

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Diverzita MHC alel a parazitace v populacích
drobných hlodavců**

Diplomová práce

Bc. Lukáš Vejsada

Školitel: doc. RNDr. Jan Štefka, PhD

Školitel – konzultant: Mgr. Jakub Vlček

České Budějovice 2017

Diplomová práce:

Vejsada L., 2017, Diverzita MHC alel a parazitace v populacích drobných hlodavců. [The diversity of MHC alleles and parasitism in populations of small rodents, Master Thesis in Czech] – 62 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This thesis provides an assesment of the patterns of parasitism and population diversity of MHC alleles in arvicolid rodents. Then the connection between MHC diversity and ectoparasite infection is evaluated.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval 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 § 47b 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

13. 12. 2017

Obsah

Úvod.....	1
1.1 Role a struktura molekul hlavního histokompatibilního systému.....	3
1.2 Genetická variabilita MHC	7
1.3 MHC polymorfismus a přírodní selekce	9
1.4 Funkční význam variability MHC v divokých populacích.....	13
1.4.1 Alelická variabilita a její vliv na parazitaci v populacích hlodavců	15
2 Cíle práce.....	18
3 Materiály a metodika	19
3.1 Výběr vzorků.....	19
3.2 Identifikace endoparazitů, ektoparazitů a zjištění jejich prevalence v jednotlivých populacích	21
3.3 Izolace DNA.....	22
3.4 PCR a modifikace pro NGS platformu	22
3.5 Analýza sekvenčních dat.....	23
4 Výsledky.....	25
4.1 Parazitologická analýza populací	25
4.2 Analýza MHC sekvencí	29
4.2.1 Fylogenetická analýza MHC sekvencí	30
4.2.2 Selektce.....	32
4.3 Korelace mezi alelami a parazity	32
5 Diskuze	35
6 Závěr.....	38
7 Zdroje	40
Přílohy.....	49

Poděkování

Rád bych poděkoval doc. RNDr. Janu Štefkovi, Ph.D. za odborné vedení a trpělivost.
A Mgr. Jakubu Vlčkovi za cenné rady a pomoc s počítačovými programy. Bez nichž by tato práce nemohla vzniknout.

Úvod

Parazitologické analýzy populací drobných hlodavců mají pozornost vědecké komunity již téměř 80 let. Mimo studie zabývající se ekologickými faktory vztahu hostitel-parazit, kompetice mezi patogeny, životními cykly parazitů a vektorovém působení hostitelů pro šíření infekčních onemocnění typu boreliózy či meningitidy. Byli a jsou tyto studie důležité i z hlediska porozumění vztahu mezi imunitním systémem, konkrétně hlavním histokompatibilním komplexem (dále jen MHC) a obrannými mechanismy parazitologické fauny. Většina studií se proto zaměřuje právě na variabilitu MHC genů a vlivu, který mají jednotlivé alely na fitness populací a jedinců.

MHC je součást imunitního systému vyskytujícího se v těle obratlovců, která zodpovídá za rozpoznávání cizorodých peptidů (antigen) díky velmi vysoké variabilitě v místě vázající antigen (dále jen ABS) na povrchu molekul MHC. Tato variabilita je pak přímo spojená s geny MHC, jejichž lokusy, konkrétně lokus MHC DRBII, kódují proteiny pro tvorbu MHC molekul. Lokusy se mohou vyskytovat v mnoha alternativních formách (alelách). A právě tyto alely jsou stěžejním bodem ve studiích zaměřujících se na problematiku MHC variability. Důležitou otázkou zde zůstává, jakým způsobem se tyto alely udržují v populacích navzdory genetickému driftu a negativní selekci. Teorie podporující udržování vysokého polymorfismu MHC v genových fondech populací jsou ve většině případů založeny na vztahu parazit-hostitel. Patří mezi ně výhoda heterozygota (overdominant selection), negativně frekvenčně závislá selekce, sexuální selekce a mezidruhový polymorfismus. Všechny tyto typy budou detailněji přiblíženy v první, teoretické části práce. Stejně jako současné povědomí o vztahu alelické různorodosti a jejím vlivu na parazitaci populací.

Druhá část této práce vykazuje především statistickým zhodnocení parazitického zamoření v Evropských populacích jedinců čeledi Arvicolinae. Přičemž se soustředí především na ektoparazitické zamoření populací ve vztahu k variabilitě MHC genů a zjištění působení selekčního tlaku. Cílem této práce je provést analytický rozbor parazitického zatížení ve vybraných populacích drobných hlodavců (druhů *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Microtus agrestis*) a prozkoumání jejich MHC diverzity. Mezi dílčí cíle patřilo získání dat o ektoparazitech v daných populacích, charakterizovat diverzitu alel lokusu MHC DRBII v populacích a jedincích zvolených druhů a následně

porovnat epidemiologická data (míra infestace) s diverzitou MHC alel s cílem odhalit případnou závislost.

1.1 Role a struktura molekul hlavního histokompatibilního systému

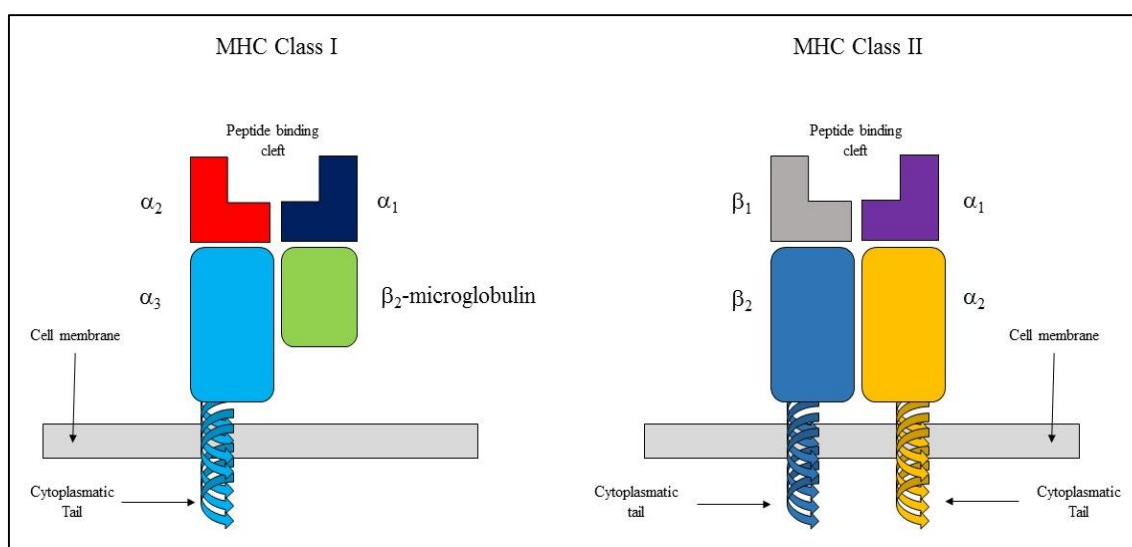
V imunitním systému savců nalezneme dvě důležité části. Jednou z nich je vrozený imunitní systém, poskládaný z mnoha funkčně odlišných modulů, poskytujících různé druhy obrany proti patogenům. Druhou částí je pak myšlen adaptivní imunitní systém, poskytující obranu na bázi vazby mezi antigenem a molekulou hlavního histokompatibilního komplexu (Medzhitov, 2007).

Pro správnou funkci adaptivního imunitního systému jsou třeba, především molekuly MHC I a MHC II, které se podílejí na prezentaci antigenu cytotoxickým T-lymfocytům (dále jen CD8⁺) a pomocným T-lymfocytům (dále jen CD4⁺), (Bellocq a Charbonnel, 2008).

Struktura MHC molekul je tvořena ze dvou imunoglobulinových domén, na které paralelně nasedají dvě α -šroubovice uložené v prostorovém uspořádání β -skládaného listu (Rock a spol., 2016). Grafické znázornění je možné vidět na obrázku (Obr. 1). Heterodimerová molekula MHC I se skládá ze dvou polypeptidických řetězců složených ze čtyř regionů. Prvním je α -řetězec, neboli těžký řetězec obsahující tři extracelulární domény a to $\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\alpha 3$, trans-membránový region a cytoplasmatická doména navázaná na karboxylovém konci. Druhým řetězcem je pak lehká $\beta 2$ -mikroglobulinová podjednotka, která je připojena k $\alpha 3$ doméně těžkého řetězce nekovalentní vazbou a obsahuje pouze jednu doménu (Hughes a Yeager, 1998; Rammensee a Falk, 1993). β -řetězec hraje také klíčovou roli pro stabilitu MHC molekuly (Penn, 2002). Nejvýznamnější částí struktury molekuly MHC I je žlábek, jinak také známý jako vazebné místo antigenu/peptidu (dále jen PBS), stojící na vrcholu. PBS je formováno dvěma α -šroubovicemi a ohraničeno strukturou β -skládaného listu (Hughes a Yeager, 1998). Peptidy se zdají být nedílnou součástí proteinového komplexu, protože prázdná molekula MHC I je značně nestabilní. Peptid o délce kolem 8 až 10 aminokyselin se těsně naváže na PBS v rozšířené konfiguraci s konci a takzvanou „kotvou“ ze zbytků zanořenou ve specifických kapsách (Rudolph a Stanfield, 2006). PBS navazuje peptid skrze konzervované zbytky přes vodíkové můstky, které se uchytí na jeho karboxylových a aminokyselinových koncích (Rammensee a Falk, 1993). Přesněji řečeno tyto dva postranní řetězce se navazují v určitých polohách peptidu a to jeden právě na

karboxylovém konci a druhý jinde, u něj záleží na MHC alele, které určí specifické kapsy u PBS (Rammensee a Falk, 1993). Takto navázaný peptid je pak dostupný pro interakci s CD8⁺ (Rudolph a Stanfield, 2006). Peptidické vazebné místo se skládá z pěti kapes, do kterých pasují postranní řetězce peptidických zbytků (Hughes a Yeager, 1998).

Struktura MHC II molekul je složena ze dvou nekovalentně navázaných polypeptidických řetězců (α a β) a extracelulárních regionů. Oba řetězce mají jednu transmembránovou sekvenci obsahující vodíkové můstky, kterými jsou molekuly zanořené v buněčné membráně, vysoce konzervovanou α_2 a β_2 doménu, kde se vážou CD4⁺ a vysoce variabilní PBS region zformovaný z α_1 a β_1 domén (Jones a spol., 2006), (Mayer a Nyland, Immunology chapter 10, [online]). Stejně jako v případě MHC I, i zde je PBS místem s největší variabilitou a je formován se základnou β -skládaného listu a dvěma stěnami zformovaných z α -šroubovic. PBS u MHC II je otevřené na jednom konci tak, aby mohl navázat delší peptidy o délce od 13 do 25 aminokyselin s některými aminokyselinami mimo PBS. Jaký peptid bude PBS vázat, závisí především na vlastnostech aminokyselin, které jsou součástí PBS (Jones a spol., 2006), (Mayer a Nyland, Immunology chapter 10, [online]).

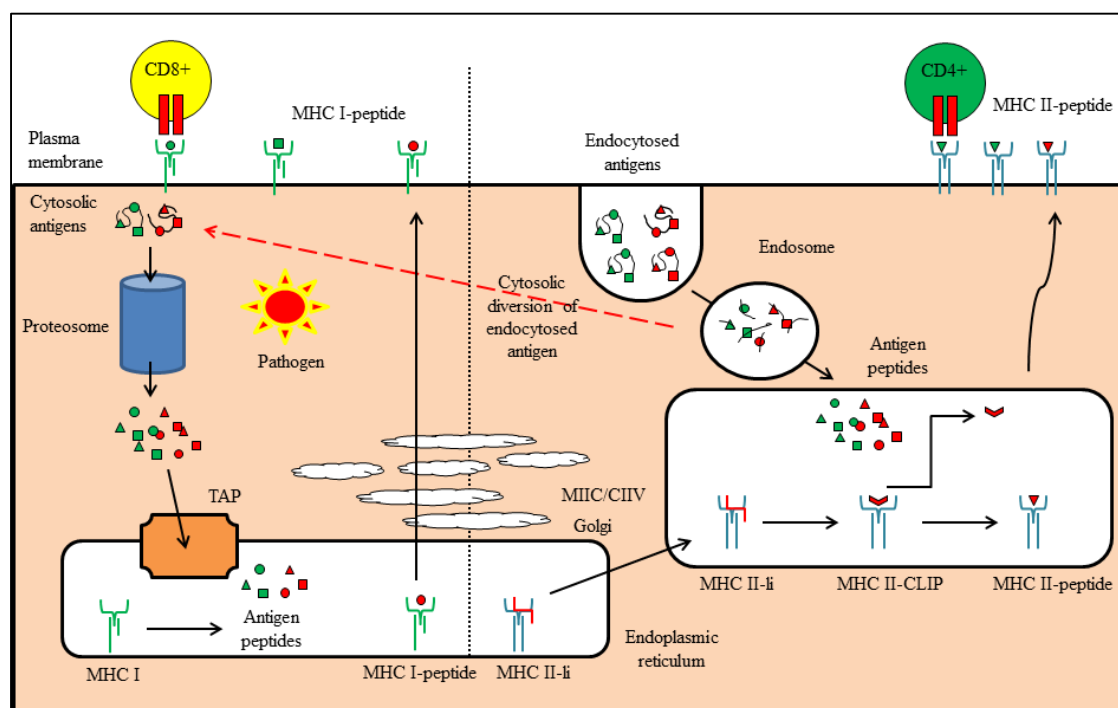


Obr. 1: Struktura molekul MHC I a MHC II (převzato z Penn, 2002).

Zásadním faktorem pro správnou funkci buněčné imunitní odpovědi jsou lymfocyty, které vznikají při hematopoéze v kostní dřeni a cirkulují v krvi, či se usazují v lymfatických orgánech. B-lymfocyty dozrávají v kostní dřeni a nesou na sobě protilátkovou molekulu sloužící jako receptor pro antigen. Po navázání antigenu B-lymfocyty začínají proliferovat a diferencují se na paměťové a plazmatické buňky. Plazmatické buňky následně začnou vytvářet protilátky (Gitlin a Nussenzweig, 2015). T-lymfocyty na rozdíl od B-lymfocytů dozrávají v brzlíku, kde se podrobují přísné selekci, až 95% z nich je eliminováno, či inaktivováno. Dělí se na dvě subpopulace $CD4^+$ a $CD8^+$. Vysoká diverzita je zajištěna náhodným přeskupováním genů T-buněčných receptorů (dále jen TCR). Pouze T-lymfocytům, které jsou schopné rozpoznat své vlastní MHC peptidové komplexy, je dovoleno vstoupit do cirkulace a to z důvodu nebezpečí autoimunitního onemocnění (Heath a Carbone, 2001).

Molekuly MHC I se nacházejí téměř na všech buňkách, kromě erytrocytů (Penn, 2002). Peptidy prezentované MHC I molekulami, pochází především z endogenně syntetizovaných proteinů. Tyto proteiny jsou následně štěpeny na peptidy za pomoci proteolytického komplexu (Heath a Carbone, 2001). Proteozomy se vyskytují u všech organismů a u savců jsou kódovány dva důležité proteozomy uvnitř MHC II regionu, jedná se o LMP2 a LMP7 (low molecular mass polypeptide). Následuje přesun rozštěpených peptidů do endoplasmatického retikula skrze dimerické antigenní transportéry (dále jen TAP), kde se utvoří komplex složený z MHC I molekuly, β_2 -mikroglobulinu a peptidu, který je transportován na povrch buňky. Pokud je peptid z vlastních proteinů buňky, $CD8^+$ díky přísné selekci, kterou podstoupily v brzlíku, na peptid nereaguje (Heath a Carbone, 2001), (Hughes a Yeager, 1998). Každý $CD8^+$ má vlastní unikátní TCR vybrané tak, aby na vlastní peptidy nereagovaly (Penn, 2002). Pokud je však buňka napadena, ať už virem, nebo vnitrobuněčným parazitem, pak se některé z proteinů rozštěpených proteozomy naváží na MHC I molekuly a vytvoří tak komplex, který se objeví na povrchu buňky, kde se střetnou s $CD8^+$. Mimo TCR má každý $CD8^+$ také adhezivní molekulu CD8 zajišťující stabilitu interakce mezi T-lymfocyty a buňkami prezentujícími peptid (Penn, 2002). Po rozpoznání cizího peptidu se T-lymfocyt aktivuje a spustí cytotoxickou reakci, která buňku zabije (Hughes a Yeager, 1998).

MHC II molekuly jsou exprimovány na specializovaných buňkách jako jsou antigen prezentující buňky typu makrofágů, dendritických buněk, B-lymfocytů a Langerhansových buněk. Z toho důvodu mají mnohem omezenější expresi než MHC I molekuly. MHC II prezentují peptidy T_H buňkám, jejichž role spočívá v aktivaci B-lymfocytů a makrofágů. (Penn, 2002). MHC II molekuly prezentují proteiny, které do buňky vstoupily endocytickou cestou. Při svém dozrívání v endoplasmatickém retikulu tvoří komplex s invariantním řetězcem na obrázku (Obr. 2) znázorněném jako (MHC II-li), který zabraňuje navázání peptidu do PBS MHC II molekuly (Heath a Carbone, 2001). Komplex následně cestuje skrze Golgiho, kde je invariantní řetězec degradován na MHC II/CLIP a poté MHC II molekula naváže antigenní peptid, který je transportován na povrch buňky, kde interaguje s CD4⁺ (Heath a Carbone, 2001), (Hughes a Yeager, 1998).



Obr. 2: Procesy prezentace antigenních peptidu u MHC I a MHC II molekul (převzato od Heath a Carbone, 2001).

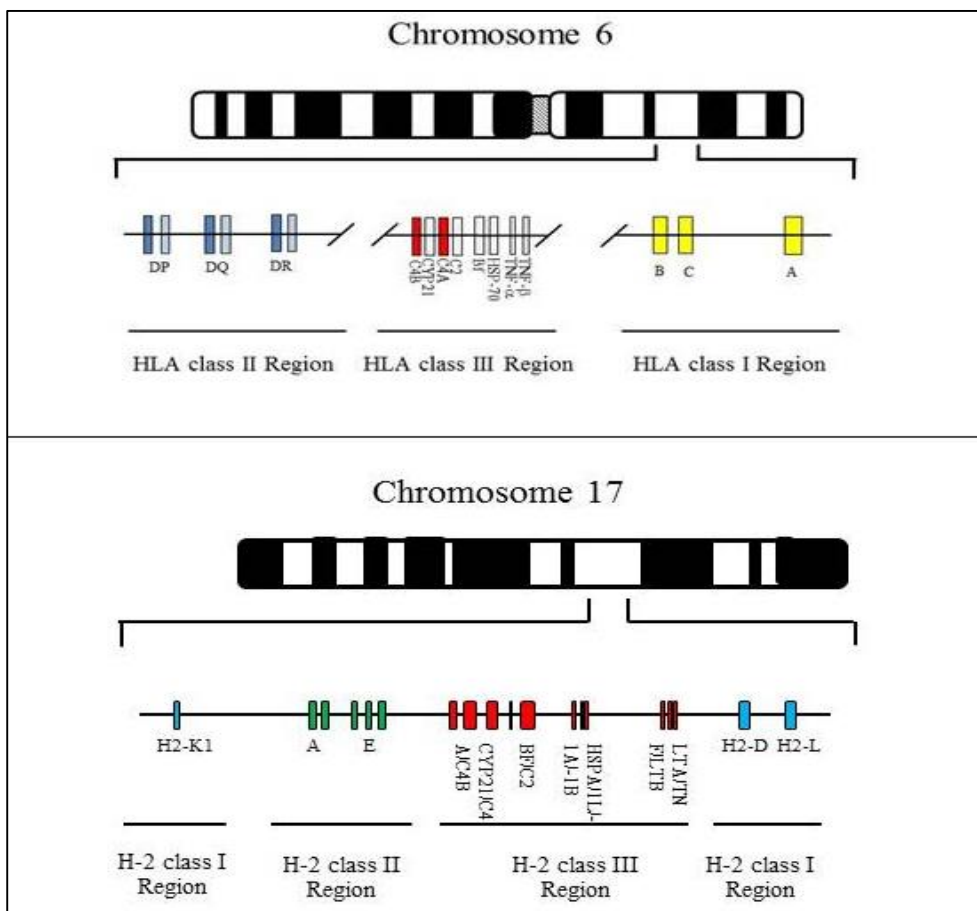
Glykoproteiny tvořící MHC molekuly jsou kódovány MHC geny, které se nacházejí na poměrně velkém chromozomálním regionu o velikosti 200 lokusů u lidí se tento region nachází na šestém chromozomu u myši pak na sedmáctém (Bellocq a Charbonnel, 2008). Tento region však nenese pouze MHC geny, ale také velké množství

jiných genů, ovlivňujících růst, vývoj, reprodukci, pach a čich (Penn, 2002). Lokusy kódující MHC molekuly mají mnoho alternativních forem (alel) jednoho genu a z toho důvodu jsou, velmi polymorfické. Ve skutečnosti patří mezi nejvíce polymorfické geny u vyšších obratlovců. Tento polymorfismus se následně projevuje u MHC molekul v PBS při zachycení a prezentaci antigenu (Babik a Radwan, 2007).

