

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie
Entomologie



Bc. Kristýna Bubeníková

Evoluce hostitelské specializace blanokřídlých parazitoidů rodu *Torymus*
Evolution of parasitic Hymenoptera hosts specialisation of the genus *Torymus*

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Petr Janšta, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

Poděkování

V první řadě největší poděkování samozřejmě patří mému školiteli Petrovi Janštovi, který prokazoval velkou trpělivost nejen v posledních chvílích kompilování této práce. Nejen během psaní práce mě zahrnoval cennými radami, připomínkami a podporou. Bez něj by tato práce nemohla vzniknout, a proto mu děkuji za jeho „patronát“.

Dále můj dík patří všem, co mi poskytli materiál či sekvence. Jmenovitě bych chtěla poděkovat těm nejdůležitějším Petrovi Janštovi, Barboře Křížkové, Jean-Yves Rasplusovi s Astrid Cruaud a Larsu Krogmannovi.

Také nesmím zapomenout na Ralphi Petrse, kterému vděčím za obětavé uvedení do problematiky sekvenování metodou Anchored Hybrid Enrichment a za jeho nepřekonatelné rady při designování „baits“.

Děkuji všem kolegům na katedře a Oddělení Entomologie, od kterých jsem ledacos naučila. Také děkuji všem studentům z pracovny Oddělení Entomologie, kteří tolerovali, že v některých obdobích se tam vyskytovala vyšší koncentrace chovných boxů s hálkami. Také jim děkuji za to, že si občas po sobě umyjí nádoby. Dík patří i Magdaleně Stuchlíkové a Julii Böhmové, které se zúčastnily výjezdů do terénu a pomohly se sběrem.

Můj dík samozřejmě patří mojí rodině za veškerou podporu, a to hlavně mamince, od níž se mi dostává v největších dávkách. Také děkuji přátelům za to, že mě podporovali, rozptylovali, i za to že se na mě nebojí křičet, abych se vzmužila ve chvílích, kdy je to nejvíc zapotřebí.

Abstrakt

Rod *Torymus* má velmi diverzifikované parazitické strategie a adaptace na své hostitele. Larvy jsou ektoparazitické a napadají převážně hálkotvorné žlabatky (Hymenoptera: Cynipidae) a hálkotvorné bejlomorky (Diptera: Cecidomyiidae). Nicméně několik druhů parazituje i na jiných hmyzích skupinách nebo jsou to dokonce fytofágové. Bylo publikováno několik hypotéz a prací o evoluci hostitelského spektra, ale zatím nebyly dostatečně testovány na parazitickém hmyzu. V této práci jsem studovala koevoluci rodu *Torymus* a jeho hostitelů. Hlavními otázkami jsou jaké hostitelské přeskoky během evoluce hostitelských strategií proběhly a zda jsou sesterské druhy parazitoidů specializované na příbuzné nebo nepříbuzné druhy žijící ve stejném prostředí. Také jsem studovala morfologické adaptace na hostitele. Sestavila jsem fylogenetický strom na základě 5 genů, aby mohly být tyto hypotézy kriticky otestovány a porovnala jsem hostitelské asociace uvnitř a mezi klády rodu *Torymus*.

Klíčová slova: *Torymus*, Chalcidoidea, parazitoid, fylogeneze, hostitelská specializace

Abstract

The genus *Torymus* (Chalcidoidea: Torymidae) has very diversified parasitic strategies and adaptations to its hosts. Its larvae are ectoparasitoids and attack mostly larvae of various gall wasps (Hymenoptera: Cynipidae) and gall midges (Diptera: Cecidomyiidae). However, few species prefer also other insect groups as a host or are even phytophagous. Many hypotheses concerning evolution of insect host associations were published, but have not been satisfactorily tested using parasitic insects as a model. In this thesis I studied coevolution of the genus *Torymus* and its hosts. The main questions are what kind of host shifts occurred during the evolution of host strategies and whether sister species of parasitoids are specific to the related hosts/or nonrelated hosts living in the same type of habitat. I also studied changes at morphological adaptations to its hosts. To test critically these hypotheses, I constructed phylogenetic tree of selected *Torymus* species based on 5 genes and compared their host association within and between clades of *Torymus*.

Key words: *Torymus*, Chalcidoide, parasitoid, phylogeny, host specialisation

Obsah	
1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1. HOSTITELSKÁ SPECIALIZACE	2
2.1.1. <i>Hypotézy o evoluci hostitelského spektra</i>	2
2.1.2. <i>Slepé evoluční uličky neboli „death ends“</i>	6
2.1.3. <i>Koevoluce</i>	7
2.2. HOSTITELÉ RODU <i>TORYMUS</i>	8
2.3. ROD <i>TORYMUS</i>	10
2.3. SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE A ROZLIŠENÍ FYLOGENETICKÝCH VZTAHŮ	19
3. CÍLE PRÁCE	21
4. MATERIÁL A METODIKA	22
4.1. MATERIÁL	22
4.2. MOLEKULÁRNÍ METODY	22
4.2.1. <i>Izolace DNA</i>	23
4.2.2. <i>Amplifikace DNA</i>	23
4.2.3. <i>Použité primery</i>	24
4.2.3. <i>Nastavení termocyklerů</i>	25
4.2.4. <i>Elektroforéza PCR produktů</i>	28
4.2.5. <i>Purifikace PCR produktů</i>	28
4.2.6. <i>Sekvenační reakce a sekvenace</i>	29
4.3. PRÁCE SE SEKVENCEMI	30
4.4. METODY TVORBY FYLOGENETICKÝCH STROMŮ	30
4.5. OVIPOSITOR INDEX (OI).....	31
4.6. DESIGNOVÁNÍ TZV. BAITS A PŘÍPRAVA NA NEXT-GEN SEKVENOVÁNÍ.....	31
5. VÝSLEDKY	35
5.1. FINÁLNÍ DATASET	35
5.2. SUBSTITUČNÍ MODEL Y PRO JEDNOTLIVÉ GENY	35
5.3. VÝSTUPY FYLOGENETICKÝCH ANALÝZ.....	37
5.4. OVIPOSITOR INDEX	55
5.5. BAIT DESIGN	56
6. DISKUZE	57
6.1. VÝSLEDNÉ FYLOGENETICKÉ STROMY	57
6.2. JE ROD <i>TORYMUS</i> MONOFYLUM?	58
6.3. JAK KORESPONDUJÍ DRUHOVÉ SKUPINY RODU <i>TORYMUS</i> S MOLEKULÁRNÍ FYLOGENEZÍ	59
6.4. CO LZE ŘÍCT O EVOLUCI HOSTITELSKÉ SPECIALIZACE	62
7. ZÁVĚR	66
8. SEZNAM LITERATURY	67
9. PŘÍLOHY	74
9.1. SEZNAM RODŮ A DRUHŮ ZMÍNĚNÝCH V TĚTO PRÁCI VČETNĚ AUTORŮ POPISU.....	74
9.2. TABULKA VZORKŮ V TĚTO PRÁCI	77
9.3. DOPLNŮJÍCÍ FYLOGENETICKÉ STROMY	84
9.4. SEZNAM ZKRATEK	88

1. Úvod

Chalcidky jsou druhou nejpočetnější nadčeledí blanokřídlého hmyzu. Čítají přes 22 500 popsaných zástupců (Klopfstein et al., 2013, Munro et al., 2011). Dnes je podle databáze v rámci nadčeledi Chalcidoidea uváděno 23 čeledí (Noyes, 2018). Včetně čeledi Megastigmidae, která byla donedávna klasifikována pouze jako podčeď čeledi Torymidae (Janšta et al., 2017). Právě do čeledi Torymidae patří rod *Torymus* popsaný již v roce 1820 (Dalman, 1820). Práce Janšta et al. (2017) objasnila mnohé fylogenetické vztahy v rámci čeledi Torymidae a postavení rodu *Torymus* v čeledi. Nicméně s rodem *Torymus* jsou stále spojené různé taxonomické a fylogenetické nejasnosti. Je uznávám koncept druhových skupin podle Graham & Gijswijt (1998), který je založený na morfologii a hostitelských asociacích. Fylogenetické vztahy v rámci rodu jsou však stále nejasné a dle Janšta et al. (2017) příliš nekopírují morfologické znaky.

Jedním z dominantních morfologických znaků (ne však synapomorfním) rodu *Torymus* a celé čeledi Torymidae je dlouhé kladélko u samiček. To je bezesporu jednou z hlavních adaptací na napadání jejich hostitelských druhů. Většina hostitelů rodu *Torymus* se totiž vyvíjí v hálkách různých velikostí, a tak u parazitoidů najdeme mezidruhovou variabilitu v délce kladélka.

Hostitelské asociace a adaptace na hostitele, jež se vyvíjely v evoluci, jsou ohromně zajímavé fenomény. Neméně zajímavá je evoluce hostitelské specializace a evoluce šíře hostitelského spektra. Neustále se mnoho prací snaží odpověď na otázky, jak evoluce hostitelského spektra probíhala, nejčastěji hypotézy o evoluci hostitelských specializací bývají studovány u fytofágního hmyzu. Mnoho studií bylo provedeno v rámci řádu motýlů (Lepidoptera) (např. Hardy & Otto, 2014). U parazitických živočichů a konkrétně u parazitoidů takových studií nebylo dosud provedeno mnoho (např. Al Khatib et al., 2016).

Hlavním cílem této práce je sestavit fylogenezi rodu *Torymus* a pokusit se (1) odpovědět na otázky týkající se hostitelských přeskoků, zda (2) sesterské druhy parazitují na příbuzných hostitelích či nikoliv a zda (3) druhové skupiny korespondují s molekulární fylogenezí.

2. Literární přehled

2.1. Hostitelská specializace

2.1.1. Hypotézy o evoluci hostitelského spektra

Bezpochyby lze živočichy a konkrétně i ty parazitické rozdělit na specialisty a generalisty (Onstad & McManus, 1996; Wilson et al., 1996). Specialisté se od generalistů odlišují nejen šíří hostitelského spektra („host range“), ale liší se morfologickými přizpůsobeními na hostitele (Chapman, 1982) či způsobem vyhledávání hostitelů (Peters, 2011). Nicméně při studiu vědeckých prací, a hlavně při jejich porovnávání, nesmíme opomínat, že ne všichni autoři rozdělují studované živočichy dle šíře hostitelského spektra jen do dvou kategorií. Například Al Khatib et al. (2016) ve své práci zabývající se parazitickými vosičkami rodu *Eupelmus* (Hymenoptera: Eupelmidae) vymezili tři úrovně míry specializace. První kategorii představují striktní specialisté (specializovaní na jednoho hostitele), následují přechodní specialisté (parazitující na více hostitelích, kteří si jsou příbuzní) a nakonec poslední kategorií jsou generalisté (parazitující napříč hmyzími řády). Podobně je tomu i u včel (Hymenoptera: Apidae), kde jsou uváděni zástupci monolektičtí, oligolektičtí a polylektičtí (pozn. terminologie koresponduje s pojmy specialista a generalista takto – monolektičtí = specialisté a polylektičtí = generalisté) (Cane et al., 1996; Müller, 1996).

Ať už si při studiu živočichy rozdělíme jakkoliv, nejzajímavější zůstává, jak probíhala evoluce šíře hostitelského spektra. A jelikož specializace a evoluce hostitelského spektra jsou velmi zajímavými fenomény, bylo vysloveno mnoho hypotéz, které se je snaží vysvětlit.

První hypotéza, „Jack of all trades is master of none“ (Huey & Hertz, 1984) – porovnávající, zda je výhodnější být specialista nebo generalista – říká, že generalisté bývají znevýhodněni. Hypotéza byla testována v rámci blanokřídlých parazitoidů mšic (Hymenoptera: Ichneumonidae: Braconidae), v dále zmíněných studiích se ukázalo, že generalisté nejsou tak účinní ve využívání hostitelů jako specialisté. Konkrétně Stilmant et al. (2008) testovali tuto hypotézu u tří zástupců z podčeledi Aphidiinae (*Aphidius rhopalosiphii*, *Aphidius ervi*, *Praon volucre*) a Straub et al. (2011) měli ve své studii zahrnuto parazitoidů (42) podčeledi Aphidiinae vylíhnutých z 48 druhů hostitelů. V tomto případě šlo o sekundární analýzu dat ze studie Kavallieratos et al. (2004), ve které byly data z 13 let trvajícího mapování hostitelské asociace mezi mšicemi a parazitoidy v jihovýchodní Evropě.

Podíváme-li se obecně na evoluční historii a fylogenezi studované skupiny, bude nás zajímat, zda evoluce šla od generalistů ke specialistům, nebo směřovala od specialistů a generalisté byli až odvozenější. Ze studií, které se tomu věnovaly, plyne, že u různých skupin se vyskytuje jiný evoluční scénář. U 15 testovaných skupin fytofágního hmyzu (Singer & Stireman, 2005) dle autorů evoluce postupovala směrem od generalistů ke specialistům, zatímco u parazitické čeledi Tachinidae (Diptera: Tachinidae) probíhala evoluce opačně (Stireman, 2005).

U parazitoidů se setkáváme se dvěma způsoby využívání hostitelů, koinobiontní a idiobiontní strategie. Koinobionti hostitele napadnou a nechají ho se dále vyvíjet, idiobionti hostitele po napadení usmrtí a začnou ho konzumovat (Askew & Shaw, 1986). Předpokládá se, že koinobiontní strategie je evolučně odvozenější a druhy s koinobiontní strategií proto bývají více specializovaní (Hawkins et al., 1992). Studie evoluce některých skupin tuto teorii nezamítají. Například dnešní Heliconinae (Hymenoptera: Ichneumonidae), jejichž ancestrální stav byl idiobiontní, jsou většinou koinobionti, a tudíž jejich evoluce probíhala směrem ke specialistům (Belshaw & Quicke, 2002). Takto jednoduchý a jednosměrný proces v evoluci však není pravidlem a dochází k přeskokům („host shifts“) a takovými složitějšími evolučními procesy se zabývají další hypotézy.

„Hypothesis of musical chairs“ (pozn. název podle dětské hry), která byla nejprve vyslovena v kontextu ptačích kolonizací ostrovů, předpokládá, že během evoluce dochází k hostitelským přeskokům, ale nikdy se nemění šíře hostitelského spektra. Míjí tedy, že dochází k hostitelským přeskokům a ze specialistů se opět stávají specialisté (Diamond, 1982).

Naproti tomu „Oscilační hypotéza“ („Oscillation hypothesis“) počítá, že v evoluci dochází ke změnám v šíři hostitelského spektra a také předpokládá vývoj od generalistů ke specialistům, či nahodilý výskyt specialistů a generalistů v rámci fylogenetických vztahů (Janz & Nylin, 2008).

Hardy & Otto (2014) hypotézy testovali u motýlů v rámci širší taxonomické jednotky u nadčeledi Papilionoide (Lepidoptera: Papilionoidea) a nižší taxonomické jednotky u tribu Heliconii (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiini), kde se přiklonili k „Hypothesis of musical chairs“. U parazitoidů z čeledi Tachinidae (Diptera: Tachinidae) také evoluce hostitelského spektra neodpovídala „Oscilační hypotéze“ („Oscillation hypothesis“), ale spíše ji lépe vysvětluje „Hypothesis of musical chairs“. Nicméně v této studii byla hypotéza testována na

málo podpořené fylogenezi, což mohlo vést k problémům analýzy (Stireman, 2005). V jediné studii, kde tyto hypotézy testovali u nadčeledi Chalcidoidea, naopak průběh evoluce naopak lépe popisuje „Oscilační hypotéza“. Nicméně v této studii u druhové skupiny “*Eupelmus urozonus* species group” (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eupelmidae) bylo velmi malé druhové zastoupení a také velmi malý poměr specialistů ku generalistům (3 ku 10) (Al Khatib et al., 2016)

Jeden z autorů zmíněného článku porovnávajícího dvě výše uvedené hypotézy se dále této problematice věnoval a hledal úskalí, která mohou hypotézy mít. Zabýval se mimo jiné tím, zda opravdu docházelo v evoluci k fázím, kdy byly druhy generalisté. Přiklání se také k teorii, že hostitelský generalismus zjednodušuje evoluci hostitelského spektra, jinými slovy u generalistů se v evoluci snáz měnila šíře hostitelského spektra a snáz docházelo k přeskokům (Hardy, 2017). Nabízí ve své práci alternativy k „Oscilační hypotéze“ a shrnuje hypotézy v tabulce (viz. Tabulka 1). Podrobil statistickému testování dříve publikované fylogeneze s namapovaným hostitelským spektrem. Ukazuje se, že lze pozorovat tendence v evoluci, které předpokládá více hypotéz. Nicméně se jedná o příklady, kdy byly hypotézy testovány na skupinách neparazitického hmyzu.

Tabulka 1: Fylogenetické důkazy navrhovaných hypotéz o evoluci hostitelského spektra na základě statistického testování již sestavených fylogenezí. Převzato a upraveno podle Hardy (2017); hypotézy: ES = Escape and radiate; OH = Oscillation hypothesis; MC = Musical chair, SD = Specialization by drift; SS = Serial specialization.

Hypotéza	Predikce	Pro/Proti	Taxon	Reference
Všechny	Historické omezení „využití hostitelů“ omezuje diverzifikaci kládu	Pro	Lepidoptera	Janz et al., 2006
ER, OH	Po speciaci následuje expanze hostitelského spektra	Pro	Lepidoptera	Fordyce, 2010
ER, OH, SD, SS	Rapidnější speciace u generalistů	Pro (proti u specialistů)	Coccoidea	Hardy et al., 2016
MC	Rapidnější speciace u specialistů	Pro (proti u generalistů)	Lepidoptera	Hardy & Otto, 2014

OH, MC	Rychlejší speciace v liniích, u kterých dochází k hostitelským přeskokům	Pro	Lepidoptera	Hardy & Otto, 2014
ER, OH, SD, SS	Hostitelská specializace je vázaná na speciaci	Pro	Coccoidea	Hardy et al., 2016
ER, OH, SS	Evoluce hostitelského spektra je vázaná na speciaci a způsobuje ji	Proti	Lepidoptera	Hardy & Otto, 2014
OH, MC, SD	Generalisté mnohem rychleji kolonizují nového hostitele	Pro	Lepidoptera	Winkler & Mitter, 2008
ER, OH	Mnohem častěji jsou hostitelé ztraceni, než nově kolonizováni	Proti	Lepidoptera	Hardy & Otto, 2014
SD, SS	Generalismus může přetrvávat po dlouhou dobu makroevolučního času	Pro	Lepidoptera, Coccoidea	Hardy et al., 2016, Hamm & Fordyce, 2015, Hardy & Otto, 2014
ER, OH	Generalismus nebude přetrvávat po dlouhou dobu makroevolučního času	Proti	Lepidoptera, Coccoidea	Hardy et al. 2016, Hamm & Fordyce, 2015, Hardy & Otto, 2014

Někteří autoři (např. Gompert et al., 2015) se snaží nalézt genetickou evidenci, která by ovlivňovala specializaci (nejedná se o testování na fylogenetické škále). Podrobili několik generací jejich modelového organismu, u kterého se liší hostitelé spektrum, studiu změny frekvence alel. Hypotéza byla testována na základě experimentální evoluce, sekvenování a genotypizace. Výše zmínění autoři ve své studii objevili, že genetická variance a s ní spojené omezení neovlivňuje specializaci na hostitelské rostliny u motýlů. Naproti tomu studie od stejného autora (Gompert et al., 2016) říká, že existuje genetická evidence, že trade off a genetická variance ovlivňuje specializaci u semenožravých zrnokazů skvrnitých (*Callosobruchus maculatus*).

Ačkoliv výše zmíněné hypotézy se týkaly primárně a původně fytofágního hmyzu, existuje i zcela unikátní hypotéza, která byla vyslovena a testována v souvislosti s blanokřídlými parazitoidy. Hypotéza brzkého učení byla poprvé testována u druhu *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae). Tento druh se skládá ze dvou dobře geneticky oddělených linií. První, pravděpodobně ancestrální, linie schopnost učení nemá. Tato linie parazituje na původním hostiteli *Stegobium paniceum* (Coleoptera: Anobiidae).

Druhá linie, která již schopnost brzkého učení v evoluci získala, preference mění a vybírá si spíše jiné hostitele z rodu *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae), který autoři použili jako alternativního hostitele v této studii (König et al., 2014).

V rámci nadčeledi Chalcidoidea prozatím nebylo testováno mnoho hypotéz. Kromě výše zmíněné studie Al khatib et al. (2016) byla provedena ještě jedna zásadní studie, která mapovala evoluci hostitelského spektra u čeledi Eucharitidae. Zástupci této čeledi parazitují u mravenců. Hostitelské spektrum bazálních zástupců parazitoidů bývá užší a skládá se ze zástupců jedné mravenčí podčeledi. U odvozených parazitoidů se lze setkat s hostiteli ze tří mravenčích podčeledí (Murray et al., 2013). V obou případech se jednalo o testování na základě sestavených molekulárních fylogenetických vztahů.

2.1.2. Slepé evoluční uličky neboli „death ends“

Specializace může znamenat pro konkrétní druh slepou evoluční uličku („dead end“) (Cope, 1896). Z toho plyne, že specializovaní živočichové by měli být náchylnější k vyhynutí (extinkci). Ačkoliv z toho mají v krátkodobém měřítku výhodu, v dlouhodobém nikoliv (Futuyma & Moreno, 1988). Podle Oscilační hypotézy by u specialistů evoluce do slepé uličky vést neměla (Janz & Nylin, 2008). Některé současné studie, které tuto hypotézu již mohou testovat na základě molekulárních fylogenezí, hypotézu slepých evolučních uliček („dead end“) nevyvrací. Například u červců (Hemiptera: Coccoidea) vede hostitelská specializace do slepé evoluční uličky (Hardy et al., 2016). Proti tomu stojí fylogenetická studie o kukaččích včelách rodu *Sphcodes* (Hymenoptera: Apoidea), která vylučuje, že by specializace vedla do slepé uličky, protože specialisti v tomto rodě vždy měli nějakého alternativního hostitele (Habermannová et al., 2013).

Podle jedné ze starších srovnávacích studií, která se zaměřila i na parazitoidy, vede specializace ke zpomalení diverzifikace (Wiegmann et al., 1993). Hostitelské spektrum podle jiných výsledků nemá vliv na rozvoj diverzifikace. Polyfágie je u modelové skupiny této studie fylogeneticky konzervovaná (Hamm & Fordyce, 2015). Nejvíce recentní a srovnávací studii provedl Day et al. (2016) na základě deseti fylogenezí a testovali, zda je hostitelská specializace slepou evoluční uličkou. Jednalo se o systémy opylovač – hostitel (2x), parazit – hostitel (4x) a fytofág – hostitel (4x). Jejich testování zahrnovalo nulovou hypotézu, která zněla, že u specialistů i generalistů je stejná míra speciace, diverzifikace i extinkce. To znamená, že by šíře hostitelského spektra neměla ovlivňovat speciaci, diverzifikaci ani

extinkci, z čehož explicitně plyne, že by specializace neměla vést do slepých evolučních uliček. Ve dvou z deseti případů se potvrdilo, že specializace vede do slepé evoluční uličky, tudíž má negativní vliv na diverzifikaci a zvyšuje míru extinkce. V osmi případech byla podpořena nulová hypotéza. Nulová hypotéza byla zamítnuta u systému parazitoidů čeledi Tachinidae (Diptera: Tachinidae) a jednoho z opylovacích systémů. Také zmiňují důležitost definování a vyhranění pojmů specialista a generalista.

2.1.3. Koevoluce

Pokud mluvíme o koevoluci, znamená to, že mezi dvěma asociovanými druhy muselo nutně dojít k synchronizaci evolučních událostí. Druhy vzájemně odpovídali genetickými a adaptačními změnami. Ať už se jedná o systém parazitoida a hostitele či jiný koevoluční vztah (Futuyama & Slatkin, 1983). V přírodě lze nalézt spoustu koevolučních vztahů, nicméně jeden extrémní případ se vykytuje v rámci nadčeledi Chalcidoidea, a proto si zasluhuje značnou pozornost. Jedná se o takzvané fíkové vosičky (Hymenoptera: Agaonidae), které opylují u rodu *Ficus* sp. V tomto systému se jedná téměř o kodiverzifikaci (Cruaud et al., 2012). V systému se kromě opylujících hálkotvorných nachází vosičky, které jsou neopylující hálkotvorné a také parazitoidi. U těch se míra kospeciace s hostiteli nevyskytuje v takové míře jako u opylovačů. Také se uvádí, že mají širší hostitelské spektrum (Lopez-Vaamonde et al., 2001; McLeish et al., 2012).

V některých případech nedochází přímo ke kospeciace, ale blízké příbuzní parazitoidi napadají fylogeneticky nepříbuzné hostitele, kteří ale mají stejné ekologické nároky. V takovém případě se mluví o hypotéze „ekologie hostitele“ („Host ecology hypothesis“). Například u rodu *Ichneumon* (Hymenoptera: Ichneumonidae) můžeme nalézt takto ovlivněné hostitelské asociace. Sesterské druhy parazitují na nepříbuzných hostitelích, kteří jsou si ekologicky blízcí (Tschopp et al., 2013). U rodu *Ichneumon* se objevují i zřejmé morfologické adaptace parazitoidů na ekologii hostitele. Morfologické adaptace spočívaly v délce a tvaru tykadla. To znamená, že parazitoidé z rodu *Ichneumon* jsou adaptováni na to, zda se kukla nachází pod zemí (parazitoidé s kratšími a tlustšími tykadly) nebo nad zemí (parazitoidé s delšími tykadly). Dále se tento typ asociace objevuje u podčeledi Rogadinae (Hymenoptera: Braconidae) a jejich kukel hostitelských druhů motýlů (Lepidoptera) (Zaldívar-Riverón et al., 2008) a u hrabalek (Hymenoptera: Pompilinae) a u jejich pavoučích hostitelů (Rodríguez et al., 2016). Také u tropických zástupců čeledi

Tachinidae (Diptera: Tachnidae) bývá většina specializovaných na užší skupinu ekologicky blízkých hostitelů (Stireman et al., 2017). U rodu *Achrysocharoides* (Hymenoptera: Eulophidae) jsou vazby na hostitele determinované hostitelskou rostlinou (Lopez-Vaamonde et al., 2005). Ve většině těchto zmíněných případů se jedná o parazitoidy s idiobiontní strategií.

2.2. Hostitelé rodu *Torymus*

Zástupci rodu *Torymus* napadají především larvy hálkotvorných žlabatek (Hymenoptera: Cynipidae) a bejlmerek (Diptera: Cecidomyiidae), ale jsou mezi nimi i druhy vyvíjející se na larvách samotářských žahadlových blanokřídlých, broucích, larvách jiných druhů hálkotvorných chalcidek, a dokonce druhy fytofágní, živící se semeny rostlin (Graham & Gijswijt, 1998; Noyes, 2018). V rámci rodu nalezneme specialisty, druhy specializované na hostitele v rámci jedné hostitelské rostliny či zcela polyfágní zástupce (Graham & Gijswijt, 1998). U mnoha druhů stále neznáme hostitele, i když u některých byly publikovány alespoň jisté náznaky asociace. Například u druhu *T. evansi* není známý hostitel, ale Grissell (2004) poukazuje na asociování s plošticemi.

Většina hostitelů rodu *Torymus* se tedy vyvíjí v hálkách. Háčky vyvíjecím se larvám slouží jako efektivní zdroj potravy (Schönrogge et al., 2000), ale také jsou obranným mechanismem (Bailey et al., 2009). Pojednává o tom takzvaná „hypotéza nepřítel“ („Enemy Hypothesis“) (Stone & Schönrogge, 2003). Adaptace na vytvoření hálek mohla následně vést k „prostoru bez nepřátel“ („Enemy-free morphospace“) (Nyman et al., 2007). To znamená, že pod selekčním tlakem predátorů/parazitoidů čili nepřátel se vyvinul nějaký obranný mechanismus. Nyman et al. (2007) také tvrdí, že vztahy mezi parazitoidy a hálkotvornými hostiteli jsou tak složité a komplexní, že je nelze popsat hypotézou „Utéct a radiovat“ („Escape and radiate“) (Ehrlich & Raven, 1964). Podle ní by únik před parazitoidem měl znamenat náhlý nástup radiace a diverzifikace. Z mnoha studií plyne, že ačkoliv háčky larvu před parazitoidem zcela neuchrání, existují některé charakteristiky, které snižují parazitaci. Například se zvyšující se velikostí háčky se snižuje procento parazitace, nebo také při zvyšování tloušťky stěny. Například u žlabatek rodu *Diplolepis* (Hymenoptera: Cynipidae) (László & Tóthmérész, 2013) a také u invazní žlabatky *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae) rozhoduje o parazitaci velikost. U druhého zmíněného hostitele (*D. kuriphilus*), si právě *T. sinensis* vybírá pro naklazení větší háčky (Cooper & Rieske, 2011).

V obranyschopnosti také může rozhodovat tvrdost hálek (Craig, 1990) či jejich chlupatost (Dixon et al., 1998).

Zástupci hálkotvorného hmyzu jsou mnohem specializovanější než ostatní z řad fytofágního hmyzu (Hardy & Cook, 2010). Například v evoluci u žlabatek došlo dokonce ke konzervatismu v hostitelských rostlinách, který odpovídá předpokladu minimálního počtu hostitelských přeskoků v evoluci. Také se ukázalo, že linie „bílých dubů“ je parazitována jinými rody žlabatek než linie „černých dubů“ (Stone et al., 2009). Dále je prozkoumán Asijský původ žlabatek a šíření do západní palearktické oblasti, které prokazuje charakter difusní koevoluce, kdy v systému na sebe vyvíjí selekční tlak dvě populace současně a recipročně (Janzen, 1980). Během šíření docházelo k unikání před parazitoidy, kteří jsou uváděni jako zástupci z řad generalistů (Stone et al., 2012).

Z novější fylogenetické studie celé čeledi Cynipidae (Hymenoptera) (Ronquist et al., 2015) plyne, že první hálkotvorní předci byli asociováni s dřevinami a v evoluci v rámci čeledi docházelo k přeskokům mezi inkvilinismem a hálkotvorností. Celkem v čeledi vymezili 12 tribů. Hálkotvorní zástupci se vyskytují v tribech Cynipini, Diplolepini, Pediastidini, Eschatocerini, Qwaqwaiini, Aylacini s. stricto, Aulacideini, Phanacidini, Ceroptresini) V rámci tribu Diastrophini jsou zastoupeni hálkotvorné druhy i inkvilini. Inkvilinismus u tribů Paraulacini, Synergini s. str. (vzácně hálkotvorný zástupce), Ceroptresini (prozatím málo dat a nedostatečně známa biologie). Mezi hostitele rodu *Torymus* patří hlavně zástupci z tribu Diplolepini, kteří jsou asociováni s růžovitými (Rosaceae), a také zástupci z tribu Cynipini, ti tvoří háčky hlavně na bukovitých (Fagaceae), konkrétně na dubech (*Quercus*).

