

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Populační struktura a genealogie vší rodu *Hoplopleura*

Bc. Tereza Marvanová

Školitel: prof. RNDr. Václav Hypša, CSc.

Laboratoř Molekulární Fylogenetiky a Evoluce Parazitů

Parazitologický Ústav, Biologické centrum, AVČR



České Budějovice 2011

Magisterská diplomová práce:

Marvanová T., 2011, Populační struktura a genealogie vší rodu *Hoplopleura*. [Population structure and genealogy of lice *Hoplopleura*, Master Thesis, in Czech] – 25pp., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Anotace:

Population structure and genealogy of lice *Hoplopleura* were studied using mitochondrial DNA.

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 diplomové 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, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 24.4. 2011

Bc. Tereza Marvanová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Václavu Hypšovi za možnost pracovat v Laboratoři molekulární fylogenetiky a evoluce parazitů a za odborné vedení mé diplomové práce. Za cenné rady bych chtěla poděkovat také Janě Martinů.

Obsah:

1.	Úvod	1
2.	Cíle práce	6
3.	Materiál a metodika	6
3.1	Odchyty hlodavců a odběr biologických vzorků	6
3.2	DNA extrakce	8
3.3	PCR a sekvenace.....	9
3.4	Alignmenty, fylogenetické a populační analýzy	10
4.	Výsledky	11
4.1	Sekvence a alignmenty	11
4.2	Fylogenetické analýzy	14
4.3	Populační struktura	16
4.4	DNASP a BEAST	18
5.	Diskuze	21
6.	Závěr	22
7.	Seznam použité literatury	23

1. Úvod

Parazitě, stejně jako jiné organismy, mají geneticky strukturované populace. Genetická strukturovanost, je způsobená tím, že se populace během historie geneticky vyvíjejí, nejsou panmiktické a zvířata v nich migrují. Areál výskytu určité populace může být v některých případech ohraničen přirozenými či uměle vytvořenými bariérami. Příkladem umělé, člověkem vytvořené bariéry, je Velká čínská zeď, která bránila genetickému toku mezi populacemi rostlin na jedné a druhé straně zdi (Su a kol., 2003). Mezi přirozené bariéry patří například okraje kontinentu, pohoří, oceán či vodní tok. Příkladem přirozené geografické bariéry je Grand Canyon, který před několika tisíci lety rozdělil původně totožný druh syslů na druhy *Ammospermophilus harrisii* a *Ammospermophilus leucurus*, žijící každý na opačné straně kaňonu (Hafner, 1981). V heterogenním prostředí bude mít geograficky široce rozšířená populace tendenci vyvinout lokální genetické rozdíly. Pokud budou tyto lokální populace dostatečně izolované, soudržný tok genů mezi nimi se přeruší, nebo drasticky redukuje a stanou se z nich nezávislé evoluční jednotky.

Kromě geografických bariér mohou mít vliv na genetickou strukturu organismů i ekologické faktory. V případě parazitů je nejnápadnějším faktorem hostitelská specifita. Geografická distribuce a hostitelská specifita v systému hostitel-parazit jsou základem pro genetickou diverzifikaci a strukturování populace. V důsledku toho parazité žijící na více druzích hostitelů mohou být ve skutečnosti skupina morfologicky nerozlišitelných, ale geneticky odlišných druhů (Štefka a Hypša, 2008). Teprve na genetické úrovni je patrné, že některé linie jsou vázány specificky na některé hostitele, či na určité území. Několik modelů, které byly detailně prostudovány ukazuje, že koevoluční procesy v systému hostitel-parazit mohou být velice komplikované; i blízké příbuzné linie se mohou lišit svými ekologickými vlastnostmi a charakterem populační struktury. Například v genealogické studii vši rodu *Pediculus* parazitujících na člověku (Reed a kol., 2004). Podobný patern byl popsán při studiu hostitelsko-parazitických vztahů vši rodu *Polyplax* (Štefka a Hypša, 2008) a tasemnic *Ligula intestinalis* (Štefka a kol., 2009). Kromě genealogické složky ovlivňuje koevoluce mezi hostiteli a parazity také mnoho demografických aspektů a genetických parametrů (například migrace zvířat, tok genů, či změny velikosti populace). Velikost populace historicky roste nebo klesá, s tím souvisí i to, jak je výrazný genetický polymorfismus. Genetický polymorfismus se může v důsledku bottlenecku snižovat či zvyšovat nárůstem populace.

Velmi důležitým evolučním faktorem, který ovlivňuje populační strukturu organismů je tok genů, tj. předávání genů mezi populacemi nejčastěji prostřednictvím migrujících jedinců. Genetický tok se může v průběhu evoluce zrychlovat či zpomalovat v závislosti na struktuře populace příslušného druhu. Z hlediska genového toku je totiž nejdůležitějším parametrem nikoli vlastní pohyblivost jedinců v populaci příslušného druhu, ale migrace. Genový tok, který zprostředkovává výměnu genetické informace mezi jednotlivými populacemi, má nejspíše zásadní význam pro průběh evoluce (Rieseberg a kol., 2001). Každá populace je vystavena působení přirozeného výběru, který z ní eliminuje jedince, jejichž genotyp neodpovídá požadavkům lokálního prostředí. Geneticky uniformní populace má horší možnosti evolučně odpovídat na rychlé a krátkodobé změny prostředí a je proto odkázána na jediný zdroj selektovatelné genetické variability, tj. na mutace. Lokální populace se nacházejí v odlišných podmínkách, tudíž se vzájemně liší i složením svých genofondů. Migranti proto s velkou pravděpodobností přinesou do populace některé alely, které se zde nevyskytují, případně, které se zde vyskytují pouze v nízké frekvenci (Flegr, 2005).

Populace parazitů prodělávají v průběhu evoluce různé demografické změny, které se odrážejí později v jejich genofondu. Pokud odhalíme tyto změny, můžeme přesněji zhodnotit genetickou variabilitu v populaci parazita. Pomocí populačně-genetických metod jsme schopni zjistit aktuální podobu struktury populace a zjistit bariéry toku genetické informace, odhadnout míru migrace a výměnu genů v populaci. Metody rekonstrukce vnitrodruhových genealogií jsou také důležitým prostředkem ke zjištění historie populační struktury a určení událostí, kterými jsou například míra populační expanze či fragmentace populace (Emerson a kol., 2001).

V průběhu čvrtohor proběhly důležité klimatické změny, které velice ovlivnily rozšíření živočišných i rostlinných druhů v palearktické oblasti (Webb a kol., 1992). Klima glaciálu bylo charakteristické chladem a suchem, krajina byla bezlesá a velká část Evropy byla pro temperátní druhy zvířat neobyvatelná. Teplomilné a náročné druhy fauny a flóry byly podmínkami glaciálu zatlačeny na jih. Středoevropské formy přežívaly ve vzájemně izolovaných mediteránních refugích na Iberském, Apeninském a Balkánském poloostrově. S oteplením v postglaciálu došlo k reexpanzi druhů ze středomořských refugií. Dnešní areály druhů jsou výsledkem postglaciální rekolonizace z mediteránních refugií (kde došlo k nezávislé divergenci až allopatrické speciaci).

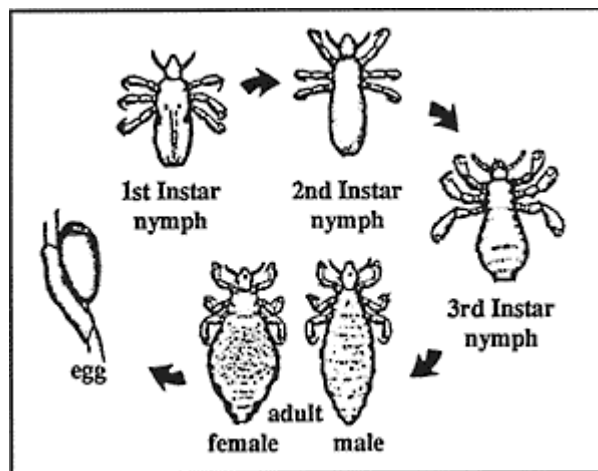
Někteří vědci se snaží pomocí fylogeografických a paleontologických přístupů zjistit konkrétní refugia, ze kterých jednotlivé druhy rekolonizovaly oblasti v Evropě. Například studie o fylogeografické historii *Myodes glareolus* v Evropě odhalila, že druhy žijící v lesích mírného pásma, jako je norník rudý, byly schopny přežít v oblastech střední Evropy během střídání dob ledových (Deffontaine, 2005). Hraboši rodu *Microtus* reprezentují savčí druhy v holarktické oblasti (Jaarola a kol., 2004, Robovský a kol., 2008). Mnoho evropských druhů má sympatrickou distribuci a na většině z nich parazitují vši rodu *Hoplopleura*. Fylogenetické studie nejčastějšího druhu *Microtus arvalis* (Buzan a kol., 2010) ukazují, že kvartérní zalednění mělo dopad na populace hrabošů podobně jako na myšice rodu *Apodemus*; oddělená refugia se nacházela v západní a východní Evropě. Situace u *Myodes glareolus* je komplikovanější. Studie o fylogeografické historii *Myodes glareolus* v Evropě odhalila, že druhy žijící v lesích mírného pásma, jako je norník rudý, byly schopny přežít v oblastech střední Evropy během střídání dob ledových (Deffontaine, 2005). Další studie odhalila, že kromě refugia v jižní a střední Evropě bylo nalezeno i refugium v Karpatech (Kotlík a kol., 2006).

