky rozlišenými populacemi, která vysvětluje nezanedbatelné množství genetické variability v datech (8.41%,  $P=0.0000$ ). Nejnížší míra variability je pak zachycena uvnitř těchto populací.

**Tab. 2.** Genetická diverzita linií *P. serrata*

Level of hierarchy	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
1) Among groups	3	5230.27	38.771	89.25
2) Among populations within groups	14	503.972	3.654	8.41
3) Within populations	180	183.058	1.017	2.34

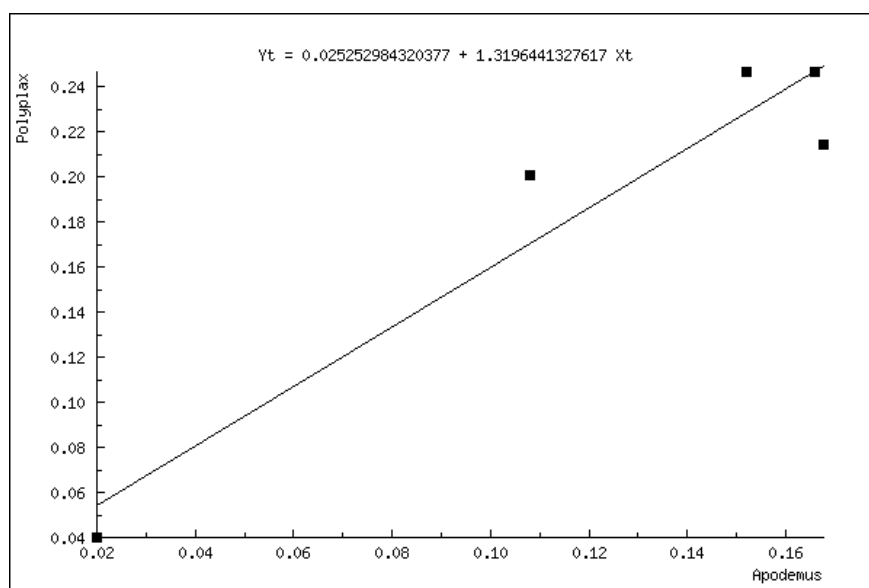
Všechny testy jsou průkazné na hladině významnosti  $P=0.0000$

**Tab. 3.** Analýza populační struktury – AMOVA

Clade	Sample size	No. of haplotypes	$P_i$	$H$
Bajkal	4	1	-	-
A	80	36	0,0223	0,956
B	72	23	0,0236	0.839
C	42	13	0,0033	0.617

### Porovnání rychlostí molekulární evoluce parazita a hostitele

Výsledky lineární regrese vykazovaly průkazný vztah mezi distančními vzdálenostmi vší z jednotlivých linií a myšic *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. agrarius* a *A. peninsulae* ( $F_{1,4} = 30.53$ , ANOVA,  $p = 0,002954$ ). Sklon přímky v grafu na Obr. 6 naznačuje, že molekulární evoluce vší *P. serrata* byla cca 1,3x rychlejší než evoluce jejich hostitelů, myšic rodu *Apodemus*.



**Obr. 6.** Genetické vzdálenosti mezi COB myšic rodu *Apodemus* a COI vší *P. serrata*. Poměr evoluční rychlosti hostitele a parazita je dán sklonem přímky. Hodnota  $y=0.02525$  ( $x=0$ ) udává relativní čas mutačních událostí mezi hostiteli a parazity; tato hodnota se významně neliší od 0 (95% konfidenční interval)