Druhou významnou hálkotvornou hostitelskou skupinou jsou bejlmorky (Diptera: Cecidomyiidae). Podčeď Cecidomyiinae je hálkotvorná skupina s největší druhovou diverzitou (Gagné & Jaschhof, 2004). Jsou asociováni hlavně s bylinami a v několika desetiletích v naší krajině začali zbývat. Z dlouhodobého výzkumu a mapování českých lokalit je vidět, jak druhy ubývají. Některé jsou dnes již velmi vzácné a lze je jen těžko najít (Skuhravá & Skuhravý, 1993). V asociacích s bejlmorkami například bylo prokázáno, že ve vztahu parazitoida *T. cecidomyidae* a hostitele *Rabdophaga strobiloides* (Diptera: Cecidomyiidae) existuje funkční závislost mezi mírou parazitace a velikostí hostitelské háčky na hostitelských rostlinách *Salix eriocephala* a *S. bebbiana*. Parazitoid si preferenčně vybírá prostřední velikosti háčky, což autoři (Van Hezewijk & Roland, 2003) interpretují jako

ochranu před predací ptáky. Nicméně to může být i velikostí kladélka a neschopností menší háčku lokalizovat.

2.3. Rod *Torymus*

Rod *Torymus* patří do čeledi Torymidae. V nedávné době byla na základě molekulární fylogeneze (Janšta et al., 2017) a fylogeneze sestavené na základě transkriptomových dat (Peters et al. 2017) prokázána monofylie čeledi. V rámci čeledi Torymidae bylo stanoveno šest podčeledí a šest podčeledí a šest tribů. Rod *Torymus* řadíme do tribu Torymini v rámci podčeledi Toryminae (Janšta et al., 2017). Stáří rodu *Torymus* je odhadováno na cca 65 milionů let (Peters et al., 2017) až cca 45 mil. let (Peters et al., 2018).

Obrázek 1: Samec a samice druhu *Torymus bedeguaris*. Na první pohled je patrný sexuální dimorfismus (foto: Josef Dvořák, biolib.cz).



Rod *Torymus* byl popsán již v roce 1820 (Dalman, 1820). Dnes je popsán více než 400 druhů (Noyes, 2018). Jak vypadá zcela běžný zástupce toho rodu lze vidět na Obrázku 1. Stále je uznáváno rozdělení druhů do druhových skupin pro evropské druhy, které nastolili Graham & Gijswijt (1998) (viz Tabulka 2). Rozdělení do druhových skupin je založeno na bázi vnější morfologie a hostitelských vazeb. Oba tyto charaktery však mohou být konvergentní a

toto rozdělení nemusí zcela odpovídat evoluční historii a fylogenetickým vztahům v rámci rodu. Nicméně tato monografie je velice cenná a obsahuje mnoho krucálních informací, o rozšíření, morfologii a hostitelských vazbách. Další druhové skupiny (pro západonearktické zástupce) byly ustanoveny již dle Grissel (1976) (viz Tabulka 3). Zavada (2003) provedl revizi a stanovení poddruhů a druhových skupin, vycházel z Graham & Gijswijt (1998) pro palearktické druhy a podle Grissell (1976) pro druhové skupiny ze západní nearktické oblasti. V práci podle morfologických znaků, které vybral jako možné definující znaky a synapomorfie poddruhů provedl morfologickou revizi a přišel s novým konceptem poddruhů a revizí předcházejících druhových komplexů (viz Tabulka 4).

Tabulka 2: Zjednodušený výčet druhových skupin (podle Graham & Gijswijt, 1998). (Pozn.: Do některých druhových skupin, které obsahují velký počet druhů, byly vypsány přednostně druhy zahrnuté ve fylogenezi v této práci.)

Druhová skupina	Zástupci	Hostitelé
<i>T. nitidulus</i> -group	<i>T. fuscicornis</i> , <i>T. nitidulus</i>	zástupci rodu <i>Semudobia</i> (Diptera: Cecidomyiidae) na břízách
<i>T. laetus</i> -group	<i>T. arcicus</i> , <i>T. chrysocephalus</i> , <i>T. cyprianus</i> , <i>T. fisheri</i> , <i>T. grahami</i> , <i>T. igniceps</i> , <i>T. laetus</i> , <i>T. regalis</i> , <i>T. scaposus</i> , <i>T. ventralis</i>	asociace s druhy na ostřicích
<i>T. cupreus</i> -group	<i>T. calcaratus</i> , <i>T. cupreus</i> , <i>T. pulcher</i>	žahadloví blanokřídlí (Hymenoptera: Sphecidae, Apidae) z ostružníku,
<i>T. austriacus</i> -group	<i>T. austriacus</i> , <i>T. imperatrix</i>	Neznámá biologie.
<i>T. baudysi</i> -group	<i>T. baudysi</i> , <i>T. thalassinus</i>	zástupci rodu <i>Tetramesa</i> (Hymenoptera: Eurytomidae) na lipnicovitých (Poaceae)
<i>T. cyaneus</i> -group	<i>T. affinis</i> , <i>T. cerri</i> , <i>T. cyaneus</i> , <i>T. fastuosus</i> , <i>T. gracilior</i> , <i>T. notatus</i>	žlabatky (Hymenoptera: Cynipade) na dubech

<i>T. varians</i> -group	<i>T. aucupariae</i> , <i>T. druparum</i> , <i>T. varians</i>	semena růžovitých (Rosaceae), fytofágové
<i>T. erucarum</i> -group	<i>T. erucarum</i> , <i>T. formosus</i> , <i>T. nobilis</i> , <i>T. roboris</i> , <i>T. scutellaris</i> , <i>T. nemorum</i>	žlabatky (Hymenoptera: Cynipidae) tvořící háčky na dubech
<i>T. hederiae</i> -group	<i>T. fagi</i> , <i>T. fagineus</i> , <i>T. hederiae</i> , <i>T. speciosus</i>	parazitě bejlmorek na buku
<i>T. flavipes</i> -group	<i>T. flavipes</i> , <i>T. longicalcar</i>	žlabatky tvořící háčky na dubech a javorech
<i>T. pulchellus</i> -group	<i>T. lampros</i> , <i>T. microcerus</i> , <i>T. pulchellus</i>	asociovaní s háčkami na vrbách
<i>T. cingulatus</i> -group	<i>T. angelicae</i> , <i>T. cingulatus</i> , <i>T. filipendulae</i> , <i>T. micrurus</i> , <i>T. poae</i> , <i>T. quercinus</i> , <i>T. triangularis</i>	žlabatky na bylinách, bejlmorky na bylinách, růžovitých, travinách a dřevinách
<i>T. bedeguaris</i> -group	subgroup <i>bedeguaris</i> – <i>T. auratus</i> , <i>T. bedeguaris</i> , <i>T. rubi</i> , (celkem 9 druhů) subgroup <i>chloromerus</i> – např. <i>T. confinis</i> , <i>T. hylesini</i> , <i>T. chloromerus</i> , <i>T. impar</i> , <i>T. scandicus</i> , <i>T. socius</i> , <i>T. stenus</i> , <i>T. veronicae</i> , (celkem 79 druhů) subgroup <i>juniperi</i> – <i>T. caudatus</i> , <i>T. flavovariegatus</i> , <i>T. juniperis</i> , <i>T. heyeri</i> , (celkem 6 druhů) subgrup <i>tipularium</i> – <i>T. amurensis</i> , <i>T. basalis</i> , <i>T. salicis</i> , <i>T. tipularium</i> , <i>T. poae</i> (celkem 9 druhů)	různí napříč řády; žlabatky na růžovitých, bejlmorky na bylinách, druh <i>Torymus hylesini</i>) parazituje na broucích (Coleoptera: Scolytidae) na jasanu

Tento přehled je zjednodušený a souhrnně ilustračně ukazuje hostitelskou diverzitu studovaného rodu. Kromě druhových skupin autoři ustanovili tzv. „species sola“: *T. apiomyiae*, *T. armatus*, *T. arundinis*, *T. azureus*, *T. favardi*.

Tabulka 3: Druhové skupiny podle Grissel (1976), které postihují druhy vyskytující se v západní části nearktické oblasti.

Druhová skupina	Zástupci	Hostitelé
<i>T. bedeguaris</i> -group	<i>T. flavicoxa</i> , <i>T. cecidomyiae</i> , <i>T. capite</i> , <i>T. scalaris</i> , <i>T. bedeguaris</i> (celkem 38 druhů)	žlabatky na ostružnicích a růžích, bejlomorky na bylinách, merovití na břestovci
<i>T. fullawayi</i> -group	<i>T. axillaris</i> , <i>T. denticulatus</i> , <i>T. frankiei</i> , <i>T. fullawayi</i> , <i>T. subcalifornicus</i> , <i>T. texanus</i>	žlabatky dubech a bejlomorky na cypřiších
<i>T. advenus</i> -group	advenus-subgroup – <i>T. prunicula</i> , <i>T. advenus</i> , <i>T. solidaginis</i> , <i>T. umbilicatus</i> warreni-subgroup – <i>T. osborni</i> , <i>T. elegantissimus</i> , <i>T. racemariae</i> , <i>T. californicus</i> , <i>T. warreni</i>	<i>advenus</i> -subgroup – bejlomorky a žlabatky na ostružníku <i>warreni</i> -subgroup – žlabatky na dubech a růži
<i>T. varians</i> -group	<i>T. varians</i> , <i>T. sulcatus</i> , <i>T. fagopirum</i> , <i>T. pallidicornis</i> , <i>T. azureus</i> , <i>T. aea</i>	semena růžovitých (fytofágní), bejlomorky na břízách a smrku, žlabatky na dubech a ostružnicích, jeden druh na <i>Megastigmus</i> (Chalcidoidea: Megastigmidae) a semenech muchovníku
<i>T. tubicola</i> -group	<i>T. atheatus</i> , <i>T. dasyneurae</i> , <i>T. koebelei</i> , <i>T. tubicola</i> , <i>T. obscurus</i> , <i>T. anthomyidae</i> , <i>T. coccineus</i> , <i>T. neuroterus</i> (celkem 23 druhů)	žlabatky na dubech a růžích, bejlomorky z různých rostlin, z hálek chalcidek z akácií (Tanaostigmatidae) a z trav (Eurytomidae)



Obrázek 2: Zástupce z druhové skupiny *T. fullawayi*-group *T. texanus*. (foto: Petr Janšta)

Tabulka 4: Poddruhy a druhové skupiny podle revize od Zavada (2003).

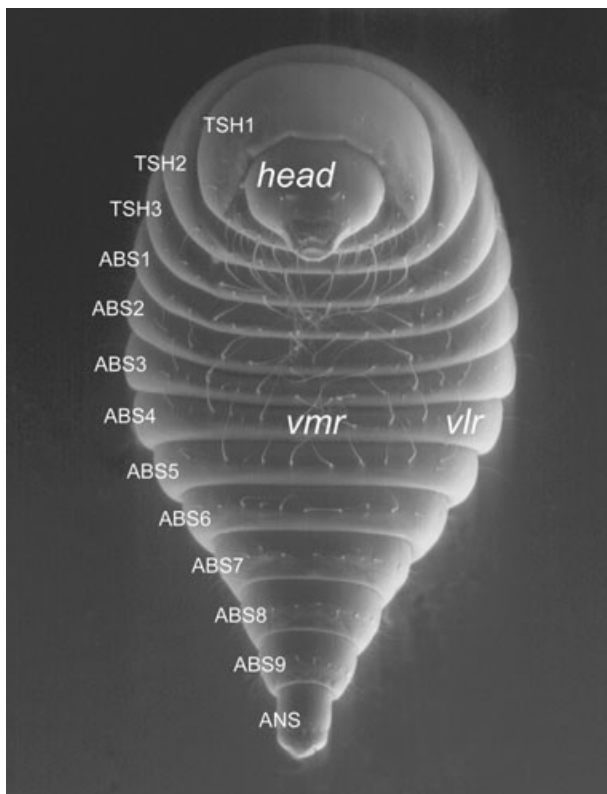
Poddruhy/druhové skupiny	Druhy	Hostitelé
poddruh <i>Arctorymus</i>		
	<i>T. baudysi</i> , <i>T. tatiana</i> , někteří zástupci skupiny <i>tubicula</i> -group	chalcidky (Eurytomidae) na travách
poddruh <i>Callimomus</i>		
<i>austriacus</i> -group	<i>T. austriacus</i> , <i>T. imperatrix</i>	
<i>laetus</i> -group	<i>T. arcticus</i> , <i>T. chrysocephalus</i> , <i>T. fischeri</i> , <i>T. grahami</i> , <i>T. igniceps</i> , <i>T. laetus</i> , <i>T. nemorum</i> , <i>T. regalis</i> , <i>T. scaposus</i> , <i>T. ventralis</i>	bejlomorky na ostřicích
poddruh <i>Lioterphus</i>		

	<i>T. azureus</i> , <i>T. fuscicornis</i> , <i>T. nitidulus</i>	bejlomorky na bříze a smrku
poddruh <i>Aretorymus</i>		
	<i>T. calcaratus</i> , <i>T. cupreus</i>	žahadloví blanokřídli na ostružníku a na žlabatkách na dubu
poddruh <i>Torymus</i> sensu stricto		
<i>T. kononovae</i> sp. sola	<i>T. kononovae</i>	neznámí hostitel, typová lokalita Velký Vřešťov – vápencové půdy
<i>T. fastuosus</i> sp. sola	<i>T. fastuosus</i>	žlabatky na dubech
<i>T. cyaneus</i> -group	<i>T. brevicoxa</i> , <i>T. cyaneus</i> , <i>T. macrurus</i>	žlabatky na dubech a růžích
<i>T. varians</i> -group	<i>T. aea</i> , <i>T. aucupariae</i> , <i>T. druparum</i> , <i>T. eurytomae</i> , <i>T. gracilor</i> , <i>T. terentius</i> , <i>T. varians</i>	fytofágové na růžovitých, někteří mají zoofágní i fytofágní larvy
<i>T. affinis</i> -group	<i>T. affinis</i> , <i>T. notatus</i> , <i>T. cerri</i>	žlabatky na dubech a růžích
<i>T. iacchos</i> -group	<i>T. anularis</i> , <i>T. iacchos</i>	žlabatky na růžích. (autor uvádí konkrétně <i>Nipporhodites magna</i>)
<i>T. hederiae</i> -group	<i>T. fagi</i> , <i>T. fagineus</i> , <i>T. hederiae</i> , <i>T. speciosus</i>	žlabatky na bucích
<i>T. chloromerus</i> -group Početná	Zahrnutý druhy z chloromerus-subgroup a bedeguaris-subgroup (podle Graham & Gijswijt 1998) a dále: <i>T. arundinis</i> , <i>T. flavipes</i> , <i>T. longicalcar</i> , <i>T. nobilis</i> , <i>T. roboris</i> , <i>T. erucarum</i> , <i>T. pulchelus</i> , <i>T. cingulatus</i>	žlabatky na dubech, bejlomorky

Výše je tedy uveden zjednodušený výčet toho, jak autoři rozdělili druhy do druhových skupin a jaké mají druhové skupiny hostitelské spektrum. V některých případech se rozdělení

do skupiny liší, hlavně v systému od Zavada (2003). Jak korespondují koncepty druhových skupin s molekulární fylogenezí bude dále diskutováno.

Na Obrázku 3 ze scanovacího elektronového mikroskopu se nachází larva rodu *Torymus*. Podle Gómez et al. (2008) se dají larvy posledního instaru čeledi Torymidae determinovat do rodu, případně i do druhu. Autoři si pro jejich studii zvolili tyto zástupce rodu *Torymus* (*T. affinis*, *T. auratus*, *T. bedeguaris*, *T. chloromerus*, *T. cingulatus*, *T. cyaneus*, *T. gerani*, *T. nobilis*, *T. notatus* a *T. rubi*). Larvy rodu *Torymus*, které podrobili morfologické studii, se vyznačují těmito znaky – všechny tělní segmenty jsou pokryté mnoha řadami vzpřímených sít s větší hustotou na ventrální straně těla; hlavová kapsule bývá širší než delší; labrum trojúhelníkovitého tvaru a dobře diferencované od labia (další znaky na ústním ústrojí mají mezidruhovou variabilitu). Tvar těla je spíše celkově protáhlý, nicméně se opět liší mezi druhy (např. *T. rubi* má značně protáhlé útlé tělo oproti druhům *T. notatus* a *T. cyaneus*). Autoři také diskutovali, zda se i morfologické znaky larev shodují s rozdělením do druhových skupin podle Graham & Gijswijt (1998). Do studie zahrnuly zástupce ze čtyř druhových skupin a podle jejich výsledků byla potvrzena druhová skupina cyaneus-group, která sdílela stejnou hustotu sít na abdominálním segmentu z ventrálního pohledu a barevné pruhy na tělních segmentech.



Obrázek 3: Snímek larvy druhu *T. cyaneus* v posledním instaru z elektronového mikroskopu. Vytěšlivky: head – hlavová kapsule, TSH1 – 3 – thorakální segmenty 1 – 3, ABS1 – 9 – abdominální segmenty 1 – 9, ANS – anální segment, vmr – ventromediální oblast, vlr – ventrolaterální oblast. Převzato z Gómez et al. (2008).

Larvy rodu *Torymus* mají idiobiontní strategii, tudíž hostitelskou larvu po napadení usmrtí a začnou ji konzumovat (Askew & Shaw, 1986). Proto o velikosti dospělého jedince parazitoidea s idiobiontní strategií rozhoduje velikost hostitele (Otto & Mackauer, 1998). Jak už bylo výše zmíněno, předpokládá se, že idiobionti nejsou tak specializovaní jako koinobionti. Také asociace a způsob specializace, které popisuje „ekologie hostitele“ („Host ecology hypothesis“) (Tschopp et al., 2013), se vyskytovalo až na výjimky hlavně u idiobiontů. U některých druhů bylo pozorováno, že po zpracování hostitele v hálce se larvy některých druhů začnou živit rostlinným pletivem hálky, například u druhu *T. cyaneus* (Askew 1961; Graham & Gijswijt, 1998).

Jeden z druhů rodu *Toymus* je asi nejprostudovanějším zástupcem. Jedná se o druh *Torymus sinensis*, který je specialista, se používá v biologickém boji proti invazní žlabatce *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae) tvořící hálky na kaštanovníku setém. Žlabatka pochází z Číny (Kamijo, 1982) a v Evropě je rozšířená již od roku 2002 (Brussino et al., 2002).

Parazitoid *T. sinensis* byl kromě jiného podroben výzkumu hybridizace. Hybridizace dvou druhů se běžně vyskytuje například u rostlin (Schmickl & Koch, 2011) nebo u ptáků (Cordero & Summers-Smith, 1993; Solberg et al., 2006). Moriya et al. (1992) poprvé pozorovali v laboratoři, že introdukovaný druh *T. sinensis* v Japonsku hybridizuje s původním japonským druhem *T. beneficus*. Pro tuto studii a další studie z Japonska byly oba druhy získány z hálek žlabatky *Dryocosmus kuriphilus*, jež parazitují (Yara et al., 2000). Jako metoda pro studium byla zvolena morfologická charakteristika u samic (poměr délky kladélka ku délce hrudi (tzv. O/T ratio neboli ovipositor index OI). Na základě tohoto znaku bylo z 821 studovaných jedinců 388 intermediálních (Yara et al., 2000). Kromě studia morfologických znaků se snažili hybridy odhalit i pomocí molekulárních metod. Nejprve poukázali na hybridizaci na základě rozdílů malických enzymů, které vizualizovali elektroforézu na polyacrylamidovém gelu (Izawa et al., 1995). Nicméně se tato metoda prokazovala malý počet hybridů. Například podle Toda et al. (2000) jen 8%. Na fylogenetickém stromě, který byl sestaven na základě genu COI se odděloval *T. sinensis* a tři klády *T. beneficus* (tyto tři klády jsou generace s jinou fenologií) (Yara, 2004). Morfologicky se jednoznačně v systému, kde se vyskytují tito dva parazitoidi vyskytují přechodní morfologičtí jedinci, nicméně výzkumy hybridizaci na molekulární úrovni neprokázaly zcela jednoznačně. Jedna z novějších studií (Quacchia et al., 2014) se zabývá touto problematikou dále. Nicméně se jedná o etologickou studii, a ne molekulární či morfologickou. V jejich pokusech testovali

specifitu druhu *T. sinensis* předkládáním jiných hostitelů. Samice žádnou z hálek žlabatek jiných druhů nevyhodnotily jako vhodného hostitele a do žádné nenakladly. Pouze u zlomku hálek nejpodobnějšího fenotypu k jejich hostitelskému druhu *D. kuriphilus* je déle prozkoumávaly, ale kladení proběhlo jen do hálek *D. kuriphilus*, což potvrzuje vysokou specifitu druhu *Torymus sinensis*. Dále testovali i páření samic a samců, do kterého zahrnuli čtyři jiné druhy rodu *Torymus* (*T. affinis*, *T. auratus*, *T. flavipes*, *T. geranii*), jenž se autorům vylíhli z hálek *D. kuriphilus* a *Biorhiza pallida*. Pokud byli samci druhu *T. sinensis* vystaveni samicím ostatních druhů, samci jeví vyšší zájem o samice než samice druhu *T. sinensis* o samce ostatních druhů. Každopádně k hybridizaci a samotnému páření nedošlo. Autoři vyhodnocují, že páření neproběhlo kvůli specifickým projevům chování před pářením, které se objevuje u samců druhu *T. sinensis*, které autoři pozorovali. Nicméně u druhů *T. sinensis* a *T. beneficus* se objevuje stejné chování samců před pářením, a tak neexistuje behaviorální překážka ve společném páření a hybridizaci (autoři Quacchia et al. 2014 to zmiňují jako vlastní pozorování).

Některé studie v rámci rodu *Torymus* poukazují na velkou fenotypovou plasticitu. Například Brown & Rossi (2013) podrobili výzkumu druh *T. umbilicatus* na Floridě. Prokázali jeho geografickou a latitudiální variabilitu – ve velikosti a v hostitelích. Druh *T. umbilicatus* parazituje bejlomorku *Asphondylia borrichidae* (Diptera: Cecidomyiidae) na hvězdicovitých rostlinách (Asteraceae). Bejlomorka tvoří hálky primárně na druhu *Borrichia frutescens*, na níž se tvoří větší hálky, než na dvou alternativních hostitelských druzích hvězdicovitých rostlin z rodu *Iva* (*I. frutescens* a *imbricata*) (Rossi et al., 1999). Všechny tři druhy hostitelských rostlin se vyskytují sympatricky. Ukázal se rozdíl a variabilita ve velikostech parazitoidů a v délce samičího kladélka. Větší parazitoidé se líhli z primární hostitelské rostliny bejlomorky než-li z alternativních. Na severu pak jsou samice menší a mají kratší kladélko než samice z jižních populací. Studie předkládá důkaz fenotypové plasticity pod vlivem latitudiálního gradientu nebo hostitelské rostliny.

Vnitrodruhovou morfologickou variabilitu (např. velikost těla či délku kladélka) lze vnímat jako fenotypovou plasticitu, ale některé práce na základě molekulárních studií odhalují, že se u některých zástupců objevují kryptické druhy. Ačkoliv by se také v širším či jiném pojetí dalo mluvit o fenotypové plasticitě, je například druh *T. flavipes* podle Kaartinen et al. (2010) ve skutečnosti tvořen dvěma genetickými liniemi, které jsou oddělené fenologicky a také morfologicky. U jarní se vyskytují samice s dlouhým i krátkým kladélkem a u podzimní jen samice s krátkým kladélkem. Druhy, které se nedají podle morfologie

jednoznačně rozlišit, se nazývají „kryptické druhy“ a díky rozvoji molekulárních metod se objevuje velké množství takovýchto nově objevených kryptických druhů (Bickford et al., 2007; Derocles et al., 2015; Hansson & Hambäck, 2013). Ukazuje se, že domnělí generalisté jsou jen skupinou více kryptických druhů, kteří jsou specializovaní. Podle Graham & Gijswijt (1998) se tento dimorfismus a napadání hostitelů s rozdílnou fenologií vyskytuje ještě u druhu *T. chloromerus*. Tento fenomén se objevuje i v jiném systému parazitoida a hálkotvorných žlabatek na dubech, který má linie tzv. „Quercus“ a „Cerris“ (Manos et al., 1999). Obě linie jsou hostitelskými druhy mnoha druhů žlabatek v palearktické oblasti (Melika et al., 2010). Například v druhovém komplexu *Bootanyomyia dorsalis* (Hymenoptera: Megastigmidae, pozn. dříve Torymidae) v asociaci se žlabatkami a duby se také objevují dvě fenologicky a geneticky oddělené linie. Kromě toho se fylogenetické linie lišily i v tom, jaký z dubů napadaly, zda z linie *Quercus* či *Cerris* (Nicholls et al., 2018). Něco podobného by se jistě dalo očekávat i v rámci druhů rodu *Torymus*.

2.3. Sekvenování nové generace a rozlišení fylogenetických vztahů

Molekulární přístupy se v rámci nadčeledi Chalcidoidea nevyžívají pouze k odlišení kryptických druhů, ale také například i k řešení fylogenetických vztahů. Dřívější podrobné morfologické studie (Graham & Gijswijt, 1998) jsou nahrazeny přístupy, kde fylogeneze bývají sestaveny pouze na základě molekulárních dat (Munro et al., 2011) nebo v kombinaci molekulárních dat a morfologie (Heraty et al., 2013). Kromě klasického Sangerovského sekvenování několika konkrétních genů (Cruaud et al., 2011a; Křížková 2011; Janšta et al., 2018) se přechází k pokročilejším metodám. K sestavení fylogenezí tak slouží metody tzv. sekvenování nové generace („Next generation sequencing“), mezi které patří sekvenování transkriptomu (u nadčeledi Chalcidoidea Peters et al. (2018)), sekvenování metodou „Ultra Conserved Elements“ (Fairthlock et al., 2015) nebo například sekvenování metodou „Anchored Hybrid Enrichment“ (Lemmon et al., 2012). Přestože všechny tři metody byly doposud úspěšně aplikovány u nadčeledi Chalcidoidea (sekvenování transkriptomu - (Peters et al., 2018) UCE (Rasplus pers. comm.) AHE (Peters pers. comm., Heraty pers. comm.)), zaměřím se zde podrobněji pouze na metodu Anchored Hybrid Enrichment – AHE (Lemmon et al., 2012). Její aplikací získáme sekvence velkého množství kódujících genů, které mají v genomu pouze jednu kopii za nižších nákladů, než je sekvenování transkriptomu. AHE funguje na principu, že se krátké oligonukleotidy (nazývané baits) zachytí na specifické části

genomu (sekvence kódujícího genu, který je v genomu v jedné kopii) a tyto části genomu jsou pak osekvenovány. Celému laboratornímu procesu předchází nalezení a nadesignování baits, jež jsou nejvhodnější pro studovanou skupinu (podrobněji viz Materiál a metodika). Metodický přístup byl použit nejprve u obratlovců (Eytan et al., 2015; Peloso et al., 2016; Prum et al., 2015). Od roku 2016 začínají být publikovány studie u bezobratlých, jmenovitě byla tato metoda aplikovaná pro sestavení fylogeneze u pavouků (Hamilton et al., 2016), u pestřenek (Diptera: Syrphidae) (Young et al., 2016), u nosatcovitých brouků (Coleoptera: Curculionidae), (Shin et al., 2017), u ostnohřbetek (Hemiptera: Membracoidea) (Dietrich et al., 2017) a u tesaříkovitých brouků (Coleoptera: Cerambycidae) (Haddad et al., 2018).

AHE lze aplikovat pro získání dobře podpořené fylogeneze, pro takové taxonomické jednotky jako je řád, jako v případě fylogeneze ptáků (Prum et al., 2015). Nicméně lze tímto přístupem studovat fylogenetické vztahy na úrovni rodové či druhové. U nadčeledi Chalcidoidea již s úspěchem vyzkoušeno v rámci rodu *Pteromalus* (Peters, pers. comm.).

3. Cíle práce

1. Na základě 5 genů sestavit fylogenezi z dostupných druhů rodu *Torymus*.
2. Na fylogenezi namapovat biologická a morfologické vlastnosti jednotlivých druhů a zjistit:
 - a) Jakým směrem probíhala evoluce hostitelského spektra?
 - b) Mají sesterské druhy hostitele ze stejné skupiny nebo sesterské druhy nepříbuzné hostitele?
 - c) Jsou blízké příbuzné druhy specializované spíše na hostitele, kteří se vyskytují na jedné rostlině?
 - d) Dochází ke změnám v morfologii kladélka při přechodu na jiného hostitele?
3. Na základě transkriptomových dat vybraných druhů nadesignovat „baity“ pro sekvenování pomocí Anchored Hybrid Enrichment.

4. Materiál a metodika

4.1. Materiál

Nově analyzovaní zástupci byli buď nasmýkáni nebo vychováni z hálek hostitelů. Nasmýkáni jedinci byli umístěni do 2 ml zkumavek s 96% EtOH. Následně skladování v mrazáku při -18 C. Vychovávání jedinců z hálek obnášelo jejich sběr v příhodnou dobu. Například nejvhodnější doba pro sběr hálek na dubech se ukázalo období na konci zimy, v horizontu několika týdnů před počátkem líhnutí. Po sběru byly háčky umístěny do chovných boxů s větráním, v zimě ponechány venku, aby byly zajištěny přirozené podmínky. Boxy byly každé dva dny kontrolovány. V případě vylíhnutí jedince z háčky následoval stejný postup usmrcení i uchovávání jako u nasmýkaných jedinců. Seznam jedinců a způsob získání viz přílohy Tabulka 1. Mimo nově analyzovaných jedinců jsem použila data zpracovaná pro předcházející studie (viz Tabulka 1). Metodika jejich sběru těchto vzorků a následného zpracování včetně získání sekvencí je podrobně popsána v pracích Křížková (2011) a Janšta et al. (2017).

Jako „outgroups“ bylo použito celkem 11 taxonů, dle Janšta et al. (2017) blíže či vzdáleněji příbuzných. Konkrétně byly zahrnuty tyto outgroups:

Eridontomerus arrabonicus a *Glyphomerus aylax* (Torymidae: Microdontomerinae)

Torymoides kiesenwetteri a *Pseudotorymus sapphyrinus* (Torymidae: Toryminae: Torymoidini)

Rod *Diomorus* (4 taxony), *Ecdamua* (1 taxon) a *Physothorax* (2 taxony) ((Torymidae: Toryminae: Torymini)

4.2. Molekulární metody

U nově analyzovaných vzorků (viz Tabulka 1, vzorky označené YY) docházelo k častým optimalizacím a úpravám protokolů pro získávání více koncentrované a kvalitnější DNA a amplifikované DNA. Níže je uvedena metodika pro amplifikaci a sekvenaci dvou jaderných genů (dvě podjednotky 28 SD2-3 rDNA a 28 SD4-5 rDNA, Elongation factor EF1- α) a jednoho mitochondriálního ((LCOHCO fragment – tzv. „Barcode“ COI).

