

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Štefan Balog

Molekulárně genetická proměnlivost netopýrů rodu *Hypsugo* v západní Palearctidě

Molecular genetic variability of bats of the genus *Hypsugo* in the Western Palearctic

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Petr Benda, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Marek Uvizi

Praha 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci na téma „Molekulárně genetická proměnlivost netopýrů rodu *Hypsugo* v západní Palearktidě“ vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4. 1. 2023

.....

Poděkování:

Nejprve bych rád poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Petru Bendovi, Ph.D., který tuto práci vedl a svými radami a návrhy značně přispěl k úspěšnému sepsání této práce.

Dále bych rád poděkoval svému konzultantovi Mgr. Markovi Uvizlovi, který mě zasvětil do práce v laboratoři a celou dobu na mě dohlížel. Moje poděkování patří i Mgr. Evě Kyralové a Mgr. Tereze Doulíkové, které mi v laboratoři poskytovaly cenné rady. Poděkovat bych chtěl také všem, kteří poskytli materiál pro tuto práci.

Nakonec bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za nesmírnou podporu, která mi pomohla dokončit tuto práci.

Abstrakt:

V západní Palearktidě se vyskytují tři druhy rodu *Hypsugo*. Druh *Hypsugo arabicus* se podle dostupných zdrojů vyskytuje pouze ve dvou oblastech, na jihu Íránu (provincie Sístán a Balúčistán) a na severovýchodě Ománu. Areál *Hypsugo ariel* lemuje západ Arabského poloostrova a lze ho také nalézt v Egyptě a Súdánu. Poslední druh, *Hypsugo savii* můžeme nalézt v širokém spektru oblastí od Kanárských ostrovů přes západní, střední a jižní Evropu, Balkán až po Blízký východ a Střední Asii. Vnitrodruhové a mezidruhové vztahy těchto tří druhů nebyly dosud v dostatečné míře zkoumány. Na základě dat získaných sekvencí mitochondriálních a jaderných markerů byla provedena fylogenetická analýza, která doplňuje informace o vnitrodruhových a mezidruhových vztazích populací tohoto rodu v západní Palearktidě. Pro molekulární analýzu byly použity dva mitochondriální markery (Cyt-*b* a D-loop) a čtyři jaderné markery (Rag2 a introny ACOX, COPS, STAT). Následně byly ve fylogenetické analýze použity metody Bayesovské analýzy a metoda Maximum likelihood pro vytvoření fylogenetických stromů. Dále byly vytvořeny haplotypové sítě a byly spočítány p-distance mezi jednotlivými populacemi.

U druhu *H. arabicus* byla na základě analýzy mitochondriálního genu pro cytochrom *b* zjištěna značná genetická divergence mezi populacemi Íránu a Ománu. Íránské populace se od ománských lišily hodnotami nekorigované p-distance 3,74–4,78 %, což by mohlo naznačovat oddělení íránských populací na úrovni poddruhu. U druhu *H. ariel* byla analýzou mitochondriálního genu pro cytochrom *b* zjištěna výrazná genetická diverzita u populací z Egypta, které se od ostatních populací z Jemenu, Ománu a Jordánska lišily hodnotami nekorigované p-distance 6,07–6,54 %, což by mohlo naznačovat oddělení egyptských jedinců na úrovni samostatného taxonu. Tyto dvě hypotézy v rámci analýzy potvrdil i konkatenovaný fylogenetický strom celé matrix. U druhu *H. savii* byly analýzou dostupných vzorků ze západní Palearktidy vymezeny tři hlavní linie. První linie zahrnuje španělské populace *H. savii*, čtyři vzorky ze Švýcarska a jeden ze Slovinska. Druhá linie zahrnuje populace z Maroka, Itálie, Švýcarska, Slovinska, Maďarska, Rakouska a České republiky. Třetí linie zahrnuje populace Balkánského poloostrova a Blízkého východu. Tato linie se následně rozdělila na dvě sublinie, které ale měly mezi sebou rozdíl maximálně do 2 %. Tři hlavní linie se od sebe lišily hodnotami nekorigovaných p-distancí o více jak 8 %. Tyto tři linie by mohly na základě analýzy zastupovat tři poddruhy *H. savii*. Pro objasnění této hypotézy je ale potřeba důkladnější studie, která bude zahrnovat zástupce *H. savii* ze všech lokalit západní Palearktidy, kde byl dosud *H. savii* zaznamenán.

Všechny tři zkoumané druhy se jasně oddělili v rámci rodu *Hypsugo*, což potvrdily analýzy všech markerů.

Klíčová slova: Chiroptera, *Hypsugo*, západní Palearktida, molekulárně genetická analýza

Abstract:

Three species of the genus *Hypsugo* occur in the Western Palearctic. According to available sources, the species *Hypsugo arabicus* occurs only in the south of Iran (provinces of Sistan and Baluchistan) and in the northeast of Oman. The range of *Hypsugo ariel* lines the west of the Arabian Peninsula and can be also found in Egypt and Sudan. *Hypsugo savii* can be found in a wide range of areas from the Canary Islands through Western, Central and Southern Europe, the Balkans to the Middle East and Central Asia. The intraspecific and interspecific relationships of these three species have not yet been sufficiently investigated. Based on the data obtained from the sequences of mitochondrial and nuclear markers, a phylogenetic analysis was performed, which supplements the information on the intraspecific and interspecific relationships of the populations of this genus in the Western Palearctic. Two mitochondrial markers (Cyt-*b* and D-loop) and four nuclear markers (Rag2 and ACOX, COPS, STAT introns) were used for molecular analysis. Subsequently, Bayesian analysis methods and the Maximum likelihood method were used in the phylogenetic analysis to create phylogenetic trees. Furthermore, haplotype networks were created and p-distances between individual populations were calculated.

In the species *H. arabicus*, significant genetic divergence between the populations of Iran and Oman was detected based on the analysis of the mitochondrial gene for cytochrome *b*. The Iranian populations differed from the Omani ones with uncorrected p-distance values of 3.74–4.78 %, which could indicate separation of the Iranian populations at the subspecies level. In the species *H. ariel*, analysis of the mitochondrial cytochrome *b* gene revealed significant genetic diversity among populations from Egypt, which differed from other populations from Yemen, Oman, and Jordan by uncorrected p-distance values of 6.07–6.54%, which could indicate separation Egyptian individuals at the level of a separate taxon. These two hypotheses were also confirmed by the concatenated phylogenetic tree of the entire matrix within the analysis. In the species *H. savii*, three main lineages were defined by the analysis of the available samples from the Western Palearctic. The first line included Spanish populations of *H. savii*, four samples from Switzerland and one from Slovenia. The second lineage included populations from Morocco, Italy, Switzerland, Slovenia, Hungary, Austria and the Czech Republic. The third lineage included the populations of the Balkan Peninsula and Middle East. This line was subsequently divided into two sublimes, which, however, had a maximum difference of 2 % between them. The three main lines differed from each other in uncorrected p-distance values by more than 8 %. Based on the analysis, these three lineages could represent three subspecies of *H. savii*. However, to clarify this hypothesis, a more thorough study is needed, which will include bats of *H. savii* from all localities of the Western Palearctic, where *H. savii* has been recorded so far. All three examined species were clearly separated within the genus *Hypsugo*, which was confirmed by all marker analyses.

Key words: Chiroptera, *Hypsugo*, Western Palearctic, molecular genetic analysis

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Čeleď Vespertilionidae.....	2
1.2. Vymezení rodu <i>Hypsugo</i> Kolenati, 1856	5
1.3. <i>Hypsugo savii</i> (Bonaparte, 1837)	8
1.4. <i>Hypsugo arabicus</i> (Harrison, 1979)	16
1.5. <i>Hypsugo ariel</i> (Thomas, 1904).....	20
2. Cíle práce.....	25
3. Materiál a metody.....	26
3.1. Materiál	26
3.2. Molekulární analýza	27
3.2.1. Izolace DNA.....	27
3.2.2. Amplifikace DNA	27
3.2.2. Elektroforéza	34
3.2.3. Purifikace.....	35
3.2.4. Sekvence a alignmenty	35
3.3. Fylogenetické analýzy	36
3.3.1. Maximum likelihood (ML).....	36
3.3.2. Bayesovská analýza (BA).....	37
3.3.3. P-distance	38
3.3.4. Haplotypové sítě.....	38
3.4. Zkratky	39
4. Výsledky.....	41
4.1. Molekulární analýza	41
4.2. Fylogenetická analýza	42
4.2.1. Mitochondriální DNA	42
4.2.2. Jaderná DNA	53
4.2.3. Celková matrix	69
4.2.4. Haplotypové sítě.....	71
5. Diskuse	77
5.1. <i>Hypsugo arabicus</i>	78
5.2. <i>Hypsugo ariel</i>	80
5.3. <i>Hypsugo savii</i>	82
6. Závěr.....	87
7. Literatura	89
Přílohy	97

1. Úvod

Molekulárně genetická analýza slouží k poznání genetické informace a může napomoci při studiu příbuzenských vztahů mezi jednotlivými organismy, kdy se porovnávají různé sekvence stejných genů, podobně jako se porovnávají morfologické znaky ve studiu morfologie. V současné době navíc platí pravidlo, že pokud má mít systematická studie dostatečnou vypovídající hodnotu, je nezbytné, aby kombinovala výsledky jak morfologické, tak i molekulárně genetické analýzy.

Řád letounů (Chiroptera) je evolučně velmi úspěšnou skupinou, která zahrnuje přibližně čtvrtinu všech savčích druhů a patří k nejkompexněji zkoumaným skupinám savců (Horáček et al. 2000). Letouni zahrnují více než 1400 známých druhů netopýrů a jsou tak druhým největším řádem savců po hlodavcích. Letouni jsou v rámci třídy savců velmi unikátní svou schopností letu, echolokace a také širokým spektrem potravních strategií, které jim umožnily uspět a rozšířit se téměř po celém světě (Fenton et Simmons 2015). Horáček et al. (2000) uvedli, že v Palearktické oblasti můžeme najít celkem 109 druhů netopýrů z 25 rodů a 8 čeledí.

Rod *Hypsugo* Kolenati, 1856 je v rámci morfologie jednotlivých druhů popsán celkem obstojně. Ačkoliv byl rod *Hypsugo* v minulosti často označován jako podrod rodu *Pipistrellus*, dnes je díky datům z více morfologických a molekulárně genetických analýz samostatným rodem, který patří do největší čeledi letounů s názvem Vespertilionidae Gray, 1821.

V minulosti bylo provedeno několik molekulárně genetických studií, ve kterých figuroval rod *Hypsugo*. Problém je ale ten, že v mnoha případech bylo v těchto studiích zastoupeno málo jedinců tohoto rodu, nebo byl použit pouze jeden molekulární marker. Tato práce si tak dává za cíl podrobit tři druhy rodu *Hypsugo* ze západní Palearktidy molekulárně genetické analýze, která by mohla následně pomoci rozšířit znalosti o evoluci, stejně jako výskytu a historii osídlování areálu, což by mohlo vést k důsledkům jak v systematice a taxonomii, tak i v ochraně těchto populací.

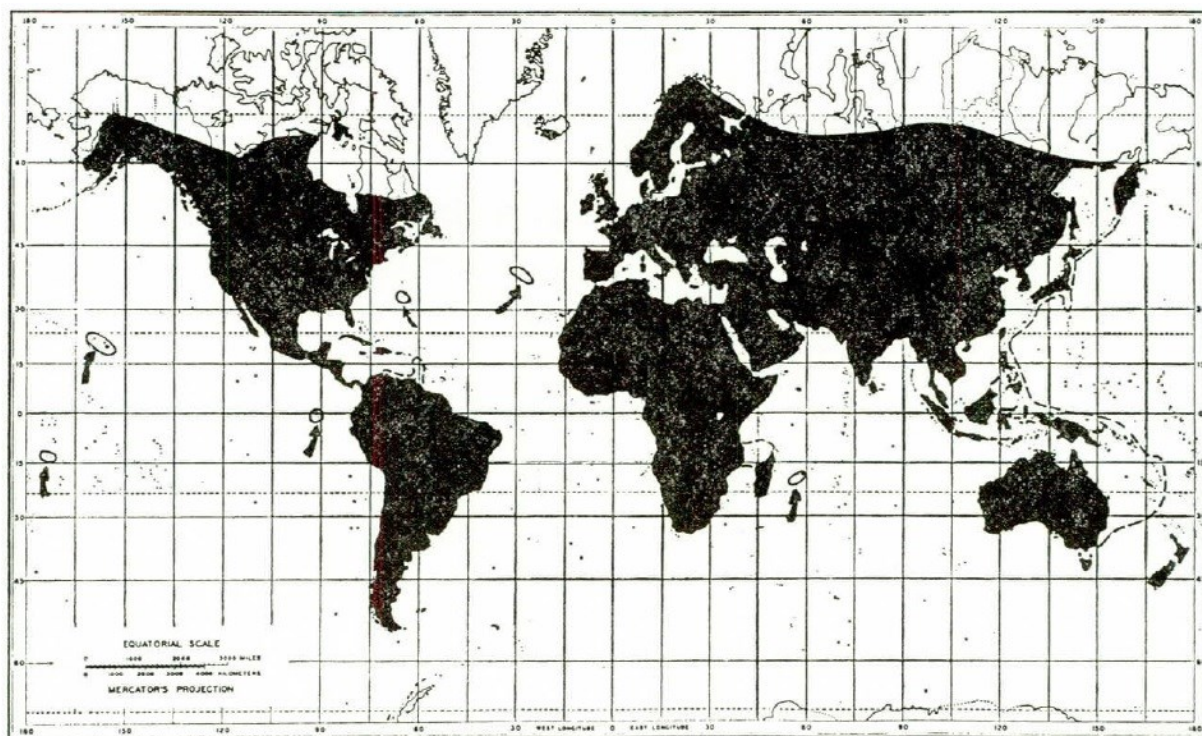
1.1. Čeleď Vespertilionidae

Řád Chiroptera Blumenbach, 1779 (letouni) se v minulosti dělil na dva podřády, Megachiroptera (kaloňi) a Microchiroptera (netopýři). Toto rozdělení bylo založeno na morfologických znacích, na laryngeálním typu echolokace u netopýrů (Microchiroptera) a na zvýšené vizuální orientaci u kaloňů (Megachiroptera) (Springer et al. 2001).

Dnes se řád Chiroptera dělí na podřády, na Yinpterochiroptera Springer, Teeling, Madsen, Stanhope et de Jong, 2001 a Yangochiroptera Koopman, 1984. Do podřádu Yinpterochiroptera dnes řadíme nadčeledi Pteropodoidea Gray, 1821 a Rhinolophoidea Gray, 1825. Podřád Yangochiroptera zahrnuje celkem tři nadčeledi. První nadčeleď je Noctilionoidea Gray, 1821, druhá nadčeleď nese název Emballonuroidea Gervais, 1855 a třetí nadčeleď jsou Vespertilionoidea Gray, 1821, do nichž kromě čeledi Cistugidae Lack, Roehrs, Stanley, Ruedi, Van Den Bussche, 2010, Miniopteridae Dobson, 1875, Molossidae Gervais, 1856, Natalidae Gray, 1866, řadíme i čeleď Vespertilionidae Gray, 1821 (Teeling et al. 2002, Simmons 2005, Teeling et al. 2005).

Do čeledi Vespertilionidae, která je největší čeledí letounů, je v současné době řazeno bezmála 500 druhů v 54 rodech. Čeleď Vespertilionidae se rozděluje do čtyř podčeledí, z nichž největší je Vespertilioninae Gray, 1821, která zahrnuje celkem 292 druhů ve 47 rodech. Dalšími třemi podčeleděmi jsou Kerivoulinae Miller, 1907, Murininae, Miller, 1907 a Myotinae Tate, 1942. Podčeleď Vespertilioninae se také rozděluje do několika tribů. Největším tribem je s 89 druhy ve 14 rodech Vespertilionini Gray, 1821, do kterého náleží i rod *Hypsugo* Kolenati, 1856 (Moratelli et al. 2019).

Rozšíření této čeledi je kosmopolitní. Nejen, že se objevuje na všech kontinentech kromě Antarktidy (viz obr. 1), rozšířila se i na mnohé oceánské ostrovy, jako jsou Bermudy, Azory, Galapágy nebo Nový Zéland. Ačkoliv je rozmanitost čeledi Vespertilionidae více patrná v teplejších oblastech světa, dokázala se tato čeleď udržet v podstatě všude tam, kde je dostatek vegetace pro udržení dostatečné hladiny výskytu hmyzu jako potravy. Jako jedna z mála čeledí si osvojila schopnost hibernace, která je nezbytná pro přežití v temperátních oblastech. Jedinými oblastmi, kam tato čeleď nedoputovala, jsou polární oblasti a většina tichomořských ostrovů (Rosevar 1965, Koopman 1970).



Obr. 1 Areál rozšíření čeledi Vespertilionidae (převzato z Koopman 1970).

Mnoho druhů vyhledává jako úkryt temné jeskyně, průrvy a pukliny, ve kterých je stabilní prostředí, jiné druhy využívají jako svůj úkryt lidská obydlí (Koopman 1970, Gaisler 2001, Reiter et al. 2010a, Jahelková et al. 2014). Netopýři z rodu *Tylonycteris* Peters, 1872 pro změnu vyhledávají úkryt v bambusových stvolech (Medway et Marshall 1972) a *Afronycteris nana* (Peters, 1852) se ukrývá mezi listy banánovníku (LaVal et LaVal 1977).

V rámci čeledi Vespertilionidae existuje velká morfologická variabilita. Obecně se jedná o menší netopýry, s průměrnou velikostí hlavy a těla (bez ocasu) 30–130 milimetrů a hmotností 4–80 gramů v závislosti na druhu. Hmotnost největšího zástupce, *Scotophilus nigrita* (Schreber, 1774) může dosahovat 88–91 gramů (Moratelli et al. 2019). Nejmenší druhy pocházejí z rodů *Pipistrellus* Schreber, 1774, *Hypsugo* Kolenati, 1856 nebo *Myotis* Kaup, 1829. Jedná se například o druh *Pipistrellus nanulus* Thomas, 1904, který má hmotnost 4–7 gramů nebo *Hypsugo musciculus* (Thomas, 1913) s hmotností 3–8 gramů (Monadjem et al. 2021).

I když je rozpětí velikosti široké, jsou tu morfologické aspekty, které většina zástupců této čeledi sdílí. Nejčastěji se tyto netopýři vyznačují jednoduchým obličejem, který postrádá výrůstky na nosu. Oči jsou převážně malé, stejně jako tragus. Většina druhů této čeledi má jednoduché zbarvení, které se pohybuje ve škále od černé, po hnědou až světle šedou

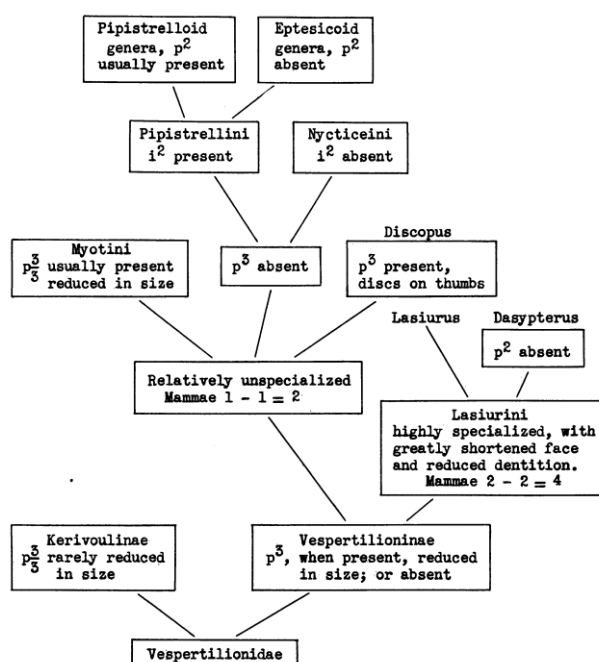
(Miller 1907, Koopman 1994). V takto velké čeledi najdeme ale i výjimky, jako například zbarvení *Lasiurus borealis* (Müller, 1776), který má rezavou až hnědou srst, díky které se dokáže maskovat na stromech a mást tak predátory (Shump et Shump 1982). U většiny zástupců je také samice větší než samec, což je, podle mnoha vědců, proto, aby se v samicích mohly plody dobře vyvíjet. Čím větší tělo samice má, tím více tuku může ukládat, a tím si zajistit dostatek energie na jaře, kdy není jistá dostupnost potravy a blíží se čas porodů (Yalden et Morris 1975, Myers 1978, Williams et Findley 1979).

Reprodukční biologie této čeledi není nijak výrazně rozmanitá. Obecně se dá říct, že po narození (zpravidla jednoho, méně často dvou mlád'at) jsou mlád'ata krmena mlékem matky po dobu několika týdnů. Některé druhy s shlukují v koloniích, aby byla mlád'ata v teple. Po odstavení mlád'at už nedochází k mateřské péči. Jakmile se mlád'ata naučí létat a získávat si potravu, jsou v podstatě nezávislá. (Yalden et Morris 1975, Myers 1978). Většina zástupců této čeledi se živí hmyzem a jinými malými členovci, které loví nad pevninou. Zajímavou potravní strategii ale zaujal například druh *Myotis vivesi* Ménégaux, 1901, který se vyskytuje v oblasti Kalifornského zálivu v Mexiku. Drtivou většinu jídelníčku tohoto druhu tvoří ryby a korýši a pouze velmi malou část hmyz (Otárola-Ardila et al. 2013). Dalším zajímavým druhem je *Nyctalus lasiopterus* (Schreber, 1780), který loví malé ptáky (Dondini et Vergari 2000).

1.2. Vymezení rodu *Hypsugo* Kolenati, 1856

Hypsugo savii (Bonaparte, 1837) byl popsán v roce 1837 s původním pojmenováním *Vespertilio savii* Bonaparte, 1837 (typová lokalita: Pisa, Itálie). Bonaparte jasně oddělil *V. savii* od *Vespertilio Vespertillus* Bonaparte, 1837 (dnes *Pipistrellus Pipistrellus* Schreber, 1774) na základě zbarvení na břicho (Bonaparte 1832–1841). Ve většině starší literatury najdeme ale *H. savii* pod jménem *Vesperugo maurus* Blasius, 1853. Do rodu *Vesperugo* Keyserling et Blasius, 1830 byly zařazeny i druhy, které dnes řadíme do rodů *Pipistrellus* Kaup, 1829 a *Nyctalus* Bowdich, 1825 (Locard 1889). Toto zařazení mohlo naznačovat jisté vztahy *H. savii* s rody *Pipistrellus* a *Nyctalus*. Nicméně na základě nalezených rozdílů mezi těmito netopýřními rody umístil Kolenati (1856) tento druh do samostatného rodu *Hypsugo*.

Většina dalších autorů zařazovala druh *H. savii* do rodu *Pipistrellus*, jako samostatnou skupinu v rámci tohoto rodu. Miller (1907) zařadil *Hypsugo* do rodu *Pipistrellus*, stejně tak Tate (1942), který nastínil základy klasifikace podčeledi Vespertilioninae (viz obr. 2), hlavně na základě zubního vzorce. Mnoho druhů bylo tak zahrnuto do tribu Pipistrellini na základě nepřítomnosti horního třetího premoláru P^3 a přítomnosti horního druhého řezáku I^2 . Dále se tento tribus dělil na základě přítomnosti druhého horního premoláru P^2 na "Pipistrelloid genera" čili skupinu rodů (včetně *Pipistrellus*), která tento premolár obvykle měla a na "Eptesicoid genera", skupinu rodů (včetně *Eptesicus* Rafinesque, 1820), u které druhý horní premolár chyběl (Tate 1942).



Obr. 2 Rozdělení Vespertilionidae podle Tate (převzato z Tate 1942).

Tato klasifikace měla ale podle některých autorů své nedostatky, a to hlavně v podobě zástupců, kteří vykazují jak znaky rodu *Pipistrellus*, tak znaky rodu *Eptesicus*. Jejich typickým zástupcem byl *Hypsugo savii* (Bonaparte, 1937), tehdy ještě nazýván *Pipistrellus savii* (Horáček et Hanák 1986), který byl v minulosti zařazován jak jako součást rodu *Pipistrellus* (Tate 1942, Hill et Harrison 1987), tak jako součást podrodu *Amblyotus* rodu *Eptesicus* (Ognev 1928). Všem takto problematickým formám, které sdílely znaky s *Pipistrellus* i *Eptesicus* bylo navrhnuo přesunutí do rodu *Vespertilio* (Kuzjakin 1950).

Významným pokrokem pro určení taxonomické pozice *H. savii* bylo shrnutí dat o karyotypu, morfologii penisu a bakula (pyjová kost), zubech a kostře. Horáček et Hanák (1986) přinesli ucelený pohled na charakteristiku znaků rodu *Pipistrellus*, *Eptesicus* a druhu *Pipistrellus savii*, když porovnali 194 jedinců *P. savii* a 145 jedinců dalších druhů z čeledi Vespertilionidae, z nichž 52 náleželo do rodu *Pipistrellus* nebo *Eptesicus*. Na základě porovnání všech výše zmíněných znaků bylo zjištěno, že se *P. savii* lišil od obou rodů tvarem a velikostí bakula, dále se *P. savii* od rodu *Pipistrellus* lišil typem moláru, který byl u *P. savii* mytodontní, stejně jako u rodu *Eptesicus*, ale u *Pipistrellus* byl nyctalodontní (Horáček et Hanák 1986). Další rozdíly jsou znázorněny na obr. 3.

	Pipistrellus	Hypsugo	Eptesicus
Karyotype <small>ancestral 44/50 eptesticoid 50/48 other</small>	+ -	+ ?	- -
Shape of baculum			
Penial morphology <small>■ accessory cav tissue ∩ baculum</small>			
Molar teeth pattern <small>(N) nyctalodancy (M) mytodancy</small>	(N)	(M)	(M)
Shape of sacrum and pelvis			
Tail tip			
Basisphenoidal pits	- (+)	-	+ (-)

Obr. 3 Rozdíly, které definovaly návrh osamostatnění rodu *Hypsugo* (převzato z Horáček et Hanák 1986).

Tato studie demonstrovala odlišnou pozici *P. savii* a dalších několika forem (*arabicus*, *alashanicus*, *pulveratus*, *affinis*) a některých jejich poddruhů od *Pipistrellus* a *Eptesicus*. Na základě stavu mnoha znaků bylo navrženo oddělení samostatného rodu *Hypsugo*, do kterého by spadal i výše zmíněný *Pipistrellus savii* (Horáček et Hanák 1986).

Další analýzou, která potvrdila hypotézu oddělení samostatného rodu *Hypsugo*, byla analýza zubů, která zařadila *P. savii* a dvě další formy (*austentianus*, *pulveratus*) do rodu *Hypsugo* (Menu 1987). Další nezávislá změna taxonomie rodu *Pipistrellus* byla navržena v roce 1987, kdy bylo popsáno rozdělení rodu *Pipistrellus* na sedm podrodů: *Pipistrellus*, *Hypsugo*, *Falsistrellus*, *Perimyotis*, *Arielulus*, *Vespadelus* a *Neoromicia* (Hill et Harrison 1987). Další studie, která potvrzovala jasné oddělení *P. savii* od rodu *Pipistrellus* byla založená na biochemické analýze a autoři této analýzy souhlasili s hypotézou Horáčka et Hanáka (1986) (Ruedi et Arlettaz 1991).

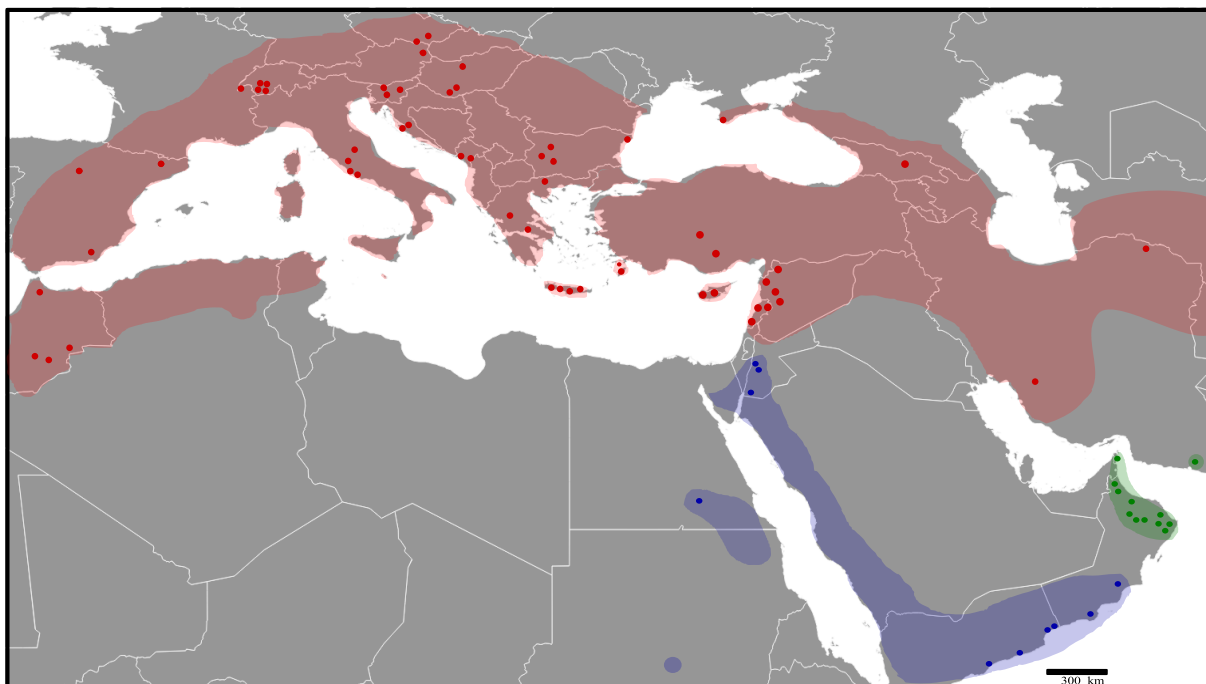
Dále tuto hypotézu podpořili i Volleth et Heller (1994) na základě srovnávací analýzy karyotypu padesáti druhů netopýrů z čeledi Vespertilionidae. Všechny tyto argumenty pro oddělení samostatného rodu *Hypsugo* se také objevily ve shrnující práci o netopýrech v Palearktidě, kde se tato hypotéza také jevila jako možné řešení taxonomické otázky rodu *Pipistrellus* s.l. (Horáček et al. 2000). Jasné oddělení rodu *Hypsugo*, podložené analýzou mitochondriální DNA, a jeho zařazení do tribu Vespertilionini proběhlo v rámci velké analýzy mtDNA čeledi Vespertilionidae (Hooper et Van Den Busche 2003).

Do rodu *Hypsugo* zařadila Simmons (2005) celkem 18 druhů, Moratelli et al. (2019) zmiňuje celkem 22 druhů a Hutterer et al. (2019) píše dokonce o 25 druzích.

1.3. *Hypsugo savii* (Bonaparte, 1837)

Hypsugo savii je druh s velkým areálem rozšíření. V palearktické oblasti je rozšířen od západu Středomoří až po střední Asii (viz obr. 4). Nicméně centrem jeho evropského areálu je oblast Středomoří. Ačkoliv většina záznamů o výskytu tohoto druhu pochází ze skalnatých oblastí, vyskytuje se *H. savii* v podstatě ve všech nadmořských výškách. Záznamy o pozorování jsou od hladiny moře (např. Jaderské moře) až do výše 3 300 metrů nad mořem, což je největší nadmořská výška pozorování jakéhokoliv evropského druhu netopýra (Garrido-Garcia 2000, Horáček et Benda 2004). V současné době můžeme v západní Palearktidě najít *H. savii* v oblasti sahající od Kanárských ostrovů a Maroka přes západ Portugalska, Španělsko, Itálii, střední Evropu, Balkánský poloostrov až po Blízký východ, Ukrajinu a Střední Asii (Horáček et al. 2000, Gaisler 2001, Benda et al. 2003, Horáček et Benda 2004, Benda et al. 2012, Uhrin et al. 2016).

V nedávné minulosti došlo k posunu areálu *H. savii* v Evropě. Před rokem 1990 zasahovala nejsevernější část areálu do rakouských Alp (Spitzenberger 1997). Postupem času se ale severní hranice areálu zvětšovala a dnes můžeme najít populace *H. savii* i v České republice a na Slovensku (Gaisler 2001, Reiter et al. 2010a, Jahelková et al. 2014, Uhrin et al. 2016). V České republice byl dokonce zaznamenán nález v Děčíně, blízko hranic s Německem (Bartonička et al. 2017). *Hypsugo savii* je jedním z nejběžnějších netopýrů, které se vyskytují v oblasti Levanty, speciálně tedy v Sýrii a Libanonu (Benda et al. 2016). Tento druh se objevuje také v Turecku a předpokládá se, že je rozšířen po celé Malé Asii (Benda et Horáček 1998, Karataş et Sözen 2006, Çoraman et al. 2013) V severní Africe se tento druh vyskytuje v Maroku, Tunisku a Alžírsku a na Kanárských ostrovech (Puechmaille et al. 2012, Ahmim et al. 2020).



Obr. 4 Mapa rozšíření tří analyzovaných druhů rodu *Hypsugo*. Červeně podbavené oblasti vymezují rozšíření *H. savii*, červené body pak značí místa, odkud pocházejí jedinci pro tuto práci. Modře podbarvené oblasti a body poté značí druh *H. ariel* a zelené oblasti a body značí druh *H. arabicus*. Rozšíření druhů bylo označeno na základě dat z publikací použitých v této práci a rozšířeno o lokality sběru vzorků použitých pro tuto práci.

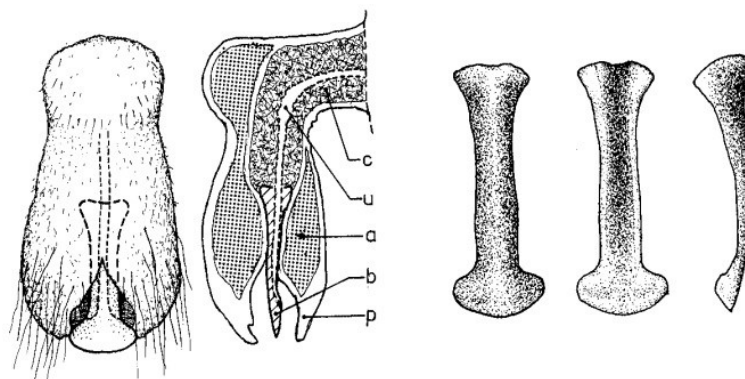
Na Ukrajině byly do roku 1990 zaznamenány pouze jednotlivé nálezy na jihu Krymského poloostrova (Bashta 2009). V Bulharsku byl zaznamenán *H. savii* v okolí měst Plovdiv a Stara Zagora (Stoycheva et al. 2009). V Rumunsku byl objeven v oblasti Roșia Montană (Murariu et Pop 2011) a také v rumunské Dobrudži (Murariu et al. 2009). *Hypsugo savii* byl objeven rumunské Moldávii (Pocora et Pocora 2011). Nové záznamy o tomto druhu pocházejí převážně z městských oblastí a rozšíření druhu je často spojeno s jeho synantropním chováním (Uhrin et al. 2016) a vhodnými mikroklimatickými podmínkami úkrytu (Reiter et al. 2010). K rozšíření areálu v Evropě může zároveň přispívat i změna klimatu (Rebello et al. 2010, Ancillotto et al. 2018).