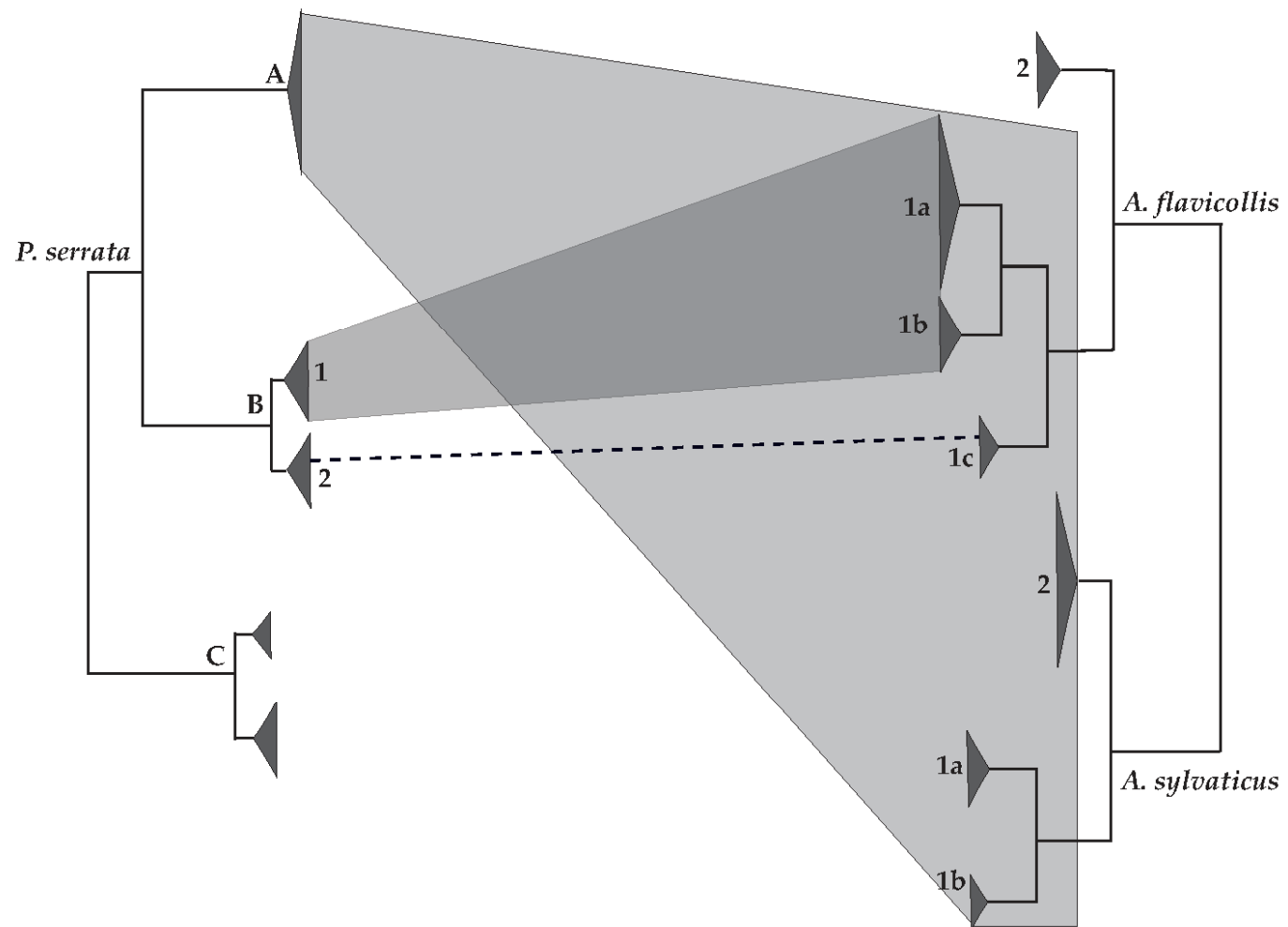
## 5. Diskuse

Výsledkem molekulárních analýz sekvencí COI z téměř 200 jedinců vši *P. serrata* byly 4 jednoznačně diferencované linie, které se vzájemně lišily stupněm hostitelské specifiity, geografickou distribucí hostitelů a do jisté míry i stupněm geografické struktury. Toto základní uspořádání je ve shodě s výsledky práce Štefka a Hypša (2008), předložená studie však přináší rozšířený dataset a také nové informace, zejména o charakteru západoevropských populací *P. serrata*. Díky analýze populací hostitelů přináší také detailnější vhled do charakteru koevoluce mezi parazitem a jeho hostiteli.

### *Geografická a hostitelská variabilita linií P. serrata*

Genealogické vztahy haplotypů *P. serrata* byly zjevně ovlivněny hostitelskou specifikou k jednotlivým liniím hostitelů, ale vzájemné vztahy mezi liniemi a uvnitř linií nesledovaly evoluci hostitelů jednoduchým recipročním způsobem. Dvě ze tří evropských linií vši, vykazovaly silnou afinitu k jedinému majoritnímu hostiteli, *A. flavicollis* v případě linie B a *A. agrarius* v případě linie C. Naproti tomu linie A byla na celém území svého rozšíření sdílena dvěma druhy hostitelů *A. sylvaticus* a *A. flavicollis* (Obr. 7). Podobné výsledky byly zjištěny i u lidských vši *Pediculus humanus* (Reed et al., 2004; Light et al., 2008). Fylogenetické analýzy potvrdily monofylii vši *Pediculus humanus*, ale reciproční monofylie formy hlavové („*capitis*“) a šatní („*humanus*“) nebyla potvrzena. Vši *P. humanus* byly rozděleny do 3 linií, které se mezi sebou lišily geografickým rozšířením a specifikou linie. Jedna větev zahrnovala formy „*capitis*“ i „*humanus*“ z celého světa, další dvě větve pouze formy „*capitis*“, ze střední a západní Ameriky a Evropy u druhé větve a z Afriky a Nepálu u třetí větve. Bylo demonstrováno, že forma „*humanus*“ vniká opakovaně nezávisle na sobě v rámci první z linií. Takovéto výsledky, kde se i blízké příbuzné linie parazita odlišují ve spektru hostitelů (*P. serrata*) nebo svou bionomií (*P. humanus*), ukazují, že tyto vlastnosti, často považované za specifické pro celé skupiny taxonů se mohou v evoluci parazitů velmi rychle proměňovat.

Nejpočetnější a nejméně hostitelsky specifická linie A vši *P. serrata* se větvila do několika větví, které se převážně shodovaly s oblastmi jednotlivých států (Čechy, Francie, Velká Británie, Slovensko). V několika případech se haplotyp začlenil do jiné geografické oblasti (UK, FR), což bylo pravděpodobně důsledkem nedokončeného procesu *lineage sorting*, který byl pozorován i u jiných ektoparazitů (Clayton et al., 2004; Johnson a Clayton, 2004; Paterson et al., 1999). Vlivem genetického driftu dochází k mizení ancestrální variability a vzniku hostitelsky či geograficky specifických linií. V tomto případě však proces driftu zřejmě není dokončen a část ancestrálního polymorfismu zůstává zachována. Dalším možným vysvětlením částečného překryvu by bylo geografické míchání hostitelů, které je však vzhledem ke značným vzdálenostem a dalším bariérám mezi oblastmi nepravděpodobné.



**Obr. 7.** Schéma parazito-hostitelských vztahů mezi liniemi vši *P. serrata* a hostiteli *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*. Stromy parazita a hostitelů odpovídají NJ topologiím na obr. 2-4.

Např. výše zmíněné haplotypové linie nalezené na myšicích ve Velké Británii a Francii jsou z části promíchány (Obr. 5) i přes dlouhotrvající rozdělení obou území bariérou kanálu La Manche. V tomto případě by alternativou k nedokončenému lineage sorting byl pouze přenos hostitelů lidskou činností mezi oblastmi .

Vnitřní geograficky podmíněnou strukturu linie A dokumentují i přes částečný překryv haplotypů mezi některými oblastmi signifikantní výsledky analýzy molekulární variance pro danou úroveň struktury (Tab. 2). Na druhou stranu, ačkoliv distribuce hostitelů mezi některými větvemi haplotypové sítě v rámci linie A (Obr. 5) mohou naznačovat vznik hostitelsky specifických linií v určitých oblastech výskytu, podrobnější pohled odhaluje, že se jedná spíše o důsledek nerovnoměrného sběru dat. U haplotypů z Velké Británie a Francie výrazně převažují vzorky z *A. sylvaticus*, což je zřejmě dáno faktem, že *A. flavicollis* je v západní Evropě méně častým druhem (Ribas, pers. comm.). To bylo pravděpodobně i důvodem nižšího zachytu vši z *A. flavicollis*. Podobně byla linie A v rámci východního Slovenska, kde se *A. sylvaticus* téměř nevyskytuje, sbírána výlučně z *A. flavicollis* (Obr. 5). Naopak o náhodném sdílení obou druhů hostitelů touto linií svědčí nálezy v oblastech, kde je denzita populací obou hostitelů srovnatelná (lokality v ČR).