4.2.1. Izolace DNA

Pro izolaci byl použit standardní kit Qiagen Blood and Tissue. U většiny vzorků se postupovalo dle výrobcem zavedeného protokolu. Nicméně u některých vzorků byl izolační protokol upraven pro větší výtěžnost DNA. Také byla snaha dosáhnout toho, aby izolace probíhala nedestruktivní metodou se stejným výtěžkem DNA. Z tohoto důvodu nedošlo k vortexování 1,5 ml mikrozkuřavky s puřrem a celým živočichem před ani po inkubaci, ale tekutina byla před inkubací promíchána pomocí špičky a po ní byla tekutina lyzačního puřru, proteinázy K a s již obsahující extrahovanou DNA odpipetována do nové 1,5 ml mikrozkuřavky (Polaszek et al. 2014). Celá inkubace pak probíhala v termobloku při 56 °C, kdy vzorky byly termoblokem neustále pomale protřepávány při 250 rpm. Nejlépe se osvědčilo inkubovat po dobu 22-24 hodin. Jedinci byli ihned po izolaci DNA přeneseni na dobu 30 minut do nové mikrozkuřavky s ddH₂O, a poté přesunuti do 80% EtOH (Fusu pers. comm, Polaszek et al., 2014). Tento krok je nutný k tomu, aby se izolovaní jedinci dali bez problémů napreparovat a nezůstávali na nich krystalky solí obsažených v izolačních médiích.

Pro větší koncentraci a výtěžnost došlo k následujícím odchylkám od standardního protokolu. Poslední krok eluce DNA byl rozdělen na dva a to tak, že bylo nejprve na kolonku napipetováno 50 μl elučního puřru, vzorek byl zcentrifugován standardně dle protokolu. Poté bylo přidáno opět 50 μl elučního puřru a opět byl vzorek zcentrifugován. Dvojnásobným centrifugováním se tak zmenšilo množství DNA, která mohla zůstat na kolonce. Celkový objem DNA tak činil 100 μl. Touto úpravou standardního protokolu došlo k výslednému získání polovičního množství izolátu, nicméně dosahoval větší koncentrace DNA (Fusu pers. comm.).

4.2.2. Amplifikace DNA

Amplifikace DNA proběhla standardně namícháním PCR mixu v objemu 25 μl a ve složení, jak je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5: Složení PCR reakce.

PPP mix bez MgCl ₂	12,5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
Primer – Forward	1 µl
Primer – Reverse	1 µl
H ₂ O	6 µl
DNA	2 µl
Celkové množství PCR mixu	25 µl

Objem DNA 2 µl se prokázal jako neoptimálnější, kdy při objemu DNA nad 4 µl pravděpodobně docházelo k inhibici polymerační reakce.

4.2.3. Použité primery

Polymerizační reakce proběhla pro následující geny za užití níže zmíněných primerů. U některých bylo nutné optimalizovat teplotu v kroku nasedání primerů. Viz tabulky 6-10 obsahující nastavení termocyklerů při polymerizační reakci.

Primery pro úsek genu 28SD2-3 rDNA (Belshaw & Quicke, 2002):

F – 28S-D2-3: 5'-GCG AAC AAG TAC CGT GAG GG-3'

R – 28S-D2-3: 5'-TAG TTC ACC ATC TTT CGG GTC -3'

Primery pro úsek genu 28SD4-5 rDNA (Belshaw & Quicke, 2002):

F – 28S-D4-5: 5'-CCC GTC TTG AAA CAC GGA CCA AGG -3'

R – 28S-D4-5: 5'-GTT ACA CAC TCC TTA GCG GA -3'

Primery pro úsek genu Elongation factor (EF1 α) (Cruaud et al., 2011b):

F – F2-557F: 5' -GAA CGT GAA CGT GGT TAT YAC SAT-3'

R – F2-1118R: 5' -TTA CCT GAA GGG GAA GAC GRAG- 3'

Primery pro úsek genu COI – fragment LCO HCO (Hebert et al., 2003):

F – LCO1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3'

R – HCO2198: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA -3'

V případě neúspěšné amplifikace primerem LCO HCO byly u těchto vzorků amplifikovány dva kratší fragmenty o délkách 295bp a 391bp podle Fusu & Polaszek (2017).

Primery pro první fragment genu COI:

F – LCO1490M: 5'-CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'

R – MChaR1: 5'-CCY GTT CCA AYA AAT ATT CT-3'

Primery pro druhý fragment genu COI:

F – MChaF1: (5'-CCT CGA ATA AAT AAT ATA AGA TT-3'

R – HCO2198: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA -3'

4.2.3. Nastavení termocyklerů

Amplifikace probíhala na thermocyklerech Eppendorf™ Mastercycler™ Nexus Thermal Cycler a Biorad T100™ Thermal Cycler v laboratořích katedry zoologie. Nastavení termocyklerů viz. níže v tabulkách 6–10.

Tabulka 6: Nastavení termocyklieru pro amplifikaci genu 28 SD2-3.

Krok	Teplota	Čas
1. Počáteční denaturace	94 °C	3:00
2. Denaturace	92 °C	0:30
3. Nasedání primeru	54 °C	0:30
4. Prodlužování	72 °C	2:00
Krok 2. – 4. – opakování 35x		
5. Konečné prodlužování	72 °C	10:00
6. Zchlazení	12 °C	∞

Tabulka 7: Nastavení termocyklieru pro amplifikaci genu 28 SD4-5.

Krok	Teplota	Čas
1. Počáteční denaturace	94 °C	3:00
2. Denaturace	92 °C	0:30
3. Nasedání primeru	58 °C	0:30
4. Prodlužování	72 °C	1:00
Krok 2. – 4. – opakování 30x		
5. Konečné prodlužování	72 °C	10:00
6. Zchlazení	12 °C	∞

Tabulka 8: Nastavení termocyklieru pro amplifikaci genu EF1 α .

Krok	Teplota	Čas
1. Počáteční denaturace	94 °C	3:00
2. Denaturace	94 °C	0:30
3. Nasedání primeru	51,5 °C	1:00
4. Prodlužování	72 °C	1:00
Krok 2. – 4. – opakování 35x		
5. Konečné prodlužování	72 °C	10:00
6. Zchlazení	12 °C	∞

Tabulka 9: Nastavení termocyklieru pro amplifikaci genu LCOHCO.

Krok	Teplota	Čas
1. Počáteční denaturace	94 °C	3:00
2. Denaturace	92 °C	0:30
3. Nasedání primeru	49 °C	1:30
4. Prodlužování	72 °C	2:00
Krok 2. – 4. – opakování 35x		
5. Konečné prodlužování	72 °C	10:00
6. Zchlazení	12 °C	∞

Tabulka 10: Nastavení termocykleru pro amplifikaci obou fragmentů genu LCOHCO – (primery LCO1490M a MChaR1, MChaF1 a HCO2198).

Krok	Teplota	Čas
1. Počáteční denaturace	94 °C	2:00
2. Denaturace	94 °C	0:30
3. Nasedání primeru	44 °C	1:30
4. Prodlužování	72 °C	0:30
Krok 2. – 4. – opakování 40x		
5. Konečné prodlužování	72 °C	10:00
6. Zchlazení	12 °C	∞

4.2.4. Elektroforéza PCR produktů

Ověření úspěchu amplifikace DNA probíhalo pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Ten byl připraven standardně z 0,5x TBE pufru a agarózy. Gel byl připravován 1%, tzn. že pokud byl připravován z 50 ml pufru, bylo přidáno 0,5 g agarózy. Přidáním barviva ethidiumbromid do gelu byla zajištěna vizualizace DNA při dopadu UV světla. Na gel byly vždy naneseny 4 µl PCR produktu jednotlivých vzorků a 2 µl standardu DNA marker 155-970 o koncentraci 50 µg/250 µl. Elektroforéza byla spuštěna na dobu 40 minut při napětí 100 V a proudu 400 mA.

4.2.5. Purifikace PCR produktů

Část vzorků byla nejprve purifikována purifikačním kitem Quiagen podle standardního návodu, ale pro lepší výtěžnost DNA byl posléze produkt purifikován látkou ExoSAP (Thermo Fisher Scientific). Touto metodou nedochází k ztrátě DNA, která může zůstat na kolonce při purifikaci kitem Quiagen. Purifikace pomocí ExoSAPu probíhá v cykleru, kde dochází k enzymatické reakci. Proces purifikace ExoSAPem a složení reakcí je popsána v Tabulkách 11-12.

Tabulka 11: Složení purifikační reakce.

Celkový objem	5 μ l
PCR produkt podle síly pruhu gelové elektroforézy	1,5 μ l (velmi silný pruh) 2 μ l 2,5 μ l (velmi slabý pruh)
ExoSAP	0,418 μ l
H ₂ O (ekvivalentně dle objemu PCR produktu)	2,09 μ l (při 2,5 μ l PCR produktu) 2,59 μ l (při 2 μ l PCR produktu) 3,09 μ l (při 1,5 μ l PCR produktu)

Tabulka 12: Program v termocykleru pro purifikaci ExoSAPem.

Krok	Teplota	Čas
Degradace primerů a zbývajících nukleotidů	37 °C	15 minut
Inaktivace Exo-SAP reagentu	80 °C	15 minut

4.2.6. Sekvenační reakce a sekvenace

U vzorků purifikovaných kitem Quagen byla přeměřena koncentrace přístrojem Nanodrop. U vzorků, kde naměřená koncentrace přesahovala 20-30 ng/ μ l, se do směsi na sekvenační reakci přidávalo 2 μ l DNA. U vzorků s nižší koncentrací se do reakce přidávaly 3 μ l purifikovaného produktu. V obou případech k purifikovanému produktu bylo přidáno 0,32 μ l primeru, který byl 100 μ M, a příslušné množství H₂O, tak aby celkový objem činil 8 μ l. Do purifikovaného produktu ExoSAPem byl přidán primer jednoho směru v objemu 0,32 μ l (koncentrace) a voda do celkového objemu 8 μ l. Sekvenační reakce posléze proběhla v Sekvenační laboratoři v BIOCEVu, kde mají tyto sekvenátory – čtyřkapilární 3130 Genetic Analyzer (2007), šestnáctikapilární 3130xl Genetic Analyzer (2010) a dvacetičtyřkapilární 3500 Genetic Analyzer (2015) od firmy Applied Biosystems.

4.3. Práce se sekvencemi

Veškeré sekvence byly zpracovány v programu Geneious® 9.1.8 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012). Data získaná ze sekvenátoru ve formátu chromatografu byly zpracovány následovně. V případě vzorků se sekvencemi v obou směrech (tj. forward i reverse) byly sekvence spojeny dohromady (tzv. „assamblovány“). Kromě nově sekvenovaných genů byly také použity již publikované sekvence (Janšta et al., 2017), sekvence z diplomové práce Barbory Křížkové (Křížková, 2011) či dosud nezpracované sekvence školitele. Kromě sekvencí genů, které byly nově sekvenované, se také jednalo o sekvence dalších tří genů 18 SD, Jerry-Pat a cytochromu B, které byly do analýz zařazeny. Všechny použité sekvence jednotlivých genů jsou zmíněny v Tabulce 1 v přílohách této práce.

Pro každý gen separátně byl vytvořen soubor ve fasta formátu obsahující sekvence všech zástupců. Následně byly sekvence alignovány programem MAFFT verze (Kato, et al., 2017, online verze - <https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). Pro kódující geny byla použita metoda L-INS-i (pro jednu konzervovanou doménu bez mezer) a metoda E-INS-i (s více konzervovanými doménami a mezerami) pro ribozomální geny. Výsledné alignmenty byly opět v programu Geneious zkontrolovány, upraveny a oříznuty na jednotnou délku. U genů kódujících proteiny po přeložení na aminokyseliny bylo zjištěno, zda se v sekvencích nevyskytují stop kodony. Nakonec byl vytvořen také konkatenát genů ribozomálních, genů mitochondriálních a také všech genů.

4.4. Metody tvorby fylogenetických stromů

Fylogenetické stromy byly tvořeny metodou maximum likelihood programem RaxML (Stamatakis, 2014) prostřednictvím serveru CIPRES (Miller et al., 2010). Výpočet byl ošetřen parametry 1000 opakování bootstrapu, při aproximačním modelu GTRCAT a tzv. Partition modelem s udanými délkami jednotlivých sekvencí v konkatenovaném alignmentu. Například takto pro alignment obsahující všechny geny:

DNA, RNA = 1-1682

(dohromady fragmenty: 18SDrDNA,
28SD2-3 rDNA a28SD4-5 rDNA)

DNA, EF = 1683-2198

DNA, COI = 2199-3641

(dohromady fragmenty: LCOHCO, Jerry-Pat)

DNA, Cytb = 3642-4397

Zobrazení stromů proběhlo ve FigTree v1.4.13 (Rambaut et al. 2012, <http://tree.bio.ed.ac.uk/>). Před aplikací bayesiánské statistiky metodou MrBayes byl dataset analyzován programem PartitionFinder 2 (Lanfear et al., 2016). Ten pro jednotlivé genové skupiny našel substituční modely, kterým geny podléhaly v evoluci. Vstupní soubor v nexus formátu pro MrBayes (v. 3.2.6. Ronquist et al., 2012) obsahoval sekvence, substituční modely a jednotlivé subsety vybrané PartititonFinderem, také v parametrech bylo nastaveno, aby opakování 30 000 000 generací. Analýza byla spuštěna opět na serveru CIPRES. Výstupní parametrové soubory byly kontrolovány v programu Tracer (Rambaut et al., 2018). Při tvorbě finálního stromu bylo nejdříve odstraněno prvních 25% vypočítaných stromů. Fylogenetické stromy z této analýzy byly též vizualizovány opět ve FigTree. Následná grafická úprava proběhla v programu CorelDraw 2018 (verze 20, 64 bit).

4.5. Ovipositor index (OI)

Pro zástupce zahrnuté do fylogeneze byly zjištěny hodnoty tzv. ovipositor indexu = OI (délka zadní tibie/délka kladélka) (Přílohy, Tabulka 1). Tato data byla získána buď z publikace Graham & Gijswijt (1998) nebo vlastním měřením dospělých samic. Protože pro konkrétní druhy/klády bylo téměř vždy zjištěno rozmezí konkrétních hodnot OI, byly tyto hodnoty pro další použití nakonec zprůměrovány. Průměrné hodnoty jsou namapovány na výsledný fylogenetický strom.

4.6. Designování tzv. baits a příprava na Next-gen sekvenování

Podle výsledků fylogenetických analýz této práce budou pro další studium vybrány reprezentativní druhy pro tzv. Next generation sequencing metodou Anchored Hybrid Enrichment (Lemmon et al., 2012). Prvním krokem, který přecházel samotnému designování baits, spočíval v práci s programem Orthograph verze 0.6.3 (Petersen et al., 2017). Jako vstupní data pro tento program sloužila transkriptomová data čtyř zástupců čeledi Torymidae

(*Torymus bedeguaris*, *Podagrion pachymerum*, *Glyphomerus stigma*, *Australgion koebelei*) a čtyř referenčních taxonů z jiných čeledí nadčeledi Chalcidoidea (*Nasonia vitripennis*, *Trichogramma evanescens*, *Copidosoma floridanum*, *Fopius arisanus*). Všechny použité transkriptomy byly assamblovány a zaslány Dr. Ralphem Petersem. Na základě těchto dat program Orthograph vybral vhodné ortology (geny, které se vyskytují v genomu jen v jedné kopii) sdílené u všech sekvencí. U ortologních genů se tedy předpokládá, že vznikly právě z jedné kopie u společného předka a prodělali podobnou evoluci (Koonin, 2005). Výstupem Orthographu pak bylo 5357 ortologních genů.

Následovalo ještě několik dalších kroků podle manuálu vytvořeného pro analýzu orthologních dat v rámci projektu 1KITE (Peters, in litt.), než se přistoupilo k designování „baits“ programem BaitFisher. Všechny kroky analyzování dat po analýze programem Orthograph jsem prováděla v prostředí Linux. Konkrétně analýza a úprava dat spočívala v krocích, které jsou níže popsány ve zjednodušené formě (pozn. nezmiňuji zde každé přejmenovávání souborů a další formátovací kroky, které musely být v průběhu analýz prováděny).

U výstupních souborů ve fasta formátu byly přepsány názvy sekvencí (tzv. „headers“) do HaMStRad formátu. V dalším kroku byly soubory sumarizovány, odstraněny stop kodony a některé referenční sekvence. Před alignováním sekvencí aminokyselin museli být provedeny formální úpravy, které spočívaly v přejmenování souborů atp. Poté byly sekvence aminokyselin alignovány programem MAFFT metodou L-INS-I separátně pro každý gen. Po alignování sekvence byly v „interleaved“ formátu. Kvůli dalším krokům proto musely být sekvence převedeny do „noninterleaved“ (fasta) formátu (hypotetický příklad interleaved a non-interleaved níže).

Interleaved format:

>Torymus

ATGGGAGCGGGGGCGTCTGTTTTGAGGGGAGAGAAGCTAGATACATGGGA

>Podagrion

ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGAAAAATTAGATTCATGGGA

>Torymus

AAGTATCAGGCTTCGGCCCGGTGGCAAGAAAAAGTACATGATAAAACATC

>Podagrion

```
GAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAACAAAAAATATAGACTGAAACATT
```

Non-interleaved format

>Torymus

```
ATGGGAGCGGGGGCGTCTGTTTTGAGGGGAGAGAAGCTAGATACATGGGAAAGT  
ATCAGGCTTCGGCCCGGTGGCAAGAAAAAGTACATGATAAAACATC
```

>Podagrion

```
ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGAAAAAATTAGATTCATGGGAGAAA  
ATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAACAAAAAATATAGACTGAAACATT
```

Další krok obnášel analýzu, zda sekvence neobsahují nějaké chyby, či zda nejsou špatně alignované. A to v případě, že se se sekvencí aminokyselin referenčního taxonu neshodovali ve více než 30 pozicích. Takovéto sekvence byly v následném kroku označeny jako „outliers“. Další problematické sekvence byly vyhodnoceny podle vzdáleností BLOSUM62 od nejbližších referenčních taxonů. Výstupem byl seznam všech sekvencí, které byly označeny jako „outliers“. V dalším kroku byly znovu alignovány pomocí MAFFT L-INSI-I. Poté bylo opět stejným postupem zkontrolováno, zda opětovné alignování proběhlo úspěšně nebo se v sekvencích stále vyskytují „outliers“. Pokud se stále mezi sekvencemi „outliers“ nacházely, tak je bylo nutné odstranit jak ze sekvencí aminokyselin, tak i z nukleových kyselin analyzovaných taxonů.

Poté ze všech souborů aminokyselin i nukleových kyselin (stále nealignovaných) byly odstraněny sekvence referenčních taxonů kromě sekvencí *Nasonia vitripennis*. Dále v sekvencích aminokyselin byly odstraněny úseky obsahující mezery, které vznikly v předchozích krocích odstraňováním „outliers“ a referenčních taxonů.

Poslední krok spočíval v konvertování alignovaných a upravených sekvencí aminokyselin do sekvencí nukleových kyselin. Konvertování bylo provedeno programem Pal2Nal (Suyama et al., 2006, v modifikaci od Donath & Meusemann pro 1KITE).

Dále již bylo možné takto připravená data analyzovat programem BaitFisher (Mayer et al., 2016). Program byl také spuštěn v operačním systému Linux. Program designuje „baity“ z alignmentů, které obsahují i sekvence referenčního taxonu s anotovaným genomem. V mém případě šlo o sekvence a anotovaný genom *Nasonia vitripennis*. V souboru obsahujícím

parametry (např. délka „baits“ nebo zda při designování zahrnout referenční taxon atp.) bylo nadefinováno, jak má program BaitFisher postupovat při designování baitů, které probíhá následovně (upraveno dle Mayer et al., 2016):

Nejdříve najde začátky exonů a sekvence podle nich rozdělí do sekcí, kde jsou exony nebo kódující sekvence (pak může být referenční taxon s anotovaným genomem odstraněn, jelikož posloužil pro nalezení exonů, ale pak už není obsažen v proceduře designování baitů), prohledá sekvence v těchto vybraných sekcích a najde vhodná místa o navolené délce baitu, přefiltruje místa, kde by baity měly začínat. Následně BaitFisher rozdělí sekvence do skupin podle nadefinované podobnosti uživatelem. Pak vypočítá sekvenci baitu pro každou skupinu. Poté jsou všechny baity vyčteny společně v jednom souboru. Ty dále byly podrobeny ještě finálnímu přefiltrování, které provádí program BaitFilter (součástí balíčku BaitFisher). Ten například odfiltruje baity, které by se poté mohly vázat na víc míst nebo by se nemusely navázat na správné místo dobře. Tímto krokem designování baitů bylo u konce. Výsledný soubor obsahující nadesignované baity byl předán firmě, která baity nasyntetizuje.

5. Výsledky

5.1. Finální dataset

Finální alignment, který sloužil k fylogenetickým analýzám, byl o délce 4397 bp a zahrnoval celkem 181 jedinců. V Tabulce 13 jsou rozepsané jednotlivé genové úseky, jejich délka a početní zastoupení sekvencí. Vše je pak podrobněji shrnuto (tj. pro které jedince byly osekvenovány jaké úseky, původ sekvencí atd.) v Tabulce 1 v kapitole Přílohy.

Tabulka 13: Genové úseky ve finálním alignmentu.

Genový úsek	Délka	Počet sekvencí
18SD rDNA	571 bp	63
28SD 2-3 rDNA	596 bp	136
28SD 4-5 rDNA	515 bp	82
Elongation factor	512 bp	93
COI (LCOHCO)	650 bp	150
COI (JerryPat)	798 bp	64
Cytochrom B	755 bp	50

V podkapitole 5.3. se nachází fylogenetické stromy sestavené na základě finálního alignmentu i jednotlivých částech.

5.2. Substituční modely pro jednotlivé geny

Program Partition Finder 2 vypočetl, jaké substituční modely odpovídají evoluci jednotlivých genů (částem alignmentu označených „charset DNA_název genu či skupiny genů“). Vše včetně modelů je zaneseno v Tabulce 14.

Tabulka 14: Souhrnná tabulka substitučních modelů, které sloužili jako parametry pro výpočet fylogenetických stromů nástrojem MrBayes.

Rozdělení pro Partition Finder 2	Jednotlivé substituční modely evoluce genů
charset DNA_RNA = 1-1682	nst=6 rates=invgamma
charset DNA_EF = 1683-2198	nst=2 rates=invgamma
charset DNA_COI = 2199-3641	nst=6 rates=invgamma
charset DNA_Cytb = 3642-4397	nst=6 rates=invgamma

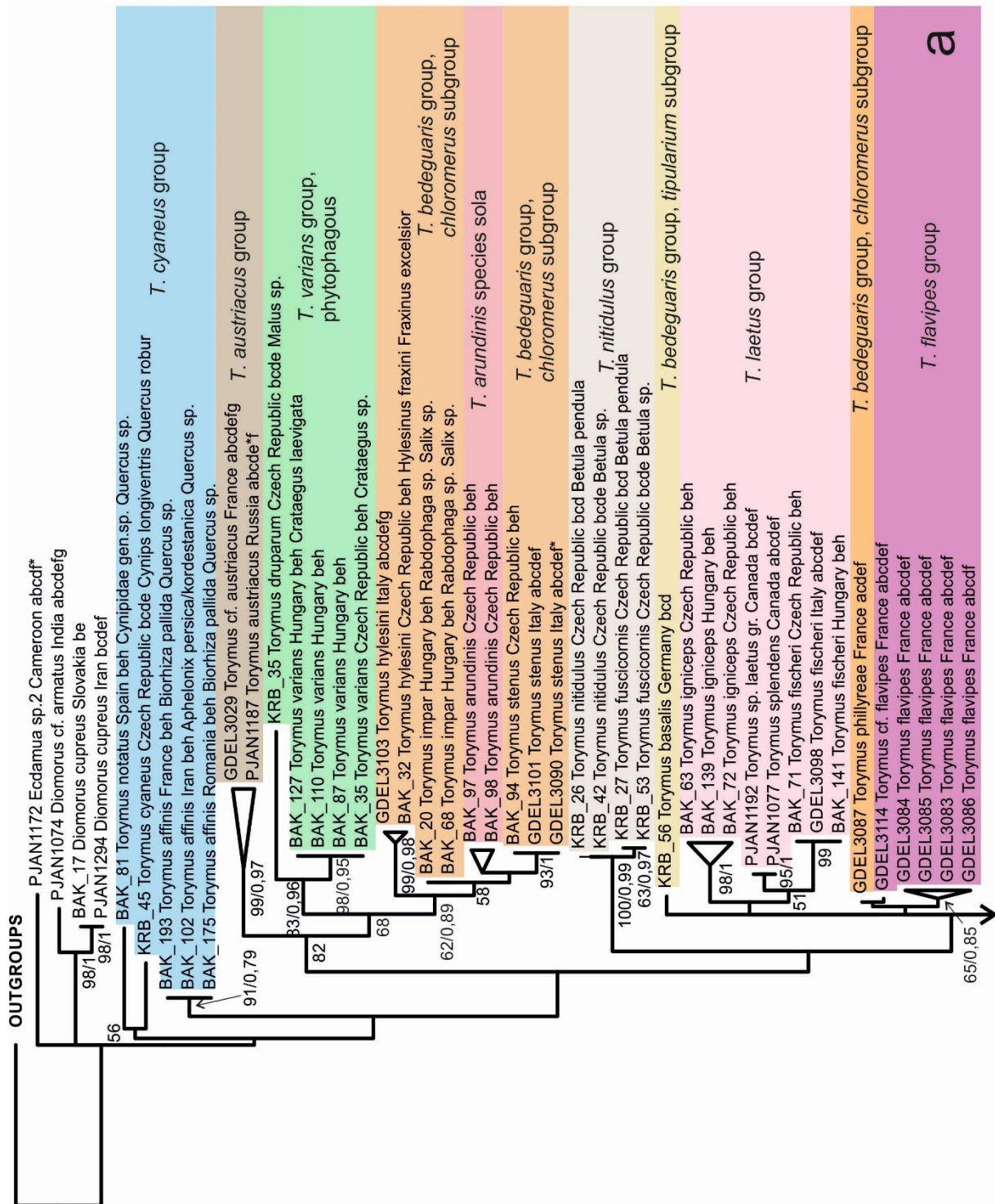
Substituční modely průběhu evoluce genů tedy pro tento dataset byly dva. Jen pro gen Elongation factor se substituční model lišil. V Tabulce 14 jsou uvedeny jako parametry, které byly poté vloženy do vstupního souboru pro analýzu MrBayes. Jejich význam je následující (Faircloth, 2010):

Parametry nst=6 rates=invgamma popisují tzv. symetrický model. Symetrický model přiřazený k většině částí alignmentu = symmetrical model (SYM): předpokládá stejnou frekvence bází a symetrické substituce, to znamená záměna A za T = T za A (Zharkikh, 1994).

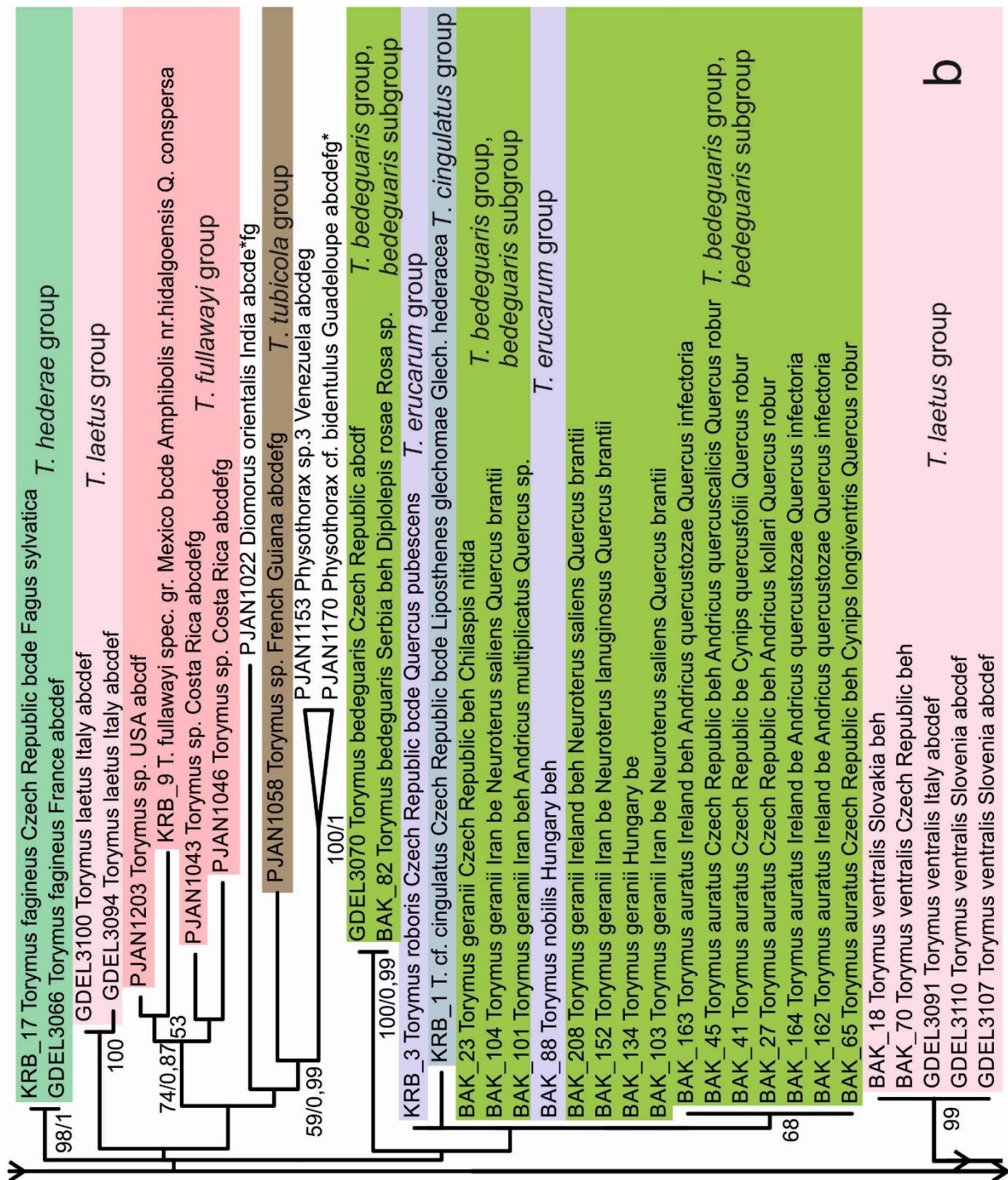
Parametry nst=2 rates=invgamma odpovídají modelu HKY (Hasegawa-Kishino-Yano). Tento model přiřazený pouze ke genu Elongation factor = Hasegawa-Kishino-Yano (HKY, nst=2): nepředpokládá stejnou frekvenci bází a rozlišuje mezi mírou tranzic a transverzí (Hasegawa et al., 1985).