Hypsugo savii se dá považovat za relativně malý druh. V různých zdrojích je velikost tohoto druhu až na malé nepatrné odchylky stejná. Velikost hlavy a těla dosahuje 40–55 milimetrů. Ocas je dlouhý 31–43 milimetrů a špička ocasu vyčnívá vně ocasní membrány (3–5 milimetrů). Délka předloktí je 30–37,9 milimetrů. Délka zadní nohy je obvykle menší než 8 milimetrů, i když některé prameny udávají délku až do 9 milimetrů. Uši mají délku 11,5–16 milimetrů a jsou široce zaoblené (Horáček et Benda 2004, 2016, Moratelli et al. 2019). Pro představu jsou v tab. 1 shrnuta biometrická data *H. savii* ze třech oblastí jeho výskytu.

Tab. 1. Základní biometrická data jedinců *H. savii* v milimetrech (převzato z Benda et al. 2016).

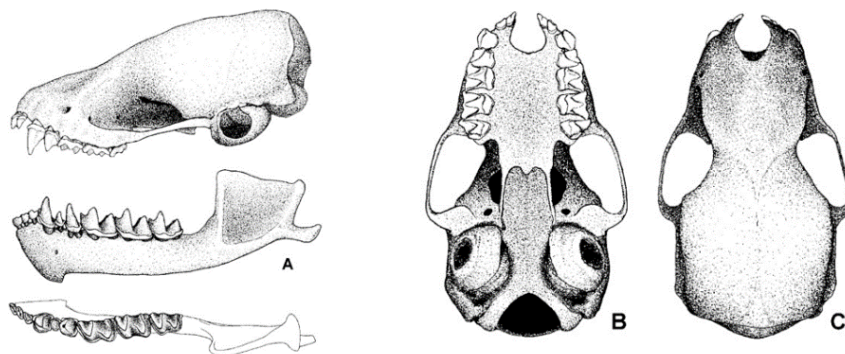
	Libanon				Írán				Kréta			
	n	M	min	max	n	M	min	max	n	M	min	max
LC	40	50	45	58	4	49,8	45	55	12	49,2	45	53
LCd	40	38,9	34	45	4	40	37	43	12	41,2	37	45
LAt	41	33,89	32,1	36,5	11	34,61	32,9	36,7	12	33,67	31,2	36,1
LAu	40	13,73	12	15,8	4	14,2	12,2	15,2	12	14,33	13,2	15,5
LTr	39	5	3,8	6,1	4	5,5	5,4	5,7	12	4,97	4,4	5,8
LCr	41	13,49	12,9	14,08	6	13,13	12,83	13,62	12	13,43	12,71	13,83
LCb	40	13,13	12,49	13,67	7	12,68	12,26	13,23	10	13,07	12,38	13,68
LaZ	40	8,73	8,3	9,27	6	8,59	8,43	8,72	10	8,73	8,49	8,93
LaI	41	3,46	3,21	3,65	7	3,36	3,16	3,53	10	3,37	3,17	3,61
LaInf	40	4,46	4,14	4,84	7	4,35	4,23	4,52	x	x	x	
LaN	41	6,71	6,44	6,98	7	6,61	6,46	6,81	10	6,55	6,21	6,74
LaM	40	7,37	6,98	7,81	7	7,3	7,08	7,62	10	7,32	7,07	7,64
ANc	41	4,58	4,2	6,74	6	4,49	4,36	4,74	10	4,44	4,28	4,61
LBT	40	3,13	2,88	3,45	7	3,23	2,96	3,42	x	x	x	
CC	41	4,29	3,98	4,5	7	4,15	3,98	4,39	10	4,38	4,19	4,75
M³ M³	41	5,79	5,54	6,13	7	5,61	5,42	5,91	10	5,79	5,61	6,03
CM³	41	4,62	4,37	4,82	7	4,45	4,28	4,61	10	4,65	4,43	4,88
LMd	41	9,49	8,97	9,89	7	9,16	8,83	9,71	10	9,56	9,08	9,97
ACo	41	2,83	2,58	3,06	7	2,78	2,64	2,93	10	3,08	2,67	4,83
CM₃	41	4,58	4,58	5,13	7	4,76	4,58	4,89	10	4,96	4,74	5,11

Křídelní blány, obličej a uši mají tmavou až načernalou barvu. Křídla jsou středně široká a špičatá. Plagiopatagium se upíná na základnu palce nohy, epiblema ocasní membrány, na rozdíl od rodu *Pipistrellus*, nikdy neobsahuje chrupavčitou lamelu. Penis *Hypsugo savii* je charakteristický svou morfologií. Je ohnutý do pravého úhlu a bakulum, umístěné v distální polovině penisu (viz obr. 5), je stejně dlouhé jako u rodu *Pipistrellus*, ale je mnohem širší, ploché, na řezu střežovitě (na rozdíl od rodu *Pipistrellus*, který ho má zaoblené) s diskovitým rozšířením na konci, což je typické a jedinečné pro palearktické zástupce celého rodu *Hypsugo* (Horáček et Benda 2004, Benda et al. 2012, Moratelli et al. 2019).



Obr. 5 Penis a bakulum *Hypsugo savii*. Nalevo je dorsální pohled na penis a průřez penisu z boku (písmeno b označuje bakulum). Napravo je vidět charakteristický tvar bakula (převzato z Horáček et Benda 2004).

Pažní kost ukazuje podobnosti s pažní kostí stejně velkých druhů z rodů *Eptesicus* a *Pipistrellus*, avšak její proximální epifýza je poněkud užší a určité rozdíly jsou i ve tvaru její distální epifýzy. Páteř se skládá z 38 obratlů, kaudální část křížové kosti není zkrácena, první ocasní obratel je užší než ocasní okraj křížové kosti a holenní kost je zhruba stejně dlouhá jako stehenní kost. Chrup je robustnější než u rodu *Pipistrellus*. Zubní vzorec je I 2/3, C1/1, P1–2/2, M3/3, celkem tedy 32 až 34 zubů (viz obr. 6) (Horáček et Hanák 1986, Horáček et Benda 2004, Moratelli et al. 2019).



Obr. 6 Lebka *Hypsugo savii* (převzato z Horáček et Benda 2004).

Ve srovnání s netopýry rodu *Pipistrellus* se dospělí jedinci *H. savii* vyznačují velmi výrazným kontrastem ve zbarvení. Mají tmavě hnědé, až černé blány, tlamu a ušní boltce. Naproti tomu mají velmi jasnou, až bílou srst na břiše. Na zádech je srst převážně zbarvená do hněda s až zlatavými konečky chlupů. *Hypsugo savii* ale vykazuje značnou variabilitu ve zbarvení srsti, která může být na zádech i dvoubarevná (Đulić 1978, Benda et Horáček 2004).

Takovéto zbarvení bylo zjištěno u jedinců na Dalmatských ostrovech, kde bylo nalezeno celkem šest různých typů dorsálního zbarvení, přičemž nejčastěji se objevovalo zbarvení tmavé hlavy, tmavě hnědého základu srsti a okrového zbarvení konečků srsti (Đulić 1978). Ve Švýcarsku a Francii mělo dokonce více než 75 % jedinců *H. savii* dvoubarevnou srst (Arlettaz et al. 1993). Jedinci z oblasti Levanty a Středního východu jsou výhradně dvoubarevní. (Benda et al. 2006, 2012). Ačkoliv je dvoubarevné zbarvení jedinců typické, existují i jedinci, kteří mají pouze jednu barvu (viz obr.7). Jejich zastoupení je ale výrazně nižší. Ve Švýcarsku a Francii se tento jednobarevný typ vyskytuje u 19 a 24 % jedinců, přičemž je přítomen bez ohledu na věkovou strukturu jedinců (Arlettaz et al. 1993).



Obr. 7 Tři různé barevné varianty *Hypsugo savii* chycené jedné noci na jedné lokalitě ve Švýcarsku (převzato z Arleattaz et al. 1993).

Hypsugo savii se může vyskytovat v širokém spektru biotopů od pobřežních mokřadů až po podhorské pastviny. Výškový gradient jeho výskytu sahá od hladiny moře po alpské pásmo a rekordem je prozatím výška 3 300 metrů nad mořem (Garrido-Garcia, 2000). Většina záznamů výskytu je však z podhorských a horských oblastí, ačkoliv nedávno expandující populace kolonizovaly i nížiny (Ibáñez et al. 1992, Paunović et al. 2015).

V přírodě je mnohdy složité *H. savii* najít, neboť se jedinci často vyskytují soliterně, nebo v malých skupinkách a shlukují se v jeskyních. Většina dostupných zdrojů o výskytu *H. savii* v urbanizovaném prostředí ukazuje na úkryty na půdách a střeších, prasklinách budov a na balkonech, v opuštěných budovách a dalších místech (Stojanovski 1994, Vernier 1995, Freitag 1996, Benda et al. 2006, Stoycheva et al. 2009, Uhrin et al. 2016). Přirozená, člověkem nedotčená stanoviště ve skalních puklinách byla v minulosti hlášena z Kyrgyzstánu, Sýrie, Libanonu nebo z Balkánského poloostrova. Jednalo se však o záznamy soliterních jedinců, nebo malých kolonií (Rybin et al. 1989, Benda et al. 2003, 2006, 2016).

V roce 2005 byl u *H. savii* zaznamenán typ stanoviště, které pro netopýry není, až na výjimky, typický, neboť se nachází nízko u země a poskytuje tak potencionálním predátorům možnost na netopýry zaútočit. V oblasti Peñadil na severu Španělska byly spatřeny dvě samice *H. savii* pod sádrovcovou skálou v nadmořské výšce 390 metrů nad mořem. V této oblasti nejsou žádné velké skály a jeskyně, a zdá se tedy, že tyto samice využily trhliny v zemi jako úkryt, který jim suploval skalní trhliny (Alcalde et Gosá 2009).

Hypsugo savii loví hmyz v letu a typicky ve výšce 2–100 metrů nad zemí. Studie, která zjišťovala složení potravy evropských netopýrů na základě rozboru jejich trusu zjistila, že nejčastější potravou byly motýli, následně dvoukřídla a blanokřídla (viz obr. 8) (Beck, 1995).

	analyzed fecal pellets	Diptera	Lepidoptera	Coleoptera	Neuroptera	Hemiptera	Hymenoptera	Trichoptera	Dermoptera	Pscoptera	Ephemeroptera	Plecoptera	Orthoptera	Arachnida	Chilopoda	
Rhinolophus ferrumequinum	164	41 (25)	129 (78)	40 (24)	9 (5)	2 (1)	47 (29)	20 (12)	-	-	-	-	-	-	2 (1)	-
Rhinolophus hipposideros	880	671 (76)	555 (63)	15 (2)	323 (37)	8 (1)	23 (3)	-	-	25 (3)	-	-	-	-	-	-
Myotis mystacinus	80	69 (86)	11 (14)	2 (3)	6 (8)	2 (3)	3 (4)	-	-	-	-	-	-	-	21 (26)	-
Myotis emarginatus	90	84 (93)	5 (6)	10 (11)	2 (2)	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	50 (56)	-
Myotis nattereri	410	332 (81)	124 (30)	22 (5)	14 (3)	28 (7)	17 (4)	6 (1)	6 (1)	-	14 (3)	-	-	-	156 (38)	-
Myotis myotis	330	18 (5)	3 (1)	330 (100)	-	1 (0,5)	2 (1)	-	3 (1)	-	-	-	-	-	21 (6)	4 (1)
Myotis daubentoni	306	304 (99)	8 (3)	14 (5)	44 (14)	65 (21)	8 (3)	20 (7)	-	1 (0,5)	1 (0,5)	5 (2)	-	-	-	-
Pipistrellus pipistrellus	60	39 (65)	20 (33)	-	11 (18)	20 (33)	13 (22)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pipistrellus nathusii	105	105 (100)	1 (1)	-	2 (2)	5 (5)	1 (1)	5 (5)	-	-	-	-	-	-	-	-
Pipistrellus kuhli	40	30 (75)	15 (38)	-	1 (3)	6 (15)	1 (3)	18 (30)	-	1 (3)	2 (5)	-	-	-	-	-
Hypsugo savii	60	29 (48)	32 (53)	2 (3)	18 (30)	11 (18)	18 (30)	1 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-
Nyctalus leisleri	126	49 (39)	85 (67)	1 (1)	6 (5)	-	4 (3)	19 (15)	-	-	-	-	-	-	-	-
Nyctalus noctula	130	57 (44)	25 (19)	25 (19)	5 (4)	49 (38)	17 (13)	44 (34)	-	-	25 (19)	4 (3)	-	-	3 (2)	-
Eptesicus nilssonii	100	69 (69)	56 (56)	7 (7)	33 (33)	18 (18)	4 (4)	5 (5)	-	-	-	1 (1)	-	-	-	-
Eptesicus serotinus	115	37 (32)	39 (34)	61 (53)	4 (3)	19 (17)	15 (13)	29 (25)	-	-	2 (2)	-	-	-	-	-
Vespertilio murinus	72	13 (18)	35 (49)	-	12 (17)	3 (4)	-	39 (54)	-	-	-	-	-	-	-	-
Barbastella barbastellus	80	7 (9)	79 (99)	-	5 (6)	-	2 (3)	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-
Plecotus auritus	854	485 (57)	519 (61)	72 (8)	34 (4)	41 (5)	33 (4)	-	147 (17)	45 (5)	-	6 (1)	6 (1)	15 (2)	7 (1)	-
Plecotus austriacus	1113	482 (43)	1001 (90)	188 (17)	40 (4)	-	39 (4)	-	4 (0,5)	2	-	-	-	-	1	2

Obr. 8 Tabulka rozboru potravy, kde je vyznačen *Hypsugo savii* (převzato z Beck 1995).

Samice rodí většinou dvě mláďata (Kuzjakin, 1950). Březost netopýrů trvá šest až devět týdnů. Délka březosti závisí na druhu a může být ovlivněna klimatem a dostupností potravy. Hmotnost mláďat *H. savii* se pohybuje v rozmezí 1,1–1,2 gramů. Na základě dostupných dat odchytu samic, které buď vykazovaly znaky laktace (Benda et al. 2006), nebo byly březí (Đulić 1970, Horáček et Benda 2004, Benda et al. 2006), se dá říct, že *H. savii* rodí svá mláďata v období od května, do poloviny července.

V západní Palearktidě bylo nalezeno v minulosti několik forem druhu *H. savii*, které byly považované za poddruhy (Simmons 2005). Prvním byl *Vespertilio ochromixtus* Cabera, 1904 (typová lokalita: Sierra de Guadarrama, Španělsko), *Scotophilus darwini* Tomes, 1859 (typová lokalita: Las Palmas, Kanárské ostrovy), *Vesperugo caucasicus* Satunin, 1901 (typová lokalita: Tbilisi, Gruzie) a *Amblyotus tauricus* Ognev, 1927 (typová lokalita: Karadag, Krym) (Ellerman et Morrison-Scott 1951). Právě už Ellerman et Morrison-Scott (1951) naznačili, že by *V. caucasicus* a *A. tauricus* mohly být stejné formy, což prohlásili i Pavlinov et Lissovsky (2012).

Hypsugo savii má podle Horáčka et al. (2000) v Palearktidě celkem čtyři poddruhy. Jedná se o *H. savii savii* (Bonaparte, 1837), který se vyskytuje hlavně v Evropě (kromě Iberského poloostrova a poloostrova Krym), dále pak *H. savii austenianus* (Dobson, 1871), známý pouze z jedné lokality v severovýchodní Indii, *H. savii caucasicus* (Satunin, 1901), vyskytující se na Krymu, na Kavkaze, na Blízkém východě v severozápadní Indii a západní Číně. Posledním poddruhem *H. savii* je *H. savii ochromixtus*, Cabera, 1904, který je typickým zástupcem iberského poloostrova a sahá až do Švýcarska (Horáček et al. 2000, Moratelli et al. 2019).

Vnitrodruhová variabilita *H. savii* byla v minulosti zkoumána v několika studiích. Pestano et al. (2003) svou studií prokázal velkou divergenci mezi jedinci *H. savii* ze Španělska a Kanárských ostrovů. Populace na Kanárských ostrovech se od těch z vnitrozemí Španělska lišily u genu pro cytochrom *b* (*Cyt-b*) v rozmezí 6,3–7,2 %, přičemž rozdíl mezi populacemi pouze na Kanárských ostrovech byl 0–0,8 %. Další analýza mezi jedinci z Maroka a jedinci z Evropy ukázala divergenci 9,6 % u mitochondriálního genu ND1 (Mayer et al. 2007). Na základě podobných pozorovaných sekvenčních rozdílů ve studii Pestana (2003) navrhl Mayer et al. (2007) vytvoření nového druhu s názvem *Hypsugo cf. darwini* (Tomes, 1859). V další analýze z roku 2011 byly na Sicílii a Sardinii nalezeny haplotypy příbuzné právě *Hypsugo cf. darwini* (Veith et al. 2011), které byly následně doplněny o stejně podobné haplotypy z Toskánska (Dondini et al. 2016).

Další molekulární studie analyzovala mitochondriální (*Cyt-b* a ND1) a jaderné (*Rag2*) sekvence z Pyrenejského poloostrova a výsledkem bylo mimo jiné nalezení 3 různých linií v Evropských vzorcích *H. savii*. První linie byla zastoupena dvěma jedinci z jihu Pyrenejského poloostrova, druhá linie byla ve Švýcarsku a Španělsku a třetí linie byla zastoupena netopýry z východního Středomoří a Turecka. Tyto linie se celkem výrazně lišily. Jedinci z východní Evropy se od těch švýcarských lišili průměrně o 8 % při analýze *Cyt-b* a jedinci z jihu Pyrenejského poloostrova

se od těch východoevropských lišili dokonce průměrně o 9 %. (Ibáñez et al. 2006, Çoraman et al. 2013). V analýze z roku 2007 byl také jeden vzorek z Izraele, který se od ostatních odlišoval o 13,8 % od ostatních vzorků ze stejné lokality (Mayer et al. 2007). V roce 2019 byly z Malty popsáni jedinci, kteří spadají do linie z jihu Pyrynejského poloostrova, kterou popsal Ibáñez et al. (2006) (Mifsud et Vella 2019).

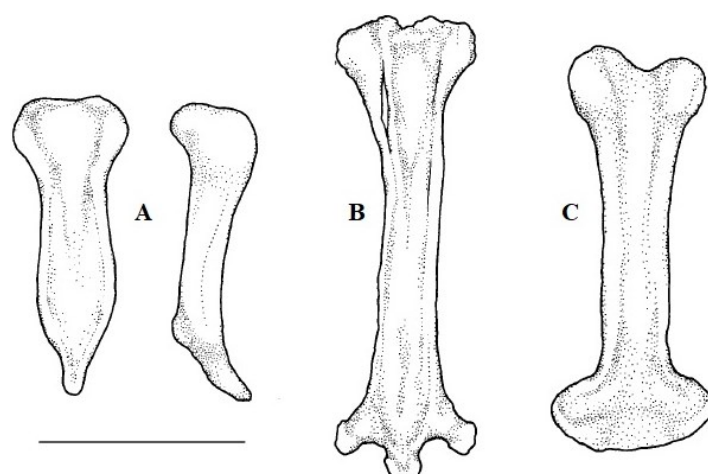
Podle výše zmíněných analýz se zdá, že se v západní Palearktidě nacházejí čtyři geograficky vymezené linie *H. savii*, pokud bychom brali v potaz správnost určení vzorku z Izraele (Mayer et al. 2007). První je jižní Levanta, která je oddělena největší divergencí, druhá se nachází v Chorvatsku, Turecku a zbytku Levanty. Třetí linie zaujímá plochu od Španělska po Švýcarsko a čtvrtá linie se rozkládá v severozápadní Africe, jižním Španělsku (jedná se právě o navržený klad *Hypsugo cf. darwini*, který se také objevil na Sardinii, Sicílii a v Toskánsku).

1.4. *Hypsugo arabicus* (Harrison, 1979)

Hypsugo arabicus je poměrně nedávno objevený druh. Poprvé byl popsán jako *Pipistrellus arabicus* v roce 1979 v Ománu. Tři nalezené zástupce doplnily v roce 1982 další dva jedinci tohoto druhu znovu z Ománu. (Harrison 1982). Do nedávna byl *H. arabicus* považován za endemický druh pohoří Al Hadžar v Ománu (Harrison et Bates 1991, Koopman 1993, Horáček et al. 2000) a byl považován za monotypický druh s typovou lokalitou: Wadi Sahtan, Omán (Harrison, 1979). Endemický status *H. arabicus* byl vyvrácen v roce 2002. V roce 2000 byl totiž *H. arabicus* objeven v provincii Sístán a Balúčistán, konkrétně v lokalitě poblíž vsi Pir Sohrab (Benda et al. 2002). V roce 2009 byl *H. arabicus* objeven i v jiných lokalitách pohoří Al Hadžar v Ománu (Benda et al. 2011).

Na základě těchto nálezů mohlo dojít k morfologickému porovnání zástupců tohoto druhu, především tedy zástupců z Ománu a Íránu. Na základě morfologického porovnání kostry hlavy, těla a končetin bylo zjištěno, že jedinci *H. arabicus* z Íránu dosahují podobných hodnot v rámci určitých částí morfologie lebky a zubů jako jedinci z Ománu. V čem se ale odlišují je velikost neurokrania, které je u Íránských zástupců vyšší a širší (Benda et al. 2012). Tvar a velikost penisu íránských zástupců *H. arabicus* se dle této morfologické analýzy nelišily od znaků penisu, který popsal Harrison v roce 1982 u ománských zástupců (viz obr. 9) (Harrison 1982).

Tvar a struktura bakula se u íránských zástupců *H. arabicus* také shodovala s bakulem ománských zástupců (Harrison 1982, Hill et Harrison 1987). Tvarem bakula se ale všichni zástupci *H. arabicus* odlišovali od jinak morfologicky velmi podobného druhu *Hypsugo ariel* (Thomas, 1904) a *Hypsugo lanzai* Benda, Al-Jumaily, Reiter et Nasher, 2011 (Harrison 1982, Benda et al. 2011). Na základě velmi odlišné anatomie penisu bylo potvrzeno, že *H. arabicus* představuje taxon jasně oddělený od *H. ariel* (Benda et al. 2012), což vyvrací hypotézu, dle které by mohl být *H. arabicus* konspecifický s druhem *H. ariel* (Horáček et al. 2000).



Obř. 9 Bakulum třĩ druhů rodu *Hypsugo*: A) *Hypsugo ariel*, B) *Hypsugo arabicus* C) *Hypsugo savii* (převzato z Benda et al. 2011), měřítko 1 mm.

Hypsugo arabicus se řadí mezi malé druhy netopýřů. Velikost hlavy a těla dosahuje 37–48 milimetrů. Ocas je dlouhý 37–44 milimetrů, předloktí dosahuje délky 28,9–34,3 milimetrů, délka boltce dosahuje 10,5–13,5 milimetrů, zadní noha je dlouhá 5,3–5,9 milimetrů a délka tragusu se pohybuje v rozmezí 4,7–5,8 milimetrů (Benda et al. 2012). Další biometrická data zástupců *H. arabicus* z Íránu a Ománu jsou vyznačena v tab. 2.

Tab. 2. Základní biometrická data jedinců *H. arabicus* v milimetrech (převzato z Benda et al. 2012). Podrobný rozpis prvního sloupce lze najít v oddělu zkratky.

	Omán				Írán			
	n	M	min	max	n	M	min	max
LC	26	43,3	40	48	12	45,7	37	48
LCd	26	40,3	37	44	12	38,8	37	41
LA _t	27	31,63	28,9	34,3	12	31,06	29,9	32,4
LA _u	26	12,4	11,2	13,5	12	11,61	10,5	12,5
LTr	26	5,12	4,7	5,8	12	5,18	4,8	5,7
LCr	23	11,55	10,97	12,09	9	11,43	11,08	11,63
LCb	23	10,93	10,47	11,26	8	10,8	10,36	11,04
LaZ	20	7,29	6,93	7,56	8	7,28	7	7,52
LaI	23	2,9	2,69	3,15	9	2,89	2,75	2,98
LaInf	23	3,29	3,07	3,56	9	3,34	3,09	3,43
LaN	23	5,78	5,59	6,02	9	5,93	5,72	6,08
LaM	23	6,25	5,97	6,48	9	6,15	5,92	6,28
ANc	23	4,02	3,76	4,22	8	4,14	4,03	4,24
LBT	22	2,71	2,52	2,97	9	2,63	2,52	2,77
CC	23	3,31	3,01	3,62	9	3,37	3,18	3,44
M ³ M ³	21	4,66	4,39	5,09	9	4,66	4,35	4,82
CM ³	22	3,95	3,72	4,13	9	3,93	3,75	4,1
LMd	22	7,79	7,38	8,15	9	7,66	7,38	7,88
ACo	22	2,3	2,19	2,47	9	2,3	2,11	2,42
CM ₃	22	4,19	3,93	4,48	9	4,11	3,98	4,22

Hypsugo arabolicus má na hřbetě světlou srst (chlupy s tmavšími bázemi, na které navazují světlejší špičky), na břišní straně je srst velmi světlá, až bílá. Obličej a uši jsou tmavé, až načernalé a blány jsou tmavě hnědé, nicméně mají částečnou průsvitnost (viz obr. 10). Uši jsou kratší a tragus je vyšší se zaoblenou špičkou dopředu.



Obr. 10 *Hypsugo arabolicus*, foto z lokality Pir Sohrab. FOTO: A. Reiter (převzato z Benda et al. 2012).

V Ománu se se vyskytuje *H. arabolicus* pouze v severozápadní části země v pohoří Al Hadžar. V roce 2000 bylo odchyceno dvanáct jedinců íránské populace *H. arabolicus* poblíž vsi Pir Sohrab. Tito jedinci se slétávali kolem vodní nádrže, která vznikla z vysychající řeky nedaleko Pir Sohrab. Tato oblast se vyznačovala nízkou vegetací a kamenitým terénem (Benda et al. 2002, 2011, 2012).

Hypsugo arabolicus loví potravu za letu. Analýzou trusu ománských jedinců bylo zjištěno, že v potravě dominují zástupci brouků (Coleoptera), balonkřídlých (Hymenoptera), motýlů (Lepidoptera) a ploštic (Heteroptera). Mezi potravou *H. arabolicus* se také objevili křísi (Auchenorrhyncha). Z dvanácti vzorků íránských jedinců z lokality Pir Sohrab byly v potravě identifikováni zástupci brouků, křísů a mravenců (Benda et al. 2012).

Z dvanácti jedinců chycených 12. dubna 2000 u vsi Pir Sohrab bylo celkem osm samic. Šest z nich bylo březích a každá z nich v sobě měla dva plody o průměrné velikosti 11,7 milimetrů. Na základě datumu odchytu samic a velikosti plodů bylo odhadnuto, že porody u *H. arabolicus* z Íránu nastávají v první polovině dubna (Benda et al. 2012).

V Ománu byla chycena březí samice, která v sobě měla dva plody, nicméně jejich velikost nebyla definována. Tato samice byla chycená 18. března (Harrison et Bates 1991). V Ománu bylo také v období od 3. do 14. dubna nalezeno několik březích samic a 7. dubna byla nalezena samice, která vykazovala znaky laktace, což potvrdilo teorii, že *H. arabicus* rodí mláďata v dubnu (Benda et al. 2012).

1.5. *Hypsugo ariel* (Thomas, 1904)

Hypsugo ariel (Thomas, 1904) byl popsán v roce 1904 pod jménem *Pipistrellus ariel*, Thomas, 1904 jako netopýr rodu *Pipistrellus* Kaup, 1829 na základě nalezení dvou jedinců ve Východní poušti v Egyptě. Tyto dva jedince našel Arthur M. Mackillingin v srpnu 1903 (Thomas 1904). Další záznam o výskytu *H. ariel* popsal Flower (1932), který informoval o nalezení dvou zástupců v lednu 1927 ve městě Rahad v Súdánu. Flower (1932) zároveň specifikoval oblast nalezení *H. ariel* v roce 1903 na oblast provincie Kasala na súdánské straně hranic s Egyptem. Ze dvou zástupců ze Súdánu se zachovala jen kůže jednoho z nich a ta je uložena v Přírodovědném muzeu v Londýně (Koopman 1975). V březnu 1987 byl v Nahal Zeelim na východě Izraele nalezen další jedinec *H. ariel*, který byl mrtvý a ve velmi špatném stavu (Makin et Harrison 1988). Podle Harrison et Bates (1991) byl *Pipistrellus ariel* vzácný druh netopýra nalezený pouze ve třech lokalitách, který je ale velmi podobný druhu *Pipistrellus bodenheimeri* Harrison, 1960.

V říjnu 1959 našel David L. Harrison ve vesnici Jotvata v Izraeli samici, kterou o rok později popsal jako samostatný druh *Pipistrellus bodenheimeri* Harrison, 1960. Tento druh od *P. ariel* odlišil na základě několika morfologických atributů. Podle Harrisona (1960) byl *P. ariel* tmavší, měl menší lebku, jeden hrot na prvním horním řezáku a měl také menší horní premolár P³, kdežto *P. bodenheimeri* měl větší lebku, dva hroty na prvním horním řezáku a jen nepatrně větší horní premolár P³ (Harrison 1960). V roce 1964 byli další čtyři jedinci z Izraele a jeden z Jemenu přiřazeni do druhu *P. bodenheimeri* (Harrison 1964). Další jedinci z Izraele byli nalezeni v lokalitách Ein Yahav a Ein Gedi u hranic s Jordánskem nebo na jihu Izraele u města Eilaot (Makin et Harrison 1988). Další dva jedinci byli nalezeni u Kláštera svaté Kateřiny na Sinajském poloostrově (Qumsiyeh 1985).

Horáček et Hanák (1986) zařadili v rámci své studie oba druhy do rodu *Hypsugo* a naznačili, že by se v případě *P. ariel* a *P. bodenheimeri* mohlo jednat o jeden druh. Tato hypotéza byla vyslovena i v roce 1992 ve studii Yom-Tov et al. (1992) vyslovena hypotéza o tom, že by *P. ariel* a *P. bodenheimeri* mohli být jedním druhem. Tato hypotéza se opírala o informaci, že jedinec ulovený v roce 1987, identifikován D. L. Harrisonem jako *P. bodenheimeri* měl pouze jeden hrot na prvním horním řezáku, což je podle Harrisona (1960) znak *P. ariel*.

Pipistrellus ariel nalezený v Nahal Ze'elim byl odlišen od *P. bodenheimeri* na základě dvou hlavních rozdílů. První rozdíl se týkal horních řezáků. První řezák měl jeden hrbol a druhý dosahoval dvou třetin výšky korunky prvního řezáku. Dalším rozdílem byly odlišné tvary uší a tlamy u obou druhů (Makin et Harrison 1988). Benda et al. (2008) ale podotkl, že tento jedinec *H. ariel* byl nalezen ve velmi špatném stavu, a tak jediným spolehlivým rozlišovacím znakem byl různý počet hrotů na prvním horním řezáku.

V roce 2008 došlo k analýze lebek *P. ariel* a *P. bodenheimeri*, kde se porovnávali kromě samotných zubů i další biometrické údaje. Do této analýzy byl přidán i *H. arabicus*, jako velmi podobný druh. Ve velikosti těla a lebky se první dva druhy víceméně shodovaly. Například šířka rostra by měla u *P. ariel* být o něco nižší než u *P. bodenheimeri*, ale to se nakonec neukázalo. Nižší hodnota šířky rostra se ukázala pouze u *H. arabicus*. Výsledná analýza ukázala, že v rámci diferenciací prvních horních řezáků není tak jasný přechod a některé analyzované vzorky dokonce vykazovaly jakýsi přechod mezi *P. ariel* a *P. bodenheimeri*. Ačkoliv byl morfotyp se dvěma hroty téměř dvakrát častější než ten s jedním hrotem, ukázalo se, že se zub s jedním hrotem, který je typický pro *P. ariel*, objevil i mezi jedinci popsány jako *P. bodenheimeri*, což v tak malém množství analyzovaných vzorků s takovou četností nebylo možné považovat za odchylku (Benda et al. 2008). Jelikož už před touto analýzou došlo ke zpochybnění taxonomického oprávnění *P. bodenheimeri* (Horáček et Hanák 1986, Yom-Tov et al. 1992, Horáček et al. 2000, Benda et al. 2002), bylo v roce 2008 navrženo sjednocení obou druhů pod jediné jméno *Hypsugo ariel*.

Kromě výše zmíněných informací o výskytu *H. ariel* byly mezi léty 2005 až 2007 v několika oblastech poloostrova Sinaj nahrány zvuky, které podle analýzy patřily *H. ariel*. Od objevu *H. ariel* do roku 1999 bylo v Izraeli zaznamenáno 17 nálezů *H. ariel* (Mendelssohn et Yom-Tov. 1999).

Zjímavostí je, že jemenský ostrov Sokotra je domovem endemického druhu jménem *Hypsugo lanzai*, který byl v minulosti považován za *P. bodenheimeri*, ale toto tvrzení bylo s přijímáno spíše s otazníkem (Corbet 1978). Později se ale podařilo tyto zástupce ostrova Sokotra identifikovat a zařadit je do samostatného druhu *Hypsugo lanzai* (Benda et al. 2011).

Hypsugo ariel patří mezi malé druhy netopýrů. Velikost hlavy a těla dosahuje 35–45 milimetrů. Ocas je dlouhý 32–44 milimetrů, předloktí dosahuje délky 28,1–33,7 milimetrů, délka boltce má velikost 9–14,1 milimetrů, zadní noha může dorůst velikosti 5–6 milimetrů a délka tragusu se pohybuje v rozmezí 4,1–5,6 milimetrů. Bakulum má jiný tvar než bakula druhů *H. savii* a *H. arabicus*. Obecně je bakulum kratší, jeho distální epifýza je špičatá (*H. arabicus* má tuto epifýzu ve tvaru trojzubce a u *H. savii* je zakulacena) (Benda et al. 2011, Moratelli et al. 2019). Další biometrická data zástupců *H. ariel* jsou vyznačena v tab.3.