Linie B, vykazující nejvyšší míru hostitelské specifičnosti, byla ve srovnání s prací Štefka a Hypša (2008) obohacena o haplotypy z Francie a Velké Británie. Linie se tak rozpadla na větev „západní“, která zahrnovala haplotypy z Francie, V. Británie a Krušných hor, a větev „východní“, do které patřily haplotypy z jižních, východních, středních Čech, Moravy a Slovenska. Tento předěl je geograficky velmi ostrý, žádný z haplotypů západní větve nebyl nalezen na východ od Krušných hor, a naopak žádný z východní větve haplotypů nebyl nalezen na západ od jižních Čech a Českomoravské vrchoviny. Tento předěl zjevně koresponduje s šířením *A. flavicollis* z různých glaciálních refugií. Přestože data pro hostitele neukazují obdobně ostrý předěl, podobná geograficky podmíněná struktura je naznačena i zde. Všechny západoevropské populace a většina vzorků *A. flavicollis* z Čech se včleňují do linií 1a a 1b, zatímco vzorek z populace Pri\_Af (Morava) začleňuje do východní větve 1c (Obr. 7) u níž Michaux et al. (2005) předpokládá dosud neznámé refugium v černomořské oblasti .

Přestože Štefka a Hypša (2008) uvedli, že se v linii B vyskytovali pouze vši z *A. flavicollis*, v rozšířeném setu, který byl analyzován zde, 2 jedinci vši z *A. sylvaticus* z Čech klastrovaly do linie B. Vzhledem k tomu, že v rámci celé linie B bylo 70 vzorků vši sesbíráno z *A. flavicollis* a pouze 2 z *A. sylvaticus*, jedná se v případě vši z *A. sylvaticus* o velmi vzácný záchyt. Naproti tomu u méně specifické linie A jsou u haplotypů zastoupeny s vysokou frekvencí vzorky z *A. sylvaticus* i *A. flavicollis*. Nejpravděpodobnějším vysvětlením původu vši linie B na nespecifickém hostiteli se jeví náhodný přeskok, po němž je parazit po určitou dobu schopen přežít na novém hostiteli, avšak není schopen dlouhodobého přežití a rozmnožení. K zjištění, zda se

jedná o jednohostitelskou linii, by bylo potřeba získat větší množství vši z *A. sylvaticus* z oblastí, ve kterých byly tyto vzorky nalezeny.

Linie C byla v porovnání s prací Štefka a Hypša (2008) obohacena o haplotypy z Bulharska, které vytvořily vlastní větev. I přes značnou geografickou vzdálenost, se však jedná o velmi malou míru divergence (Obr. 5), což koreluje s velmi nízkou mírou haplotypové a nukleotidové diverzity (Tab. 3) a tudíž malou genetickou velikostí populací linie C zjištěnou na datech z menšího vzorku (Štefka a Hypša, 2008). Tato data také korespondují s údaji známými pro majoritního hostitele této linie. Myšice *A. agrarius*, která je v Evropě poměrně recentní linií starou jen cca 5000 let (Kowalski, 2001), má původně asijský areál a i v současnosti se šíří dál směrem na západ. Recentnímu původu *A. agrarius* a tedy i jeho parazitů odpovídá i nízká haplotypová variabilita populací *A. agrarius* v západním palearktu ve srovnání s východní částí areálu (Catteau, G., 2006). Linie C však byla, alespoň na území Slovenska, sporadicky nalézána i na dalších hostitelích. Kromě vzorků z *A. microps*, kde byli parazité zastoupeni výlučně haplotypy linie C, byly v několika případech nalezeny haplotypy linie C i na *A. flavicollis* a *Clethrionomys glareolus*. Pro výskyt vzorků z *A. flavicollis* a *C. glareolus* v linii C existuje několik vysvětlení. Je možné, že během šíření populací majoritního hostitele, kdy se *A. agrarius* stává dominantním druhem nově obsazovaných území, dochází často k náhodné infekci nových hostitelů, jako je např. i *A. microps*. Také je možné, že má linie C celkově nižší míru hostitelské specifity, a je schopná dlouhodobě přežívat na více hostitelích. Pro ojedinělé nálezy z *A. flavicollis* a *C. glareolus* však nelze vyloučit ani metodický artefakt způsobený metodou sběru materiálu: na východoslovenských lokalitách odkud pochází tyto sběry (viz. Obr. 5) byl odchyt hostitelů prováděn do živochytných pastí, které umožňují odchyt i několika zvířat v jedné pasti zároveň. Mohlo tak dojít ke kontaktu mezi zvířaty v malém prostoru a přenosu vši. Míru distribuce linie C mezi více druhy hostitelů zjištěnou na území východního Slovenska bude třeba ověřit novými sběry a sběry rozšířenými ve větší míře i o další území.

#### *Struktura populací hostitele a koevoluce parazit-hostitel*

Populační struktura hostitele *A. flavicollis* se shodně s výsledky Michaux et al. (2004) větvila do 4 linií podle geografického rozšíření, které se v případě linií 1a, 1b a 1c částečně překrývalo. Genealogické vztahy *A. sylvaticus* se shodovaly s výsledky Michaux et al. (2005) a vytvářely 2 linie, které se dále větvily na 2 podlinie podle geografického rozšíření. Nižší podpory vztahů mezi liniemi u *A. flavicollis* a *A. sylvaticus* ve srovnání s analýzami Michaux et al. (2004) a Michaux (2005) byly pravděpodobně způsobeny použitím kratšího úseku COB z důvodu nutnosti vytvoření vlastních primerů. Sekvence vzorků COB použité v našich analýzách byly u *A. flavicollis* dlouhé 752bp a u *A. sylvaticus* 740bp, zatímco délka sekvencí vzorků použitých v pracích výše uvedených autorů byla 972 bp a 965 bp.



Původ parazitických druhů s různými stupni hostitelské specifity je v parazitologii diskutovaným problémem (Clayton et al., 2004; Hoberg et al., 1997). Mezi nejdůležitější procesy, které ovlivňují průběh evoluce stávajících linií a vznik linií nových se řadí přeskoky parazita na jiného hostitele, duplikace linií, lineage sorting a neschopnost parazita speciovat spolu s hostitelem. Štefka a Hypša (2008) připouštějí pro původ linií vší *P. serrata* A a B, které sdílejí spektrum hostitelů několik vysvětlení. Autoři vzhledem k odhadovanému stáří linií A a B (cca 1.5 mil. let), které je výrazně nižší než stáří hostitelských druhů (cca 4 mil. let podle Michaux a Pasquier (1974)), jako nejpravděpodobnější hypotézu stanovili duplikaci populací parazita v rámci glaciálně oddělených populací hostitele *A. flavicollis* a pozdější rozšíření jedné z linií o nového hostitele - *A. sylvaticus*. Tomuto pohledu odpovídají i literární údaje, podle Michaux et al. (2005) myšice *A. flavicollis* přežily čtvrtohorní zalednění v několika izolovaných refugiích a posléze odtud kolonizovaly Evropu.