1.2 Genetická variabilita MHC

Region zodpovědný za kódování α -řetězců se nachází u lidí na šestém chromozomu u myši je pak tento region přítomen na chromozomu sedmnáctém (Penn, 2002). Na těchto chromozomech se u lidí vyskytuje polymorfická třída Ia lokusů označovaná jako HLA komplex (HLA-A, HLA-B a HLA-C), kde se nachází geny s mnoha variantami alel. Podobně je to u myši, kde se nachází H-2 komplex s kódujícími lokusy K, D, L (Hughes a Yeager, 1998). H-2 region u myši se svou organizací genů podobá lidskému HLA, H2 region se nachází mezi geny H2-K a pgk-2 a lidský HLA region mezi PGE-2 a DQA, bližší seznámení s příslušnými lokusy a regiony, pak můžete vidět na obrázku (Obr. 3), (Klein, 1986).

Na H-2 regionu se vyskytuje přes 60 genů, mimo geny MHC I a MHC II třídy zodpovědné za prezentaci antigenu, zde můžeme najít geny MHC III třídy. Geny třídy MHC III zahrnují složky komplementu, hydroxylázu, tumor necrosis factor (dále je TNF α či β) a proteiny tepelného šoku (Uehara et al., 1992). Další důležité složky MHC molekul jako β 2-mikroglobulin je kódován mimo MHC komplex, u lidí na patnáctém chromozomu. Mezi β 2-mikroglobulinem a MHC I α -řetězcem a MHC II molekulami je zaznamenán vzdálený evoluční vztah, ale tento lokus nevykazuje žádnou známku polymorfismu (Hughes a Yeager, 1998). Diverzita MHC je patrná jak uvnitř druhu, tak mezidruhově. Vnitrodruhové – haplotypové variace probíhají na dvou úrovních, tou jednou je obrovská variabilita u alel MHC I a MHC II a u té druhé se jedná o změnách počtu celých lokusů (Stroynowski, 1990).



Obr. 3: Rozdělení MHC lokusů na 6 (lidském) a 17 (myším) chromozomu (převzato a upraveno od Relle a Schwarting (2012)).

Hlavním projevem MHC variability je kódování proteinů v PBS, kde nalezneme vysoké množství nesynonymních substitucí (Hughes a Nei, 1989). Za procesy předcházející expresi aminokyselin v PBS jsou zodpovědné především výše zmíněné regiony H-2 u myši a HLA u lidí. Působnost MHC genů se ovšem neomezuje pouze na imunitní adaptivní systém, ale ovlivňuje i další životně důležité procesy. Mezi nimi kupříkladu geny ovlivňující růst a rozmnožování (Penn, 2002). Podle T. J. Gill III a spol., (1994) jeden z regionů úzce spojený s MHC ovlivňuje právě růst, rozmnožování a rezistenci vůči rakovině. U *Rattus* se jedná o region označovaný jako růstový a rozmnožovací komplex (growth and reproduction complex, dále jen grc). Mnoho podobných vlastností vykazují t-haplotypy u *Mus musculus*, avšak na rozdíl od grc narušuje tento region segregaci a tlumí rekombinaci. Další důležitou funkcí MHC genů je rozpoznávání pachů, na základě čehož, pak může docházet k výběru partnera.

O funkčním významu rozpoznání pachů na základě MHC variability je několik hypotéz, zakládajících se výběru partnera skrze zvýšenou heterozygotnost u potomstva či zajistit větší šanci na kombinaci alel vhodných k přežití v daném ekosystému s rychle se vyvíjejícími parazity. Třetí hypotéza je založena na vyhnutí se inbreedingu, který může mít vážné následky pro fitness potomstva (Millinsky a spol., 2006).

1.3 MHC polymorfismus a přírodní selekce

MHC systém je součástí imunoglobulinové multigenní super-rodiny, s níž sdílí procesy duplikace genu, funkční rozdílnost duplikovaných genů, a umlčení (silencing) duplikovaných genů prostřednictvím mutace a delece pouze určitých genů, což může v průběhu evoluce vést k obrácení lokusu a mezi-lokusové rekombinaci (Penn, 2002; Hughes a Yeager, 1998). Vysoký stupeň polymorfismu lokusech MHC je udržován kombinací dvou protichůdných sil a to balancující selekcí a genetickým driftem. Právě stochasticky působící genetický drift společně s rekombinací je zodpovědný za dlouhotrvající mezidruhový polymorfismus a homogenizaci intronů, vzhledem k exonům. Také působí proti balancující selekci a to zejména v malých populacích, případně v populacích, kde došlo k náhlému zmenšení genofondu (Nei a spol., 1997; Miller a Lambert, 2004). Nicméně i přes toto působení zůstává polymorfismus v MHC genech udržován na vysoké míře. Dvě nejpřekládanější hypotézy o mechanismech balancující selekce jsou heterozygotní výhoda (heterozygote advantage) a frekvenčně závislá selekce (frequency-dependence selection), (Sommer, 2005).

Heterozygotní výhoda je mechanismem balancující selekce, která funguje na předpokladu, že heterozygot má díky vyššímu počtu alel větší šanci na včasnou imunitní odpověď než homozygot (Doherty a Zinkernagel, 1975). Avšak musíme si vymežit rozdíl mezi termíny dominance a overdominance. Termín dominance se odkazuje na heterozygoty, které mají stejnou odolnost jako nejodolnější homozygoti. V tomto případě heterozygotní výhoda může pouze maskovat alely citlivé na parazitní zátěž z okolí (Gould a spol., 2004). Naproti tomu overdominance by měla vykazovat lepší fitness a větší odolnost proti parazitární zátěži, než jejich předchozí homozygotní generace a to z důvodů uvedených na začátku odstavce (Hughes a Nei, 1992). V důsledku mechanismu, na základě kterého funguje heterozygotní výhoda, byly stanoveny dva modely. Symetrická overdominance je modelem u kterého se předpokládá, že všechny

heterozygoti dávají podobnou výhodu, před homozygoty. Naproti tomu stojí model s divergentní alelou, u kterého se uvažuje o možnostech přenosu většího množství alelických sekvencí a s tím spojeným širším spektrem rozlišení parazitů (Takahata, 1990; Wakeland a spol, 1990). Ačkoliv se může zdát, že vyšší míra variability je pro organismus pouze přínosem, je zde možnost výskytu autoimunitního onemocnění, které může vést ke snížení fitness jedince a nakonec zapříčinit i smrt (Sommer, 2005).

Druhým významným mechanismem je frekvenčně závislá selekce, u nichž se vychází z předpokladu, že jedinci v populaci disponující vzácnou sadou alel se úspěšně vyhýbají parazitické zátěži ve svém ekosystému. Kdežto jedinci s běžnou sadou alel jsou snadným cílem parazitace (Clarke a Kirby, 1966). V populaci jsou tedy pak více parazitováni jedinci s běžnou sadou alel, což vede ke snížení jejich fitness a následně může zapříčinit i jejich úhyn. Na druhou stranu, tím, že jsou jedinci se vzácným alelickým setem schopni se účinně bránit se jich tento pokles netýká, a přežívají až do bodu, kdy začnou tvořit většinu dané populace (Hedrick, 1999). V tomto případě působí selekční tlak, na populaci parazitů, kteří se musejí přizpůsobit novým podmínkám v populaci hostitelů, nebo dojde ke snížení jejich abundance a mohou i lokálně vyhynout. Přeživší parazité, kteří se byli schopni přizpůsobit, následně opět začínají parazitovat na populaci hostitele s nyní opět běžnou alelickou sadou (Bernatchez a Landry, 2003).

Dalším způsobem jak udržet v populacích vysokou variabilitu MHC je výběr partnera k páření na základě odlišnosti MHC genů s cílem zvýšit heterozygotitu potomstva. Případně je zde možnost zabránit inbreedingu snižujícím fitness (Penn a Potts, 1999). Preference při páření mají svůj základ v pachu a čichu zúčastněných jedinců (Singh a spol, 1987). Peptidy MHC komplexů, které nezaujali své místo na buněčném povrchu mohou být vyplavovány do extracelulárního prostoru a objevit se v moči, nebo tělních sekretech a tím pádem i ovlivnit komunikaci mezi jedinci (Singh, 1998). Z toho důvodu může být MHC genotypová diverzita promítnuta do chemických signálů a informovat potenciálního partnera o zdravotním stavu, sociálním postavení a pohlaví, který je tyto signály schopen zachytit za pomoci Jacobsonova orgánu (Zufall a spol, 2004). Prokázalo se, že samice myši byla méně přitahována močí samce nakaženého virem chřipky, než zdravého jedince (Penn a Potts, 1998). V případě pohlavního výběru je v zájmu samičky vybrat si partnera s co možná nejlepší kombinací

genů. Podobně jako v případě heterozygotní výhody, i zde bylo prokázáno, že samičky dávají přednost spíše optimální diverzitě v MHC než maximální (Trivers, 1972).

Dalším faktorem při výběru partnera mohou být i zkušenosti, z časného života jedince, jako forma rodinného imprintingu. Přes veškerá data, která nám tyto studie poskytly, jsou ostře kritizované, kvůli používání inbredních linií, které mohou ovlivnit chování, speciálně u samic vybírajících si partnera (Manning a spol, 1992). Posledním případem je výběr konkrétních MHC genů vhodných pro dané prostředí. Mohou nastat situace, kde se vyplatí spíše jeden specifický genotyp, než vysoká diverzita proti patogenům. Tento jev je v přírodě celkem běžný, avšak je obtížné jej zaznamenat.

Experimenty prováděné Yamazaki (1976), nám ukázaly, že u čtyř z šesti kmenů kongenních myší, samci preferují samice s odlišnými MHC a následně samice také vykazují preference k MHC odlišným samcům, a navíc samice v říji vykazují větší preferenci pro pach samců s odlišnými MHC (Egid and Brown, 1989). Tento obecný obrázek o MHC preferencích je mírně zmatený, protože různé genetické zázemí ovlivňuje sílu a směr partnerské preference, s homozygoty vykazujícími nejsilnější reakce (Yamazaki et al, 1976). Navzdory očekávání byl v potomstvu nalezen nedostatek homozygotních jedinců, s ohledem na to, že se by se mělo jednat o náhodné páření. Po kontrole dalších mechanismů, které by mohly být zodpovědné za velké množství heterozygotů v populaci, došli autoři k závěru, že byla zodpovědná právě MHC sexuální selekce. Podobné studie se prováděly i u lidí, kde však bylo dosaženo rozporuplných výsledků. Hedrick a Black (1997) nenašli žádný důkaz u jedenácti jihoamerických kmenů o ovlivnění výběru partnera skrze jeho odlišnost v MHC lokusech. Naproti tomu, Ober a spol. (1997) našli důkazy pro negativní asortativní páření podle HLA typu u 411 párů Hutteritů.

Existence mezidruhového polymorfismu je jednou z dalších význačných charakteristik MHC lokusů (Hughes a Yeager, 1998). V různých druzích rozdělených před miliony let se stále dají nalézt identické sekvence MHC i přes jejich oddělenou evoluci. Toto zjištění je o to pozoruhodnější, připustíme-li, že právě tyto geny by se měly podílet na koevolučním závodu s parazity, přesto však vykazují nízký stupeň nukleotidových substitucí. (Cock van Oosterhout, 2009). Potvrdilo se, že balanční selekce je schopná mezidruhový polymorfismus udržet. To ovšem vedlo k rozdělení alel do jednotlivých funkčních lokusů a do souborů specifických dědičných linií. Díky tomuto

rozdělení se pak geny z jednotlivých funkčních lokusů, ale odlišných druhů podobají více, než geny v rámci jednoho druhu. (Werner a spol, 1992).

Bohužel ani modely balanční selekce nejsou schopné vysvětlit způsob, jakým se rozdělené sekvence mohly udržet v různých populacích po tak dlouhou dobu (Cock_van Oosterhout, 2009).

Odpovědí na udržení mezidruhového polymorfismu u rozdělených linií by mohl být tzv. asociačně balanční komplex (dále jen ABC). ABC je schopen udržet vysoký MHC polymorfismus i bez zásahu patogenů. ABC předpokládá, že haplobloky s MHC geny akumulují genetický polymorfismus, kvůli své vysoké genové diverzitě a vazebné nerovnováze. Důležitou vlastností, kterou se odlišuje ABC od balanční selekce, je poměrně nízká rychlost fluktuace. A to z toho důvodu, že se nová, škodlivá mutace, kumuluje kolem funkčních MHC genů což je svým způsobem ochrana. S větším množstvím alel se totiž snižuje možnost projevu mutace v homozygotním stavu, který by mohl mít případně smrtelné následky (Cock van Oosterhout, 2009).

MHC polymorfismus je ovlivňován nejen mechanismy přirozeného výběru, ale také náhodnými molekulárními procesy typu rekombinace a mutace či procesech závislých na prostředí jako je genetický drift a genetický tok. Rekombinace je schopna působit na MHC polymorfismus v několika rovinách. Meiotická rekombinace probíhá v „hot spots“ intronů a úsecích a vysokou vazebnou nerovnováhou (Jeffreys a May 2004). Na úrovni multiplikace celých MHC alel pak působí ne-alelická homologní rekombinace (Hurles a Lupski 2006). A v neposlední řadě genová konverze, která se definuje rekombinátorním přenosem DNA mezi alelami nebo lokusy bez crossoveru, což způsobuje promíchání přítomných MHC a tvorbu nových alel (Ohta 1991; Jeffreys a May 2004). Dalším zdrojem vysoké variability MHC genů jsou mutace a to především typ bodových mutací, konkrétně hojně zastoupené nesynonymní mutace v PBS (Hosomichi et al. 2008). Prvním demografickým procesem je genetický drift ovlivňující variabilitu alel v populaci náhodným posunem frekvence alel. A v případě malých populací se jeho efekt zvyšuje až do stavu, kdy dochází ke ztrátám MHC alel (Kimura, 1983; Alcaide, 2010). Centrální otázkou u populačních studií zabývajících se divokými populacemi a silami, které na ně působí je, zda může genetický drift potlačit balancující selekce a tím i MHC polymorfismus.

V různých situacích se tato možnost ověřuje za pomoci porovnání neutrální variability (efekt driftu) a MHC variability (interakce drift x selekce),(Hedrick 2001).

Posledním procesem je genový tok, který je charakterizován přenosem alel z jedné populace na druhou. V případě MHC multiplikovaných lokusů může jedince získat až dvojnásobné množství alel, odvozené od počtu jeho vlastních alel. Tento mechanismus zvýší mnohonásobně účinek genového toku, než by tomu bylo u ne-multiplikovaných alel (Hansen a spol., 2007).

1.4 Funkční význam variability MHC v divokých populacích

Pro objektivní vyhodnocení mechanismů selekce a vlivu MHC variability na parazitární zátěž, je nutné sbírat empirická data ve volných populacích. Přestože, kongenní myši používané v laboratořích mohou mít pestřejší genetický základ, není zde možné simulovat podmínky vnějšího prostředí. A právě absence stresů v podobě změn klimatu, nedostatku potravy, kompetice, či výskytu určitého patogenu zabraňuje projevu nových alel, ať už výhodných či škodlivých (Altizer a spol., 2003.)

U studií, zabývajících se selekčním působením heterozygotní výhody se prokázala skutečnost, že skupina jedinců s průměrným množstvím alel, v tomto případě u koljušky tříostné (*Gasterosteus aculeatus*), má nejnižší míru parazitace z populace (Wegner a spol., 2003). Na druhou stranu u kalifornských lachtanů (*Zalophus californicus*), kteří mají osm lokusů MHC DRB II regionu, ovšem s nízkou diverzitou alel na lokus, se objevili předběžné důkazy o spojitosti mezi jedním genotypem a rakovinou urogenitálního traktu (Bowen a spol., 2005).

Dobře podpořený je ve studiích princip vzácných alel v populacích jinak také známý jako negativně frekvenční selekce. Spojení mezi MHC alelami a rezistencí či citlivostí k patogenům byla nalezena u volně se pasoucí populace ovcí, kde MHC varianty hrály klíčovou roli, v obraně proti strongyloidním nematodům (Paterson a spol., 1998). V této populaci zaznamenali úhyn jehňat s alelami (OLADRB 205 a OLADRB 257), které byli v populaci běžné (frekvence: 0,21 – 0,24). Naopak výskyt vzácné alely (OLADRB 263; frekvence 0,13) zajistil jejich přežití a odolnost (Paterson a spol., 1998).

Opelt a spol. (2010) studovali efekt MHC alel na parazitické zatížení u populace králíka divokého (*Oryctolagus cuniculus*). U populace byly zjištěny dva bottlenecky

a proto nebyla MHC diverzita příliš vysoká. Ze 113 jedinců, získali 6 MHC DRB II genotypů (3 alely - OrcuDRB*02, OrcuDRB*03, OrcuDRB*04). Faktory parazitického zatížení byli hlístice (*Graphidium strigosum*, *Trichostrongylus retortaeformis* a *Passalurus ambiguus*) a několik druhů kokcií (*Eimeria*). Prokazatelná asociace byla prokázána, právě u alely OrcuDRB*04 a kokcií způsobujících jaterní kokcidiózu (*Eimeria stiedai*). Avšak její účinek se projevil pouze v případě, že byla v heterozygotním stavu s jinou alelou a pokud se vzal v potaz věk jedinců. Ve vztahu k jiným endoparazitům, se žádná asociace neprokázala, pouze že u kokcií byly samci více parazitováni a starší jedinci byli více parazitováni.

Meyer-Lucht a spol. (2010) vybrali vzorky z 5 oblastí brazilského atlantického lesa ze dvou druhů vačic. Jednalo se o 102 jedinců *Gracilinanus microtarsus* a 123 jedinců *Marmosops incanus*. Zde byly vidět rozdíly mezi vysokou a nízkou MHC variabilitou. U *Gracilinanus microtarsus* bylo nalezeno 80 alel z toho 5 možných pseudogenů, zbývajících 75 alel rozdělili do 17 funkčních supertypů založených na podobných vlastnostech aminokyselin v jejich PBS. U jedinců tohoto druhu byla nalezena nízká prevalence vůči 11 morfotypům helmintů. Naproti tomu druh *Marmosops incanus* s 8 alelami měl nízkou MHC diverzitu a prevalence u něj byla vysoká. I přes nízký počet alel, měl nicméně podobnou průměrnou sekvenční divergenci jako *Gracilinanus microtarsus*. Supertypu ST09 stačila k dobré obranyschopnosti jedna alela (Grmi-DAB*16) naproti tomu ST14 potřeboval k silné rezistenci celou skupinu alel. Alela zvyšující infekci byla pak Main-DAB*05 z *Marmosops incanus*.

Julia Schad a spol. (2012) zkoumali souvislosti mezi MHC genotypem, ektoparazitickou zátěží reprezentovanou zastoupením klíšťat (*Ornithodoros hasei*) a blech (*Paradyschira* a *Noctiliostrebla*) a přenosem výhodných alel do dalších generací jihoamerických netopýrů říčních (*Noctilio albiventris*). Ukázalo se, že samci, kteří se úspěšně páří, vykazují nižší míru parazitace. Podobný princip fungoval i u samic, kojící či březí samice neměly tak vysokou prevalenci ektoparazitů. Samozřejmě do tohoto vztahu zasahuje i diverzita MHC alel. V tomto případě byly identifikovány konkrétní alely podmiňující vysokou rezistenci k ektoparazitům (Noal-DRB*02, Noal-DRB*04, Noal-DRB*09, Noal-DRB*11) a nízkou (Noal-DRB*01, Noal-DRB*04, Noal-DRB*05, Noal-DRB*10).

1.4.1 Alelická variabilita a její vliv na parazitaci v populacích hlodavců

Parazité jsou schopni způsobit v relativně krátkém čase velké poškození, i tak se ale brání odhalení a za pomoci různých mechanismů se vyhýbají imunitní odpovědi. Všechny tyto procesy jsou založeny na manipulaci parazitů s molekulárními mechanismy hostitele (Phillips, 2002). Důkazy naznačují, že patogen unikne MHC systému změnou pouze několika aminokyselin. Známe tři základní mechanismy zahrnující změny v antigenech patogenů - zabránění navázání se do PBS, nebo navázání na TCR, třetí možností jsou pak molekulární mimikry podle hostitelských proteinů, což kvůli přísné selekci CD4+ v brzlíku vyloučí možnost rozpoznání patogenu (Sommer, 2005).