Tab. 3. Základní biometrická data jedinců *H. ariel*. Levá polovina označuje jedince z jižní části Arabského poloostrova a pravá polovina ze severu Arabského poloostrova. (převzato z Benda et al. 2016). Podrobný rozpis prvního sloupce lze najít v oddílu zkratky.

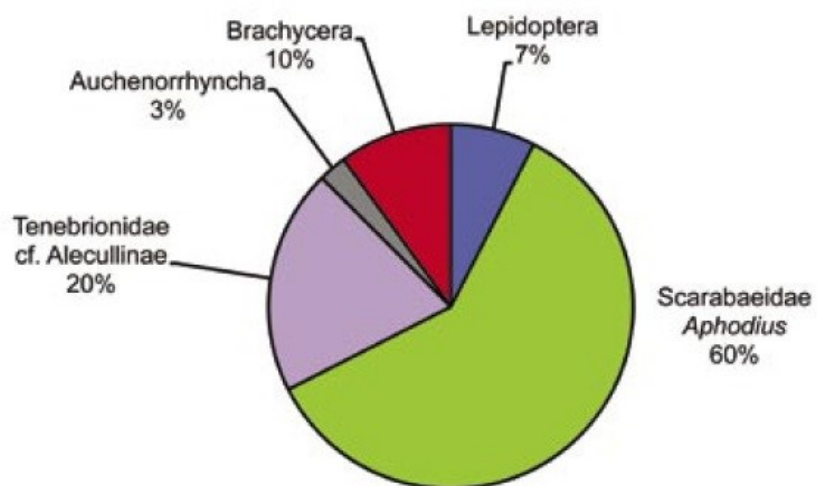
	jižní Arábie				severní Arábie			
	n	M	min	max	n	M	min	max
LC	20	39,7	35	45	10	40,1	37	42
LCd	20	37,4	32	44	9	39,3	37	44
LA_t	20	30,08	28,1	32,1	11	30,4	28,9	33,7
LA_u	20	13,08	12,2	14,1	10	13,22	12,5	14
LTr	20	4,94	4,1	5,6	10	4,94	4,4	5,6
LCr	16	11,54	10,63	11,84	10	11,51	11,18	11,89
LCb	16	11,07	10,19	11,5	10	11	10,67	11,51
LaZ	14	7,08	6,68	7,39	10	6,93	6,41	7,18
LaI	16	2,63	2,44	2,78	10	2,64	2,46	2,76
LaInf	16	3,65	3,34	3,92	10	3,51	3,26	3,86
LaN	16	5,52	5,34	5,75	10	5,6	5,33	5,76
LaM	16	6,1	5,87	6,32	10	6,09	5,82	6,31
ANc	16	3,98	3,73	4,17	10	3,92	3,79	4,02
LBT	15	2,7	2,44	2,92	10	2,62	2,28	2,93
CC	16	3,47	3,27	3,78	10	3,4	3,25	3,59
M³ M³	15	4,74	4,47	5,18	10	4,65	4,42	4,87
CM³	15	3,99	3,74	4,28	10	3,92	3,75	4,08
LMd	16	7,87	7,42	8,16	10	7,77	7,46	8,17
ACo	16	2,34	2,16	2,46	10	2,37	2,24	2,57
CM₃	13	4,24	4,02	4,47	10	4,1	3,87	4,29

Obecně má *H. ariel* světlejší srst než *H. savii* a *H. arabicus*. Na hřbetě má světle hnědou až krémovou srst, na břicho je tato srst bělavá. Barva srsti kontrastuje s hnědou barvou blán a končetin (viz obr. 11) (Harrison 1960). Hlavním habitatem *H. ariel* jsou skalnaté oblasti, pouště a polopouště, kde byl často odchycen v okolí vodních ploch. Je také známo, že se vyskytuje v okolí farem a zavlažovaných oblastí v Jordánsku. Tento druh byl zaznamenán v nadmořských výškách 345–1224 m (Benda et al. 2008). Nálezy *H. ariel* poblíž Mrtvého moře, které se nachází dokonce pod hladinou moře, ukazují, že se *H. ariel* vyskytuje i v nižší nadmořské výšce (Makin et Harrison 1988).



Obr. 11 Ukázka variabilního zbarvení dvou zástupců *Hypsugo ariel*: nahoře (samec *H. ariel* z Hawf, západní Jemen), dole (samec *H. ariel* z Al Nueimah, centrální Jemen) FOTO: A. Reiter, P. Benda a D. Král, (převzato z Benda et al. 2011).

Nejčastější potravou *H. ariel* na poloostrově Sinai byli zástupci brouků z rodu *Aphodius*, kteří tvořili více jak polovinu jejich jídelníčku. Následovali zástupci čeledi potěmnikovitých (Tenebrionidae). Další složky potravy byly zastoupeny spíše ojediněle (viz obr. 12) (Benda et al 2008). Ve studii z roku 2010 byla analyzována potrava *H. ariel* ze dvou oblastí v Jordánsku (Wadí Al Hasa, Al Ghal). V potravě těchto jedinců se nejčastěji objevovali motýli (*Lepidoptera*) a brouci (*Coleoptera*), v oblasti Wadí Al Hasa dominovali v jídelníčku zástupci brouků a v oblasti Al Ghal byla potrava složená většinou z motýlů. V závislosti na předchozích datech byla také vyslovena hypotéza, že se potrava *H. ariel* mění v závislosti na dostupnosti létající kořisti (Benda et al. 2010).



Obr. 12 Složení potravy *H. ariel* na poloostrově Sinai. (převzato z Benda et al. 2008).

2. Cíle práce

Z výše zmíněných informací je patrné, že v palearktické oblasti je ohledně rodu *Hypsugo* stále ještě dost problémů, které je třeba vyřešit. U všech tří zástupců rodu, kteří tuto oblast obývají, jsou poměrně jasně rozlišeny ekologické nároky i geografické rozšíření, byť i zde se stále objevují nové poznatky. Rovněž morfologicky se jedná o dobře definované druhy. Nejasnosti se objevují na vnitrodruhové úrovni, především z hlediska vymezení jednotlivých populací. Je tedy potřeba provést analýzu jak na vnitrodruhové, tak na mezidruhové úrovni.

Hlavním cílem této práce je tedy provést molekulárně genetickou analýzu populací netopýrů rodu *Hypsugo* v západní Palearktidě pomocí srovnání mitochondriálních a jaderných markerů a doplnit tak informace o mezidruhové a vnitrodruhové proměnlivosti těchto druhů vzhledem k poznatkům z morfologických analýz. Dalším dílčím úkolem je potvrdit vymezení samostatného rodu *Hypsugo*, který v minulosti patřil do rodu *Pipistrellus*, a tím náležitě revidovat taxonomické postavení rodu *Hypsugo* v západní Palearktidě.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Na začátku analýzy bylo k dispozici 291 vzorků tkání zástupců rodu *Hypsugo*. Celkem se podařilo nejméně jedním primerem (u většiny vzorků ale více primery) osekvenovat a následně analyzovat 220 vzorků DNA. Vzorky tkání pochází v drtivé většině ze sbírky Národního muzea. Seznam všech vzorků včetně označení haplotypů jednotlivých markerů je kvůli své délce uveden v přílohách 1 a 2.

Hypsugo arabicus se vyskytuje pouze na jihu Íránu a na severovýchodě Ománu, a právě z těchto oblastí pochází i vzorky použité pro fylogenetickou analýzu. Jedná se o okolí vsi Pir Sohrab v íránské provincii Sístán a Balúčistán a také o severozápad Ománu. Areál *Hypsugo ariel* lemuje západ Arabského poloostrova a byl nalezen i v Egyptě a Súdánu. Pro tuto analýzu byly úspěšně sekvenovány a analyzovány vzorky jedinců z Ománu, Jemenu, Jordánska a dva vzorky z Egypta. *Hypsugo savii* je v západní Palearktidě rozšířen od západu Středomoří až po Střední Asii. Pro tuto analýzu byly úspěšně osekvenovány a analyzovány vzorky z Maroka, Španělska, Itálie, Slovinska, Švýcarska, Maďarska, České republiky, Bulharska, Chorvatska, Černé Hory, Ukrajiny (Krym), Sýrie, Libanonu, Íránu, Kypru, Gruzie a Řecka, ke kterým se přidali sekvence ze Švýcarska, Španělska a Turecka z databáze GenBank. Další sekvence, které jsou k dispozici v GenBank nebyly přidány, neboť nebyly dostatečně dlouhé.

3.2. Molekulární analýza

3.2.1. Izolace DNA

Izolaci DNA z dostupných tkáňových vzorků provedla Marina Kipson, která měla původně v plánu tuto analýzu vypracovat.

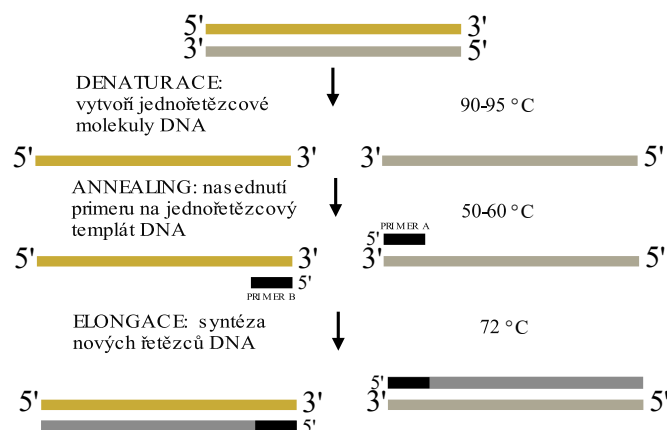
3.2.2. Amplifikace DNA

Z izolované DNA bylo pomocí polymerázové řetězové reakce amplifikováno celkem šest genů. Konkrétně se jednalo o dva mitochondriální (mtDNA) a čtyři jaderné (nDNA) geny, které se amplifikovaly pomocí různých primerů (popsáno níže). Proces amplifikace probíhal za pomoci polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction), čili zkráceně PCR.

Polymerase chain reaction (PCR), neboli polymerázová řetězová reakce je metoda molekulární biologie, která má za úkol opakovaně amplifikovat (zmnožit) DNA z předem určených vzorků. Principem PCR je opakovaná denaturace dvouřetězcové DNA, následovaná renaturací (annealing) osamocených řetězců s primery, které byly do reakce přidány. Na konci reakce následuje syntéza (extension, elongation) nového řetězce DNA.

Při denaturaci, která probíhá při teplotě 90–95 °C dochází k rozpojení řetězců DNA. Následně dochází ke zchlazení na 50–60 °C a k napojení specifických primerů na dva rozpojené řetězce. K syntéze nové DNA dochází v dalším kroku, při kterém se zvýší teplota na 72 °C. Tyto tři operace se opakují v cyklech, kterých bývá zpravidla 20 až 30, což zajistí, že se DNA exponenciálně zmnoží (viz obr. 13) (Sambrook et al. 1989, Degen et al. 2006).

SCHÉMA PCR



Tento proces se opakuje v cyklech (obvykle 30 cyklů)

Obr. 13 Základní schéma polymerázové řetězové reakce (vytvořeno v programu Inkscape).

Reakce se provádí v termocykleru, v němž se teplota mění v automaticky naprogramovaných časových intervalech. Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně vytvoří až miliarda kopií vybraného úseku cílové molekuly. Jejich přítomnost v reakční směsi se prokazuje pomocí gelové elektroforézy. Metoda PCR je náchylná na kontaminaci výsledného produktu (Šmarda et al. 2008). Podmínky cyklů musí být optimálně nastaveny, aby došlo k co nejlepšímu výsledku. Pokud jsou parametry (teplota, čas, počet opakování) PCR nižší, nebo naopak vyšší, může docházet ke ztrátě dat nebo může PCR skončit neúspěchem (viz obr. 14.) (Degen et al. 2006).

Cycling Parameter	Value Used in Standard PCR ^a	Effect if Parameter Value Is Lower than Optimal ^b	Effect if Parameter Value Is Higher than Optimal ^b
Initial Denaturation	94°C 2 min	Few or no PCR products	Premature denaturation of polymerase, leading to reduced yield
Denaturation during Cycling	94°C 15 – 30 s	Reduced yield	Reduced yield
Primer Annealing	50 to 65°C ^c 30 – 60 s	Reduced yield	Formation of nonspecific products
Elongation	72°C 45 s – 2 min ^d	Reduced yield	▶ Reduced yield ▶ Increased error rate
Total Number of Cycles	25 – 30	Reduced yield	Formation of nonspecific products
Final Elongation	72°C 7 min	Products are not fully double-stranded	Formation of nonspecific products

^{a)} With Taq DNA Polymerase; copied from standard PCR protocol (Chapter 4, section 4.1). Other enzyme systems will require different parameter values.

^{b)} From Aoyagi (2001). Effects are generally independent of the enzyme system used.

^{c)} Optimal temperature depends on primer melting temperature.

^{d)} Elongation time depends on fragment length; for Taq DNA Polymerase, the recommended times are 45 seconds for targets that are 1 kb or shorter, 1 minute for 1.0 – 1.5 kb, and 2 minutes for 1.5 – 3.0 kb.

Obr. 14 Základní data pro polymerázovou řetězovou reakci a možné dopady nedodržení doporučených postupů (převzato z Degen et al. 2006).

3.2.1.1. Mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA (mtDNA) je malá, zpravidla kruhová molekula DNA o velikosti 16569 bází, která je v buňkách přítomná v několika stovkách až tisícovkách kopií. Pro své mnohé výhody je mitochondriální DNA často používána pro mapování genetické variability. Je relativně malá a snadno izolovatelná, nepodléhá rekombinaci nebo má ve srovnání s jadernými sekvencemi vyšší evoluční rychlost (Avisé 2004).

Gen pro Cytochrom *b* je mezi mitochondriálními DNA markery nejlépe prozkoumán a popsán. Délka tohoto genu 1140 bp. Je považován za jeden z nejužitečnějších DNA markerů a často se využívá v kombinaci s dalšími markery (Irwin et al. 1991). Sledovaný gen pro Cytochrom *b* byl amplifikován pomocí pěti primerů. Tento počet byl zvolen proto, aby mohlo dojít k získání delšího fragmentu. Jednalo se o primery L15162 (Irwin et al. 1991), H15915 (Irwin et al. 1991), Molcit-F (Ibáñez et al. 2006), MVZ 16 (Smith et Patton 1993) a také o primer specifický pro *Hypsugo savii* Bsvs268H (Stadelmann et al. 2004) (viz tab. 4).

Tab. 4 Sekvence primerů pro amplifikaci mitochondriálního genu pro Cytochrom *b*.

Název primeru	Sekvence primeru	Citováno z:
L15162	5' - GCAAGCTTCTACCATGAGGACAA - 3'	Irwin et al. 1991
H15915	5' - AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC - 3'	Irwin et al. 1991
Bsvs268H	5' - ATTTCTGGYTTACAACACCRGTGTAA - 3'	Stadelmann et al. 2004
Molcit-F	5' - AATGACATGAAAAATCACCGTTGT - 3'	Ibáñez et al. 2006
MVZ 16	5' - AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT - 3'	Smith and Patton 1993

PCR reakční směs byla připravena v objemu 25 μ l a byla složena z 12,5 μ l PCR mixu (PPP Master Mix, Top-Bio), 8,5 μ l dvojité destilované vody (ddH₂O), 1 μ l od každého primeru a 2 μ l DNA daného vzorku. Samotná amplifikace vzorku začala počáteční denaturací DNA, na kterou navazovaly cykly popsané v tab. 5. Výsledná délka fragmentu byla 1140 bp.

Tab. 5 Popis PCR postupu pro amplifikaci genu *Cyt-b*. Číslo v závorce značí, o kolik stupňů se snížila teplota v každém cyklu. D = Denaturace, A = Annealing, E = Elongation.

Fáze	Počet opakování	Teplota	Čas
D	1	95 °C	5 minut
D	10	95 °C	30 sekund
A		60 °C (-1 °C)	105 sekund
E		72 °C	1 minuta
D	10	95 °C	30 sekund
A		60 °C (-1 °C)	105 sekund
E		72 °C	1 minuta
D	30	95 °C	30 sekund
A		50 °C	30 sekund
E		72 °C	1 minuta
E	1	72 °C	10 minut

Kontrolní region (D-loop) obsahuje replikační počátek pro jedno z vláken mtDNA, ale nekóduje žádné genové produkty. Obsahuje však hypervariabilní segmenty HV1 (16024–16365), HV2 (73–340), a také HV3 (438–574). Výskyt mutací v HV1 a HV2 úseku je 5–10x vyšší než v jaderné DNA. Na rozdíl od kódující oblasti mohou být na D-loop rozdíly mezi různými jedinci, protože není dále překládána a neobsahuje geny nutné k přežití buňky (Taanman 1999). Pro amplifikaci D-loop byly použity celkem tři primery, a to L16517, HSC (Fumagalli et al. 1996) a H607 (Wilmer et al. 1994) (viz tab. 6.). Zpětný primer HSC byl však použit jen u několika vzorků. PCR reakční směs byla vytvořena stejně jako směs pro amplifikaci Cytochromu-*b* a výsledný fragment měl délku 351 bp. Průběh PCR pro amplifikaci regionu D-loop je znázorněn v Tab. 7.

Tab. 6. Sekvence primerů pro amplifikaci regionu D-loop.

Název primeru	Sekvence primeru	Citováno z:
L16517	5' - CATCTGGTTCTTACTTCAGG - 3'	Fumagalli et al. 1996
HSC	5' - TTGTTTTAGGGGTTTGGCAAGA - 3'	Fumagalli et al. 1996
H607	5' - AGGACCCATCTAAGCATTTTCAGTG - 3'	Wilmer et al. 1994

Tab. 7. Popis PCR postupu pro amplifikaci D-loop. Číslo v závorce značí, o kolik stupňů se snížila teplota v každém cyklu. D = Denaturace, A = Annealing, E = Elongation.

Fáze	Počet opakování	Teplota	Čas
D	1	94 °C	5 minut
D	10	94 °C	1 minuta
A		63 °C (-0,5 °C)	1 minuta
E		72 °C	1 minuta
D	25	94 °C	1 minuta
A		58 °C	1 minuta
E		72 °C	1 minuta
E	1	72 °C	5 minut

3.2.1.2. Jaderná DNA

Samotná mitochondriální DNA často nemusí přesně odrážet fylogenezi. Pro doplnění nebo upřesnění výsledků analýzy se používají jaderné markery. Jaderná DNA se liší od mitochondriální svou velikostí i uspořádáním (Page et Holmes 1998). Pro tuto analýzu byly vybrány čtyři jaderné geny. Tři z nich jsou introny a čtvrtý je gen aktivující rekombinaci, proto název Rag2 (Recombination activating gene). Ten je oproti ostatním genům konzervativnější. Ostatní tři introny nesou označení COPS, STAT a ACOX.

Prvním amplifikovaným intronem byl acyl-koenzym A oxidáza 2 intron 3 (acyl-CoA oxidáza, ACOX2-3), jenž byl identifikován ve studii Igea et al. (2010). Pro tuto analýzu byly použity primery ACOX2-F1 a ACOX2-R1 (Salicini et al. 2011) (viz tab. 8).

Tab. 8. Sekvence primerů pro amplifikaci genu ACOX2-3.

Název primeru	Sekvence primeru	Citováno z:
ACOX2 F1	5' - CCTSGGCTCDGAGGAGCAGAT - 3'	Salicini et al. 2011
ACOX2 R1	5' - GGGCTGTGHAYCACAAACTCCT - 3'	Salicini et al. 2011

Reakční směs byla připravena podle předchozích vzorů a výsledný fragmenty byl dlouhý 382 bp. Průběh PCR pro amplifikaci intronu COPS je znázorněn v tab. 9.

Tab. 9. Popis PCR postupu pro amplifikaci ACOX2-3. Číslo v závorce značí, o kolik stupňů se snížila teplota v každém cyklu. D = Denaturace, A = Annealing, E = Elongation.

Fáze	Počet opakování	Teplota	Čas
D	1	95 °C	10 minut
D	17	95 °C	15 sekund
A		65 °C (-1 °C)	30 sekund
E		72 °C	1 minuta
D	17	95 °C	15 sekund
A		65 °C (-1 °C)	30 sekund
E		72 °C	1 minuta
D	30	95 °C	30 sekund
A		48 °C	30 sekund
E		72 °C	1 minuta
E	1	72 °C	5 minut

Druhým amplifikovaným intronem byl COP9 Signalzóm podjednotka 7A intron 4 (COP9 Signalsome subunit 7A, COPS7A-4). Na amplifikaci tohoto intronu byly použity primery COPS-F1 a COPS-R1 (Igea et al. 2010) (viz tab. 10).

Tab. 10. Sekvence primerů pro amplifikaci genu COPS7A-4.

Název primeru	Sekvence primeru	Citováno z:
COPS F1	5' - TACAGCATYGGRCGRGACATCCA - 3'	Igea et al. 2010
COPS R1	5' - TCACYTGCTCCTCRATGCCCKGACA - 3'	Igea et al. 2010

Reakční směs pro PCR byla vytvořena stejným způsobem a ve stejném objemu jako směs Cyt-*b* a výsledný fragment měl délku 559 bp. Průběh PCR pro amplifikaci tohoto intronu byl stejný jako u intronu ACOX.

Třetím intronem, který byl v této analýze využit, je převaděč signálu a aktivátor transkripce 5A (Signal Transducer and Activator of Transcription 5A, STAT5A). Pro jeho amplifikaci byly použity primery STAT5AF a STAT5AR (Eick et al. 2005) (viz tab. 11).

Tab. 11. Sekvence primerů pro amplifikaci genu STAT5A.

Název primeru	Sekvence primeru	Citováno z:
STAT5A F	5' - CTGCTCATCAACAAGCCCGA - 3'	Eick et al. 2005
STAT5A R	5' - GGCTTCAGGTTCCACAGGTTGC - 3'	Eick et al. 2005

Reakční směs byla znovu totožná s předchozími vzory. Výsledný fragment byl dlouhý 594 bp a průběh PCR pro amplifikaci byl stejný s předchozími jadernými introny.

Pro amplifikaci genu aktivující rekombinaci (Rag2) byly použity dva primery. První je primer s názvem F266, který nadesignovala Zuzana Kotyková Varadínová (Uvizl et al. 2019) a druhý je 968R (Stadelmann et al. 2007) (viz tab. 12). Samotná reakční směs byla připravena na 15 µl a byla složena ze 7,5 µl PCR směsi (Multiplex PCR Kit, QIAGEN), 4,8 µl dvojité destilované vody, 0,6 µl od každého primeru a 1,5 µl vzorku.

Tab. 12. Sekvence primerů pro amplifikaci genu Rag2.

Název primeru	Sekvence primeru	Citováno z:
F266	5' - TCAAAGRARGCTTAGARTCTGA - 3'	Uvizl et al. 2019
R968	5' - CCCATGTTGCTTCCAAACCATA - 3'	Stadelmann et al. 2007

Pro amplifikaci byly použity dva postupy PCR, jen proto aby bylo jisté, který má větší úspěšnost. Výsledný postup popisuje tab. 13.

Tab. 13. Popis PCR postupu pro amplifikaci Rag2. Číslo v závorce značí, o kolik stupňů se snížila teplota v každém cyklu. D = Denaturace, A = Annealing, E = Elongation.

Fáze	Počet opakování	Teplota	Čas
D	1	94 °C	3 minuty
D	5	93 °C	45 sekund
A		58 °C (-1 °C)	45 sekund
E		72 °C	1 minuta
D	5	93 °C	45 sekund
A		58 °C (-1 °C)	45 sekund
E		72 °C	1 minuta
D	29	93 °C	45 sekund
A		54 °C	45 sekund
E		72 °C	1 minuta
E	1	72 °C	5 minut

3.2.2. Elektroforéza

Po skončení PCR reakce byla úspěšnost amplifikace DNA ověřena pomocí agarózové elektroforézy. Kontrola elektroforézou byla prováděna na 1 % gelu. Ten byl připraven ze 100ml pufru TAE (Tris-acetát-EDTA), 1 mg agarózy (VWR Life Science AMRESCO Agarose ITM). Tato směs se poté zahřívala v mikrovlnné troubě tak dlouho, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agarózy (cca 2 minuty). Následně byla tato směs ochlazená pod tekoucí vodou na teplotu cca 40 °C. Po ochlazení byly do směsi přidány 2 µl Ethidium Bromidu (EtBr, 10 mg/ml) pro zviditelnění amplifikované DNA pod UV světlem. V průběhu realizace vlastního výzkumu byl do laboratoře pořízen GelRed™, který nahradil výše zmíněný ethidium bromid, který se považuje za mutagen, protože se interkaluje do DNA, což může způsobit problémy při replikaci DNA (Waring 1965). I když práce s EtBr v laboratoři nepřináší velké riziko, je nutné dodržovat bezpečnostní opatření. Právě z tohoto důvodu se ve většině laboratoří přechází na GelRed™, který je pro člověka bezpečnější (Haines et al. 2015).

Tento rozpuštěný agarózový gel byl nalit do připravené formy s hřebínky zajišťujícími vznik jamek pro PCR produkt. Tuhnutí gelu trvalo cca 30-40 minut při pokojové teplotě. Hotový gel byl použit rovnou k elektroforéze a do připravených jamek byly nanесeny 2 µl PCR produktu. Pro kontrolu byl do elektroforézy přidán délkový standard označující délku fragmentu (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder). Zda je či není gen přítomen v PCR produktu, bylo kontrolováno prosvícením gelu v UV skeneru (DNR Bio-Imaging Systéme MiniBIS), který byl napojen na počítačový program GelCapture Software.

3.2.3. Purifikace

Pokud agarozová elektroforéza potvrdila přítomnost daného genu, byl zbylý PCR produkt purifikován, aby mohlo dojít k sekvenaci. Pro většinu PCR produktů byla použita purifikace pomocí octanu sodného. PCR produkt byl přepipetován do 1,5 ml zkumavky společně s 2,3 µl roztoku octanu sodného (pH 5,2) a 23 µl zmraženého 100 % ethanolu. Tato směs byla po dobu 10 minut odstředována v centrifuze (Nüve NF 800R) při otáčkách 14 000 rpm. Po odsátí supernatantu bylo přidáno 23 µl 75 % ethanolu a směs byla znovu odstředěna stejným způsobem (10 minut, 14 000 rpm). Následně byl opět odsán supernatant a nechal se vyschnout ethanol. Po vysušení bylo přidáno 20 µl ddH₂O a v přístroji Nanodrop byla kontrolována kvalita PCR produktu.

Druhý způsob purifikace byl použit pro vzorky intronů STAT a Rag2. Purifikace probíhala za pomoci ExoSap kitu (USB-IT). Do mikroplata o 96 jamkách se nanoslo 10 µl PCR produktu, a to proto, aby mohl být poté produkt sekvenován z obou stran (pro sekvenaci z jedné strany stačí 5 µl PCR produktu). Do každé jamky se poté přidaly 4 µl ExoSapu. Následně se plato utěsnilo hliníkovou folií a vložilo se do termocykleru, kde se všech 96 PCR produktů purifikovalo celkem 1 hodinu a 14 minut. Po purifikaci se odstranila aluminiová folie a plato se uzavřelo pomocí plastových víček. Před odesláním na sekvenaci byly přidány k platu i oba primery potřebné k sekvenaci. Primery byly přidány zvlášť ve dvou mikrozukumavkách.

3.2.4. Sekvence a alignmenty

Sekvenaci Sangerovou metodou prováděla společnost Macrogen, Inc. (Soul, Jižní Korea). Pro práci se sekvencemi byl použit program Geneious 11.1.4 (Biomatters Ltd.). V programu se provádělo spojení sekvencí získaných pomocí obou primerů. Následně byly sekvence seřazeny a byl proveden alignment pro jednotlivé geny. Jelikož byla délka sekvencí v mnoha případech různá, došlo k seříznutí všech sekvencí na největší společnou délku. V programu Geneious byla provedena i konkatenace. Nejprve byly konkatenovány mitochondriální geny a poté jaderné geny.

3.3. Fylogenetické analýzy

3.3.1. Maximum likelihood (ML)

Jednou z metod pro tvorbu fylogenetického stromu byla Maximum likelihood neboli metoda maximální pravděpodobnosti. Jedná se o znakovou konstrukční metodu, která předpokládá, že se do náhodného výběru dostávají znaky s různou pravděpodobností. Vybrán je strom, který má největší pravděpodobnost (je nejvěrohodnější) pro danou topologii (Felsenstein 1981, Cvrčková 2006). Pro všechny alignmenty, včetně konkatenovaných, byly pomocí webového rozhraní IQ Tree, které používá verzi programu IQ-TREE 1. 6. 12. (Trifinopoulos et al. 2016) vypočítány evoluční modely pomocí programu ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al. 2017) (viz tab. 14), který za pomoci Bayesovského informačního kritéria (BIC) vyhledal nejvhodnější evoluční model. To vše probíhalo díky Ultrafast bootstrap doplňku, který urychlil analýzu (Hoang et al. 2018). Před vytvořením fylogenetického stromu pomocí Tree inference bylo potřeba nahrát tzv partition file (Chernomor et al. 2016), který u konkatenovaných alignmentů přesně určoval, jaký evoluční model se uplatní, na jakou část alignmentu (viz tab. 15). Následně byl program spuštěn a výsledkem byl fylogenetický strom (Nguyen et al. 2015).

Tab. 14. Navržené evoluční modely dle ModelFinder pro jednotlivé geny.

gen	kritérium	navrhnutý model
Cyt <i>b</i>	BIC	TIM2+F+I+G4
D-loop	BIC	K2P+G4
ACOX	BIC	HKY+F+G4
COPS	BIC	K2P+G4
STAT5a	BIC	K3Pu+F+G4
Rag2	BIC	K2P+G4

Tab. 15. Navržené evoluční modely dle ModelFinder pro analýzy konkatenovaných alignmentů.

konkatenované alignmenty	kritérium	Výsledné modely	
mitochondriální	<i>Cyt b</i>	BIC	TIM2+F+I+G4
	D-loop	BIC	TVM+F+G4
jaderný	ACOX	BIC	TN+F+G4
	COPS	BIC	K2P+I+G4
	STAT5a	BIC	TN+F+G4
	Rag2	BIC	K3P+I+G4
celková matrix	<i>Cyt b</i>	BIC	TIM2+F+I+G4
	D-loop	BIC	TVM+F+G4
	ACOX	BIC	TN+F+G4
	COPS	BIC	K2P+I+G4
	STAT5a	BIC	TN+F+I+G4
	Rag2	BIC	K3P+I+G4

3.3.2. Bayesovská analýza (BA)

Tato metoda hledá strom, který nejlépe vystihuje vstupní data (počítá pravděpodobnost s jakou strom vysvětluje vstupní data – „posteriorní pravděpodobnost“). Také využívá substituční modely evoluce sekvencí DNA. Vychází z náhodně zvolené topologie, kterou obměňuje na základě Markovových řetězců Monte Carlo (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) (Metropolis et al. 1953, Hastings 1970, Larget et Simon 1999). Stromy s nejvyššími posteriorními pravděpodobnostmi byly ukládány do paměti a na základě nich je vytvořen výsledný strom, který obsahuje informaci o spolehlivosti jednotlivých větví, ta odpovídá procentu stromů v paměti, které danou větev obsahují. Tato analýza je prováděna programem MrBayes (Huelsenbeck et Ronquist 2001, Ronquist et Huelsenbeck 2003), konkrétně se jedná o verzi 3.2.7a, která je dostupná online a analýzy se provádí prostřednictvím webového rozhraní Cipres science gateway (Miller et al. 2015).

Substituční modely byly vybrány dle výsledku evolučních modelů na ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al. 2017), ale do MrBayes lze zadat pouze omezený počet modelů. Dle toho bylo zadáno nastavení programu (příkaz nst). V závislosti na parametrech „I“, „G“ či „I+G“ ve zvoleném evolučním modelu bylo bráno v potaz, zda některé pozice v alignmentech byly konstantní či tyto pozice byly proměnlivé v rámci gamma distribuce nebo dokonce kdy pozice byly konstantní, avšak byla variabilní míra těchto pozic dle gamma distribuce. Počet generací byl stanoven u mtDNA na 10 000 000, z nichž každá tisící generace byla uložena v podobě stromu i s délkami větví. U jaderné DNA byl počet generací stanoven na 30 000 000, neboť při nižším počtu generací tato analýza nekonvergovala. Pro zjištění konvergence byl použit program Tracer v1.7.2. (Rambaut et al. 2018). Pokud není nastaveno jinak, program po příkazu sump odřízne 25 % počátečních generací, tedy generací, u nichž nebylo dosaženo ustálení frekvence určitých topologií. Ze zbylých generací vytvoří konsenzuální strom.

3.3.3. P-distance

V rámci analýzy proběhlo i určení podobnosti sekvencí na základě počtu rozdílných pozic v sekvenci k délce sekvence. Toto rozlišení se nazývá p-distance (Strimmer et al. 2009). Pro výpočet p-distancí byl použit program MEGA11 (Tamura et al. 2021) a sekvence byly rozděleny podle geografických oblastí sběru dat (viz tab. 16).

Tab. 16 Rozdělení sekvencí *Hypsugo savii* pro analýzu p-distancí podle oblasti sběru vzorků.

označení oblasti	seznam zemí/oblastí
<i>H. s. Španělsko</i>	Španělsko
<i>H. s. Ita, Mor, Swi</i>	Maroko, Itálie, Švýcarsko
<i>H. s. centr. Evropa</i>	Česká republika, Rakousko, Maďarsko, Slovinsko
<i>H. s. Balkán</i>	Chorvatsko, Bulharsko, Černá Hora
<i>H. s. Kréta, pev. Řec.</i>	pevninské Řecko, Kréta
<i>H. s. Simi, Rhodos</i>	Simi, Rhodos
<i>H. s. Bl. východ</i>	Kypr, Írán, Sýrie, Libanon, Ukrajina (Krym), Gruzie, Turecko

3.3.4. Haplotypové sítě

Haplotypové sítě se používají při analýze populačních genetických dat k vizualizaci vztahů na vnitrodruhové úrovni, stejně jako k vyvozování závěrů o biogeografii a historii populací. Pro tuto analýzu byly použity pouze sekvence genu pro *Cyt-b*. Na základě těchto dat bylo vytvořeno celkem pět haplotypových sítí. První pro *H. arabicus*, druhá pro *H. ariel* a další tři pro *H. savii*. K vytvoření haplotypových sítí byl využit program PopART, verze 1.7 (Leigh et Bryant 2015) a sítě se tvořily na základě algoritmu *median-joining* (Bandelt et al. 1999).