5.3. Výstupy fylogenetických analýz

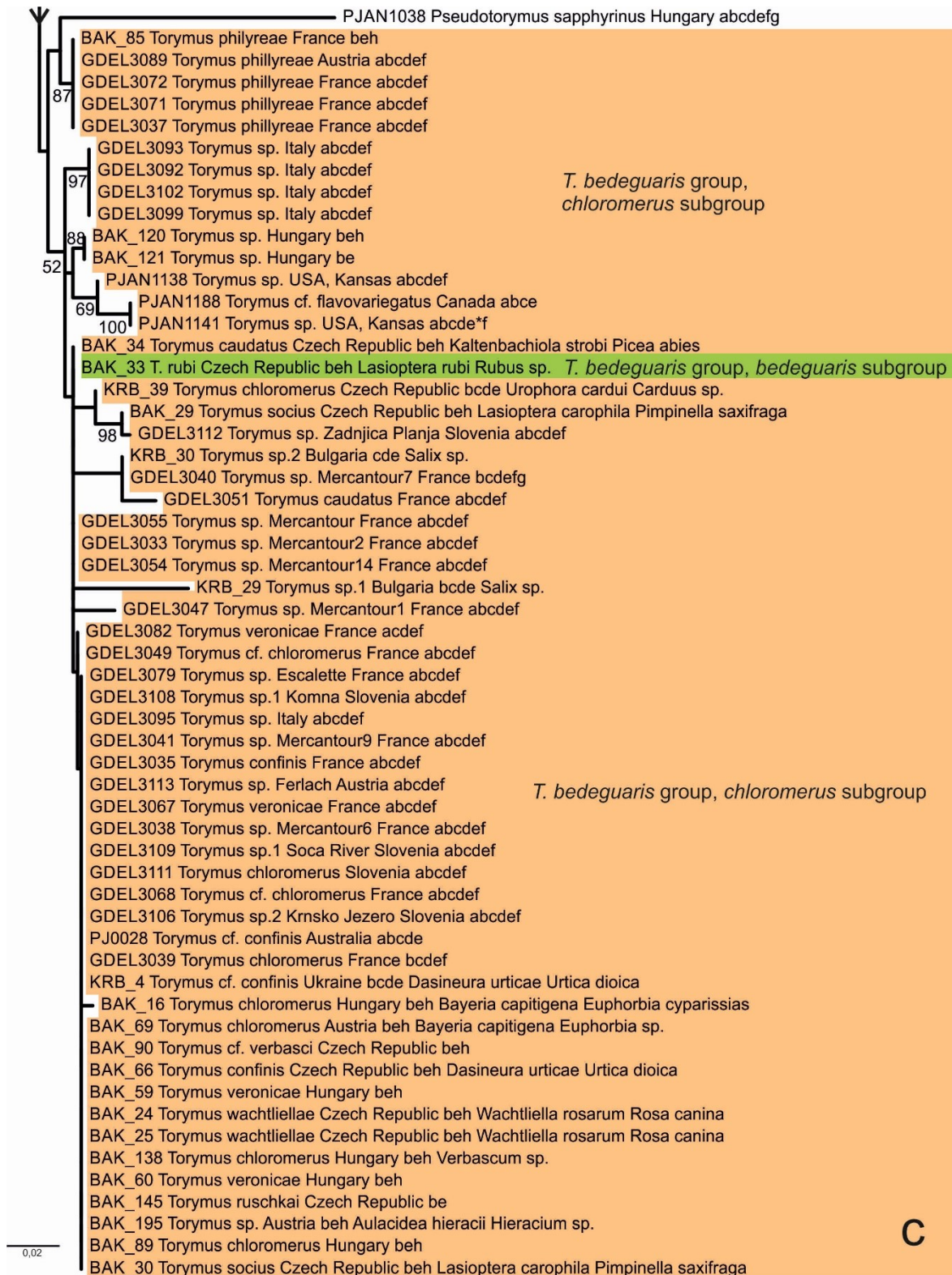
Metodami Maximum Likelihood a MrBayes byly sestaveny fylogenetické stromy na základě částí dvou ribozomálních genů 18SD a 28SD (Obrázek 4a – c), části genu pro elongation factor (Obrázek 5a – b), částí dvou mitochondriálních genů cytochrom oxidázy I a cytochromu B (Obrázek 6a – c), zvláště pro část genu pro cytochrom oxidázu I (Obrázek 7a – c). Také byl sestaven fylogenetický strom na základě konkatenátu všech genů (Obrázek 8a – b). U tohoto stromu byl největší počet jedinců ($n=181$) a jeho topologie byla podpořena nejvyššími hodnotami bootstrapu a posteriorní pravděpodobnosti (PP). Z tohoto důvodu ho tedy považují ho za nejvíce reprezentativní. Na tento strom byly navíc namapovány hostitelské asociace, včetně hostitelských rostlin, habitatů, kde se druhy vyskytují a „ovipositor indexu“. Tato data byla získána buď vlastním pozorováním nebo z práce Graham & Gijswijt (1989). U stromů pro jednotlivé úseky, kde je vždy zahrnut nižší počet jedinců, jsou podpory většinou nižší a topologie se navzájem liší. Níže na všech obrázcích je vždy topologie získaná metodou Maximum Likelihood a u nodů větví, které jsou shodné i ve stromech získaných programem MrBayes, je za hodnotou bootstrapu doplněna hodnota PP. Vždy jsou uváděny jen hodnoty $<50/0,5$. Kompletní neupravené výstupy se všemi hodnotami se nachází v elektronické příloze této práce. V tištěných přílohách se nachází i fylogenetický strom sestavený na základě cytochromu b (Obrázek 1 a 2). Protože pro gen cytochromu b bylo získáno jen velmi málo sekvencí ($n=50$) a výsledný strom nemá tudíž výraznou výpovědní hodnotu, nebyl zahrnut do samotné práce. Dále je v tištěných přílohách (Obrázek 3) zahrnut fylogenetický strom, který obsahuje pouze sekvence genů od vzorků, které byly vychovány z konkrétního hostitele. Nicméně tento strom také nemá dostatečnou výpovědní hodnotu z důvodu zařazení malého počtu jedinců. I přesto také jsou některé hostitelské asociace a jejich evoluce v kontrastu s fylogenezí dle všech genů.



Obrázek 4a: První část výsledného fylogenetického stromu pro jaderné ribozomální geny (18 SD rDNA a 28 SD rDNA) sestaveného na základě sekvencí od 139 jedinců. Ve všech stromech jsou zaneseny hodnoty bootstrapu a pravděpodobností <math><50/0,5</math>. Různými barvami jsou zvýrazněny druhové skupiny dle Graham & Gijswijt (1998) a Grissell (1976).



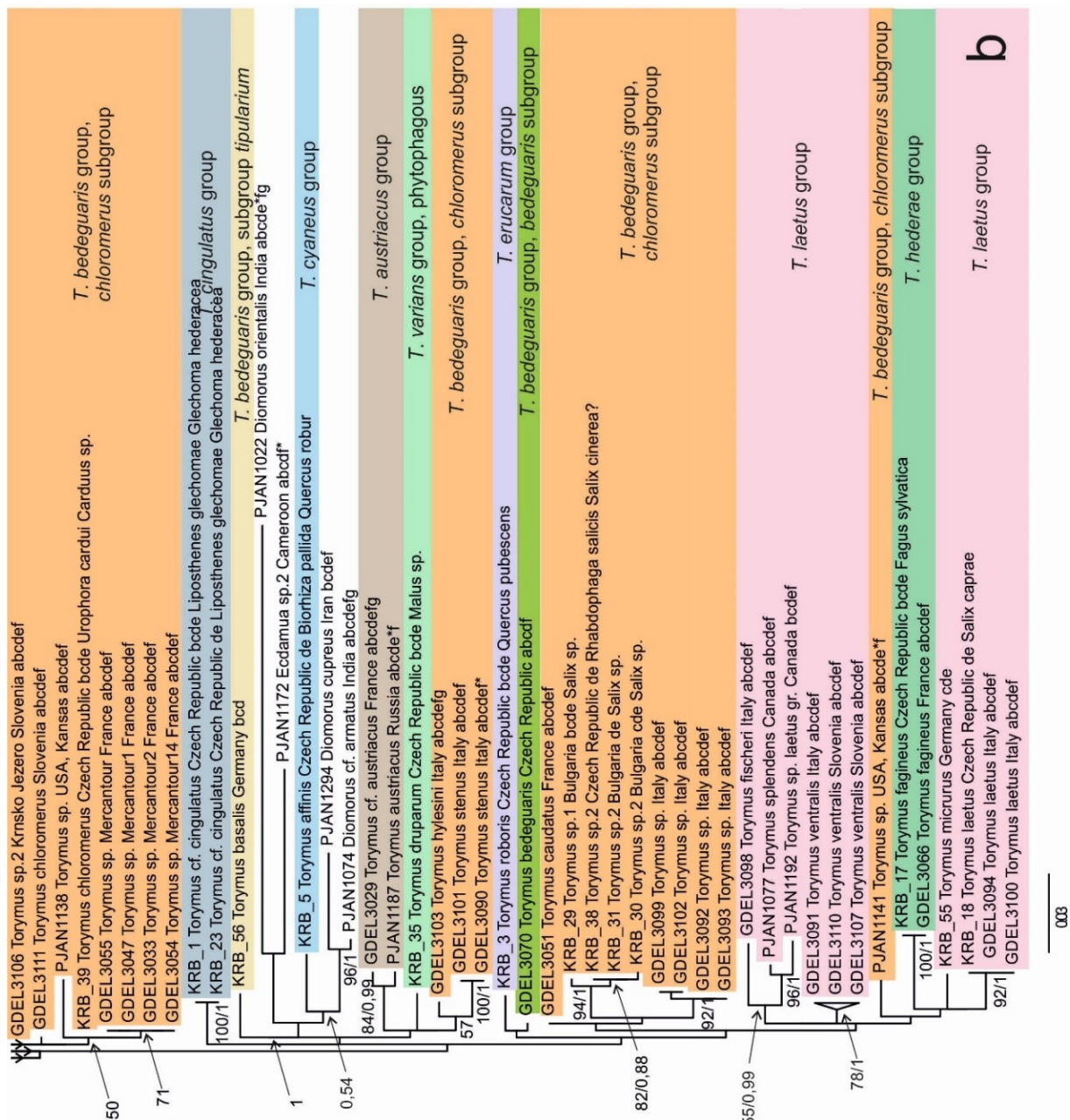
Obrázek 4b: Druhá část výsledného fylogenetického stromu pro jaderné ribozomální geny (18 SD a 28 SD). Ve všech stromech jsou zaneseny hodnoty bootstrapu a pravděpodobností $50/0,5$. Různými barvami jsou zvýrazněny druhové skupiny dle Graham & Gijswijt (1998) a Grissell (1976).



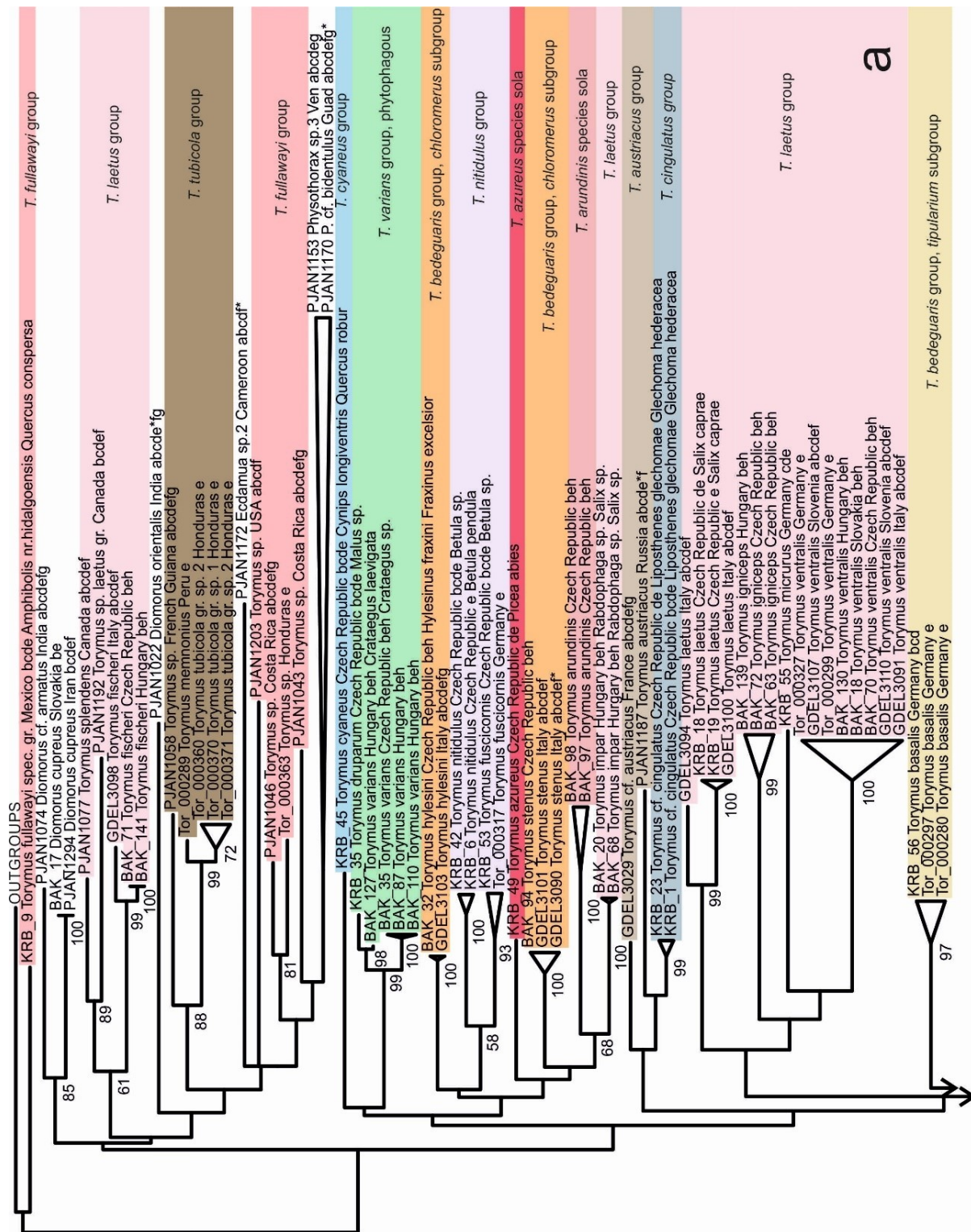
Obrázek 4c: Třetí část výsledného fylogenetického stromu pro jaderné ribozomální geny (18 SD a 28 SD). Ve všech stromech jsou zaneseny hodnoty bootstrapu a pravděpodobností <math><50/0,5</math>. Různými barvami jsou zvýrazněny druhové skupiny dle Graham & Gijswijt (1998) a Grissell (1976).



Obrázek 5a: První část fylogenetického stromu sestaveného na základě jaderného genu Elongation faktor (pro 93 jedinců). Ve všech stromech jsou zaneseny hodnoty bootstrapu a pravděpodobností $50/0,5$. Různými barvami jsou zvýrazněny druhové skupiny dle Graham & Gijswijt (1998) a Grissell (1976).



Obrázek 5b: Druhá část stromu sestaveného na základě jaderného genu Elongation factor. Ve všech stromech jsou zaneseny hodnoty bootstrapu a pravděpodobností <50/0,5. Různými barvami jsou zvýrazněny druhové skupiny dle Graham & Gijswijt (1998) a Grissell (1976).

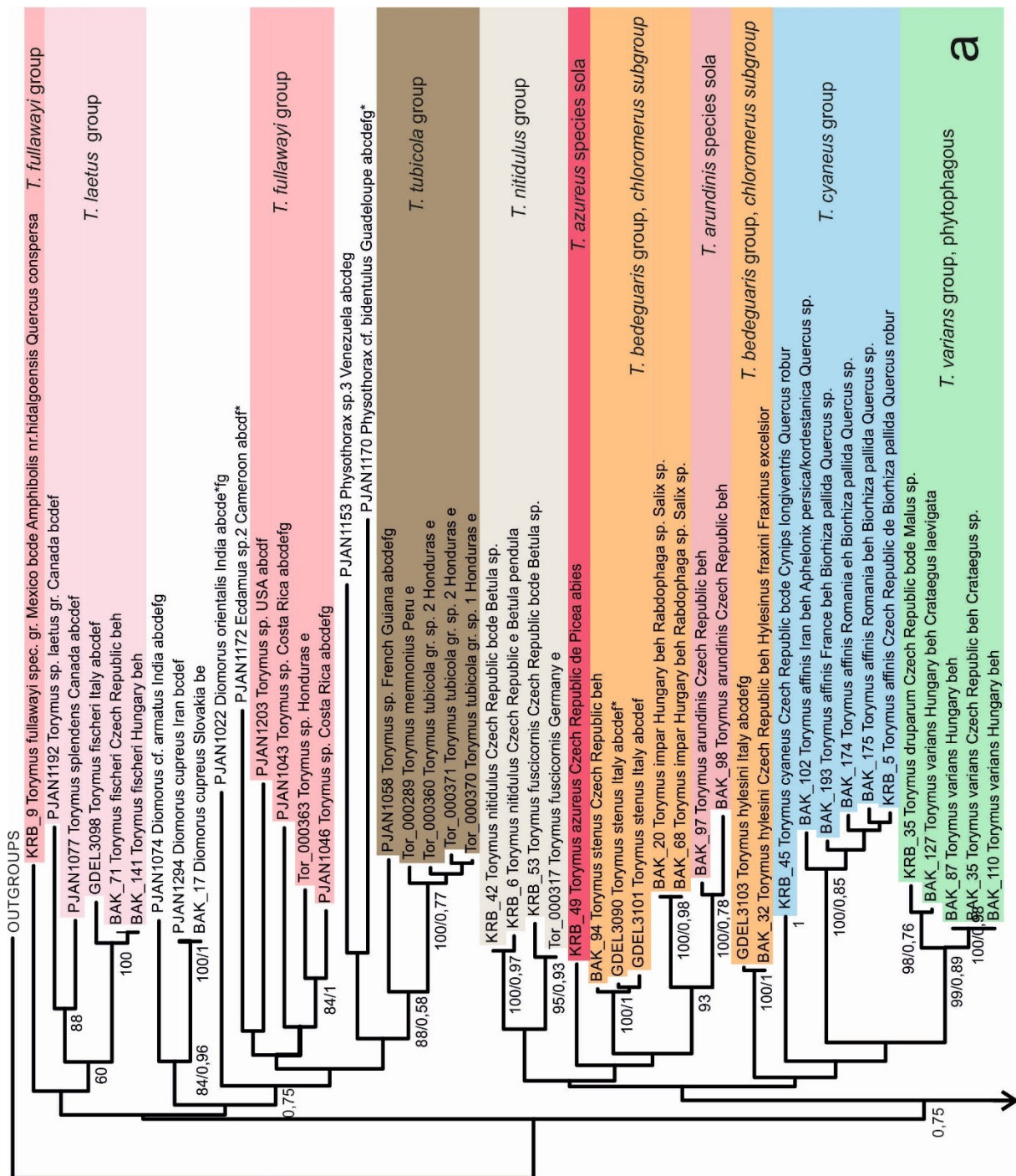


Obrázek 6a: První část fylogenetického stromu sestavená na základě mitochondriálních genů (COI a cyt b) pro 178 jedinců. Ve všech stromech jsou zaneseny hodnoty bootstrapu a pravděpodobností <50/0,5. Různými barvami jsou zvýrazněny druhové skupiny dle Graham & Gijswijt (1998) a Grissel (1976).

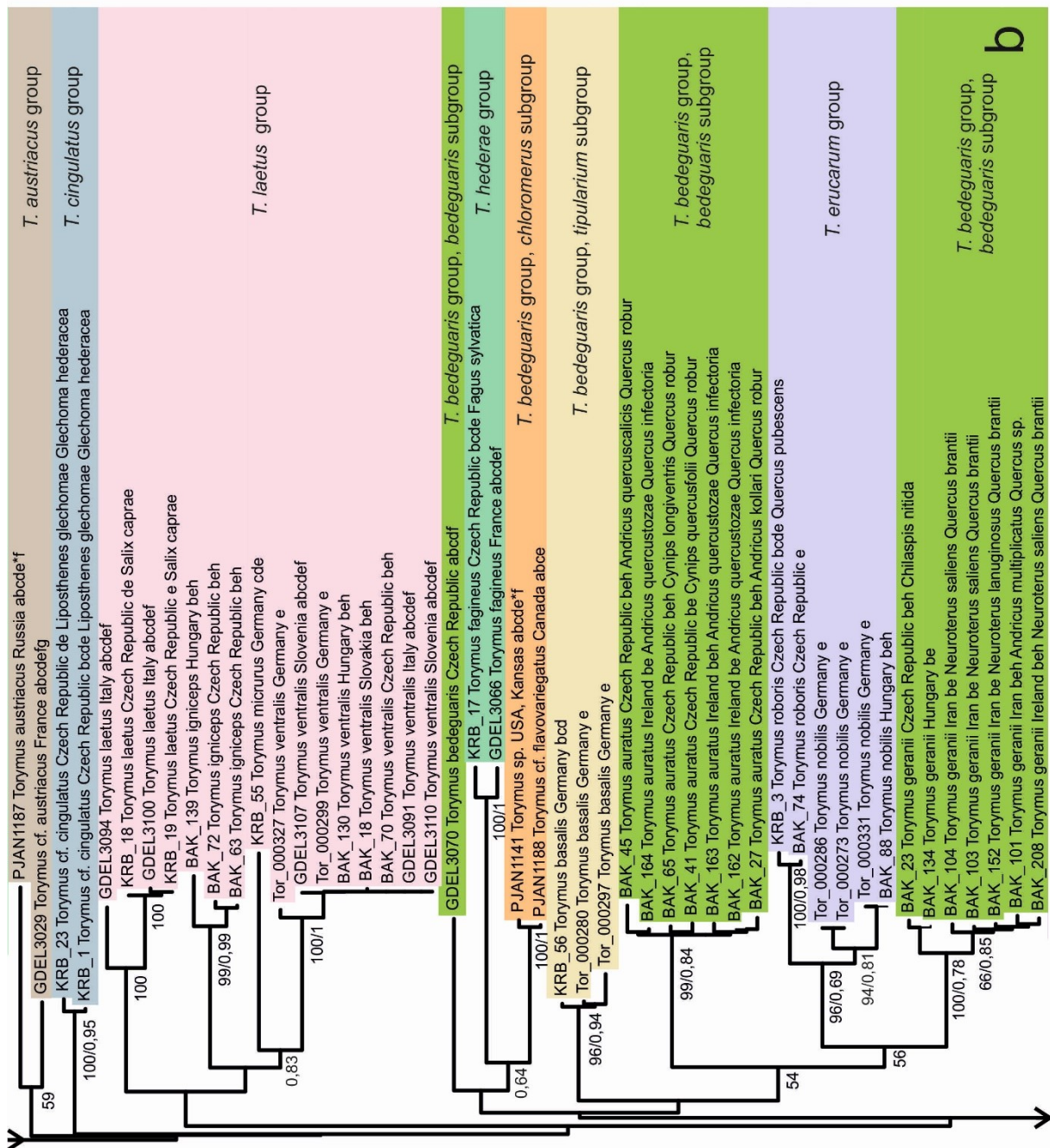


009

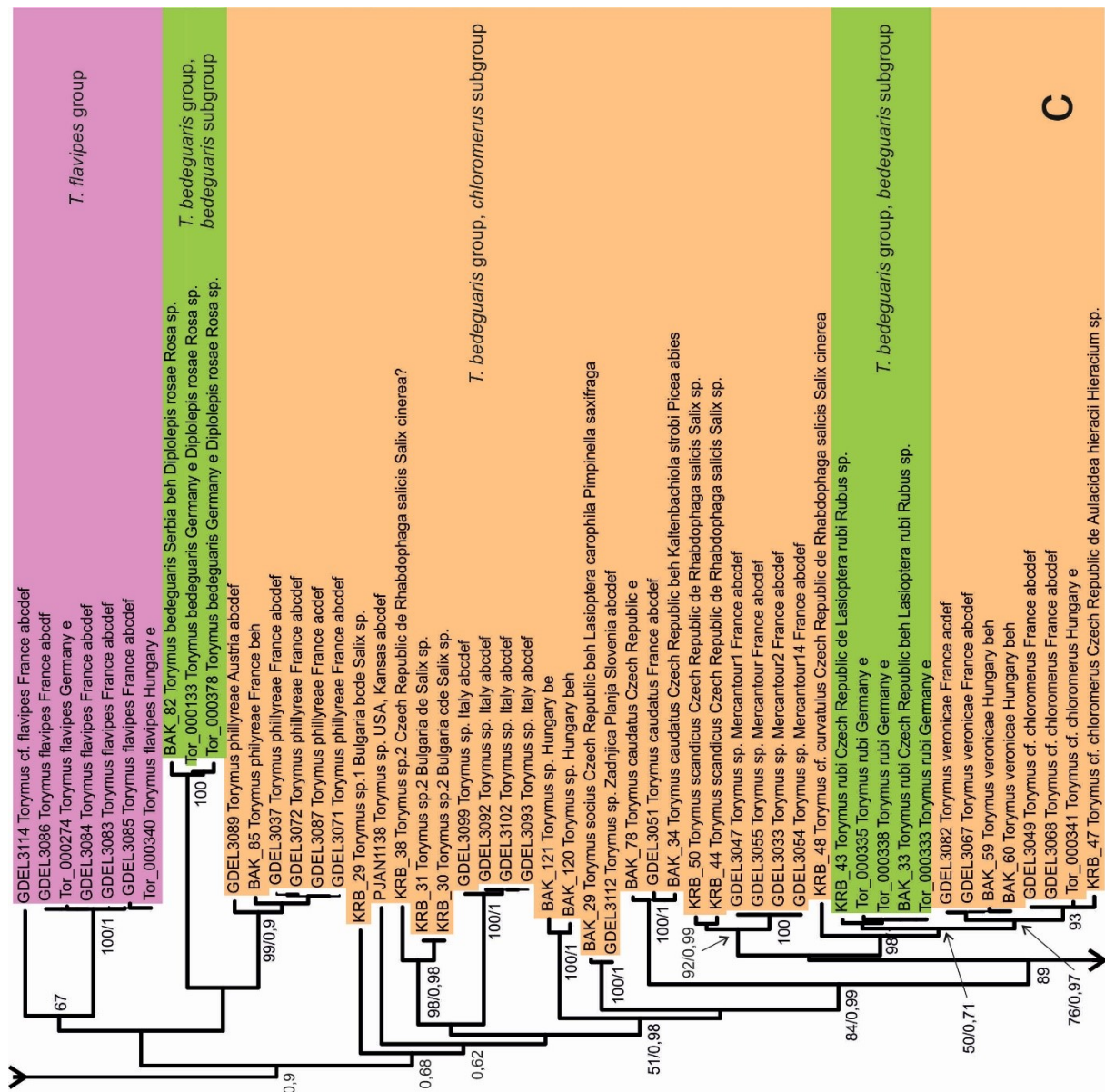
Obrázek 6c: Třetí část fylogenetického stromu sestavená na základě mitochondriálních genů (COI a cyt b). Ve všech stromech jsou zaneseny hodnoty bootstrapu a pravděpodobností <50/0,5. Různými barvami jsou zvýrazněny druhové skupiny dle Graham & Gijswijt (1998) a Grissell (1976).



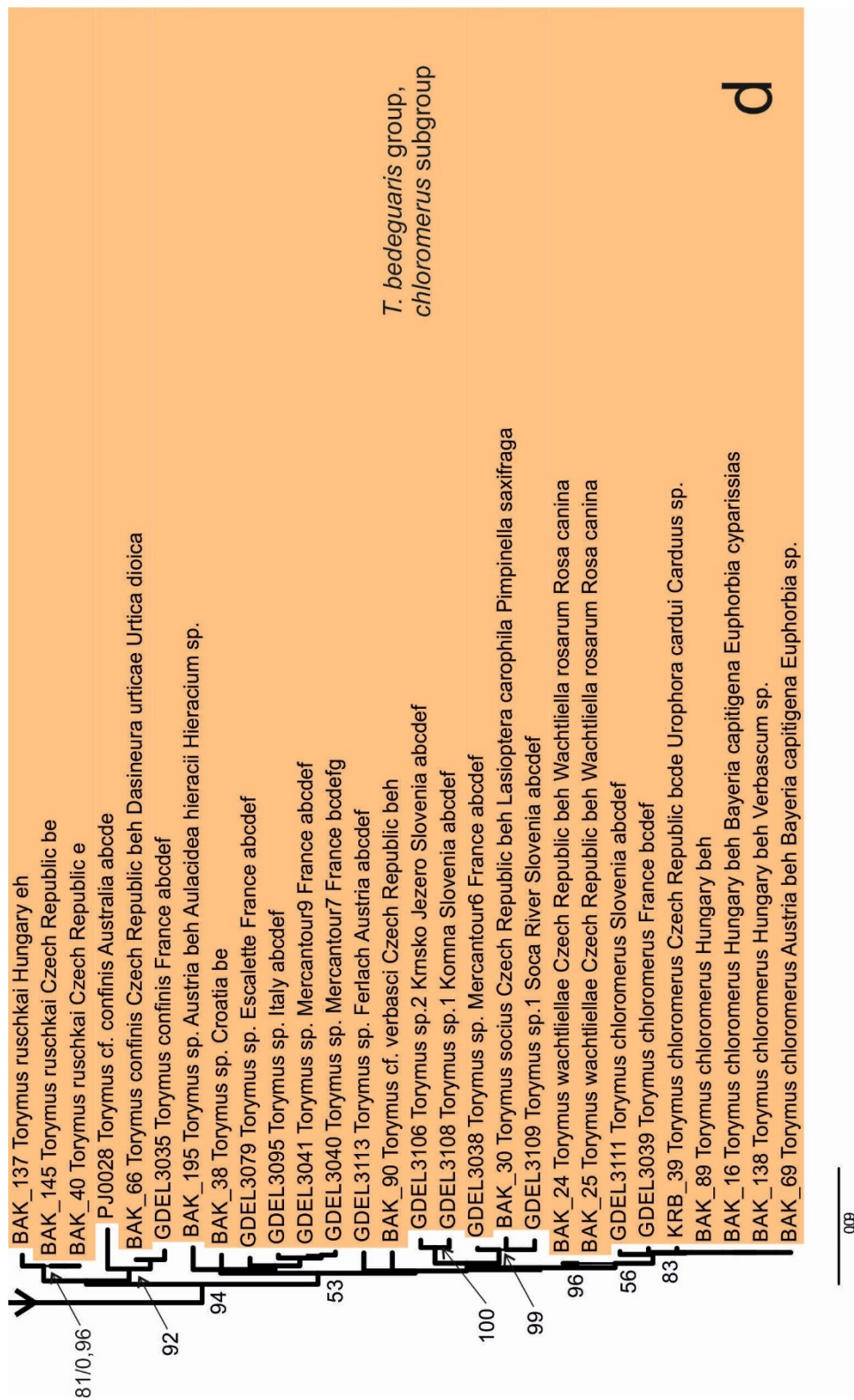
Obrázek 7a: První část fylogenetického stromu sestaveného na základě genu cytochrom oxidázy I (pro n=177). Ve všech stromech jsou zaneseny hodnoty bootstrapu a pravděpodobností <50/0,5. Různými barvami jsou zvýrazněny druhové skupiny dle Graham & Gijswijt (1998) a Grissell (1976).