Jak se již předeslalo MHC DRB II region je základním pilířem adaptivního imunitního systému pro boj s parazity. Jeho alelická variabilita a účinnost se s různými úspěchy modifikuje skrze polymorfismus a selekční mechanismy. Díky spolupráci s toll-like receptory se zvažuje i možnost, že by mohly MHC geny ovlivňovat tímto způsobem vrozenou imunitu.

U hlodavců je známo, že v divokých populacích je prevalence parazitů a intenzita infekce značně ovlivněna místní a časovou variací, stejně jako vnitřními faktory jako jsou věk, pohlaví a zdravotní stav (Abu-Madi a spol., 2000). Ve studiích zabývajících se vztahem mezi populacemi, či jedinci drobných hlodavců a jejich parazity jsou často řešeny alelické frekvence vzácných či běžných alel. To naznačuje, že v nich působí negativně závislá selekce jako kupříkladu u myšic (*Apodemus flavicollis*), kde jsou určité alely rezistentní a jiné citlivé k helmintům (*Heligmosomoides polygyrus*). Bylo zjištěno, že některé alely u myšice jsou více náchylné k infekci parazitem (Apfl-DRB*5, Apfl-DRB*15), s tím pak může souviset negativní korelace mezi genovou expresí MHC a intenzitou infekce, avšak pouze za předpokladu, že *H. polygyrus* je schopný ovlivnit hostitelský imunitní systém. U jedinců nesoucích tyto alely byly také zaznamenány vyšší hodnoty Faecal egg count (dále jen FAE). Obě alely sdílí také blízkou příbuznost, liší se totiž pouze v jedné synonymní a jedné nesynonymní substituci. Důkazem, že důsledek vyšší prevalence helmintem je opravdu spojen s danými alelami, a ne jen rozdílným parazitickým tlakem okolí, potvrzuje fakt, že jedinci, byli odchyceni na různých lokalitách. Naopak u alely (Apfl-DRB*23) se projevila výrazně nižší prevalence i hodnoty FAE.

U norníka (*Myodes glareolus*) našli Babik a Radwan (2007) 15 unikátních sekvencí MHC DRB II, pravděpodobně ze dvou lokusů. Přestože se potvrdila vysoká aminokyselinová diverzita v PBS, bylo zde zaznamenáno možné působení pozitivní selekce na MHC DRB II regionu. Po prozkoumání alel došli Babik a Radwan (2007) k názoru, že alely u populací *Myodes glareolus* netvoří monofyletické skupiny. V další studii Kloch a spol. (2010) potvrdili hypotézu, že optimální diverzita MHC alel v populaci má pozitivní vliv na rezistenci vůči nejrozšířenější střevní hlístici (*Aspicutulus tetraptera*). Zvláště jedna alela (MyGI-DRB*028) prokázala skrze populaci výraznou rezistenci. Na druhou stranu intenzita infekce se snižovala s vyšší diverzitou MHC alel. Další dvě analýzy provedené na dvou běžně se vyskytujících druhích hlístic (*Heligmosomum mixtum* a *Heligmosomoides glareoli*) však neprokázaly v populacích norníka žádný rezistentní efekt. Z osmi populací *Apodemus flavicollis* v okolí Hamburгу v počtu 159 jedinců bylo nalezeno 28 MHC DRB II alel, které byly porovnány s parazitací osmi morfotypů hlístic. V tomto případě se projevil efekt pouze v alelické bohatosti populací, v populacích s vysokým počtem alel byla nízká prevalence. Opět se zde neprokázal vliv věku, pohlaví, nekódujících lokusů MHC, či MHC heterozygosity (Meyer-Lucht a Sommer 2009.)

V Polských populacích hraboše hospodárného (*Microtus oeconomus*) byly také zjištěny alely vztahující se k přežití parazitární zátěže a zimních měsíců. Konkrétně se jednalo o tři význačné alely (AA*01, AA*05, AA*08), přičemž parazitární zátěží představovaly hlístice a Babésie (Kloch a spol., 2012). U alely AA*01 se nenašlo spojení s žádným parazitem, ale jedinci s touto alelou spíše přežili zimní období, samozřejmě to také může znamenat, že je tato alela asociována s parazitem, který se ve studii nevyskytoval. Jedinci nakažení babesii měli mnohem menší stupeň přežití, než jedinci nakažení pouze tasemnicemi. K babesii se vztahují dvě alely z populace hrabošů a to AA*05, se kterou jsou jedinci náchylnější k infekci a AA*08, při které je infekce mnohem méně častá. Ve výsledku se však zřejmě právě kvůli těmto alelám nenašel žádný rozdíl mezi prevalencí u homozygotů a heterozygotů (Kloch a spol., 2012). Winternitz a spol., (2014) nenašli, žádnou souvislost mezi MHC alelickou diverzitou u hrabošů a parazitací tasemnic (*Cestoda*) a eimerií (*Eimeria*). Avšak jedna z alel (Mimo-DRB*14) by mohla

mít negativní účinek na fitness jedince v populaci a alela (Mimo-DRB*07) zase slabý vliv na intenzitu infekce u tasemnic.

2 Cíle práce

Cílem práce je provést analýzu parazitace a MHC diverzity populací drobných hlodavců (druhů *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis* a *Microtus agrestis*). Specifické cíle jsou následující:

- Získat data o ektoparazitech v populacích *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis* a *Microtus agrestis*
- Charakterizovat diverzitu alel lokusu MHC DRBII v populacích a jedincích zvolených druhů.
- Porovnat epidemiologická data (míra infestace) s diverzitou MHC alel s cílem odhalit případnou závislost.

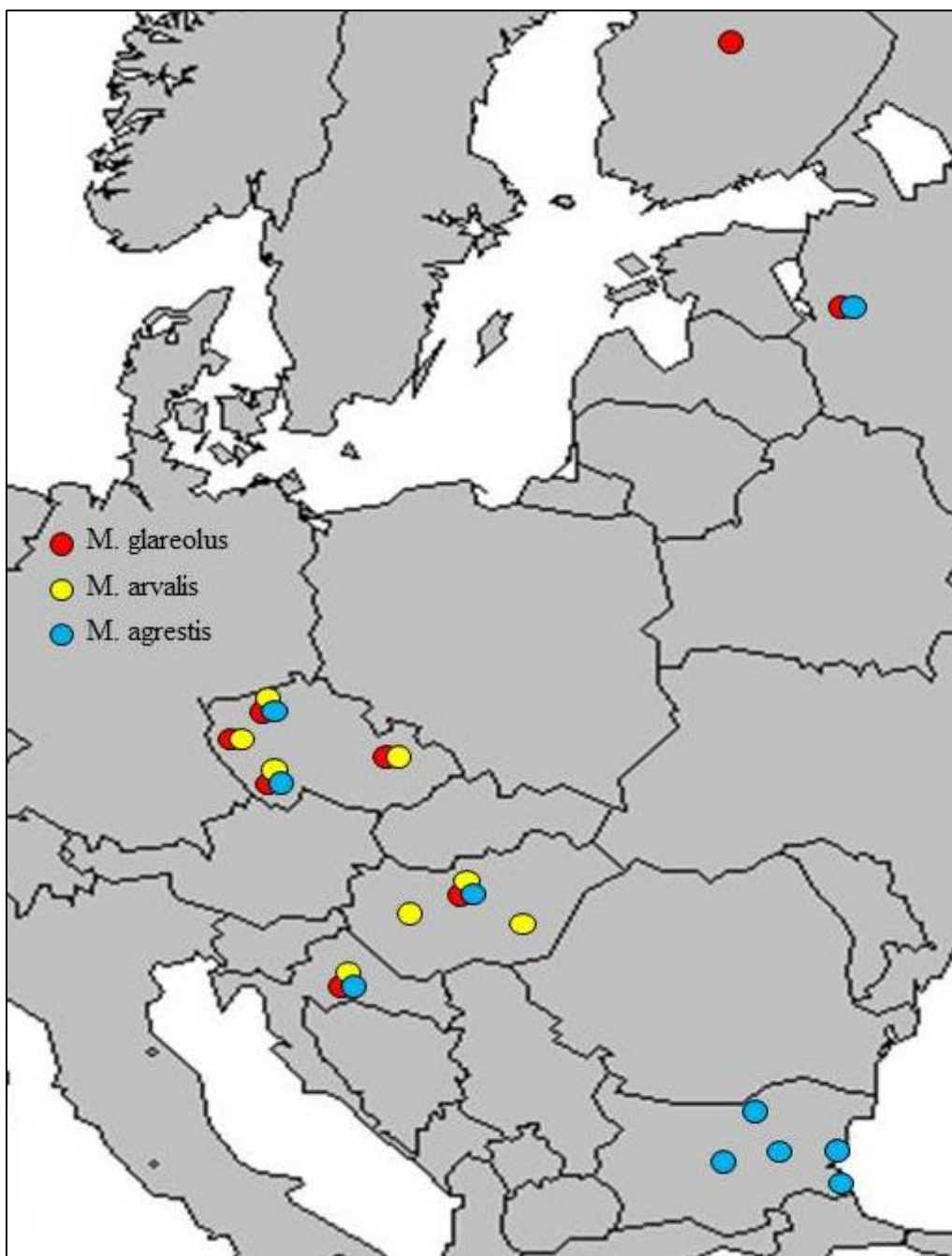
3 Materiály a metodika

3.1 Výběr vzorků

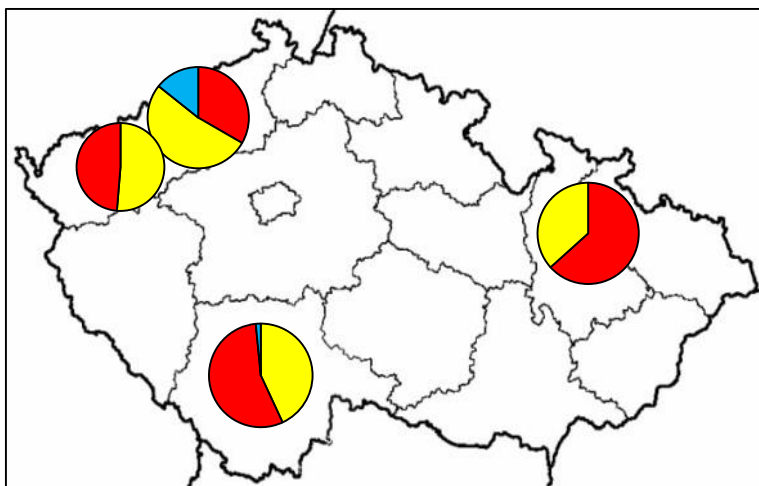
V této práci, jsem se zaměřil, především na vztah diverzity MHC alel a parazitické zátěže ve volně žijících populacích zástupců z podčeledi hrabošovitých (Arvicolinae) a to konkrétně u dvou druhů hrabošů, hraboše polního (*Microtus arvalis*) a hraboše lesního (*Microtus agrestis*) a jednoho druhu norníka (*Myodes glareolus*). Tyto populace byly zkoumány na ektoparazity, mezi nimi vši (*Hoplopleura*), klíšťata (*Ixodes*), a ostatní roztoče (Acari). Odchyty hlodavců byly prováděny do sklapovacích pastí. Každý jedinec byl pečlivě očesan od všech ektoparazitů, kteří byli vloženi do mikroskopických vložek v 96% etanolu. Z usmrcených hlodavců jsme odebrali tkáň, konkrétně prsty, či špičku ocasu (pro následnou izolaci DNA a její sekvenaci) a rovněž fixovali v mikroskopických vložkách s etanolem. Nakonec byly odebrány vzorky tlustého střeva se stolicí pro testy na přítomnost oocyst kokcií (*Eimeria*). Střevo bylo fixováno v 2.5% roztoku dichromanu draselného. Přesné počty jakožto i poloha populací zkoumaných hlodavců jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1) a na obrázcích (Obr. 4). Polohy jednotlivých populací byly zaměřeny podle GPS, popřípadě podle názvu místa odkud byly vzorky dovezeny spolupracovníky.

Tab. 1: Počty jedinců dostupných pro parazitologická vyšetření.

Druh	Vyšetření jedinci na:		
	Eimeria	Ixodida	Acari
<i>Myodes glareolus</i>	170	97	97
<i>Microtus arvalis</i>	99	63	63
<i>Microtus agrestis</i>	41	29	29



Obr. 4: Populace zkoumaných druhů (*M. glareolus*, *M. arvalis*, *M. agrestis*) v Evropě.



Obr. 5: Detailnější náhled na vzorkování druhů na území České republiky. Koláčové grafy ukazují relativní četnosti druhů na lokalitách v ČR.

3.2 Identifikace endoparazitů, ektoparazitů a zjištění jejich prevalence v jednotlivých populacích

Cílem mé práce bylo stanovit vztahy MHC alel a zamoření parazity pro jednotlivé rody, druhy a geograficky definované populace hrabošovitých hlodavců. Z toho důvodu, bylo nutné získat statistický přehled o jejich rozšíření v populacích. U endoparazita rodu *Eimeria* jsem měl k dispozici výsledky z předchozího výzkumu v laboratoři a pouze jsem pro své vybrané populace spočítal prevalenci. Vzorky ektoparazitů byly identifikovány pod binolupou po zaškolení školitelem do rozpoznávání základních druhů (případně rodů) ektoparazitů běžně se vyskytujících na hrabošovitých hlodavcích. Při prvním zkoumání jsem se soustředil, především na rozpoznání larev a dospělců vši (Anoplura) a roztočů (Acari). Z důvodů malého množství nalezených vší jsem provedl druhé důkladnější zkoumání, kde jsem se zaměřil i na rozpoznávání larev a dospělců ektoparazitů z řádu Ixodida a dalších roztočů z čeledí Neotrombuculidae a Laelapidae. Bohužel při druhém zkoumání se ve sbírkách nepodařilo dohledat část vzorků z předešlé identifikace, a proto jsou u některých vzorků v příloze (Př. 1) vyplněny pouze počty nalezených roztočů. Pro analýzu jsem tedy použil pouze vzorky, u kterých jsem skutečně znal počet všech identifikovaných ektoparazitů.

Výpočty prevalence u jednotlivých populací různých druhů ektoparazitů a endoparazitů byli provedeny v programu Quantitative Parasitology 3.0 (<http://www.zoologia.hu/qp/qp.html>) pomocí metod deskriptivní statistiky. Pro lepší znázornění prevalence a parazitace u jednotlivých rodů jsem zhotovil histogramy v programu Microsoft Excel.

3.3 Izolace DNA

V první fázi své práce jsem se soustředil na rod *Apodemus*, ale poté, co se nedařilo standardizovat primery převzaté z literatury, jsem práci zaměřil na rody *Myodes* a *Microtus* a analyzoval molekulární data generovaná spolupracovníky v laboratoři školitele. Zde uvádím postupy, které vedly k získání dat. Izolace DNA probíhala podle protokolu přiloženého k Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Vzorky tkáně, ať už ocas či prsty byly den před izolací nastříhány sterilními nůžkami na menší části a ponechány přes noc vyschnout v mikrozkuřkách při pokojové teplotě. Následný postup je možno prohlédnout v příloze (Př. 2).

3.4 PCR a modifikace pro NGS platformu

Pro amplifikaci úseku MHC DRB II u myšic jsem použil primery JS1 a GH46 (Musolf a spol., 2004) a optimalizoval je různými obměnami v PCR cyklech, abych na ně následně mohl napojit adaptéry nezbytné k High-Throughput Sequencing. Z NGS (Next generation sequencing) jsme se rozhodli využít metodu Illumina (Illumina MiSeq). Bohužel, optimalizovat primery pro tuto metodu se nám nepodařilo. Z toho důvodu jsme využili data získaná od školitele specialisty (Jakub Vlček), který využil primery MioeL/R a G- MGDRBL/R uvedené v tabulce (Tab. 2) na populace norníků a zaslal je k sekvenaci na platformě Illumina Miseq. Složení mastermixu a nastavení PCR cyklu naleznete v příloze (Př. 3). Získal jsem od něj tedy dataset MHC alel odlišených od artefaktů pomocí přístupu DOC (Degree of Change; Lighten a spol., 2014), který byl použit i pro jiný MHC dataset v publikaci Vlček et al, 2016.

Tab. 2: Primery použité k amplifikaci regionu: MHC DRB II MGDRBL/R byl vyzkoušen na *Myodes glareolus* (Babik, 2009) a MioeL/R testován na *Microtus oeconomus* (Kloch, 2012).

Název primeru	forward	reverse
MGDRBL/R	GACAGAKACWTCTACAAAYCRG	TAGTTGTRTCTGCAGWAYGYGTCC
MioeL/R	GAGTGTCRTTTYTACAAAYGGGAC	TGCWCAGTGAAGCYMTC

3.5 Analýza sekvenčních dat

Jednotlivé sekvence MHC alel ze dvou rodů *Myodes* a *Microtus* z podčeledi *Arvicolinae*, jsem získal ve FASTA formátu, který jsem importoval do programu Geneious. Osekvenováno bylo celkem 155 jedinců, z nichž 72 náleželo k rodu *Myodes* a 83 k rodu *Microtus*. Jednotlivé sekvence jsem spojil do dvou aligmentů podle délky sekvencí za pomoci MAFFTu v defaultním nastavení. Že se skutečně jedná o alely MHC z výše zmíněných rodů jsem si ověřil za pomoci prohledání databáze NCBI programem BLAST. Sekvence o délce 122 bp patřily *Myodes glareolus* a sekvence 196 bp dlouhé byly přiřazeny k rodu *Microtus*. Vybrané příbuzné sekvence z Genbank byly alignovány k našim sekvencím pro analýzu mezidruhového polymorfismu v datasetu hrabošovitých hlodavců. Fylogenetický strom, potřebný k analýze byl za pomoci mého školitele vytvořen v programu RaxML s použitím substitučního modelu GTR+GAMMA. Jako outgroup byla zvolena sekvence hystrikognátního hlodavce *Ctenomys australis* (GQ497465.1). Barevné odlišení sekvencí pak bylo provedeno v programu Figtree (ver.1.4.3).

Sekvence MHC DRB II lokusu by měly podléhat silné vnitrodruhové selekci, stabilizující nebo diverzifikující jejich biologickou funkci (viz úvod). K analýze možné selekce v našem datasetu hrabošovitých hlodavců jsem si vybral portál datamonkey.org. Pro správný překlad do aminokyselinového čtecího rámce byla v programu Geneious odříznuta první báze alignmentu. V tomto stavu jsem sekvence následně nahrál na portál a spustil jejich analýzu. Pro zjištění zda jsou mé dva datasety (*Myodes* a *Microtus*) pod

purifikujícím či diverzifikujícím typem selekce jsem si vybral doporučenou metodu SLAC. Tyto datasety jsem také testoval na purifikující a pozitivní selekci v programu MEGA 7. Použil jsem Z-test selection, který porovnává počty synonymních a nesynonymních substitucí za pomoci metody Nei-Gojobori (dále jen NGJC).

Nakonec k posouzení vztahu mezi počtem alel a parazitárním zatížením populací (respektive jedinců) jsem za instruktáže konzultanta-specialisty pracoval v analytickém softwaru R. Nejdříve jsem importoval tabulky s daty z excelu do R. Pro zjištění závislosti mezi počtem alel a četností ektoparazitů Acari, do kterých jsem zahrnul pouze jedince z čeledí Neotrombuculidae a Laelapidae, jsem si zvolil generalizovaný lineární model (dále jen glm) s Poissonovým rozdělením (package: lme4 v R). Modely jsem vytvořil a s pomocí funkce summary, zjistil zda jsou průkazné, či nikoliv a následně jim dal grafickou podobu za pomoci funkce plot. Také jsem vytvořil dataframe pro sloupec s počty alel a přiřadil jim určité hodnoty (= seq (0,01 – 9), length.out = (50)). K predikci glm, jsem použil argument type s funkcí response a regresní přímky byly vytvořeny z příslušných dataframe a predikcí. Analýzy jsem začal se všemi daty na porovnání bez ohledu na rod či druh hlodavců a poté i separátně pro jednotlivé rody a druhy hostitelů. Nakonec jsem použil glm na ověření možné závislosti počtu alel a zamoření jednotlivými čeleděmi parazitů konkrétně Neotrombuculidae a Laelapidae. Posledním krokem bylo porovnání, ve kterém jsem provedl glm s Poissonovým rozdělením a náhodným faktorem pro rod a druh. Tímto byl eliminován možný vliv variability druhů na interpretaci závislosti mezi počtem alel a parazitací Acari.