Bez znalosti genealogie populací *A. flavicollis*, z nichž pocházejí zde studované sběry, však nebylo možno s určitostí rozhodnout, zda současné členění populací vší do linií A a B skutečně vzniklo duplikací parazita v rámci jednoho druhu hostitele, nebo zda se jedná o kospeciaci se dvěma odlišnými liniemi *A. flavicollis*. V prvním případě by během postglaciální expanze došlo k promíchání populací hostitele na území západní a střední Evropy, avšak populace parazita by zůstaly důsledkem předchozí glaciální fragmentace geneticky odděleny. Ve druhém případě by rozdělení haplotypů parazita do linií A a B, nalézáných na *A. flavicollis*, odráželo kryptické členění hostitele do dvou druhů, a nejednalo by se o dvě geneticky odlišené avšak hostitelsky sympatrické linie. Vzhledem k distribuci linií vší A a B a jednotlivých linií hostitelů, je patrné, že druhá hypotéza neplatí. Populace hostitele *A. flavicollis* a linie *P. serrata* A a B tvoří recipročně monofyletické linie (Obr. 7). Linie A a B, tvoří linie s různým stupněm hostitelské specifity, jejichž genetická izolace přetrvává i přes sympatrický výskyt v rámci hostitele *A. flavicollis*. Tento sympatrický výskyt obou linií je nově podpořen i společným nálezem haplotypů linií A a B na stejném jedinci *A. flavicollis* ve vzorku UkAf39.

Ke vzniku genetické bariery mezi liniemi *P. serrata* během období glaciální izolace mohla přispět vyšší rychlost molekulární evoluce parazita ve srovnání s hostitelem. Rychlejší evoluce genomu parazita je v koevolučních pracech poměrně často pozorovaným jevem. Např., podle výsledků studia mitochondriální DNA probíhala molekulární evoluce: 2,3x rychleji u vší než u primátů (Reed et al., 2004), 2,5x a 2-5x rychleji u všenek ve srovnání s pytlonoši (Hafner et al., 1994; Light a Hafner, 2007), 2,6x rychleji u všenek než u rorýsů (Page a Charleston, 1998) a 5,5x rychleji u všenek než mořských ptáků (Paterson et al., 2000). Z výsledků lineární regrese na Obr. 6 vyplývá, že molekulární evoluce COI vší *P. serrata* byla cca 1,3x rychlejší než evoluce COB jejich hostitelů, myšic rodu *Apodemus*. Přestože i zde byla pro parazity odvozena vyšší rychlost molekulární evoluce ve srovnání s jejich hostiteli, je tento

rozdíl výrazně menší než u ostatních studovaných modelů. Důvodů, proč je evoluce parazitů rychlejší než u hostitelů může být mnoho. Pravděpodobně se jedná o kombinaci faktorů, kterými jsou odlišnosti v generační době, rychlosti metabolismu, složení DNA bází, pořadí genů a evoluce parazitického stylu života (Brown a Simpson, 1982; Clayton, 1982; Tanaka et al., 1994; Wu a Li, 1985; Martin a Palumbi, 1993; Rand, 1994; Downton a Austin, 1995; Light a Hafner, 2007). Většina výše jmenovaných parazito-hostitelských modelů zahrnovala ve srovnání s myšicemi rodu *Apodemus* spíše dlouhověková zvířata, u nichž je rozdíl mezi generační dobou hostitele a parazita větší. Tento fakt mohou odrážet i data pro jiné parazity myšic, např. hlístice druhu *Heligmosoides polygyrus* vykazují podobný poměr evolučních rychlostí parazit-hostitel, cca 1.5x (Nieberding et al, 2004). Další důvody zde odvozeného malého rozdílu evolučních rychlostí mohou být spíše metodického rázu, poměr rychlostí evoluce vší *P. serrata* a myšic rodu *Apodemus* mohl být ovlivněn i tím, že byly použity nehomologní úseky mitochondriální DNA parazitů a hostitelů. Pro přesnější odhad bude zapotřebí použít dataset rozšířený o homologní sekvence a pokud možno větší počet uzlů v topologiích parazita a hostitele. Již nyní je však zřejmé, že zvýšená rychlost molekulární evoluce sekvencí parazita se podílí na vyšší úrovni genetické struktury pozorované mezi populacemi parazita (např. uvnitř linie B) ve srovnání se zdrojovými populacemi hostitele.

#### *Perspektivy dalšího studia modelu*

Všichni *P. serrata* a myšice rodu *Apodemus* se jeví jako velmi dobrý model pro studium otázky, zda je speciace parazitů procesem převážně genealogickým, nebo adaptačním. Tedy zda je hlavním faktorem koevoluce s hostitelem genealogická kontinuita z důvodu absence hostitelských přeskoků, nebo zda je důležitějším faktorem bariéra způsobená nutností vytvoření specifických adaptací k osídlení nového hostitele. Dosavadní výsledky jasně ukazují, že adaptace je hlavním faktorem v evoluci *P. serrata*, zatímco genealogie zřejmě nehraje významnou roli. To je asi nejlépe dokumentováno nízkou frekvencí, se kterou jsou haplotypy *P. serrata* náležející k liniím s úzkou specitou nalézány na nesespecifických hostitelích, a to i přes sympatrický výskyt těchto hostitelů a zjevnou schopnost vší z „generalistické“ linie frekventovaně střídat druhy hostitele.

Přesto však zůstává několik zajímavých otázek nedořešeno. Vzhledem k absenci dat o populacích *P. serrata* z oblastí Evropy, kde se podle Michaux et al. (2005) nacházela některá další refugia myšic *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*, bude nutné rozšířit dataset o nové odchvy hostitelů a sběry parazitů v oblastech Iberského poloostrova na jih od Pyrenejí, v Itálii a na Balkánu. Takto bude možno zpřesnit informace o tom, jak sdílená glaciální historie ovlivnila evoluci genetických linií parazita.

Pro hlubší analýzu koevolučních vztahů parazitů a hostitelů na genealogické úrovni je také nutný výběr informativnějšího markeru u hostitele, než jakým je COB. V tomto směru se jeví slibně zejména hypervariabilní úsek mitochondriální DNA, tzv.

D-loop (Bellinvia, 2004). Dále bude třeba pro lepší rekonstrukci fylogenetických vztahů mezi liniemi *P. serrata* rozšířit stávající dataset o sekvence delších úseků COI a případně o další gen (např. COB). S pomocí takto získaných dat bude také umožněno zpřesnit odhad rychlosti evoluce parazita a hostitele a použít molekulární hodiny pro datování hlavních evolučních událostí vší *P. serrata*.