Obrázek 7b: Druhá část fylogenetického stromu sestaveného na základě sekvencí genu cytochrom oxidáza I. Ve všech stromech jsou zaneseny hodnoty bootstrapu a pravděpodobností <math><50/0,5</math>. Různými barvami jsou zvýrazněny druhové skupiny dle Graham & Gijswijt (1998) a Grissell (1976).



Obrázek 7c: Třetí část fylogenetického stromu sestaveného na základě sekvencí genu cytochrom oxidáza I. Ve všech stromech jsou zaneseny hodnoty bootstrapu a pravděpodobností <50/0,5. Různými barvami jsou zvýrazněny druhové skupiny dle Graham & Gijswijt (1998) a Grissell (1976).



T. bedeguaris group,
chloromerus subgroup

d

Obrázek 7d: Čtvrťá část fylogenetického stromu sestaveného na základě sekvencí genu cytochrom oxidáza I. Ve všech stromech jsou zaneseny hodnoty bootstrapu a pravděpodobností <50/0,5. Různými barvami jsou zvýrazněny druhové skupiny dle Graham & Gijswijt (1998) a Grissell (1976).

Odlišnosti ve fylogenezích založených na jednotlivých genech či částech jsou vypsaná v posloupnosti, jak jsou stromy výše řazeny. Vnitřní topologie stromů je často velmi proměnlivá kvůli nízkému fylogenetickému signálu.

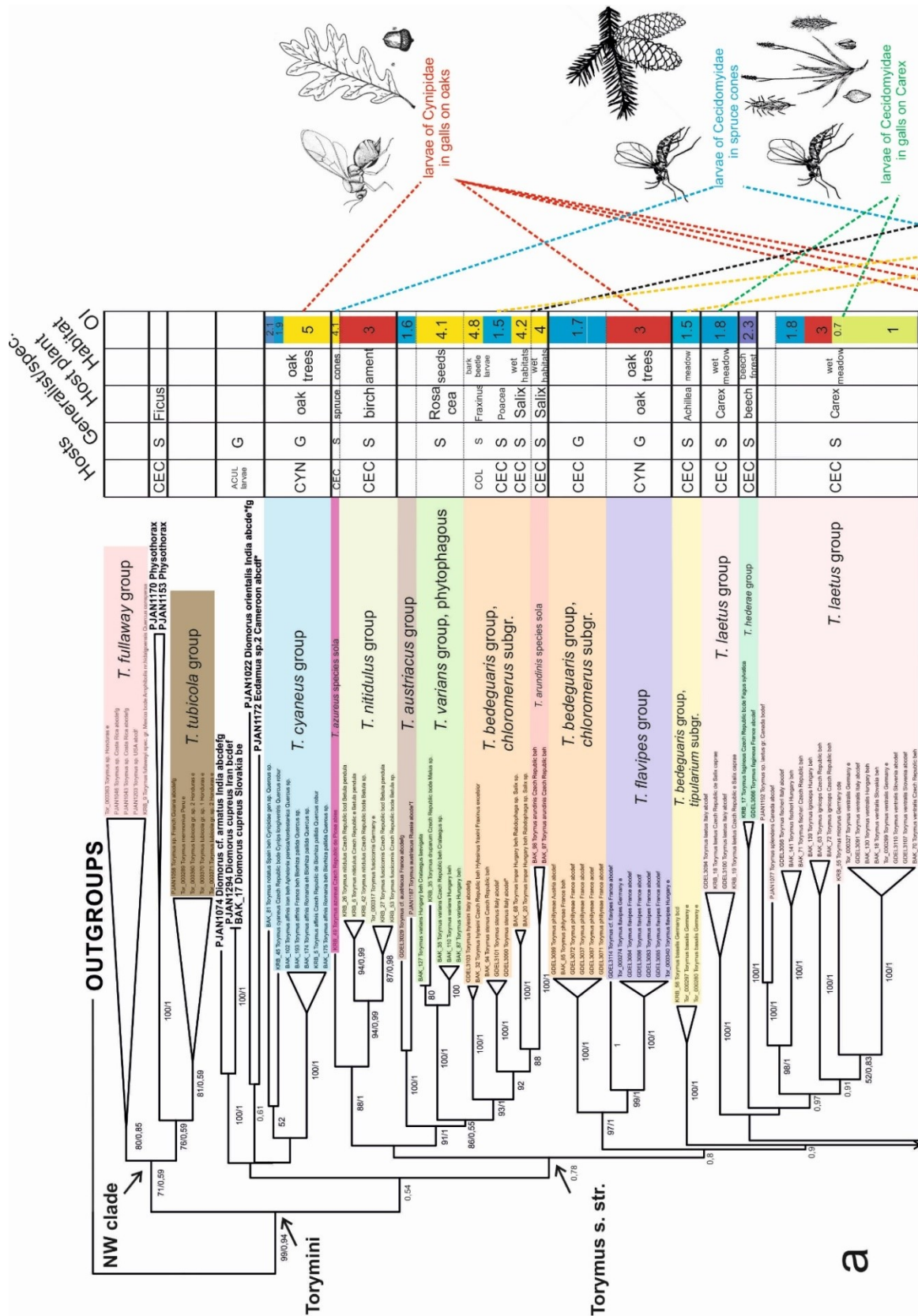
U stromu (Obrázek 4a-c) založeném na základě sekvencí jaderných ribozomálních genů 139 jedinců se taxony outgroups na stromě nenachází všechny u kořene stromu. Strom byl jako u všech ostatních stromů zakořeněn druhem *Torymoides kiesewetteri* v jeho těsné příbuznosti jsou 3 druhy z taxonu *Diomorus* a *Ecdamua*, nicméně druhy taxonu *Physothorax* a druh *Diomorus orientalis* jsou až dále hlouběji uvnitř stromu a nachází se ve společné větvi s druhy ze skupin *T. hederiae*-group, *T. laetus*-group, *T. tubicola*-group a *T. fullawayi*-group. Úplně osamoceně je outgroup *Pseudotorymus sapphyrinus*, který ve stromě je sesterský k druhu *T. phillyreae*. Monofylie druhových skupin je v tomto fylogenetickém stromě podpořena (hodnoty ML/PP) u skupin *T. varians*-group (100/1), *T. nitidulus*-group (94/0,99) a *T. fullawayi*-group (80/0,85), také u skupin zastoupených jen jedinci jednoho druhu (*T. austriacus*-group, *T. flavipes*-group, *T. hederiae*-group a *T. cingulatus*-group). Skupiny, které jsou ve stromu rozdělené a problematické jsou *T. laetus*-group, *T. erucarum*-group (druhy *T. nobilis* a *T. roboris* jsou rozděleny mezi více druhových skupin, ale v konsenzuálním stromu je podpořena hodnotami 100/1), *T. cyaneus*-group a *T. bedeguaris*-group *bedeguaris* subgroup. *T. bedeguaris*-group *chloromerus* subgroup se na stromě vyskytuje rozdělená do tří linií, jedna linie druhů *T. hylesini* a *T. impar*, druhá linie je druh *T. stenus* a třetí je linie zahrnující mnoha druhů, v níž je vnořen druh *T. rubi*, který by měl dle morfologie patřit do skupiny *T. bedeguaris*-group subgroup *bedeguaris*.

Na stromě (Obrázek 5a-b) sestrojeném na základě genu Elongation factor a opřený o 93 sekvencí jsou outgroups *Torymoides kiesewetteri* a *Pseudotorymus sapphyrinus* společně u kořene, dva druhy taxonu *Physothorax* nasedají ve stromě k zástupcům druhových skupin *T. tubicola* a *T. fullawayi*. *Ecdamua sp.* a všechny druhy taxonu *Diomorus* pak nasedají dovnitř stromu a tvoří větev s druhem *T. affinis*. Jedinou druhovou skupinou, kterou lze označit za monofyletickou, je *T. nitidulus*-group, která tvoří klád s druhem *T. azureus* species sola. Zástupci z dalších druhových skupin jsou ve stromě spíše roztroušeni, za zmínku stojí parafyletické skupiny *T. laetus* a *T. bedeguaris*-group *chloromerus* subgroup (nicméně v tomto datasetu chyběly druhy *hylesini*, *T. impar* a *T. stenus*, které v ostatních stromech sedají mimo skupinu).

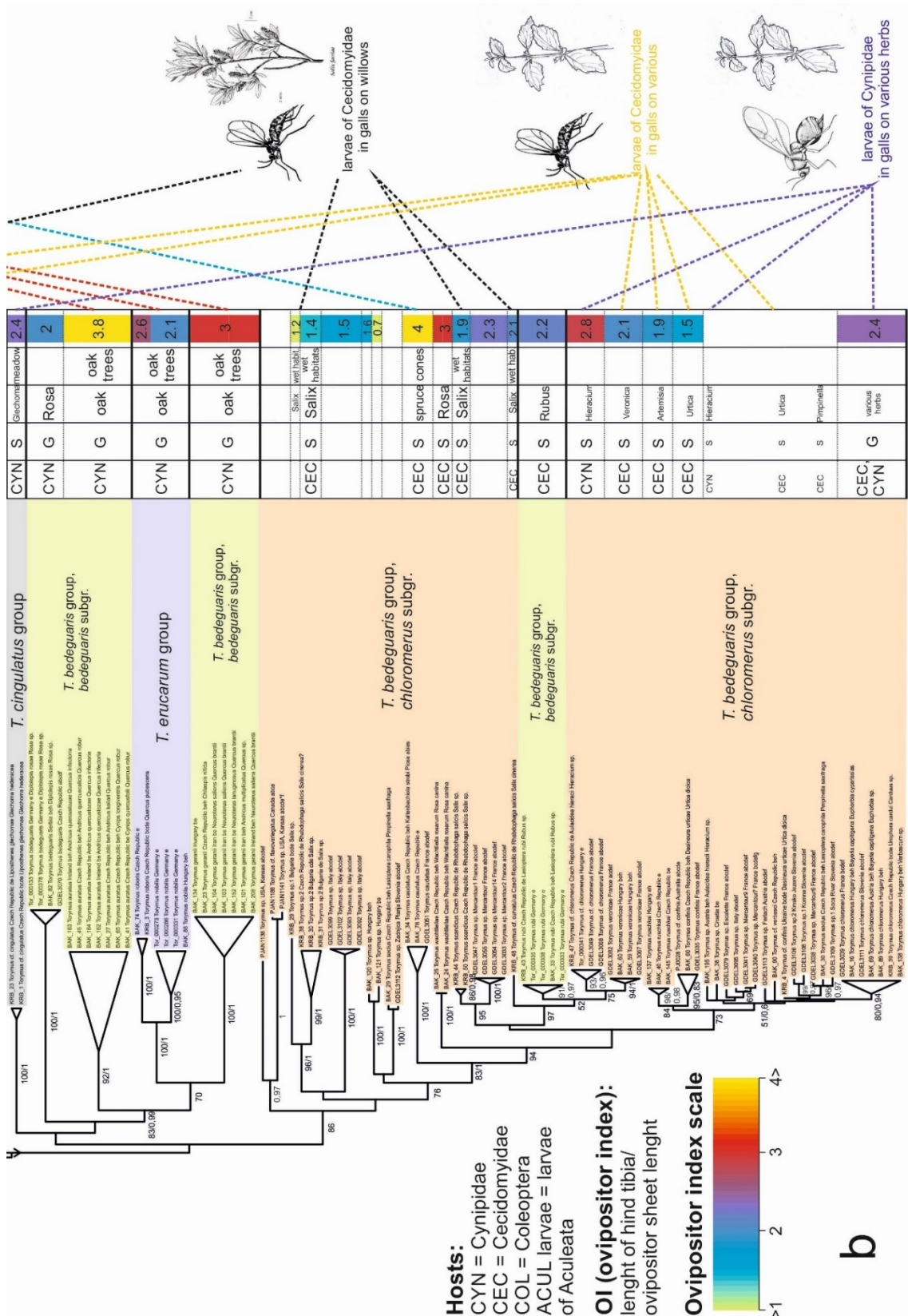
Fylogenetický strom (Obrázek 6a-c) pro 178 jedinců opřený o sekvence dvou mitochondriálních genů můžeme pozorovat obdobnou skutečnost, že část taxonů

považovaných za outgroups netvoří jedinou linii sesterskou k jedincům rodu *Torymus*. Nicméně oproti předchozím dvěma fylogenetickým stromům jsou tentokrát tyto outgroups zařazeny v rámci jedné větve s částí zástupců ze skupiny *T. laetus*-group a oběma skupinami nového světa. Druhovú skupina *T. laetus*-group tedy není monofyletická, stejně jako *T. bedeguaris*-group *bedeguaris* subgroup, opět se druh *T. rubi* nachází uvnitř skupiny *T. bedeguaris*-group *chloromerus* subgroup a i další druhy ze skupiny netvoří jednu linii. Z podskupiny *chloromerus*-subgroup jsou stejně jako u stromu pro jaderné ribozomální geny druhy *T. hylesini*, *T. impar* a *T. stenus* na fylogenetickém stromě v jiném místě a příbuzní ke druhům z fytofágní skupiny *T. varians*. Právě v této skupině se objevuje velmi zajímavá skutečnost, druh *T. druparum* je sesterský s jedním jedincem druhu *T. varians*. Tato skutečnost se objevuje jen na fylogenetických stromech, jež jsou založené pouze na sekvencích mitochondriálních genů (resp. COI), což by mohlo naznačovat probíhající hybridizaci mezi těmito druhy. Ke skupině *T. varians*-group je sesterský druh *T. cyaneus*. Zbytek zástupců skupiny *T. cyaneus*-group je pak vnořen uvnitř stromu v příbuznosti s druhy ze skupiny *T. bedeguaris*-group *bedeguaris* subgroup, *T. bedeguaris*-group *chloromerus* subgroup a *T. hederæ* group.

Poslední fylogenetický strom (Obrázek 7a-d) pro jednotlivé úseky je ten založený na sekvencích genu cytochrom oxidáza I pro 177 jedinců. Postavení zástupců outgroups je stejné jako u stromu pro oba mitochondriální geny. Tato linie u kořene stromu je zastoupená stejnými jedinci outgroup a zástupci skupiny *T. fullawayi*-group a *T. laetus*-group a *T. tubicola*-group. Většina topologií je obdobná jako u stromu pro mitochondriální geny, ale liší se v postavení skupiny *T. cyaneus*. V rámci stromu dle genu COI jsou zástupci *T. affinis* sesterští ke skupině *T. varians* a druh *T. cyaneus* je pak sesterský k nim. Skupiny *T. laetus*-group a *T. bedeguaris*-group *bedeguaris* subgroup nejsou monofyletické.



Obrázek 8a: Výsledný strom sestavený na základě všech genů (část první). Ve všech stromech jsou zaneseny hodnoty bootstrap a pravděpodobností <50/0,5. Různými barvami jsou zvýrazněny druhy skupiny dle Graham & Gijswijt (1998) a Grissell (1976). Také jsou na stromě namapovány hodnoty OI a hostitelské asociace. Legenda se nachází na konci druhé části stromu. Přiřazení ke skupinám hostitelů je znázorněno barevnými čárkovanými čarami.



Obrázek 8b: Výsledný strom sestavený na základě všech genů (část druhá). Ve všech stromech jsou zaneseny hodnoty bootstrap a pravděpodobností <50/0,5. Různými barvami jsou zvýrazněny druhové skupiny dle Graham & Gijswijt (1998) a Grissell (1976). Také jsou na stromě namapovány hodnoty OI a hostitelské asociace. Legenda se nachází na tomto obrázku. Přiřazení ke skupinám hostitelů je znázorněno barevnými čárkovanými čarami.

Na stromu sestaveném na základě konkatenátu všech genů (Obrázek 8a – b) byly namapovány hodnoty ovipositor indexu (OI), hostitelské asociace, hostitelské strategie (specialista/generalista) a habitaty, kde se druhy vyskytují. V tomto stromě je jasně podpořeno oddělení dvou fylogeneticky nejvzdálenějších outgroupů a zbytku taxonů, které všechny náleží do tribu Torymini. V rámci tribu Torymini se pak rod *Torymus* jeví jako parafylum, kdy se druhy z nového světa (*T. fullawai*-group a *T. tubicola*-group) tvoří jednu linii společně se zástupci rodu *Physothorax*. Tato linie je zde rovněž relativně dobře podpořena (ML bootstrap/PP – 71/0,59) Druhovú skupina *T. cyaneus*-group se nachází rovněž mimo zbylé zástupce rodu *Torymus* (dále označené jako *Torymus* s. str.) a tvoří monofylum s rody *Ecdamua* a *Diomorus*. Nicméně toto monofylum má velmi nízkou statistickou podporu. Rovněž příbuznost druhů zahrnutých do *T. cyaneus*-groupnejsou statisticky nijak významně podpořené na základě sekvencí genů použitých v této diplomové práci.

Dále se ve stromu vyčleňuje skupina označená *Torymus* s. str. Přestože toto monofylum rovněž nemá výraznou podporu (0/0,78), zahrnuje pouze druhy rodu *Torymus*. Skupina *Torymus* s. str. obsahuje linii druhů sesterskou ke všem ostatním, které jsou si zjevně i blízké nejen geneticky, ale také svými hostitelskými asociacemi. Jedná se o *T. azureus* species sola a dva druhy ze skupiny *T. nitidulus*-group (podpora ML, podpora PP). Druhy v celé této větvi parazitují bejlomorky v jehnědách bříz a šišticích smrku. Sesterská větev výše uvedené větvi (tj. větev zahrnující *T. azureus* species sola a *T. nitidulus*-group) obsahuje zástupce ze skupin *T. austriacus*-group, *T. varians*-group, *T. bedeguaris*-group *chloromerus* subgroup, a *T. arundinis* species sola. Celá část topologie zahrnující tyto linie je velmi dobře podpořená a vyskytuje se napříč všemi topologiemi. Druhy spadající do této linie zahrnují jak druhy fytofágní (*T. varians*-group), tak druhy parazitující na chalcidkách na travách, na bejlomorkách na vrbách a v neposlední řadě druh parazitující na broucích (Coleoptera: Scolytidae). Zejména skupina fytofágních druhů bude dále diskutována.

Následně se v bližší příbuznosti objevuje další skupina s „nestandardními“ hostitelskými asociacemi“, která atakuje žlabatky na ostřicích ve vlhkých habitatech. Tato skupina *T. laetus*-group se nedá označit zcela jistě jako monofyletická z důvodu, že vně nasedá druh ze skupiny *T. hederæ*-group (100/1), ale celá větev se skupinou *T. laetus*-group a *T. hederæ*-group nemá podporu vyšší než 50/0,5, navíc se v jednotlivých stromech nikdy nevyskytovali zástupci této skupiny pospolu. Tato skutečnost bude dále diskutována.

Dále se již nachází převážně zástupci z podskupin skupiny *T. bedeguaris*. *T. bedeguaris*-group *bedeguaris* subgroup se nejprve vyskytuje ve větvi se skupinami *T.*

cingulatus a *T. erucarum*. Dále se druh *T. rubi* (91/0,97) z *T. bedeguaris*-group *bedeguaris* subgroup nachází vnořen v podskupině *T. bedeguaris*-group *chloromerus* subgroup stejně jako v předchozích jednotlivých stromech. Tato podskupina pak (*T. bedeguaris*-group *chloromerus* subgroup) tvoří korunovou větev s nejvíce zástupci hlavně parazitů bejlomerek na různých bylinách. Namapované hostitelské asociace naznačují, že fytofagie, asociace s břízami a asociace s ostřicemi mohli vzniknout v evoluci rodu *Torymus* jednou. O jiných hostitelských strategiích se to dle topologie prohlásit nedá. Jelikož se parazitoidé žlabatek a parazitoidé bejlomerek vyskytují v rámci stromu nahodile a netvoří větší jednotnou linii, tyto asociace tedy vznikaly pravděpodobně několikrát nezávisle. Dále se dá vyzorovat, že během evoluce druhy nejdříve osídlili hostitele tvořící hálky na stromech a vyskytující se na vlhkých stanovištích a postupně osidlovali hostitele na bylinách.

5.4. Ovipositor index

Hodnoty ovipositor indexu (OI) jsou namapovány na konsenzuálním fylogenetickém stromě (Obrázek 8a – b). Celkově vykazují mezidruhové rozdíly (od nejnižších hodnot počínaje od 0,7 až do hodnoty 5). V literatuře je udávána i vnitrodruhová variabilita a sezónní variabilita. Konkrétní hodnoty ovipositor indexu pro všechny použité jedince jsou obsaženy v tabulce druhů obsažených v této práci v příloze Tabulka 1. V měřítku celého fylogenetického stromu se nedá vysledovat jistý trend evoluce délky kladélka, ale v měřítku druhových skupin či jednotlivých větví lze pozorovat různé trendy. Například u skupiny *T. laetus*-group, kromě druhu *T. igniceps* má hodnoty OI menší. Stejně vysoká hodnota je u fytofágní skupiny a *T. nitidulus*-group a *T. azureus* species sola. Pak u větve, kde jsou zástupci ze skupin *T. cingulatus*-group, *T. bedeguaris*-group *bedeguaris* subgroup a *T. erucarum*-group, dosahuje ovipositor index velmi blízkých hodnot. V této větvi jsou všichni zástupci parazitoidé žlabatek a až na druh *T. cingulatus* se jedná o generalisty. Nelze však obecně prohlásit, že by generalisté měli delší kladélka než specialisté a obráceně, protože tato hodnota s mírou specializace zcela nekoresponduje. Lze však vyzorovat, že druhy parazitující na hostitelích na dubech mají vyšší ovipositor index. Nicméně není rozdíl mezi tím, zda zástupci parazitují na bejlomorkách či žlabatkách, hodnoty se pohybují na stejné škále.

5.5. Bait design

Na základě analýzy vybraných orthologních genů (celkem 5357 genů) bylo pomocí programu BaitFisher nalezeno celkem 4937 různých „baits“, které dokáží amplifikovat úseky celkem 875 genů. Seznam těchto „baits“ není součástí diplomové práce, ale je na vyžádání u autorky práce. Bude dále použit pro AHE sekvenování vybraných taxonů rodu *Torymus*.

6. Diskuze

6.1. Výsledné fylogenetické stromy

Obecně vyšla podpora pro stromy nejlepší u konsenzuálního stromu, kdy se topologie větví až tak výrazně nelišila mezi metodami. Nicméně některé odlišnosti jsou patrné. Hlavní odlišnost v pozicích byla pro větev s druhy *T. bedeguaris*, *T. auratus*, *T. cingulatus*, *T. roboris*, *T. nobilis* a *T. geranii*. Větev se stejnou topologií se ve stromu vytvořeného analýzou MrBayes nacházela více u báze stromu.

Problematické je, že se na hlubším větvení stromu často vyskytuje hladina bootstrapu pod 50%, ale pravděpodobnosti z bayesiánské analýzy bývají povětšinou vyšší. Domnívám se, že by celé analýze výrazně prospělo, kdyby ve studii bylo zahrnuto více druhů s rozšířením mimo Evropu. Studie obsahuje jen několik zástupců ze západní palearktické oblasti a také zástupce z „nového světa“. Tito zástupci ze střední Ameriky tvoří v konsenzuálním stromě tzv. „New World clade“, spadají do některých druhových skupin ustanovených na základě morfologie v práci Grissel (1976).

V případě stromů pro jednotlivé geny se již vyskytovaly jisté problémy, přesto však povětšinou některé topologie pro sesterské druhy vycházely v souladu s konsenzuálním stromem. Problematicky vyšly fylogenetické stromy pro mitochondriální geny. Obzvláště ty vycházející z analýzy MrBayes. Strom z MrBayes pro mitochondriální geny (COI – LCOHCO a JerryPat, a cytochrom b) měl u všech větví pravděpodobnosti $< 0,5$, stejně tak strom z MrBayes i pro cytochrom b byl tak nízce podpořen.

Otázkou tedy je, zda použité geny jsou dobrými fylogenetickými markery. Mitochondriální geny jsou posuzovány jako nevhodné markery pro fylogenezi blízké příbuzných druhů. U členovců, kteří sdílejí endosymbionty *Wolbachia* a *Cardinium* děděné po mateřské linii stejně jako mitochondrie, mohou endosymbionti ovlivňovat strukturu mitochondriální DNA (Hurst & Jiggins, 2005). Kromě toho bylo prokázáno, že gen cytochrom oxidáza I podléhá ve vyšší míře rychlejší evoluci u blanokřídlých než u dvoukřídlých (Crozier et al., 1989). Další problém s těmito geny je problém se saturací pozic v kodónu, a z toho plynoucí možná nevhodnost mitochondriálních genů pro sestavování fylogeneze. Bylo to pozorováno u obratlovců při analýze cytochromu b, a tak autoři vypustili některou z pozic kodonu a došlo ke změně topologií (Farias et al., 2001). Případně by mohlo být užitečné provést v budoucnu tento krok i pro data v této práci (Cardinal pers. comm.).

Podle jiných autorů je na druhou stranu užití mitochondriálního genu pro cytochrom oxidázu i cytochrom b vhodné pro sestavování fylogenezí u nadčeledi Chalcidoidea (Cruaud et al., 2010; Cruaud et al., 2012; Lopez-Vamonde, 2001).

Z důvodu vyšší rychlosti evoluce, které podléhají mitochondriální geny oproti jaderným ribozomálním a ovlivnění mitochondriálních genů endosymbionty také mohl vzniknout problém u druhu *T. druparum*, který v analýzách, kde byly obsaženy sekvence genu cytochrom oxidáza I, tvořil větev společně s jedním jedincem druhu *T. varians* sesterskou k větví dvou dalších jedinců druhu *T. varians*. Samozřejmě by mohl být tento jev vysvětlen hypotézou, že probíhá mezi těmito fytofágními druhy k hybridizaci, jak je studováno u druhů *T. sinensis* a *T. beneficus* (Moriya et al. 1992, Yara 2004). Stejně tak jako druhy *T. sinensis* a *T. beneficus* parazitují stejného/podobného hostitele, larvy druhů *T. druparum* a *T. varians* se vyvíjí v plodech růžovitých a živí se jejich semeny. *T. druparum* je asociován s jabloní (*Malus* sp.) a *T. varians* s plody hlohu (*Crataegus* sp.). Nicméně pro vyvozování takových závěrů bude nutné získat více zástupců druhu *T. druparum* a podrobit je výzkumu. Už kvůli výše zmíněné problematice s mitochondriálními geny jako markery by tak mělo být osekvenováno více genů. Nicméně ve stromech založených na jaderných ribozomálních genech se tento fenomén neobjevuje, což by mohlo teorii hybridizace podporovat.

Mimo jiné se i v celkem „nepřehledné“ terminální větví objevovaly rozpoznatelné problémy se sekvencemi genu COI. Konkrétně ve skupině *T. bedeguaris*-group *chloromerus* subgroup, která je problematická pro rozlišení i morfologicky (Graham & Gijswijt, 1998). V této skupině jsem průběžně pozorovala nekonzistentní umístění vzorků druhu *T. confinis* v závislosti na přítomnosti/nepřítomnosti sekvencí genu COI v analyzovaných datasetech.

Strom sestavený na základě genu Elongation factor konzistentně podporuje větev, kde *T. nitidulus*-group je příbuzná *T. azureus* species sola. Gen Elongation factor je sice velmi málo variabilní oproti třeba COI u mnou zkoumaných taxonů nebo jiných živočichů (Mitchell et al. 1997, Moreira et al., 1999), ale i tak jsou na stromě některé takovéto zásadní věci dobře patrné.

6.2. Je rod *Torymus* monofylum?

Klád, který označuji v konsenzuálním stromu jako *Torymus* sensu stricto, by se dal označit jako monofyletický. Problém s monofylií rodu *Torymus* ovšem způsobuje celá

skupina *T. cyaneus*-group (do níž spadají druhy *T. affinis*, *T. cyaneus* a *T. notatus*) a obě druhové skupiny z nového světa *T. fullawayi*-group a *T. tubicola*-group, které se nachází mimo skupinu *Torymus* s. str. společně se zástupci rodů *Diomorus*, *Ecdamua* a *Physothorax*, které byly do práce zahrnuty jako outgroups.

V minulosti byly rod *Diomorus* a rod *Torymus* na základě morfologie synonymizovány (Graham & Gijswijt, 1998), protože byl popsán druh *T. kononovae*, který nese intermediální znaky obou rodů. Nicméně Zerova et al. (2003) se s tímto názorem neztotožnili a znovu pak rozdělili rod na dva samostatné rody *Diomorus* a *Torymus*. Tvrzení Zerovy et al. (2003) podporují víceméně i výsledky studie Munro et al. (2010) a Janšta et al. (2017), Janšta et al. (2017) označili celý rod *Torymus* za polyfyletický a rozdělili tribus Torymini do 3 tzv. „subkládů“. Subklád a zahrnuje zástupce nového světa (druhy s neznámou biologií) a zástupce rodu *Physothorax* (asociace s řískami). Subklád b v jejich studii zahrnoval zástupce rodů *Diomorus* a *Ecdamua* (oba parazitoidi žahadlových blanokřídlých). Subklád c pak zahrnoval už čistě zástupce rodu *Torymus*. Jejich analýzy však nezahrnovaly dostatečné množství zástupců. Munro et al. (2010) také zjistil, že rod *Ecdamua* spadá dovnitř kládu tvořeného druhem rodu *Torymus*. Podobné trendy jako vyšly v předchozích studiích (Munro et al. 2010, Janšta et al. 2017) se vyskytují i v této práci a opět podporují myšlenku, že rod *Torymus* je spíše parafyletický (ne-li polyfyletický) a rod *Diomorus* je platným rodem. Nicméně statistická podpora pro toto tvrzení je nízká a tuto otázku bude nejspíše možné zodpovědět jen na základě více vypovídajících dat.