4 Výsledky

4.1 Parazitologická analýza populací

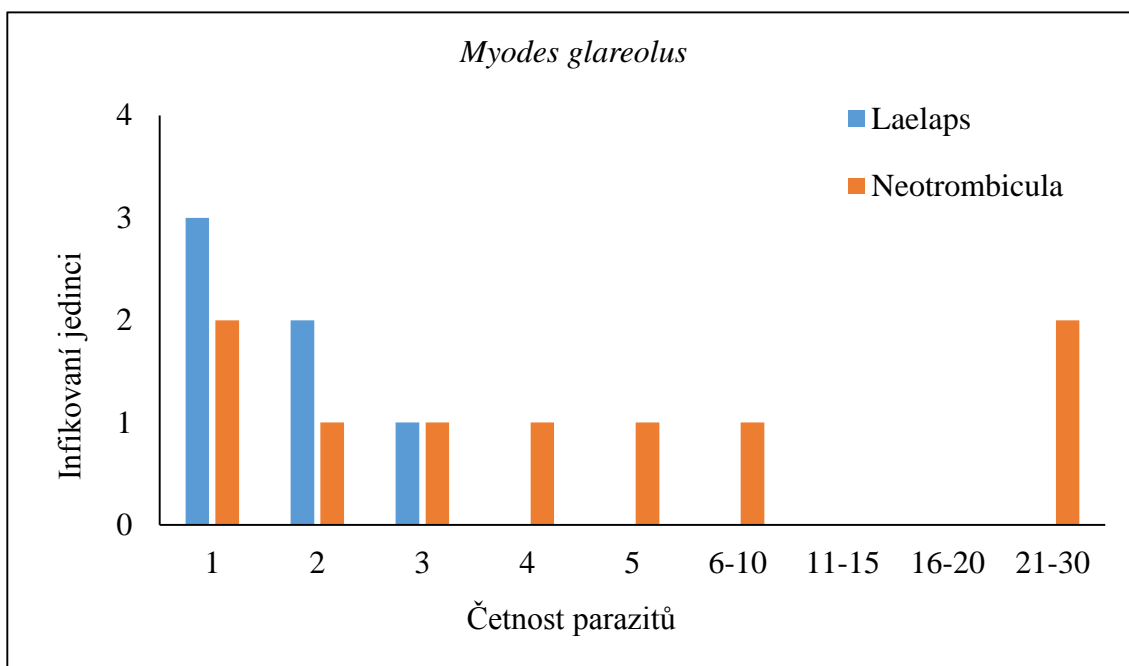
Parazitologickou analýzu jednotlivých populací u druhů *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis* a *Microtus agrestis* jsem prováděl v programu QP30. U endoparazitů (r. *Eimeria*), kde byla dostupná data pouze pro přítomnost nebo nepřítomnost infekce, ale ne její intenzitu, jsem vypočítal pouze prevalenci. Ektoparazity jsem si rozdělil na Ixodida a Acari (Neotrombuculidae a Laelapidae). Pro představu o celkové parazitaci v populacích jsem do těchto výpočtů zahrnul všechny mnou vyšetřené jedince, tudíž i ty ze kterých jsme vlivem metodických omezení (filtrace dat po Illimuna sekvenování) neměli dostupné sekvence MHC. Některé z těchto populací byly na tolik malé, že jsem je spojil s geograficky blízkými lokalitami. Výsledky prevalence a průměrného množství parazitů na jedince v populaci jsou uvedeny v Tabulce 3. Hodnoty prevalence u *Eimeria* kolísají od 9% do 87%, u Ixodida se pohybují od 0% až do 40% a u Acari od 0% do 100%.

Tab. 3: Hodnoty prevalence a průměrného množství parazitů *Eimeria*, Ixodida a Acari na jedince v populacích podčeledí Arvicolinae.

Populace	Prevalence (n)			Mean/median intensity	
	<i>Eimeria</i>	Ixodida	Acari	Ixodida	Acari
<i>Myodes glareolus</i>					
Jižní Čechy	72,2% (36)	0% (15)	6,7% (15)	0/0	3,00/3,0
Veselí nad Lužnicí	72,2% (36)	0% (15)	6,7% (15)	0/0	3,00/3,0
Severní Čechy	- % (7)	- % (2)	- % (2)	-	-
Litvínov	- % (7)	- % (2)	- % (2)	-	-
Severní Morava	10,5% (19)	0% (16)	0% (16)	0/0	0/0
Nový Jičín	9,1% (11)	- % (9)	- % (9)	-	-
Jeseníky	- % (8)	- % (7)	- % (7)	-	-
Západní Čechy	5,7% (35)	0% (33)	0% (33)	0/0	0/0
Stružná	4,8% (21)	0% (22)	0% (22)	0/0	0/0
Jáchymov	7,1% (14)	0% (11)	0% (11)	0/0	0/0
Chorvatsko	8,3% (12)	- % (2)	- % (2)	-	-
Finsko	- % (7)	- % (6)	- % (6)	-	-
Polsko	15,4% (39)	40% (10)	100% (10)	1,75/1,5	5,90/5,5
Rusko	86,7% (15)	0% (12)	0% (12)	0/0	0/0

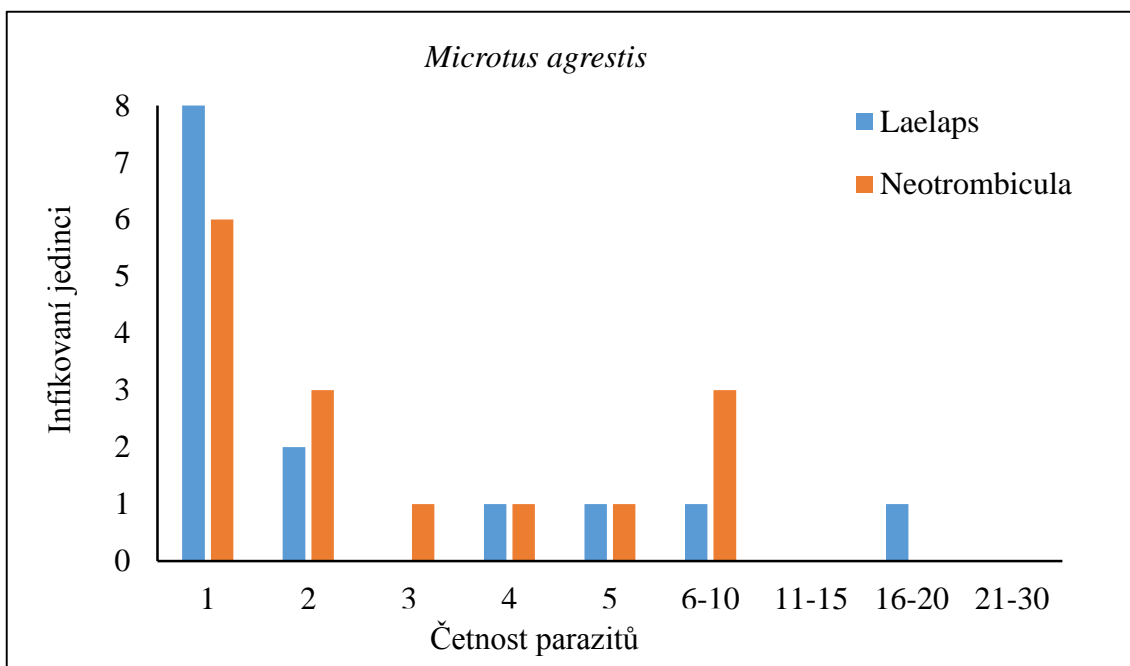
<i>Microtus arvalis</i>	Eimeria	Ixodida	Acari	Ixodida	Acari
Jižní Čechy	53,6%(28)	5,3%(19)	26,32%(19)	1,00/1,0	2,60/3,0
České Budějovice	58,3%(12)	0%(10)	30%(10)	0/0	2,33/2,0
Chelčice	- %(7)	- %(3)	- %(3)	-	-
Veselí nad Lužnicí	- %(9)	- %(6)	- %(6)	-	-
Severní Čechy	36,4%(11)	- %(3)	- %(3)	-	-
Litvínov	36,4%(11)	- %(3)	- %(3)	-	-
Severní Morava	9,1%(11)	- %(4)	- %(4)	-	-
Nový Jičín	9,1%(11)	- %(4)	- %(4)	-	-
Západní Čechy	28,6%(35)	6,3%(32)	9,4%(32)	1,50/1,5	3,00/2,0
Stružná	28,6%(35)	6,3%(32)	9,4%(32)	1,50/1,5	3,00/2,0
Maďarsko	50%(14)	- %(5)	- %(5)	-	-
Celkem	37,37%(99)	6,35%(63)	15,87%(63)	1,50/1,5	3,80/3,0
<i>Microtus agrestis</i>	Eimeria	Ixodida	Acari	Ixodida	Acari
Jižní Čechy	- %(1)	-	-	-	-
Veselí nad Lužnicí	- %(1)	-	-	-	-
Severní Čechy	- %(3)	- %(2)	- %(2)	-	-
Litvínov	- %(3)	- %(2)	- %(2)	-	-
Bulharsko	54,2%(24)	31,8%(22)	72,7%(22)	1,71/1,0	5,06/3,5
Chorvatsko	- %(8)	- %(1)	- %(1)	-	-
Maďarsko	- %(1)	-	-	-	-
Rusko	- %(4)	- %(4)	- %(4)	-	-
Celkem	56,10%(41)	31,03%(29)	62,06%(29)	1,56/1,0	5,17/4,0
Celkem	33,12%(163)	6,19%(91)	18,56%(91)	1,67/1,5	7,83/5,0

Také jsem zjišťoval rozložení míry infestace v populacích pro dvě nalezené čeledi roztočů u rodů *Myodes* a *Microtus*, abych zjistil přibližné rozložení různě nakažených jedinců v populacích pro pozdější analýzy s MHC diverzitou. Výsledné histogramy jsou k dispozici na obrázcích (Obr. 5, 6, 7). Z histogramů byli vyřazeni nenakažení jedinci pro větší přehlednost. Histogramy zahrnující i nenakažené jedince jsou k nahlédnutí v příloze (Př. 4). Rozložení infestace u *Myodes glareolus* (Obr. 6) je relativně rovnoměrné s nejvyšším zastoupením 28 parazitů z čeledi Neotrombiculidae na jedince. V analýze jsem nezohlednil výraznější počty i kolem sta jedinců ektoparazitů na jednom hostiteli, z důvodů neúplné identifikace daných ektoparazitů (do čeledí). Šlo o vzorky jedinců, které jsem při druhém zkoumání nedohledal ve sbírce.

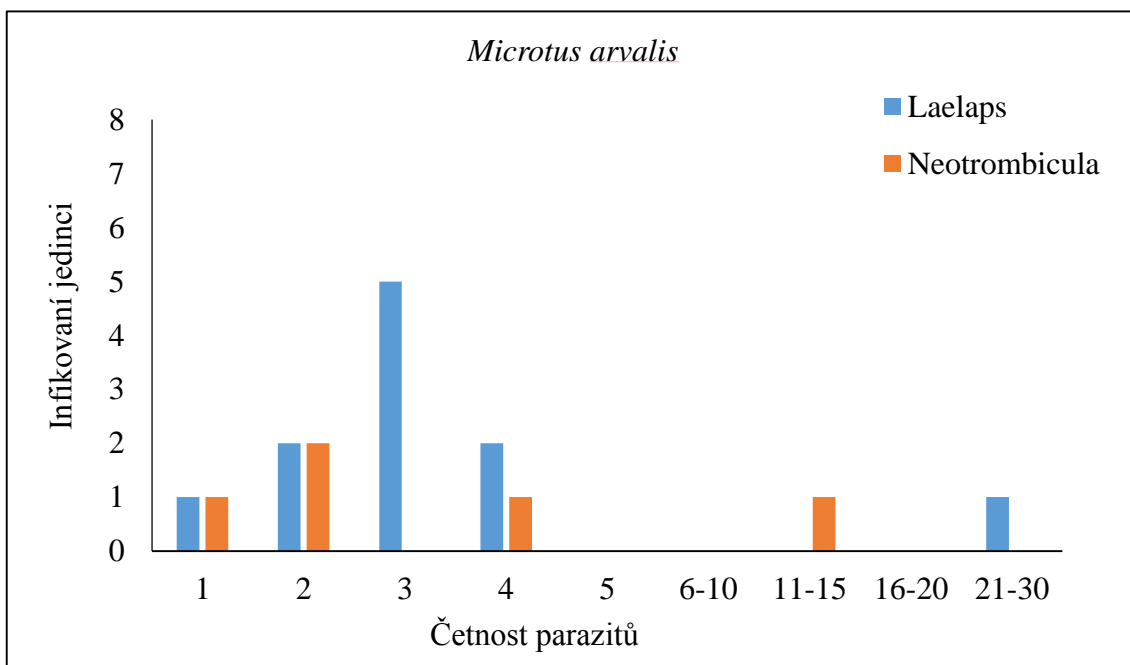


Obr. 6: Rozložení parazitace ektoparazity čeledí Neotrombiculidae a Laelapidae v populacích norníka *Myodes glareolus*.

Na obrázku (Obr. 7) je znázorněno rozložení ektoparazitů u *Microtus agrestis*, je z něj patrné, že nejčastěji na jedincích tohoto druhu parazitovali ektoparazité solitérně a nejvyšší mírou parazitické zátěže byl postihnut jedinec s 16 ektoparazity čeledi Laelapidae. Na dalším obrázku (Obr. 8) je znázorněna situace s jedinci *Microtus arvalis*, kteří byli nejčastěji parazitováni třemi jedinci čeledi Laelapidae, a stejnou čeledí byl napaden i jedinec s nejvyšší mírou parazitace s počtem 21 parazitů.



Obr. 7: Rozložení parazitace ektoparazity čeledi Neotrombiculidae a Laelapidae v populacích hraboše *Microtus agrestis*.



Obr. 8: Rozložení parazitace ektoparazitů čeledi Neotrombiculidae a Laelapidae v populaci hlodavce *Microtus arvalis*.

4.2 Analýza MHC sekvencí

Z celkového počtu 314 vyšetřených jedinců jsem získal od Jakuba Vlčka dataset 155 osekvenovaných vzorků, které jsou uvedeny v příloze (Př. 5). V tabulce níže (Tab. 4) je uvedeno množství sekvencí pro jednotlivé druhy a informace o tom, kolik z osekvenovaných jedinců bylo vyšetřeno na *Eimerie* i ostatní parazity. Nejvíce osekvenovaných jedinců jsme získali z rodu *Myodes glareolus* (72) nejméně pak z *Microtus agrestis* (29). Vyšetření na *Eimerie* bylo provedeno na všech osekvenovaných jedincích, avšak po přidání ektoparazitů, počet vyšetřených jedinců klesl téměř o třetinu.

Tab. 4: Rodové a druhové rozložení osekvenovaných jedinců na příslušných parazitech.

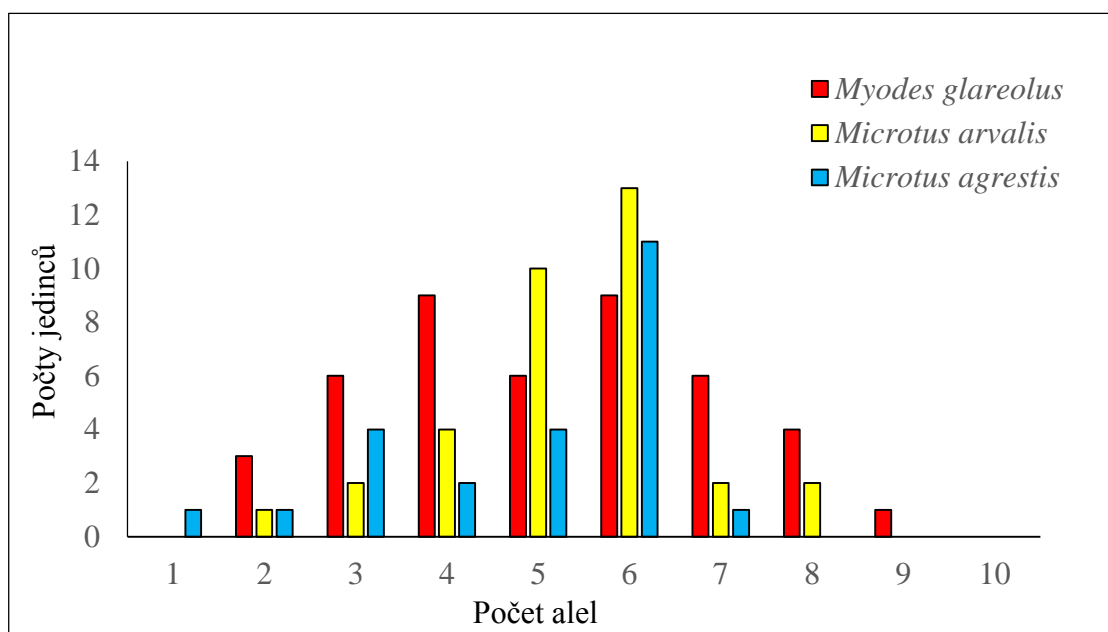
Rod a druh	MG	MAr	MAg	celkem
Počet osekvenovaných vzorků	72	54	29	155
Sekvence + <i>Eimerie</i>	72	54	29	155
Sekvence + Ektoparazit + <i>Eimerie</i>	44	29	27	100

Druhové označení: *Myodes glareolus* – MG, *Microtus arvalis* – MAr, *Microtus agrestis* – MAg.

Dále jsem stanovil, v jakém rozsahu se vyskytují alely v populacích výše zmíněných druhů, jaký je jejich průměrný počet na jedince, standardní odchylka (standard deviation), efektivní hodnota (Square root of no. of observation) a standardní chyba průměru (Standard error of mean). Vše je obsaženo v tabulce (Tab. 5) a pro lepší představu o alelické bohatosti daných druhů je přiložen histogram (Obr. 8), na kterém je zřetelné Gaussovo rozdělení hodnot, i když u *Microtus agrestis* vypadá, poněkud rozkolísaně. Nejspíše je to způsobené relativně malým počtem dostupných vzorků pro tento druh. DRBII lokus je u těchto hlodavců zjevně multiplikovaný. Za normálních podmínek by měl mít jedinec vždy buď 1 alelu (homozygot) nebo 2 alely (heterozygot). Když se však podíváme na průměrný počet alel na jedince napříč studovanými druhy, zjistíme, že výsledek se pohybuje kolem 5 alel na jedince, což nám indikuje přítomnost multiplikovaných lokusů. Možná míra multiplikace DRBII lokusu je naznačena jedincem *Myodes glareolus*, u něhož bylo nalezeno 9 alel.

Tab. 5: Shrnutí průměrného počtu alel pro jednotlivé druhy.