Modelem mé práce je veš *Hoplopleura*, která je pro studium populační struktury výhodná, protože žije na více hostitelích. Všichni jsou výhradními parazity placentálních savců. Jsou vysoce specializovaným krevsajícím hmyzem, jehož životní cyklus je zcela závislý na jediném hostiteli. Všichni sají krev přímo z cévy hostitele a to i několikrát za den. Mimo své hostitele dokáží přežít jen několik málo hodin či dnů. Životní cyklus se skládá z několika vývojových stádií (vajíčko, tři nymfální stadia a dospělec) **Obr. 1**. Ústní ústrojí mají značně modifikované a přetvořené v bodavě sací aparát s vysunovatelným styletem. Silné nohy slouží k přichycení na chlupech hostitele a srpovitý dráp, proti němuž vyrůstá na holeni silný palcovitý výrůstek, vytváří jakési kleště. Samička klade průměrně 5 až 20 vajíček denně, v závislosti na druhu vši a dostupnosti potravy (Volf a kol., 2007).

Všichni rodu *Hoplopleura* parazitující zejména na hlodavcích rodu *Microtus* jsou morfologicky blízce příbuzní. To je důvod, proč veš parazitující na hraboších *Microtus arvalis* a *Microtus agrestis* byla považována za stejný druh jako veš vyskytující se na *Myodes glareolus*. V roce 1966 Beaucournu detailně prostudoval morfologii a poukázal na to, že *Hoplopleura edentula* parazitující na *Myodes glareolus* je odlišný druh. Od

této doby byla považována jako poddruh *Hoplopleura acanthopus* (Fahrenholz, 1916). Diagnostické znaky na povrchu *H. acanthopus* a *H. edentula* byly studovány pod skenovacím elektronovým mikroskopem. Spolehlivým rozpoznávacím znakem je rozdíl ve tvaru paratergálních destiček a v délce a tloušťce sít, které se na nich nacházejí (Kohn a kol., 1987).

Obr. 1. Životní cyklus vší (převzato z: <http://www.squidoo.com/Head-Lice-Life-Cycle>)



Hostitelé vší rodu *Hoplopleura*

Microtus arvalis (hraboš polní) je jeden z našich nejběžnějších drobných savců, vyskytuje se na celém území České republiky. V Krkonoších proniká i nad horní hranici lesa. Vyjma Finska, Skandinávie a větší části Středomoří obývá téměř celou pevninu Evropy až po Ukrajinu a Rusko (povodí Volhy). Je sice typickým druhem suchých stanovišť otevřené krajiny a kulturní stepi, ale v dobách přemnožení proniká i do prosvětlených lesů. Vyhýbá se místům s hustou vysokou vegetací, na zimu se stahuje do stohů, sýpek a seníků. Svrchu bývá žlutošedý, šedohnědý nebo slabě narezavělý, naspodu obvykle šedobílý se žlutým nádechem.

Microtus agrestis (hraboš mokřadní) se vyskytuje od Velké Británie (chybí v Irsku a na Islandu) až po jezero Bajkal na střední Sibiři. Jižní hranice evropské části areálu běží horskými oblastmi Španělska, Itálie, Slovinska a Chorvatska, na severu sahá až na pobřeží Severního ledového oceánu. V České republice je místy zcela běžný, obývá polohy od 140 m n. m. (Děčínsko, Mostecko) do 1600 m n. m. (Krkonoše-Sněžka,

Vysoké Kolo, Hrubý Jeseník, Praděd). Dosud nebyl zjištěn v nížinách středních a východních Čech a jižní Moravy. Vyžaduje hustý porost vlhkomilných rostlin, takže optimální podmínky nalézá na podmáčených (nekosených) loukách, rašeliništích, bažinách a jiných mokřadech. V horách hojně osídluje holiny po odumřelých lesích, okrajově obývá kamenné sutě. Od hraboše polního se sice liší nepříliš zřetelnými znaky, hřbetní stranu těla má obvykle tmavší, rezavě až skořicově hnědou, někdy i s příměsí černých chlupů a světlejší břicho šedavé nebo žlutavé.

Myodes glareolus (norník rudý) se vyskytuje s výjimkou větší části Pyrenejského poloostrova, Řecka, středomořských ostrovů a Islandu v celé Evropě a Malé Asii, dále na východ zasahuje do střední Sibiře, přibližně po Altaj a Bajkalské jezero. V Čechách se s ním setkáme skutečně všude, od nížin až po hřebeny hor, kde vystupuje i nad horní hranici lesa. Nejhojnější je v listnatých a smíšených lesích s bohatým podrostem, ale nachází se i ve smrčinách, v kosodřevině, břehových porostech, křovinách, polních remízcích i parcích. Od jiných hrabošů se snadno pozná podle nápadně červenavě rezavého zbarvení na hřbetě, větších ušních boltců a delšího ocasu (obvykle 45 – 60 % délky těla). Břicho mívá světlejší, nažloutlé nebo v zimní srsti někdy až čistě bílé, také tlapky jsou světlé.

Apodemus flavicollis (myšice lesní) žije od východní Francie, Itálie a jižní Skandinávie po Ural, Kavkaz, Malou Asii a Blízký východ, ostrůvkovitě se vyskytuje v jižní Anglii, Pyrenejích a rovněž na mnoha ostrovech. V Čechách se na příhodných biotopech běžně vyskytuje na celém území, v horách vystupuje vysoko nad horní hranici lesa (např. Krkonoše - Sněžka, 1602 m n. m.). Obývá zvláště listnaté smíšené lesy od nížin po hory. Rovněž osídluje chladnější místa na březích vodních toků, sady nebo polní remízky, v zimě se stahuje k obytným či hospodářským budovám. Myšice lesní je největší z druhů myšic žijících u nás. Spolehlivým určovacím znakem je délka zadní tlapky nad 24mm. Podobně je tomu i s ocasem, který je u dospělých jedinců stejně dlouhý, nebo spíše delší než tělo. V dospělosti mívá myšice lesní poměrně výrazné zbarvení, ve kterém ryšavě hnědý až kaštanový odstín na hřbetě a bocích odděluje ostrá hranice od téměř čistě bílého břicha. Na hrdle bývá velká žlutá skvrna, která se na vnitřní straně předních končetin napojuje na tmavší zbarvení boků. Má nápadné korálkově černolesklé oči o průměru asi 5mm a velké, lysé ušní boltce (Anděra a Horáček, 2005).

2. Cíle práce

Cílem této práce bylo zjistit populační strukturu vší rodu *Hoplopleura* z různých hostitelů a lokalit v Čechách a na Slovensku pomocí sekvencí mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu podjednotku I (COI).