3.4. Zkratky

a) zkratky z tabulek s biometrickými údaji druhů rodu *Hypsugo*

ACo – výška koronoidního výběžku mandibuly

ANc – výška mozkovny

CC – šířka rostra přes horní špičáky u korunek

CM³ – délka horní řady zubů od přední části špičáku k zadní části třetího moláru

CM3 – délka spodní řady zubů od přední části špičáku k zadní části třetího moláru

LaI – šířka interorbitálního zúžení

LaInf – infraorbitální šířka

LaM – mastoidální šířka

LaN – šířka mozkovny

LA_t – délka předloktí včetně zápěstí

LA_u – délka ušního boltce

LaZ – šířka mezi lícními kostmi

LBT – největší horizontální délka bubínkové výdutě

LC – délka těla

LC_b – rostrální šířka mezi podočnicovými útvary

LC_d – délka ocasu

LC_r – největší délka lebky

LM_d – kondylární délka dolní čelisti

LTr – délka tragu

M – průměr hodnot

M³M³ – šířka přes třetí horní moláry

max – maximální naměřená hodnota

min – minimální naměřená hodnota

n – počet jedinců

b) zkratky zemí, ze kterých pochází vzorky použité v analýze

Aus – Rakousko

Bul – Bulharsko

Cro – Chorvatsko

Cyp – Kypr

CZ – Česká republika

Egy – Egypt

Gab – Gabon

GB – Velká Británie

Geo – Gruzie

Gre – Řecko

Hu – Maďarsko

Ir – Írán

Ita – Itálie

JAR – Jihoafrická republika

Jor – Jordánsko

Ken – Keňa

Leb – Libanon

Mon – Černá Hora

Mor – Maroko

Om – Omán

Slo – Slovinsko

Spa – Španělsko

Swi – Švýcarsko
Syr – Sýrie
Tan – Tanzánie
Tur – Turecko
Ukr – Ukrajina
Yem – Jemen

c) obecné zkratky vyskytující se v textu

ACOX – acyl-CoA oxidáza
BIC – Bayesovské informační kritérium
BP – bootstrap percentage
C – špičák
COPS – COP9 Signalzóm
Cyt-*b* – Cytochrom *b*
ddH₂O – dvojitě destilovaná voda
D-loop – kontrolní region D-loop
DNA – deoxyribonukleová kyselina
EtBr – Ethidium bromid
H – haplotyp
HVI – hypervariabilní region I
HVII – hypervariabilní region II
HVIII – hypervariabilní region III
I – řezák
I – řezák
M – stolička
M – stolička
MCMC – Monte Carlo metoda Markovových řetězců (Markov Chain Monte Carlo)
ML – analýza maximální věrohodnosti (Maximum Likelihood)
mtDNA – mitochondriální DNA
nDNA – jaderná DNA
NMP – Národní museum, Praha
O – outgroup
P – třenový zub
P – třenový zub
PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PP – posterior probability
Rag2 – gen aktivující rekombinaci (Recombination activating gene)
Rpm – otáčky za minutu
STAT – převaděč signálu a aktivátor transkripce (Signal Transducer and Activator of Transcription)
TAE – Tris-acetát-EDTA
UV – ultrafialový

4. Výsledky

4.1. Molekulární analýza

Pro tuto diplomovou práci bylo k dispozici celkem 291 tkáňových vzorků netopýrů rodu *Hypsugo*, z nichž většina (178 vzorků) pocházela ze sbírky Národního muzea v Praze. Ze všech tkáňových vzorků se podařilo izolovat DNA u 268 vzorků (36 vzorků *H. arabicus*, 34 vzorků *H. ariel* a 198 vzorků *H. savii*). Úspěšně sekvenováno alespoň jedním primerem bylo nakonec 220 vzorků DNA. Multilokusový dataset rodu *Hypsugo* byl sestaven ze dvou mitochondriálních a čtyř jaderných markerů. Gen pro *Cyt-b* byl úspěšně osekvenován a analyzován u 154 vzorků DNA (z toho 26 vzorků DNA *H. arabicus*, 22 vzorků *H. ariel* a 106 vzorků *H. savii*) a *Rag2* byl úspěšně osekvenován a analyzován u 152 vzorků DNA (z toho 24 vzorků *H. arabicus*, 19 vzorků *H. ariel* a 110 vzorků *H. savii*) (viz tab. 17). U ostatních markerů nebyla úspěšnost amplifikace a sekvenace tak velká. Do analýzy genu pro *Cyt-b* byly přidány 4 publikované sekvence z GenBank.

Tab.17 Přehled úspěšně analyzovaných genů jedinců rodu *Hypsugo* z původních 291 vzorků.

	Cyt <i>b</i>	D-loop	ACOX	COPS	STAT5a	Rag2
<i>H. savii</i>	106	57	33	46	52	110
<i>H. arabicus</i>	26	18	29	19	15	24
<i>H. ariel</i>	22	8	28	18	24	19

4.2. Fylogenetická analýza

Pro fylogenetickou analýzu byly použity alignmenty sekvencí jednotlivých genů a následně zkonkatenované alignmenty. Jako první byly vyhodnoceny evoluční modely. V tab. 14. jsou uvedeny modely, které mají nejvyšší váhu podle BIC podle ModelFinder. Navrhované evoluční modely byly zadávány jako jeden z parametrů do následujících analýz. U alignmentu, který byl konkatenován z více genů navrhl Model Finder evoluční modely pro každý gen zvlášť a uložil ho do tzv. "partition model" souboru, který definoval evoluční model pro každou část konkatenovaného alignmentu zvlášť. Výsledné fylogenetické stromy (ML i BA) mají stejnou topologii, rozdíl je jen v podpořených uzlech. U analýzy ML bylo více podpořených uzlů než u analýzy BA, byla tedy vybrána pro prezentaci do této práce. Na fylogenetických stromech najdeme barevné tečky, které značí porovnání jednotlivých uzlů, na kterých byla posteriorní pravděpodobnost (posterior probability, PP) vyšší nebo rovna hodnotě 0,95 a procento bootstrapu (bootstrap percentage, BP) vyšší nebo rovno 70 %.

4.2.1. Mitochondriální DNA

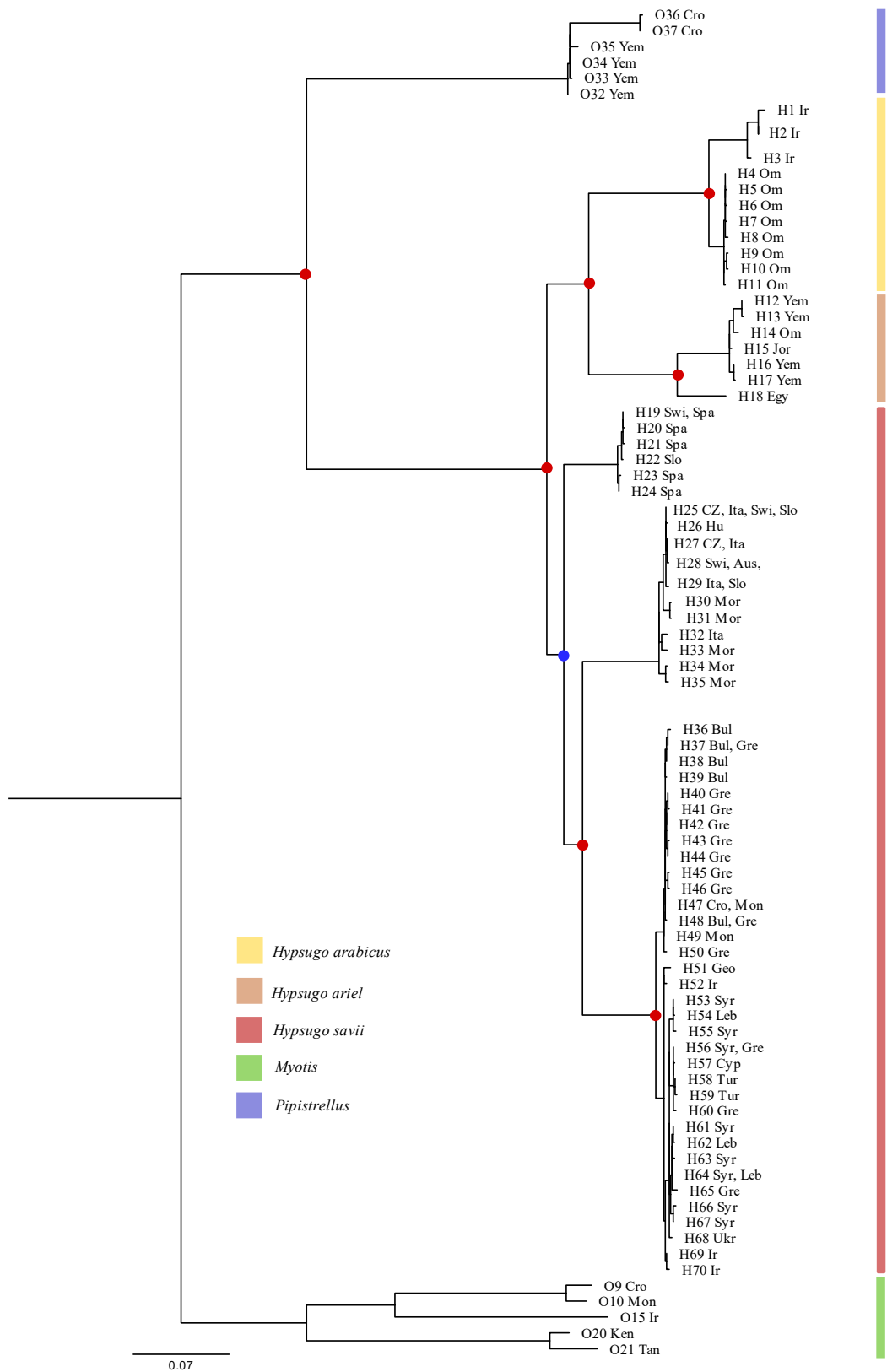
Amplifikace mtDNA probíhala poměrně jednoduše a povedlo se tak získat sekvenční data dvou třetin všech vzorků. Nejlépe vyšla amplifikace genu *Cyt-b*, kterou jsme získali sekvence všech tří druhů, které byly pro tuto práci použity. Publikovanými sekvencemi tohoto genu se navíc dataset rozšířil o další druhy rodu *Myotis*, jeden druh rodu *Pipistrellus*, jeden druh rodu *Nycticeinops* a několik druhů rodu *Neoromicia*, které zde posloužily jako outgroup. Dataset byl doplněn o další 4 sekvence druhu *H. savii* ze Španělska, Švýcarska, a Turecka (viz příloha 2).

Podle analýzy *Cyt-b* (viz obr. 15) vykazuje *H. arabicus* celkem jednotné uspořádání, které rozděluje iránské a ománské populace. U čtyř osekvenovaných jedinců z Íránu byly nalezeny tři různé haplotypy s maximálně sedmi substitucemi. Průměr p-distancí dosahoval u těchto jedinců hodnoty 0,66 %. Ománských vzorků *H. arabicus* se podařilo osekvenovat celkem 26 a bylo u nich nalezeno 9 různých haplotypů s maximální vzdáleností dvou substitucí a průměrem p-distancí v hodnotě 0,2 %. Íránské a ománské jedince ale oddělovalo celkem 36 substitucí a průměrná hodnota p-distancí mezi oběma skupinami vzorků byla 4,2 %. Nejvyšší hodnota p-distancí mezi jedinci *H. arabicus* byla 4,78 %.

Sesterskou skupinou *H. arabicus* se ukázal být *H. ariel*. Vnitrodruhové uspořádání tohoto druhu ukazuje příbuznost jedinců z Ománu, Jemenu a Jordánska. Jedinci z těchto zemí vytvořili celkem 6 různých haplotypů a měli mezi sebou rozdíl maximálně 10 substitucí. Hodnoty nekorigovaných p-distancí mezi nimi byly v průměru do 1 %. Velmi výrazně z druhu *H. ariel* vystupují v tomto stromu dva jedinci z Egypta, jejichž vzdálenost od ostatních jedinců tohoto druhu je nejméně 70 substitucí a hodnota p-distancí vůči ostatním jedincům *H. ariel* byla vyšší než 6 %.

Na bázi fylogenetického stromu druhu *H. savii* se nachází linie tvořena především španělskými jedinci, které dopňují jedinci ze Slovinska a Švýcarska. V další pozici větvení se oddělují dvě hlavní linie *H. savii*, První linii tvoří zejména jedinci ze střední Evropy, Itálie, a Maroka. V této linii se ale objevují i zástupci Slovinska a Švýcarska. Druhou linii tvoří zástupci populací Balkánského poloostrova a Blízkého východu. Mezi těmito dvěma liniemi je průměrná hodnota p-distancí vyšší než 8 %. Další větvení druhé linie ji rozděluje tuto linii na dvě další podlinie. První tvoří zástupci populací Balkánu a druhou zástupci populací Blízkého východu. Problematickou skupinou jsou vzorky z Řecka.

Zástupci pevninského Řecka a Kréty se v analýze *Cyt-b* zařadili do podlinie společně s dalšími vzorky z Balkánu. Zástupci populací z ostrovů Simi a Rhodos se ale rozdělili. Někteří spadají do Balkánské podlinie a někteří do blízkovýchodní podlinie. Mezi jedinci z Balkánu a Blízkého východu je značná příbuznost. Tyto podlinie odděluje nejméně 15 substitucí a hodnota p-distancí mezi nimi je v průměru od 1–2 %. Španělští jedinci se podle hodnoty p-distancí od všech ostatních populací ve střední Evropě a Itálii liší nejvíce. Nejbližší jsou španělským populacím populace ze Švýcarska. Hodnoty p-distancí všech skupin lze najít v tab. 18–20.



Obr. 15 Výsledný fylogenetický strom vypočítaný ze sekvencí genu pro *Cyt-b* metodou ML. Červené kolečko značí $PP \geq 0,95$ a $BP \geq 70\%$, modré kolečko vyjadřuje pouze $BP \geq 70\%$.

Tab. 18. Přehled vypočítaných **minimálních** p-distancí sekvencí pro gen Cyt-*b*. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>H. arabicus</i> Írán	0,00%												
2 <i>H. arabicus</i> Omán	3,74%	0,00%											
3 <i>H. ariel</i> Egypt	12,36%	12,06%	0,00%										
4 <i>H. ariel</i> Jordánsko	12,90%	12,06%	6,07%	0,00%									
5 <i>H. ariel</i> Omán	12,80%	12,06%	6,45%	0,65%	0,00%								
6 <i>H. ariel</i> Jemen	12,90%	12,06%	6,26%	0,47%	0,93%	0,00%							
7 <i>H. s.</i> Španělsko	11,89%	11,78%	11,31%	11,50%	11,50%	11,68%	0,00%						
8 <i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	12,06%	11,50%	11,12%	11,50%	11,68%	11,68%	0,00%	0,00%					
9 <i>H. s.</i> centr. Evropa	11,99%	11,87%	11,31%	11,40%	11,59%	11,59%	0,19%	0,00%	0,00%				
10 <i>H. s.</i> Balkán	13,08%	12,80%	12,15%	12,79%	12,79%	12,42%	8,09%	8,09%	8,09%	0,00%			
11 <i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	13,08%	12,71%	12,06%	12,62%	12,62%	12,24%	8,04%	8,04%	8,04%	0,00%	0,00%		
12 <i>H. s.</i> Simi, Rhodos	13,21%	12,92%	12,15%	12,52%	12,52%	12,34%	8,02%	8,02%	8,02%	0,19%	0,09%	0,00%	
13 <i>H. s.</i> Bl. východ	13,18%	12,71%	12,52%	12,34%	12,34%	12,15%	7,66%	7,66%	7,66%	1,31%	1,50%	0,00%	0,00%

Tab. 19. Přehled vypočítaných **maximálních** p-distancí sekvencí pro gen Cyt-*b*. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

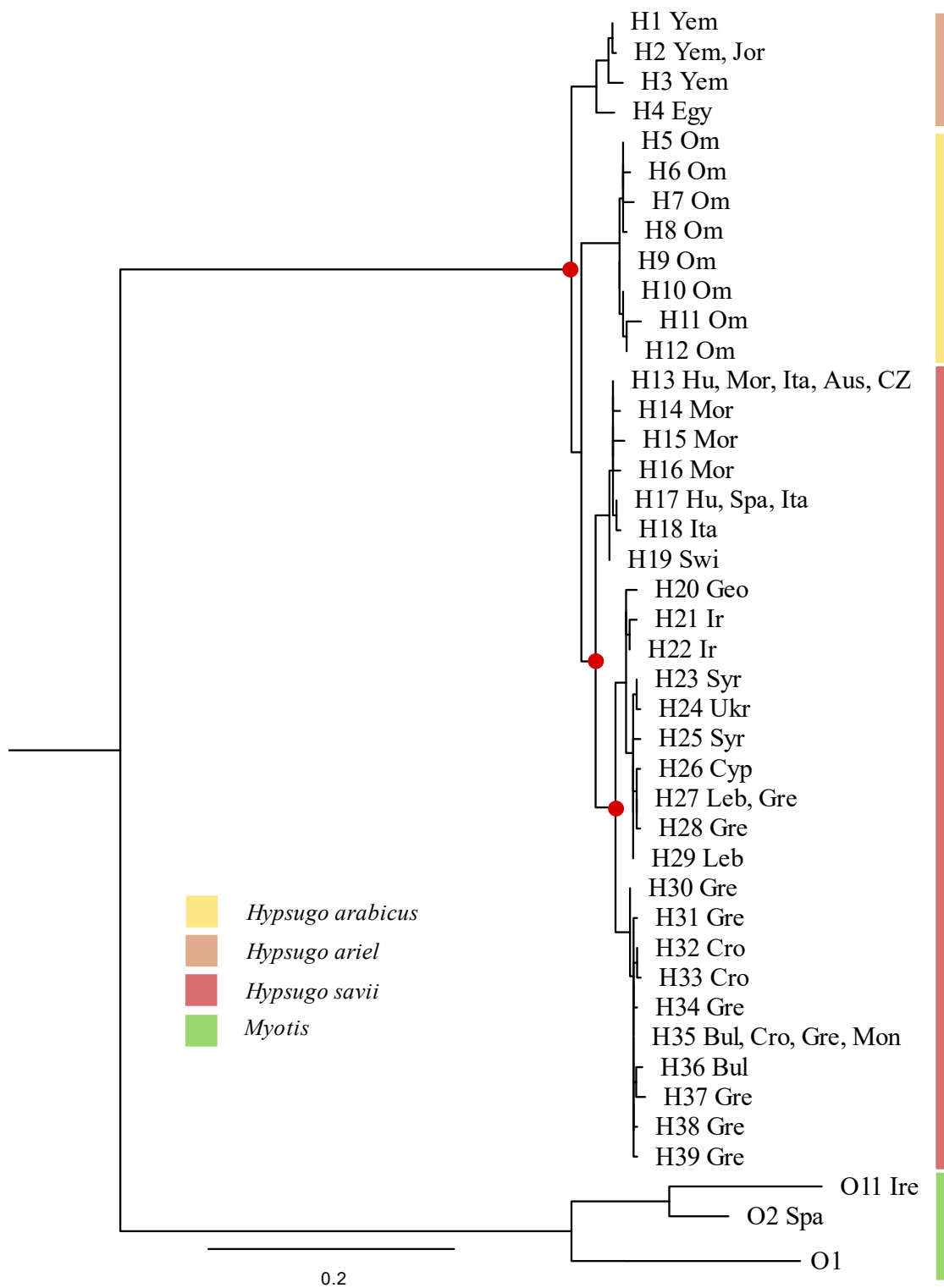
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>H. arabicus</i> Írán	1,22%												
2 <i>H. arabicus</i> Omán	4,78%	0,56%											
3 <i>H. ariel</i> Egypt	12,52%	12,24%	0,00%										
4 <i>H. ariel</i> Jordánsko	12,99%	12,43%	6,07%	0,00%									
5 <i>H. ariel</i> Omán	12,92%	12,43%	6,45%	0,65%	0,00%								
6 <i>H. ariel</i> Jemen	13,27%	12,71%	6,54%	1,12%	1,03%	1,31%							
7 <i>H. s.</i> Španělsko	13,27%	12,62%	11,98%	12,64%	12,55%	12,92%	8,60%						
8 <i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	13,50%	13,32%	11,87%	12,62%	12,93%	13,1%	10,39%	10,5%					
9 <i>H. s.</i> centr. Evropa	12,92%	12,64%	11,78%	12,43%	12,34%	12,71%	8,77%	8,68%	8,58%				
10 <i>H. s.</i> Balkán	13,83%	13,27%	12,36%	13,11%	13,11%	13,39%	8,80%	9,08%	9,17%	0,47%			
11 <i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	13,83%	13,27%	12,34%	12,99%	12,99%	13,27%	8,79%	9,07%	9,15%	0,66%	0,47%		
12 <i>H. s.</i> Simi, Rhodos	14,21%	13,64%	13,08%	13,08%	13,08%	13,36%	9,44%	9,72%	9,82%	2,53%	2,43%	2,43%	
13 <i>H. s.</i> Bl. východ	14,22%	13,65%	13,17%	12,99%	13,09%	13,09%	9,42%	9,70%	9,72%	2,45%	2,35%	2,35%	1,13%

Tab. 20. Přehled vypočítaných **průměrných** p-distancí sekvencí pro gen Cyt-*b*. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>H. arabicus</i> Írán	0,66%												
2 <i>H. arabicus</i> Omán	4,20%	0,20%											
3 <i>H. ariel</i> Egypt	12,42%	12,08%	0,00%										
4 <i>H. ariel</i> Jordánsko	12,93%	12,28%	6,07%	0,00%									
5 <i>H. ariel</i> Omán	12,86%	12,28%	6,45%	0,65%	0,00%								
6 <i>H. ariel</i> Jemen	13,08%	12,37%	6,41%	0,85%	0,96%	0,62%							
7 <i>H. s.</i> Španělsko	12,47%	12,05%	11,70%	11,88%	11,85%	12,01%	4,37%						
8 <i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	12,33%	12,14%	11,52%	11,78%	11,89%	11,96%	4,28%	3,59%					
9 <i>H. s.</i> centr. Evropa	12,34%	12,21%	11,46%	11,59%	11,76%	11,82%	4,06%	2,63%	1,40%				
10 <i>H. s.</i> Balkán	13,46%	13,01%	12,26%	12,85%	12,85%	12,71%	8,43%	8,63%	8,73%	0,12%			
11 <i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	13,41%	12,93%	12,20%	12,79%	12,79%	12,65%	8,40%	8,61%	8,72%	0,23%	0,23%		
12 <i>H. s.</i> Simi, Rhodos	13,63%	13,15%	12,47%	12,81%	12,81%	12,73%	8,53%	8,78%	8,93%	1,01%	1,09%	1,30%	
13 <i>H. s.</i> Bl. východ	13,61%	13,10%	12,79%	12,61%	12,62%	12,56%	8,59%	8,90%	9,10%	1,83%	1,91%	1,43%	0,61%

Amplifikace kontrolního regionu D-loop se podařila pouze u třetiny dostupných vzorků. Celkově získané sekvence regionu D-loop nebyly tak čisté jako sekvence cytochromu *b*, možná z důvodu nízké specificity použitých primerů. Analýza se tedy zdařila pouze u 83 vzorků a bylo nalezeno 39 haplotypů. Je nutno podotknout, že délka sekvencí byla jen 351 bp., což je velmi krátký úsek, a to mohlo ovlivnit výsledky této analýzy. Výsledky p-distancí mezi skupinami jedinců jsou znázorněny v tab. 21–23.

Podle analýzy sekvencí regionu D-loop je *H. ariel* na bázi stromu rodu *Hypsugo* a *H. arabicus* a *H. savii* jsou sesterské druhy (viz obr. 16). *Hypsugo ariel* je stejně jako u výsledků analýzy *Cyt-b* celkem uniformní, až na jedince z Egypta, kteří se odlišovali vyšším počtem substitucí. U *Hypsugo ariel* byly nalezeny 4 haplotypy. *Hypsugo arabicus* se v případě analýzy D-loop jeví jako sesterský druh k *H. savii* a vnitrodruhově je velmi uniformní. *Hypsugo arabicus* se rozdělil na 8 haplotypů. *Hypsugo savii* se zde dělí na dvě linie. První linií jsou evropské a severoafrické vzorky, které byly ve fylogenetickém stromu *Cyt-b* rozděleny na dvě samostatné linie. Sesterskou skupinou těmto jedincům jsou balkánští a blízkovýchodní zástupci *H. savii*. Tato linie se nadále větví právě na balkánskou a blízkovýchodní větev. V obou těchto větvích se znovu nachází Řecké vzorky, a to hlavně proto, že řecké vzorky pocházely z několika oblastí. Jednalo se o pevninské Řecko, ostrov Kréta, ostrov Rhodos a ostrov Simi.



Obr. 16 Výsledný fylogenetický strom vypočítaný ze sekvencí pro kontrolní region D-loop metodou ML. Červené kolečko značí $PP \geq 0,95$ a $BP \geq 70\%$.

Tab. 21 Přehled vypočítaných **minimálních** p-distancí sekvencí kontrolního regionu D-loop. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	<i>H. arabicus</i> Omán	0,00%										
2	<i>H. ariel</i> Egypt	5,30%	0,00%									
3	<i>H. ariel</i> Jordánsko	5,67%	2,88%	0,00%								
4	<i>H. ariel</i> Jemen	5,33%	2,59%	0,00%	0,29%							
5	<i>H. s.</i> Španělsko	1,37%	2,05%	2,05%	2,05%	0,00%						
6	<i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	1,37%	2,05%	2,05%	2,05%	0,00%	0,00%					
7	<i>H. s.</i> centr. Evropa	1,35%	2,03%	2,03%	2,03%	0,00%	0,00%	0,00%				
8	<i>H. s.</i> Balkán	5,94%	7,16%	6,63%	6,63%	0,68%	0,68%	0,68%	0,00%			
9	<i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	5,61%	6,88%	6,34%	6,34%	0,68%	0,68%	0,68%	0,00%	0,00%		
10	<i>H. s.</i> Simi, Rhodos	5,94%	6,92%	5,80%	5,80%	0,68%	0,68%	0,68%	0,00%	0,00%	0,00%	
11	<i>H. s.</i> Bl. východ	6,27%	6,30%	5,76%	5,76%	0,68%	0,68%	0,68%	2,57%	2,29%	0,00%	0,00%

Tab. 22 Přehled vypočítaných **maximálních** p-distancí sekvencí kontrolního regionu D-loop. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	<i>H. arabicus</i> Omán	2,29%										
2	<i>H. ariel</i> Egypt	7,18%	0,00%									
3	<i>H. ariel</i> Jordánsko	7,60%	2,94%	0,00%								
4	<i>H. ariel</i> Jemen	7,83%	3,50%	1,76%	1,74%							
5	<i>H. s.</i> Španělsko	7,36%	7,10%	7,23%	7,17%	2,48%						
6	<i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	6,29%	6,29%	6,42%	6,31%	2,46%	0,99%					
7	<i>H. s.</i> centr. Evropa	6,57%	6,03%	6,14%	6,09%	2,42%	0,68%	0,29%				
8	<i>H. s.</i> Balkán	8,60%	7,78%	7,33%	7,56%	5,52%	4,30%	4,58%	1,15%			
9	<i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	8,45%	7,49%	7,04%	7,27%	5,33%	4,08%	4,37%	0,88%	0,58%		
10	<i>H. s.</i> Simi, Rhodos	8,86%	8,05%	7,60%	7,83%	6,13%	5,26%	5,14%	4,01%	3,79%	4,29%	
11	<i>H. s.</i> Bl. východ	8,33%	7,23%	6,76%	7,00%	6,17%	5,30%	5,17%	4,03%	3,81%	4,29%	2,01%

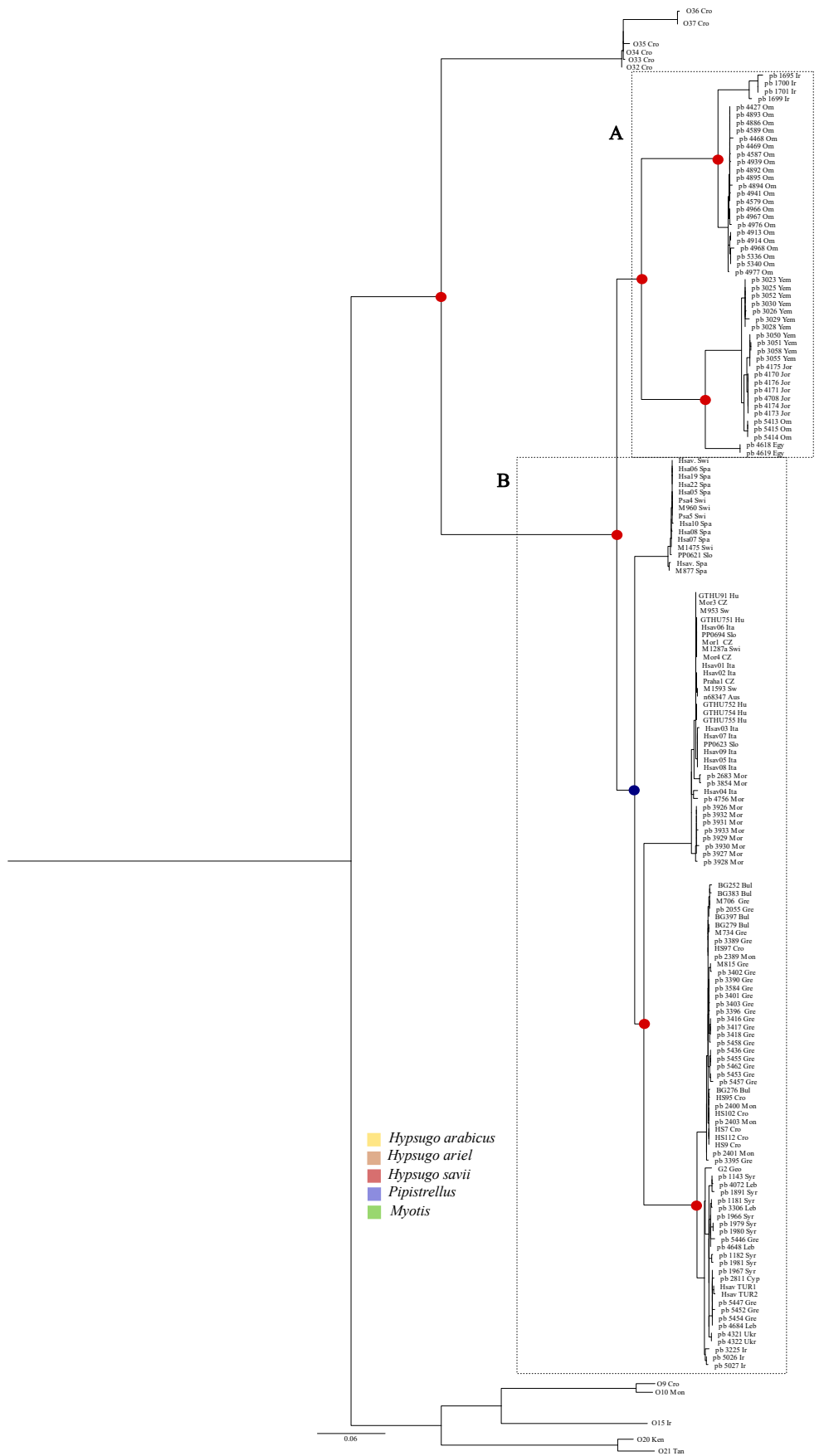
Tab. 23 Přehled vypočítaných **průměrných** p-distancí sekvencí kontrolního regionu D-loop. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	<i>H. arabicus</i> Omán	0,56%										
2	<i>H. ariel</i> Egypt	6,23%	0,00%									
3	<i>H. ariel</i> Jordánsko	6,55%	2,90%	0,00%								
4	<i>H. ariel</i> Jemen	6,54%	2,99%	0,68%	1,16%							
5	<i>H. s.</i> Španělsko	4,61%	5,06%	5,11%	5,01%	0,77%						
6	<i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	4,84%	5,35%	5,40%	5,27%	0,45%	0,23%					
7	<i>H. s.</i> centr. Evropa	4,93%	5,31%	5,36%	5,26%	0,36%	0,14%	0,06%				
8	<i>H. s.</i> Balkán	7,28%	7,40%	6,89%	7,06%	3,34%	3,51%	3,58%	0,35%			
9	<i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	7,14%	7,23%	6,71%	6,89%	3,27%	3,43%	3,51%	0,35%	0,26%		
10	<i>H. s.</i> Simi, Rhodos	7,32%	7,27%	6,59%	6,76%	3,58%	3,78%	3,84%	1,32%	1,22%	1,86%	
11	<i>H. s.</i> Bl. východ	7,07%	6,76%	6,12%	6,26%	3,70%	4,00%	4,01%	3,24%	3,09%	2,53%	1,12%

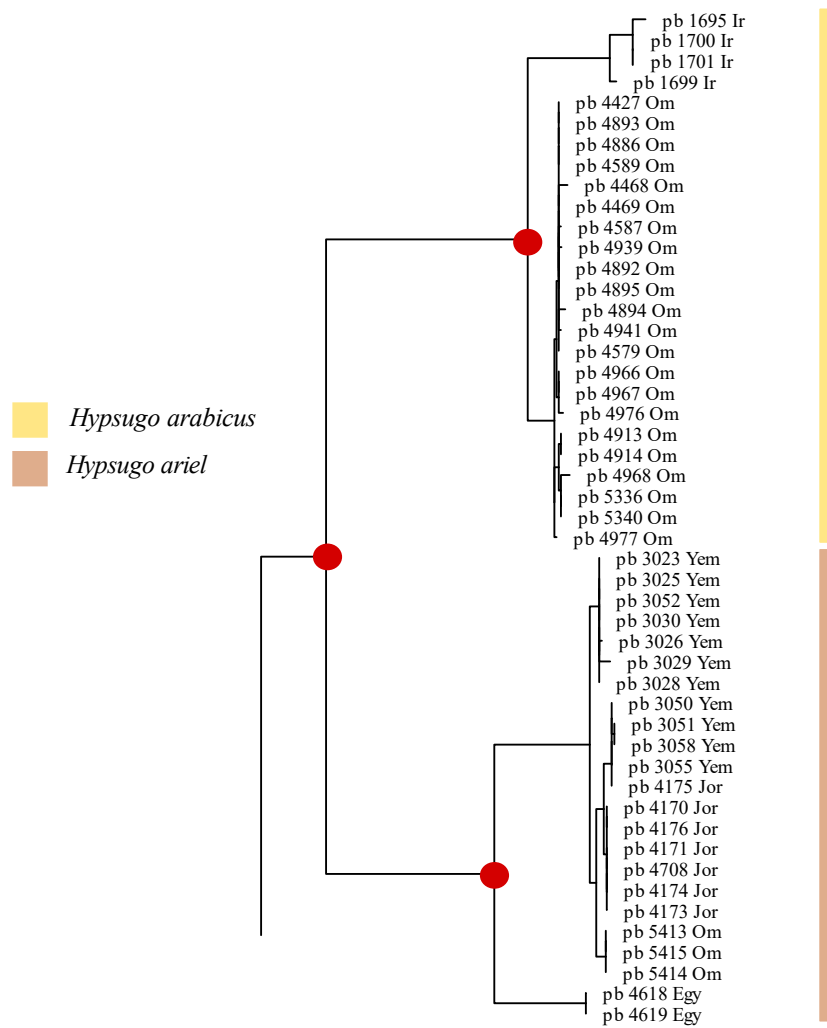
Na fylogenetickém stromu spočteném z konkatenované mitochondriální matrix se jeví *H. ariel* a *H. arabicus* jako sesterské druhy. *Hypsugo ariel* vykazuje příbuznost jedinců z Jemenu, Ománu a Jordánska. Právě tyto tři země se v rámci populací ve fylogenetickém stromu oddělily. Samostatně pak stojí dva jedinci z Egypta, kteří se podle analýzy genu pro *Cyt-b* jeví jako samostatný druh na základě p-distance. U *H. arabicus* se oddělili jedinci z Íránu od ománských jedinců. Jedinci z Ománu vykazují značnou uniformitu a jen nepatrné rozdíly.