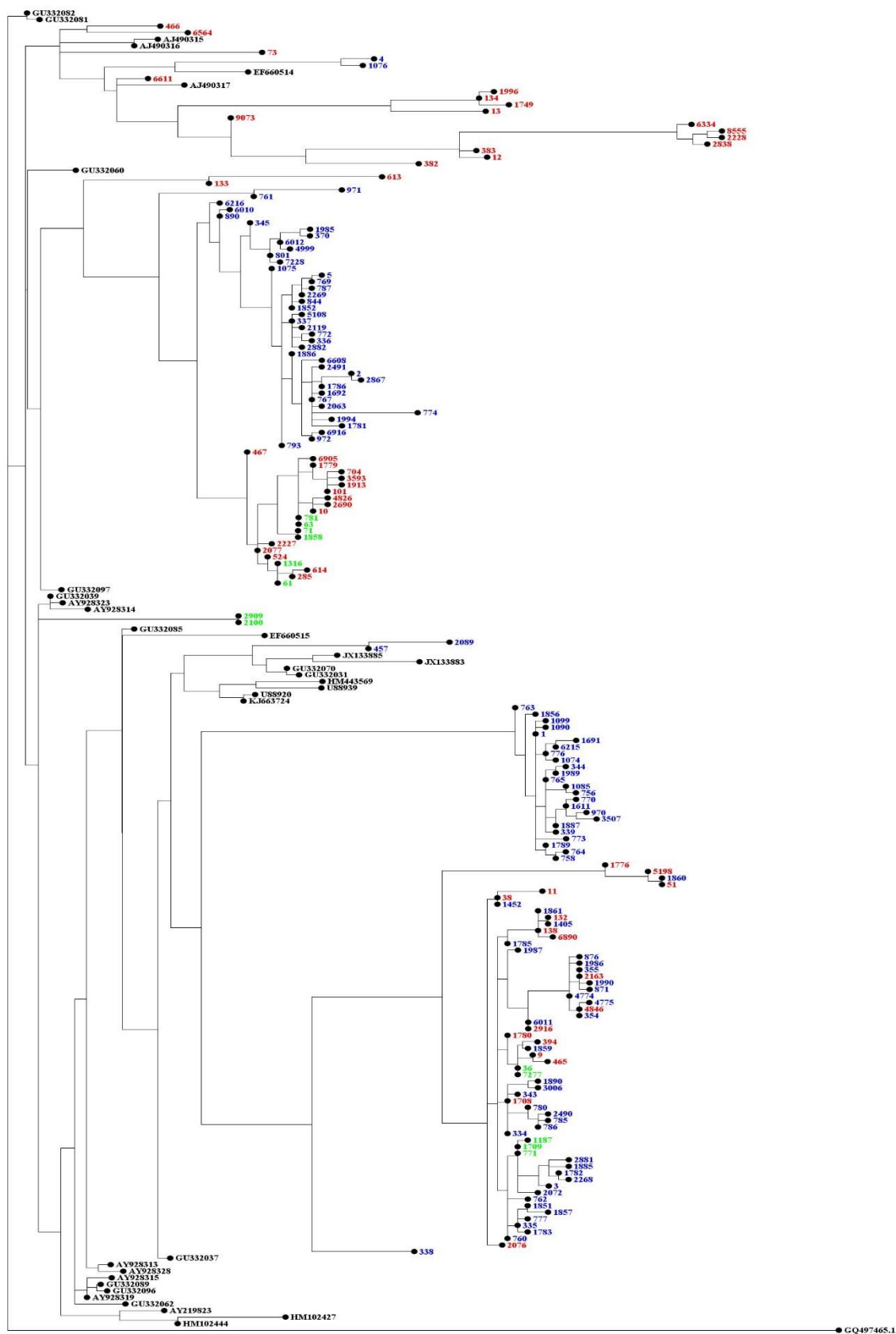
Rod a druh	MG	MAr	MAG	Mar+Mag
Průměrný počet alel na jedince	5,153	5,463	4,862	5,301
Počet alel od/do	2 až 9	2 až 9	1 až 7	1 až 9
Standard deviation	1,821	1,224	1,529	1,360
Square root of no. of observations	8,485	7,349	5,385	9,110
Standard error of mean	0,215	0,167	0,284	0,149



Obr. 9: Zastoupení multiplikovaných lokusů v populacích jednotlivých druhů *Myodes* a *Microtus*.

4.2.1 Fylogenetická analýza MHC sekvencí

V zájmu zjištění vzájemného příbuzenského vztahu jednotlivých sekvencí byl vytvořen fylogenetický strom (Obr. 9). Výsledná topologie ukazuje klastrování sekvencí podle druhové příslušnosti, avšak je zde i vidět značný vliv mezidruhového polymorfismu, kdy některé sekvence jsou mezi druhy sdílené, či se klastrují společně se sekvencemi odlišného druhu. Uvedené sekvence z genbanku společně s jejich rodovými a druhovými názvy jsou dostupné v příloze (Př. 6).



Obr. 10: Fylogenetický strom MHC alel u rodů *Myodes* (červená) a *Microtus* (modrá) s outgroupem *Ctenomys australis* (GQ4974651) a sdílenými alelami (zelená).

4.2.2 Selekcce

Pro ověření působení selekčního tlaku na osekvenované jedince jsem zvolil metody SLAC (Single-Likelihood Ancestor Counting) a Z-Test selection v programu MEGA7. Dataset rodu *Myodes* obsahoval 58 sekvencí a analýza odhalila průkazný signál pro purifikující selekci s průměrem ze synonymních a nesynonymních substitucí (mean dN/dS= 0,362137), zatímco pro pozitivní selekci byl neprůkazný (se signifikancí 0,1). Analýza také odhalila 8 negativně vybraných míst se signifikancí < 0,05. Pro rod *Microtus* jsem získal 111 sekvencí a také zde byl patrný vliv purifikující selekce (mean dN/dS= 0,331748). Pozitivní selekce se opět neprokázala a v sekvencích se našlo 11 negativně selektovaných míst (P < 0,05).

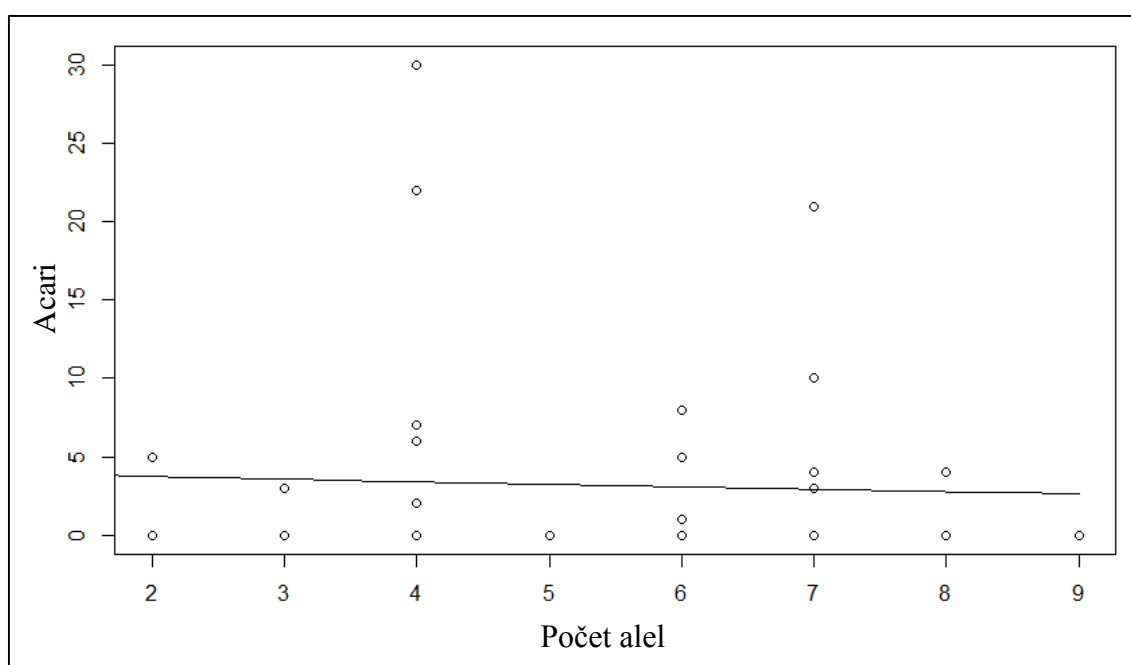
V programu MEGA7 jsem dále ověřoval selekční tlak na alelickou diverzitu sekvenovaných jedinců a došel ke stejnému závěru jako při analýze SLAC. Rod *Myodes* vykazoval purifikující selekci (s pravděpodobností p=0,004) v Z-testu a NGJC. A neprůkazně pro pozitivní selekce opět u Z-testu s pravděpodobností (p=1,000). Rod *Microtus* měl podobné výsledky testů, byl prokázán vliv purifikující selekce (s pravděpodobností p=0,003) a neprůkazný vliv pozitivní selekce (s pravděpodobností p=1,000).

4.3 Korelace mezi alelami a parazity

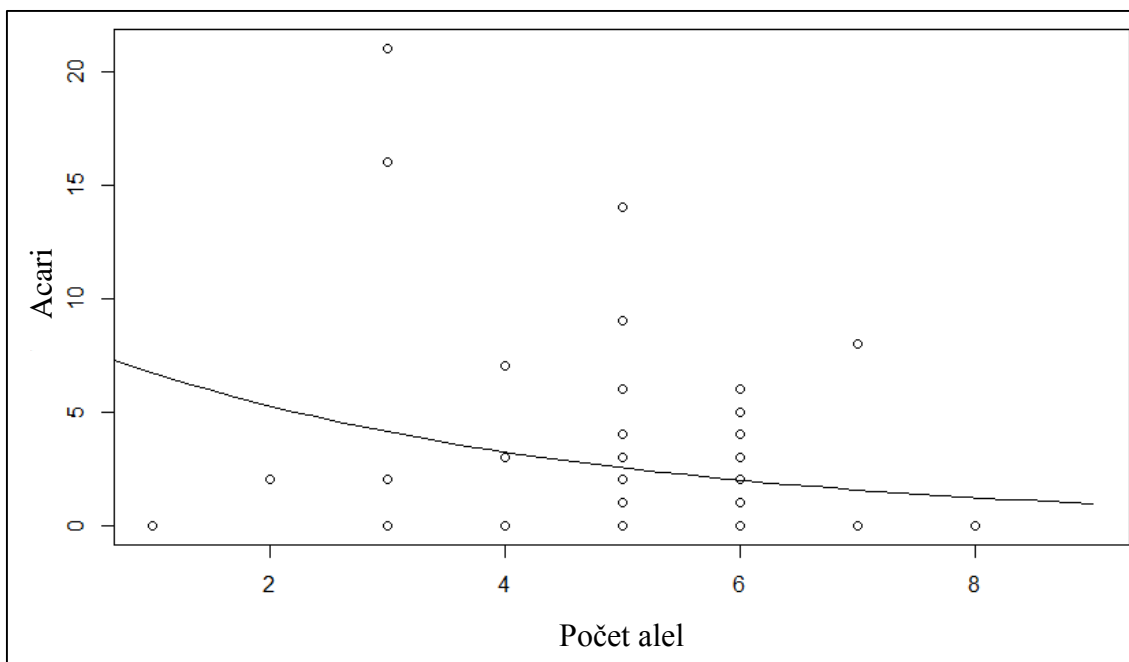
V programu R jsem se zaměřil na odhalení možného vztahu mezi počtem alel a parazitací jednotlivých druhů. Mou cílovou skupinou byli ektoparazité, kam jsem zahrnul čeledi Neotrombiculidae a Laelapidae s dostatečnými počty infikovaných jedinců. Nejdříve jsem je prověřil jako jednu skupinu označenou obecně jako Acari a v případě rodu *Myodes* se mi podařilo po použití glm (model s Poissonovým rozdělením) nalézt pouze slabý trend pro závislost mezi počtem alel a parazitů (Obr. 10, sklon regresní přímky = -0,05022, Std. Error = 0.047), který byl statisticky neprůkazný (Pr (>|z|=0,283).

Stejně jsem postupoval i u rodu *Microtus*, kde měla regresní přímka větší sklon (- 0.243, Estimate Std. Error = 0.053), než u *Myodes*, a test byl vysoce průkazný (Pr (>|z|= 4.90e-06). Tyto parametry jsou vidět na grafu glm vytvořeném v R (Obr. 11). Dále jsem se zaměřil na prokázání vlivu množství alel na parazitaci, avšak v tomto případě jsem si stanovil náhodným faktorem rod a druh jedinců, čímž jsem z analýzy vyloučil možnost,

že by byl výsledek ovlivněn druhovou variabilitou. Výsledek byl pozitivní, s hodnotami: ($\Pr(>|z|) = 0,002$), (sklonu regresní přímky = $-0,112$) a (Estimate Std. Error = $0,036$). V případě, kdy jsem do analýz rozdělil rod *Microtus* na druhy *agrestis* a *arvalis*, vyšly oba modely neprůkazně. Podobná situace nastala v případě srovnání jednotlivých čeledí ektoparazitů s celým zkoumaným datasetem, kdy výsledky pro čeleď Neotrombiculidae byly neprůkazné ($\Pr(>|z|) = 0,677$) a měly téměř nulový sklon regresní přímky (Estimate Std. Error = $-0,01978$). U čeledi Laelapidae byla situace lepší, sklonu přímky byl strmější (sklon regresní přímky = $-0,32852$), (Estimate Std. Error = $0,05793$) a výsledek průkazný ($\Pr(>|z|) = 1,42e-08$). Tyto dva modely jsou graficky znázorněny v příloze (Př. 7).



Obr. 11: Sledovaný trend regresní přímky sledující korelaci mezi počtem alel v populaci rodu *Myodes* a jeho parazitickým zatížením.



Obr. 12: Výsledný trend regresní přímky sledující korelaci mezi počtem alel jedinců rodu *Microtus* a jejich parazitickým zatížením.

5 Diskuze

Výsledky parazitologické analýzy charakterizovaly míru zamoření jedinců v populacích různými parazity, a i přes možné nepřesnosti (viz níže) poskytla tato data základ pro následnou analýzu ve vztahu k MHC alelám. Našemu vzorkování na parazity, chyběla lepší přesnost ve sběru dat. Jedním z hlavních důvodů bylo použití sklapovacích pastí. Pro studii prevalence ektoparazitů by se bezpochyby více hodily pasti k odchytu živých jedinců, jako použili například ve svém výzkumu Harris a spol., (2009). Hlavní výhodou by byla možnost podchytit i ektoparazity, kteří po smrti hostitele opouští tělo. Nicméně při využití vzorků a dat z databáze odchytu hlodavců naší laboratoře, nebylo jediným cílem získat přehled o ektoparazitech na hrabošovitých, ale také určit parazitické zatížení populací rodem *Eimeria*, v tomto případě, by tedy bylo použití živých pastí komplikované a společně s polními podmínkami odchytů v zahraničí bez přístupu do laboratoře téměř nemožné.

V případě prevalence rodu *Eimeria* nacházejícím se ve střevech hrabošovitých, bych řekl, že výsledky jichž jsme dosáhli, jsou spolehlivé. Obecně jsou studie na téma endoparazitů a variabilita MHC alel častější, viz studie střevní hlístice u *Myodes glareolus* Kloch a spol. (2010), či výzkum vlivu na přežití zimního období u *Microtus oeconomus* v závislosti na nakažení endoparazitů *Cestoda* a *Babesia* a jejich interakce s příslušnými MHC alelami (Kloch a spol., 2012). V případě řádu Ixodida se je třeba brát výsledky s určitou rezervou, z důvodů které jsem uvedl výše, a stejnou opatrnost musíme aplikovat při práci s výsledky s ostatními ektoparazity řádu Acari. I přesto, jsme však získali alespoň základní přehled o ektoparazitické fauně v rámci druhů a v některých případech i přímo populací o velikosti až 22 jedinců. Následná infestace hostitelů dvěma druhy ektoparazitů v rámci druhů je zobrazena histogramy (Obr. 6 – 8) a doplněna pro lepší orientaci. U *Myodes glareolus* a *Microtus agrestis* bylo zaznamenáno nejvíce zastoupených jedinců s jedním parazitem, avšak zahrneme-li do výsledků i neinfikované jedince, výsledný obraz je jiný, velký podíl jedinců byl totiž naprosto bez ektoparazitů. Způsobeno to mohlo být mnoha faktory, čas od smrti jedince, počasí, roční období i lidský faktor. V budoucnu by se mohly pro zlepšení reálného náhledu na parazitologickou zátěž populací osvědčit plánované výjezdy více lidí s živými pastmi.

Od původního plánu mé práce, jimž bylo sekvenování vzorků jedinců rodu *Apodemus* pomocí metody Illumina (Illumina MiSeq) s primery použitými na sekvenaci Musolfem a spol (2004), jsme upustili po několika obměnách PCR cyklu a po zjištění, že dané primery nasedají v ne příliš konzervativním místě sekvence. Rozhodli jsme se tedy mou práci tedy pojmout jinak a zaměřit se spíše na vztah mezi parazitem a rodovou bohatostí MHC alel. K tomuto účelu nám pomohl již zkompletovaný dataset vytvořený školitelem-specialistou, který jsem si upravil pro své potřeby.

Předchozí studie již potvrdily teorie o tom, že u norníka rudého se vyskytují multiplikované kopie MHC-DRB II lokusu (Scherrman a spol., 2014). Babik a Radwan (2007) našli důkaz o existenci dvou lokusů a Axner a Sommer (2007) až čtyř, což by znamenalo, že možný počet alel v jedincích by se vyšplhal až na osm. V mé práci jsem ale narazil i na jedince s 9 alelami. I pro to už však je vysvětlení, Babik a spol (2009) za pomoci 454 sekvenování narazil i na jedince s 18 DRB alelami, což zvýšilo možný počet lokusů až na devět pro jedince. V našich populacích jsme však nenalezli žádného jedince s vyšším počtem alel než je deset. Mohlo by to být způsobeno metodickými rozdíly mezi studii, tedy nižším počtem genotypovaných vzorků, nebo odlišnými kritérii při filtraci MHC alel od sekvenačních chyb. Nebo tyto rozdíly odrážejí přirozenou variabilitu populací. Množství alel se ale může měnit mezi odlišnými populacemi v důsledku jiných nároků na obranyschopnost před lokálními patogeny, jak se ukázalo v případě korelace mezi MHC variabilitou a druhovou bohatostí hlístic u hlodavců (Bellocq a spol., 2008). Zajímavým faktem bylo i zjištění, že počty alel u námi zkoumaných druhů blízce sledovalo Gaussovo rozdělení, výjimkou byli zástupci druhu *Microtus agrestis*, u kterých to ale mohlo být zapříčiněno nižším počtem osekvenovaných vzorků.

Fylogenetická analýza MHC-DRB sekvencí nám naznačila působení mezidruhového polymorfismu. Nejen, že se jednotlivé sekvence různých druhů klastrují společně, ale existují zde přímo i sdílené alely mezi oběma druhy. Avšak i přesto, že se alely různých druhů klastrují společně, stále je znát vliv rodu či druhu na lokalizaci ve fylogenetickém zobrazení. Tedy na rozdíl od fylogenetické analýzy, kterou provedl Musolf a spol (2004) a kdy zjistil, že se alely neklastrují podle druhů, ale jsou spíše inkorporované mezi druhy. Je však nutno dodat, že autoři se ve své studii zabývali evolučním vztahem MHC-DRB alel u rodu *Apodemus* a srovnávali ho ostatními hlodavci.

Pro určení jakému typu selekce podléhají sekvence, se tradičně používá metoda NGJC. Podrobili jsme tedy sekvence testu na oba typy selekce a zjistili, že u obou rodů *Myodes* i *Microtus* se projevuje purifikující selekce. Toto zjištění není ojedinělé, výzkumy MHC-DRB regionu narazily na podobné výsledky u *Myodes glareolus* (Axtner a Sommer., 2007; Babik a Radwan., 2007). Ovšem u jiných savců byly tyto výsledky odlišné, příkladem mohou být studie Bernatchez a Landry (2003) či Sommer (2005). Neprůkaznost pozitivní selekce v našich datech také mohla být ovlivněna volbou testu. Scherrman a spol., (2014) se dostali ke stejnému výsledku za použití stejné metody NGJC, avšak když použili více pokročilou Kumarovu metodu, došli k pozitivnímu výsledku. V mé práci jsem také zvolil jednu odlišnou metodu testování selekce u NGJC a to metodu SLAC. Avšak i v tomto případě jsem došel k závěru, že v rámci našeho datasetu lze u obou rodů detekovat pouze negativní purifikující selekci.

S určováním typu selekce úzce souvisí poslední část mé práce a to vztahy MHC alel a ektoparazitů u čeledi Arvicolinae. V případě prokázání závislosti mezi počtem alel a množstvím nalezených ektoparazitů na jedinci by se dalo polemizovat o typu působící selekce - heterozygotní výhody (overdominant selection). A opravdu jsme zjistili, že tento trend se zde vyskytuje, avšak je velmi slabý. Právě v analýze vztahu mezi ektoparazitami a počtem MHC alel, je tato práce v celku unikátní. Ve většině studií se vliv diverzity MHC alel aplikuje spíše na přítomnost endoparazitů. Čistě z praktických důvodů, je to logická volba. Zatímco endoparazité jsou přímo vystaveni působení imunitní odpovědi, efekt na většinu ektoparazitů, kteří nejsou delší dobu prisátí na těle hostitele, je spíše nepřímý. Mezi možné vlivy patří interakce s komplementem u krev sajících parazitů (např. Khattab a spol 2015), nebo možná souvislost mezi MHC podmíněnou fitness jedince a schopností behaviorální obrany před ektoparazitami, jako je preening (Clayton a spol., 2005). U ektoparazitů také existuje mnoho metodických proměnných, které mohou ovlivnit výsledek. Hlavní riziko se vyskytuje již při sběru vzorků (viz první část diskuze). I přesto můžeme konstatovat, že přes možné metodické problémy a pouze slabou závislost mezi sledovanými proměnnými, kterou se podařilo nalézt, měla tato studie význam jako předběžná analýza pro studie s větším počtem jedinců v populacích, případně pro asociační studii mezi infestací ektoparazitami a konkrétními alelami či supertypy MHC-DRB II.