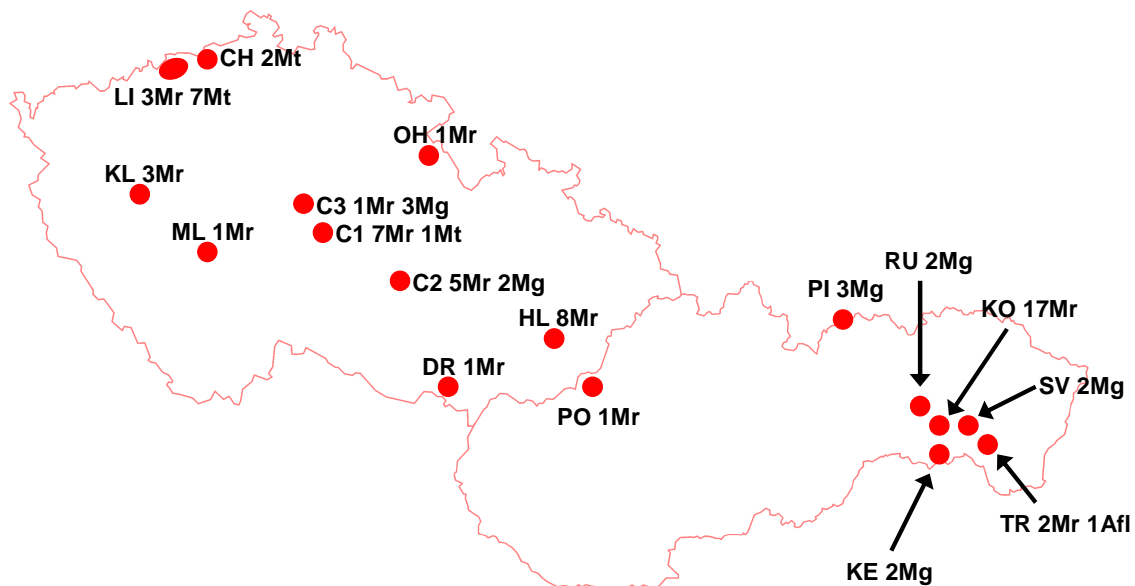
3. Materiál a metodika

3.1 Odchyty hlodavců a odběr biologických vzorků

Materiál vší rodu *Hoplopleura*, který jsem zpracovala ve své diplomové práci, pochází z terénních odchytů drobných hlodavců (druhů *Microtus arvalis*, *M. agrestis*, *Myodes glareolus*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*), které probíhaly v průběhu let 2005 - 2010 na lokalitách v České republice a na Slovensku. Pro odchvy byly použity klasické dřevěné sklapovací pasti. Jednotliví hlodavci byli identifikováni pomocí literatury (Anděra a Horáček, 2005). Odchycení hlodavci byli vyšetřeni na přítomnost parazitů (vši, blechy, klíšťata) a nalezení ektoparazitů byli posléze uloženi do 96% ethanolu. Z každého hlodavce byl pro molekulárně biologické účely odebrán tkáňový vzorek. Pro vědecké pokusy kolegů z naší laboratoře, kteří se zabývají studiem kokciidií z myšic, byl odebrán z každého hlodavce také trus z tračníku, který byl přenesen do vzorkovnice s 4% roztokem dichromanu draselného.

Hraboši druhu *Microtus arvalis* a *Microtus agrestis* a normíci rodu *Myodes glareolus* byli odchyceni celkem na sedmnácti lokalitách, které jsou znázorněny na mapě (**Obr.2**) a vyšetřeni na přítomnost vší rodu *Hoplopleura*. Prevalence vší z jednotlivých lokalit jsou znázorněny v tabulce **Tab. 1**. Vši byly nalezeny na celkem 50 hraboších rodu *Microtus arvalis*, 10 hraboších rodu *Microtus agrestis*, 15 normících *Myodes glareolus* a na jedné myšici druhu *Apodemus flavicollis*. Celkem bylo sesbíráno 75 jedinců vší.

Obr. 2. Mapa lokalit odchyťů hrabořů a nornůků, u kterých byly nalezeny vři rodu *Hoplopleura* (názvy lokalit jsou uvedené v **Tab. 1**).



Afl..... *Apodemus flavicollis*

Mg..... *Myodes glareolus*

Mr..... *Microtus arvalis*

Mt..... *Microtus agrestis*

Tab. 1. Prevalence vši rodu *Hoplopleura* na jednotlivých hostitelích a lokalitách (počet odchycených hlodavců určitého druhu / počet hlodavců, u kterých byly nalezeny vši).

Označení	Lokalita	Počet vši na daném hostiteli			
		<i>M. arvalis</i>	<i>M. agrestis</i>	<i>M. glareolus</i>	<i>A. flavicollis</i>
C1	Českomoravská vrchovina, lokalita 1, ČR	21/7	5/1		
C2	Českomoravská vrchovina, lokalita 2, ČR	15/5		4/2	
C3	Českomoravská vrchovina, lokalita 3, ČR	8/1		3/3	
KO	Košice, SR	42/17			
PO	Pováží, SR	3/1			
DR	Drholec, ČR	5/1			
HL	Horní Lapač, ČR	22/8			
TR	Trebišov, SR	12/2			10/1
LI	Litvínov, ČR	18/3	12/7		
ML	Milevsko, ČR	5/1			
CH	Chlumeč, ČR		6/2		
KL	Klabava, ČR	5/3			
OH	Deštné v Orlických horách, ČR	1/1			
SV	Slánské Vrchy, SR			3/2	
KE	Kechnec, SR			2/2	
PI	Pieniny, SR			3/3	
RU	Ružín, SR			3/2	

3.2 DNA extrakce

Pro izolaci DNA byly vši vyjmuty z ethanolu, pod binolupou rozříznuty skalpelem mezi thoraxem a abdomenem a vysušeny přes noc při pokojové teplotě. Genomová DNA byla extrahována izolačním kitem QIAamp DNA Micro Kit od firmy Qiagen. DNA byla vyzolována dle návodu výrobce. Chitinový exoskelet vši byl po izolaci DNA uchován pro případ zpětné morfologické determinace.

3.3 PCR a sekvenace

K zjištění fylogenetických vztahů mezi populacemi vší rodu *Hoplopleura* byl použit fragment mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu podjednotku I (COI) dlouhý 581bp. Pro PCR reakci byly použity primery LCO 1940 a HCO 2198 (Hafner a kol., 1994) a polymeráza High Fidelity PCR Enzyme Mix (HiFi) od firmy Fermentas. PCR probíhala v objemu 20 µl za standardních podmínek.

Pro amplifikaci byly použity tyto primery:

LCO 1940

HCO 2198

Amplifikace probíhala za těchto podmínek:

1.	denaturace	94°C	3:00
2.	denaturace	94°C	1:00
	annealing	55°C	1:00
	<u>elongace</u>	<u>72°C</u>	<u>1:30</u>
	30 cyklů opakování		
3.	finální extenze	72°C	10:00

Výsledek PCR reakce byl vizualizován elektroforézou na 1% agarózovém gelu při napětí 100V, při použití barviva Sybr Green a 1kb ladderu. Získané PCR produkty byly enzymaticky přečištěny pomocí 0,2 µl Exo I (exonuclease I z *E. Coli*) a 0,2 µl CIP (alkaline phosphatase calf intestinal; New England Biolabs®Inc). Vzorky byly následně odeslány na sekvenaci do firmy Macrogen (Korea). K prohlížení, úpravě a kompletování výsledných sekvencí byl použit program SeqMan (DNA STAR, Inc.). Identifikace sekvencí a jejich porovnání s publikovanými sekvencemi byly provedeny v genové bance pomocí algoritmu BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.4 Alignmenty, fylogenetické a populační analýzy

Alignmenty sekvencí byly vytvořeny v programu BioEdit7 (Hall, 1999). Sekvence byly alignovány algoritmem Clustal W Multiple Alignment (Thomson a kol., 1994). Manuálně zkontrolovány a ořezány do stejné délky 581bp. Upravený alignment sekvencí byl exportován do programu Collapse 1.2 (Posada, 2006) a tímto programem byly sekvence zkolabovány do jednotlivých haplotypů. Jako outgroup byly pro všechny fylogenetické analýzy použity sekvence *Metria* sp. (GU163418.1) a *Lepidoptera* sp. (HM388626.1).

K zjištění genealogických vztahů mezi haplotypy byly použity metody maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) a neighbour joining (NJ). MP analýzy byly provedeny v programu TNT (Goloboff a kol., 2004) s poměry tranzicí ku transverzím (Ts/Tv) 1/1, byl použit TBR algoritmus s 10 replikacemi a náhodným přidáváním sekvencí (random sequence addition). Striktní konsensus byl získán ze všech MP stromů. Hodnoty bootstrapu byly získány 1000 replikacemi, byl použit TBR algoritmus s poměrem tranzicí ku transverzím (Ts/Tv) 1/1. ML analýza byla provedena v programu Phyml (Guindon a kol., 2003) s použitím modelu GTR, který byl vybrán pomocí programu Modeltest a parametry odhadnutými z dat. Se stejným modelem byla provedena bootstrapová analýza s 1000 replikacemi dat. NJ analýza byla provedena v programu PAUP v.4b10 (Swofford, 2002). Haplotypové sítě byly zrekonstruovány v programu TCS (Clement a kol., 2000). Výsledné stromy byly vizualizovány programem TreeView v.1.6.6 (Page, 1996).