Na tomto stromu je patrné dělení *H. savii* do několika linií. V první linii jsou zástupci západní Evropy, Slovinska a Švýcarska a tato linie se oddělila na bázi části stromu tohoto druhu. V další pozici větvení se rozděluje *H. savii* na dvě další linie, tato divergence ale není dostatečně podpořena (viz obr. 17). První linii tvoří zástupci z Maroka, Itálie, České republiky, Maďarska a objevují se tu také jedinci ze Švýcarska a Slovinska. Druhou linii tvoří zástupci Balkánu a Blízkého východu. Tato linie se následně štěpí na dvě podlinie. První tvoří zástupci Chorvatska, Bulharska, Černé Hory a Řecka (pevninské Řecko, Kréta a dva jedinci z ostrova Simi). Do druhé podlinie patří zástupci Íránu, Sýrie, Libanonu, Kypru, Gruzie, Krymu, Rhodu a zbývající jedinci z ostrova Simi.

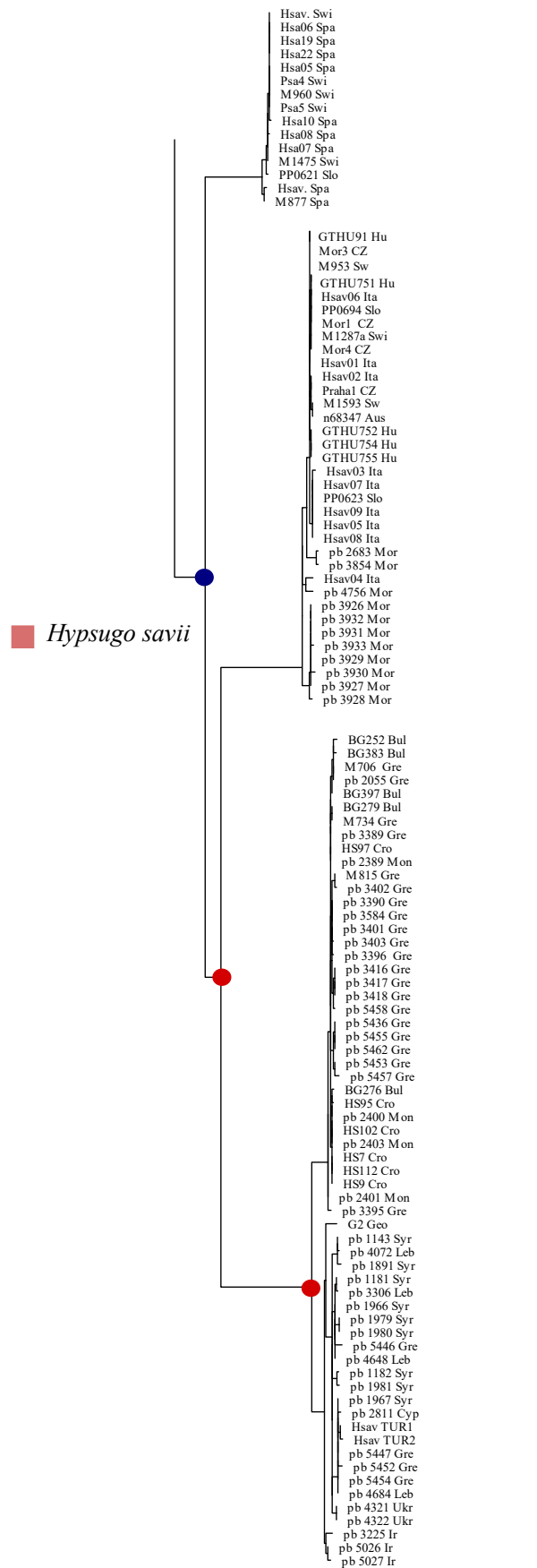
Ačkoliv se na konkatenovaném fylogenetickém stromu ukázalo několik jedinců stejného haplotypu, tento strom nebyl zkracován, neboť nelze s přesností určit, jak se haplotyp tvořil. Vzorků pro gen pro *Cyt-b* bylo téměř dvakrát více než vzorků pro kontrolní region D-loop, a není jisté, čím byl výsledný konkatenovaný strom více ovlivněn. Díky nerovnoměrnému zastoupení obou markerů je ovšem třeba výpovědní hodnotu této části analýzy považovat za omezenou. Pro přehlednost bylo zobrazení tohoto stromu rozděleno do dvou částí (viz obr. 18–19).



Obř. 17 Výřsledný fylogenetický řstrom vypořčítaný ze všech analyzovanřch mitochondřriálních řsekvencí metodou ML. řČervené koleřčko znařčí PP≥0,95 a BP≥70 %, modřré koleřčko vyjadřřřuje pouze BP≥70 %. řStrom je z důvodu mnoha vzorků rozdělen na dvě řčásti.



Obr. 18 Výsledný fylogenetický strom vypočítaný ze všech analyzovaných mitochondriálních sekvencí metodou ML. Červené kolečko značí $PP \geq 0,95$ a $BP \geq 70$ % (část A).

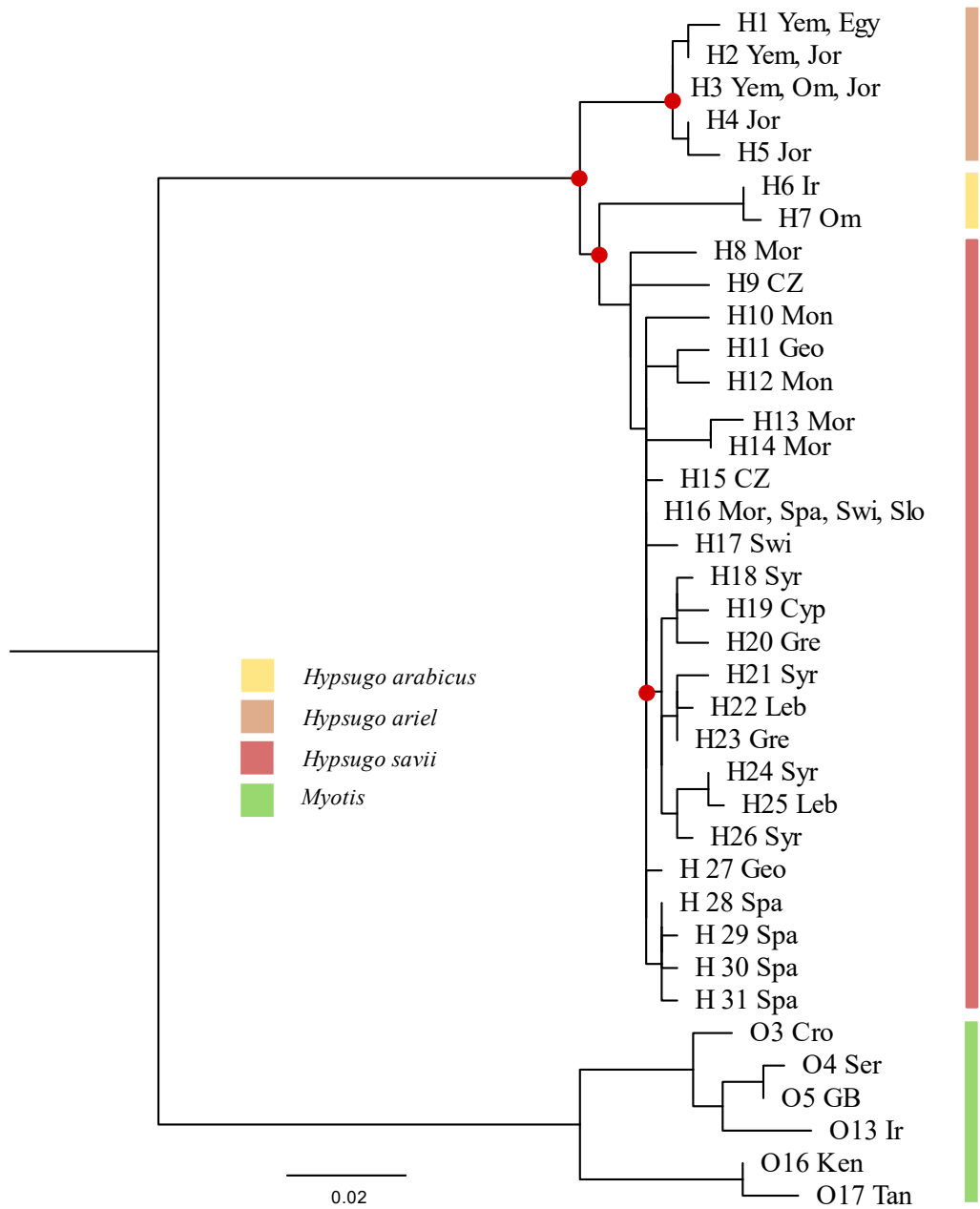


Obr. 19 Výsledný fylogenetický strom vypočítaný ze všech analyzovaných mitochondriálních sekvencí metodou ML. Červené kolečko značí $PP \geq 0,95$ a $BP \geq 70$ %, modré kolečko vyjadruje pouze $BP \geq 70$ % (část B).

4.2.2. Jaderná DNA

Ačkoliv byly dodrženy všechny postupy, došlo u některých jaderných markerů ke slabšímu výtěžku, a tedy k osekvenování méně vzorků.

Analýza intronu ACOX se zdařila u celkem 90 vzorků a bylo nalezeno celkem 31 haplotypů (viz obr. 20). U *Hypsugo ariel* bylo nalezeno celkem 5 haplotypů s maximální hodnotou p-distancí mezi nimi 4,58 %. *Hypsugo arabicus* se tu jeví jako sesterská skupina k *H. savii*. Íránští jedinci zaujímají samostatný haplotyp a to samé platí i pro jedince z Ománu, ačkoliv hodnota p-distancí mezi nimi je 0,26%. Sekvence *Hypsugo savii* se rozdělily do dvou linií. Daly by se označit za západní linii (Maroko, Španělsko, střední Evropa a Balkán) a východní linii (Blízký východ). Patrně vzhledem menšímu počtu amplifikovaných vzorků *H. savii* pro gen ACOX se nevymezilo u tohoto druhu více skupin. Výsledky p-distancí mezi skupinami jedinců jsou znázorněny v tab. 24–26.



Obr. 20 Výsledný fylogenetický strom vypočítaný ze sekvencí jaderného genu pro ACOX metodou ML. Červené kolečko značí $PP \geq 0,95$ a $BP \geq 70\%$.

Tab. 24 Přehled vypočítaných **minimálních** p-distancí sekvencí pro gen ACOX. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>H. arabicus</i> Írán	0,00%											
2 <i>H. arabicus</i> Omán	0,25%	0,00%										
3 <i>H. ariel</i> Egypt	3,85%	4,58%	0,00%									
4 <i>H. ariel</i> Jordánsko	3,57%	4,33%	0,51%	0,00%								
5 <i>H. ariel</i> Omán	3,57%	4,33%	0,76%	0,00%	0,00%							
6 <i>H. ariel</i> Jemen	3,57%	4,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%						
7 <i>H. s.</i> Španělsko	3,01%	3,29%	2,80%	2,54%	2,54%	2,54%	0,00%					
8 <i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	3,01%	3,29%	2,80%	2,54%	2,54%	2,54%	0,00%	0,00%				
9 <i>H. s.</i> centr. Evropa	3,01%	3,29%	2,80%	2,54%	2,54%	2,54%	0,00%	0,00%	0,26%			
10 <i>H. s.</i> Balkán	3,80%	4,05%	3,56%	3,31%	3,31%	3,31%	0,79%	1,01%	1,01%	2,03%		
11 <i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	3,54%	3,80%	3,31%	3,05%	3,05%	3,05%	0,26%	0,51%	0,51%	1,52%	0,00%	
12 <i>H. s.</i> Bl. východ	3,01%	3,29%	2,80%	2,54%	2,54%	2,54%	0,00%	0,00%	0,00%	1,01%	0,25%	0,25%

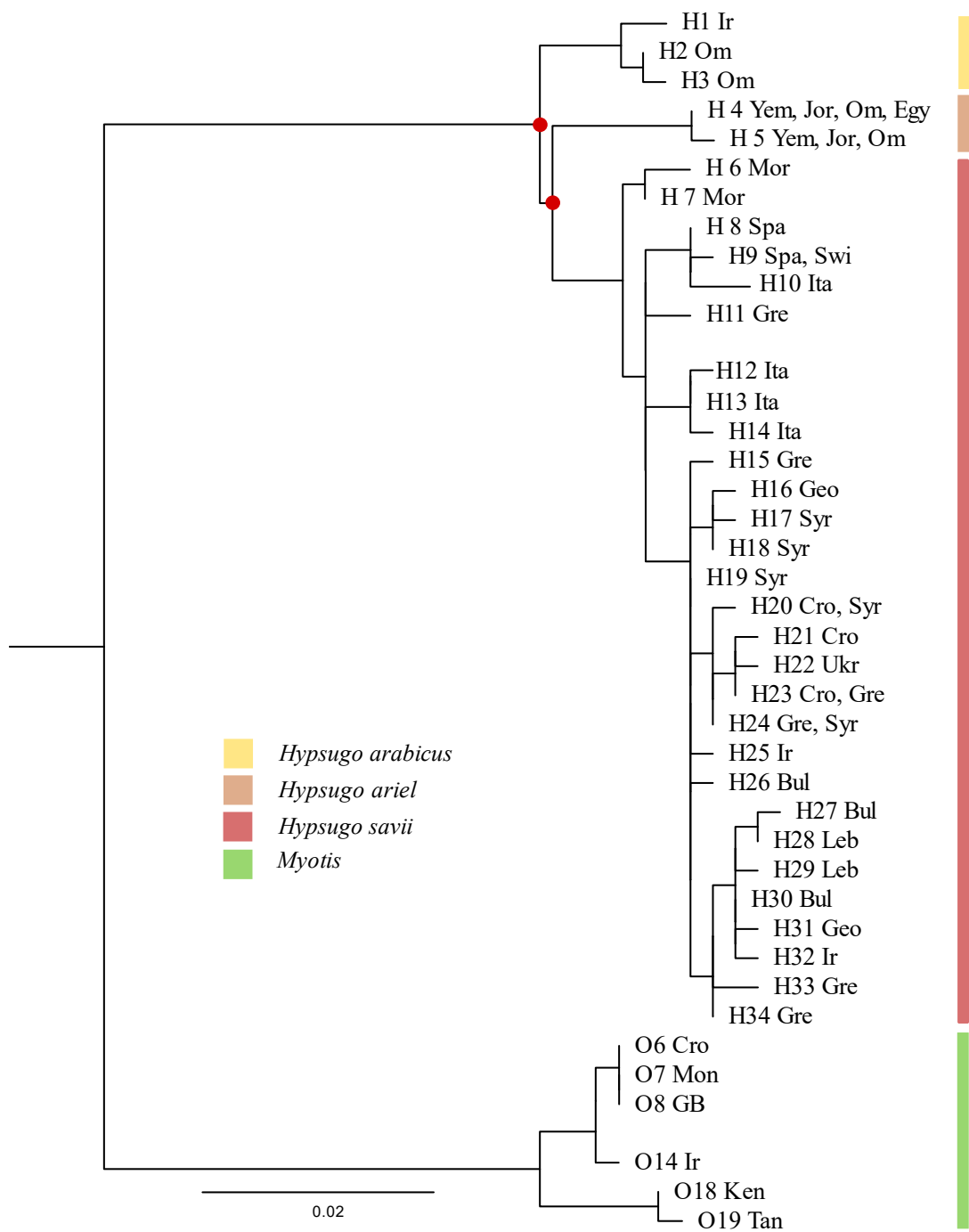
Tab. 25 Přehled vypočítaných **maximálních** p-distancí sekvencí pro gen ACOX. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>H. arabicus</i> Írán	0,00%											
2 <i>H. arabicus</i> Omán	0,27%	0,00%										
3 <i>H. ariel</i> Egypt	4,33%	4,58%	0,00%									
4 <i>H. ariel</i> Jordánsko	4,33%	4,58%	1,02%	1,02%								
5 <i>H. ariel</i> Omán	4,07%	4,33%	0,76%	0,76%	0,00%							
6 <i>H. ariel</i> Jemen	4,33%	4,58%	0,76%	1,02%	0,76%	0,76%						
7 <i>H. s.</i> Španělsko	4,70%	4,96%	4,46%	4,46%	4,20%	4,46%	2,87%					
8 <i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	3,54%	3,80%	3,31%	3,31%	3,05%	3,31%	1,83%	0,51%				
9 <i>H. s.</i> centr. Evropa	4,05%	4,30%	3,56%	3,56%	3,31%	3,56%	2,87%	1,77%	1,57%			
10 <i>H. s.</i> Balkán	4,10%	4,30%	3,82%	3,82%	3,56%	3,82%	2,35%	1,52%	2,28%	2,03%		
11 <i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	3,55%	3,80%	3,31%	3,31%	3,05%	3,31%	2,61%	1,52%	2,28%	2,03%	1,01%	
12 <i>H. s.</i> Bl. východ	4,10%	4,30%	3,82%	3,82%	3,56%	3,82%	2,87%	1,77%	2,28%	2,28%	2,03%	2,28%

Tab. 26 Přehled vypočítaných **průměrných** p-distancí sekvencí pro gen ACOX. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>H. arabicus</i> Írán	0,00%											
2 <i>H. arabicus</i> Omán	0,26%	0,00%										
3 <i>H. ariel</i> Egypt	4,21%	4,58%	0,00%									
4 <i>H. ariel</i> Jordánsko	4,18%	4,55%	0,64%	0,53%								
5 <i>H. ariel</i> Omán	3,95%	4,33%	0,76%	0,43%	0,00%							
6 <i>H. ariel</i> Jemen	4,18%	4,55%	0,23%	0,59%	0,53%	0,31%						
7 <i>H. s.</i> Španělsko	3,50%	3,80%	3,33%	3,30%	3,07%	3,30%	0,89%					
8 <i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	3,18%	3,46%	2,97%	2,94%	2,71%	2,94%	0,69%	0,34%				
9 <i>H. s.</i> centr. Evropa	3,47%	3,75%	3,17%	3,14%	2,91%	3,14%	1,05%	0,68%	1,03%			
10 <i>H. s.</i> Balkán	3,93%	4,18%	3,69%	3,66%	3,44%	3,66%	1,43%	1,18%	1,40%	2,03%		
11 <i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	3,55%	3,80%	3,31%	3,28%	3,05%	3,28%	1,16%	0,84%	1,13%	1,69%	0,68%	
12 <i>H. s.</i> Bl. východ	3,56%	3,82%	3,41%	3,40%	3,18%	3,39%	1,25%	0,90%	1,21%	1,65%	0,95%	1,20%

Analýza COPS se zdařila u celkem 83 vzorků a bylo nalezeno 35 haplotypů (viz obr. 21). Linie *Hypsugo arabicus* leží samostatně na bázi rodového stromu a *H. ariel* se jeví jako sesterská skupina k *H. savii*. U *Hypsugo arabicus* byly nalezeny 3 haplotypy. Íránské vzorky se oddělily od ománských a u ománských vzorků se jeden haplotyp oddělil samostatně od všech ostatních. Jedinci *H. arabicus* vytvořili dvě linie, bez geografického uspořádání a dva egyptští jedinci, kteří stáli v několika předchozích stromech stranou se nyní zařadili do jedné z těchto linií. Sekvence *Hypsugo savii* v tomto vytvořili sesterskou skupinu *H. ariel*. Diferenciovali se na dvě linie. Evropskou linii, která se ale poté geograficky nediferencuje, a východní linii, obsahující jedince z Balkánu a Blízkého východu. U *Hypsugo savii* bylo celkem nalezeno 29 různých haplotypů. Výsledky p-distancí mezi skupinami jedinců jsou znázorněny v tab. 27–29.



Obr. 21 Výsledný fylogenetický strom vypočítaný ze sekvencí jaderného genu COPS metodou ML. Červené kolečko značí $PP \geq 0,95$ a $BP \geq 70$ %.

Tab. 27 Přehled vypočítaných **minimálních** p-distancí sekvencí pro gen COPS. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>H. arabicus</i> Írán	0,00%											
2	<i>H. arabicus</i> Omán	0,58%	0,00%										
3	<i>H. ariel</i> Egypt	2,31%	2,12%	0,00%									
4	<i>H. ariel</i> Jordánsko	2,31%	2,12%	0,00%	0,00%								
5	<i>H. ariel</i> Omán	2,31%	2,12%	0,00%	0,00%	0,00%							
6	<i>H. ariel</i> Jemen	2,31%	2,12%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%						
7	<i>H. s.</i> Španělsko	1,92%	1,73%	1,93%	0,77%	1,93%	1,93%	0,19%					
8	<i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	2,31%	2,12%	2,12%	0,19%	2,12%	2,12%	0,00%	0,00%				
9	<i>H. s.</i> centr. Evropa	2,32%	2,13%	2,33%	0,19%	2,33%	2,33%	0,58%	0,00%	0,00%			
10	<i>H. s.</i> Balkán	2,31%	2,12%	1,93%	0,96%	1,93%	1,93%	0,77%	0,77%	0,77%	0,00%		
11	<i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	2,31%	2,12%	1,93%	0,96%	1,93%	1,93%	0,77%	0,77%	0,77%	0,00%	0,00%	
12	<i>H. s.</i> Simi, Rhodos	2,12%	1,92%	1,73%	1,16%	1,73%	1,73%	0,96%	0,96%	0,97%	0,19%	0,00%	0,38%
13	<i>H. s.</i> Bl. východ	2,12%	1,92%	1,93%	0,96%	1,93%	1,93%	0,77%	0,77%	0,77%	0,00%	0,00%	0,00%

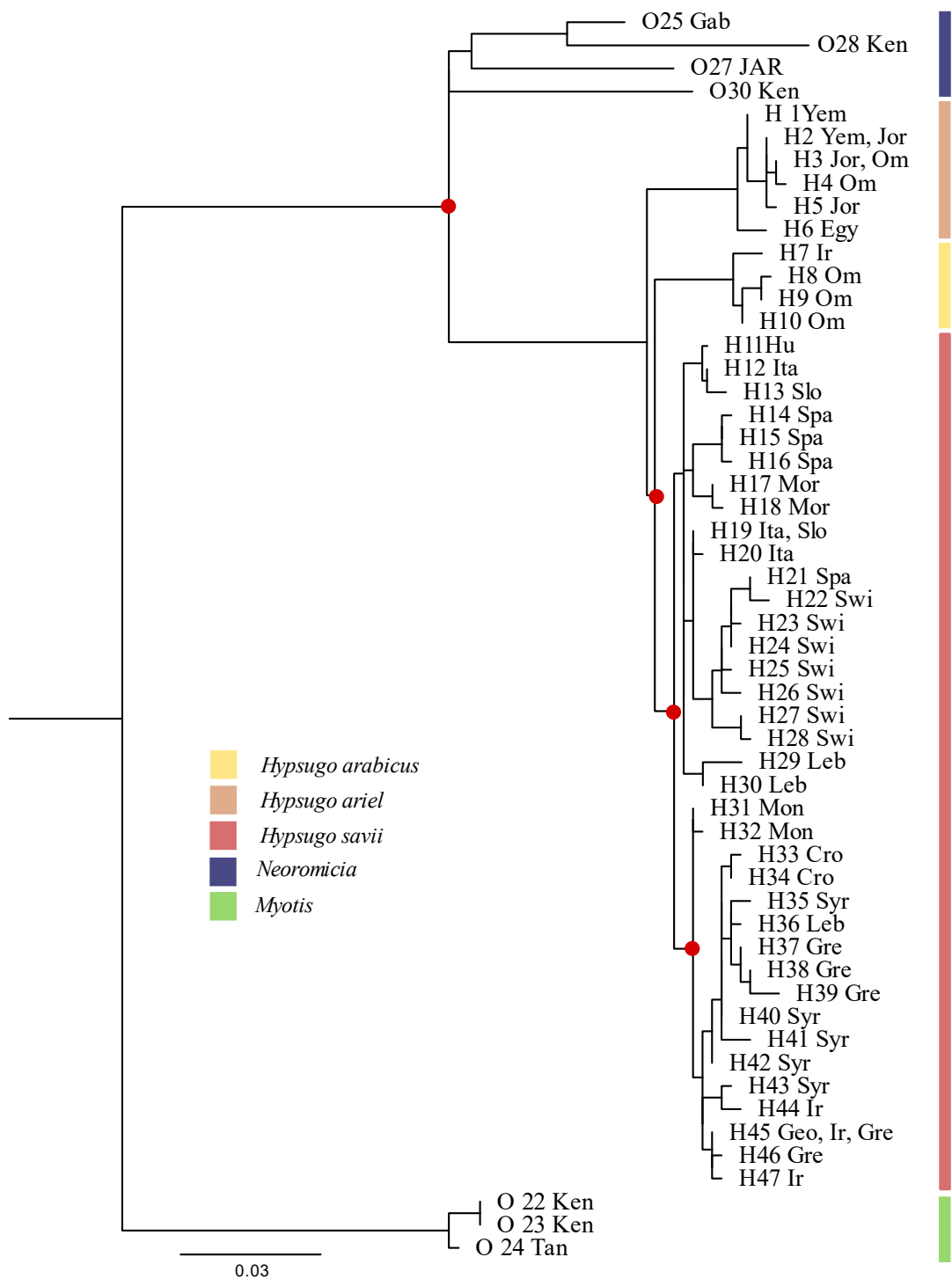
Tab. 28 Přehled vypočítaných **maximálních** p-distancí sekvencí pro gen COPS. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>H. arabicus</i> Írán	0,00%											
2	<i>H. arabicus</i> Omán	0,77%	0,19%										
3	<i>H. ariel</i> Egypt	2,31%	2,31%	0,00%									
4	<i>H. ariel</i> Jordánsko	2,50%	2,50%	2,12%	2,32%								
5	<i>H. ariel</i> Omán	2,50%	2,50%	0,19%	2,32%	0,19%							
6	<i>H. ariel</i> Jemen	2,50%	2,50%	0,19%	2,32%	0,19%	0,19%						
7	<i>H. s.</i> Španělsko	2,50%	2,50%	2,50%	2,70%	2,70%	2,70%	1,16%					
8	<i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	3,08%	3,08%	3,08%	3,28%	3,28%	3,28%	1,93%	1,73%				
9	<i>H. s.</i> centr. Evropa	2,32%	2,32%	2,33%	2,52%	2,52%	2,52%	0,78%	1,55%	0,00%			
10	<i>H. s.</i> Balkán	2,69%	2,69%	2,31%	2,50%	2,50%	2,50%	1,73%	2,31%	1,55%	0,96%		
11	<i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	2,50%	2,50%	2,31%	2,50%	2,50%	2,50%	1,73%	2,12%	1,35%	1,54%	1,35%	
12	<i>H. s.</i> Simi, Rhodos	2,50%	2,50%	2,12%	2,31%	2,31%	2,31%	1,54%	2,12%	0,97%	0,96%	1,35%	0,77%
13	<i>H. s.</i> Bl. východ	2,69%	2,69%	2,50%	2,70%	2,70%	2,70%	1,73%	2,12%	1,35%	1,15%	1,35%	1,15%

Tab. 29 Přehled vypočítaných **průměrných** p-distancí sekvencí pro gen COPS. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>H. arabicus</i> Írán	0,00%											
2	<i>H. arabicus</i> Omán	0,59%	0,02%										
3	<i>H. ariel</i> Egypt	2,31%	2,13%	0,00%									
4	<i>H. ariel</i> Jordánsko	2,48%	2,30%	0,41%	0,61%								
5	<i>H. ariel</i> Omán	2,38%	2,20%	0,06%	0,38%	0,13%							
6	<i>H. ariel</i> Jemen	2,38%	2,20%	0,06%	0,38%	0,09%	0,10%						
7	<i>H. s.</i> Španělsko	2,26%	2,03%	2,27%	2,24%	2,33%	2,33%	0,74%					
8	<i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	2,54%	2,35%	2,48%	2,39%	2,54%	2,54%	0,85%	0,76%				
9	<i>H. s.</i> centr. Evropa	2,32%	2,14%	2,33%	2,20%	2,39%	2,39%	0,73%	0,42%	0,00%			
10	<i>H. s.</i> Balkán	2,42%	2,24%	2,15%	2,18%	2,21%	2,21%	1,19%	1,34%	1,11%	0,53%		
11	<i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	2,42%	2,24%	2,09%	2,12%	2,16%	2,16%	1,11%	1,21%	0,99%	0,53%	0,48%	
12	<i>H. s.</i> Simi, Rhodos	2,40%	2,22%	2,02%	2,06%	2,09%	2,09%	1,15%	1,22%	0,97%	0,51%	0,44%	0,51%
13	<i>H. s.</i> Bl. východ	2,45%	2,27%	2,17%	2,18%	2,23%	2,23%	1,13%	1,18%	0,94%	0,55%	0,51%	0,47%

Analýza markeru STAT se zdařila u celkem 91 vzorků a bylo vymezeno 47 haplotypů (viz obr. 22). Ve fylogenetickém stromu tohoto markeru stojí *H. ariel* na bázi a *H. arabicus* a *H. savii* se zde jeví jako sesterské druhy. Sekvence *H. ariel* se rozdělily do 6 haplotypů, z nichž jeden je postaven samostatně a jedná se o dva zástupce *H. ariel* z Egypta. Dalších 5 haplotypů se mezi sebou liší pouze minimálně. *Hypsugo arabicus* se rozděluje se na 4 haplotypy, z nichž jeden samostatný je z Íránu, zbylé tři pocházejí z Ománu. Znovu se tedy opakuje vzor z předchozích analýz, nicméně hodnoty nekorigovaných p-distancí byly nižší než u genu pro *Cyt-b*. *Hypsugo savii* se zde rozděluje na znovu na evropskou linii a linii z Balkánu a Blízkého východu. Zajímavostí jsou ale dva haplotypy z Libanonu (H29 a H30), které se tu objevují ve skupině evropských zástupců. Tento jev se u předchozích fylogenetických stromu neobjevil. Výsledky p-distancí mezi skupinami jedinců jsou znázorněny v tab. 30–32.



Obr. 22 Výsledný fylogenetický strom vypočítaný ze sekvencí jaderného genu STAT5a metodou ML. Červené kolečko značí $PP \geq 0,95$ a $BP \geq 70\%$.