6.3. Jak korespondují druhové skupiny rodu *Torymus* s molekulární fylogenezí

V některých případech koncept druhových skupin založený na morfologii a hostitelských asociacích a fylogenetickým stromem nekoresponduje, ale některé skupiny se zdají být stanovené správně. Druhové skupiny západní palearktické oblasti podle Grissel (1976) ve fylogenezi všech genů jsou u kořene stromu a každá je monofylum, až na výjimky, které se ukazují ve stromech pro jednotlivé geny či úseky, kde jsou tyto skupiny problematictější. Podle Grissel (1976) je skupina *T. fullawayi* morfologicky blízká rodu *Diomorus*, sdílený znak jsou zuby na zadním femuru. Ačkoliv se ve fylogenetickém stromě nachází blízko zástupců rodu *Diomorus*, nikdy nejsou sesterské. Druhová skupina *T. tubicola*-group zahrnuje 23 druhů a podle Grissel (1976) je velmi variabilní morfologicky i

v hostitelských strategiích. V mém případě u vzorků zahrnutých v této studii hostitelské asociace nejsou známe, ale monofylie skupiny podporuje koncept dle Grissel (1976).

Dále je možné diskutovat monofylii skupiny *T. nitidulus*-group a také můžeme rozlišit, že druhy *T. nitidulus* a *T. fuscicornis* jsou opravdu dva druhy tvořící jednu druhovou skupinu. Morfologické rozdíly mezi těmito dvěma druhy jsou tak malé, že by mohlo jít o jeden druh. Oba druhy jsou velmi malé a liší se pouze ve zbarvení přední coxy, kdy u *T. nitidulus* je coxa převážně žlutá a u *T. fuscicornis* je zbarvená převážně tmavě. Navíc samice *T. nitidulus* by měly mít o něco delší kladélko (Graham & Gijswijt, 1998). Nicméně ve všech sebraných vzorcích se u výše zmíněných znaků vyskytují přechody. Do společné druhové skupiny byly druhy zařazeny nejen kvůli sdílené morfologické podobnosti a velikosti těla, ale protože jako jediní napadají bejlomorky v jehnědách bříz. Tyto dva druhy se často se ve fylogenetických stromech objevují jako jedno monofylum se sesterským druhem *T. azureus* species sola. Zavada (2003) pro druhy *T. azureus* a *T. nitidulus*-group stanovil samostatný poddruh *Lioterphus. T. (Lioterphus) azureus* parazituje bejlomorky v šištících smrku. To je sice odlišný hostitel než bejlomorky v jehnědách bříz (hostitelé pro *T. (L.) nitidulus*-group), nicméně zjevně vyžadující podobná morfologická přizpůsobení. Klazení do těchto hostitelů totiž vyžaduje alespoň částečné laterální zploštění těla a relativně dlouhé kladélko, aby se samice parazita dostala až k hostiteli žijícím mezi „šupinami“ šišek/jehněd. Na druhu *T. (L.) azureus* jsou tak tedy patrné jednotlivé morfologické adaptace, které jsou vyzorovatelné i u zástupců *T. (L.) nitidulus*-group. Mezi tyto morfologické znaky patří například podobně vysoká hodnota ovipositor indexu, prodloužená zadní coxa a redukovaná nebo chybějící ostruha na zadní tibia (Graham & Gijswijt, 1998, Zavada, 2003). Část výše zmíněných znaků a to, že všechny tři druhy mají holarktické rozšíření, vedli Zavadu (2003) k ustanovení poddruhu *Lioterphus*. Vyčlenění těchto druhů do stejného poddruhu bylo tedy potvrzeno i v této práci na základě molekulárních dat. Navíc se zdá, že tyto druhy je asi zbytečně členit do dvou druhových skupin.

Druhová skupina *T. varians*-group, do níž patří druhy *T. varians* a *T. druparum*, se vyskytuje ve všech třech konceptech druhových skupin (tj. Grissell, 1976, Graham & Gijswijt, 1998, Zavada, 2003). Nicméně Grissel (1976) do ní zahrnuje i druh *T. azureus*, který byl již diskutován výše. Mimo druh *T. azureus* se jedná o skupinu fytofágní. Fytofágie je zcela jistě synapomorfie *T. varians* a *T. druparum* a kromě toho sdílí tyto morfologické znaky: dlouhé kostální pole na křídlech (11-12 krát dlouhé než široké), cirkulární tvar hlavy, hlava maximálně 1,7 krát delší než široká a téměř hladké propodeum (Graham & Gijswijt,

1998). Zařazení druhu *T. azureus* do této druhové skupiny je zcela jistě mylné, ale jinak je morfologický koncept *T. varians*-group podpořen i výsledky této práce.

Druhová skupina *T. laetus*-group se v konsenzuálním stromě vyskytuje v jedné větvi s polečně se zástupcem skupiny *T. hederæ*-group, ale v dílčích stromech je velmi problematická. Proto se nedá prohlásit za monofyletickou, ačkoliv by její monofylii podporovala unikátní strategie. Podle Zavada (2003) patří tato druhová skupina do podrodu *Callimomus* společně se skupinou *T. austriacus*-group. Hlavním sdíleným znakem pro tento poddruh by měla být velká mandibula se dvěma zuby. Nedá se říct, jestli by poddruh podpořila stejná biologie, protože pro druh *T. austriacus* hostitel doposud není znám. Na základě umístění ve všech fylogenetických stromech této práce se dá monofylie tohoto poddruhu zcela vyloučit.

Druhová skupina *T. erucarum*-group, do které patří mimo jiné druhy *T. nobilis* a *T. roboris* ve všech stromech, kromě dvougenového stromu na základě jaderných ribozomálních genů, vycházela monofyletický. Podle Zavada (2003) by měla být součástí skupiny *T. chloromerus*-group ještě společně například s druhy *T. flavipes*, *T. cingulatus*, což představené fylogenetické stromy také nepodporují. Naopak je zajímavé, že *T. nobilis* a *T. roboris* téměř ve všech výstupech analýz vycházeli vždy jako jedno monofylum (kromě fylogeneze na základě genu Elongation factor, kde nicméně nebylo dostatečné zastoupení těchto druhů) společně s *T. auratus* a *T. gerani* (zástupci *T. bedeguaris*-group, *bedeguaris*-subgroup), což jsou rovněž druhy parazitující generalisticky u žlabatek na dubech.

Problematická skupina ve fylogenezích byla *T. cyaneus*-group, která se v konsenzuálním stromě nacházela jako monofyletická větev mimo klád *Torymus* sensu stricto, ale v jednotlivých stromech nebyla často monofyletická. Takové postavení je v rozporu s konceptem podle Zavada (2003), který již tuto druhovou skupinu zařadil do poddruhu *Torymus* sensu stricto a navíc druhy z ní rozdělil do skupin *T. affinis*-group a *T. cyaneus*-group. Ačkoliv k tomu nemohl vést rozdíl v biologii, poněvadž skupiny sdílejí hostitelské asociace se žlabatkami na dubech a růžích. Autor také zmiňuje, že si není zcela jist v rozdělení těchto skupin, protože nenachází ani morfologické diagnostické znaky unikátní pro tyto skupiny.

Největší („sběrná“) skupina je skupina *T. bedeguaris*-group, pro kterou ani nejsou nadefinovány konkrétní morfologické synapomorfie, rozhodně jako celek není monofyletická a její jednotlivé podskupiny také ne. Podskupina *T. bedeguaris*-group *tipularium* subgroup je

je v mých analýzách reprezentována jen jedním druhem, zbylé dvě jsou zastoupeny několika druhy. Ani o jedné podskupině se nedá prohlásit, že by mohly být monofyletické. Skupina *T. bedeguaris*-group *bedeguaris* subgroup i skupina *T. bedeguaris*-group *chloromerus* subgroup, jsou ve všech fylogenetických stromech rozděleny, a tak zcela odporují konceptu podle (Graham & Gijswijt 1998). Zvláště nápadné je umístění druhů *T. hylesini*, *T. stenus* a *T. impar*, kteří podle autorů náleží do druhové skupiny *T. bedeguaris*-group *chloromerus* subgroup, ale ve fylogenetických stromech se vyskytují v příbuznosti s druhy ze skupiny *T. nitidulus*-group a fytofágními zástupci. I tyto tři druhy jsou ve své biologii nestandardní, protože se jedná o parazitoidy brouků a bejlomorek na travách nebo vrbách s tím, že část druhů se vyznačuje velmi dlouhým kladélkem.

Jak bylo již uvedeno výše, některé druhové skupiny s koncepty druhových skupin korespondují, koncept poddruhů však fylogenetické vztahy spíše nepodporují.

6.4. Co lze říct o evoluci hostitelské specializace

Stromy (fylogenetické hypotézy) získané v této práci nelze nakonec dost dobře použít pro testování hypotéz o evoluci hostitelského spektra například programy Diversetree (FitzJohn, 2012) či programem MEDUSA (Modeling Evolutionary Diversification Using Stepwise Akaike Information Criterion (AIC) (Alfaro et al. 2009), které jsou pro tyto účely používány. Přestože sestavená fylogeneze zahrnuje dostatečné množství jedinců a značnou diverzitu hostitelských asociací (například na rozdíl od studie Al khatib et al. (2016)), ale větve mají velmi nízkou podporu hlavně v hlubším větvení jako v případě studie Stireman (2005). Nicméně sestavená fylogeneze dává dobrý podklad pro mapování hostitelských asociací a sledování hostitelských přeskoků. Hlavně lze sledovat, zda sesterské druhy sdílejí stejné či příbuzné hostitele. Mimo jiné pak je možné u sesterských druhů závěry považovat za relativně směřodatné, poněvadž tyto sesterské linie mají často dostatečnou podporu.

Fylogenetické stromy v této práci také předkládají důkaz o tom, které hostitelské asociace vznikly v evoluci v rámci rodu *Torymus* pouze jednou. Jednou z nich je fytofágie. Je vlastně zajímavé, proč se pravděpodobně zoofágní rod vydal touto fytofágní cestou. Navíc tato cesta se neukázala evolučně nijak zvláště výhodná, když nevedla k nějakému masivnějšímu vzniku fytofágních druhů. To je trochu v kontrastu se vznikem fytofágie a tedy současně i opylovací strategie u fíkových vosiček (Chalcidoidea: Agaonidae), kde tato

strategie sice vznikla pouze jednou, ale vedla k obrovské radiaci druhů (Cook & Rasplus, 2013). Recentní výzkum (Janšta et al., 2017) diskutuje vznik fytofágie také například u čeledi Megastigmidae (rovněž Chalcidoidea). Zde je opět fytofágie považována za ancestrální strategii, která vedla ke vzniku mnoha fytofágních druhů, a zoofágie pak v této skupině vznikla v evoluci minimálně dvakrát nezávisle.

Stejně tak vyplývá ze sestavené fylogeneze, že vznik asociací s bejlmorkami na břízách proběhl v evoluci také pouze jednou u skupiny *T. nitidulus*-group, která jak už bylo několikrát výše zmíněno, čítá pouze dva zástupce, a tak se vznik této asociace nejeví jako evolučně výhodný. Také by nás zajímala, asociace s hostiteli z ostřic u skupiny *T. laetus*-group proběhla jako jediná evoluční událost. Fylogenetický strom na základě všech genů by tuto hypotézu nevyvrátil, získané fylogeneze z jednotlivých genů či dvou genů skupinu *T. laetus*-group nepodporují jako monofyletickou, a tak se nedá soudit, zda došlo k opakované evoluční události či proběhla jen jednou. Stejně jako druhy parazitující hostitele na ostřicích, se vyskytují ve vlhkých habitatech druhy parazitující hostitele tvořící hálky na vrbách. Tato asociace podle výsledného stromu také v minulosti nevznikla jen jednou, ale několikrát nezávisle. Vznik ostatních hostitelských asociací se jeví jako problematický a bude dále diskutován.

Například o ancestrální hostitelské strategii rodu *Torymus* lze z výsledků práce jen těžko cokoli soudit. Když budeme uvažovat pouze *Torymus* sensu stricto, ve fylogenetických hypotézách vyplývajících z této práce jsou na bázi větve totiž druhy *T. azureus* species sola a skupina *T. nitidulus*-group, které parazitují bejlmorky. Druhy, které jsou sesterské s linií *Torymus* sensu stricto jakožto, zástupci druhové skupiny *T. cyaneus*-group jsou generalisté a parazitují na žlabkách na dubech. Také minimálně jeden vzorek v této studii patřící do skupiny *T. fullawayi*-group je asociován s duby. Tento vzorek byl vychován z hostitele a další zahrnuté druhy jsou podle databáze také asociováni s duby a žlabkami (Noyes 2018). Nicméně lze jen těžko vyvozovat závěry, poněvadž linie *Torymus* sensu stricto nebyla dostatečně podpořena, a tak nemůžeme říct, která strategie byla ancestrální. Z výsledků (Křížková, 2011) plyne, že plesiomorfní hostitelská strategie byla zoofágie a diskutuje, že by ancestrální strategií nemusela být asociace ani se žlabkami či bejlmorkami, ale v jejím případě asociace s chalcidkami. U kořene jejích fylogenetických stromů byl druh *T. baudysi*, který parazituje chalcidky rodu *Tetramesa* tvořící hálky na stéblech trav. Ačkoliv dataset této práce je rozšířen o zástupce z nového světa a další zástupce, i tak nejsem zcela schopná říct, jaká mohla být ancestrální strategie pro celý rod *Torymus*.

V literatuře se jako ancestrální strategie pro celou čeleď Torymidae předpokládá ektoparazitismus hálkotvorných žlabatek, jak nasvědčuje nejnovější fylogeneze (Janšta et al. 2017). Nicméně pro klád Torymini, kde se nachází rod *Torymus* jim statisticky vycházela jako ancestrální hostitelská strategie napadání bejlmorek. Můžeme však tvrdit, že nejodvozenější hostitelskou strategií je napadání bejlmorek tvořících hálky na bylinách, kde došlo k velké radiaci, nicméně asociace s bejlmorkami také v evoluci vznikla několikrát nezávisle.

Nelze pozorovat, že by se ve fylogenetických stromech získaných v této práci vyskytovaly striktně oddělené asociace se žlabatkami od asociací s bejlmorkami, ale lze vyvozovat, že tyto asociace nevznikly pouze jednou a docházelo k hostitelským přeskokům. Dále stručně popíšu možný evoluční scénář. Nejprve tedy od evolučně původní strategie napadat žlabatky na dubech přešli k napadání bejlmorek a fytofáгии (*T. nitidulus*-group, *T. austriacus*-group, *T. varians*-group, *T. azureus* species sola, *T. arundinis* species sola a druhy *T. hylesini*, *T. impar* a *T. stenus* ze skupiny *T. bedeguaris* group *chloromerus* subgroup), u vše zmíněných se vždy jedná se o linie striktních specialistů. Dále se ve větvení nachází větev se dvěma druhy generalistů (*T. phillyreae* – parazitující na bejlmorkách a *T. flavipes* – parazitující na žlabatkách). Další linií je skupina *T. laetus*-group, tedy linie specialistů asociovaných s bejlmorkami, poté muselo v evoluci dojít k přeskoku zpátky k parazitování žlabatek na dubech a růžích (druhy *T. flavipes*, *T. auratus*, *T. nobilis*, *T. roboris*, *T. geranii*) a posledním přeskokem a finálním tak byl přeskok na bejlmorky tvořící hálky na bylinách (celá korunová větev). Tento zjednodušený popis evoluce hostitelských specializací je ve shodě s Křížková (2011).

Výše popsany hypotetický evoluční scénář tak vcelku koresponduje s tím, co předpokládá Oscilační hypotéza, která podle jediné studie u parazitoidů z nadčeledi Chalcidoidea také vhodně korespondovala s jejich studovanou skupinou (Al khatib et al., 2016). Ačkoliv se u rodu *Torymus* nemůžu opřít o silně podpořenou fylogenezi, dá se polemizovat, zda evoluce probíhala podle předpokladů této hypotézy. Předpoklad, že se v rámci fylogeneze objevují specialisté a generalisté nahodile je v tomto případě splněn, také v evoluci očividně docházelo v evoluci hostitelského spektra ke změnám širě hostitelského spektra. Předpoklad Oscilační hypotézy je i to, že generalisté snáze kolonizují nové hostitele a zahrnou je do svého hostitelského spektra. Takový fenomén byl pozorován u rodu *Torymus*, kdy generalisté (*T. flavipes*, *T. auratus*, *T. geranii*) mezi prvními začali parazitovat na invazní

žlabatce *Dryocosmus kuriphilus*, když se rozšířila do jejich areálu (Matoševic & Melika, 2013).

Dále teoreticky fylogeneze a hostitelské asociace rodu *Torymus* nasvědčují, že by mohla být vhodná pro popis evoluce hostitelského spektra hypotéza „ekologie hostitele“ („Host ecology hypothesis“) (Tschopp et al., 2013). Nasvědčují tomu druhy parazitující na žlabatkách na dubech, které sdílejí i podobnou hodnotu ovipositor indexu, což je adaptací na napadání hostitelů. Pak také linie, která parazituje na bejломorkách na bylinách. Kromě toho, jak je vidět namapované na fylogenetickém stromě, sesterské druhy se vyskytují v podobném prostředí. Takovými druhy jsou i *T. impar* a *T. arundinis*, ačkoliv nesdílejí stejné hostitele, ale oba se vyskytují ve vlhkém prostředí a mají i velmi podobnou délku kladélka.

Zda v tomto případě specializace vede do slepé evoluční uličky, se dá usuzovat, že to tak nejspíše nebude, poněvadž se na fylogenetickém stromě vyskytují specialisté a generalisté střídavě a nahodile. Výše již bylo diskutováno, že specializovaná fytofágní strategie se nejeví jako výhodná evoluční strategie a nepřinesla významnou radiaci jako v případě fíkových vosiček. Nicméně terminální větev druhů parazitujících na bejломorkách na bylinách, kde jsou většinou specialisté je právě nejdvozenější, a přesto se v rámci ní objevují i druhy generalistů včetně druhu *T. chloromerus*, který je úplně terminální. Naopak strategie parazitování bejlomorek na bylinách a s ní spojená vysoká specificita přinesla výraznou radiaci na těchto hostitelích. Nejen specializace by se dala posuzovat jako znak vedoucí do slepé evoluční uličky. Například hálkotvorní zástupci, kteří tvoří háčky jsou také velmi specifictí, a tak bylo testováno, zda právě tvorba hálek nemůže vést do slepé evoluční uličky a nebylo to potvrzeno ani vyvráceno, protože se druhová diverzita ve skupinách lišila (Hardy & Cook, 2010). V mém případě by tím znakem mohla být délka kladélka. Při pohledu na namapované hodnoty ovipositor indexu se nejeví, že by dlouhé/krátké kladélko znamenalo nějaké evoluční omezení a vedlo tak do slepé evoluční uličky.

7. Závěr

Předložená práce zabývající se fylogenezí a evolucí hostitelského spektra u druhu *Torymus* přináší nové poznatky o této parazitické skupině živočichů. Rozšířením datasetu na 181 jedinců se podařilo zodpovědět na více otázek o evoluci hostitelského spektra tohoto diverzifikovaného rodu. Fylogenetická hypotéza rodu *Torymus* v této práci v souladu s jinými výzkumy zpochybňuje, zda je vůbec tento rod monofyletický. Stejně tak zpochybňuje monofylii většiny druhových skupin, které byly v minulosti stanoveny.

Ačkoliv o ancestrální hostitelské strategii můžeme nadále polemizovat, sestavený fylogenetický strom přinesl důkazy, které hostitelské asociace vznikly v evoluci pouze jednou či opakovaně. Za zmínku samozřejmě stojí již mnohokrát diskutovaná fytofágní strategie a asociace s hostiteli na břízách tyto asociace vznikly v evoluci pouze jednou. Asociace se žlabkami a bejlmorkami v evoluci vznikly patrně několikrát nezávisle. Sesterské skupiny často parazitují příbuzné hostitele, například větev parazitující žlabky na dubech, v tomto konkrétním případě je pak vyloučen druhový koncept. Dále můžeme pozorovat, že se sesterské druhy často vyskytují ve stejném či podobném prostředí.

K potvrzení hypotéz o směru evoluce či konkrétních hypotéz o evoluci hostitelského spektra není fylogenetická hypotéza dostatečně podpořená. Přesto lze říci, že jelikož se míra hostitelské specificity vyskytuje na stromě zcela nahodile, a tak v evoluci docházelo patrně k dramatickým změnám v šíři hostitelského spektra. Dále jsou ze stromu patrně četné hostitelské, a proto bych se přiklonila tomu, že evoluce hostitelského spektra u rodu *Torymus* nejlépe popisuje Oscilační hypotéza.

V budoucnu bude nutné sestavit fylogenezi s vysokou podporou, aby mohly být hypotéty o evoluci hostitelského spektra uspokojivěji testovány. Součástí právě mého magisterského studia byla příprava na sekvenování metodou Anchored Hybrid Enrichment. Nadesignovala jsem baity, které umožní amplifikovat až 875 genů, a tak bychom měli dojít k sestavení dobře podpořené fylogeneze. Na základě této práce a fylogenetických vazeb, které ukázala, budou pro Anchored Hybrid Enrichment vybrány reprezentativní druhy, které se ukázaly jako vhodné a aby vhodně zastupovaly diverzitu hostitelských asociací.

8. Seznam literatury

- Al khatib, F., Cruaud, A., Fusu, A., Genson, G., Rasplus, J.-Y., Ris, N., & Delvare, G. 2016. "Multilocus Phylogeny and Ecological Differentiation of the 'Eupelmus Urozonus Species Group' (Hymenoptera, Eupelmidae) in the West-Palaeartic." *BMC Evolutionary Biology* 16 (1): 13
- Alfaro, M.E., Santini, F., Brock, C., Alamillo, H., Dornburg, A., Rabosky, D.L., Carnevale, G. & Harmon, L.J., 2009. Nine exceptional radiations plus high turnover explain species diversity in jawed vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(32), 13410-13414.
- *Askew, R.R. & Shaw, M.R. 1986 Parasitoid communities: their size, structure and development. Insect Parasitoids. citováno dle - Hawkins, B. A., Shaw, M. R. & Askew, R. R. 1992. Relations Among Assemblage Size, Host Specialization, and Climatic Variability in North American Parasitoid Communities. *The American Naturalist* 139 (1): 58–79.
- Askew, R.R. 1961. On the Biology of the Inhabitants of Oak Galls of Cynipidae (Hymenoptera) in Britain. *Transactions of the Society for British Entomology*, (14): 237 - 268.
- Bailey, R., Schönrogge, K., Cook, J.M., Melika, G., Csóka, G., Thuróczy, C., & Stone, G. N. 2009. Host Niches and Defensive Extended Phenotypes Structure Parasitoid Wasp Communities. *PLoS Biology* 7 (8): e1000179.
- Belshaw, R. & Quicke, D.L.J., 2002. Robustness of Ancestral State Estimates: Evolution of Life History Strategy in Ichneumonoid Parasitoids. *Systematic Biology* 51 (3): 450–77.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K.L., Meier, R., Winker, K., Ingmar, K.K. & Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology and evolution*, 22(3): 148-155.
- Brown P., & Rossi, A. M. 2013. Geographic and Host-Associated Size Variation in the Parasitoid Wasp *Torymus Umbilicatus* (Hymenoptera: Torymidae) in Florida: Implications for Host Survival and Community Structure. *Florida Entomologist* 96 (3): 832–838
- *Brussino, G., Bosio, G., Baudino, M., Giordano, R., Ramello, F., Melika, G. 2002. Pericoloso insetto esotico per il castagno europeo. *Informatore Agrario*, 58: 59-61 citováno dle Aebi, A., Schönrogge, K., Melika, G., Alma, A., Bosio, G., & Quacchia, A. 2006. Parasitoid Recruitment to the Globally Invasive Chestnut Gall Wasp *Dryocosmus Kuriphilus*. *Galling arthropods and their associates* 103–121.
- Cane, J. H., Snelling, R. R., & Kervin, L. J. 1996. A new monoleptic coastal bee, *Hesperapis oraria* Snelling and Stage (Hymenoptera: Melittidae), with a review of desert and neotropical disjunctives in the southeastern US. *Journal of the Kansas Entomological Society*, (69): 238-247.
- Cook, J. M., & Rasplus, J. Y. 2003. Mutualists with attitude: coevolving fig wasps and figs. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(5), 241-248.
- Cooper, W. R., & Riesecke, L. K. 2011. A native and an introduced parasitoid utilize an exotic gall-maker host. *BioControl*, 56(5): 725-734.
- Cope, E. D. 1896. The primary factors of organic evolution. *Open Court Publishing Co., Chicago* citováno dle Kelley, S. T., & Farrell, B. D. 1998. Is Specialization a Dead End? The Phylogeny of Host Use in *Dendroctonus* Bark Beetles (Scolytidae). *Evolution* 52 (6): 1731–43.
- Cordero, P. J., & Summers-Smith, J. D. 1993. Hybridization between House and Tree Sparrow (*Passer domesticus*, *P. montanus*). *Journal für Ornithologie*, 134(1): 69-77.
- Craig, T. P., Itami, J. K., & Price, P. W. 1990. The Window of Vulnerability of a Shoot-Galling Sawfly to Attack by a Parasitoid. *Ecology*, 71 (4): 1471–82.
- Crozier, R. H., Crozier, Y. C., & Mackinlay, A. G. 1989. The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Molecular Biology and Evolution*, 6(4): 399-411.
- Cruaud, A., Jabbour-Zahab, R., Genson, G., Cruaud, C., Couloux, A., Kjellberg, F., van Noort, S. & Rasplus, J. -Y. 2010. Laying the foundations for a new classification of Agaonidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), a multilocus phylogenetic approach. *Cladistics*, 26(4): 359-387.
- Cruaud, A., Jabbour-Zahab, R., Genson, G., Kjellberg, F., Kobmoo, N., van Noort, S., Da-Rong, Y., Ubaidillah, R., Hanson, P.E., Santos-Mattos, O., Farache, F. HA, Pereira, R. AS., Kerdelhué, C., & Rasplus, J.-Y. 2011a. Phylogeny and evolution of life-history strategies in the Sycophaginae non-pollinating fig wasps (Hymenoptera, Chalcidoidea). *BMC Evolutionary Biology*, 11(1): 178.
- Cruaud, As., Jabbour-Zahab, R., Genson, G., Couloux, A., Yan-Qiong, P., Yang, D-R., Ubaidillah, R., Pereira, R.AS., Kjellberg, F., van Noort, S., Kerdelhué, C & Rasplus, J.-Y. 2011b. Out of Australia and Back Again: The World-Wide Historical Biogeography of Non-Pollinating Fig Wasps (Hymenoptera: Sycophaginae). *Journal of Biogeography*, 38 (2): 209–225.

- Cruaud, A., Ronsted, N., Chantarasuwan, B., Siang Chou, L., Clement, W.L., Couloux, A., Cousins, B., Genson, G., Harrison, R. D., Hanson, P.E., Hossaert-Mickey, M., Jabbour-Zahab, R., Jousellin, E., Kerdelhué, C., Kjellberg, F., Lopez-Vamonde, C., Peebles, J., Penq, Y-Q., Pereira, R.A.S., Schramm, T., Ubaidillah, R., van Noort, S., Weiblen, G.D., Yang, D-R., Yodpinyace, A., Liebeskin-Hadas, R., Cook, J.M., Rasplus, J.-Y. & Savolainen, V. 2012. An Extreme Case of Plant-Insect Codiversification: Figs and Fig-Pollinating Wasps. *Systematic Biology*, 61 (6): 1029–47.
- Dalman, J. W. 1820. Forsök till Uppställning af insectenfamiljen Pteromalini, i synerhed med afseende på de i Sverige funne arter. Tab, 2, 123-174.
- Day, E. H., Hua, X., & Bromham, L. 2016. Is specialization an evolutionary dead end? Testing for differences in speciation, extinction and trait transition rates across diverse phylogenies of specialists and generalists. *Journal of evolutionary biology*, 29(6): 1257-1267.
- Derocles, S. A., Plantegenest, M., Rasplus, J. Y., Marie, A., Evans, D. M., Lunt, D. H., & Le Ralec, A. 2016. Are generalist Aphidiinae (Hym. Braconidae) mostly cryptic species complexes? *Systematic Entomology*, 41(2) 379-391.
- Diamond, J. 1982. Effect of Species Pool Size on Species Occurrence Frequencies: Musical Chairs on Islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79 (7): 2420–24.
- Dietrich, C. H., Allen, J. M., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., Takiya, D. M., Evangelista, O., Walden, K.K.O., Grady, P.G.S, & Johnson, K.P. 2017. Anchored hybrid enrichment-based phylogenomics of leafhoppers and treehoppers (Hemiptera: Cicadomorpha: Membracoidea). *Insect Systematics and Diversity*, 1(1): 57-72.
- Dixon, K A, Lerma, R. R., Craig, T.P. & Hughes, K. A. 1998. Gall Morphology and Community Composition in *Asphondylia* Flocossa (Cecidomyiidae) Galls on *Atriplex Polycarpa* (Chenopodiaceae). *Environmental Entomology* 27 (3): 592–99.
- Ehrlich, P. R., & Raven, P. R. 1964. Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. *Evolution* 18 (4): 586–608.
- Eytan, R-I., Evans, B.R., Dornburg, A., Lemmon, A.R., Lemmon, E.M., Wainwright P.C. & Near, T.J. 2015. Are 100 Enough? Inferring Acanthomorph Teleost Phylogeny Using Anchored Hybrid Enrichment. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1):113.
- Faircloth, B. C., Branstetter, M. G., White, N. D., & Brady, S. G. 2015. Target enrichment of ultraconserved elements from arthropods provides a genomic perspective on relationships among Hymenoptera. *Molecular Ecology Resources*, 15(3): 489-501.
- Farias, I. P., Ortí, G., Sampaio, I., Schneider, H., & Meyer, A. 2001. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of molecular evolution*, 53(2): 89-103.
- FitzJohn, R.G. 2012. Diversitree: Comparative Phylogenetic Analyses of Diversification in R. *Methods in Ecology and Evolution* 3 (6): 1084–92.
- Fordyce, J. A. 2010. Host shifts and evolutionary radiations of butterflies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277(1701): 3735-3743.
- Fusu, L., & Polaszek, A. (2017). Description, DNA barcoding and phylogenetic placement of a remarkable new species of *Eopelma* (Hymenoptera: Eupelmidae) from Borneo. *Zootaxa*, 4263(3): 557-566.
- *Futuyma, D.J., & M. Slatkin. 1983. Introduction. Pp. 1-13 in D. J. Futuyma and M. Slatkin, eds. *Coevolution*. Sinauer, Sunderland, Mass. citováno dle Henter, H.J. 1995. The Potential for Coevolution in a Host-Parasitoid System. II. Genetic Variation within a Population of Wasps in the Ability to Parasitize an Aphid Host. *Evolution* 49 (3): 439–445.
- Futuyma, D. J., & Moreno, G. 1988. The evolution of ecological specialization. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19(1): 207-233.
- Gagné, R.J. & M. Jaschhof. 2014. A Catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the World. 3rd Edition. Digital version 2.
- Gomez, J. F., Nievev-Aldrey, J. L., & Hernandez Nieves, M. 2008. Comparative morphology, biology and phylogeny of terminal-instar larvae of the European species of Toryminae (Hym., Chalcidoidea, Torymidae) parasitoids of gall wasps (Hym. Cynipidae). *Zoological journal of the Linnean Society*, 154(4): 676-721.
- Gompert, Z., Jahner, J. P., Scholl, C. F., Wilson, J. S., Lucas, L. K., Soria-Carrasco, V., Fordyce, J.A., Chris, C.C., Buerkle, A. & Forister, M. L. 2015. The evolution of novel host use is unlikely to be constrained by trade-offs or a lack of genetic variation. *Molecular ecology*, 24(11): 2777-2793.
- Gompert, Z., & Messina, F. J. 2016. Genomic evidence that resource-based trade-offs limit host-range expansion in a seed beetle. *Evolution*, 70(6): 1249-1264.