6 Závěr

Cílem této práce bylo analyzovat souvislosti mezi parazitickým zatížením populací druhů (*Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Microtus agrestis*) a jejich MHC variabilitou. K naplnění tohoto cíle sloužily specifické kroky, jejichž účelem bylo zajistit rozbor ektoparazitické situace v daných populacích čeledi Arvicolinae, charakterizovat variabilitu alel MHC-DRB II v populacích a jedincích vybraných druhů a porovnat získaná epidemiologická data s diverzitou MHC alel pro zjištění závislosti. Parazitologická analýza populací odhalila převážný výskyt ektoparazitů dvou čeledí Neotrombiculidae a Laelapidae a v menší míře také řádu Ixodida. Míry infestace těmito parazity byly zaneseny v tabulce (Tab. 4) ve výsledcích. Skutečné vypovídající hodnoty byly získány z populací, kde bylo odchyceno alespoň 10 jedinců od jednoho druhu. Což z výpočtů vyřadilo většinu populací, hlavně u států, kde byly odchyty prováděny na několika různých lokalitách. Nicméně statisticky odpovídající hodnoty byly získány pro dvě populace *Myodes glareolus* a stejný počet pro *Microtus arvalis*, kdy jedna z prověřovaných populací *Myodes glareolus* byla naprosto imunní. Analýza MHC diverzity byla provedena na sekvencích výše zmíněných druhů a dále srovnána s výsledky z ostatních studií, kde byla zaznamenána určitá podobnost. Jednotlivé druhy měly velmi podobné rozložení alel na jedince, které se blízce podobalo Gaussovu rozdělení. Stejně tak si byly podobné i v průměrném počtu alel na jedince. Fylogenetický rozbor pak přinesl náznak sdíleného mezidruhového polymorfismu, kdy se vyskytovaly mimo druhově specifickými alelami i alely sdílené. Bohužel i přes značnou různorodost alel jsme neprokázali vliv pozitivní selekce. Z našeho testování vyplynulo, že cílené alely jsou především pod vlivem selekce purifikující. Přesto tato analýza, tím že prokázala působení selekce na MHC diverzitu ve studovaných populacích hlodavců, poskytla důležitý podklad pro poslední dílčí úkol spojující předchozí analýzy. Tím bylo zjistit možnou závislost mezi množstvím alel v jedincích a počtem jejich parazitů. Testována byla jen jedna skupina parazitů s dostatečným počtem vzorků (Acari), která obsahovala pouze jedince z čeledí Neotrombiculidae a Laelapidae. Tato analýza poskytla pozitivní výsledek pro dataset spojující data ze všech tří hostitelských druhů. Další analýzy pro jednotlivé rody prokázaly tento trend i pro rod *Myodes*. Dílčí analýzy jednotlivě zastoupených parazitů byly neprůkazné. V budoucnu by se tedy dalo pokračovat

například srovnáním osekvenovaných částí u hrabošovitých s genetickou informací získanou z jejich ektoparazitů. Případně porovnat složení peptidů MHC sekvencí v ABS a sloučit podobné sekvence do skupin tzv. supertypů.

7 Zdroje

Abu-Madi, M.A., Behnke, J.M., Lewis, J.W., Gilbert, F.S., (2000). Seasonal and site specific variation in the component community structure of intestinal helminthes in *Apodemus sylvaticus* from three contrasting habitats in south-east England. *J. Helminthol.* 74, 7–15.

Alcaide, M. (2010). On the relative roles of selection and genetic drift in shaping MHC variation. *Molecular Ecology*, 19(18), 3842–4.

Altizer, S., Nunn, C. C. L., Thrall, P. P. H., Gittleman, J. L. J., Antonovics, J., Cunningham, A. A. a., ... Pulliam, J. J. R. C. J. (2003). Social organization and parasite risk in mammals: Integrating theory and empirical studies. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 517–547. <http://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.030102.151725>.

Axtner J, Sommer S (2007) Gene duplication, allelic diversity, selection processes and adaptive value of MHC class II DRB genes of the bank vole, *Clethrionomys glareolus*. *Immunogenetics* 59:417–426.

Axtner, J., & Sommer, S. (2011). Infection, Genetics and Evolution Heligmosomoides polygyrus infection is associated with lower MHC class II gene expression in *Apodemus flavicollis*: Indication for immune suppression? *Infection, Genetics and Evolution*, 11(8), 2063–2071. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.020>.

Babik, W., & Radwan, J. (2007). Sequence diversity of MHC class II DRB genes in the bank vole *Myodes glareolus*, 52(3), 227–235.

Babik W, Taberlet P, Ejsmond MJ, Radwan J (2009) New generation sequencers as a tool for genotyping of highly polymorphic multilocus MHC system. *Mol Ecol Resour* 9:713–719.

Bernatchez, L., & Landry, C. (2003). MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology*, 16(3), 363–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635837>.

Bowen L, Aldridge BM, DeLong R, Melin S, Buckles EL, et al. (2005). An immunogenetic basis for the high prevalence of urogenital cancer in a free-ranging population of California sea lions (*Zalophus californianus*) *Immunogenetics*; 56:846–848. doi: 10.1007/s00251-004-0757.

BRYAN CLARKE & D. R. S. KIRBY (1966). Maintenance of Histocompatibility Polymorphisms, *Nature*, 211, 999 – 1000.

Clayton, D.H., Moyer, B.R., Bush, S.E., Jones, T.G., Gardiner, D.W., Rhodes, B.B., Goller, F., 2005. Adaptive significance of avian beak morphology for ectoparasite control. *Proc. Biol. Sci.* 272, 811–817.

DNeasy Blood and Tissue Handbook (2006). Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues, (Spin-Column Protocol), 28 – 30.

Egid K, Brown JL, 1989. The major histocompatibility complex and female mating preferences in mice. *Anim Behav* 38:548-550.

Figueroa, F., & Klein, J. (1986). The evolution of MHC class II genes. *Immunology Today*, 7(3), 78–81. [http://doi.org/10.1016/0167-5699\(86\)90089-7](http://doi.org/10.1016/0167-5699(86)90089-7).

Gill, T. J. (1992). Influence of MHC and MHC-linked genes on reproduction. *American Journal of Human Genetics*, 50(1), 1–5.

Gitlin, A. D., Mayer, C. T., Oliveira, T. Y., Shulman, Z., Jones, M. J. K., Koren, A., & Nussenzweig, M. C. (2015). T cell help controls the speed of the cell cycle in germinal center B cells. *Science*, 349(6248), 643–646. <http://doi.org/10.1126/science.aac4919>.

Hansen, M. M., Skaala, Ø., Jensen, L. F., Bekkevold, D., & Mensberg, K. L. D. (2007). Gene flow, effective population size and selection at major histocompatibility complex

genes: Brown trout in the Hardanger Fjord, Norway. *Molecular Ecology*, *16*(7), 1413–1425. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03255.x>.

Harris, P. D., Paziewska, A., Zwolińska, L., & Siński, E. (2009). Seasonality of the ectoparasite community of woodland rodents in a Mazurian Forest, Poland. *Wiadomości Parazytologiczne*, *55*(4), 377–388. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209812>.

Heath, W. R., Carbone, F. R., Walter, T., Hall, E., & Royal, P. O. (2001). Heath et al, cross-presentation in viral immunity and self-tolerance, *nature reviews* 2001, *1*(November), 126–135. <http://doi.org/10.1038/35100512>.

Hedrick, P. W. (1999). Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, *53*(2), 313–318. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.488>.

Hedrick, P. W. (2001). Conservation genetics : where are we now ? *Trends in Ecology & Evolution*, *16*(11), 629–636. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04691.x>.

Hedrick, P. W., & Black, F. L. (1997). HLA and Mate Selection: No Evidence in South Amerindians. *The American Journal of Human Genetics*, *61*(3), 505–511. <http://doi.org/10.1086/515519>.

Hosomichi, K., Miller, M. M., Goto, R. M., Wang, Y., Suzuki, S., Kulski, J. K., ... Shiina, T. (2008). Contribution of mutation, recombination, and gene conversion to chicken MHC-B haplotype diversity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *181*(5), 3393–3399. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1090026>.

Hughes, a L., & Nei, M. (1989). Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(3), 958–62. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=286598&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Hughes, A. L., & Yeager, M. (1998). Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annual Review of Genetics*, 32, 415–35. <http://doi.org/10.1146/annurev.genet.32.1.415>.

Hughes, A. L., & Nei, M. (1992). Maintenance of MHC polymorphism. *Nature*, 355(6359), 402–403. <http://doi.org/10.1038/355402b0>.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al (2001) Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition, New York: Garland Science.

Jeffreys, A. J., & May, C. a. (2004). Intense and highly localized gene conversion activity in human meiotic crossover hot spots. *Nature Genetics*, 36(2), 151–6. <http://doi.org/10.1038/ng1287>.

Jones, E. Y., Fugger, L., Strominger, J. L., & Siebold, C. (2006). MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nature Reviews. Immunology*, 6(4), 271–282. <http://doi.org/10.1038/nri1805>.

Jonna B. Westover, Thayne L. Sweeten, Michael Benson, Patricia Bray-Ward and Anthony R. Torres (2011). Immune Dysfunction in Autism Spectrum Disorder, DOI: 10.5772/22318.

Khattab, A., Barroso, M., Miettinen, T., Meri, S., 2015. Anopheles Midgut Epithelium Evades Human Complement Activity by Capturing Factor H from the Blood Meal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003513.

Kimura (1983). The neutral theory of molecular evolution: a review, 401–402.

Kloch, A., Babik, W., Bajer, A., Siński, E., & Radwan, J. (2010). Effects of an MHC-DRB genotype and allele number on the load of gut parasites in the bank vole *Myodes glareolus*. *Molecular Ecology*, 19 Suppl 1, 255–65. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04476.x>.

Kloch, A., Baran, K., Buczek, M., Konarzewski, M., & Radwan, J. (2012). MHC influences infection with parasites and winter survival in the root vole *Microtus oeconomus*. *Evolutionary Ecology*, 27(3), 635–653. <http://doi.org/10.1007/s10682-012-9611-1>.

Leinders-Zufall, T., Brennan, P., Widmayer, P., S, P. C., Maul-Pavicic, A., Jäger, M., ... Boehm, T. (2004). MHC Class I Peptides as Chemosensory Signals in the Vomeronasal Organ. *Science*, 306(5698), 1033–7. <http://doi.org/10.1126/science.1102818>.

Lighten J, van Oosterhout C, Paterson IG, McMullan M, Bentzen P (2014) Ultra-deep Illumina sequencing accurately identifies MHC class IIb alleles and provides evidence for copy number variation in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Molecular Ecology Resources*, 14, 753–767.

Lindsay, S. J., Khajavi, M., Lupski, J. R., & Hurles, M. E. (2006). A chromosomal rearrangement hotspot can be identified from population genetic variation and is coincident with a hotspot for allelic recombination. *American Journal of Human Genetics*, 79(November), 890–902. <http://doi.org/10.1086/508709>.

Manning C.J, Wakeland E.K, Potts W.K (1992). Communal nesting patterns in mice implicate MHC genes in kin recognition. *Nature*. 360, 581–583. [doi:10.1038/360581a0](https://doi.org/10.1038/360581a0).

Mayer a Nyland, Immunology chapter 10, [<http://www.microbiologybook.org/bowers/mhc.htm>].

Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819–26. <http://doi.org/10.1038/nature06246>.

Mhc, C., Penn, D. J., & City, S. L. (2002). Major Histocompatibility.

Milinski, M. (2006). The major histocompatibility complex, sexual selection, and mate choice. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 37(2006), 159–186. <http://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110242>.

Miller, H. C., & Lambert, D. M. (2004). Genetic drift outweighs balancing selection in shaping post-bottleneck major histocompatibility complex variation in New Zealand robins (Petroicidae). *Molecular Ecology*, *13*(12), 3709–21. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02368.x>.

Muslof, K., Meyer-Lucht, Y., Sommer, S. (2004) Evolution of MHC-DRB class II polymorphism in the genus *Apodemus* and a comparison of DRB sequences within the family Muridae (Mammalia: Rodentia). *Immunogenetics*, *56*, 420-426. <http://doi.org/0.1007/s00251-004-0715-9>.

Nei, M., Gu, X., & Sitnikova, T. (1997). Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(15), 7799–806. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=33709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Ober, C., Weitkamp, L. R., Cox, N., Dytch, H., Kostyu, D., & Elias, S. (1997). HLA and mate choice in humans. *American Journal of Human Genetics*, *61*, 497–504. <http://doi.org/10.1086/515511>.

Paterson S, Wilson K, Pemberton JM (1998). Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries* L.) *Evol*; *95*:3714–3719.

Penn, D. J., & Potts, W. K. (1999). The Evolution of Mating Preferences and Major Histocompatibility Complex Genes. *The American Naturalist*, *153*(2), 145–164. <http://doi.org/10.1086/303166>.

PETER C. DOHERTY & ROLF M. ZINKERNAGEL, Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. Holley, W. (1975). © 1975 Nature Publishing Group.

Prim B. Singh, Richard E. Brown & Bruce Roser (1987). MHC antigens in urine as olfactory recognition cues. *Nature* *327*, 161 - 164 (14 May 1987); doi:10.1038/327161a0.

Rammensee, H. G., Falk, K., & Rötzschke, O. (1993). MHC molecules as peptide receptors. *Current Opinion in Immunology*, 5(1), 35–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8437623>.

Relle, M., & Schwarting, A. (2012). Role of MHC-linked susceptibility genes in the pathogenesis of human and murine lupus. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/584374>.

Rock, K. L., Reits, E., & Neefjes, J. (2016). Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends in Immunology*, 37(11), 724–737. <http://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.010>.

Rudolph, M. G., Stanfield, R. L., & Wilson, I. a. (2006). How Tcrs Bind Mhcs, Peptides, and Coreceptors. *Annual Review of Immunology*, 24, 419–466. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115658>.

Sexual selection and the descent of man, 1871–1971 (pp. 136–179). London Heinemann Press.

Scherman, K., Råberg, L., & Westerdahl, H. (2014). Positive selection on MHC class II DRB and DQB genes in the bank vole (*Myodes glareolus*). *Journal of Molecular Evolution*, 78(5), 293–305. <http://doi.org/10.1007/s00239-014-9618-z>.

Singh, P. B. (1999). The present status of the “carrier hypothesis” for chemosensory recognition of genetic individuality. *Genetica*, 104(3), 231–233. <http://doi.org/10.1023/A:1026475118901>.

Sommer, S. (2005). The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology*, 2, 16. <http://doi.org/10.1186/1742-9994-2-16>.

Srivastava, P. (2002). Roles of Heat-Shock Proteins in Innate and Adaptive Immunity, 2(March). <http://doi.org/10.1038/nri749>.

Stephen J. Gould, James E. K. Hildreth, Amy M. Booth (2004). THE EVOLUTION OF ALLOIMMUNITY AND THE GENESIS OF ADAPTIVE IMMUNITY . *The Quarterly Review of Biology*, 82(1), 3–8. <http://doi.org/10.1086/516403>.

Stroynowski, I. (1990). Molecules Related To Class-I Major Histocompatibility, 2.

Takahata, N., & Nei, M. (1990). Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics*, 124(4), 967–978.

Trinchieri, G., & Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Reviews. Immunology*, 7(3), 179–90. <http://doi.org/10.1038/nri2038>.

Trivers, R. L. (1972). Parental investment and sexual selection. In B. Campbell (Ed.),

van Oosterhout, C. (2009). Trans-species polymorphism, HLA-disease associations and the evolution of the MHC. *Communicative and Integrative Biology*, 2(5), 408–410. <http://doi.org/10.4161/cib.2.5.8765>.

Wakeland, E. K., Boehme, S., She, J. X., Lu, C. C., McIndoe, R. A., Cheng, I., ... Potts, W. K. (1990). Ancestral polymorphism of MHC class II genes: divergent allele advantage. *Immunol Res*, 9, 115–122.

Wegner K. M., Reusch T. B. H., Kalbe M. (2003). Multiple parasites are driving major histocompatibility complex polymorphism in the wild. *J. Evol. Biol.* 16, 224–232 (doi:10.1046/j.1420-9101.2003.00519.x).

Werner, C., Thiruchandurai V. Rajan (1992). Characterization of a myosin heavy chain gene from *Brugia malayi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 50 (1992) 261–268.

Winternitz, J. C., Wares, J. P., Yabsley, M. J., & Altizer, S. (2014). Wild cyclic voles maintain high neutral and MHC diversity without strong evidence for parasite-mediated selection. *Evolutionary Ecology*, 28(5), 957–975. <http://doi.org/10.1007/s10682-014-9709-8>

Wong, F. S., & Janeway, C. a. (1999). The role of CD4 vs. CD8 T cells in IDDM. *Journal of Autoimmunity*, 13(3), 290–5. <http://doi.org/10.1006/jaut.1999.0322>.

Yamazaki, B. Y. K., Boyse, E. a, Thaler, H. T., & Mathieson, B. J. (1976). CONTROL OF MATING PREFERENCES IN MICE BY GENES IN THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX * While observing AKR and AKR backcross mice being bred to produce an AKR-H-2 b congenic mouse strain , one of us (J . B .) noticed that homozygous H- 2 b c ~ d were m, 144, 1324–1335.

Přílohy

Př. 1: Tabulka zkoumaných jedinců rodů *Myodes* a *Microtus* s jejich ekto- a endoparazitickým zatížením.

Vzorek	Rod a druh	Lokace	Hoplopleura dospělec	Hoplopleura larva	Ixodidae dospělec	Ixodidae larva	Lael.	Neotrombiculidae	Acari (bez Ixodidae)	Acari celkem	Eimerie
B115/14	MiAg	CZSCLV	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	3	1
D28/14	MiAg	CZSCLV	1	0	1	0	5	0	5	6	1
PB/14	MiAg	CZSCLV	0	0	1	0	7	0	7	8	1
32/15 MAGR E	MiAg	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
02/14 (Magr) E	MiAg	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
04/14 (Magr) neg.	MiAg	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
09/14 (Magr) E	MiAg	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
11/14 (Magr) E	MiAg	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B1Magr E	MiAg	B1	0	0	0	0	4	10	14	14	1
B2Magr 1 V	MiAg	B1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
B2Magr 2 E	MiAg	B1	0	0	0	0	0	8	8	8	1
B2Magr 3 E	MiAg	B1	0	0	0	0	0	4	4	4	1
B2Magr 4 neg.	MiAg	B1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
B2Magr 5 E	MiAg	B1	0	0	0	0	1	1	2	2	1
B2Magr 6 neg.	MiAg	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2Magr 7 E	MiAg	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B3Magr 1 E	MiAg	B1	0	0	0	0	2	2	4	4	1
B3Magr 2 neg.	MiAg	B1	0	0	0	0	1	1	2	2	0
B4Magr 2 E	MiAg	B1	0	0	3	0	0	0	0	3	1
B4Magr 3 neg.	MiAg	B1	0	0	1	1	0	0	0	2	0
B4Magr 4 neg.	MiAg	B1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
B4Magr 5 E	MiAg	B1	0	0	0	0	1	5	6	6	1
B4Magr 6 neg.	MiAg	B1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
B6Magr 1 neg.	MiAg	B1	0	0	3	0	0	0	0	3	0
B7Magr 1 neg.	MiAg	B1	0	0	0	0	1	1	2	2	0
B7Magr 10 neg.	MiAg	B1	0	0	0	0	1	2	3	3	0
B7Magr 2 E + V	MiAg	B1	1	1	0	1	0	0	0	1	1
B7Magr 4 E	MiAg	B1	0	0	1	0	1	2	3	4	1
B7Magr 5 E	MiAg	B1	0	0	0	0	16	0	16	16	1
B7Magr 6 neg.	MiAg	B1	0	0	0	0	1	1	2	2	0
B7Magr 7 E + V	MiAg	B1	0	0	0	1	1	3	4	5	1
B7Magr 9 E	MiAg	B1	0	0	1	0	2	7	9	10	1
6HU1MAGR E x	MiAg	MAD1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
MAGR2 (CHE2E2)	MiAg	CH1	1	3	NA	NA	NA	NA	NA	9	1
MAGR1 (CH2V15)	MiAg	CH1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MA3 (CH2V11)	MiAg	CH1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	28	0
MA2 (CH2V13)	MiAg	CH1	49	32	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
MA4 (CH2E26)	MiAg	CH1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	16	0
MA5 (CH2E8)	MiAg	CH1	1	0	NA	NA	NA	NA	NA	18	0
MA1 (CH2V16)	MiAg	CH1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
MA6 (CH3V1)	MiAg	CH1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	4	0
ML1	MiAr	CZSCLV	0	0	0	0	4	0	4	4	1
ML2	MiAr	CZSCLV	0	0	0	0	21	0	21	21	0
ML3	MiAr	CZSCLV	0	0	0	0	3	0	3	3	1
ML4	MiAr	CZSCLV	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	6	1
ML5	MiAr	CZSCLV	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	45	0
ML6	MiAr	CZSCLV	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	20	0
ML7	MiAr	CZSCLV	46	16	NA	NA	NA	NA	NA	4	1
ML8	MiAr	CZSCLV	3	1	NA	NA	NA	NA	NA	6	0