Tab. 30 přehled vypočítaných **minimálních** p-distancí sekvencí pro gen STAT. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>H. arabicus</i> Írán	0,00%												
2 <i>H. arabicus</i> Omán	0,80%	0,00%											
3 <i>H. ariel</i> Egypt	4,38%	4,38%	0,00%										
4 <i>H. ariel</i> Jordánsko	4,78%	4,38%	0,80%	0,00%									
5 <i>H. ariel</i> Omán	4,98%	4,58%	1,00%	0,00%	0,00%								
6 <i>H. ariel</i> Jemen	4,38%	3,98%	0,80%	0,00%	0,20%	0,00%							
7 <i>H. s.</i> Španělsko	3,38%	2,98%	3,62%	3,62%	3,82%	3,19%	0,00%						
8 <i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	2,98%	2,58%	3,39%	3,39%	3,59%	2,99%	0,40%	0,00%					
9 <i>H. s.</i> centr. Evropa	2,98%	2,58%	3,39%	3,39%	3,59%	2,99%	0,80%	0,00%	0,60%				
10 <i>H. s.</i> Balkán	2,99%	2,59%	3,20%	3,20%	3,40%	2,80%	1,01%	0,80%	0,80%	0,00%			
11 <i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	3,59%	3,19%	3,80%	3,80%	4,00%	3,40%	1,01%	1,00%	1,00%	0,20%	0,20%		
12 <i>H. s.</i> Simi, Rhodos	3,39%	2,99%	3,60%	3,60%	3,80%	3,20%	1,01%	0,80%	0,80%	0,20%	0,20%	0,00%	
13 <i>H. s.</i> Bl. východ	3,20%	2,80%	3,21%	3,21%	3,41%	2,81%	1,00%	0,60%	0,60%	0,20%	0,20%	0,00%	0,00%

Tab. 31 Přehled vypočítaných **maximálních** p-distancí sekvencí pro gen STAT. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

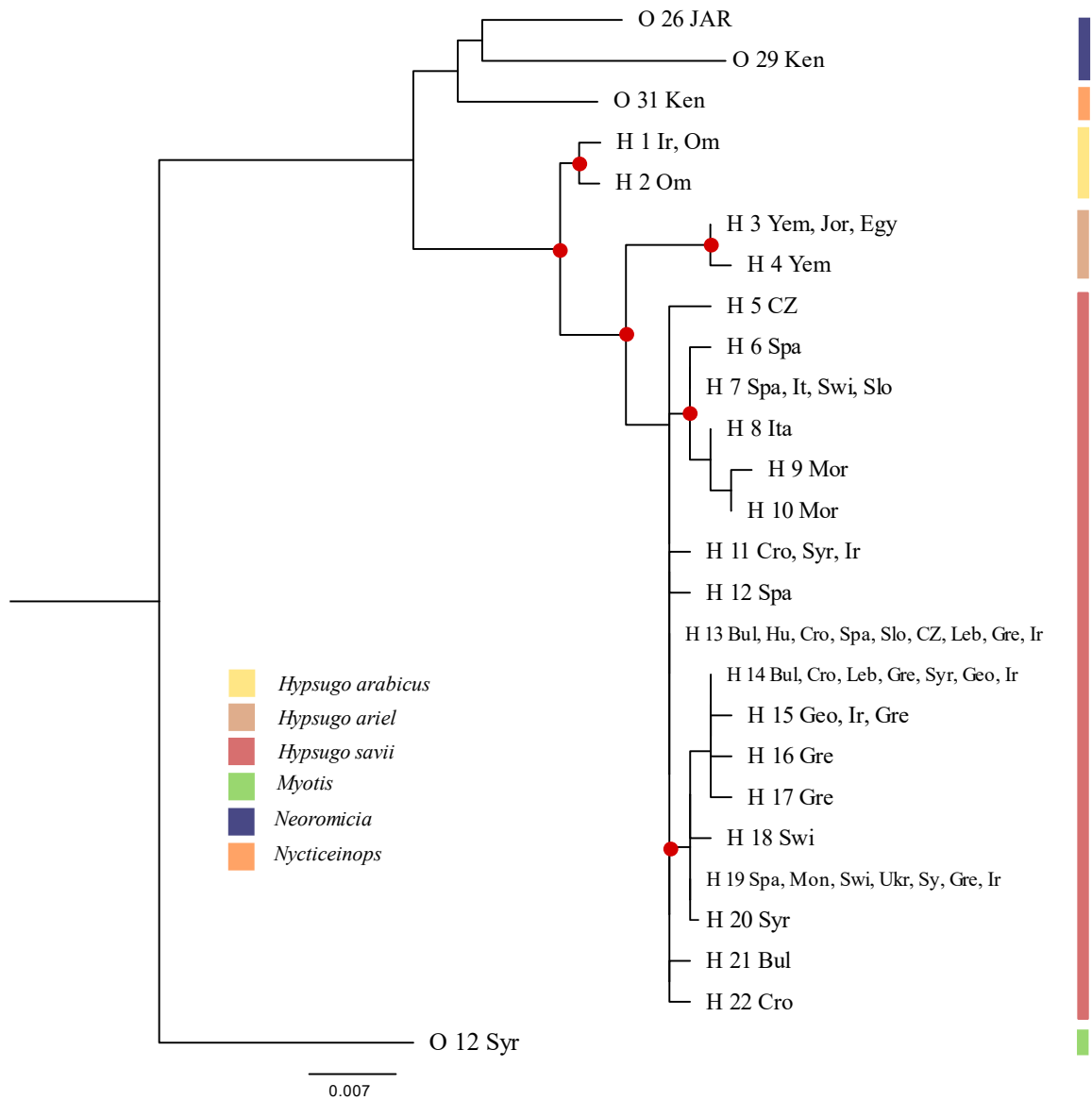
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>H. arabicus</i> Írán	0,00%												
2 <i>H. arabicus</i> Omán	1,19%	0,60%											
3 <i>H. ariel</i> Egypt	4,38%	4,78%	0,00%										
4 <i>H. ariel</i> Jordánsko	4,98%	5,18%	1,00%	0,40%									
5 <i>H. ariel</i> Omán	5,18%	5,18%	1,20%	0,60%	0,20%								
6 <i>H. ariel</i> Jemen	4,78%	4,98%	0,80%	0,60%	0,80%	0,40%							
7 <i>H. s.</i> Španělsko	3,83%	4,18%	4,19%	4,79%	4,99%	4,59%	1,91%						
8 <i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	4,18%	4,58%	4,59%	5,19%	5,39%	4,99%	2,34%	2,19%					
9 <i>H. s.</i> centr. Evropa	3,58%	3,78%	3,98%	4,18%	4,38%	3,98%	1,79%	2,19%	0,60%				
10 <i>H. s.</i> Balkán	3,79%	3,99%	4,00%	4,20%	4,40%	4,00%	2,00%	2,40%	1,80%	1,00%			
11 <i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	3,99%	4,19%	4,21%	4,41%	4,60%	4,21%	2,20%	2,59%	2,00%	1,20%	1,20%		
12 <i>H. s.</i> Simi, Rhodos	3,39%	3,59%	3,60%	3,80%	4,00%	3,60%	1,60%	2,00%	1,40%	0,60%	1,00%	0,00%	
13 <i>H. s.</i> Bl. východ	3,98%	4,18%	4,19%	4,39%	4,59%	4,19%	2,59%	2,99%	2,20%	1,60%	2,20%	1,40%	2,00%

Tab. 32 Přehled vypočítaných **průměrných** p-distancí sekvencí pro gen STAT. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>H. arabicus</i> Írán	0,00%												
2 <i>H. arabicus</i> Omán	0,87%	0,24%											
3 <i>H. ariel</i> Egypt	4,38%	4,45%	0,00%										
4 <i>H. ariel</i> Jordánsko	4,84%	4,58%	0,85%	0,11%									
5 <i>H. ariel</i> Omán	5,03%	4,75%	1,05%	0,25%	0,10%								
6 <i>H. ariel</i> Jemen	4,49%	4,24%	0,80%	0,35%	0,54%	0,17%							
7 <i>H. s.</i> Španělsko	3,59%	3,36%	3,92%	4,01%	4,21%	3,66%	0,81%						
8 <i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	3,57%	3,34%	3,97%	4,06%	4,25%	3,71%	1,31%	0,97%					
9 <i>H. s.</i> centr. Evropa	3,25%	2,99%	3,65%	3,71%	3,90%	3,36%	1,33%	0,97%	0,60%				
10 <i>H. s.</i> Balkán	3,57%	3,31%	3,78%	3,83%	4,03%	3,48%	1,70%	1,49%	1,34%	0,42%			
11 <i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	3,79%	3,51%	4,05%	4,11%	4,28%	3,76%	1,73%	1,56%	1,46%	0,67%	0,70%		
12 <i>H. s.</i> Simi, Rhodos	3,39%	3,14%	3,60%	3,66%	3,85%	3,31%	1,42%	1,21%	1,06%	0,37%	0,55%	0,00%	
13 <i>H. s.</i> Bl. východ	3,59%	3,34%	3,80%	3,85%	4,05%	3,51%	1,83%	1,65%	1,49%	0,70%	0,92%	0,57%	0,86%

Analýza genu aktivující rekombinaci (Rag2) se zdařila u celkem 153 vzorků, bylo však vymezeno pouze 22 haplotypů (viz obr. 23). Skupina sekvencí *H. arabicus* leží samostatně a v této analýze ukazuje pouze dva haplotypy z jedinců různého původu. První haplotyp obsahuje 23 jedinců z Ománu a Íránu a druhý haplotyp má pouze jediný vzorek z Ománu (Wadi Banah). Sekvence *Hypsugo ariel* se rozdělily do dvou haplotypů. První haplotyp odpovídá 17 jedincům z Jemenu, Jordánska a Egypta. Druhý haplotyp mají pouze dva jedinci z Jemenu.

V rámci *H. savii* se diferenciovaly různé geografické oblasti s celkem 18 haplotypy, ovšem jen s malými rozdíly. Například jedinec nalezený v České republice se svým haplotytem shoduje s jedinci z Libanonu, jedinci z Chorvatska v tomto fylogenetickém stromu spadají do skupiny s jedinci z Libanonu. Malé, či žádné rozdíly mezi sekvencemi mohou být způsobeny problémy s amplifikací, nebo nedostatečnou specifikací primeru. Ačkoliv byla kvalita sekvencí a jejich délka relativně vysoká, počet haplotypů je nízký. Výsledky p-distancí mezi skupinami jedinců jsou znázorněny v tab. 33–35.



Obr. 23 Výsledný fylogenetický strom vypočítaný ze sekvencí jaderného genu Rag2 metodou ML. Červené kolečko značí $PP \geq 0,95$ a $BP \geq 70\%$.

Tab. 33. Přehled vypočítaných **minimálních** p-distancí sekvencí pro gen Rag2. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>H. arabicus</i> Írán	0,00%											
2 <i>H. arabicus</i> Omán	0,00%	0,00%										
3 <i>H. ariel</i> Egypt	1,49%	1,16%	0,00%									
4 <i>H. ariel</i> Jordánsko	1,49%	1,16%	0,00%	0,00%								
5 <i>H. ariel</i> Jemen	1,49%	1,16%	0,00%	0,00%	0,00%							
6 <i>H. s.</i> Španělsko	0,99%	0,99%	0,99%	0,99%	0,99%	0,00%						
7 <i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	0,99%	0,99%	0,99%	0,99%	0,99%	0,00%	0,00%					
8 <i>H. s.</i> centr. Evropa	0,99%	0,99%	0,99%	0,99%	0,99%	0,00%	0,00%	0,00%				
9 <i>H. s.</i> Balkán	1,16%	1,16%	0,99%	0,99%	0,99%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%			
10 <i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	1,16%	1,16%	0,99%	0,99%	0,99%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%		
11 <i>H. s.</i> Simi, Rhodos	1,16%	1,16%	0,99%	0,99%	0,99%	0,00%	0,17%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
12 <i>H. s.</i> Bl. východ	1,16%	1,16%	0,99%	0,99%	0,99%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 34. Přehled vypočítaných **maximálních** p-distancí sekvencí pro gen Rag2. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

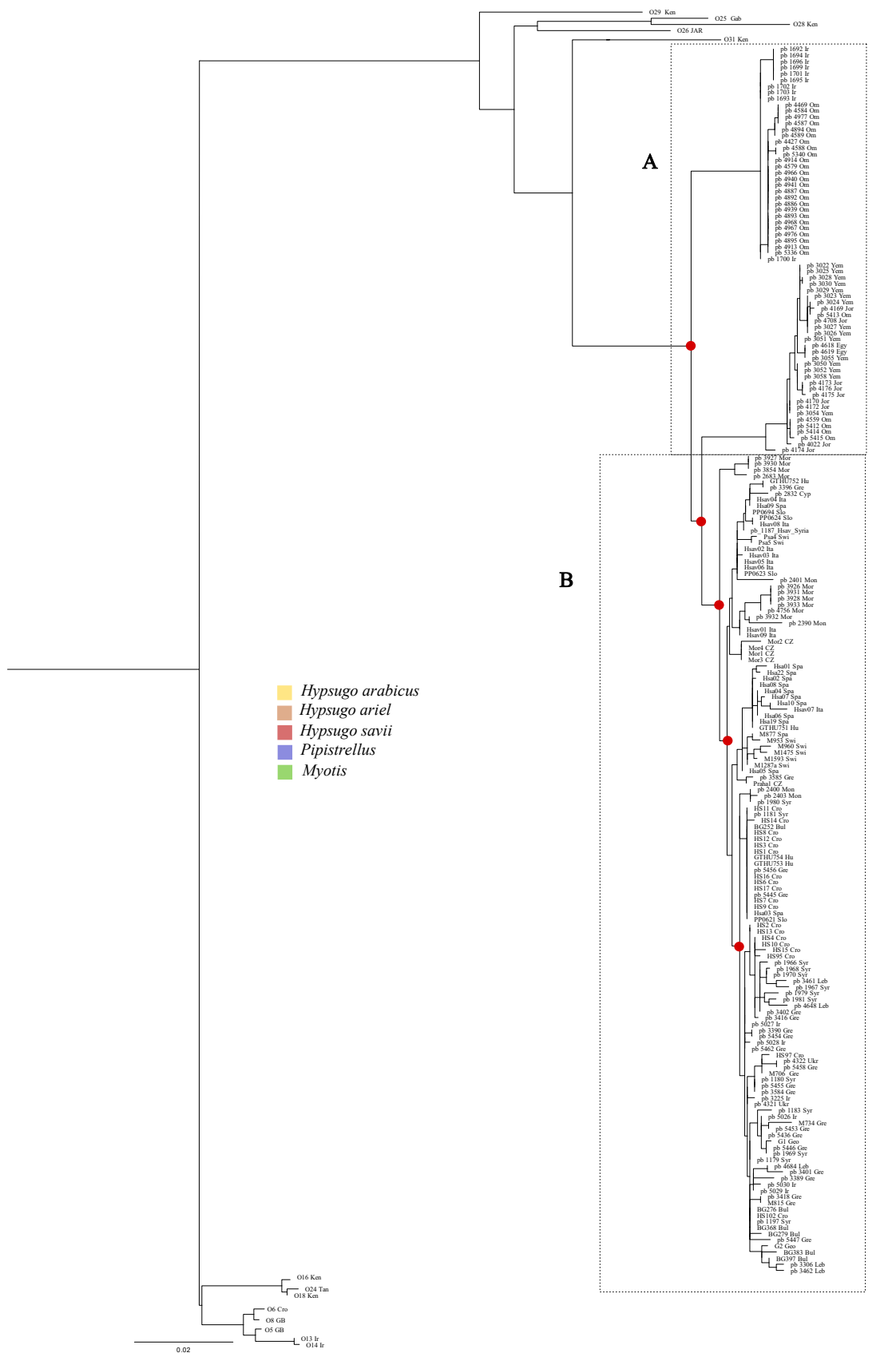
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>H. arabicus</i> Írán	0,00%											
2 <i>H. arabicus</i> Omán	0,33%	0,33%										
3 <i>H. ariel</i> Egypt	1,49%	1,49%	0,00%									
4 <i>H. ariel</i> Jordánsko	1,49%	1,49%	0,00%	0,00%								
5 <i>H. ariel</i> Jemen	1,65%	1,66%	0,17%	0,17%	0,17%							
6 <i>H. s.</i> Španělsko	1,49%	1,65%	1,32%	1,32%	1,49%	0,66%						
7 <i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	1,49%	1,49%	1,32%	1,32%	1,49%	0,83%	0,66%					
8 <i>H. s.</i> centr. Evropa	1,49%	1,49%	1,16%	1,16%	1,32%	0,66%	0,50%	0,50%				
9 <i>H. s.</i> Balkán	1,49%	1,49%	1,32%	1,32%	1,49%	0,83%	0,66%	0,66%	0,50%			
10 <i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	1,65%	1,66%	1,49%	1,49%	1,65%	0,99%	0,83%	0,83%	0,66%	0,50%		
11 <i>H. s.</i> Simi, Rhodos	1,65%	1,65%	1,49%	1,49%	1,65%	0,99%	0,83%	0,83%	0,66%	0,50%	0,50%	
12 <i>H. s.</i> Bl. východ	1,49%	1,49%	1,32%	1,32%	1,49%	0,99%	0,83%	0,83%	0,66%	0,50%	0,66%	0,66%

Tab. 35. přehled vypočítaných **průměrných** p-distancí sekvencí pro gen Rag2. Podrobný seznam lokalit sdružených pod písmeny A-G lze najít v tabulce č. 16.

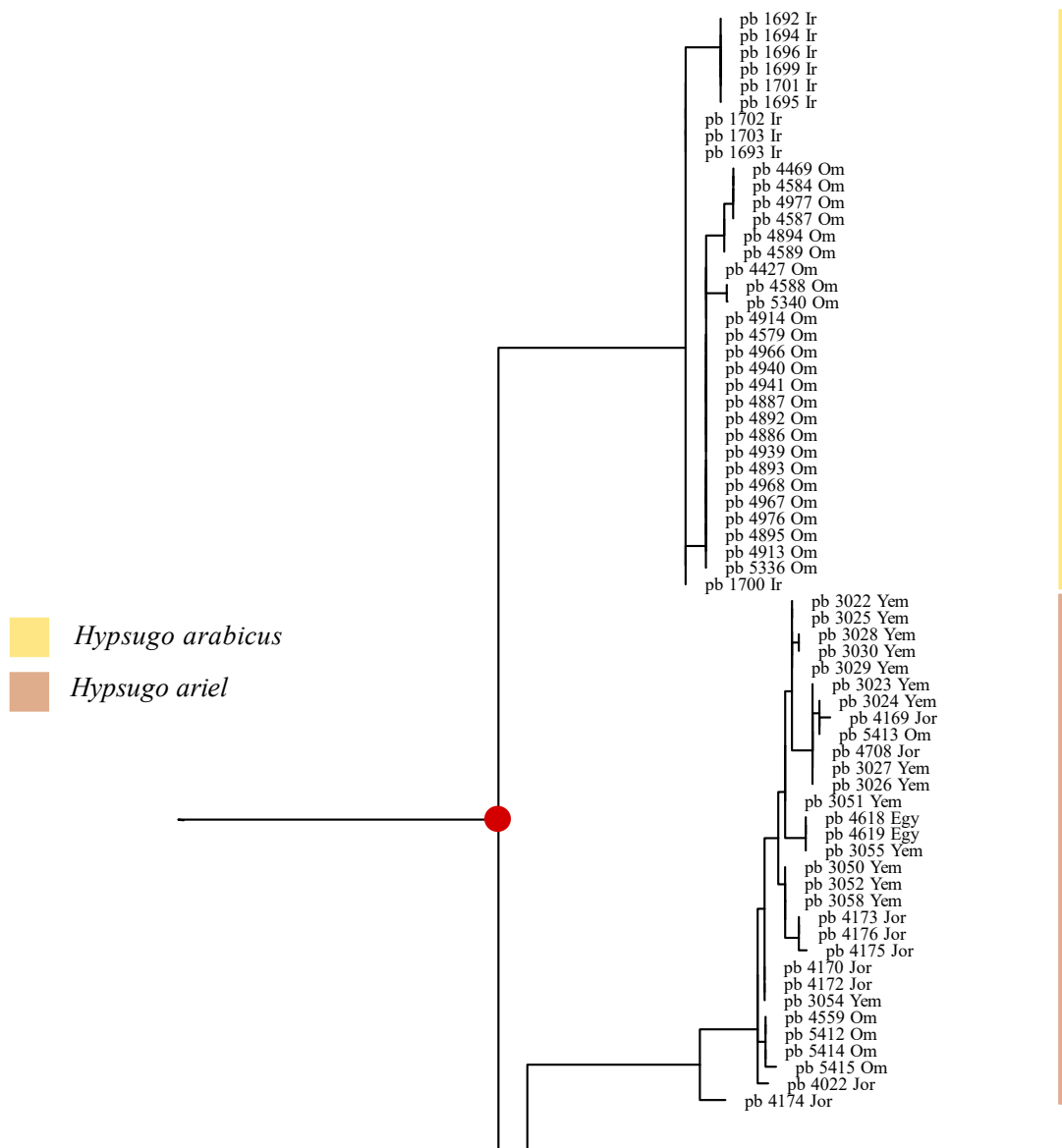
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>H. arabicus</i> Írán	0,00%											
2 <i>H. arabicus</i> Omán	0,02%	0,03%										
3 <i>H. ariel</i> Egypt	1,49%	1,47%	0,00%									
4 <i>H. ariel</i> Jordánsko	1,49%	1,47%	0,00%	0,00%								
5 <i>H. ariel</i> Jemen	1,51%	1,50%	0,03%	0,03%	0,05%							
6 <i>H. s.</i> Španělsko	1,27%	1,28%	1,06%	1,06%	1,08%	0,28%						
7 <i>H. s.</i> Ita, Mor, Swi	1,15%	1,16%	1,17%	1,17%	1,19%	0,34%	0,25%					
8 <i>H. s.</i> centr. Evropa	1,22%	1,22%	1,03%	1,03%	1,06%	0,28%	0,27%	0,22%				
9 <i>H. s.</i> Balkán	1,25%	1,25%	1,08%	1,08%	1,11%	0,29%	0,29%	0,23%	0,15%			
10 <i>H. s.</i> Kréta, pev. Řec.	1,34%	1,34%	1,17%	1,17%	1,20%	0,37%	0,35%	0,32%	0,19%	0,21%		
11 <i>H. s.</i> Simi, Rhodos	1,27%	1,27%	1,10%	1,10%	1,13%	0,41%	0,40%	0,36%	0,24%	0,26%	0,30%	
12 <i>H. s.</i> Bl. východ	1,35%	1,35%	1,18%	1,18%	1,21%	0,43%	0,40%	0,38%	0,24%	0,21%	0,27%	0,23%

Na výsledném stromu, který je složený ze všech jaderných markerů (viz obr. 24) je vidět bazální postavení *H. arabicus* ke dvojici druhů *H. ariel* a *H. savii*, které se podle této analýzy jeví jako sesterské druhy. V rámci *H. arabicus* se vyzemilo celkem 8 haplotypů. *Hypsugo ariel* se rozdělil na 18 haplotypů bez ohledu na geografickou příslušnost jedinců. U *Hypsugo savii* je zajímavostí bazální postavení marockých vzorků *H. savii* vůči všem ostatním skupinám. Ze stromu je patrné i obecné oddělení balkánských a blízkovýchodních jedinců *H. savii*, i když s výjimkami. Například dva jedinci ze Španělska (Katalánska) se zde objevují ve skupině jedinců z Balkánu, i přesto že v ostatních analýzách tomu tak nebylo a tito jedinci byli součástí linie jedinců západní Evropy.

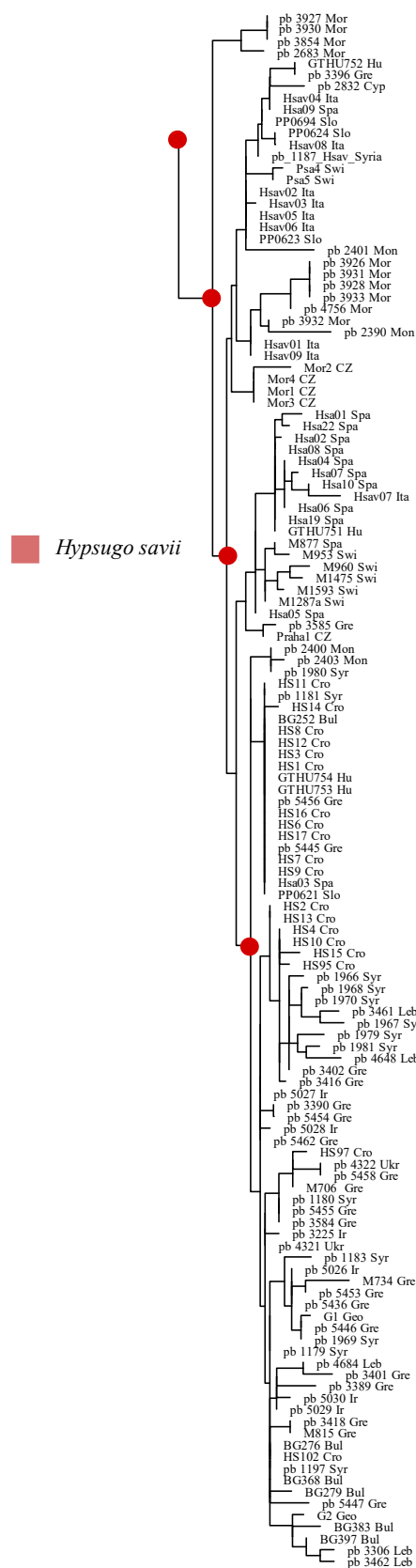
Ačkoliv se na konkatenovaném fylogenetickém stromu jaderných markerů ukázalo několik jedinců stejného haplotypu, tento strom nebyl zkracován, neboť nelze s přesností určit, jak se haplotyp tvořil. Aby došlo ke zkrácení stromu, musely by všechny čtyři jaderné markery mít dané haplotypy stejné, což se nestalo. Strom tedy zůstal celý, nicméně byl pro přehlednost rozdělen do dvou částí (viz obr. 25–26).



Obr. 24 Výsledný fylogenetický strom vypočítaný ze sekvencí všech jaderných genů metodou ML. Červené kolečko značí $PP \geq 0,95$ a $BP \geq 70\%$. Strom je z důvodu mnoha vzorků rozdělen na dvě části.



Obr. 25 Výsledný fylogenetický strom vypočítaný ze sekvencí všech jaderných genů metodou ML (část A).

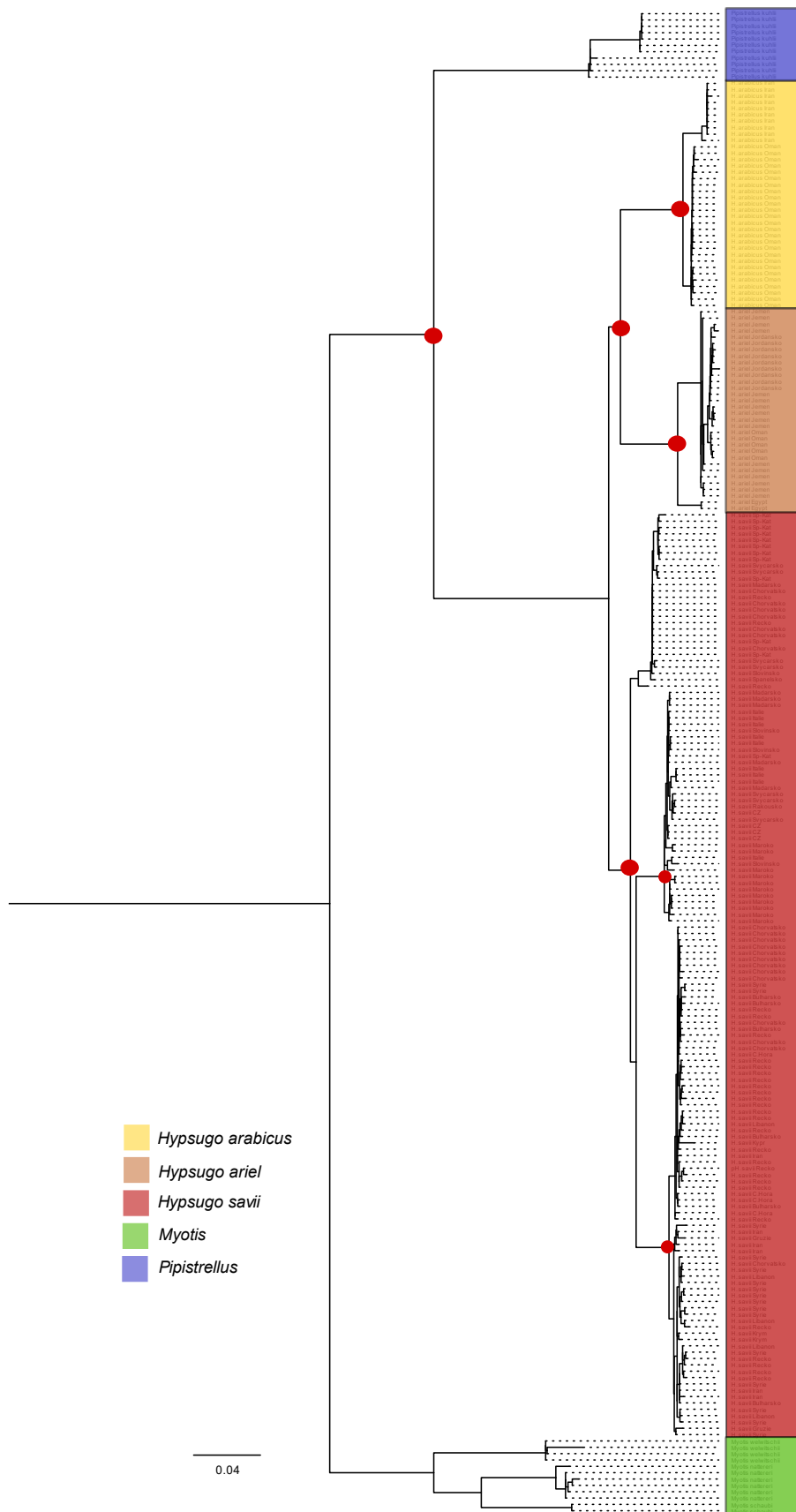


Obr. 26 Výsledný fylogenetický strom vypočítaný ze sekvencí všech jaderných genů metodou ML (část B).

4.2.3. Celková matrix

Společný fylogenetický strom všech analyzovaných mitochondriálních i jaderných markerů ukazuje jasné rozdělení rodu *Hypsugo* na tři druhy (viz obr. 27). Ze stromu je patrné, že se jedinci druhu *H. arabicus* z Íránu liší od jedinců z Ománu. U druhu *H. ariel* se jedinci z Jemenu, Ománu a Jordánska vzájemně liší pouze na základě jednotek mutací, zatímco egyptští zástupci se od ostatních zástupců odlišují díky vyššímu počtu mutací.

Zástupci druhu *H. savii* se rozdělili do celkem tří geograficky separovaných linií, z nichž jedna, ta východní se rozdělila na dvě podlinie (balkánskou a blízkovýchodní). Ze stromu je patrné, že se sekvence *H. savii* rozdělily geograficky na zástupce severozápadní Afriky a Evropy a dále na zástupce Balkánu a Blízkého východu. Podle fylogenetického stromu celkové studované matrix je *H. arabicus* sesterským druhem k *H. ariel* a tato dvojice je v sesterské pozici k *H. savii*.

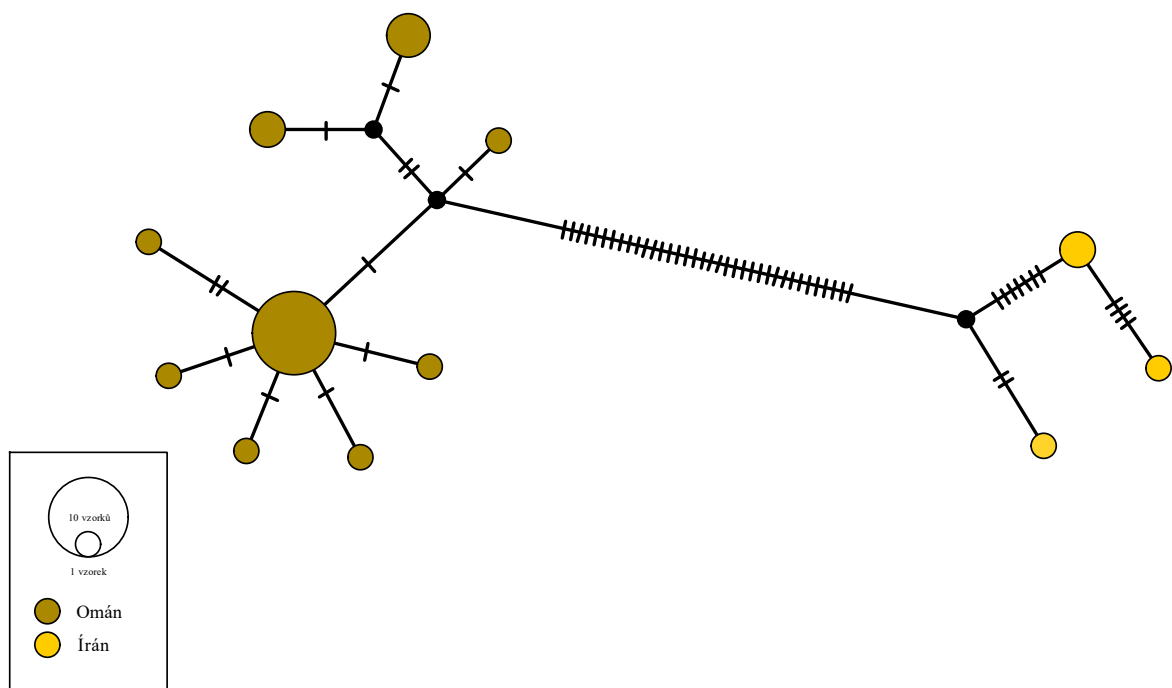


Obr. 27 Výsledný fylogenetický strom vypočítaný ze všech mitochondriálních i jaderných markerů metodou ML. Červené kolečko značí $PP \geq 0,95$ a $BP \geq 70$ %.

4.2.4. Haplotypové sítě

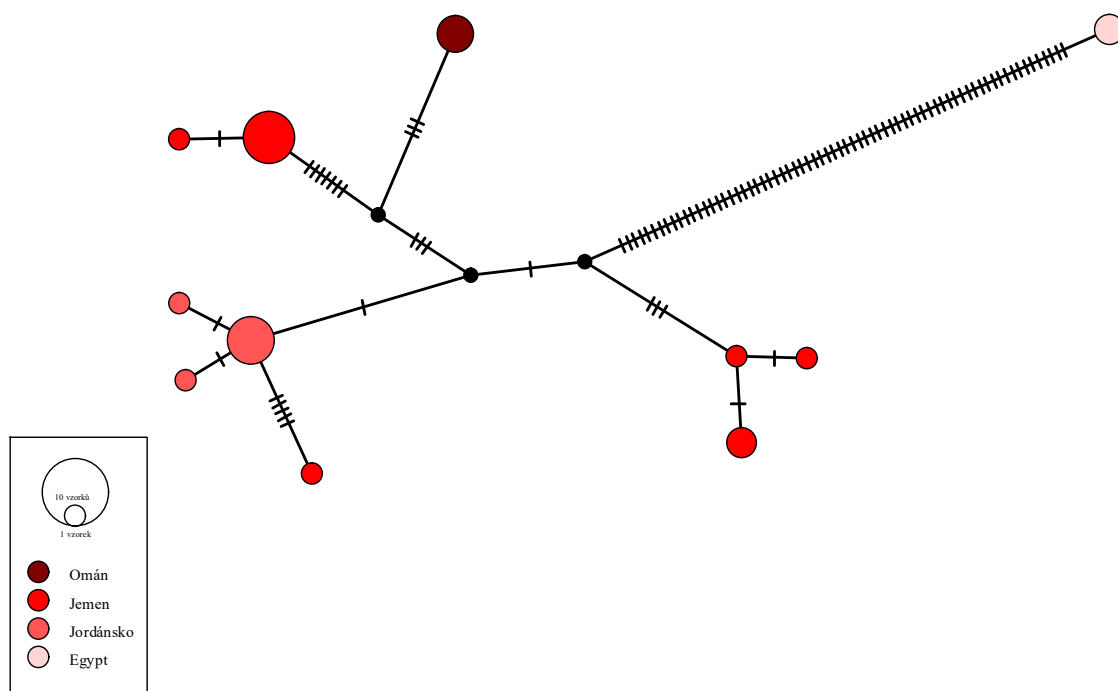
Pro vykreslení haplotypových sítí byly použity alignmenty haplotypů sekvencí genu *Cyt-b*. Pro druhy *H. arabicus* a *H. ariel* byly vytvořeny samostatné haplotypové sítě. Pro *H. savii* bylo potřeba vytvořit několik různých sítí vzhledem k počtu vzorků a komplikovanosti vztahů mezi haplotypy. K rozdělení vzorků na dvě skupiny proběhlo na základě fylogenetické analýzy podle *Cyt-b*. Následně byla vytvořena haplotypová síť *H. savii* všech analyzovaných sekvencí genu pro *Cyt-b* (viz obr. 32), která potvrzuje, že *H. savii* vytváří několik geograficky definovaných linií.