Získání multilokusových markerů, mikrosatelitů, umožní detailnější pohled na možnou diverzifikaci populací polyxenních linií *P. serrata*. Také lokálně zaměřené sběry linií A a B s překrývajícím se spektrem hostitelů poskytnou údaje zajímavé z ekologického a epidemiologického hlediska, např. rozdíly ve frekvencích, se kterými parazitují generalisté (linie A) a specialisté (linie B).

## 6. Závěr

- Výsledkem molekulárních analýz sekvencí vší *P. serrata* byly 4 jednoznačně diferencované linie, které se vzájemně lišily stupněm hostitelské specifiity, geografickou distribucí hostitelů a do jisté míry i stupněm vnitřní geografické struktury.
- Populační struktura hostitelů *A. flavicollis* a *A. sylvaticus* se shodně s výsledky Michaux et al. (2003, 2004, 2005) větvila v rámci každého z druhů do několika linií shodujících se s geografickým rozšířením studovaných vzorků.
- Genealogické vztahy haplotypů *P. serrata* byly zjevně ovlivněny hostitelskou specifiitou jednotlivých linií hostitelů, ale vzájemné vztahy mezi liniemi a uvnitř linií nesledovaly evoluci hostitelů jednoduchým kospeciačním způsobem. Populace hostitele *A. flavicollis* a linie *P. serrata* A a B netvořily recipročně monofyletické linie. Linie A a B, jsou liniemi s různým stupněm hostitelské specifiity, jejichž genetická izolace přetrvává i přes sympatrický výskyt v rámci hostitele *A. flavicollis*. Vzhledem k distribuci linií vší A a B a jednotlivých linií hostitelů členění *P. serrata* do linií A a B pravděpodobně vzniklo duplikací parazita v rámci jednoho druhu hostitele.
- Ke vzniku genetické bariéry mezi liniemi *P. serrata* během období glaciální izolace přispěla vyšší rychlost molekulární evoluce parazita, která byla cca 1,3x rychlejší než evoluce hostitele.

## 7. Seznam použité literatury

- Althoff, D. M., Thompson, J. N., 1999. Comparative geographic structures of two parasitoid-host interactions. *Evol.* 53: 818-825
- Baer, C. F., Tripp, D. W., Bjorksten, T. A., Antolin, M. F., 2003. Phylogeography of a parasitoid wasp (*Diaeretiella rapae*): no evidence of host-associated lineages. *Mol. Ecol.* 13: 1859-1869
- Bellinvia, E., 2004. A phylogenetic study of the genus *Apodemus* by sequencing the mitochondrial DNA control region. *J. Zoological. System.* 42(4): 289-297
- Blouin, M. S., Yowell, C. A., Courtney, Ch., Dame, J. B., 1995. Host movement and genetic-structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics* 141: 407-420
- Blouin, M. S., Liu, J., Berry, R. E., 1999. Life cycle variation and the genetic structure of nematode populations. *Heredity* 83: 253-259
- Bouzig W., Štefka J., Hypša V., Lek S., Scholz T., Legal L., Ben Hassine O. K., Loot G. (2008): Geography and host specificity: Two forces behind the genetic structure of the freshwater fish parasite *Ligula intestinalis* (Cestoda: Diphylobothriidae). *Int. J. Parasitol.* 38: 1465–1479.
- Brown, G. G., Simpson, M. V., 1982. Novel features of the animal mtDNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase II gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3246-3250
- Charleston, M. A., Perkins, S. L., 2006. Traversing the tangle: algorithms and applications for cophylogenetic studies. *J. Biomed. Inform.* 39: 62-71
- Clayton, D. A., 1982. Replication of mitochondrial DNA. *Cell* 28: 693-705
- Clayton, D. H., Bush, S. E., Goates, B. M., Johnson, K. P., 2003. Host defense reinforces host-parasite cospeciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 15694-15699
- Clayton, D. H., Johnson, K. P., 2003. Linking coevolutionary history to ecological process: Doves and lice. *Evol.* 57: 2335-2341

- Clayton, D. H., Bush, S. E., Johnson, K. P., 2004. Ecology of Congruence: Past Meets Present. *Syst. Biol.* 53(1):165-173
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TSC: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657–1659
- Demanche, C., Berthelemy, M., Petit, T., Polack, B., Wakefield, A. E., Dei-Cas, E., Guillot, J., 2001. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2126-2133
- Downton, M., Austin, A. D., 1995. Increased genetic diversity in mitochondrial genes is correlated with the evolution of parasitism in the Hymenoptera. *J. Mol. Evol.* 41: 928-941
- Goloboff, P.A., Farris, J.S., Nixon, K.C., 2004. TNT. *Cladistics* 20: 84-84
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., Gascuel, O., 2005. PHYML Online – a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res.* 33: W557-W559
- Hafner, M. S., Nadler, S. A., 1990. Cospeciation in host-parasite assemblages: comparative analysis of rates of evolution and timing of cospeciation events. *Syst. Zool.* 39: 192-204
- Hafner, M. S., Sudman, P. D., Villablanca, F. X., Spradling, T. A., Demastes, J. W., Nadler, S. A., 1994. Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science* 265(5175): 1087-1090
- 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
- Hoberg, E. P., Brooks, D. R., Siegel-Causey, D., 1997. Host-parasite co-speciation: History, principles and prospects. (ed. by Clayton, D. H., Moore, J.) *Host-parasite evolution: General principles and avian models*. Oxford. Univ. Press, Oxford.