ML9	MiAr	CZSCLV	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	4	0
ML10	MiAr	CZSCLV	4	0	NA	NA	NA	NA	NA	5	0
ML11	MiAr	CZSCLV	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	13	0
StrMa23	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMa24	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMa25	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMa26	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	1
StrMa27	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMa28	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMa29	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMa30	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMa31	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMa32	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	1
StrMa33	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMa34	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMa35	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	1
StrMa36	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMa37	MiAr	CZZCSR	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
StrMa38	MiAr	CZZCSR	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	2	0
StrMa39	MiAr	CZZCSR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
StrMa40	MiAr	CZZCSR	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
StrMa41	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	1
StrMa42	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMa43	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMa44	MiAr	CZZCSR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
StrMa1	MiAr	CZZCSR	0	2	1	0	3	2	5	6	1
StrMa2	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	2	2	2	1
StrMa3	MiAr	CZZCSR	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	2	0
StrMa4	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMa5	MiAr	CZZCSR	8	4	0	2	0	0	2	4	0
StrMa6	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2StrMa1	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2StrMa2	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2StrMa6	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2StrMa7	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2StrMa8	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2StrMa9	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2StrMa11	MiAr	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1MA_CB	MiAr	CZJCCB	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2MA_CB	MiAr	CZJCCB	0	0	0	0	3	0	3	3	1
3MA_CB	MiAr	CZJCCB	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
4MA_CB	MiAr	CZJCCB	0	0	0	0	2	0	2	2	1
5MA_CB	MiAr	CZJCCB	1	3	0	0	0	0	0	0	1
6MA_CB	MiAr	CZJCCB	0	0	0	0	0	0	0	0	1
7MA_CB	MiAr	CZJCCB	0	0	0	0	2	0	2	2	1
8MA_CB	MiAr	CZJCCB	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 PAÚ (MA)	MiAr	CZJCCB	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 PAÚ (MA)	MiAr	CZJCCB	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
4 PAÚ (MA)	MiAr	CZJCCB	0	0	0	0	0	0	0	0	1
8 PAÚ (MA)	MiAr	CZJCCB	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1MA_V	MiAr	CZJCCH	1	2	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
2MA_V	MiAr	CZJCCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3MA_V	MiAr	CZJCCH	0	0	0	0	0	0	0	0	1
4MA_V	MiAr	CZJCCH	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
6MA_V	MiAr	CZJCCH	0	0	0	0	0	0	0	0	1
8MA_V	MiAr	CZJCCH	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
13MA_V	MiAr	CZJCCH	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
17MA_LUŽ	MiAr	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18MA_LUŽ	MiAr	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23MA_LUŽ	MiAr	CZJCLUZ	0	0	0	1	3	0	3	4	1

26MA_LUŽ	MiAr	CZJCLUZ	0	0	0	0	3	0	3	3	1
27MA_LUŽ neg.	MiAr	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
33/15 MA E	MiAr	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
35/15 MA E x	MiAr	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1
48/15 MA E	MiAr	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
56/15 MA E	MiAr	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1
NJ10	MiAr	CZSMNJ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
NJ15	MiAr	CZSMNJ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
NJ19	MiAr	CZSMNJ	2	1	0	0	0	0	0	0	0
NJ21	MiAr	CZSMNJ	0	4	0	0	0	0	0	0	0
NJ22	MiAr	CZSMNJ	0	0	0	0	0	0	0	0	1
NJ32	MiAr	CZSMNJ	1	2	NA	NA	NA	NA	NA	2	0
NJ33	MiAr	CZSMNJ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
NJ34	MiAr	CZSMNJ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
NJ35	MiAr	CZSMNJ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
NJ12	MiAr	CZSMNJ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
NJ88	MiAr	CZSMNJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5HU1MA neg.	MiAr	MAD1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6HU1MA E	MiAr	MAD1	0	0	1	1	1	11	12	14	1
6HU2MA E x	MiAr	MAD1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
6HU3MA E	MiAr	MAD1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
6HU4MA neg.	MiAr	MAD1	0	0	0	0	4	0	4	4	0
HUA14Mar1 V x	MiAr	MAD1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
HUA14Mar2 neg.	MiAr	MAD1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
HUA14Mar3 V	MiAr	MAD1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
HUCMar 4 E	MiAr	MAD1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
HUCMar 5 neg.	MiAr	MAD1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
HUCMar 6 E x	MiAr	MAD1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
HUCMar 7 E x	MiAr	MAD1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
HUD14Mar8 E	MiAr	MAD1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
HUD14Mar9 neg.	MiAr	MAD1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
11MA/PL	MiAr	P1	0	0	0	0	4	2	6	6	0
13MA/PL	MiAr	P1	0	0	0	0	1	1	2	2	0
92MA/PL	MiAr	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
96MA/PL	MiAr	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	9	1
D103	MyoGl	CZSCLV	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
D2	MyoGl	CZSCLV	1	0	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
B17/14	MyoGl	CZSCLV	1	3	NA	NA	NA	NA	NA	3	1
C40/14	MyoGl	CZSCLV	0	0	1	0	3	0	3	4	1
PPL2/14	MyoGl	CZSCLV	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	1
CGČJ1/14	MyoGl	CZSCLV	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	1
C36	MyoGl	CZSCLV	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrClgl23	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrClgl24	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrClgl25	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	1
StrClgl26	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrClgl27	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrClgl28	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrClgl29	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrClgl31	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrClgl32	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMgl1	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMgl2	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMgl3	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMgl4	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMgl5	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMgl6	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMgl7	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StrMgl8	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2StrMgl2	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2StrMgl3	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2StrMgl5	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2StrMgl6	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 CG/J	MyoGl	CZSCJA	1	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
3 CG/J	MyoGl	CZSCJA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6 CG/J	MyoGl	CZSCJA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7 CG/J	MyoGl	CZSCJA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4J	MyoGl	CZSCJA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5J	MyoGl	CZSCJA	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	4	0
7J	MyoGl	CZSCJA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2J	MyoGl	CZSCJA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
3J	MyoGl	CZSCJA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5J	MyoGl	CZSCJA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10J	MyoGl	CZSCJA	4	2	0	0	0	0	0	0	0
11J	MyoGl	CZSCJA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12J	MyoGl	CZSCJA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16J	MyoGl	CZSCJA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72(MG)	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
5CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
6CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	3	3	3	1
8CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
9CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
11CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
12CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
20CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	2	0
22CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
33CG_LUŽ neg.	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	4	0
35CG_LUŽ E	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
37CG_LUŽ E	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	5	1
2/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
3/15 CG E x	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
5/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1
8/15 CG E x	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1
12/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
25/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
26/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27/15 CG E x	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1
29/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
30/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
31/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
34/15 CG E x	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1
36/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
40/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1
44/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
47/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1
51/15 CG E x	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1
60/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1
61/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1
62/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
67/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1
NJ11	MyoGl	CZSMNJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NJ13	MyoGl	CZSMNJ	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
NJ16	MyoGl	CZSMNJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NJ39	MyoGl	CZSMNJ	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	5	0
NJ40	MyoGl	CZSMNJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NJ41	MyoGl	CZSMNJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NJ20	MyoGl	CZSMNJ	0	0	0	0	0	0	0	0	1

NJ42	MyoGl	CZSMNJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NJ14	MyoGl	CZSMNJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NJ47	MyoGl	CZSMNJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NJ55	MyoGl	CZSMNJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
151	MyoGl	CZJES	0	0	0	0	0	0	0	0	0
152	MyoGl	CZJES	0	0	0	0	0	0	0	0	0
153	MyoGl	CZJES	0	0	0	0	0	0	0	0	0
156	MyoGl	CZJES	0	0	0	0	0	0	0	0	0
157	MyoGl	CZJES	0	0	0	0	0	0	0	0	0
161	MyoGl	CZJES	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	1
162	MyoGl	CZJES	0	0	0	0	0	0	0	0	0
163	MyoGl	CZJES	0	0	0	0	0	0	0	0	0
009/13 (CG) neg.	MyoGl	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
010/13 (CG) E x	MyoGl	R1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	1
011/13 (CG) E + V	MyoGl	R1	3	2	0	0	0	0	0	0	1
014/13 (CG) E x	MyoGl	R1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	1
016/13 (CG) E	MyoGl	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
022/13 (CG) E x	MyoGl	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
025/13 (CG) E	MyoGl	R1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
029/13 (CG) E x	MyoGl	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
03/14 (CG) E	MyoGl	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
030/13 (CG) neg.	MyoGl	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
034/13 (CG) E	MyoGl	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
10/14 (CG) E x	MyoGl	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
15/14 (CG) E x	MyoGl	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
22/14 (CG) E	MyoGl	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
33/14 (CG) E + V	MyoGl	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
HUCMgl 1 E	MyoGl	MAD1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
4C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	5	0
5C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	15	0
6C/PL	MyoGl	P1	0	0	0	0	0	8	8	8	0
7C/PL	MyoGl	P1	0	0	0	0	1	20	21	21	1
8C/PL	MyoGl	P1	0	0	1	0	0	7	7	8	1
10C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	4	0
21C/PL	MyoGl	P1	0	0	0	0	0	2	2	2	0
22C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	11	0
24C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	4	0
25C/PL	MyoGl	P1	0	0	3	0	0	2	2	5	0
26C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	6	0
27C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	13	1
28C/PL	MyoGl	P1	0	0	1	1	0	5	5	7	1
30C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	7	0
31C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	17	0
32C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
33C/PL	MyoGl	P1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
44C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
45C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	17	0
46C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
47C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	11	0
50C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	12	0
51C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	39	0
52A/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	2	0
53C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	18	0
54C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	5	0
55C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	4	0
56C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
57C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
58C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	5	0
59C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
60C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	5	0

62C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	23	0
77C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	20	0
78C/PL	MyoGl	P1	0	0	0	0	0	6	6	6	1
82C/PL	MyoGl	P1	0	1	1	0	1	9	10	11	0
83C/PL	MyoGl	P1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
84C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	11	0
98C/PL	MyoGl	P1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	6	0
F24Mg neg.	MyoGl	F1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	4	0
F26Mg neg.	MyoGl	F1	0	0	2	0	2	2	4	6	0
F27Mg E	MyoGl	F1	0	0	0	0	0	4	4	4	1
F28Mg neg.	MyoGl	F1	0	0	0	0	1	6	7	7	0
F29Mg E	MyoGl	F1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
F32Mg V	MyoGl	F1	0	0	0	0	0	5	5	5	0
F33Mg E	MyoGl	F1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	1
CG1 (CH2V14)	MyoGl	CH1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CG2 (CH2V10)	MyoGl	CH1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	64	0
CG3 (CH2V7)	MyoGl	CH1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	113	0
CG4 (CH2V9)	MyoGl	CH1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	11	0
CG9 (CH3V9)	MyoGl	CH1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	4	1
CG7 (CH3E8)	MyoGl	CH1	0	0	0	0	1	21	22	22	0
CG8 (CH3E5)	MyoGl	CH1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	10	0
CG5 (CH3E4)	MyoGl	CH1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	42	0
CG6 (CH3E14)	MyoGl	CH1	0	0	0	0	2	28	30	30	0
CG10 (CH3V3)	MyoGl	CH1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	35	0
CG11 (CH4V11)	MyoGl	CH1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	2	0

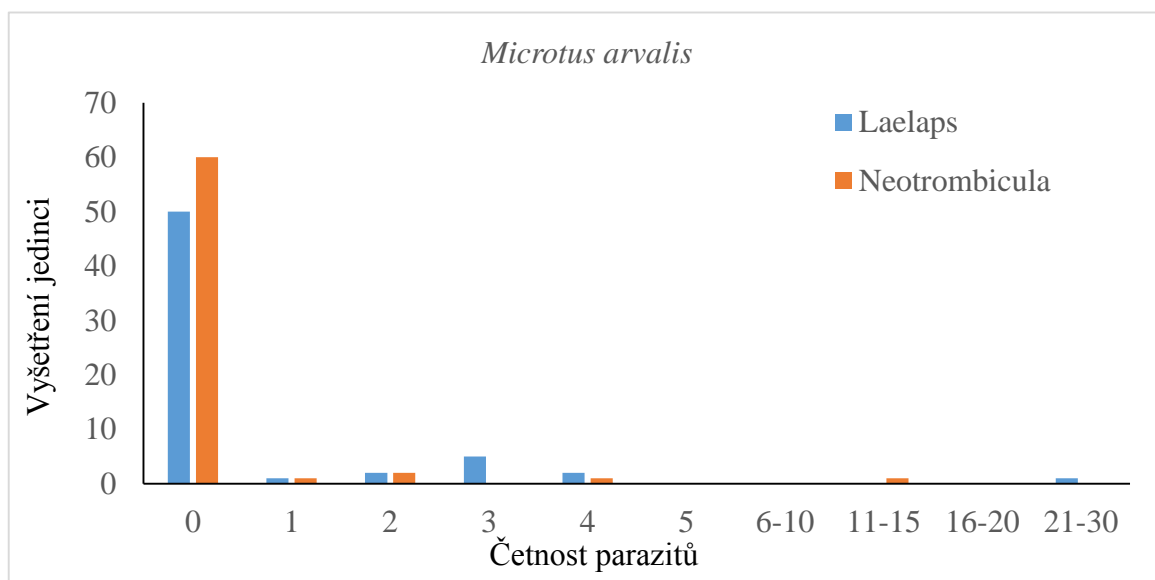
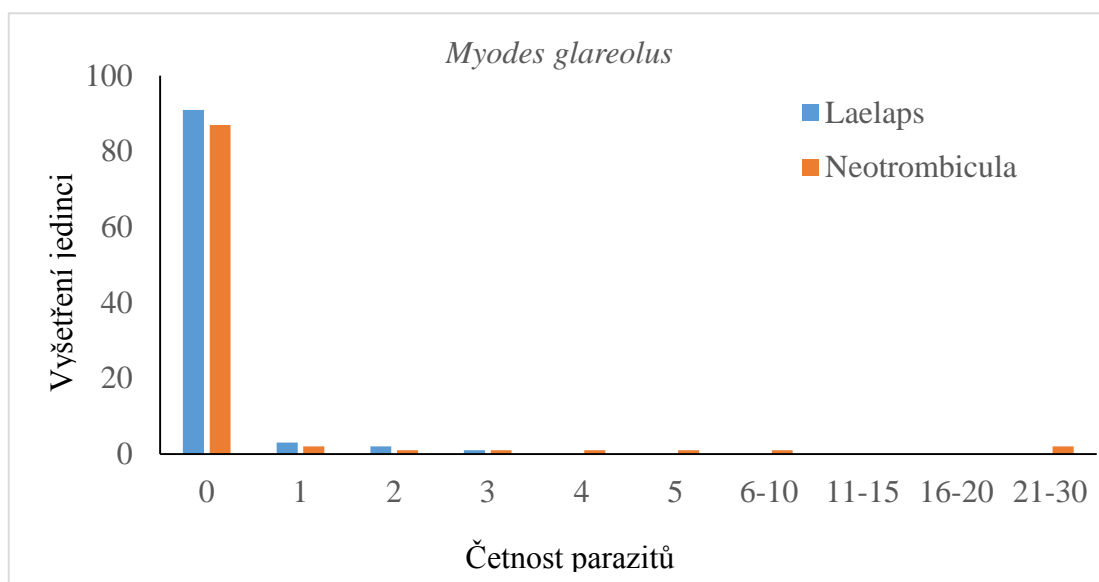
Př. 2: Protokol izolace DNA převzato z DNeasy Blood and Tissue (2006).

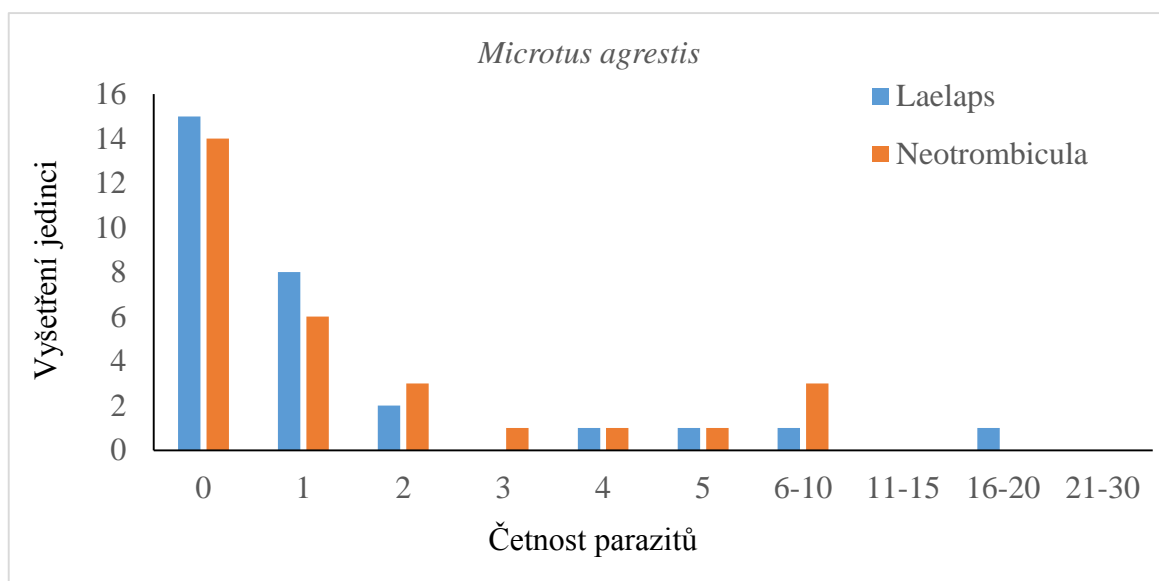
1. Nastříhat tkáň na drobné kousky o hmotnosti 25 mg a umístit je do 1,5 ml mikrozkuřavky a přidat 180 μ l ATL pufru.
2. Přidat 20 μ l Proteinázy K, důkladně promíchat pomocí vortexu a nechat lyzovat v heateru (popřípadě inkbátoru) na 56°C. Při lyzování občasně promíchat. Lyzujeme 1-8 hodin v závislosti na typu tkáně.
3. Vortexovat 15s a přidat 200 μ l AL pufru na vzorek a důkladně zvortexovat. Přidat 200 μ l etanolu (96 – 100%) a znovu zvortexovat.
4. Napipetovat včetně sraženin do Dneasy Mini spin mikrozkuřavky, která je součástí 2 ml sběrné mikrozkuřavky a centrifugovat na 8000 rpm na 1 min. Obsahu i sběrné mikrozkuřavky se zbavit.
5. Umístit DNeasy mini spin mikrozkuřavku do nové 2 ml sběrné mikrozkuřavky a přidat 500 μ l AW1 pufru. Centrifugovat 1 min na 8000 rpm a znovu se zbavit sběrné mikrozkuřavky i obsahu.
6. Umístit DNeasy mini spin mikrozkuřavku do nové 2 ml sběrné mikrozkuřavky a přidat 500 μ l AW2 pufru. Centrifugovat 3 min na 14000 rpm a znovu se zbavit sběrné mikrozkuřavky i obsahu.
7. Umístit DNeasy mini spin mikrozkuřavku do 1,5 ml mikrozkuřavky a přidat 200 μ l AE pufru přímo do membrány DNeasy mini spin mikrozkuřavky. Inkubovat na pokojové teplotě na 1 min a stočit na 8000 rpm.
8. Pro maximum vyizolované DNA několikrát opakovat krok 7.

Př. 3: Složení mastemixu a nastavení cyklu PCR reakce.

Protokol k PCR reakci					
Složení mastermixu	množství (μ l)	Část cyklu	teplota (°C)	čas (min)	cykly
H2O	15,375	Denaturace	95	8:00	1
25 mM MgCL	2	Hybridizace	55	0:30	
dNTP	2	Elongace	72	0:30	
Primer Forward	1	Extense	72	7:00	1
Primer Reverse	1	Chlazení	4	NA	NA
Polymerase Amplitaq gold	0,125	-	-	-	-
DNA	1	-	-	-	-

Př. 4: Úplné histogramy četností parazitů čeledí Neotrombiculidae a Laelapidae u rodů *Myodes* a *Microtus*.





Př. 5: Výchozí tabulka se 155 osekvenovanými jedinci rodů *Myodes* a *Microtus* pro práci v programu R.