Haplotypová síť *Hypsugo arabicus* ukazuje celkem 12 různých haplotypů, z nichž devět se nachází v Ománu a pouze 3 haplotypy v Íránu (viz obr. 28). Haplotypová diverzita (Hd) rodu *H. arabicus* má hodnotu 0,8185 a bylo zde dohromady nalezeno 51 substitucí.



Obr. 28 Haplotypová síť druhu *Hypsugo arabicus* (Překřížení ramen znázorňuje počet substitucí mezi haplotypy).

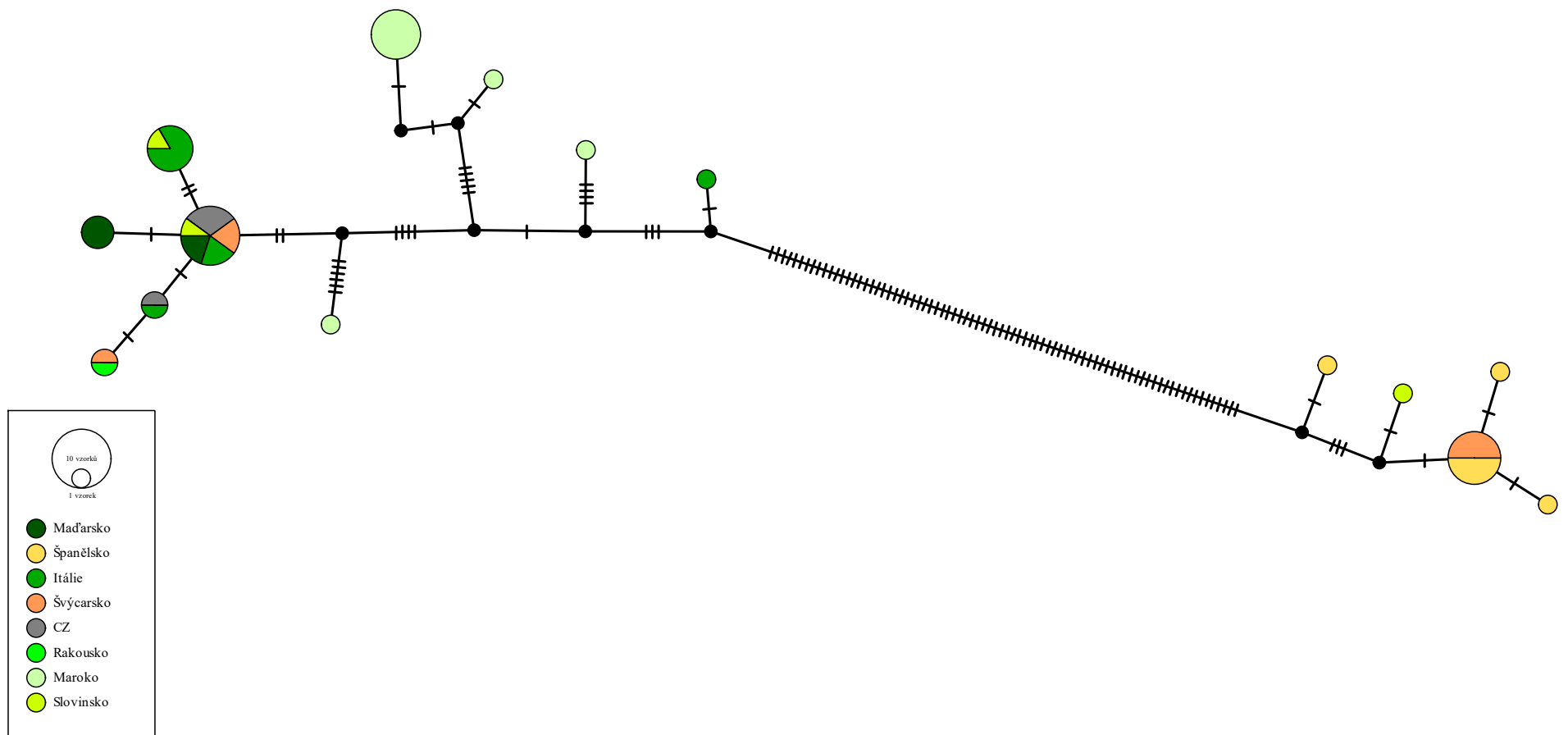
Z haplotypové sítě druhu *H. ariel* je zřejmé, že egyptskou populaci dělí od ostatních jedinců 72 substitucí (viz obr. 29). Ománská populace (na obrázku značená nejtmaší červenou barvou) stojí samostatně, zastoupena jediným haplotypem. U jemenských zástupců se vyznačilo 6 haplotypů a jordanští zástupci se rozdělili do tří haplotypů. Haplotypová diverzita (H_d) druhu *H. ariel* má hodnotu 0,8442 a celkem bylo nalezeno 99 substitucí.



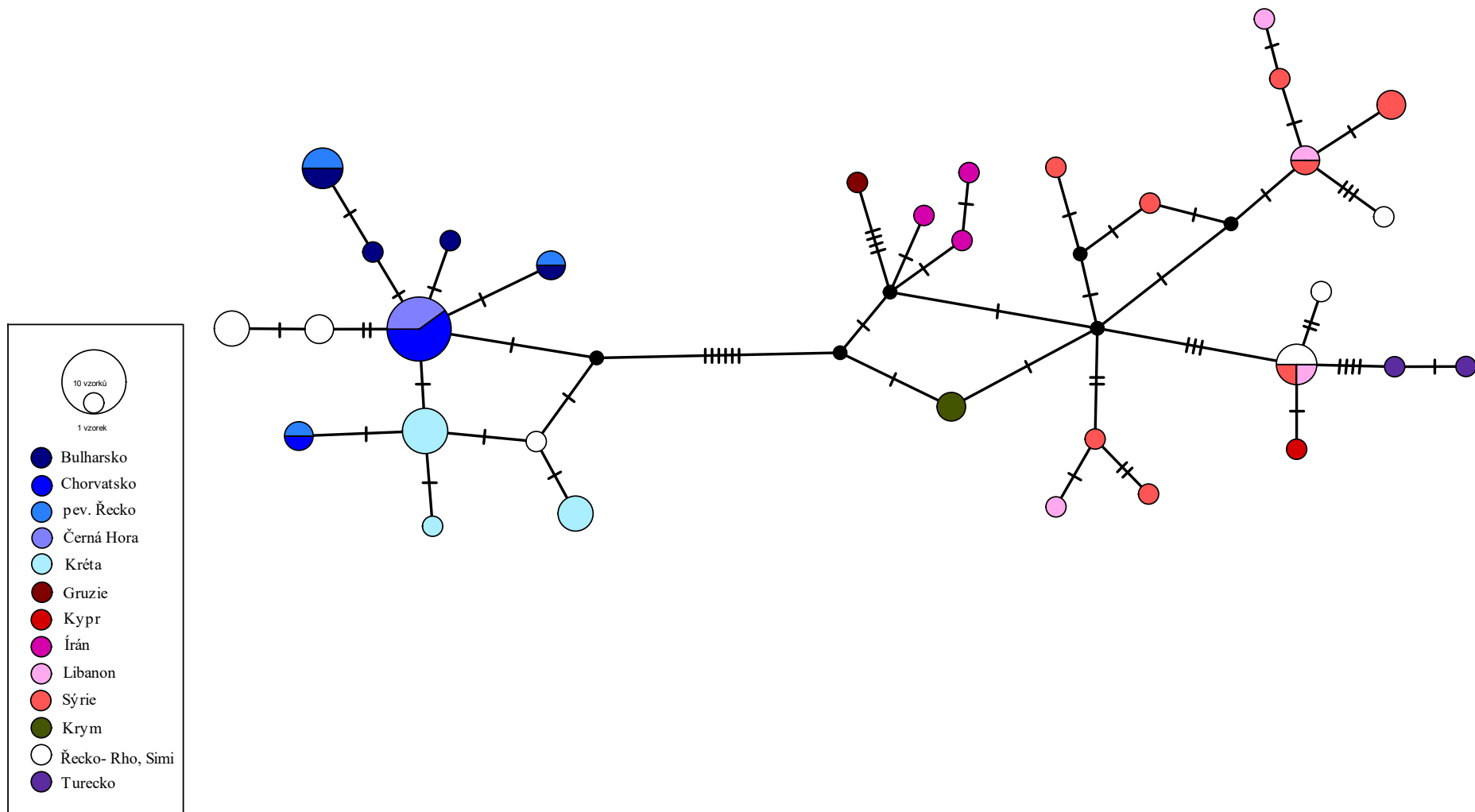
Obr. 29 Haplotypová síť rodu *Hypsugo ariel* (Překřížení ramen znázorňuje počet substitucí mezi haplotypy)

Haplotypová síť první skupiny *H. savii* ukazuje velkou podobnost italských, marockých, maďarských a českých zástupců. Naopak španělské zástupce jsou odděleny 80 substitucemi. Zajímavostí je, že slovinští a švýcarští zástupci se objevují na obou stranách haplotypové sítě (viz obr. 30).

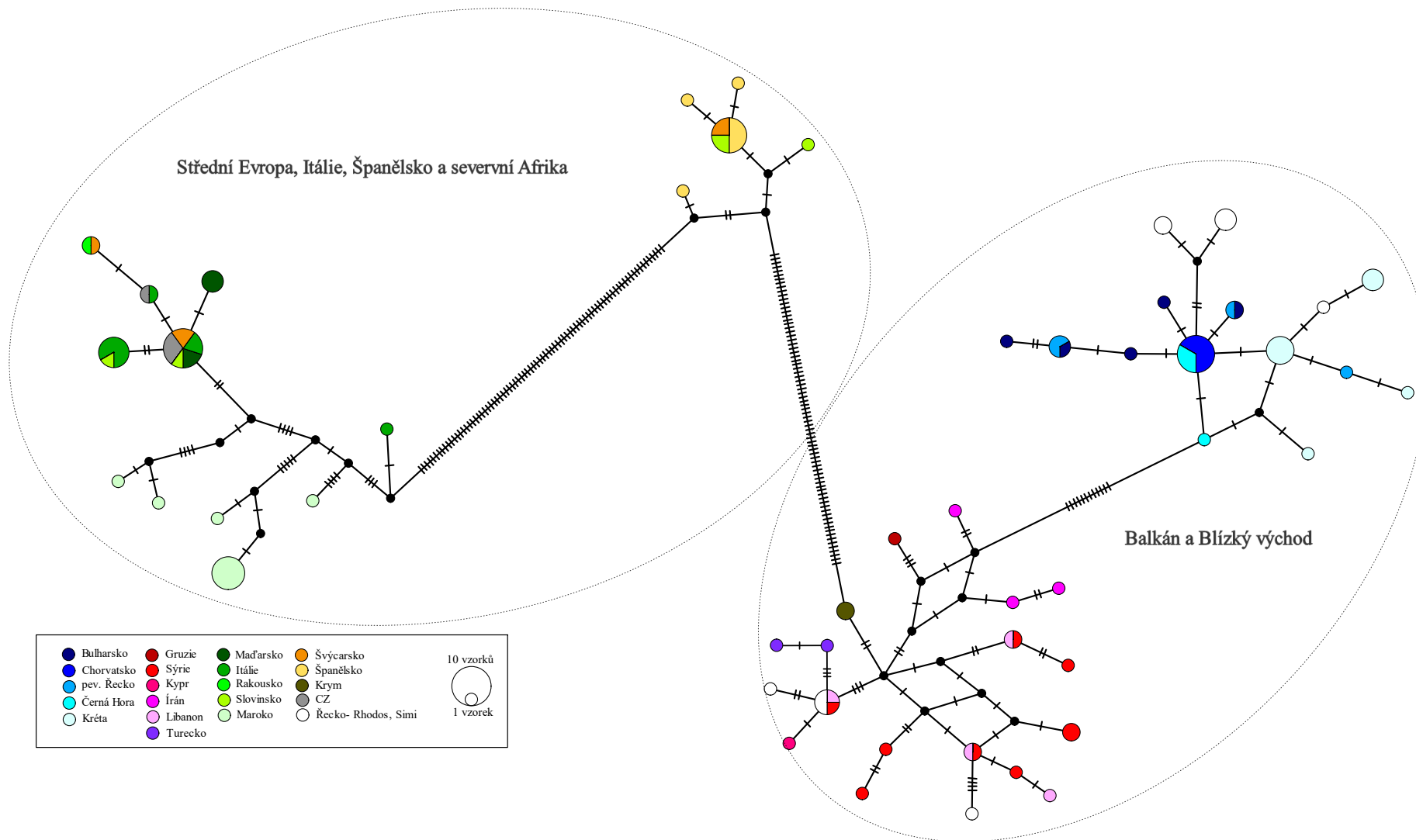
Druhá haplotypová síť druhu *H. savii* naznačuje rozdělení populací Balkánu a Blízkého východu (viz obr. 31). Gruzínští jedinci se podle této analýzy společně s jedinci z Krymu řadí mezi blízkovýchodní zástupce. Jedinci z Řecka byly rozděleny na 3 linie. První linie se vyskytuje ve vnitrozemí Řecka, druhá na Krétě a třetí na ostrovech Rhodos a Simi, které se nachází u pobřeží Malé Asie. Jedinci prvních dvou řeckých linií jeví příbuznost s balkánskými jedinci. Jedinci z ostrovů Rhodos a Simi se objevili na obou stranách haplotypové sítě. Ostatní jedinci jeví příbuznost s jedinci podle geografického původu. Haplotypová diverzita druhu *H. savii* má hodnotu 0,9738 a celkem bylo vymezeno 46 haplotypů. Počet substitucí je dle haplotypových sítí velký.



Obr. 30 Haplotypová síť rodu *Hypsugo savii* vytvořená podle analýzy genu pro Cyt-*b* (Maroko, střední Evropa a Itálie).



Obr. 31 Haplotypová síť rodu *Hysugo savii* vytvořená podle analýzy genu pro *Cyt-b* (Oblast Balkánu a Blízkého východu)



Obr. 32 Haplotypová síť rodu *Hypsugo savii* vytvořená podle analýzy genu pro Cyt-*b* (všechny oblasti dohromady)

5. Diskuse

Letouni jako velmi specifictí živočichové se těší velkému zájmu vědců. Rod *Hypsugo* je obecně poměrně obstojně prozkoumán morfologicky, v mnohých případech ale chybí průzkum na molekulárně genetické úrovni, bez které se už dnešní systematika neobejde. Koplexní studie zaměřená na druhy rodu *Hypsugo* v západní Palearktidě chybí a je třeba se jí věnovat hlouběji k pochopení jak mezidruhových, tak vnitrodruhových vztahů mezi populacemi. V této analýze byly zkoumány tři druhy, *Hypsugo arabicus*, *Hypsugo ariel* a *Hypsugo savii*. Tyto druhy jsou poměrně dobře definované, byť v některých znacích může být poměrně velká variabilita. I proto se na vnitrodruhové úrovni objevují nejasnosti, které bylo třeba vyřešit. Všechny tři druhy jsou v palearktické oblasti rozšířeny v několika relativně izolovaných populacích, mezi kterými mohou existovat rozdíly, a to především v tělesné velikosti nebo zbarvení srsti. Nejen na základě těchto znaků byly definovány poddruhy *H. savii* a geograficky byly odděleny populace, které se značně lišily.

Prvním ze zástupců rodu *Hypsugo* je *H. arabicus*, který byl donedávna považován za endemický druh Ománu, nicméně tento druh je dnes znám, kromě severovýchodu Ománu, také v jihovýchodním Íránu v provincii Sístán a Balúčistán. Druhým zástupcem je *H. ariel*, druh, jehož rozšíření lemuje jihozápad Arabského poloostrova (Jemen, Omán, Saudská Arábie, Jordánsko, Izrael) a byl nalezen i v Egyptě a Súdánu. Třetím druhem je *H. savii*, jehož rozšíření v západní Palearktidě sahá od Kanárských ostrovů, přes Maroko, jižní, střední a východní Evropu až na Blízký východ a do Střední Asie.

Cílem této práce bylo se za použití molekulárně genetických postupů stanovit míru rozdílů, jak mezi jmenovanými druhy, tak mezi jejich různými populacemi a zaměřit se na nejasnosti v systematickém uspořádání těchto populací. Pro genetickou analýzu byly použity mitochondriální i jaderné markery dohromady tvořící multilokusový dataset (ve zkratce mtDNA: *Cyt-b* a D-loop; nDNA: *Rag2* a introny *ACOX*, *COPS* a *STAT*). Výsledky byly následně využity ve fylogenetické analýze.

Nejvýraznějších mezipopulačních rozdílů dosahovala analýza provedená genem pro *Cyt-b*, který je sám o sobě významným a často používaným markerem v analýzách fylogenetických vztahů různých skupin savců včetně netopýrů (např. Puechmaille et al. 2011, Salicini et al. 2011, Thong et al. 2012).

5.1. *Hypsugo arabicus*

Hypsugo arabicus je poměrně krátce známý druh. Popsán byl jako *Pipistrellus arabicus* v roce 1979 z Ománu. Tři nalezené jedince, kteří posloužili jako typová série k popisu druhu, doplnili v roce 1982 další dva zástupci tohoto druhu znovu z Ománu (Harrison 1982). Do nedávna byl *H. arabicus* považován za endemický druh pohoří Al Hadžar v Ománu (Harrison et Bates 1991, Koopman 1993, Horáček et al. 2000) a byl považován za monotypický druh s typovou lokalitou: Wadi Sahtan, Omán (Harrison 1979). Endemický status *H. arabicus* byl vyvrácen v roce 2002. V roce 2000 byl totiž *H. arabicus* objeven v provincii Sístán a Balúčistán, konkrétně na lokalitě Pir Sohrab (Benda et al. 2002). V roce 2011 byl *H. arabicus* objeven i v jiných lokalitách pohoří Al Hadžar v Ománu (Benda et al. 2011).

Pro tuto analýzu se podařilo alespoň jedním markerem osekvenovat 36 vzorků z obou zemí, ve kterých se *H. arabicus* vyskytuje. Nejvíce sekvencí bylo získáno díky jadernému genu ACOX (celkem 29 sekvencí) a nejméně sekvencí kontrolního regionu D-loop (celkem 15 sekvencí). Při analýze sekvencí genu pro *Cyt-b*, u kterého se podařilo úspěšně osekvenovat 22 vzorků z Ománu a 4 vzorky z Íránu, bylo zjištěno, že se íránská populace na fylogenetickém stromu výrazně oddělila od té ománské. Čtyři sekvence íránských jedinců reprezentovaly 3 haplotypy a 22 sekvencí ománských vzorků představovalo celkem 12 haplotypů. Íránské populace jsou od těch ománských vzdáleny v rozmezí 4,20–4,78 % p-distancí, přičemž tradičně se u savců uvádí jako mezidruhový rozdíl p-distance větší než 5 % (Barker et Bradley 2006). V tomto případě se nejvyšší hodnota velmi blížila 5 %, ale stále byla pod touto hodnotou. Vzhledem k tomu, že do analýzy vstupovalo mnohem méně vzorků íránských než ománských, bylo by potřeba dalších analýz ke zjištění, jestli se může jednat o dva taxony, tedy dva poddruhy, či méně pravděpodobně, o dva druhy. Výsledky této analýzy nicméně naznačují, že populace *H. arabicus* z Íránu se od populací z Ománu výrazně geneticky liší a představují tak dvě fylogenetické jednotky. Pro kontrolní region **D-loop** se u *H. arabicus* podařilo získat sekvence zástupců pouze z Ománu, což může značit nedostatečnou specifitu primerů. Nicméně fylogenetický strom naznačuje, že *H. arabicus* je sesterským druhem *H. savii* a *H. ariel* je na bázi rodu *Hypsugo*, což je jiný stav, než naznačují výsledky genu pro *Cyt-b*, kde se *H. arabicus* ukázal v sesterské pozici k *H. ariel* a tato dvojice se ukázala v sesterské pozici k *H. savii*. Konaktenovaný mitochondriální strom pak kopíruje v podstatě strom genu pro *Cyt-b*. Haplotypová síť genu pro *Cyt-b* u *H. arabicus* ukazuje, že íránské a ománské zástupce dělí minimálně 36 substitucí.

Fylogenetické stromy vytvořené na základě analýzy jaderných markerů nenaznačily tak výraznou diverzitu, jakou naznačily výsledky analýzy markerů mitochondriálních, a to hlavně proto, že obecně jsou jaderné markery konzervativnější. Fylogenetický strom vypočítaný na základě analýzy sekvencí intronu **ACOX** rozdělil vzorky *H. arabicus* na dva haplotypy, z nichž jeden nesou jedinci z Íránu a druhý jedinci z Ománu. Maximální hodnota p-distancí mezi těmito dvěma populacemi činí 0,27 %. Fylogenetický strom vypočtený ze sekvencí intronu **COPS** ukázal, že *H. arabicus* leží na bázi stromu celého rodu. Byly nalezeny tři haplotypy. První haplotyp reprezentoval všechny íránské vzorky, druhý haplotyp byl přítomen u většiny ománských vzorků, až na jeden, který nesl třetí haplotyp. Maximální genetická p-distance mezi těmito haplotypy byla 0,77 %, což naznačuje nízkou diverzitu. Výsledky analýzy intronu **STAT** vyšly v podstatě totožně. Byly nalezeny sice čtyři haplotypy, ale první haplotyp byl nalezen ve všech íránských jedincích a další tři haplotypy byly přítomny u ománských jedinců. Velikost p-distancí je v rozmezí 0,8–1,19 %, což je v podstatě totožné jako u COPS. Pouze dva haplotypy byly vymezeny u sekvencí genu aktivujícího rekombinaci **Rag2**. Na rozdíl od všech ostatních intronů spadají do prvního haplotypu jak zástupci z Íránu, tak zástupci z Ománu. Íránští jedinci se u tohoto intronu v podstatě nijak nediverzifikovali od Ománských. Hodnota p-distancí mezi jedinci z Íránu a Ománu činila 0,33 %.

U konkatenaného stromu jaderných markerů byly populace íránských *H. arabicus* odděleny do separátní linie od ománských jedinců a fylogenetický strom celkové matrix naznačuje rozdělení íránských a ománských populací *H. arabicus* na stejné úrovni jako u stromu sekvencí *Cyt-b*. Výsledky molekulárně genetické analýzy *H. arabicus* naznačují, že by se u íránských populací tohoto druhu mohlo jednat o samostatný pevninský poddruh. Dosud nalezené morfologické rozdíly mezi íránskými a ománskými vzorky v metrických hodnotách neurokrania (Benda et al. 2012) příliš velkou odlišnost obou potencionálních taxonů nenaznačují. Ovšem důkladná morfometrická analýza může rozdíly nalézt a podpořit tak difference přesvědčivě ukázané genetickým porovnáním obou populací v této analýze.

5.2. *Hypsugo ariel*

Hypsugo ariel (Thomas, 1904) byl popsán v roce 1904 pod jménem *Pipistrellus ariel*, jako netopýr rodu *Pipistrellus* na základě nalezení dvou jedinců ve Východní poušti v Egyptě. V průběhu let byly zaznamenávány další nálezy *H. ariel* (Flower 1932, Makin et Harrison 1988). Taxonomie *H. ariel* byla ale dlouhou dobu předmětem diskusí a studií. V roce 1959 našel David L. Harrison ve vesnici Jovata v Izraeli samici rodu *P. bodenheimeri*. Tento druh od *P. ariel* odlišil na základě několika morfologických atributů (Harrison 1960). V dalších letech bylo hlášeno několik záznamů o nálezů *P. bodenheimeri* (Harrison 1964, Qumsiyeh 1985, Makin et Harrison 1988). V průběhu let byly ale vysloveny i hypotézy (Horáčec et Hanák 1986, Yom-Tov et al. 1992) o tom, že by *P. ariel* a *P. bodenheimeri* mohli být jedním druhem, což na základě morfologických dat naznačila i studie Bendy et al. (2008), která navrhla sjednocení obou druhů pod jediné jméno *H. ariel*.

Pro molekulárně genetickou analýzu se podařilo alespoň jedním markerem osekvenovat 32 vzorků (15 vzorků z Jemenu, 10 vzorků z Jordánska, 5 vzorků z Ománu a 2 vzorky z Egypta). Nejvíce sekvencí se podařilo získat u jaderného genu ACOX (celkem 28 sekvencí) a nejméně u kontrolního regionu D-loop (celkem 8 sekvencí). Při analýze sekvencí genu pro **Cyt-b** bylo vymezeno celkem 7 haplotypů. Jordánští, ománští a egyptští jedinci náleželi vždy jednomu samostatnému haplotypu. U jemenských jedinců byly nalezeny celkem 4 haplotypy. Mezi jedinci z Jemenu, Jordánska a Ománu byly spočítané hodnoty p-distancí v rozmezí 0–1,12 %, což při značné geografické vzdálenosti (nejvíce cca 3500 km mezi lokalitami v Ománu a Jordánsku) značí velmi nízkou mezipopulační diverzitu. Na druhou stranu egyptští jedinci se od ostatních vzorků *H. ariel* lišili o 6–6,54 % genetické distance, což je poměrně vysoká hodnota, odpovídající nejméně 72 substitucím (viz obr. 29). V analýze sekvencí mitochondriálního genu pro **Cyt-b**, kterou publikoval Benda et al. (2016) byl zahrnut jedinec *H. ariel* z Egypta, který má ve fylogenetickém stromu samostatnou linii oddělenou od linie zahrnující dva vzorky *H. ariel* z Jemenu. Analýza Bendy et al. (2016) se tedy shoduje s výsledky této analýzy, které nabízejí otázku, zda by mohly být egyptské a arabské populace *H. ariel* hodnoceny jako samostatné taxony a pokud, tak na jaké úrovni. Vzhledem k tomu, že egyptské vzorky byly pouze dva, je patrně potřeba provést detailnější analýzu s větším geografickým pokrytím, která by tuto hypotézu mohla potvrdit nebo vyvrátit. Kontrolního regionu **D-loop** se podařilo získat 8 sekvencí, které se vyzemily do čtyř haplotypů (nepodařilo se získat sekvence pro ománské zástupce). Samostatně se diferenciovaly vzorky z Egypta, zatímco zbytek vzájemně blízkých haplotypů utvořil sesterskou linii. Hodnoty p-distancí

egyptských a arabských populací se pohybovaly v rozmezí 2,88–3,5 %, což by mohlo ukazovat na oddělení egyptských zástupců v rámci poddruhu. Konkatenovaný mitochondriální strom v podstatě kopíroval strom sekvencí genu pro *Cyt-b*.

Fylogenetické stromy vytvořené na základě analýzy jaderných markerů naznačily menší diverzitu než markery mitochondriální, což je vzhledem k jejich vyšší konzervativnosti pochopitelné. Fylogenetický strom vypočítaný na základě sekvencí intronu **ACOX** ukazuje celkem 5 haplotypů. První haplotyp byl sdílen egyptskými a částí ománských jedinců. Sekvence intronu **ACOX** vykázaly celkově velmi nízkou diverzitu. Naznačily tak, že všechny dotyčné populace je vhodné hodnotit jako jediný druh, *H. ariel*. Hodnoty p-distancí egyptských a arabských jedinců se pohybovaly v rozmezí 0–1,02 %. U intronu **COPS** byla dokumentována v podstatě stejná topologie sekvencí. Analýza potvrdila pouze dva velmi podobné haplotypy tohoto markeru. Hodnoty p-distancí egyptských a arabských (jordánských) populací se pohybovaly v rozmezí 0–2,12 %. Fylogenetický strom vypočítaný na základě analýzy sekvencí intronu **STAT** vymezil 6 haplotypů, z nichž jeden haplotyp byl reprezentován dvěma egyptskými jedinci a od zbývajících haplotypů ho dělila hodnota p-distancí 0,8–1,2 %. Analýza genu pro rekombinaci **Rag2** rozdělila sekvence *H. ariel* do dvou haplotypů, z nichž jeden zahrnoval všechny jedince, kromě dvou jemenských, kteří byli vymezeni do druhého haplotypu. Hodnoty p-distancí zde dosahují nejvyšší hodnoty 0,17 %, což naznačuje konzervativitu tohoto genu a s tím i společnou fylogenetickou historii všech populací. Fylogenetický strom vypočítaný ze všech sekvencí jaderných genů ukazuje nízkou vnitrodruhovou geografickou variabilitu, neboť spojil egyptské a jemenské vzorky do stejného haplotypu a naznačil jejich fylogenetickou blízkost. Obecně se u výsledných jaderných fylogenetických stromů ukazovaly nižší hodnoty p-distancí a celková heterogenita druhů byla menší, až velmi nízká, což je ovšem u celkově konzervativnějších jaderných markerů očekávatelné. U fylogenetického stromu vypočítaného z celkové matrix se ukázalo, že se egyptská populace *H. ariel* výrazně separuje od všech ostatních populací tohoto druhu a obě haplotypové linie tak mohou představovat samostatné evoluční jednotky.

Na základě analýzy genu pro cytochrom *b* publikované Bendou et al. (2016) a této mnohem širší analýzy se nabízí hypotéza, že by se mohla populace *H. ariel* z Egypta odlišovat od populací *H. ariel* z Arábie na úrovni samostatného taxonu. Ovšem pro potvrzení této hypotézy by bylo vhodné analyzovat větší počet vzorků z celého areálu druhu.

5.3. *Hypsugo savii*

Analýza zahrnuje celkem 106 sekvencí genu pro Cyt-*b* jedinců z Maroka, Španělska, Itálie, Švýcarska, České republiky, Rakouska, Maďarska, Slovinska, Chorvatska, Bulharska, Řecka, Sýrie, Íránu, Kypru, Libanonu, Ukrajiny a Černé Hory. Tento soubor sekvencí byl doplněn o dvě sekvence z Turecka (Çoraman et al. 2013), jednu sekvenci ze Španělska (Ibáñez et al. 2006) a jednu sekvenci ze Švýcarska (Stadelmann et al. 2004). Pro tuto mitochondriální analýzu bylo zvaženo i přidání sekvencí *H. savii* z Kanárských ostrovů a Malty, nicméně délka těchto sekvencí byla výrazně kratší než délka sekvencí získaných z amplifikovaných vzorků v této práci, a proto nebyly použity.

Ve fylogenetickém stromu vypočítaném analýzou sekvencí genu pro Cyt-*b* se bazálně oddělila linie, která byla podpořena pouze metodou maximum likelihood (>70 %). V této linii byly zastoupeni všichni jedinci ze Španělska (Katalánska), čtyři jedinci ze Švýcarska a jeden ze Slovinska (Lublaň). Nicméně p-distance mezi dotýčnými haplotypy naznačují, že nejbližší španělským populacím byly dva jedinci ze Slovinska s průměrnou hodnotou p-distancí 3,25 %. Mimo katalánské vzorky byl do španělských populací zahrnut i jeden vzorek *H. savii* z jižního Španělska (Ibáñez et al. 2006), který ale dosahoval podobných hodnot jako vzorky z Katalánska a naznačil tak fylogenetickou shodu v celém iberském prostoru. Druhá linie fylogenetického stromu zahrnuje jedince z Maroka, Itálie, Rakouska, Maďarska, Švýcarska a Slovinska. Mayer et al. (2007) porovnával marockého jedince *H. savii* se dvěma vzorky z Balkánského poloostrova (Chorvatsko a Řecko) a analýzou mitochondriálního genu ND1 našel mezi těmito haplotypy vzdálenost 9,6 % dvouparametrové Kimurově distancí. Naše data tuto hypotézu potvrzují, neboť se ukázalo, že průměrná hodnota p-distancí mezi marockými a chorvatskými haplotypy je 8,53 % a mezi marockými a řeckými haplotypy jedinců z pevniny je 8,66 %. Maročtí jedinci ale vykazovali největší příbuznost s jedinci z Itálie, Rakouska, Maďarska a České republiky (p-distance mezi dotýčnými haplotypy byla vždy do 1,5 %). Významnou podobnost mezi marockými a italskými jedinci z Toskánska objevili i Dondini et al. (2016). Pro naši analýzu byly použity vzorky jedinců z oblastí Itálie, které přímo sousedí s Toskánskem. Genetická vzdálenost (p-distance) mezi populacemi Maroka a Španělska dosáhla průměrné hodnoty 8,29 %.

Zdá se tedy, že první linii *H. savii* v západní Palearktidě zauímají jedinci ze Španělska a druhou jedinci z Maroka, Itálie, Rakouska, Maďarska a České republiky. Pro lepší pochopení vztahů mezi populacemi severoafrických, španělských, italských a středoevropských zástupců rodu *H. savii* by bylo potřeba zapojit do analýzy také sekvence z Kanárských ostrovů, Alžírsko, Tunisko, Sardinie s Malty, které by možná objasnily otázku, proč jsou si právě zástupci střední Evropy, Itálie a Maroka podobní více než jiní zástupci západní Palearktidy.

Třetí linii tvoří podle analýzy genu pro *Cyt-b* jedinci z Balkánského poloostrova a Blízkého východu, společně s dvěma jedinci z ukrajinského poloostrova Krym. Tato linie se od prvních dvou liší velmi výrazně, a to v průměrných hodnotách p-distancí. Například zástupci z Chorvatska se od českých zástupců lišily o 8,8 % v rámci p-distance. Syrské a italské haplotypy dělí průměrná hodnota p-distance 9,32 %. V rámci této třetí linie došlo k rozdělení na další dvě sublinie, které by se daly popsat jako sublinie Balkánského poloostrova a sublinie Blízkého východu. Mezi těmito dvěma subliniemi je průměrná hodnota p-distancí menší než 2 %. Na celkové haplotypové síti (obr. 32) je jasně vidět, že mezi balkánskými a blízkovýchodními jedinci je mnohem menší počet substitucí než mezi prvními dvěma liniemi. Do balkánské sublinie se zařadili zástupci Chorvatska, Černé Hory, Bulharska a Řecka. Řecké vzorky pocházely ze tří různých oblastí. První oblastí bylo pevninské Řecko, druhou oblastí byl ostrov Kréta a třetí oblastí byly ostrovy Rhodos a Simi, které se nachází v Egejském moři v blízkosti pobřeží Malé Asie. Do balkánské sublinie se tedy zařadili řecké vzorky z pevninského Řecka, Kréty a zajímavostí je, že vzorky z ostrovů Rhodos a Simi se objevily jak v balkánské sublinii, tak i v té blízkovýchodní. Do blízkovýchodní sublinie se kromě vzorků z ostrovů Rhodos a Simi zařadily také vzorky z Gruzie, Krymu, Kypru, Turecka, Sýrie, Libanonu a Íránu.