- Hocking, B., 1971. Blood-sucking behavior of terrestrial arthropods. *An. Rev. Entomol.* 16: 1-26
- Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Nikoh, N., Shimada, M., Fukatsu, T., 2006. Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biol.* 4: e337
- Huelsenbeck, J. P., Huelsenbeck, J. P., Rannala, B., Yang, Z. H., 1997. Statistical tests of host-parasite cospeciation. *Evolution* 51: 410-419
- Huyse, T., Poulin, R., Theron, A., 2005. Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends parasitol.* 21: 469-475
- Johnson, K.P., Adams, R.J., Clayton, D.H., 2002a. The phylogeny of the louse genus *Brueelia* does not reflect host phylogeny. *Biol. J. Linn. Soc.*, 77(2): 233-247
- Johnson, K. P., Adams, R. J., Page, R. D. M., Clayton, D. H., 2003. When Do Parasites Fail to Speciate in Response to Host Speciation? *Syst. Biol.* 52(1): 37-47
- Johnson, K. P., Clayton, D. H., 2004. Untangling Coevolutionary History. *Syst. Biol.* 53(1):92-94
- Johnson, K. P., Clayton, D. H., 2002. Coevolutionary history of ecological replicates: Comparing phylogenies of wing and body lice to columbiform hosts. (ed. by R. D. M. Page) *Tangled trees: Phylogeny, cospeciation and coevolution.* Univ. Chicago Press, Chicago.
- Johnson, K.P., Williams, B.L., Drown, D.M., Adams, R.J., Clayton, D.H., 2002b. The population genetics of host specificity: genetic differentiation in dove lice (Insecta: Phtiraptera). *Mol. Ecol.*, 11: 25-38.
- Joseph, L., Wilke, T., Alpers, D., 2002. Reconciling genetic expectations from host specificity with historical population dynamics in an avian brood parasite, Horsfield's Bronze-Cuckoo *Chalcites basalis* of Australia. *Mol. Ecol.* 11: 829-837
- Jousson, O., Bartoli, J., Pawlowski, J., 2000. Cryptic speciation among intestinal parasites (Trematoda: Digenea) infecting sympatric host fishes (Sparidae). *J. Evol. Biol.* 13: 778-785

- Kim, K. C., 1988. Evolutionary parallelism in Anoplura and eutherian mammals. Biosystematics of Haematophagous Insects (ed. by M. W. Service). Systematics Association Special 37. Clarendon Press, Oxford.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X., Wilson, A. C., 1989. Dynamics of mitochondrial-DNA evolution in animals - amplification and sequencing with conserved primers
- Krištofík, J., Lysý, J., 1992. Seasonal dynamics of sucking lice (Anoplura) in small mammals (Insectivora, Rodentia) in the natural foci of infections in south-west Slovakia. *Biológia* 47(8): 605-617
- Krištofík, J., 1994. Lice (Anoplura) on small mammals (Insectivora, Rodentia) in floodplain forests. *Biológia* 49(5): 697-707
- Libois, R. M., Michaux, J. R., Ramalhinho, M. G., Maurois, C., Sará, M., 2001. On the origin and systematics of the North African wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations. A comparative study of mtDNA restriction patterns. *Can. J. Zool.* 79: 1503-1511
- Light, J. E., Hafner, M. S., 2007. Phylogenetics and host associations of *Fahrenholzia* sucking lice (Phthiraptera: Anoplura). *Syst. Entomol.* 32: 359-370
- Light, J. E., Hafner, M. S., 2008. Codivergence in Heteromyid Rodents (Rodentia: Heteromyidae) and Their Sucking Lice of the Genus *Fahrenholzia* (Phthiraptera: Anoplura). *Syst. Biol.* 57(3): 449-465
- Light, J. E., Toups, M. A., Reed, D. L., 2008. What's in a name: The taxonomic status of human head and body lice. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47: 1203-121
- Macholán, M., Filippucci, M. G., Benda, P., Frynta, D., Sádlová, J., 2001a. Allozyme variation and systematics of the genus *Apodemus* (Muridae, Rodentia) in Asia Minor and Iran. *J. Mammal.* 82: 799-813
- Marshall, A. G., 1981. *The Ecology of Ectoparasitic Insect*. Academic Press, London
- Martin, A. P., Palumbi, S. R., 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4087-4091

- McCoy, K. D., Boulinier, T., Tirard, C., Michalakis, Y., 2001. Host specificity of a generalist parasite: genetic evidence of sympatric host races in the seabird tick *Ixodes uriae*. *J. Evol. Biol.* 14: 395-405
- Michaux, J. R., Pasquier, L., 1974. Dynamique des populations de mulots (*Rodentia*, *Apodemus*) en Europe durant le Quaternaire. Premières données. *Bull. Soc. Geol. France* 7: 431-439
- Michaux, J.R., Filippucci, M.G., Libois, R.M., Fons, R., Matagne, R.F., 1996. Biogeography and taxonomy of *Apodemus sylvaticus* (the woodmouse) in the tyrrhenian region: Enzymatic variations and mitochondrial DNA restriction pattern analysis. *Heredity* 76: 267–277.
- Michaux, J.R., Sara, M., Libois, R.M., Matagne, R., 1998a. Is the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) of Sicily really a “separate” species? *Belgian J. Zool.* 128: 211–214.
- Michaux, J.R., Libois, R., Ramalhinho, M.G., Maurois, C., 1998b. On the mtDNA restriction patterns variation of the iberian wood mouse (*Apodemus sylvaticus*): comparison with other west Mediterranean populations. *Hereditas* 129, 187–194.
- Michaux, J. R., Kinet, S., Filippucci, M. G., Libois, R., Besnard, A., Catzeflis, F., 2001. Molecular identification of three sympatric species of wood mice (*Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. alpicola*) v západní Evropě (*Muridae*: *Rodentia*). *Mol. Ecol. Notes* 1: 260-263
- Michaux JR, Chevret P, Filippucci MG, Macholán M., 2002. Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis on the subgenus *Sylvaemus* using the nuclear
- Michaux, J. R., Magnanou, E., Paradis, E., Nieberding, C., Libois, R. M., 2003. Mitochondrial phylogeography of the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in Western Palearctic region. *Mol. Ecol.* 12: 685-697



- Michaux, J. R., Libois, R., Paradis, E., Filippucci, M. G., 2004. Phylogeographic history of the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) in Europe and in the Near and Middle East. *Mol. Phyl. Evol.* 32: 788-798
- Michaux, J. R., Libois, R., Filippucci, M. G., 2005. So close and so different: comparative phylogeography of two small mammal species, the Yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Heredity* 94: 52-63
- Montgomery, W. I., 1999. *Apodemus sylvaticus* and *Apodemus flavicollis*. The atlas of European Mammals (ed by A. J. Mitchell-Jones). Academic Press, London.
- Moran, N., Baumann, P., 1994. Phylogenetics of cytoplasmatically inherited microorganisms of arthropods. *Trends Ecol. Evol.* 9: 15-20
- Nelson, W. A., Bell, J. F., Clifford, C. M., Keirans, J. E., 1977. Interaction of ectoparasites, and their hosts. *J. Med. Entomol.* 13: 389-428
- Nieberding, C., Morand, S., Libois, R., Michaux, J.R., 2004. A parasite reveals cryptic phylogeographic history of its host. *Proc. R. Soc. B* 271: 2559-2568
- Page, R. D. M., 1994. Maps between trees and cladistic analysis of historical associations among genes, organisms, and areas. *Syst. Biol.* 43: 58-77
- Page, R. D. M., Charleston, M. A., 1998. Trees within trees: phylogeny and historical associations. *Trends. Ecol. Evol.* 13: 356-359
- Page, R. D. M. (ed.), 2003. *Tangled trees: Phylogeny, cospeciation, and coevolution.* Univ. Chicago Press, Chicago.
- Paterson, A. M., a Gray, R. D., 1997. Host-parasite co-speciation, host switching, and missing the boat (ed by D.H. Clayton, J. Moore) *Host-parasite evolution: General principles and avian models.* Oxford Univ. Press, Oxford.
- Paterson, A. M., Palma, R. L., Gray, R. D., 1999. How frequently do avian lice miss the boat? *Syst. Biol.* 48: 214-223
- Posada, D. 2006. Collapse: describing haplotypes from sequence alignments, <http://darwin.uvigo.es/software/collapse.html>