Genetická variabilita jednotlivých linií byla vyhodnocena v programu DNASP 4.0 (Rozas a kol., 2003) pomocí koeficientů nukleotidové (π) a haplotypové (H) diverzity. V tomto programu byly také provedeny testy neutrality COI sekvencí. Haplotypové sítě byly použity jako základ pro nested clade analýzu provedenou v programu Geodis (Posada a kol., 2000). V programu BEAST (Drummond a kol., 2007) byly provedeny pomocí metody skylineplot analýzy růstu populace pro linie vykazující signifikantní výsledek testu neutrality.

4. Výsledky

4.1 Sekvence a alignmenty

Byly získány sekvence části genu pro COI dlouhé 581bp ze 75 jedinců vši, z toho 68 jedinců *Hoplopleura acanthopus* a 7 jedinců *Hoplopleura edentula* (**Tab.2**). Devět sekvencí nebylo kompletně osekvenovaných (C3CG1, C3CG2, C1MR3, C1MR4, C2MR2, C2MR4, C2MR5, C2MR1, CHMT1). Celkových 66 sekvencí představovalo 30 haplotypů (**Tab.3**). Počty sekvencí kolísaly mezi 1 - 11, nejčastější zastoupení bylo 1 - 3 sekvence (podrobnosti viz. **Tab.3**).

Tab. 2: Přehled sekvencí, podbarvené sekvence nebyly použity pro analýzy.

označení	druh parazita	hostitel	lokalita
C1MT1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. agrestis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 1
C1MR2	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 1
C1MR3	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 1
C1MR4	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 1
C1MR5	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 1
C1MR6	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 1
C1MR7	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 1
C1MR1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 1
C2MR1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 2
C2MR2	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 2
C2MR3	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 2
C2CG1	<i>H. edentula</i>	<i>M. glareolus</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 2
C2MR4	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 2
C2MR5	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 2
C2CG2	<i>H. edentula</i>	<i>M. glareolus</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 2
POMR1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Pováží, Klíčové
KOMR1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR2	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR3	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR4	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR5	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR6	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR7	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR8	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR9	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR10	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR11	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR12	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR13	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR14	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR15	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice

KOMR16	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
KOMR17	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Košice
C3CG1	<i>H. edentula</i>	<i>M. glareolus</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 3
C3MR1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 3
C3CG2	<i>H. edentula</i>	<i>M. glareolus</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 3
C3CG3	<i>H. edentula</i>	<i>M. glareolus</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 3
DRMR1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Drnholec
HLMR1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač
HLMR2	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač
HLMR3	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač
HLMR4	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač
HLMR5	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač
HLMR6	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač
HLMR7	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač
HLMR8	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač
TRMR1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Třebišov
TRMR2	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Třebišov
TRAF1	<i>H. acanthopus</i>	<i>A. flavicollis</i>	Třebišov
LIMT1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. agrestis</i>	Litvínov
LIMR1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Litvínov
LIMT2	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. agrestis</i>	Litvínov
LIMT3	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. agrestis</i>	Litvínov
LIMT4	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. agrestis</i>	Litvínov
LIMR2	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Litvínov
LIMR3	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Litvínov
LIMT5	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. agrestis</i>	Litvínov
LIMT6	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. agrestis</i>	Litvínov
LIMT7	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. agrestis</i>	Litvínov
MLMR1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Milevsko
CHMT1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. agrestis</i>	Chlumec
CHMT2	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. agrestis</i>	Chlumec
KLMT1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Klabava
KLMT2	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Klabava
KLMT3	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Klabava
OHMR1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. arvalis</i>	Deštné v Orlických horách
SVCG1	<i>H. edentula</i>	<i>M. glareolus</i>	Slánské Vrchy
SVCG2	<i>H. edentula</i>	<i>M. glareolus</i>	Slánské Vrchy
KECG1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. glareolus</i>	Kechnec
KECG2	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. glareolus</i>	Kechnec
PICG1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. glareolus</i>	Pieniny
PICG2	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. glareolus</i>	Pieniny
PICG3	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. glareolus</i>	Pieniny
RUCG1	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. glareolus</i>	Ružín
RUCG2	<i>H. acanthopus</i>	<i>M. glareolus</i>	Ružín

Tab. 3: Přehled haplotypů z různých lokalit a hostitelů.

haplotyp	označení	hostitel	lokality	
Hap 1	C1MR2	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 1	
	C1MR5	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 1	
	HLMR5	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač	
	HLMR6	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač	
Hap 2	C1MR7	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 1	
Hap 3	C1MR6	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 1	
Hap 4	POMR1	<i>M. arvalis</i>	Pováží	
Hap 5	C2MR3	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 2	
Hap 6	OHMR1	<i>M. arvalis</i>	Deštné v Orlických horách	
Hap 7	C1MR1	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 1	
Hap 8	C3MR1	<i>M. arvalis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 3	
Hap 9	DRMR1	<i>M. arvalis</i>	Drnholec	
	Hap 10	HLMR1	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač
		HLMR7	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač
		HLMR8	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač
HLMR2		<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač	
Hap 11	HLMR3	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač	
	HLMR4	<i>M. arvalis</i>	Horní Lapač	
Hap 12	TRMR1	<i>M. arvalis</i>	Třebíšov	
	TRMR2	<i>M. arvalis</i>	Třebíšov	
Hap 13	LIMR2	<i>M. arvalis</i>	Litvínov	
Hap 14	LIMR3	<i>M. arvalis</i>	Litvínov	
Hap 15	MLMR1	<i>M. arvalis</i>	Milevsko	
Hap 16	CHMT1	<i>M. agrestis</i>	Chlumeč	
	CHMT2	<i>M. agrestis</i>	Chlumeč	
	LIMT7	<i>M. agrestis</i>	Litvínov	
Hap 17	KOMR2	<i>M. arvalis</i>	Košice	
	KOMR15	<i>M. arvalis</i>	Košice	
	KOMR7	<i>M. arvalis</i>	Košice	
	PICG1	<i>M. glareolus</i>	Pieniny	
	PICG2	<i>M. glareolus</i>	Pieniny	
Hap 18	PICG3	<i>M. glareolus</i>	Pieniny	
	KOMR16	<i>M. arvalis</i>	Košice	
	KOMR17	<i>M. arvalis</i>	Košice	
	KOMR3	<i>M. arvalis</i>	Košice	
	KOMR4	<i>M. arvalis</i>	Košice	
	KOMR8	<i>M. arvalis</i>	Košice	
	KOMR9	<i>M. arvalis</i>	Košice	
	KOMR10	<i>M. arvalis</i>	Košice	
	KOMR13	<i>M. arvalis</i>	Košice	
	KECG1	<i>M. glareolus</i>	Kechnec	
KECG2	<i>M. glareolus</i>	Kechnec		
Hap 19	KOMR11	<i>M. arvalis</i>	Košice	
	KOMR5	<i>M. arvalis</i>	Košice	
	KOMR12	<i>M. arvalis</i>	Košice	
	KOMR14	<i>M. arvalis</i>	Košice	
Hap 20	KOMR6	<i>M. arvalis</i>	Košice	
Hap 21	KLMT1	<i>M. arvalis</i>	Klabava	
	KLMT3	<i>M. arvalis</i>	Klabava	