Vzorek	Rod a druh	Lokace	Lael.	Neotromb.	Acari (bez Ixodida)	počet alel	total coverage	seq. Codeschar	počet alel	total coverage	seq. Codeschar
D2	MyoGl	CZSCLV	NA	NA	NA	6	7381	c(11, 101, 382, 10, 13, 383)			
B17/14	MyoGl	CZSCLV	NA	NA	NA	3	7744	c(9,10,11)			
C40/14	MyoGl	CZSCLV	3	0	3	3	10381	c(9,10,11)			
PPL2/14	MyoGl	CZSCLV	NA	NA	NA	3	22131	c(71, 132, 10)			
CGČJ1/14	MyoGl	CZSCLV	NA	NA	NA	7	9642	c(51, 71, 132, 10, 12, 18, 6334)			
C36	MyoGl	CZSCLV	0	0	0	2	3567	c(38, 9)			
2StrMgl5	MyoGl	CZZCSR	0	0	0	9	6911	c(613, 36, 11, 134, 704, 63, 12, 2228, 2580)	9	12227	c(613, 36, 134, 11, 704, 63, 2228, 12, 2580)
2J	MyoGl	CZZCJA	NA	NA	NA	2	6900	c(38, 2838)			
3J	MyoGl	CZZCJA	0	0	0	6	28097	c(394, 9, 61, 10, 6039, 525)			
11J	MyoGl	CZZCJA	0	0	0	3	6754	c(101, 382, 383)			
12J	MyoGl	CZZCJA	0	0	0	2	6027	c(36, 63)			
5CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	5	2110	c(71, 138, 11, 13, 10)	6	13228	c(71, 138, 11, 10, 13, 988)
6CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	0	3	3	7	6411	c(38, 36, 63, 6905, 13, 609, 14)			
8CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	6	14050	c(71, 138, 466, 1779, 1780, 988)			
9CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	3	8496	c(524, 394, 9)			
11CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	2	6780	1736:29:00			
20CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	6	17930	c(457, 38, 132, 133, 134, 101)			
22CG_LUŽ	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	6	7046	c(51, 132, 38, 134, 61, 63)			
33CG_LUŽ neg.	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	5	9256	c(38, 133, 134, 1996, 136)			
35CG_LUŽ E	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	7	18164	c(51, 466, 132, 134, 61, 1779, 1780)			
37CG_LUŽ E	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	6	9213	c(38, 11, 10, 63, 13, 609)			
2/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	9	22794	c(51, 132, 11, 134, 61, 10, 13, 18, 2127)			
12/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	6	6884	c(36, 38, 1913, 63, 1749, 609)	6	11049	c(36, 38, 1749, 1913, 63, 609)
26/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	5	4347	c(38, 132, 133, 61, 134)	5	4347	c(38, 132, 133, 61, 134)
29/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	8	7501	c(51, 71, 132, 138, 61, 988, 13, 18)			
30/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	5	7152	c(394, 1776, 38, 4826, 63)			
31/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	5	10712	c(613, 38, 10, 11, 134)			
36/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	2	8801	c(2163, 2916)			
37/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	4	12316	c(132, 38, 101, 63)			
39/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	4	10257	c(51, 132, 61, 134)			
40/15 CG neg.	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	6	9545	c(71, 138, 132, 61, 988, 135)			
41/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	2	9397	c(2100, 4846)			
47/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	5	8323	c(38, 132, 133, 134, 10)	5	14566	c(38, 132, 133, 134, 10)
60/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	7	7183	c(394, 132, 61, 10, 526, 135, 525)			
61/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	5	8146	c(613, 38, 132, 10, 134)			
62/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	NA	NA	NA	6	4447	c(38, 11, 63, 10, 13, 609)			
67/15 CG E	MyoGl	CZJCLUZ	0	0	0	6	12347	c(38, 132, 133, 1996, 134, 10)			
NJ11	MyoGl	CZSMNJ	0	0	0	7	13423	c(38, 71, 138, 3593, 988, 615, 616)			
NJ13	MyoGl	CZSMNJ	NA	NA	NA	5	9425	c(9, 38, 133, 3593, 10)			
NJ39	MyoGl	CZSMNJ	NA	NA	NA	3	10854	c(51, 71, 138)			
NJ42	MyoGl	CZSMNJ	0	0	0	4	11474	c(51, 71, 138, 10)			
NJ14	MyoGl	CZSMNJ	0	0	0	8	8802	c(9, 133, 36, 704, 10, 989, 12, 4930)			
161	MyoGl	CZJES	NA	NA	NA	5	6540	c(613, 38, 11, 614, 63)	5	10520	c(613, 38, 11, 614, 63)
009/13 (CG) neg.	MyoGl	R1	0	0	0	6	7672	c(6611, 36, 467, 10, 18, 6334)			
011/13 (CG) E + V	MyoGl	R1	0	0	0	5	3724	c(465, 466, 36, 467, 383)			
016/13 (CG) E	MyoGl	R1	0	0	0	6	3129	c(36, 467, 2690, 383, 6334, 468)			
022/13 (CG) E x	MyoGl	R1	0	0	0	5	3230	c(63, 38, 36, 609, 14)			
025/13 (CG) E	MyoGl	R1	NA	NA	NA	2	14384	c(36, 467)			
030/13 (CG) neg.	MyoGl	R1	0	0	0	8	10607	c(71, 9073, 138, 36, 133, 467, 989, 383)			

034/13 (CG) E	MyoGl	R1	0	0	0	5	7528	c(71, 138, 133, 36, 467)			
22/14 (CG) E	MyoGl	R1	0	0	0	7	7339	c(71, 138, 133, 10, 134, 989, 6334)			
33/14 (CG) E + V	MyoGl	R1	0	0	0	6	13057	c(132, 38, 10, 134, 63, 609)			
6C/PL	MyoGl	P1	0	8	8	6	4022	c(38, 71, 2077, 2076, 135, 383)	6	4161	c(38, 71, 2076, 2077, 383, 135)
7C/PL	MyoGl	P1	1	20	21	7	3980	c(132, 6564, 36, 101, 63, 135, 14)			
8C/PL	MyoGl	P1	0	7	7	4	9034	c(457, 38, 36, 101)			
21C/PL	MyoGl	P1	0	2	2	4	9340	c(38, 36, 73, 101)			
25C/PL	MyoGl	P1	0	2	2	4	8870	c(36, 2077, 2076, 63)			
28C/PL	MyoGl	P1	0	5	5	2	22673	c(36, 101)			
33C/PL	MyoGl	P1	0	1	1	6	5064	c(5198, 71, 138, 11, 63, 135)			
78C/PL	MyoGl	P1	0	6	6	4	9628	c(457, 38, 36, 101)			
82C/PL	MyoGl	P1	1	9	10	7	5365	c(51, 71, 138, 11, 135, 13, 988)			
83C/PL	MyoGl	P1	0	1	1	6	5352	c(457, 36, 101, 63, 14, 3510)			
F26Mg neg.	MyoGl	F1	2	2	4	7	2436	c(38, 71, 63, 6334, 615, 616, 989)	7	2242	c(38, 71, 63, 6334, 616, 989, 615)
F27Mg E	MyoGl	F1	0	4	4	8	3971	c(38, 63, 36, 2089, 615, 616, 989, 14)			
F28Mg neg.	MyoGl	F1	1	6	7	4	5528	c(71, 36, 63, 6334)			
F29Mg E	MyoGl	F1	0	0	0	5	7445	c(36, 38, 1749, 63, 1913)			
F32Mg V	MyoGl	F1	0	5	5	6	3354	c(9, 101, 382, 18, 4947, 383)			
F33Mg E	MyoGl	F1	NA	NA	NA	4	3738	c(36, 704, 2228, 12)			
CG2 (CH2V10)	MyoGl	CH1	NA	NA	NA	5	2721	c(36, 132, 10, 134, 2883)			
CG3 (CH2V7)	MyoGl	CH1	NA	NA	NA	8	3793	c(1776, 38, 36, 2227, 63, 18, 2228, 12)			
CG7 (CH3E8)	MyoGl	CH1	1	21	22	4	5580	c(38, 11, 101, 285)			
CG6 (CH3E14)	MyoGl	CH1	2	28	30	4	2594	c(9, 101, 382, 10)			
ML1	MiAr	CZSCLV	4	0	4	6	13591	c(1, 336, 334, 335, 337, 4)			
ML2	MiAr	CZSCLV	21	0	21	3	1319	c(756, 1, 4)			
ML3	MiAr	CZSCLV	3	0	3	5	1810	c(970, 763, 971, 972, 334)			
ML4	MiAr	CZSCLV	NA	NA	NA	6	2758	c(1, 334, 335, 336, 337, 338)			
ML6	MiAr	CZSCLV	NA	NA	NA	4	2503	c(336, 334, 335, 337)			
StrMa32	MiAr	CZZSSR	0	0	0	6	1845	c(339, 344, 345, 1987, 355, 4999)			
StrMa35	MiAr	CZZSSR	0	0	0	5	1977	c(339, 1985, 1986, 354, 370)			
StrMa39	MiAr	CZZSSR	NA	NA	NA	4	1293	c(1, 1074, 2, 762)			
StrMa41	MiAr	CZZSSR	0	0	0	4	1829	c(1074, 1, 762, 2)			
StrMa43	MiAr	CZZSSR	0	0	0	6	1549	c(1074, 1, 2072, 2, 762, 6608)			
StrMa44	MiAr	CZZSSR	NA	NA	NA	6	1419	c(1, 1074, 2072, 2, 762, 1786)			
StrMa1	MiAr	CZZSSR	3	2	5	6	1120	c(764, 1, 772, 771, 335, 793)			
StrMa2	MiAr	CZZSSR	0	2	2	5	713	c(756, 1, 762, 2, 761)			
StrMa5	MiAr	CZZSSR	0	0	2	6	1714	c(339, 344, 345, 354, 355, 370)			
2StrMa8	MiAr	CZZSSR	0	0	0	5	579	c(764, 756, 334, 1786, 4)	5	27786	c(764, 756, 334, 1786, 4)
2StrMa9	MiAr	CZZSSR	0	0	0	6	4980	c(764, 1, 334, 762, 2119, 1786)	6	4980	c(764, 1, 334, 762, 2119, 1786)
2StrMa11	MiAr	CZZSSR	0	0	0	5	13689	c(339, 890, 801, 876, 871)			
2MA_CB	MiAr	CZICCB	3	0	3	6	498	c(764, 765, 343, 2881, 2882, 769)	6	15123	c(764, 765, 2882, 343, 2881, 769)
3MA_CB	MiAr	CZICCB	NA	NA	NA	3	9421	c(1, 2, 760)			
4MA_CB	MiAr	CZICCB	2	0	2	5	1262	c(764, 2072, 2881, 2882, 1786)			
5MA_CB	MiAr	CZICCB	0	0	0	5	438	c(764, 1, 2072, 1786, 2)			
6MA_CB	MiAr	CZICCB	0	0	0	8	1710	c(1, 765, 1783, 793, 343, 769, 756, 764)			
7MA_CB	MiAr	CZICCB	2	0	2	5	932	c(756, 765, 335, 767, 343)			
8MA_CB	MiAr	CZICCB	0	0	0	6	2753	c(764, 2, 2881, 2882, 760, 1)			
1 PAÚ (MA)	MiAr	CZICCB	0	0	0	8	1584	c(1, 764, 771, 760, 2, 793, 787, 339)			
8 PAÚ (MA)	MiAr	CZICCB	0	0	0	6	1720	c(339, 1989, 801, 890, 2909, 355)			
3MA_V	MiAr	CZICCH	0	0	0	6	5444	c(1, 764, 2072, 2268, 1786, 2269)			

4MA_V	MiAr	CZJCCH	NA	NA	NA	5	2640	c(756, 3006, 2268, 793, 772)	5	73193	c(756, 2268, 3006, 793, 772)
6MA_V	MiAr	CZJCCH	0	0	0	5	426	c(756, 2072, 760, 2, 1786)			
8MA_V	MiAr	CZJCCH	NA	NA	NA	6	966	c(764, 760, 2, 335, 1786, 1)			
13MA_V	MiAr	CZJCCH	NA	NA	NA	5	2933	c(764, 756, 2268, 761, 2269)			
17MA_LUŽ	MiAr	CZJCLUZ	0	0	0	6	1658	c(756, 2, 335, 1, 760, 793)			
23MA_LUŽ	MiAr	CZJCLUZ	3	0	3	6	3397	c(339, 344, 6010, 6011, 355, 6012)			
26MA_LUŽ	MiAr	CZJCLUZ	3	0	3	5	1198	c(756, 764, 1786, 334, 2072)			
27MA_LUŽ neg.	MiAr	CZJCLUZ	NA	NA	NA	4	1459	c(1, 338, 771, 772)			
33/15 MA E	MiAr	CZJCLUZ	NA	NA	NA	6	2508	c(1074, 1, 2269, 2881, 338, 2882)			
56/15 MA E	MiAr	CZJCLUZ	0	0	0	6	2632	c(756, 1, 1074, 771, 1075, 1076)	6	2632	c(756, 1, 1074, 1075, 771, 1076)
NJ10	MiAr	CZSMNJ	NA	NA	NA	6	20040	c(756, 4, 335, 844, 1786, 798)			
NJ15	MiAr	CZSMNJ	NA	NA	NA	9	1042	c(1858, 1860, 1859, 1861, 756, 4, 844, 1786, 335)			
NJ19	MiAr	CZSMNJ	0	0	0	4	1724	c(1099, 338, 337, 4)			
NJ21	MiAr	CZSMNJ	0	0	0	7	1759	c(1, 756, 793, 2268, 5108, 1786, 971)			
NJ32	MiAr	CZSMNJ	NA	NA	NA	6	1660	c(756, 1, 760, 793, 4, 6916)			
NJ88	MiAr	CZSMNJ	0	0	0	7	1839	c(1, 1856, 4, 1857, 337, 769, 756)			
6HU4MA neg.	MiAr	MAD1	4	0	4	5	890	c(1611, 1187, 1075, 335, 767)			
HUA14Mar3 V	MiAr	MAD1	NA	NA	NA	5	871	c(770, 1, 760, 338, 787)			
HUCMar 4 E	MiAr	MAD1	0	0	0	6	2635	c(770, 1, 334, 777, 793, 787)			
HUCMar 5 neg.	MiAr	MAD1	NA	NA	NA	6	2666	c(770, 1, 1075, 334, 335, 2269)			
HUCMar 7 E x	MiAr	MAD1	NA	NA	NA	7	787	c(1, 762, 2867, 777, 767, 1074, 2)			
HUD14Mar8 E	MiAr	MAD1	NA	NA	NA	4	682	c(764, 1851, 760, 793)			
HUD14Mar9 neg.	MiAr	MAD1	NA	NA	NA	5	535	c(1789, 1851, 338, 1852, 793)			
11MA/PL	MiAr	PI	4	2	6	5	530	c(1, 2, 2268, 793, 4)			
13MA/PL	MiAr	PI	1	1	2	5	759	1:05			
92MA/PL	MiAr	PI	NA	NA	NA	6	378	c(1, 756, 336, 2, 760, 334)			
96MA/PL	MiAr	PI	NA	NA	NA	2	1708	c(7277, 1452)	2	1708	c(7277, 1452)
D28/14	MiAg	CZSCLV	5	0	5	6	7381	c(339, 344, 890, 7228, 355, 4774)	7	7381	c(11, 382, 101, 10, 13, 383, 14)
PB/14	MiAg	CZSCLV	7	0	7	4	1596	c(339, 801, 4775, 4774)			
02/14 (Magr) E	MiAg	R1	0	0	0	3	846	c(773, 774, 771)			
04/14 (Magr) neg.	MiAg	R1	0	0	0	6	2669	c(344, 1989, 345, 890, 1990, 355)			
09/14 (Magr) E	MiAg	R1	0	0	0	6	3371	c(339, 6215, 801, 354, 6216, 4774)			
11/14 (Magr) E	MiAg	R1	0	0	0	4	1124	c(339, 801, 4774, 4775)	4	26757	c(339, 801, 4774, 4775)
B1Magr E	MiAg	B1	4	10	14	5	5857	c(1, 1090, 1885, 338, 793)			
B2Magr 1 V	MiAg	B1	0	1	1	6	1562	c(1, 1085, 1781, 1783, 334, 793)			
B2Magr 2 E	MiAg	B1	0	8	8	7	1191	c(756, 1, 1781, 334, 777, 793, 3507)			
B2Magr 3 E	MiAg	B1	0	4	4	6	1465	c(1994, 786, 1785, 758, 1611, 767)			
B2Magr 5 E	MiAg	B1	1	1	2	3	790	c(776, 780, 767)			
B2Magr 6 neg.	MiAg	B1	0	0	0	3	910	c(1075, 1783, 760)			
B2Magr 7 E	MiAg	B1	0	0	0	6	1196	c(1, 1085, 1781, 1075, 1782, 1783)			
B3Magr 1 E	MiAg	B1	2	2	4	6	1114	c(1789, 1074, 1783, 760, 793, 769)			
B3Magr 2 neg.	MiAg	B1	1	1	2	2	731	c(756, 338)			
B4Magr 2 E	MiAg	B1	0	0	0	6	1502	c(758, 1691, 335, 786, 2063, 1692)			
B4Magr 3 neg.	MiAg	B1	0	0	0	6	1784	c(758, 1691, 786, 1785, 1692, 2063)			
B4Magr 4 neg.	MiAg	B1	NA	NA	NA	6	3765	c(1611, 1, 786, 2490, 2491, 767)	6	3765	c(1611, 1, 786, 2491, 767, 2490)
B4Magr 5 E	MiAg	B1	1	5	6	6	28277	c(1887, 1074, 1075, 1886, 760, 1890)			
B4Magr 6 neg.	MiAg	B1	0	1	1	5	897	c(793, 764, 1611, 1074, 1885)			
B6Magr 1 neg.	MiAg	B1	0	0	0	1	405	3507			
B7Magr 1 neg.	MiAg	B1	1	1	2	3	1618	c(758, 786, 767)			
B7Magr 10 neg.	MiAg	B1	1	2	3	6	1610	c(1785, 1994, 776, 780, 767, 1611)			
B7Magr 4 E	MiAg	B1	1	2	3	4	1120	c(758, 767, 785, 786)			
B7Magr 5 E	MiAg	B1	16	0	16	3	1170	c(1, 786, 767)			
B7Magr 6 neg.	MiAg	B1	1	1	2	6	1386	c(758, 786, 1785, 1994, 767, 1611)			
B7Magr 7 E + V	MiAg	B1	1	3	4	5	1655	c(1611, 1691, 335, 780, 1692)			
B7Magr 9 E	MiAg	B1	2	7	9	5	1134	c(1611, 1785, 786, 1994, 767)			
6HU1MAGR E x	MiAg	MAD1	NA	NA	NA	6	21221	c(756, 764, 335, 777, 793, 787)			

Př. 6: Rodové a druhové názvy sekvencí z genbanku použitých na fylogenetickou analýzu MHC genů u zástupců čeledi Arvicolinae.

Id sekvence Genbank	Rod a Druh
GU332082	<i>Rhabdomys pumilio</i>
GU332081	<i>Rhabdomys pumilio</i>
Aj490315	<i>Cricetus cricetus</i>
Aj490316	<i>Cricetus cricetus</i>
Aj490317	<i>Cricetus cricetus</i>
EF660514	<i>Arvicola terrestris</i>
GU332060	<i>Rhabdomys pumilio</i>
GU332097	<i>Rhabdomys pumilio</i>
GU332039	<i>Rhabdomys pumilio</i>
AY928323	<i>Rhabdomys pumilio</i>
AY928314	<i>Rhabdomys pumilio</i>
GU332085	<i>Rhabdomys pumilio</i>
EF660515	<i>Arvicola terrestris</i>
JX133885	<i>Sigmodon hispidus</i>
GU332070	<i>Rhabdomys pumilio</i>
GU332031	<i>Rhabdomys pumilio</i>
HM443569	<i>Mus musculus</i>
U88939	<i>Mus spretus</i>
U88920	<i>Mus musculus</i>
Kj663724	<i>Mus musculus</i>
GU332037	<i>Rhabdomys pumilio</i>
AY928313	<i>Rhabdomys pumilio</i>
AY928328	<i>Rhabdomys pumilio</i>
AY928315	<i>Rhabdomys pumilio</i>
GU332089	<i>Rhabdomys pumilio</i>
GU332096	<i>Rhabdomys pumilio</i>
AY928319	<i>Rhabdomys pumilio</i>
GU332062	<i>Rhabdomys pumilio</i>
AY219823	<i>Peromyscus eremicus</i>
HM102427	<i>Cricetus barabensis</i>
HM102444	<i>Cricetus barabensis</i>
GQ0497465.1	<i>Ctenomys australis</i>

Př. 7: Grafické zobrazení glm s Poissonovým rozdělením a regresní přímkou označující trend závislosti ektoparazitických čeledí Neotrombiculidae a Laelapidae u hlodavců z čeledi Arvicolinae.