- Prugnolle, F., 2005. Dispersal in a parasitic worm and its two hosts: consequence for local adaptation. *Evolution* 59: 296-303
- Rand, D. M., 1994. Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. *Trends Ecol. Evol.* 9: 125-131
- Reed, D. L., Smith, V. S., Hammond, S. L., Rogers, A. R., Clayton, D. H., 2004. Genetic Analysis of Lice Supports Direct Contact between Modern and Archaic Humans. *PLoS Biol* 2: e340
- Reed, D. L., Light, J. E., Allen, J. M., Kirchman, J. J., 2007. Pair of lice lost of parasites regained: the evolutionary history of anthropoid primate lice. *BMC Biol.* 5(7): 1741-7007-5-7
- Rozas, J., Sa'nchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin, Version 2.0: a software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva
- Smith, M. A., Woodley, N. E., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Hebert, P. D. N., 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *PNAS* 103(10): 3657-3662
- Serizawa, K., Suzuki, H., Tsuchiya, K., 2000. A phylogenetic view on species radiation in *Apodemus* inferred from variation of nuclear and mitochondrial genes. *Biochem. Gen.* 38: 27-40
- Steinauer, M. L., Nickol, B. B., Orti, G., 2007 Cryptic speciation and patterns of phenotypic variation of a highly variable acanthocephalan parasite *Mol. Ecol.* 16(19): 4097-4109
- Swofford, D.L. 1998. PAUP 4.0-phylogenetic analysis using parsimony. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

- Štefka, J., Hypša, V., 2008. Host specificity and genealogy of the louse *Polyplax serrata* on field mice, *Apodemus* species: A case of parasite duplication or colonisation? Int. J. Parasitol. 38(6): 731-741
- Tanaka, M., a Ozawa, T., 1994. Strand asymmetry in human mitochondrial DNA mutations. Genomics 22: 327-335
- Thomas, F., Vernau, O., deMeeus, T., Renaud, F , 1996. Parasites as host evolutionary prints: Insights into host evolution from parasitological data. Int. J. Parasitol. 26: 677-686
- Tzedakis, P. C., Andrieu, V., de Beaulieu, J. L., Crwhurst, S., Follieri, M., Hooghiemstr, H., 1997. Comparison of terrestrial and marine records of changing climate of the last 500 000 years. Earth Planet Sci. Lett. 150: 171-176
- Wessa, 2008. Free Statistics Software, Office for Research Development and Education, version 1.1.23-r3, URL <http://www.wessa.net/>
- Whiteman, N. K., Parker, P. G., 2005. Using parasites to infer host population history: a new rationale for parasite conservation. Anim. Conserv. 8: 175-181
- Wirth, T., Wang, X.Y., Linz, B., Novick, R. P., Lum, J. K., Blaser, M., Morelli, G., Falush, D., Achtman, M., 2004. Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: lessons from Ladakh. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101: 4746-4751
- Wirth, T., Meyer, A., Achtman, M., 2005. Deciphering host migrations and origins by means of their microbes. Mol. Ecol. 14: 3289-3306
- Wu, C.-L., Li, W.-H., 1985. Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1741-1745

## 8. Přílohy

Příloha 1. Seznam haplotypů *P. serrata*

Haplotyp	Sekvenování jedinci <i>P. serrata</i>
Hap4	CB0504As
Hap1	Kec1Af, Ruz4Af, Ruz5Af
<b>Hap49</b>	<b>CM3GAs6</b>
Hap13	CM3Af9, CM3As6
Hap19	CM3Af10
Hap14	CM3As2, <b>CM3EAs6</b>
<b>Hap48</b>	<b>CM3BAs6</b>
Hap11	CB05Af06
Hap15	KH13Af, KH7Af
Hap16	Ose1As, Ruz7Af, KH8As, KH9Af, KH11Af
Hap17	KH10Af
Hap5	CM3As13
Hap6	CM3Af11
Hap9	CB0505As, CB0502As, CB0507Af, <b>CB0805As, CB0807As</b> , CB0508Af, CB0509Af, CM3Af12, CM3Af15, <b>CM3DAs6</b>
Hap12	C3Af4
Hap20	Sc1As - Sc5As
<b>Hap65</b>	<b>Uk3As50b, Uk3As55, Uk3As49a, Uk3As49b, Uk3As55a, Uk3As55b, Uk2Af57a, Uk2Af57b</b>
<b>Hap66</b>	<b>Uk1As47d</b>
<b>Hap70</b>	<b>Uk1As46</b>
<b>Hap67</b>	<b>Uk1As47a, Uk1As43b, Uk1As43</b>
<b>Hap55</b>	<b>Fr3As65</b>
Hap2	Ruz3Af
Hap3	CM3Af5, CM3Af1
Hap7	Tre1Af
Hap8	Ruz6Af
<b>Hap54</b>	<b>Fr2As50, Fr2As86, Fr2As83, Fr2As75, Fr2Af88, Fr2As76, Fr2As76b, Fr2As51</b>
<b>Hap61</b>	<b>Fr2As79</b>
<b>Hap 56</b>	<b>FR2As82</b>
<b>Hap60</b>	<b>Fr3As65</b>
<b>Hap62</b>	<b>Fr1As98, Fr4As</b>
<b>Hap64</b>	<b>Uk1Af39a</b>
Hap21	Fr1As, Fr2As, Fr5As
<b>Hap63</b>	<b>Fr1As99</b>