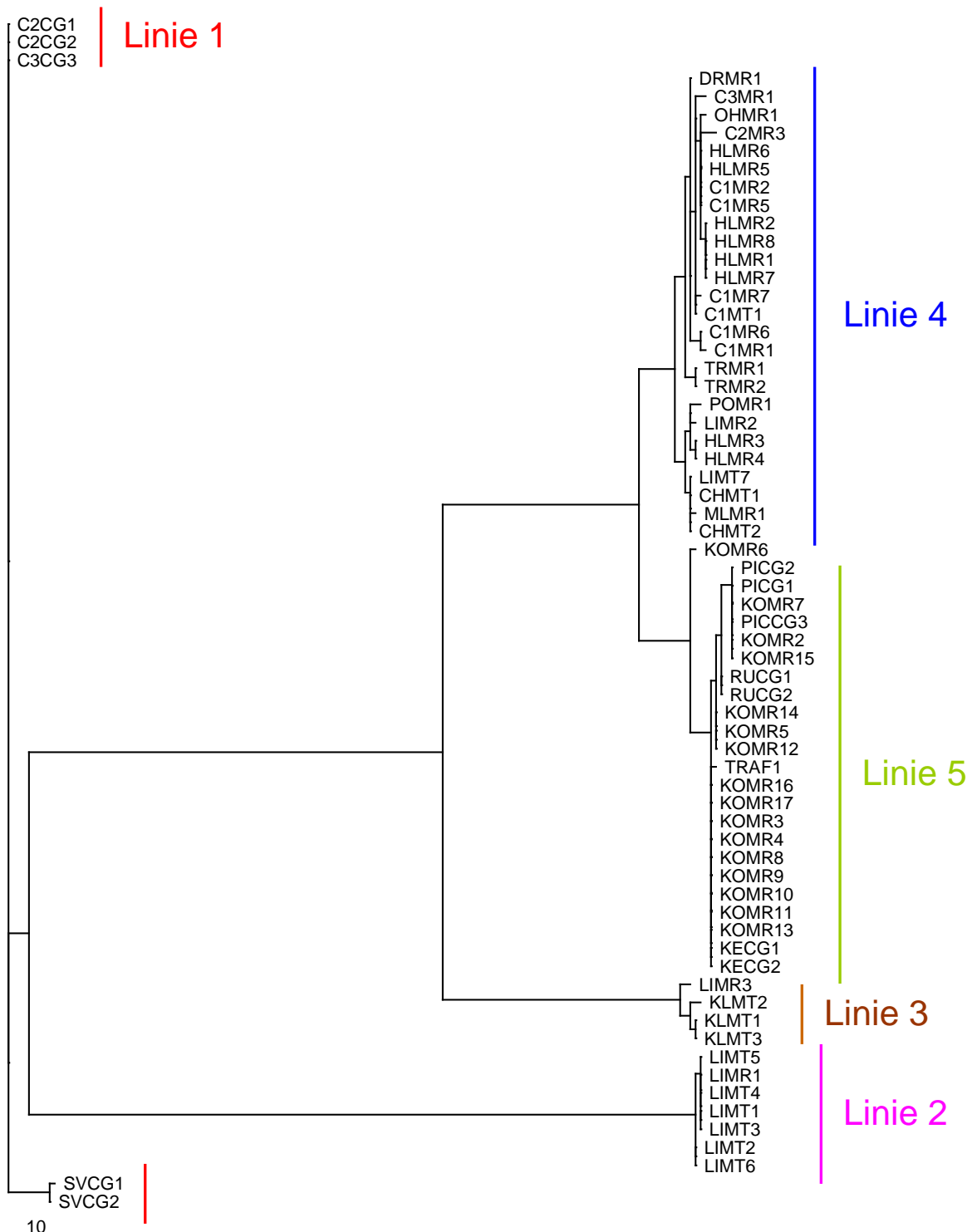
Hap 22	KLMT2	<i>M. arvalis</i>	Klabava
Hap 23	C1MT1	<i>M. agrestis</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 1
Hap 24	LIMT1	<i>M. agrestis</i>	Litvínov
	LIMT3	<i>M. agrestis</i>	Litvínov
	LIMT4	<i>M. agrestis</i>	Litvínov
	LIMR1	<i>M. arvalis</i>	Litvínov
	LIMT5	<i>M. agrestis</i>	Litvínov
Hap 25	LIMT2	<i>M. agrestis</i>	Litvínov
	LIMT6	<i>M. agrestis</i>	Litvínov
Hap 26	C2CG1	<i>M. glareolus</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 2
	C2CG2	<i>M. glareolus</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 2
	C3CG3	<i>M. glareolus</i>	Českomoravská vrchovina, lokalita 3
Hap 27	SVCG1	<i>M. glareolus</i>	Slánské Vrchy
Hap 28	SVCG2	<i>M. glareolus</i>	Slánské Vrchy
Hap 29	RUCG1	<i>M. glareolus</i>	Ružín
	RUCG2	<i>M. glareolus</i>	Ružín
Hap 30	TRAF1	<i>A. flavicollis</i>	Třebišov

4.2 Fylogenetické analýzy

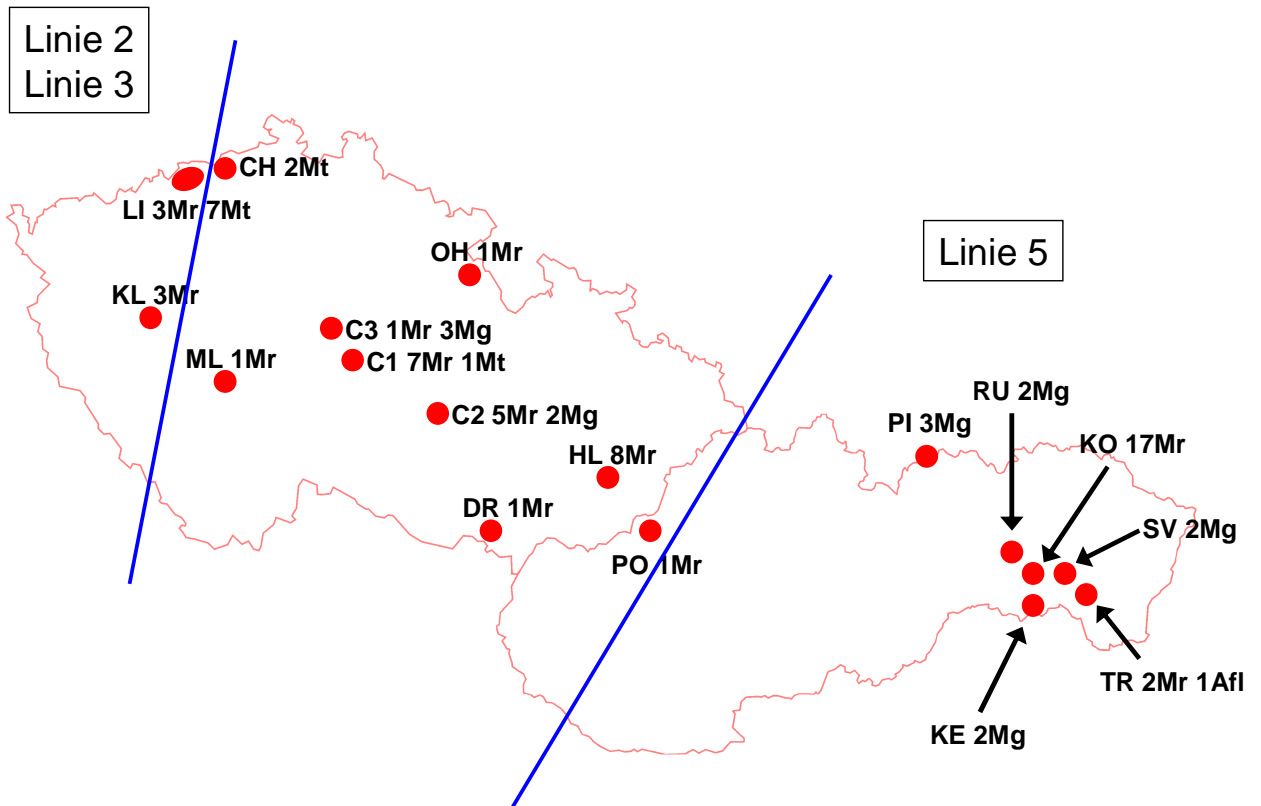
Výsledkem všech analýz (MP, ML, NJ) bylo 5 rozlišených linií (linie: 1, 2, 3, 4, 5 na **Obr.3**). Linie 1 zahrnovala 5 jedinců vší, pravděpodobně *Hoplopleura edentula*, nalezených na stejném druhu hostitele, *Myodes glareolus*, ze tří lokalit (Českomoravská vrchovina 2, Českomoravská vrchovina 3 a Slánské Vrchy na Slovensku). Linie 2 zahrnovala pouze vší nalezené na jediné lokalitě, Litvínov, na dvou druzích hrabošů *Microtus arvalis* a *Microtus agrestis*. Linie 3 obsahovala 3 vzorky z Klatov z hostitele *Microtus agrestis* a jeden vzorek z Litvínova z hostitele druhu *Microtus arvalis*. Linie 4 zahrnuje velké množství vší především z Čech, pouze 2 vzorky jsou z Třebišova (SR). Hostiteli vší z této linie jsou pouze hraboši (*Microtus arvalis* a *Microtus agrestis*). Linie 5 obsahuje vzorky z východního Slovenska z hostitelů *Microtus arvalis* a *Myodes glareolus*.

Bazální linie kladogramu (Linie 2 a 3) pocházejí z lokalit Litvínov a Klabava na severozápadě České republiky a jsou odděleny od ostatních hranic. V této západní části se jiné linie z kladogramu neobjevují. Linie 5 se nachází u různých druhů hostitelů, je geograficky specifická, nachází se pouze na Slovensku a tvoří jihovýchodní linii. Linie 4 není geograficky specifická (je v Čechách i na Slovensku), ale je hostitelsky specifická a nachází se pouze u rodu *Microtus*. Hranice mezi liniemi probíhají přibližně v lokalitách jak je znázorněno na mapě (**Obr. 4**).