- Graham, d.V., M.W.R. & Gijswijt, M.J. 1998. Revision of the European species of *Torymus* Dalman (s. lat.) (Hymenoptera: Torymidae). *Zoologische Verhandelingen*, 317: 1 - 202.
- Grissell, E. 1976. A Revision of Western Nearctic Species of *Torymus* Dalman (Hymenoptera, Torymidae) (Vol. 79). *Univ of California Press*.
- Grissell, E. E. 2004. A new species of *Torymus* (Hymenoptera: Torymidae) associated with *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 639-643.
- Habermannová, J., Bogusch, P. & Straka, J. 2013. Flexible Host Choice and Common Host Switches in the Evolution of Generalist and Specialist Cuckoo Bees (Anthophila: *Sphecodes*). *PLoS One* 8 (5): e64537.
- Haddad, S., Shin, S., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., Svacha, P., Farrell, B., Slipinski, A., Windsor, D. & McKenna, D. D. 2018. Anchored hybrid enrichment provides new insights into the phylogeny and evolution of longhorned beetles (Cerambycidae). *Systematic Entomology*, 43(1): 68-89
- Hamilton, C. A., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., & Bond, J. E. 2016. Expanding anchored hybrid enrichment to resolve both deep and shallow relationships within the spider tree of life. *BMC evolutionary biology*, 16(1): 212.
- Hamm, C. A., & Fordyce, J. A. 2015. Patterns of host plant utilization and diversification in the brush-footed butterflies. *Evolution*, 69(3): 589-601.
- Hansson, C. & Hambäck, P.A. 2013. Three Cryptic Species in *Asecodes* (Forster) (Hymenoptera, Eulophidae) Parasitizing Larvae of *Galerucella* spp. (Coleoptera, Chrysomelidae), Including a New Species. *Journal of Hymenoptera Research*, 30: 51-64.
- Hardy, N. B., & Cook, L. G. 2010. Gall-Induction in Insects: Evolutionary Dead-End or Speciation Driver? *BMC Evolutionary Biology*, 10 (1): 257.
- Hardy, N.B., & Otto, S.P. 2014. Specialization and Generalization in the Diversification of Phytophagous Insects: Tests of the Musical Chairs and Oscillation Hypotheses. *Proceedings of the Royal Society*, 281
- Hardy, N. B., Peterson, D. A., & Normark, B. B. 2016. Nonadaptive radiation: Pervasive diet specialization by drift in scale insects? *Evolution*, 70(10): 2421-2428.
- Hardy, N. B. 2017. Do plant-eating insect lineages pass through phases of host-use generalism during speciation and host switching? Phylogenetic evidence. *Evolution*, 71(8): 2100-2109.
- Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T. A. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, 22(2): 160-174.
- Hawkins, B.A., Shaw, M.R. & Askew, R.R. 1992. Relations Among Assemblage Size, Host Specialization, and Climatic Variability in North American Parasitoid Communities. *The American Naturalist* 139 (1): 58-79.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., & Ball, S. L. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Heraty, J. M., Burks, R. A., Cuaud, A., Gibson, G. A. P., Liljeblad, J., Munro, J., Rasplus, J.-Y., Delvare, G., Janšta, P., Gumowsky, A., Huber, J., Woolley, J. B., Krogmann, L., Heydon, S., Polaszek, A., Schmidt, S., Darling, D. C., Gates, M. W., Mottern, J., Murray, E., Dal Molin, A., Triapitsyn S., Baur, H., Pinto, J. D., Van Noort, S., George, J. & Yoder, M. 2013: A phylogenetic analysis of the megadiverse Chalcidoidea (Hymenoptera). *Cladistics* 29: 466-542.
- Huey, R. B. & Hertz, P. E. 1984. "Is a Jack-of-All-Temperatures a Master of None?" *Evolution* 38 (2): 441-444.
- Hurst, G. D., & Jiggins, F. M. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences*, 272(1572): 1525-1534.
- *Chapman, R.F. 1982. Chemoreception: the significance of receptor numbers. *Advances in insect physiology* (16): 247-356.
- citováno dle - Symonds, M. R. E., & Elgar, M. A. 2013. The Evolution of Body Size, Antennal Size and Host Use in Parasitoid Wasps Hymenoptera : Chalcidoidea): A Phylogenetic Comparative Analysis. *PLOS ONE*, 8 (10): 1-13.
- Izawa, H., Osakabe, M., & Moriya, S. (1995). Relation between banding patterns of malic enzyme by electrophoresis and a morphological character in exotic and native *Torymus* species. *Applied Entomology and Zoology*, 30(1), 37-41.
- Janšta, P., Cruaud, A., Delvare, G., Genson, G., Heraty, J., Křížková, B., & Rasplus, J.-Y. 2017. Torymidae (Hymenoptera, Chalcidoidea) revised: molecular phylogeny, circumscription and reclassification of the family with discussion of its biogeography and evolution of life-history traits. *Cladistics* (akceptováno).
- Janz, N., & Nylin, S. 2008. The Oscillation Hypothesis of Host-Plant Range and Speciation. *Specialization, Speciation, and Radiation: The Evolutionary Biology of Herbivorous Insects*, 203-215.

- Janz, N., S. Nylin, & N. Wahlberg. 2006. Diversity begets diversity: host expansions and the diversification of plant-feeding insects. *BMC Systematic Biology*, (62): 789–804.
- Janzen, D. H. 1980. When Is It Coevolution? *Evolution*, 34 (3): 611–612.
- Kamijo, K. 1982. Two New Species of *Torymus* (Hymenoptera, Cynipidae) in China and Korea. *Kontyu*, Tokyo 50 (4): 505–10.
- Kaartinen, R., Stone, G. N., Hearn, J., Lohse, K., & Roslin, T. 2010. Revealing secret liaisons: DNA barcoding changes our understanding of food webs. *Ecological Entomology*, 35(5): 623-638.
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics*.
- Kavallieratos, N. G., Tomanović, Ž., Starý, P., Athanassiou, C. G., Sarlis, G. P., Petrović, O., Niketic, M. & Veroniki, M. A. 2004. A survey of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) of Southeastern Europe and their aphid-plant associations. *Applied Entomology and Zoology*, 39(3): 527-563.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647-1649.
- Klopfstein, S., Vilhelmsen, L., Heraty, J. M., Sharkey, M., & Ronquist, F. (2013). The hymenopteran tree of life: evidence from protein-coding genes and objectively aligned ribosomal data. *PLoS One*, 8(8), e69344.
- König, K., Krimmer, E., Brose, S., Gantert, C., Buschlüter, I., König, C., Klopfstein, S., Wedt, I., Baur, H., Krogmann, L., & Steidle, J. L.M. 2014. Does Early Learning Drive Ecological Divergence during Speciation Processes in Parasitoid Wasps? *The Royal Society Publishing*, no. *The Royal Society Publishing*. 282(1799), 20141850.
- Koonin, E.V. 2005 Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annual Review of Genetics*, 39:309-338
- Křížková, B. 2011. Fylogeneze vybraných druhových skupin rodu *Torymus* (Hymenoptera: Torymidae)
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. 2016. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34(3): 772-773.
- László, Z., & Tóthmérész, B. 2013. The enemy hypothesis: correlates of gall morphology with parasitoid attack rates in two closely related rose cynipid galls. *Bulletin of entomological research*, 103(3): 326-335.
- Lemmon, A. R., Emme, S. A., & Lemmon, E. M. 2012. Anchored hybrid enrichment for massively high-throughput phylogenomics. *Systematic biology*, 61(5): 727-744.
- Lopez-Vaamonde, C., Rasplus, J.Y., Weiblen, G.D. & Cook, J. M. 2001. Molecular Phylogenies of Fig Wasps: Partial Cocladogenesis of Pollinators and Parasites. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21 (1): 55–71.
- Lopez-Vaamonde, C., Godfray, H. C. J., West S., Hansson, C., & Cook, J. M. 2005. The Evolution of Host Use and Unusual Reproductive Strategies in Achrysocharoides Parasitoid Wasps. *Journal of Evolutionary Biology*, 18 (4): 1029–41.
- Manos, P. S., Doyle, J. J., & Nixon, K. C. 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 12(3): 333-349.
- Matosevic, D., & Melika, G. 2013. Recruitment of Native Parasitoids to a New Invasive Host: First Results of Dryocosmus Kuriphilus Parasitoid Assemblage in Croatia. *Bulletin of Insectology*, 66 (2): 231–38.
- Mayer, C., Sann, M., Donath, A., Meixner, M., Podsiadlowski, L., Peters, R. S., Petersen, M., Meusemann, K., Lier, K., Wägele, J.-W., Misof, B., Bleidorn, C., Ohl, M., Niehuis, O. 2016. BaitFisher: a software package for multispecies target DNA enrichment probe design. *Molecular biology and evolution*, 33(7): 1875-1886.
- McLeish, M. J., Beukman, G., van Noort, S., & Wossler, T. C. 2012. Host-plant species conservatism and ecology of a parasitoid fig wasp genus (Chalcidoidea; Sycoryctinae; Arachonia). *PloS one*, 7(9), e44804.
- Melika, G., Pujade-Villar, J., Abe, Y., Tang, C., Nicholls, J., Wachi, N., Ide, T., Yang, M.-M., Péñsez, Z., Csóka, G. & Stone, G. N. 2010. Palaeartic oak gallwasps galling oaks (*Quercus*) in the section *Cerris*: re-appraisal of generic limits, with descriptions of new genera and species (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini). *Zootaxa*, 2470, 1-79.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)* 1 - 8.
- Mitchell, A., Cho, S., Regier, J. C., Mitter, C., Poole, R. W., & Matthews, M. 1997. Phylogenetic utility of elongation factor-1 alpha in noctuoidea (Insecta: Lepidoptera): the limits of synonymous substitution. *Molecular biology and evolution*, 14(4): 381-390.

- Moreira, D., Le Guyader, H., & Philippe, H. 1999. Unusually high evolutionary rate of the elongation factor 1 alpha genes from the Ciliophora and its impact on the phylogeny of eukaryotes. *Molecular biology and evolution*, 16(2): 234-245.
- Moriya, S. 1992. Interspecific relationship between an introduced parasitoid, *Torymus sinensis* Kamijo, as a biological control agent of the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, and an endemic parasitoid, *Torymus beneficus* Yasumatsu et Kamijo. *Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica*, 27: 479-483.
- Müller, A. 1996. Host-Plant Specialization in Western Palearctic Anthidine Bees (Hymenoptera: Apoidea: Megachilidae). *Ecological Monographs*, 66 (2): 235–57.
- Munro, J. B., Heraty, J. M., Burks, R.A., Hawks, D., Mottern, J., Cruaud, A., Rasplus, J. Y., & Jansta, P. 2011. A Molecular Phylogeny of the Chalcidoidea (Hymenoptera). *PLoS ONE* 6 (11): e27023
- Murray, E. A., Carmichael, A. E., & Heraty, J. M. 2013. Ancient Host Shifts Followed by Host Conservatism in a Group of Ant Parasitoids. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 280(1759): 20130495.
- Nicholls, J. A., Schönrogge, K., Preuss, S., & Stone, G. N. 2018. Partitioning of herbivore hosts across time and food plants promotes diversification in the *Megastigmus dorsalis* oak gall parasitoid complex. *Ecology and evolution*, 8(2): 1300-1315.
- Nyman, T., Bokma, F., & Kopelke, J.P..2007. Reciprocal Diversification in a Complex PlantHerbivore-Parasitoid Food Web. *BMC Biology*. 5(1): 49.
- Onstad, D. W., & McManus, M. L. 1996. Risks of host range expansion by parasites of insects. *BioScience*, 46(6), 430-435.
- Otto, M., & Mackauer, M. 1998. The Developmental Strategy of an Idiobiont Ectoparasitoid, *Dendrocerus Carpenteri*: Influence of Variations in Host Quality on Offspring Growth and Fitness. *Oecologia* 117 (3): 353–364.
- Peloso, P. L., Frost, D. R., Richards, S. J., Rodrigues, M. T., Donnellan, S., Matsui, M., Raxworthy, C. J., Biju, S. D., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. & Wheeler, W. C. 2016. The impact of anchored phylogenomics and taxon sampling on phylogenetic inference in narrow-mouthed frogs (Anura, Microhylidae). *Cladistics*, 32(2): 113-140.
- Peters, R... S. 2011. Two Ways of Finding a Host: A Specialist and a Generalist Parasitoid Species (Hymenoptera: Chalcidoidea: Pteromalidae). *European Journal of Entomology*, 5759: 565–73.
- Peters, R. S., Krogmann, L., Mayer, C., Donath, A., Gunkel, S., Meusemann, K., Kozlov, A., Podsiadlowski, A., Petersen, M., Lanfear, R., Diez, P.A., Heraty, J., Krejci, K.M., Klopstein, S., Meier, R., Polidori, C., Schmitt, T., Liu, S., Zhou, X., Wappler, T., Rust, J., Misof, B. & Niehuis, O. 2017. Evolutionary History of the Hymenoptera, *Current Biology*, 27: 1013–1018
- Peters, R.S., Niehuis, O., Gunkel, S., Bläser, M., Mayer, C., Podsiadlowski, L., Kozlov, A., Donath, A., van Noort, S., Liu, S., Zhou, X., Misof, B., Heraty, J. & Krogmann L 2018. Transcriptome sequence-based phylogeny of chalcidoid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea) reveals a history of rapid radiations, convergence, and evolutionary success. *Molecular phylogenetics and evolution*, 120: 286-296.
- Petersen, M., Meusemann, K., Donath, A., Dowling, D., Liu, S., Peters, R. S., Podsiadlowski, L., Vasilikopoulos, A., Zhou, X. & Niehuis, O. 2017. Orthograph: a versatile tool for mapping coding nucleotide sequences to clusters of orthologous genes. *BMC Bioinformatics*, 18(1). 111.
- Polaszek, A., Ayshford, T., Yahya, B. E., & Fusu, L. 2014. *Wallaceaphytis*: an unusual new genus of parasitoid wasp (Hymenoptera: Aphelinidae) from Borneo. *Journal of Natural History*, 48(19-20): 1111-1123.
- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., & Lemmon, A. R. (2015). A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526 (7574): 569–73.
- Quacchia, A., Moriya, S., Askew, R. & Schönrogge, K. (2014). *Torymus sinensis*: Biology, host range and hybridization. *Acta Horticulturae*. 1043: 105-111
- Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie D, Baele, G. & Suchard, M.A. 2018 Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*.
- Rodriguez, J., Pitts, J. P., Florez, J.A., Bond, J.A. & von Dohlen, C. D. 2016. Molecular Phylogeny of Pompilinae (Hymenoptera: Pompilidae): Evidence for Rapid Diversification and Host Shifts in Spider Wasps. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94:55–64.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. & Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 61(3):539-542.
- Ronquist, F., Nieves-Aldrey, J. L., Buffington, M. L., Liu, Z., Liljeblad, J., & Nylander, J. A. 2015. Phylogeny, evolution and classification of gall wasps: the plot thickens. *PLoS One*, 10(5), p. e0123301

- Rossi, A. M., Stiling, P., Cattell, M. V., & Bowdish, T. I. 1999. Evidence for host-associated races in a gall-forming midge: trade-offs in potential fecundity. *Ecological Entomology*, 24(1): 95-102.
- Shin, S., Clarke, D. J., Lemmon, A. R., Moriarty Lemmon, E., Aitken, A. L., Haddad, S., Farrell, B. D., Marvaldi, A. D., Oberprieler, R. G. & McKenna, D. D. 2017. Phylogenomic data yield new and robust insights into the phylogeny and evolution of weevils. *Molecular biology and evolution*, 35(4), 823-836.
- Schmickl, R., & Koch, M. A. 2011. Arabidopsis hybrid speciation processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34): 14192-14197.
- Schönrogge, K., L. J. Harper, & C. P. Lichtenstein. 2000. The Protein Content of Tissues in Cynipid Galls (Hymenoptera: Cynipidae): Similarities between Cynipid Galls and Seeds. *Plant, Cell and Environment* 23 (2): 215–222.
- Singer, M. S., & Stireman, J.O. 2005. The Tri-Trophic Niche Concept and Adaptive Radiation of Phytophagous Insects. *Ecology Letters*, 8 (12): 1247–1255.
- Skuhrová M. & Skuhrový, V. 1993: Bejlomorky Českého krasu (Cecidomyiidae, Diptera). Die Gallmücken des Böhmischen Karstes (Cecidomyiidae, Diptera). *Bohemia centralis*, Praha, 22: 51-281.
- Solberg, E. J., Jensen, H., Ringsby, T. H., & Sæther, B. E. 2006. Fitness consequences of hybridization between house sparrows (*Passer domesticus*) and tree sparrows (*P. montanus*). *Journal of Ornithology*, 147(3), 504-506.
- Stamatakis, A. 2014 RAXML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Stilmant, D., Van Bellinghen, C., Hance, T., & Boivin, G. 2008. Host Specialization in Habitat Specialists and Generalists. *Oecologia*, 156 (2): 431–440.
- Stireman, J. O., Dyer, L. A., & Greeney III, H. F. 2017. Specialised generalists? Food web structure of a tropical tachinid-caterpillar community. *Insect Conservation and Diversity*, 10(5): 367-384.
- Stireman, J. O. 2005. The Evolution of Generalization? Parasitoid Flies and the Perils of Inferring Host Range Evolution from Phylogenies. *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 325–336.
- Stone, G. N., & Schönrogge, K. 2003. The Adaptive Significance of Insect Gall Morphology. *Trends in Ecology & Evolution*, 18 (10): 512–522.
- Stone, G. N., Hernandez-Lopez, A., Nicholls, J. A., Di Pierro, E., Pujade-Villar, J., Melika, G., & Cook, J. M. 2009. Extreme host plant conservatism during at least 20 million years of host plant pursuit by oak gallwasps. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 63(4): 854-869.
- Stone, G. N., Lohse, K., Nicholls, J. A., Fuentes-Utrilla, P., Sinclair, F., Schönrogge, K., Csóka, G., Melika, G., Nieves-Aldry, J.-L., Pujade-Villar, J., Tavakoli, M., Askew, R. R. & Hickerson, M.J. 2012. Reconstructing community assembly in time and space reveals enemy escape in a Western Palearctic insect community. *Current Biology*, 22(6): 532-537.
- Straub, C. S., Ives, A.R., & Gratton, C. 2011. Evidence for a Trade-off between Host-Range Breadth and Host-Use Efficiency in Aphid Parasitoids. *The American Naturalist*, 177 (3): 389–395.
- Suyama, M., Torrents, D., & Bork, P. 2006. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Research*. 34:609-612.
- Toda, S., Miyazaki, M., Osakabe, M., & Komazaki, S. 2000. Occurrence and hybridization of two parasitoid wasps, *Torymus sinensis* Kamijo and *T. beneficus* Yasumatsu et Kamijo (Hymenoptera: Torymidae) in the Oki islands. *Applied Entomology and Zoology*, 35(1), 151-154.
- Tschopp, A., Riedel, M., Kropf, Ch., Nentwig, W. & Klopstein, S. 2013. The Evolution of Host Associations in the Parasitic Wasp Genus *Ichneumon* (Hymenoptera: Ichneumonidae): Convergent Adaptations to Host. *BMC evolutionary biology*, 13(1): 74.
- Van Hezewijk, B. H., & Roland, J. 2003. Gall size determines the structure of the *Rabdophaga strobiloides* host–parasitoid community. *Ecological Entomology*, 28(5): 593-603.
- Wiegmann, B. M., Mitter, Ch., & Farrelle, B. 1993. Diversification of Carnivorous Insects: Extraordinary Radiation or Specialized Dead End? *The American Naturalist* 1422 (5): 737–754.
- Wilson, H. B., Hassell, M. P., & Godfray, H. C. J. 1996. Host-parasitoid food webs: dynamics, persistence, and invasion. *The American Naturalist*, 148(5): 787-806.
- Winkler, I. S., & Mitter, C. 2008. The phylogenetic dimension of insect-plant interactions: a review of recent evidence. *Specialization, speciation, and radiation: the evolutionary biology of herbivorous insects*, 240-263.
- Yara, K., Yano, E., Sasawaki, T., & Shiga, M. 2000. Detection of hybrids between introduced *Torymus sinensis* and native *T. beneficus* (Hymenoptera: Torymidae) in central Japan, using malic enzyme. *Applied entomology and zoology*, 35(2): 201-206.

- Yara, K. 2004. Relationship between the introduced and indigenous parasitoids *Torymus sinensis* and *T. beneficus* (Hymenoptera: Torymidae) as inferred from mt-DNA (COI) sequences. *Applied Entomology and Zoology*, 39(3): 427-433.
- Young, A. D., Lemmon, A. R., Skevington, J. H., Mengual, X., Ståhls, G., Reemer, M., Jordaens, K., Kelso, S., Lemmon, E. M., Hauser, M., De Meyer, M., Misof, B. & Wiegmann, B. M. (2016). Anchored enrichment dataset for true flies (order Diptera) reveals insights into the phylogeny of flower flies (family Syrphidae). *BMC evolutionary biology*, 16(1), 143.
- Zaldívar-Riverón, A., Shaw, M.R., Sáez, A.G., Mori, M., Belokoblylskij, S.A., Shaw, S.R., and Quicke, D. J. 2008. Evolution of the Parasitic Wasp Subfamily Rogadinae (Braconidae): Phylogeny and Evolution of Lepidopteran Host Ranges and Mummy Characteristics. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 329.
- Zavada, A. (2003). Definition of subgenera and a reassessment of species groups of *Torymus* Dalman (Hymenoptera: Torymidae), based on Palaeartic material. *Phegea*, 31(3): 91-120.
- Zharkikh, A. 1994. Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 39(3): 315-329.

Internetové zdroje a databáze

Faircloth, 2010 (Faircloth <https://gist.github.com/brantfaircloth/895282>)

Noyes J.S. 2018. Universal Chalcidoidea Database. World Wide Web electronic publication. <http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids> (poslední aktualizace březen 2018).

Rambaut et al., 2012 FigTree v1.4.13 - <http://tree.bio.ed.ac.uk/>

9. Přílohy

9.1. Seznam rodů a druhů zmíněných v této práci včetně autorů popisu.

<i>Acer</i>	Linnaeus, 1735	<i>Eupelmus</i>	Dalman, 1820
<i>Alacidea hieracii</i>	Linnaeus, 1758	<i>Eupelmus urozonus</i>	Dalman, 1820
<i>Andricus kollari</i>	Hartig, 1843	<i>species group</i>	
<i>Andricus multiplicatus</i>	Giraud, 1859	<i>Euphorbia cyparissias</i>	Linnaeus, 1753
<i>Andricus quercuscalicis</i>	Burgsdorf, 1783	<i>Ficus sp</i>	Linnaeus, 1753
<i>Andricus quercustozae</i>	Bosc, 1792	<i>Fopius arisanus</i>	Sonan, 1932
<i>Aphelonix kordestanica</i>	Melika 2010	<i>Fraxinus</i>	Linnaeus, 1753
<i>Aphelonix persica</i>	Stone, Sadeghi & Pujade-Villar, 2004	<i>Fraxinus excelsior</i>	Linnaeus, 1753
<i>Aphidius ervi</i>	Haliday, 1834	<i>Glechoma hederacea</i>	Linnaeus, 1753
<i>Aphidius rhopalosiphii</i>	DeStefani, 1902	<i>Glyphomerus stigma</i>	Fabricius, 1973
<i>Aretozymus</i>	Zavada, 2003	<i>Hieracium</i>	Linnaeus, 1753
<i>Asphondylia borrichiae</i>	Rossi & Strong, 1990	<i>Hylesinus fraxini</i>	Panzer, 1779
<i>Aulacidea hieracii</i>	Linnaeus, 1758	<i>Chilaspis nitida</i>	Giraud, 1859
<i>Bayeria capitigena</i>	Bremi, 1847	<i>Ichneumon</i>	Linnaeus, 1758
<i>Betula pendula</i>	Roth	<i>Iva frutescens</i>	Linnaeus, 1753
<i>Biorhiza pallida</i>	Olivier, 1791)	<i>Iva imbricata</i>	Walter, 1788
<i>Bootanomyia dorsalis</i>	Fabricius, 1978	<i>Lariophagus distinguendus</i>	Foster, 1841
<i>Borrchia frutescens</i>	Linnaeus 1753	<i>Lasioptera carophila</i>	1874
<i>Callimomus</i>	Thmson, 1876	<i>Lasioptera rubi</i>	nk, 1803
<i>Callosobruchus maculatus</i>	Fabricius, 1775	<i>Lioterphus</i>	Thomson, 1876
<i>Carduus</i>	Linnaeus, 1753	<i>Liposthnes glechomae</i>	Linnaeus, 1758
<i>Carex</i>	Linnaeus, 1753	<i>Nasonia vitripennis</i>	Walker, 1836
<i>Copidosoma floridanum</i>	Ashmead, 1900	<i>Neuroterus lanuginosus</i>	Giraud, 1859
<i>Crataegus laevigata</i>	Poir. In. Lam.	<i>Neuroterus saliens</i>	Kollar, 1857
<i>Cynips longiventris</i>	Hartig, 1840	<i>Picea abies</i>	Linnaeus, 1753
<i>Cynips quercusfolii</i>	Linnaeus, 1758	<i>Pimpinella saxifraga</i>	Linnaeus, 1753
<i>Dasineura urticae</i>	Perris, 1840	<i>Podagrion pachymerum</i>	Walker, 1833
<i>Diomorus</i>	Walker, 1843	<i>Populus tremula</i>	Linnaeus, 1753
<i>Diomorus armatus</i>	Boheman, 1843	<i>Praon volucre</i>	Haliday, 1833
<i>Diomorus cupreus</i>	Spinola, 1808	<i>Pseudotorymus sapphyrinus</i>	Fonscolombe, 1832
<i>Diomorus orientalis</i>	Masi, 1926	<i>Pteromalus</i>	Swederus, 1795
<i>Diplolepis rosae</i>	Linnaeus, 1758	<i>Quercus</i>	Linnaeus, 1753
<i>Dryocosmus curiphilus</i>	Yasumatsu, 1951	<i>Quercus brantii</i>	Lindley
<i>Ecdamua</i>	Walker, 1862	<i>Quercus conspera</i>	
<i>Eridontomerus arrabonicus</i>	Erdös, 1954	<i>Quercus infectoria</i>	Olivier

<i>Quercus robur</i>	Linnaeus, 1753	<i>Torymus cupreus</i>	Spinola, 1808
<i>Rabdophaga strobiloides</i>	Sacken, 1832	<i>Torymus cyaneus</i>	Walker, 1847
<i>Rosa canina</i>	Linnaeus, 1753	<i>Torymus cyprianus</i>	Graham & Gijswijt, 1998
<i>Salix bebbiana</i>	Sargent	<i>Torymus dasyneurae</i>	Huber, 1927
<i>Salix cinerea</i>	Linnaeus, 1753	<i>Torymus denticulatus</i>	Breland, 1939
<i>Salix eriocephala</i>	Michx.	<i>Torymus druparum</i>	Boheman, 1843
<i>Semudobia</i>	Kieffer, 1913	<i>Torymus elegantissimus</i>	Ashmead, 1881
<i>Sitophilus</i>	Schönherr, 1838	<i>Torymus erucarum</i>	Schrank, 1781
<i>Sphecodes</i>	Latreille, 1805	<i>Torymus eurytomae</i>	Puzanowa-Malysheva, 1936
<i>Stegobium paniceum</i>	Linnaeus, 1758	<i>Torymus evansi</i>	Grissel, 2004
<i>Torymoides kiesenwetteri</i>	Mayr, 1874	<i>Torymus fagi</i>	Hoffmeyer, 1930
<i>Torymus</i>	Dalman, 1820	<i>Torymus fagineus</i>	Graham, 1994
<i>Torymus advenus</i>	Osten-Sacken, 1870	<i>Torymus fagopirum</i>	Provancher, 1881
<i>Torymus aea</i>	Walker, 1836	<i>Torymus fastuosus</i>	Boheman, 1834
<i>Torymus affinis</i>	Fonscolombe, 1832	<i>Torymus favardi</i>	Steffan, 1962
<i>Torymus amurensis</i>	Walker, 1836	<i>Torymus filipendulae</i>	Graham & Gijswijt, 1998
<i>Torymus angelicae</i>	Walker, 1836	<i>Torymus fisheri</i>	Ruschka, 1921
<i>Torymus anthomyidae</i>	Ashmead, 1887	<i>Torymus flaavicoxa</i>	Osten-Sacken, 1870
<i>Torymus apimyiae</i>	Bouček & Mihajovič, 1986	<i>Torymus flavipes</i>	Walker, 1833
<i>Torymus arcticus</i>	Thomson, 1876	<i>Torymus flavovariiegatus</i>	Gijswijt, 1990
<i>Torymus armatus</i>	Boheman, 1843	<i>Torymus formosus</i>	Walker, 1833
<i>Torymus arundinis</i>	Walker, 1833	<i>Torymus frankei</i>	Grissel, 1973
<i>Torymus atheatus</i>	Grissel, 1976	<i>Torymus fullawayi</i>	Huber, 1927
<i>Torymus aucupariae</i>	Rodzianko, 1908	<i>Torymus fuscicornis</i>	Walker, 1833
<i>Torymus auratus</i>	Muller, 1764	<i>Torymus gracilior</i>	Graham, 1994
<i>Torymus austriacus</i>	Graham, 1994	<i>Torymus grahami</i>	Bouček, 1994
<i>Torymus axilaris</i>	Ashmead, 1894	<i>Torymus hederæ</i>	Walker, 1883
<i>Torymus azureus</i>	Boheman, 1843	<i>Torymus heyeri</i>	Wachtl, 1883
<i>Torymus basalis</i>	Walker, 1833	<i>Torymus hylesini</i>	Graham, 1994
<i>Torymus baudysi</i>	Bouček, 1954	<i>Torymus chloromerus</i>	Walker, 1833
<i>Torymus bedeuarius</i>	Linnaeus, 1758	<i>Torymus chrysocephalus</i>	Boheman, 1834
<i>Torymus beneficus</i>	Yasumatsu & Kamijo, 1979	<i>Torymus iacchos</i>	Zavada, 2001
<i>Torymus brevicoxa</i>	Zavada, 2001	<i>Torymus igniceps</i>	Mayr, 1874
<i>Torymus calcaratus</i>	Nees, 1834	<i>Torymus impar</i>	Rondani, 1877
<i>Torymus californicus</i>	Ashmead, 1886	<i>Torymus imperatrix</i>	Graham & Gijswijt, 1998
<i>Torymus capite</i>	Huber, 1927	<i>Torymus juniperi</i>	Linnaeus, 1758
<i>Torymus caudatus</i>	Boheman, 1843	<i>Torymus koebelei</i>	Huber, 1927
<i>Torymus cecidomyidae</i>	Walker, 1844	<i>Torymus konovovae</i>	Zerova & Seregina, 1991
<i>Torymus cerri</i>	Mayr, 1874	<i>Torymus laetus</i>	Walker, 1883
<i>Torymus cingulatus</i>	Nees, 1834	<i>Torymus lampros</i>	Graham, 1994
<i>Torymus coccineus</i>	Huber, 1927	<i>Torymus longicalcar</i>	Graham, 1994
<i>Torymus confinis</i>	Walker, 1833	<i>Torymus macrurus</i>	Förster, 1859