# Linie A

**Příloha1. Pokračování**

Haplotyp	Sekvenování jedinci <i>P. serrata</i>	
Hap27	CM1Af2a - c, CM1Af8, CM1Af8b, CM1Af8c, CB10Af, CM1Af1, CM1Af3 - 7, CM1Af9 - 10, CM2Af3 - 5, CM2Af8 - 10	<b>Linie B</b> <b>Větev 1</b>
Hap28	CM1Af2	
Hap29	CM2Af7	
Hap26	SH1Af, CM2Af6, Ben01Af, Ben02As	
Hap50	Ben03Af	
Hap35	Pri10Af, Pri1Af	
Hap32	Dun1Af	
Hap34	Dun3Af, Dun5Af	
Hap31	Dun2Af, Dun6Af, Dun8 - 10Af, Rad1Af	
Hap33	Dun4Af	
Hap30	Dun7Af	
Hap36	Kec2Af	
Hap59	Fr2Af89, Fr2Af94, Fr2Af94b, Fr2Af93, Fr2Af45	<b>Linie B</b> <b>Větev 2</b>
Hap23	KH08110Af, KHO8111As, KH2 - 4Af	
Hap24	KH6Af	
Hap25	KH1Af, KH0811Af, KH0812Af, KH08115Af, KH0814AfA, KH0827AfA - B, KH0828AfA - B, KH0829	
Hap72	KH0829AfA	
Hap73	KH0830Af	
Hap74	KH0831Af	
Hap71	KH0812AfB	
Hap68	Uk1Af39c	
Hap69	Uk1Af39d	
Hap37	Ruz1 - 2 Cg, PS1 - 4Am, Kos1 - 3Aa, Kec2Af, Tre2Aa, Tre5Aa, Gra2Aa, Gra4Aa, Gra6 - 7Aa, Kec3Af, Kec10 - 11Aa, Kec4Aa, Kec8Aa, Kec17Am, Rad3Aa, Rad6 - 7Aa, Ruz7Aa	<b>Linie C</b>
Hap39	Tre4Aa	
Hap46	Kec15Am	
Hap43	Gra1Aa	
Hap38	Tre3Aa	
Hap45	Kec9Af	
Hap47	Rad5Aa	
Hap41	Pri5Aa, Pri6Aa	
Hap44	Gra3Aa, Kec5Aa	
Hap40	Pri12 - 14Aa	
Hap53	BG5Aa	
Hap51	BG1Aa	
Hap52	BG2Aa	
Baj1	BajAp, Baj2Ap, Baj3Ap, Baj4Ap	<b>Baj1</b>

Zkratky v názvech vzorků odpovídají populacím a hostitelům v tab.1. Černá barva reprezentuje data převzatá z Štefka a Hypša (2008). Červená barva reprezentuje nová data.

Príloha č.2. Seznam haplotypů *A. flavicollis*

Haplotyp	Další sekvenování jedinci <i>A. flavicollis</i>	Haplotyp	Další sekvenování jedinci <i>A. flavicollis</i>
<b>Pri10</b> YU180 YU178 RM533 RM572 RM534 RU288 RU309 RU287	<b>Linie 1c</b>	GE207 FR344 GR485 GR707 IT200 IT192 IT193 IT175 SL418	IT19
<b>Fr2_45</b> GR460 SP124 SP127 <b>Fr2_89</b> <b>Fr2_93</b> SP125 SP128 <b>KH14</b> <b>Uk1_41</b> <b>Uk2_57</b> SW294 SW295 <b>KH114</b> <b>CM188</b> CZ255 <b>CM290</b> <b>CB11</b> GR219 <b>CM1127</b> IT194 GR704 TU380 TU382 TU383 SI392 <b>CM153</b> RM532 <b>KH31</b> <b>KH25</b> <b>CM310</b> <b>CM233</b> FR343 BE332 MA120 MA492 IT298 CZ373 GR481 GR482		<b>Fr2_94</b>  SP126, SW445	
		<b>KH108</b> <b>CM222</b> <b>KH21</b> ES316 RU408 BR314 FR395 RO531 TU223 GR217 <b>CM255</b> <b>CM272</b>	<b>CM381</b>  BR315, ES348, RU405, Li347
		TU238 TU232 TU1362 TU241 TU1366 TU1364 TU1367 TU1361 TU237 TU243 TU244 TU1360 TU1365	TU242
	AU203  <b>CM2_47</b> BR313  <b>CM236, CM282, CM38</b>  FR666  HU307		<b>Linie 1a</b>  <b>Linie 1b</b>  <b>Linie 2</b>

Černá barva reprezentuje data převzatá z Michaux et al. (2004, 2005). Červená barva reprezentuje nová data.

Příloha č.3. Seznam haplotypů *A. sylvaticus*

Haplotyp	Další sekvenování jedinci <i>A. sylvaticus</i>	Haplotyp	Další ekvenování jedinci <i>A. sylvaticus</i>
Fr2_78		FR396	
Fr1_97	Fr1_98, Fr1_115	CB07	GE519, SW453
FR575		SW452	GE519
Fr2_86	UK543	SP578	GE519
Fr2_80	UK543	CZ374	
Fr1	SP130, UK543, Fr1_99	CZ373	
SP131		CZ372	
Uk1_47	UK543	CM1	CZ375, BE104, GE519
Uk1_48	UK543	BE101	
Uk1_37	UK543	CM57	GE519
Sc06		CB05	
Sc07		CM55	UK543
Uk1_43		CB62	CB02, UK543
Uk1_46		Uk3_52	UK543, Uk1_38
FR270	UK543	Uk3_49	UK543
FR345		Uk3_53	
UK536	AS436, SL436, TU563, FR274, FR574	Uk3_55	
Fr3_59		YU210	
FR142		YU211	
Fr2_75	Fr2_85, CB61, FR274, GE519	SL417	SL434
FR577		IT176	
Fr2_84	GE519	IT853	
BE107	GE519	IT172	IT160, IT852
GE157	GE519	IT171	
FR269	GE519, IT168	IT851	
BE103		IT163	
SP133		IT165	
FR143		YU212	
Fr2_79	GE519	MC181	
BE102	BE105, GE519	IT860	
GE514	GE519	IT161	
TN138		IT159	
MA185		IT162	
TN141		GR183	
TN140	MA186	IT174	
MA187		GR157	GR705
MA188		IT167	
TN139		IT169	
SP132		IT170	
FR145		IT164	
FR144		Si842	
FR272		Si846	
FR714		Si849	
FR271		Si305	
SP596		Si848	
SP594		Si844	
FR589	GE519	Si845	
UK538		Si304	
UK537		Si306	
Fr2_82			

Linie 2

Linie 1a

Linie 2

Linie 1b

Černá barva reprezentuje data převzatá z Michaux et al. (2003). Červená barva reprezentuje nová data.