Obr. 3: Výsledný kladogram získaný analýzou neighbour joining (NJ) s vyznačenými liniemi.



Obr. 4 : Mapa s vyznačenými hranicemi mezi liniemi.

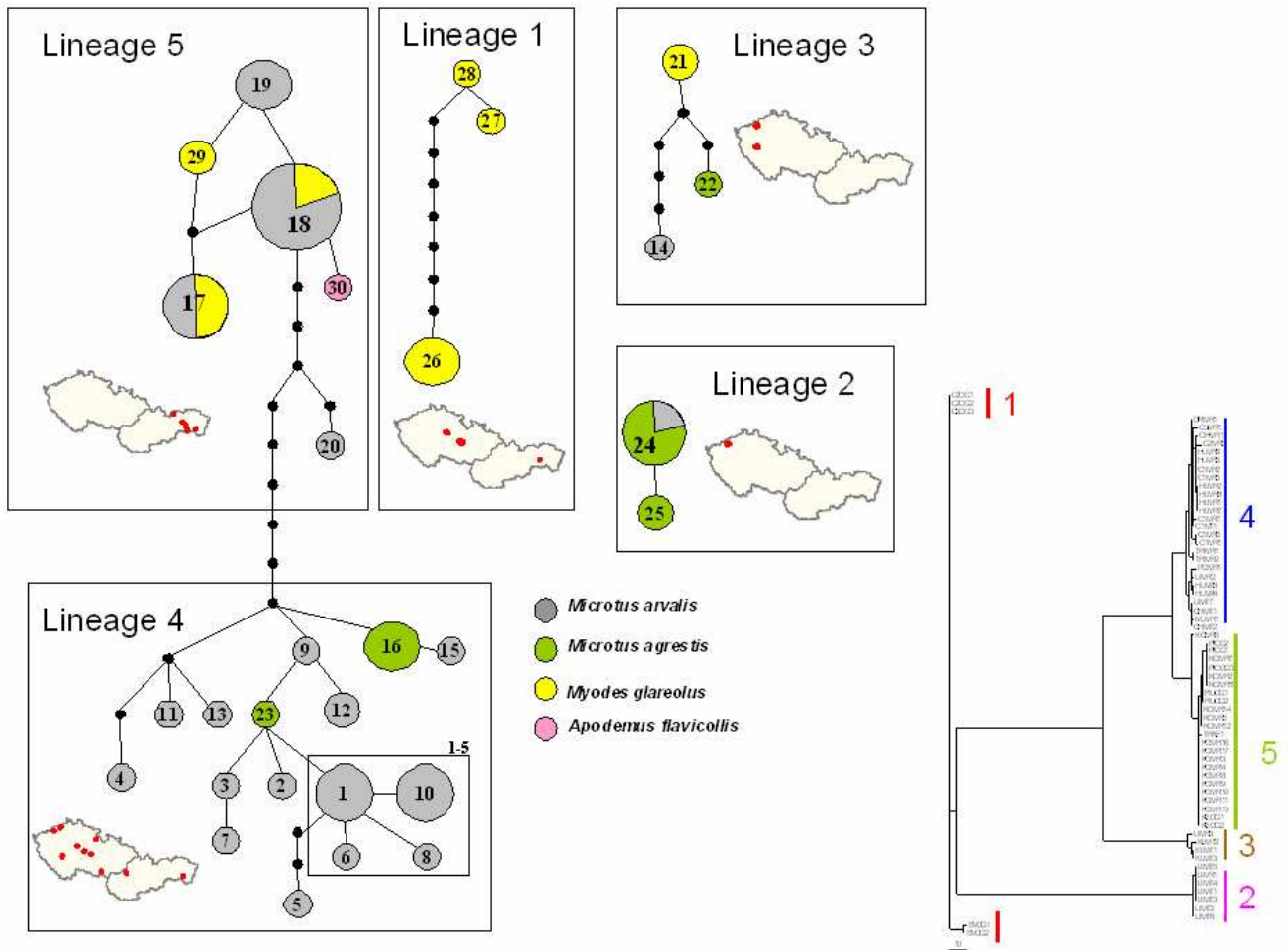


4.3 Populační struktura

Analýzou programem TCS bylo zjištěno, že se 66 získaných sekvencí vší rozdělilo do 30 haplotypů, které se rozpadly na 4 nezávislé sítě odpovídající genetickým liniím: (Linie 1, Linie 2, Linie 3, Linie 4 + 5). NCPA Analýza založená na nestovaných haplotypech neukázala významnou roli geografie na formování genetické struktury. Pouze v jednom případě došlo k omezení toku genů v důsledku geografické izolace (isolation by distance) u linie 1-5 (**Obr. 5**). Hostitelsky specifická je především Linie 4, která vykazuje silnou afinitu k hostitelům rodu *Microtus* (druhy *Microtus agrestis* a *Microtus arvalis*). Tato linie pochází ze širokého území České republiky i Slovenska, tudíž není geograficky specifická. Je bohatá na haplotypy a velice dobře prosbíráná: je patrné, že v síti chybí pouze málo haplotypů. Obraz této linie je tedy velmi kompletní a lze jej považovat za věrohodnou prezentaci populace. Je charakteristický vysokým počtem haplotypů a široce rozvětvenou sítí. Geograficky specifické jsou bazální linie

kladogramu (Linie 2 a 3) (**Obr. 3**), které se nachází v západní oblasti České republiky (lokality Litvínov a Klabáň) a jsou od zbytku kladogramu odděleny hranicí (**Obr. 4**). Tyto dvě bazální skupiny tvoří severozápadní linii v populaci vší rodu *Hoplopleura*. Linie 2 není bohatá na haplotypy, jelikož je sesbírána z malého území (Litvínov) a pochází z hostitelů *Microtus arvalis* a *Microtus agrestis* (**Obr.5**). Linie 3 není hostitelsky specifická. Nachází se u hostitelů *Microtus arvalis*, *Microtus agrestis* a *Myodes glareolus* a pochází ze dvou lokalit Litvínov a Klabáň (**Obr.5**). Linie 5 je geograficky specifická, pochází z menšího území na Slovensku a tvoří jihovýchodní linii oddělenou hranicí. Je chudší na haplotypy, jelikož i při opakovaných sběrech z různých hostitelů se zde objevují stále stejné haplotypy. Linie 5 je propojena do jedné sítě s Liníí 4, vzdálenost mezi nimi je poměrně veliká, jelikož v síti chybí mnoho haplotypů. Je pravděpodobné, že by se síť zaplnily chybějícími haplotypy, pokud by se provedly sběry i v území mezi lokalitami Liníí 4 a 5. Linie 1 je hostitelsky specifická, nachází se na hostiteli *Myodes glareolus*, je na bázi kladogramu a vyčleňuje se od ostatních linií, jelikož se pravděpodobně jedná o jedince druhu *Hoplopleura edentula*.