<i>Torymus microcerus</i>	Walker, 1833	<i>Torymus solidaginis</i>	Huber, 1927
<i>Torymus micrurus</i>	Bouček, 1994	<i>Torymus speciosus</i>	Boheman, 1874
<i>Torymus nemorum</i>	Bouček, 1994	<i>Torymus stenus</i>	Graham, 1994
<i>Torymus neuroterus</i>	Ashmead, 1887	<i>Torymus subcalifornicus</i>	Grissel, 1976
<i>Torymus nitidulus</i>	Walker, 1883	<i>Torymus sulcatus</i>	Huber, 1927
<i>Torymus nobilis</i>	Boheman, 1834	<i>Torymus tatiana</i>	Zavada, 2001
<i>Torymus notatus</i>	Walker, 1833	<i>Torymus terentius</i>	Zavada, 2001
<i>Torymus obscurus</i>	Breland, 1939	<i>Torymus texanus</i>	Hoffmeyer, 1930
<i>Torymus osborni</i>	Huber, 1927	<i>Torymus thalassinus</i>	Crosby, 1908
<i>Torymus poae</i>	Hoffmeyer, 1930	<i>Torymus tipularium</i>	Zetterstedt, 1838
<i>Torymus prunicola</i>	Huber, 1927	<i>Torymus triangularis</i>	Thomson, 1876
<i>Torymus pulchellus</i>	Thomson, 1876	<i>Torymus tubicola</i>	Osten-Sacken, 1870
<i>Torymus pulcher</i>	Bouček, 1996	<i>Torymus umbilicatus</i>	Gahan, 1919
<i>Torymus quercinus</i>	Boheman, 1834	<i>Torymus varians</i>	Walker, 1833
<i>Torymus regalis</i>	Walker, 1833	<i>Torymus ventralis</i>	Fonscolombe, 1832
<i>Torymus roboris</i>	Walker, 1834	<i>Torymus veronicae</i>	Ruschka, 1921
<i>Torymus rubi</i>	Schrank, 1781	<i>Torymus wachtiellae</i>	Graham & Gijswijt, 1998
<i>Torymus salicis</i>	Graham, 1994	<i>Torymus warreni</i>	Cockerell, 1911
<i>Torymus scalaris</i>	Huber, 1927	<i>Trichogramma evanescens</i>	Westwood, 1833
<i>Torymus scandicus</i>	Graham & Gijswijt, 1998	<i>Urtica dioica</i>	Linnaeus, 1753
<i>Torymus scaposus</i>	Thomson, 1876	<i>Verbascum sp.</i>	Linnaeus, 1753
<i>Torymus scutellaris</i>	Walker, 1833	<i>Wachtiella rosarum</i>	Hardy, 1850
<i>Torymus sinensis</i>	Kamijo, 1982		
<i>Torymus socius</i>	Mayr, 1874		

9.2. Tabulka vzorků v této práci

Tabulka 1: Souhrnná tabulka všech vzorků použitých v této práci, s uvedenými hodnotami průměru oviposito indexu, který je zaokrouhlený na dvě desetinná místa. Nově použité vzorky jsou označeny „YY“, mnou osekvenované vzorky pak tučně; (kódy genů – 18SD - a, 28SD2 -3- b, 28SD3-5 - c, EF-1α - d, LCOHCO - e, JerryPat - f, CytB - h

Unikátní kód jedince	Rod	Druh	Genové úseky	Lokalita	Hostitel	Hostitelská rostlina	Průměr OI	Poznámky
BAK_101	Torymus	geranii	beh	Iran	Andricus multiplicatus	Quercus sp.	3	
BAK_102	Torymus	affinis	beh	Iran	Aphelonix persica/kordestanica	Quercus sp.	5	
BAK_103	Torymus	geranii	be	Iran	Neuroterus saliens	Quercus brantii	3	
BAK_104	Torymus	geranii	be	Iran			3	
BAK_110	Torymus	varians	beh	Hungary			4,1	
BAK_120	Torymus	sp.	beh	Hungary			1,5	
BAK_121	Torymus	sp.	be	Hungary			1,5	
BAK_127	Torymus	varians	beh	Hungary		Crataegus laevita	4,1	
BAK_130	Torymus	ventralis	eh	Hungary			1	
BAK_134	Torymus	geranii	be	Hungary			3	
BAK_137	Torymus	ruschkai	eh	Hungary			1,7	
BAK_138	Torymus	chloromerus	beh	Hungary		Verbascum sp.	2,4	
BAK_139	Torymus	igniceps	beh	Hungary			3	
BAK_141	Torymus	fischeri	be	Hungary			1,85	
BAK_145	Torymus	ruschkai	be	Czech Republic			1,9	
BAK_152	Torymus	geranii	be	Iran	Neuroterus lanuginosus	Quercus brantii	3	
BAK_16	Torymus	chloromerus	beh	Hungary	Bayeria capitigena	Euphorbia cyparissias	2,4	
BAK_162	Torymus	auratus	be	Iran	Andricus quercustozae	Quercus infectoria	3,85	
BAK_163	Torymus	auratus	beh	Iran	Andricus quercustozae	Quercus infectoria	3,85	

BAK_164	Torymus	auratus	be	Iran	Andricus quercustozae	Quercus infectoria	3,85	
BAK_17	Diomorus	cupreus	be	Slovakia			1,3	Outgoup
BAK_174	Torymus	affinis	eh	Romania	Biorhiza pallida	Quercus sp.	5	
BAK_175	Torymus	affinis	beh	Romania	Biorhiza pallida	Quercus sp.	5	
BAK_18	Torymus	ventralis	beh	Slovakia			1	
BAK_193	Torymus	affinis	beh	France	Biorhiza pallida	Quercus sp.	4,75	
BAK_195	Torymus	sp.	beh	Austria	Alacidea hieracii	Hieracium sp.		
BAK_20	Torymus	impar	beh	Hungary	Rhabdophaga sp.	Salix sp.	4,25	
BAK_208	Torymus	geranii	beh	Iran	Neuroterus saliens	Quercus brantii	3	
BAK_23	Torymus	geranii	beh	Czech Republic	Chilaspis nitida		3	
BAK_24	Torymus	wachtliellae	beh	Czech Republic	Wachtliella rosarum	Rosa canina	3	
BAK_25	Torymus	wachtliellae	beh	Czech Republic	Wachtliella rosarum	Rosa canina	3	
BAK_27	Torymus	auratus	beh	Czech Republic	Andricus kollari	Quercus robur	3,85	
BAK_29	Torymus	socius	beh	Czech Republic	Lasioptera carophila	Pimpinella saxifraga	1,25	
BAK_30	Torymus	socius	beh	Czech Republic	Lasioptera carophila	Pimpinella saxifraga	1,25	
BAK_32	Torymus	hylesini	beh	Czech Republic	Hylesinus fraxinus	Fraxinus excelsior	4,75	
BAK_33	Torymus	rubi	beh	Czech Republic	Lasioptera rubi	Rubus sp.	2,25	
BAK_34	Torymus	caudatus	beh	Czech Republic			4	
BAK_35	Torymus	varians	beh	Czech Republic		Crataegus sp.	4,1	
BAK_38	Torymus	sp.	e	Croatia			1,25	
BAK_40	Torymus	ruschkai	e	Czech Republic			1,9	
BAK_41	Torymus	auratus	beh	Czech Republic	Cynips quercusfolii	Quercus robur	3,85	
BAK_45	Torymus	auratus	beh	Czech Republic	Andricus quercuscalicis	Quercus robur	3,85	
BAK_59	Torymus	veronicae	beh	Hungary			2,1	
BAK_60	Torymus	veronicae	beh	Hungary			2,1	
BAK_63	Torymus	igniceps	beh	Czech Republic			3	
BAK_65	Torymus	auratus	beh	Czech Republic	Cynips longiventris	Quercus robur	3,85	
BAK_66	Torymus	confinis	beh	Czech Republic	Dasineura urtica	Urtica dioica	1,5	

BAK_68	Torymus	impar	beh	Hungary	Rhabdophaga sp.	Salix sp.	4,25	
BAK_69	Torymus	chloromerus	beh	Austria	Bayeria capitigena	Euphorbia sp.	2,4	
BAK_70	Torymus	ventralis	beh	Czech Republic			1	
BAK_71	Torymus	fischeri	be	Czech Republic			1,85	
BAK_72	Torymus	igniceps	beh	Czech Republic			3	
BAK_74	Torymus	roboris	e	Czech Republic			2,6	
BAK_78	Torymus	caudatus	e	Czech Republic			4	
BAK_81	Torymus	notatus	bh	Spain	Cynipidae gen. Sp.	Quercus sp.	2,13	
BAK_82	Torymus	bedeguaris	beh	Serbia	Diplolepis rosae	Rosa sp.	2,04	
BAK_85	Torymus	philyreae	beh	France			3,85	
BAK_87	Torymus	varians	beh	Hungary			4,1	
BAK_88	Torymus	nobilis	beh	Hungary			2,1	
BAK_89	Torymus	chloromerus	beh	Hungary			2,4	
BAK_90	Torymus	cf. verbasci	beh	Czech Republic			2,08	
BAK_94	Torymus	stenus	beh	Czech Republic			1,45	
BAK_97	Torymus	arundinis	beh	Czech Republic			4	
BAK_98	Torymus	arundinis	beh	Czech Republic			4	
GDEL3029	Torymus	cf. austriacus	abcdf	France			1,58	
GDEL3033	Torymus	sp. Mercantour2	abcdef	France			2,3	
GDEL3035	Torymus	confinis	abcdef	France			1,5	
GDEL3037	Torymus	phillyreae	abcdef	France			1,65	
GDEL3038	Torymus	sp. Mercantour6	abcdef	France				
GDEL3039	Torymus	chloromerus	bcdef	France			2,4	
GDEL3040	Torymus	sp. Mercantour7	cdef	France				
GDEL3041	Torymus	sp. Mercantour9	abcdef	France				
GDEL3046	Torymoides	kiesenwetteri	abcdf	France				Outgroup
GDEL3047	Torymus	sp. Mercantour1	abcdef	France			2,3	
GDEL3049	Torymus	cf. chloromerus	acdef	France			2,8	
GDEL3051	Torymus	caudatus	abcdef	France			4	
GDEL3054	Torymus	sp. Mercantour14	abcdef	France			2,3	

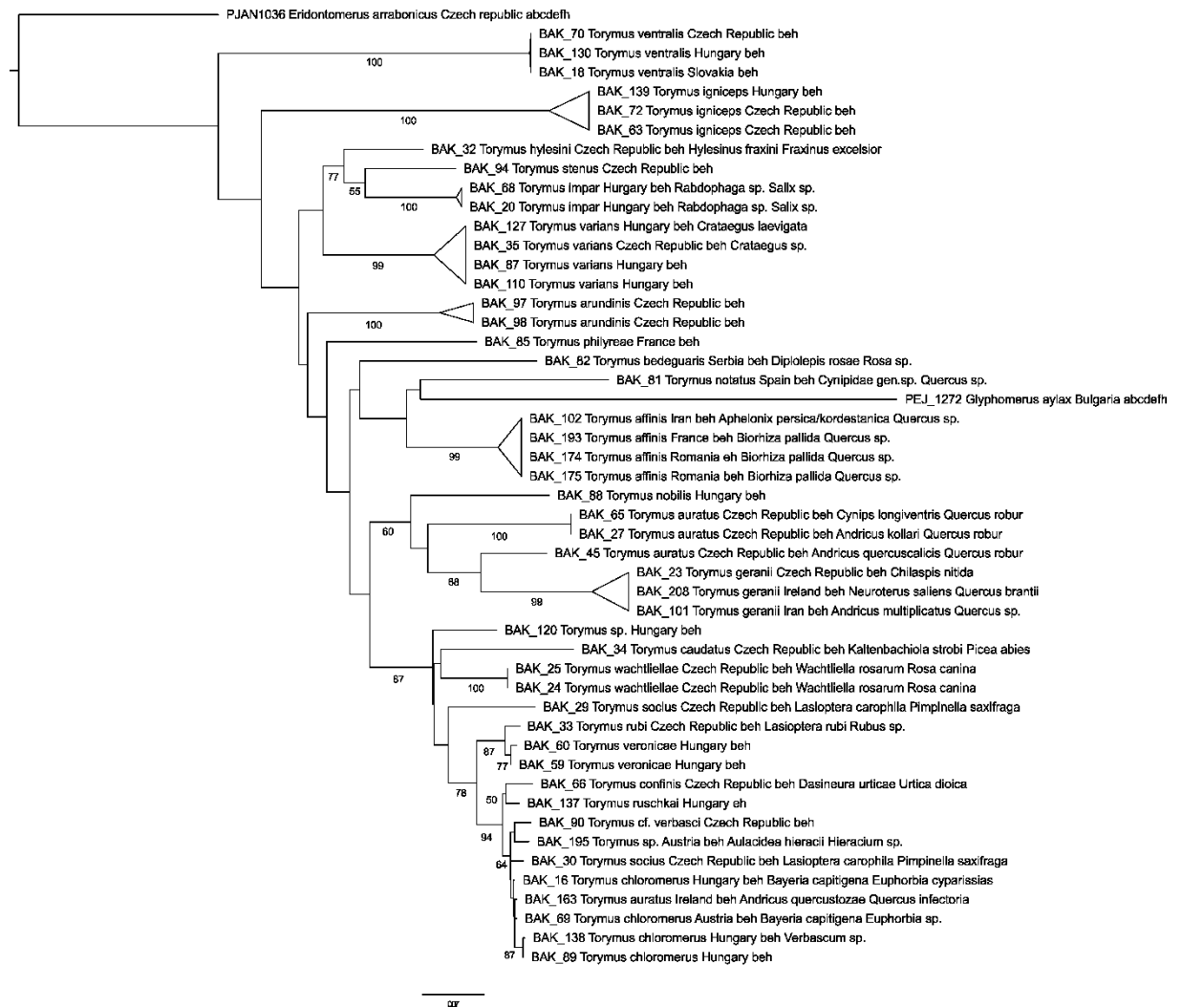
GDEL3055	Torymus	sp. Mercantour	abcdef	France			2,3	
GDEL3066	Torymus	fagineus	abcdef	France			2,33	
GDEL3067	Torymus	veronicae	abcdef	France			2,1	
GDEL3068	Torymus	cf. chloromerus	abcdef	France			2,8	
GDEL3070	Torymus	bedeguaris	abcdf	Czech Republic			2,04	
GDEL3071	Torymus	phillyreae	abcdef	France			1,65	
GDEL3072	Torymus	phillyreae	abcdef	France			1,65	
GDEL3079	Torymus	sp. Escalette	abcdef	France				
GDEL3082	Torymus	veronicae	acdef	France			2,1	
GDEL3083	Torymus	flavipes	abcdef	France			3	
GDEL3084	Torymus	flavipes	abcdef	France			3	
GDEL3085	Torymus	flavipes	abcdef	France			3	
GDEL3086	Torymus	flavipes	abcdf	France			3	
GDEL3087	Torymus	phillyreae	acdef	France			1,65	
GDEL3089	Torymus	phillyreae	abcdef	Austria			1,65	
GDEL3090	Torymus	stenus	abcdef	Italy			1,45	
GDEL3091	Torymus	ventralis	abcdef	Italy			1	
GDEL3092	Torymus	sp.	abcdef	Italy			1,55	
GDEL3093	Torymus	sp.	abcdef	Italy			1,55	
GDEL3094	Torymus	laetus	abcdef	Italy			1,8	
GDEL3095	Torymus	sp.	abcdef	Italy				
GDEL3098	Torymus	fischeri	abcdef	Italy			1,8	
GDEL3099	Torymus	sp.	abcdef	Italy			1,55	
GDEL3100	Torymus	laetus	abcdef	Italy			1,8	
GDEL3101	Torymus	stenus	abcdef	Italy			1,45	
GDEL3102	Torymus	sp.	abcdef	Italy			1,55	
GDEL3103	Torymus	hylesini	abcdef	Italy			4,75	
GDEL3106	Torymus	sp.2 Krnsko Jezero	abcdef	Slovenia				
GDEL3107	Torymus	ventralis	abcdef	Slovenia			1	

GDEL3108	Torymus	sp.1 Komna	abcdef	Slovenia				
GDEL3109	Torymus	sp.1 Soca River	abcdef	Slovenia				
GDEL3110	Torymus	ventralis	abcdef	Slovenia			1	
GDEL3111	Torymus	chloromerus	abcdef	Slovenia			2,4	
GDEL3112	Torymus	sp. Zadnjica Planja	abcdef	Slovenia			1,25	
GDEL3113	Torymus	sp. Ferlach	abcdef	Slovenia				
GDEL3114	Torymus	cf. flavipes	abcdef	France			3	
KRB_1	Torymus	cf. cingulatus	bcde	Czech Republic	Liposthnes glechomae	Glechoma hederacea	2,4	YY
KRB_17	Torymus	fagineus	bcde	Czech Republic			2,33	YY
KRB_18	Torymus	laetus	de	Czech Republic			1,8	YY
KRB_19	Torymus	laetus	e	Czech Republic			1,8	YY
KRB_23	Torymus	cf. cingulatus	de	Czech Republic	Liposthnes glechomae	Glechoma hederacea	2,4	YY
KRB_26	Torymus	nitidulus	bcd	Czech Republic			3	YY
KRB_27	Torymus	fuscicornis	bcd	Czech Republic			3	YY
KRB_29	Torymus	sp.1	bcde	Bulgaria			1,16	YY
KRB_3	Torymus	roboris	bcde	Czech Republic			2,6	YY
KRB_30	Torymus	sp.2	cde	Bulgaria			1,38	YY
KRB_31	Torymus	sp.2	de	Bulgaria			1,38	YY
KRB_35	Torymus	druparum	bcde	Czech Republic			4,1	YY
KRB_38	Torymus	sp.2	de	Czech Republic	Rhabdophaga salicis	Salix cinerea?	1,38	YY
KRB_39	Torymus	chloromerus	bcde	Czech Republic	Urophaga cardui	Carduus sp.	2,4	YY
KRB_4	Torymus	cf. confinis	bcde	Ukraine	Dasineura urtica	Urtica dioica	1,5	YY
KRB_42	Torymus	nitidulus	bcde	Czech Republic			3	YY
KRB_43	Torymus	rubi	de	Czech Republic	Lasioptera rubi	Rubus sp.	2,25	YY
KRB_44	Torymus	scandicus	de	Czech Republic	Rhabdophaga salicis	Salix sp.	1,9	YY
KRB_45	Torymus	cyaneus	bcde	Czech Republic	Cynips longiventris	Quercus robur	1,9	YY
KRB_47	Torymus	cf. chloromerus	de	Czech Republic	Aulacidea hieracii	Hieracium sp.	2,8	YY
KRB_48	Torymus	cf. curvatulus	de	Czech Republic	Rhabdophaga silicis	Salix cinerea	2,1	YY

KRB_49	Torymus	azureus	de	Czech Republic		Picea abies	4,1	YY
KRB_5	Torymus	affinis	de	Czech Republic	Biorhiza pallida	Quercus robur	5	YY
KRB_50	Torymus	scandicus	de	Czech Republic	Rhabdophaga salicis	Salix sp.	1,9	YY
KRB_53	Torymus	fuscicornis	bcde	Czech Republic		Betula sp.	3	YY
KRB_55	Torymus	micrurus	cde	Germany			0,7	YY
KRB_56	Torymus	basalis	bcd	Germany			1,35	YY
KRB_6	Torymus	nitidulus	e	Czech Republic		Betula pendula	3	YY
KRB_9	Torymus	fullawayi spec. gr.	bcde	Mexico	Amphibolis nr. hidalgoensis	Quercus conspera	4,2	YY
PEJ_1272	Glyphomerus	aylax	h	Bulgaria				Outgroup
PJ0028	Torymus	cf. confinis	abcde	Australia			1,5	
PJAN1022	Diomorus	orientalis	abcdef	India			2,5	Outgroup
PJAN1036	Eridontomerus	arrabonicus	h	Czech Republic				Outgroup
PJAN1038	Pseudotorymus	sapphyrinus	abcdef	Hungary				Outgroup
PJAN1043	Torymus	sp.	abcdef	Costa Rica				
PJAN1046	Torymus	sp.	abcdef	Costa Rica				
PJAN1058	Torymus	sp.	abcdef	French Guiana				
PJAN1074	Diomorus	cf. armatus	abcdef	India			2,5	Outgroup
PJAN1077	Torymus	splendens	abcdef	Canada				
PJAN1138	Torymus	sp.	abcdef	USA, Kansas				
PJAN1141	Torymus	sp.	abcdef	USA, Kansas				
PJAN1153	Physothorax	sp.3	abcde	Venezuela				Outgroup
PJAN1170	Physothorax	cf. bidentulus	abcdef	Guadeloupe				Outgroup
PJAN1172	Ecdamua	sp.2	abcdf	Cameroon				Outgroup
PJAN1187	Torymus	austriacus	abcdf	Russia			1,58	
PJAN1188	Torymus	cf. flavovariegatus	abce	Canada			1,05	
PJAN1192	Torymus	sp. laetus gr.	bcdef	Canada				
PJAN1203	Torymus	sp.	abcdf	USA				
PJAN1294	Diomorus	cupreus	bcdef	Iran			1,3	Outgroup

Tor 000133	Torymus	bedeguaris	e	Germany	Diplolepis rosae	Rosa sp.	2	
Tor 000273	Torymus	nobilis	e	Germany			2,1	
Tor_000274	Torymus	flavipes	e	Germany			3	
Tor 000280	Torymus	basalis	e	Germany			1,35	
Tor 000286	Torymus	nobilis	e	Germany			2,1	
Tor 000289	Torymus	memnonius	e	Peru				
Tor_000297	Torymus	basalis	e	Germany			1,35	
Tor_000299	Torymus	ventralis	e	Germany			1	
Tor 000317	Torymus	fuscicornis	e	Germany			3	
Tor 000327	Torymus	ventralis	e	Germany			1	
Tor 000331	Torymus	nobilis	e	Germany			2,1	
Tor 000333	Torymus	rubi	e	Germany			2,25	
Tor 000335	Torymus	rubi	e	Germany			2,25	
Tor 000338	Torymus	rubi	e	Germany			2,25	
Tor_000340	Torymus	flavipes	e	Hungary			3	
Tor 000341	Torymus	cf. chloromerus	e	Hungary			2,8	
Tor 000360	Torymus	tubicola gr. sp. 2	e	Honduras				
Tor 000363	Torymus	sp.	e	Honduras				
Tor_000370	Torymus	tubicola gr. sp. 1	e	Honduras				
Tor 000371	Torymus	tubicola gr. sp. 2	e	Honduras				
Tor 000378	Torymus	bedeguaris	e	Germany	Diplolepis rosae	Rosa sp.	2	

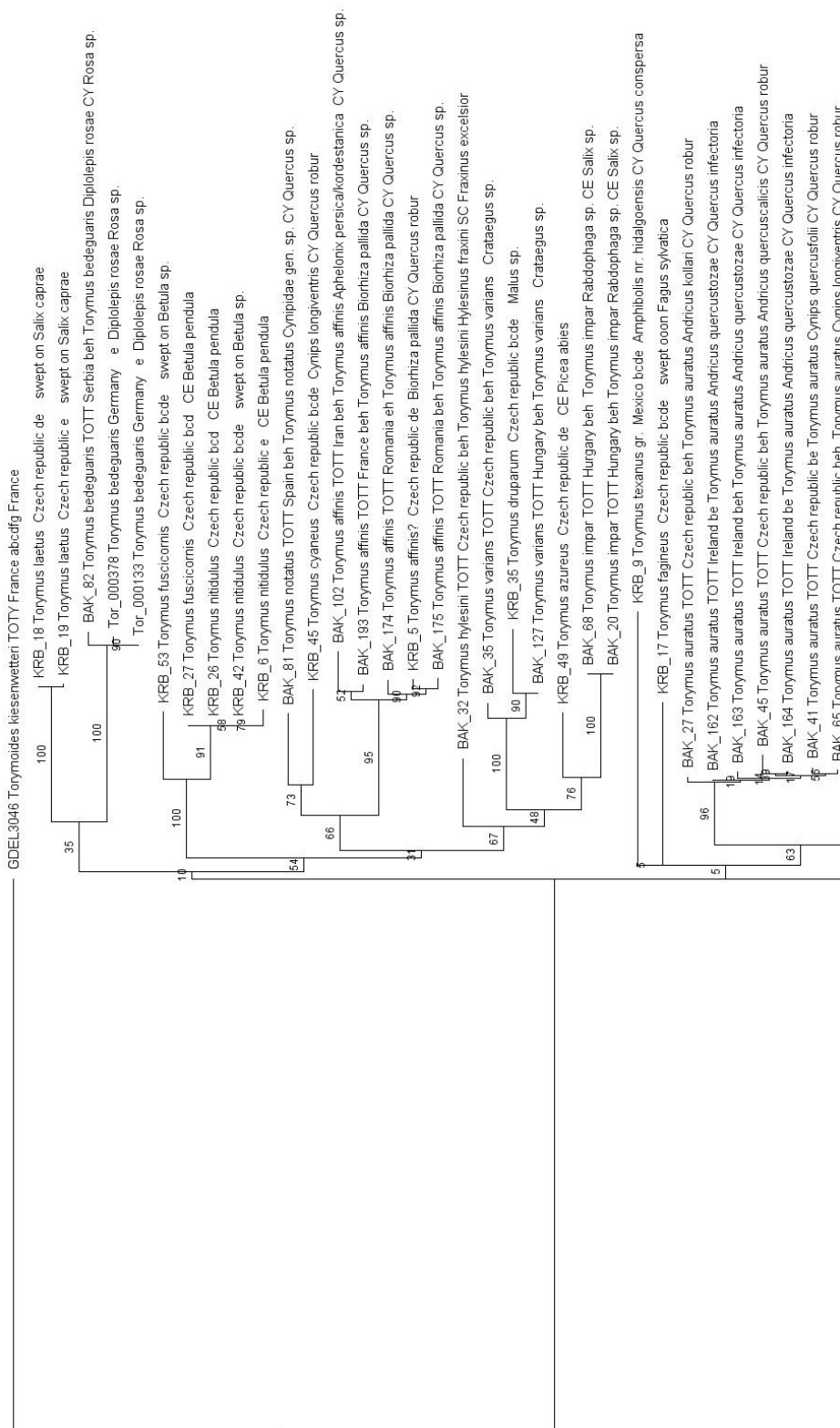
9.3. Doplnující fylogenetické stromy



Obrázek 1: Fylogenetický strom sestavený na základě mitochondriálního genu cytochrom b pro 50 jedinců, topologie je získána metodou Maximum likelihood a na stomě jsou vyznačeny hodnoty bootstrap.



Obrázek 2: Fylogenetický strom sestavený na základě genu cytochrom b metodou MrBayes pouze pro 50 jedinců.



Obrázek 3-a: První část fylogenetického stromu, který zahrnoval jen zástupce s jasnou hostitelskou asociací (tzn. vylíhnutých 65 jedinců). Byl sestaven na základě dvou genů 28 SD-2-3 a cytochrom oxidázy I metodou Maximum likelihood.

9.4. Seznam zkratek

°C	Stupeň celsia
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitr
18SDrDNA	Ribosomální podjednotka 18S rDNA
28 SD2-3 rDNA	Velká ribosomální podjednotka 28S rDNA, segment D2-3
28 SD4-5 rDNA	Velká ribosomální podjednotka 28S rDNA, segment D4-5
AHE	Anchored Hybrid Enrichment
bp	Base pair
COI	Podjednotka I cytochrom oxidázy
CytB	Cytochrom B
ddH ₂ O	Dvakrát destilovaná voda
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EF	Elongation factor
ES	Escape and raaiate
EtOH	Ethanol
GTRCAT	General time reversible model nukleotidových záměn
mA	Miliampér
MC	Musical chair hypothesis
MgCl ₂	Chlorid hořečnatý
ml	Mililitr
ML	Maximum likelihood
OH	Oscillation hypothesis
OI	Ovipositor index
PCR	Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PP	Posterior probability
rpm	Revolutions per minute, otáčky za minutu
SD	Specialization by drift
SS	Serial specialization
TBE	Tris-borate-EDTA pufr
UCE	Ultraconserved Elements
UV	Ultrafialové záření
V	Volt