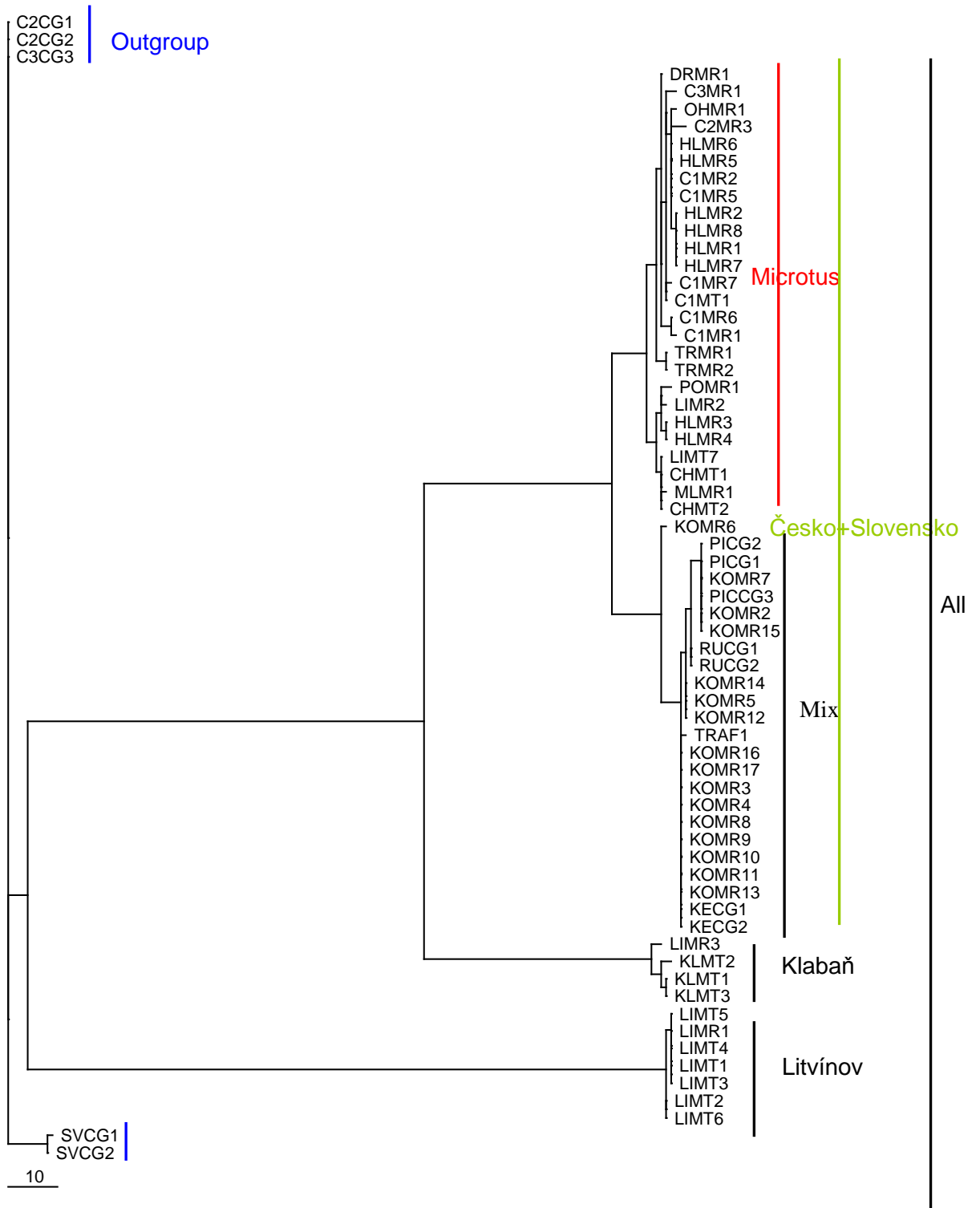
Obr. 5: Haplotypová síť populace *Hoplopleura* linií 1, 2, 3, 4, 5. Velikost haplotypů odpovídá počtu vzorků. Geografický původ vzorků je uveden v **Tab.2**.



4.4 DNASP a BEAST

Analýzy byly provedeny pro 7 různých populací (pracovně označeny: All, Česko+Slovensko, Litvínov, Klabaň, Ingroup, Mix, Microtus, viz. **Obr.6**). Genetická variabilita, hodnoty nukleotidové i haplotypové diverzity jednotlivých linií jsou znázorněny v **Tab. 4**. Jediný signifikantní výsledek v testech na neutralitu vykazuje linie *Microtus* (**Tab. 4**). Skyline plot pro linii *Microtus* vytvořený v programu BEAST naznačuje mírný nárůst populace (viz. **Obr. 7**).

Obr. 6 : Rozdělení linií pro analýzy v programu DNASP.



Tab. 4 : Výsledky testu neutrality

linie	n	S	Hd	π	Tajima	Fu's Fs	Fu D	Fu F	R2	Ragg	Theta per site
All	60	114	0,942	0,0454	-0,08386	2,602	0,92609	0,6393			0,04652
Outgroup	5	9	0,7	0,00954	1,44761	2,385	1,44761	1,52181			0,00793
Litvínov	7	1	0,476	0,00088	0,55902	0,589	0,95346	0,91788			0,00075
Klabaň	4	7	0,833	0,00673	-0,38921	1,031	-0,38921	-0,37908			0,00701
Česko+Slovensko	50	34	0,926	0,01378	-0,03563	-3,554	-1,51054	-1,17047	0,1039	0,0287	0,01393
Mix	24	9	0,732	0,00312	-0,96669	-0,425	-1,90302	-1,89214	0,1305	0,1344	0,00442
Microtus	26	20	0,948	0,00653	-1,15	-7,979	-1,64078	-1,74389	0,0773*	0,0215*	0,00962

n.....počet sekvencí

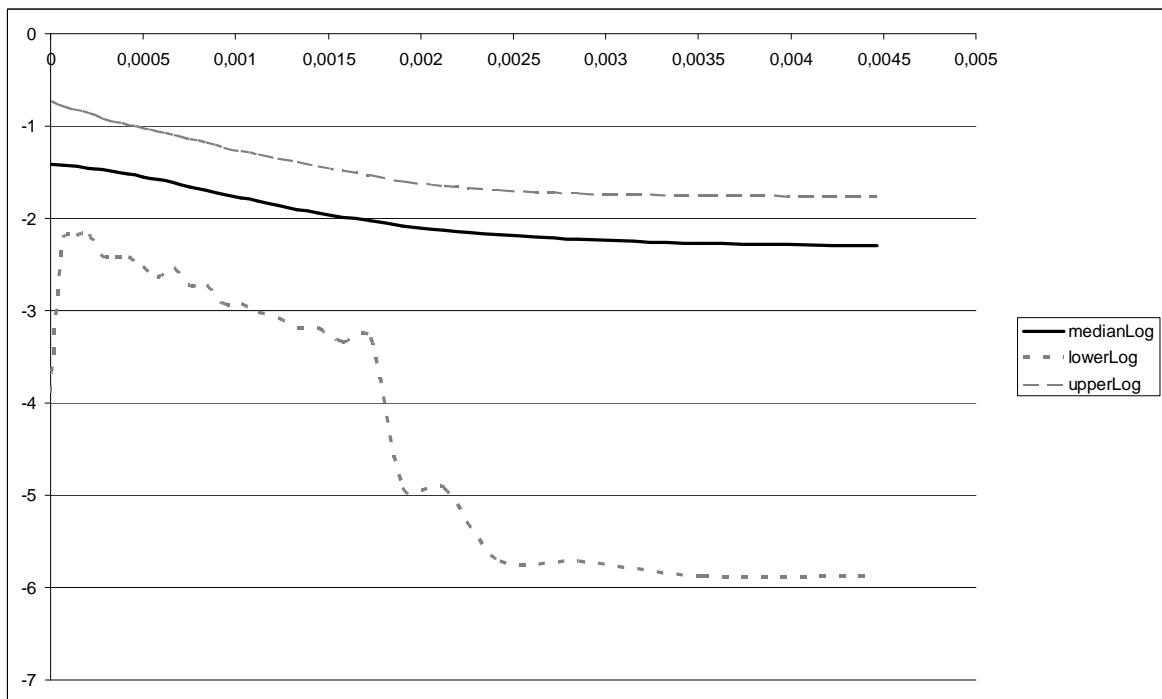
S.....počet segregačních míst

Hd....haplotypová diverzita

πnukleotidová diverzita

*****.....signifikantní hodnoty

Obr. 7: Skyline plot pro linii Microtus vytvořený v programu BEAST



5. Diskuze

Výsledkem molekulárních analýz sekvencí COI z 66 jedinců vší rodu *Hoplopleura* bylo 5 oddělených linií, které se vzájemně lišily v hostitelské specifitě a geografické distribuci. Genealogické vztahy vší rodu *Hoplopleura* byly nejspíše ovlivněny hostitelskou specifitou k jednotlivým druhům hostitelů. Hostitelsky specifická je především Linie 4, která vykazuje silnou afinitu k hostitelům rodu *Microtus* (druhy *Microtus agrestis* a *Microtus arvalis*). Geograficky specifické jsou bazální linie kladogramu (Linie 2 a 3), které se nachází v západní oblasti České republiky a jsou od zbytku kladogramu odděleny hranicí. Tyto dvě bazální skupiny tvoří severozápadní linii v populaci vší rodu *Hoplopleura*. Linie 5 je geograficky specifická, pochází z menšího území na Slovensku a tvoří jihovýchodní linii oddělenou hranicí. Linie 1 je hostitelsky specifická, nachází se na hostiteli *Myodes glareolus*, je na bázi kladogramu a vyčleňuje se od ostatních linií, jelikož se pravděpodobně jedná o jedince druhu *Hoplopleura edentula*.

Analýza v programu Geodis ukázala, že v populacích vší nedochází k vytváření žádné zřetelné vazby mezi genetickou strukturou a geografickým rozšířením. Pouze v případě linie 1-5, která je součástí linie *Microtus*, došlo podle nested clade analýzy k omezení toku genů v důsledku geografické izolace (isolation by distance). Existují zde pravděpodobně určité genetické bariéry. Jelikož se jedná o malou skupinu, nemůžeme vyvodit příčinu, díky níž v evoluci k této změně došlo. Hvězdčovitý tvar sítě linie 1-5 je typický vzor pro expanzi a populační explozi, což potvrdily i populační analýzy v programu DNASP. Byla vyhodnocena genetická variabilita jednotlivých linií a provedeny testy neutrality. Testy na neutralitu ukazují jediný signifikantní výsledek u linie *Microtus*. Znamená to, že je u této linie buď narušena neutralita - je pod selekcí, nebo jde o změnu velikosti populace. Selekcí je možné vyloučit, jelikož jde o gen cytochromoxidázy COI. Je tedy pravděpodobnější, že se jedná o změny velikosti populace. Tuto hypotézu potvrdil i výsledný skylineplot z programu Beast pro linii *Microtus*, který naznačuje mírný nárůst velikosti populace.

Z výsledků vyplývá, že ve fylogenetických vztazích vší rodu *Hoplopleura* existuje jistý patern, který ukazuje určité zákonitosti a je dán specifitou jednotlivých linií (např. linie hostitelsky specifická, parazitující pouze na hostitelích druhu *Microtus*, linie geograficky specifická, vyskytující se pouze na Slovensku, dvě linie na bázi tvořící severozápadní linii). Důležitým poznatkem je, že zde existují hranice, které dělí populaci

vší rodu *Hoplopleura* na severozápadní a jihovýchodní větev, což je obecný patern u mnoha organismů v Evropě. Je zajímavé, že tyto hranice se vyskytují přibližně ve stejném území jako u vší rodu *Polyplax serrata* parazitujících na myšicích rodu *Apodemus* (Štefka a Hypša, 2008). Autoři ve své práci studovali genealogii, populační strukturu a populační dynamiku 126 jedinců vší *Polyplax serrata*. Výsledkem fylogenetických analýz evropských haplotypů byly 3 jednoznačně oddělené linie A, B a C. Linie A pocházela ze širokého geografického území (z východního Slovenska, České republiky, Skotska a Francie) a nacházela se u hostitelů *Apodemus sylvaticus* a *Apodemus flavicollis*. Linie B pocházela převážně z Čech a z jedné lokality na Slovensku a je hostitelsky specifická, parazituje na hostiteli *Apodemus flavicollis*. Linie C byla geograficky specifická, nacházela se pouze na východě Slovenska a tvořila jihovýchodní linii populace. Je patrné, že v populaci vší *Polyplax serrata* existují hranice dělící populaci na severozápadní a jihovýchodní linii (Štefka a Hypša., 2008). Hranice oddělující linie vší *Polyplax serrata* se svou polohou shodují s hranicemi v populaci vší rodu *Hoplopleura* vycházející z výsledků této práce.

6. Závěr

Byla zjištěna genealogická struktura populace vší rodu *Hoplopleura* parazitujících na hostitelích *Microtus arvalis*, *Microtus agrestis*, *Myodes glareolus* a *Apodemus flavicollis*. Ze vzorků vší rodu *Hoplopleura*, které se podařilo osekvenovat byla vytvořena matice a zalignována, kde všechny sekvence byly zkráceny na délku 581bp. Fylogenetické analýzy byly provedeny v programech PAUP a Phym. Populační analýzy byly provedeny v programu DNASP. Haplotypová síť byla vytvořena v programu TCS a nested clade analýza v programu Geodis. Z výsledků vyplývá, že v populační struktuře vší rodu *Hoplopleura* existuje patern, který ukazuje na zákonitosti a specifičnosti jednotlivých linií. V populaci vší rodu *Hoplopleura* existují hranice, dělící vší na severozápadní a jihovýchodní větev. Tyto hranice se vyskytují přibližně ve stejném území jako se prokázaly u vší rodu *Polyplax serrata*. Tato práce ukazuje zatím jen orientační patern, díky němuž je jasně vidět, že zde existují určité zákonitosti, které mohou být do budoucna s doplněním informací z dalších sekvencí lépe objasněny.

7. Seznam použité literatury

Anděra M., Horáček I., 2005: Poznáváme naše savce. 2. vydání. Sobotáles, Praha.

Beaucournu, J. C., 1966. *Hoplopleura edentula* Fahrenholz, 1916 (Anoplura), parasite spécifique de *Clethrionomys glareolus*, est une bonne espèce. Acta Parasit. Polon. 14: 127 - 131.

Buzan, E., V., Forste, D., W., Searle, J., B., Kryštůfek, B., 2010. A new cytochrom b phylogroup of the common vole (*Microtus arvalis*) endemic to the Balkans and its implications for the evolutionary history of the species. Society 788 - 796.

Clement, M., Posada, D., Crandall, K. A., 2000. TCS: Computer program to estimate gene genealogies. Mol. Ecol. 9, pp. 1657 - 1659.

Deffontaine, V., Libois, R., Kotlík, P., Sommer, R., Nieberding, C., Pradis, E., Searle, J. B., Michaux, J. R., 2005. Beyond the Mediterranean Peninsulas: Evidence of Central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). Molecular Ecology 14: 1727 - 1739.

Drummond A. J., Rambaut A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. Molecular Evolutionary Biology 7, 214.

Emerson, B.C., Paradis, E. and Thébaud, C. 2001. Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. Trend Ecol. Evol., 16: 707 - 716.

Flegr, J., 2005. Evoluční biologie, Academia.

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

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

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.

Hafner, D. J., 1981. Evolution and historical zoogeography of antelope ground squirrels, genus *Ammospermophilus* (Rodentia: Sciuridae), The University of New Mexico, Albuquerque, 255 pp.

Hafner, M. S. , Sudman , P. D., Villablanca, F.X., Spradling, T.A., Demastes, J.V., Nadler, S.A. 1994. Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. Science, 365, 1087 - 1090.

Jaarola, M., Martínková, N., Gündüz I., Brunhoff, C., Zima, J., Nadachowski, A., 2004. Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* inferred from mitochondrial sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 33:(3): 647 - 663.

Kohn, M., Štěřba, J., 1987. A comparison of some diagnostic features of *Hoplopleura acanthopus* and *Hoplopleura edentula* (Anoplura: Hoplopleuridae) under scanning electron microscope. Folia Parasitologica 34: 183 - 187, 1987.

Kotlík, D., Deffontaine, V., Mascheretti, S., Zima, J., Michaux, J. R., Searle, J. B., 2006. A northern glacial refugium for bank voles (*Clethionomys glareolus*). P Natl Acad Sci USA 103(40): 14860 - 14864.

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

Posada, D., Crandal, K.A., Templeton, A.R., 2000. GeoDis : a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. Mol. Ecol. 9, 487 - 488.

Posada, D., 2006. Collapse : describing haplotypes from sequence alignments, <http://darwin.uvigo.es/software/collapse.html>

- Reed, D. L., Smith, V. S., Rogers, A. R., Hammond, S. L., Clayton, D. H., 2004. Molecular genetic analysis of human lice support direct contact between modern and archaic humans. *PloS – Biology* 2 (11): 340.
- Rieseberg, L.-H., Burke, J. M., 2001. The biological reality of species: gene flow, selection and collective evolution: *taxon* 50, 47 - 67.
- Rybovský, J., Řičánková, V., Zrzavý, J., 2008. Phylogeny of Arvicolinae (Mammalia, Cricetidae): utility of morphological and molecular data sets in a recently radiating clade. *Zool Scr* 37(6): 571 - 590.
- Swofford, D.L., 2002. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods)*, Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Su, H., Qu, L.-J., He, K., Zhang, Z., Wang, J., Chen, Z., Gu, H., 2003. The Great Wall of China: a physical barrier to gene flow?, *Heredity* (2003) 90, 212 - 219.
- Štefka, J., Hypša, V., 2008. Host specificity and genealogy of the louse *Polyplax serrata* on field mice, *Apodemus* species: A case of parasite duplication or colonisation? *International Journal for Parasitology* 38: 731 - 741.
- Štefka, J., Hypša, V., Scholz, T., 2009. Interplay of host specificity and biogeography in the population structure of a cosmopolitan endoparasite: microsatellite study of *Ligula intestinalis* (Cestoda). *Mol. Ecol.* 18: 1187 - 1206.
- Thomson, J. D., Higgins, D. G., Gibson T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap, penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, pp. 4673 - 4680.
- Volf, P., Horák, P., 2007. *Paraziti a jejich biologie*, Olympia.
- Webb, T., Bartlein, P. J., 1992. Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic responses. *Annual Reviews of Ecology and Systematic*, 23, 141-173.