Do balkánské sublinie náleží 15 haplotypů s celkem 19 substitucemi. Je tedy zřejmé, že tyto haplotypy jsou si velmi podobné. V blízkovýchodní sublinii bylo nalezeno 20 haplotypů s celkem 39 substitucemi. Je ale důležité zmínit, že z některých lokalit se podařilo získat pouze malý počet vzorků. Z Gruzie a Kypru se podařilo do analýzy genu pro *Cyt-b* získat pouze jeden vzorek a ukrajinské a turecké vzorky byly zastoupeny pouze dvěma jedinci. Vzhledem k tomu, že nebyly dostupné vzorky *H. savii* z Izraele, nebylo možné potvrdit hlubokou divergenci Izraelských jedinců *H. savii* tak, jak ji popsal Mayer et al. (2007).

Zajímavostí je, že se v obou subliních objevují haplotypy z ostrovů Rhodos a Simi. Z přítomnosti dvou skupin rozdílných haplotypů v jednom území, zastoupených jak v blízkovýchodní linii, tak v té balkánské lze usuzovat, že došlo k opakované kolonizaci ostrovů různými populacemi *H. savii*. Podobné smísení haplotypů různých linií v geograficky jasně vymezené oblasti se ukázalo i u první a druhé linie. Čtyři vzorky ze Švýcarska a jeden ze Slovinska se objevil v první linii, zatímco zbylé švýcarské a slovinské haplotypy se objevily v druhé linii.

Fylogenetický strom kontrolního regionu (D-loop) se v rámci *H. savii* rozdělil na dvě linie, evropskou a východní, která se dále rozdělila na balkánskou a blízkovýchodní linii. Problém nicméně nastal při počítání p-distancí, neboť sekvence nevykazovaly tak velké rozdíly hodnot nekorigovaných p-distancí. I přes dodržení postupu, dvojitou kontrolu alignmentu a několik po sobě jdoucích stejných analýz sekvencí se ukázala nízká hodnota p-distancí. Pravděpodobnou příčinou může být to, že délka finálních sekvencí byla u D-loop pouhých 351 bp a kvalita sekvencí nebyla dostatečná. Může se tedy jednat o chybu v procesu amplifikace, nebo nedostatečnou specifitu primerů. Vzhledem k tomu, že nebylo možné porovnat získané sekvence kontrolního regionu u rodu *Hypsugo* (v databázi GenBank nebyly žádné pro kontrolní region), není možné posoudit, zda je délka 351 bp relevantní pro analýzu kontrolního regionu u rodu *Hypsugo*. Proto byly výsledky analýzy ponechány v této práci, ale s omezením, že je nutno analýzu kontrolního regionu D-loop rodu *Hypsugo* v západní Palearktidě prozatím přijímat s rezervou a případně ji prozkoumat podrobněji – zvolit případně jiné techniky a způsoby amplifikace (jiné primery, jiné kombinace teplot u PCR atd.).

U sekvencí jaderných genů bylo u *H. savii* ve většině případů nalezeno rozdělení na 2 až tři linie. Pokud se jednalo o dvě linie, bylo to rozdělení, kde první linii zaujímali jedinci z Blízkého východu a Balkánu. Druhou linii pak tvořili ostatní jedinci. Pokud se jednalo o 3 linie, byly v podstatě totožné s liniemi z analýzy genu pro *Cyt-b*.

Výsledný fylogenetický strom vypočítaný ze všech vzorků všech markerů ukazoval v podstatě podobné rozdělení jako strom genu pro *Cyt-b*, hlavně tedy těch nejdůležitějších poznatků, které lze najít v závěru.

Reiter et al. (2010b) vysvětluje možné cesty expanze *H. savii* na sever z Rakouska. Jedna z jeho hypotéz říká, že šíření *H. savii* na sever proběhlo z Itálie, přes Slovinsko do Rakouska a odtamtud severněji až do České republiky a na Slovensko. Tato hypotéza se zdá pro naše vzorky jako možné vysvětlení blízké příbuznosti jedinců z Itálie, Slovinska, Rakouska a České republiky. Co se týče rozšíření do Maďarska, zmiňuje Reiter et al. (2010b) možné rozšíření z Chorvatska. Jelikož je ale průměrná hodnota p-distancí mezi maďarskými a chorvatskými haplotypy v naší analýze 8,6 % a maďarské sekvence se mnohem více podobají sekvencím rakouským, českým, slovinským a italským, nabízí se spíše možnost, že nedávná expanze do Maďarska neproběhla z Chorvatska. Je ale nutné podotknout, že chorvatské vzorky pocházely z jedinců ze dvou oblastí na západě Chorvatska (město Rtina, Národní park Paklenica). Pro přesnější analýzu by bylo vhodné mít více vzorků z různých míst Chorvatska a Maďarska.

Hypsugo savii byl dlouhou dobu označován různými názvy. Ve většině starší literatury ho ale můžeme najít pod jménem *Vesperugo maurus*. Až v roce 1856 zařadil Kolenati tento druh do samostatného rodu *Hypsugo*. Většina dalších autorů zařazovala tento druh do rodu *Pipistrellus*, jako samostatnou skupinu v rámci tohoto rodu (Miller 1907, Tate 1942) nebo jako součást podrodu *Amblyotus* rodu *Eptesicus* (Ognev 1928). Kuzjakin (1950) ale navrhl, aby se na základě znaků sdílených s *Pipistrellus* i *Eptesicus* zařadil *H. savii* do rodu *Vespertilio*. Významně do taxonomie *H. savii* zasáhla studie, která porovnávala karyotyp, morfologii penisu, bakulum, zuby a kostru rodů *Pipistrellus*, *Eptesicus* a druhu *Pipistrellus savi* (Horáček et Hanák 1986), která navrhla oddělení samostatného rodu *Hypsugo*, do kterého by *H. savii* a další jeho formy spadaly. Tuto hypotézu potvrdila i analýza od Menu (1987) nebo od Hooper et Van Den Busche (2003) (viz kapitola 1.2.).

Vnitrodruhovou variabilitu *H. savii* v minulosti nastínili studie, které se soustředili na molekulárně genetické analýzy (Pestano et al. 2003, Ibáñez et al. 2006, Mayer et al. 2007, Veith et al. 2011, Çoraman et al. 2013, Dondini et al. 2016, Mifsud et Vella 2019). Podle výše zmíněných analýz se zdálo, že se v západní Palearctidě nachází 4 geografické oblasti se liniemi *H. savii*. První je jižní Levanta, která je oddělena největší divergencí, druhá se nachází v Chorvatsku, Turecku a zbytku Levanty. Třetí linie zaujímá plochu od Španělska po Švýcarsko a čtvrtá linie se rozkládá v severozápadní Africe, jižním Španělsku (viz kapitola 1.3.).

Podle Horáčka et al. (2000) se *Hypsugo savii ochromixtus* vyskytuje ve Španělsku a sahá až do Švýcarska. Podle molekulárně genetické analýzy García-Mudarra et al. (2009) se odděluje španělská populace od té Marocké o více jak 8 % ve dvouparametrové Kimurově distanci. Naše analýza také výrazně oddělila tuto španělskou linii od ostatních linií, což by mohlo značit, že právě tato linie by mohla být poddruhem *H. s. ochromixtus*.

Mayer et al. (2007) navrhl nové označení *Hypsugo cf. darwini* pro jedince obývající Maroko a Kanárské ostrovy. V další analýze z roku 2011 byly na Sicílii s Sardinii nalezeny haplotypy příbuzné právě *Hypsugo cf. darwini* (Veith et al. 2011), které byly následně doplněny o stejně podobné haplotypy z Toskánska (Dondini et al. 2016). Výsledky této diplomové práce popisují, že se do linie marockých a italských jedinců zařadily i jedinci z Rakouska, Slovinska, Švýcarska, Maďarska a České republiky. Pokud bychom měli k dispozici sekvence jedinců z Kanárských ostrovů a Malty, bylo by možné zhodnotit, jestli tato linie odpovídá právě tomuto Mayerem et al. (2007) navrženému druhu. Nutno ale podotknout, že Mayer et al. (2007) disponovali pouze dvěma vzorky *H. savii* z Maroka a Turecka, a po jednom vzorku z Chorvatska, Izraele a Řecka. Haplotypy podobné *Hypsugo cf. darwini* byly nalezeny na italských ostrovech, přičemž vzorky v této práci byly z pevninské Itálie. Otázkou tedy zůstává, jestli by při větším počtu vzorků z Maroka a Kanárských ostrovů, Malty a Itálie byla tato hypotéza potvrzena, či vyvrácena.

Hypsugo savii caucasicus byl v minulosti označován za poddruh vyskytující se v západní Palearktidě na Blízkém východě a Krymu (Koopman 1994, Horáček et al. 2000). Nicméně toto zařazení bylo založeno na morfologické analýze, kterou Benda et al. (2006) zpochybnil, neboť naznačil, že morfologické rozdíly, kterými předchozí autoři rozdělovali *H. savii* na poddruhy, jsou v těchto poddruzích variabilní. V analýze García-Mudarra et al. (2009) se v západní Palearktidě vymezila linie Balkánského poloostrova a Blízkého východu, která se oddělila od španělské linie o 8,2 % v hodnotách dvouparametrové Kimurově distanci. V naší analýze se tato linie oddělila od španělské linie o více jak 8 % p-distancí. Blízkovýchodní a balkánskou sublinii oděluje v této analýze průměrná hodnota p-distancí menší než 2 %. Dalo by se tedy říct, že Blízkovýchodní jedinci i balkánští jedinci by mohli být poddruhem *H. s. caucasicus*.

6. Závěr

Předkládaná diplomová práce zabývající se molekulárně genetickou analýzou druhů *Hypsugo arabicus*, *Hypsugo ariel* a *Hypsugo savii* je příspěvkem k mapování genetické variability populací netopýrů rodu *Hypsugo* v západní Palearktidě. Tyto výsledky by mohly napomoci k dalšímu studiu vnitrodruhové a mezidruhové variability těchto druhů.

Studiem této problematiky jsem dospěl k následujícím závěrům.

U druhu *Hypsugo arabicus* byla na základě analýzy mitochondriálního genu pro cytochrom *b* zjištěna značná genetická divergence mezi populacemi Íránu a Ománu. Íránské populace se od ománských lišily hodnotami nekorigované p-distance **3,74–4,78 %**, což by mohlo naznačovat oddělení íránských populací na úrovni poddruhu. Tento stav se také potvrdil na fylogenetickém stromu konkatenovaných vzorků celé matrix. Pokud by se v budoucnu potvrdila separátní fylogenetická pozice íránských populací na úrovni pojmenovaného taxonu (nejspíše poddruh), bude potřeba pro něj vytvořit nové jméno, neboť v synonymice rodu *Hypsugo* není žádné k dispozici.

U druhu *Hypsugo ariel* byla analýzou mitochondriálního genu pro cytochrom *b* zjištěna výrazná genetická diverzita mezi populacemi Egypta, které se od ostatních populací z Jemenu, Ománu a Jordánska lišily hodnotami nekorigované p-distance **6,07–6,54 %**, což by mohlo naznačovat oddělení egyptských jedinců na úrovni samostatného taxonu. Tento stav se také potvrdil na fylogenetickém stromu konkatenovaných vzorků celé matrix. Jestliže bude tato vzájemně separátní pozice egyptských a arbských populací na úrovni taxonu potvrzena, pro arabské populace je použitelné jméno *bodenheimeri* Harrison, 1960, zatímco egyptské populace by měly náležet nominotypickému taxonu, *ariel* Thomas, 1904.

U druhu *Hypsugo savii* byly analýzou dostupných vzorků ze západní Palearktidy vymezeny **tři hlavní linie**. První linie zahrnuje španělské populace *H. savii*, čtyři vzorky ze Švýcarska a jeden ze Slovinska. Druhá linie zahrnuje populace z Maroka, Itálie, Švýcarska, Slovinska, Maďarska, Rakouska a České republiky. Tato linie se od první lišila v nekorigované p-distanci v průměru o více jak 8 %. Třetí linie zahrnuje populace Balkánského poloostrova a Blízkého východu. Tato linie se následně rozdělila na dvě sublinie, které ale měly mezi sebou rozdíl maximálně do 2 %. Třetí linie se od první liší průměrně o 8,5 % a od druhé o 8,7 %.

Všechny tři zkoumané druhy se jasně oddělili v rámci rodu *Hypsugo*, což potvrdily analýzy všech markerů. Zajímavostí je nález haplotypů na ostrovech Rhodos a Simi reprezentující jak balkánskou, tak blízkovýchodní sublinii, což může nasvědčovat dvojí kolonizaci ostrovů jak z východu, tak ze západu. Ten samý jev se ukázal i u první a druhé linie. Jeden vzorek ze Švýcarska a jeden ze Slovinska se objevil v první linii. Zbytek švýcarských a slovinských jedinců se objevil v druhé linii.

Rozdělení *H. savii* na tři linie koresponduje s analýzou García-Mudarra et al. (2009), která také sjednotila blízkovýchodní a balkánské jedince do jedné linie, španělské jedince do druhé linie a marocké jedince do třetí linie. Dle dostupných dat se tedy zdá, že španělské jedince by mohli být poddruhem *Hypsugo savii ochromixtus*, balkánské a blízkovýchodní jedince by mohli být poddruhem *Hypsugo savii caucasicus*. Dle této analýzy jsou si maročtí, italští, švýcarští, rakouští, maďarští a čeští zástupci *H. savii* velmi podobní. Otázkou je, jestli tito jedinci patří do Mayerem et al. (2007) navrženého *Hypsugo cf. darwini* (viz kapitola 5.3.). Pro zjištění, o jakou linii se v tomto případě jedná, je potřeba hluší studie více jedinců z většího geografického areálu.

7. Literatura

- Ahmim, M., Dalhoumi, R. et Măntoiu, D. S. (2020). First data on the acoustic characteristics of some Chiropteran species from northern Algeria. *Bioacoustics*, 29(5), 499–517.
- Alcalde, J. T. et Gosá, A. (2009). The discovery of two Savi's pipistrelles under a stone, reveals its adaptation to shrub steppe habitats. *Munibe*, 57, 303–305.
- Ancillotto, L., Budinski, I., Nardone, V., Di Salvo, I., Della Corte, M., Bosso, L., Conti, P. et Russo, D. (2018). What is driving range expansion in a common bat? Hints from thermoregulation and habitat selection. *Behavioural processes*, 157, 540–546.
- Arlettaz, R., Guibert, E., Lugon, A., Médard, P. et Sierro, A. (1993). Variability of fur coloration in Savi's bat *Hypsugo savii* (Bonaparte, 1837). *Bonner Zoologische Beiträge*, 44, 293–297.
- Avise, J. C. (2004). *Molecular Markers, Natural history, and Evolution 2nd edition*. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland. 684pp.
- Bandelt, H. J., Forster, P. et Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37–48.
- Bartonička, T., Benda, P. et Juda, J. (2017). První nálezy a fenologie netopýra Saviova (*Hypsugo savii*) na Děčínsku (Chiroptera: Vespertilionidae). *Lynx, ns*, 48(1), 5–14.
- Bashta, A. T. (2009). Survey of current state and distribution of bats (Chiroptera) in Ukraine. *Studia chiropterologica*, 6, 43–80.
- Beck, A. (1995). Fecal analyses of European bat species. *Myotis*, 32–33, 109–119.
- Benda, P. et Horáček, I. (1998). Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean. Part 1. Review of distribution and taxonomy of bats in Turkey. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 62, 255–313.
- Benda, P. et Ševčík, M. (2020). Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean and Middle East. Part 16. Review of the distribution and taxonomy of bats in Egypt. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 84, 115–279.
- Benda, P., Abi Said, M. R., Bou Jaoude, I., Karanouh, R., Lučan, R. K., Sadek, R., Ševčík, M., Uhrin, M. et Horáček, I. (2016). Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean and Middle East. Part 13. Review of distribution and ectoparasites of bats in Lebanon. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 80, 207–316.
- Benda, P., Al-Jumaily, M. M., Reiter, A. et Nasher, A. K. (2011). Noteworthy records of bats from Yemen with description of a new species from Socotra. *Hystrix, Italian Journal Of Mammalogy*, 22(1), 23–56.
- Benda, P., Andreas, M. et Reiter, A. (2002). Record of *Hypsugo arabicus* from Baluchistan, Iran, with remarks to its ecology and systematical status. In: *IX European Bat Research Symposium, Univeristy of Le Havre. Abstracts*. University of Le Havre.
- Benda, P., Andreas, M., Kock, D., Lučan, R. K., Munclinger, P., Nová, P., Obuch, J., Ochman, K., Reiter, A., Uhrin, M. et Weinfurtová, D. (2006). Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean. Part 4. Bat fauna of Syria: distribution, systematics, ecology. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 70(1), 1–329.
- Benda, P., Dietz, C., Andreas, M., Hotový, J., Lučan, R. K., Maltby, A., Mekain, K., Truscott, J. et Vallo, P. (2008). Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean and Middle East. Part 6. Bats of Sinai (Egypt) with some taxonomic, ecological and echolocation data on that fauna. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 72(1), 1–103.
- Benda, P., Faizolâhi, K., Andreas, M., Obuch, J., Reiter, A., Ševčík, M., Uhrin, M., Vallo, P. et Ashrafi, S. (2012). Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean and Middle East. Part 10. Bat fauna of Iran. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 76(3–4), 163–582.

- Benda, P., Ivanova, T., Horáček, I., Hanák, V., Červený, J., Gaisler, J., Gueorgioeva, A., Petrov, B. et Vohralík, V. (2003).** Bats (Mammalia: Chiroptera) of the eastern Mediterranean. Part 3. Review of bat distribution in Bulgaria. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 67(4), 245–357.
- Benda, P., Lučan, R. K., Obuch, J., Reiter, A., Andreas, M., Bačkor, P., Bohnenstengel, T., Eid, E. K., Ševčík, M., Vallo, P. et Amr, Z. S. (2010).** Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean and Middle East. Part 8. Bats of Jordan: fauna, ecology, echolocation, ectoparasites. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 74 (3–4), 185–353.
- Bonaparte, C. L. (1832–1841).** *Iconografia della fauna italiana per le quattro classi degli animali vertebrati, T1 mammiferi e uccelli*. Dalla tipografia salviucci Roma.
- Boston, E. S., Puechmaille, S. J., Scott, D. D., Buckley, D. J., Lundy, M. G., Montgomery, I. W., Prodöhl, P. A., Teeling, E. C. (2012).** Empirical assessment of non-invasive population genetics in bats: comparison of DNA quality from faecal and tissue samples. *Acta Chiropterologica*, 14(1), 45–52.
- Çoraman, E., Furman, A., Karataş, A. et Bilgin, R. (2013).** Phylogeographic analysis of Anatolian bats highlights the importance of the region for preserving the Chiropteran mitochondrial genetic diversity in the Western Palaearctic. *Conservation Genetics*, 14(6), 1205–1216.
- Corbet, G. B. (1978).** *The mammals of the Palaearctic region: a taxonomic review*. British Museum (Natural History) and Cornell University Press, London and Ithaca, 314pp.
- Cvrčková, F. (2006).** *Úvod do praktické bioinformatiky*. Academia, 150pp.
- Degen, H. J., Deufel, A., Eisel, D., Grunewald-Janho, S. et Keeseey, J. (2006).** *PCR applications manual. 3rd edition*. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 340pp.
- Dondini, G. et Vergari, S. (2000).** Carnivory in the greater noctule bat (*Nyctalus lasiopterus*) in Italy. *Journal of Zoology*, 251(2), 233–236.
- Dondini, G., Vergari, S., Fichera, G. et Kiefer, A. (2016).** First record of *Hypsugo cf. darwini* (Tomes, 1859) in Tuscany, Italy. *Barbastella*, 9 (1).
- Đulić, B. (1970).** Ökologische Beobachtungen der Fledermäuse der Adriatischen Inseln. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 35, 45–51.
- Đulić, B. (1978).** Morphology of the hair of *Pipistrellus savii* Bonaparte 1837. 51–61 In: Olembro, R. J., Castelano, J.B. et Mutere, F. A. (eds.): *Proceedings of the fourth International bat research conference*. Nairobi, Kenya National Academy for Advancement of Arts and Sciences, 328pp.
- Eick, G. N., Jacobs, D. S. et Matthee, C. A. (2005).** A nuclear DNA phylogenetic perspective on the evolution of echolocation and historical biogeography of extant bats (Chiroptera). *Molecular Biology and Evolution*, 22(9), 1869–1886.
- Ellerman, J. R. et Morrison-Scott, T. C. S. (1951).** *Checklist of Palearctic and Indian mammals, 1758 to 1946*. British Museum (Natural History), London, 810pp.
- Felsenstein, J. (1981).** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*, 17(6), 368–376.
- Fenton, M. B. et Simmons, N. B. (2015).** *Bats: A World of Science and Mystery*. University of Chicago press, 240pp.
- Flower, S. S. (1932).** Notes on the recent mammals of Egypt, with a list of the species recorded from that Kingdom. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 101, 369–450.

- Frantz, A. C., Viglino, A., Wilvert, E., Cruz, A. P., Wittische, J., Weigand, A. M., Bujik, J., Pierrette, N., Dekeukeleire, D., Dekker, J. J. A., Horsburgh, G. J., Schneider, S., Lang, M., Caniglia, R., Galaverni, M., Schleimer, A., Bücs, S. L. et Pir, J. B. (2022). Conservation by trans-border cooperation: population genetic structure and diversity of geoffroy's bat (*Myotis emarginatus*) at its north-western european range edge. *Biodiversity and Conservation*, 31(3), 925–948.
- Freitag, B. (1996). *Pipistrellus savii* (Bonaparte, 1837) - Erstnachweis für die Steiermark (Mammalia, Chiroptera). *Mitteilungen des Naturwissenschaftlicher Vereins für Steiermark*, 125, 237–238.
- Fumagalli, L., Taberlet, P., Favre, L. et Hausser, J. (1996). Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Molecular biology and evolution*, 13(1), 31–46.
- Furman, A., Coraman, E., Çelik, Y. E., Postawa, T., Bachanek, J. et Ruedi, M. (2014). Cytonuclear discordance and the species status of *Myotis myotis* and *Myotis blythii* (Chiroptera). *Zoologica Scripta*, 43(6), 549–561.
- Gaisler, J. (2001). A mammal species new to Czech Republic – Savi's pipistrelle *Hypsugo savii*. *Folia zoologica*, 50(3), 231–233.
- Garcia-Mudarra, J. L., Ibanez, C. et Juste, J. (2009). The Straits of Gibraltar: barrier or bridge to Ibero-Moroccan bat diversity? *Biological Journal of the Linnean Society*, 96(2), 434–450.
- Garrido-Garcia, J. A. (2000). New altitude record for Chiroptera in Europe. *Myotis*, 37, 103.
- Haines, A. M., Tobe, S. S., Kobus, H. J. et Linacre, A. (2015). Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 36(6), 941–944.
- Harrison, D. L. (1960). A new species of pipistrelle bat (Chiroptera: Pipistrellus) from south Israel. *Durban Museum Novitates*, 5(19), 261–267.
- Harrison, D. L. (1964). *The Mammals of Arabia: Vol 1 Insectivora Chiroptera Primates*. Ernest Benn Limited, 192 pp.
- Harrison, D. L. (1979). A new species of pipistrelle bat (*Pipistrellus* Vespertilionidae) from Oman, Arabia. *Mammalia*, 41, 573–576.
- Harrison, D. L. (1982). Observation on some rare Arabian *Pipistrellus* (Chiroptera: Vespertilionidae) with special reference to the external male genitalia. *Bonner zoologische beiträge*, 33, 187–190.
- Harrison, D. L. et Bates, P. J. J. (1991). *The Mammals of Arabia. Second Edition*. Harrison Zoological Museum, Sevenoaks, 354 pp.
- Hastings, W. K. (1970). Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika*, 57(1), 97–109.
- Hill, J. E. et Harrison, D. L. (1987). The baculum in the Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) with a systematic review, a synopsis of *Pipistrellus* and *Eptesicus*, and the description of a new genus and subgenus. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology Series*, 52, 225–305.
- Hoang, D. T., Chernomor, O., Von Haeseler, A., Minh, B. Q. et Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular biology and evolution*, 35(2), 518–522.
- Hofer, S. R. et Van Den Bussche, R. A. (2003). Molecular Phylogenetics of the Chiropteran Family Vespertilionidae. *Acta Chiropterologica*, 5, 1–63.
- Horáček, I. et Benda, P. (2004). *Hypsugo savii* (Bonaparte, 1837) – Aplenfledermaus. 911–941 In: Krapp, F. (ed.): *Handbuch der Säugtiere Europas, Band 4, Fladertiere. Teil II: Chiroptera II Vespertilionidae 2, Molossidae, Nycteridae*. Wiebelsheim, Aula-Verlag, 1186pp.
- Horáček, I. et Hanák, V. (1986). Generic status of *Pipistrellus savii* and comments on classification of the genus *Pipistrellus* (Chiroptera, Vespertilionidae). *Myotis*, 23–24, 9–16.

- Horáček, I., Hanák, V. et Gaisler, J. (2000).** Bats of the Palearctic region: a taxonomic and biogeographic review. 11–157 In: Woloszyn, B. W. (ed.): *Proceedings of the VIIIth European Bat Research Symposium. Vol. I. Approaches to Biogeography and Ecology of Bats*. Krakow, Chiropterological Information Center, Institute of Systematics and Evolution of Animals PAS, 280pp.
- Huelsenbeck, J. P., et Ronquist, F. (2001).** MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754–755.
- Hutterer, R., Decher, J., Monadjem, A. et Astrin, J. (2019).** A new genus and species of vesper bat from West Africa, with notes on *Hypsugo*, *Neoromicia*, and *Pipistrellus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Acta Chiropterologica*, 21(1), 1–22.
- Chernomor, O., Von Haeseler, A. et Minh, B. Q. (2016).** Terrace aware data structure for phylogenomic inference from supermatrices. *Systematic biology*, 65(6), 997–1008.
- Ibáñez, C., García–Mударra, J. L., Ruedi, M., Stadelmann, B. et Juste, J. (2006).** The Iberian contribution to cryptic diversity in European bats. *Acta Chiropterologica*, 8(2), 277–297.
- Ibáñez, C., Guillén, A., Fernández, R., Pérez, J. L. et Guerrero, S. I. (1992).** Iberian distribution of some little known bat species. *Mammalia*, 56(3), 433–444.
- Igea, J., Juste, J. et Castresana, J. (2010).** Novel intron markers to study the phylogeny of closely related mammalian species. *BMC evolutionary biology*, 10(1), 1–13.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D. et Wilson, A. C. (1991).** Evolution of the cytochrome-b gene of mammals. *Journal of molecular evolution*, 32(2), 128–144.
- Jahelková, H., Neckářová, J., Bláhová, A., Sasínková, M., Weinfurtová, D., Hybnerová, Z., Čermáková, V. et Zieglerová, D. (2014).** First record of *Hypsugo savii* in Prague and summary of winter records of *Pipistrellus nathusii* from Prague and close surroundings (Czech Republic). *Vespertilio*, 17, 95–101.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., Von Haeseler, A. et Jermin, L. S. (2017).** ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods*, 14(6), 587–589.
- Karataş, A. et Sözen, M. (2006).** Bats of the middle and upper Kızılırmak regions, Central Anatolia, Turkey (Chiroptera). *Lynx, ns*, 37, 151–159.
- Kolenati, F. A. (1856).** Europa's Chiroptern I. Synopsis der Europäischen Chiroptern. *Allgemeine deutsche Naturhistorische Zeitung, N. F.*, 2 (4): 121–133.
- Koopman, K. F. (1970).** Zoogeography of Bats. 29–50 In: Slaughter, B. H. & Walton, D. W. (eds.): *About Bats: A Chiropteran Symposium*. Dallas, Southern Methodist University Press, 339pp.
- Koopman, K. F. (1975).** Bats of Sudan. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 154(4), 353–444.
- Koopman, K. F. (1993).** Order Chiroptera. 137–241 In: Wilson, D. E. et Reeder, D. M. (eds.): *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Washington & London, Smithsonian Institution Press, 1206pp.
- Koopman, K. F. (1994).** Chiroptera: Systematics. 2–217 In: Neithammer, J., Schliemann, H. et Starck, D. (eds.): *Handbuch der Zoologie, Band VIII, Mammalia, Teilband 60*. Berlin and New York, Walter de Gruyter.
- Kuzjakin, A. P. (1950).** *Letucije mysi*. Sov. Nauka, Moskva, 413pp.
- Lack, J. B., Roehrs, Z. P., Stanley Jr, C. E., Ruedi, M. et Van Den Bussche, R. A. (2010).** Molecular phylogenetics of *Myotis* indicate familial-level divergence for the genus *Cistugo* (Chiroptera). *Journal of Mammalogy*, 91(4), 976–992.
- Larget, B. et Simon, D. L. (1999).** Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 16(6), 750–759.

- LaVal, R. K. et LaVal, M. L. (1977).** Reproduction and behavior of the African banana bat, *Pipistrellus nanus*. *Journal of Mammalogy*, 58(3), 403–410.
- Leigh, J. W. et Bryant, D. (2015).** POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116.
- Locard, A. (1889).** Catalogue descriptif des mammifères qui vivent dans le département du Rhône et dans les régions avoisinantes. *Publications de la Société Linnéenne de Lyon*, 35(1), 1–74.
- Makin, D. et Harrison, D. L. (1988).** Occurrence of *Pipistrellus ariel* Thomas, 1904 (Chiroptera: Vespertilionidae) in Israel. *Mammalia*, 52(3), 419–422.
- Mayer, F., Dietz, C. et Kiefer, A. (2007).** Molecular species identification boosts bat diversity. *Frontiers in zoology*, 4(1), 1–5.
- Medway, L. et Marshall, A. G. (1972).** Roosting associations of flat-headed bats, *Tylonycteris* species (Chiroptera: Vespertilionidae) in Malaysia. *Journal of Zoology*, 168(4), 463–482.
- Mendelssohn, H. et Yom-Tov, Y. (1999).** *Fauna Palaestina, Mammalia of Israel*. Jerusalem, The Israel Academy of Sciences and Humanities, 439 pp.
- Menu, H. (1987).** Morphotypes dentaires actuels et fossiles des Chiroptères Vespertilionines. II: Implications systématiques et phylogéniques. *Palaeovertebrata*, 17(3), 77–150.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H. et Teller, E. (1953).** Equation of state calculations by fast computing machines. *The journal of chemical physics*, 21(6), 1087–1092.
- Mifsud, C. M. et Vella, A. (2019).** Mitochondrial genetic diversity of bat species from the Maltese Islands and applications for their conservation. *Natural and Engineering Sciences*, 4(3), 276–292.
- Miller, G. S. (1907).** The families and genera of bats. *United States National Museum Bulletin*, 57, 1–282.
- Miller, M. A., Schwartz, T., Pickett, B. E., He, S., Klem, E. B., Scheuermann, R. H., Passarotti, M., Kaufman, S. et O’Leary, M. A. (2015).** A RESTful API for Access to Phylogenetic Tools via the CIPRES Science Gateway. *Evolutionary Bioinformatics*, 11, 43–48.
- Monadjem, A., Demos, T. C., Dalton, D. L., Webala, P. W., Musila, S., Kerbis Peterhans, J. C. et Patterson, B. D. (2021).** A revision of pipistrelle-like bats (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae) in East Africa with the description of new genera and species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 191(4), 1114–1146.
- Moratelli, R., Burgin, C., Cláudio, V. C., Novaes, R. L. M., Lopez–Baucells, A. et Haslauer, R. (2019).** Family Vespertilionidae (Vesper Bats). 716–981 In: Wilson, D. E. et Mittermeier, R. A. (eds.) *Handbook of the mammals of the world, vol. 9., Bats*. Barcelona, Lynx Editions, 1008pp.
- Murariu, D. et Pop, D. A. (2011).** Observations on the bat fauna (Mammalia: Chiroptera) of Roşia Montană (Romania). *Travaux du Muséum National d’Histoire Naturelle “Grigore Antipa”*, 54(2), 529–540.
- Murariu, D., Atanasova, I., Raykov, I. et Chişamera, G. (2009).** Results on mammal (Mammalia) survey from Bulgarian and Romanian Dobrogea. *Travaux du Muséum national d’Histoire naturelle “Grigore Antipa”*, 52, 371–386.
- Myers, P. (1978).** Sexual dimorphism in size of vespertilionid bats. *The American Naturalist*, 112(986), 701–711.
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A. et Minh, B. Q. (2015).** IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 32(1), 268–274.
- Ognev, S. I. (1928).** *Zveri vostochnoi Evropy i severnoi Azii: Nasekomoyadnye i letychie myshi*. Glavnauka, Moscow, 631pp.
- Otálora-Ardila, A., Herrera M, L. G., Flores-Martínez, J. J. et Voigt, C. C. (2013).** Marine and terrestrial food sources in the diet of the fish-eating myotis (*Myotis vivesi*). *Journal of Mammalogy*, 94(5), 1102–1110.

- Page, R. D. M. et Holmes, E. C. (1998).** *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell publishing Ltd., 346pp.
- Patterson, B. D., Webala, P. W., Kerbis Peterhans, J. C., Goodman, S. M., Bartonjo, M. et Demos, T. C. (2019).** Genetic variation and relationships among Afrotropical species of *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Journal of Mammalogy*, 100(4), 1130–1143.
- Paunović, M., Karapandža, B., Budinski, I. et Jovanović, J. (2015).** New records of the Savi's pipistrelle *Hypsugo savii* (Bonaparte, 1837) (Chiroptera, Mammalia) from Serbia: an evidence for the expansion of its geographical range. *Acta Zoologica Bulgarica*, 67(3), 389–397.
- Pavlinov, I. Y. et Lissovski, A. A. (2012).** *THE MAMMALS OF RUSSIA: A taxonomic and geographic reference*. KMK Scientific Press Ltd., Moscow, 602pp.
- Pestano, J., Brown, R. P., Suárez, N. M. et Fajardo, S. (2003).** Phylogeography of pipistrelle-like bats within the Canary Islands, based on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26(1), 56–63.
- Pocora, I. et Pocora, V. (2011).** The use by bats (Chiroptera: Vespertilionidae) of various habitat types in Moldova and the Danube delta (Romania). *Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle "Grigore Antipa"*, 54, 223–242.
- Puechmaille, S. J., Ar Gouilh, M., Piyapan, P., Yokubol, M., Mie, K. M., Bates, P. J. J., Satasook, C., Nwe, T., Hla Bu, S. S., Mackie, I. J., Petit, E. J. et Teeling, E. C. (2011).** The evolution of sensory divergence in the context of limited gene flow in the bumblebee bat. *Acta Chiropterologica*, 9 (2), 269–276.
- Puechmaille, S. J., Hizem, W. M., Allegrini, B. et Abiadh, A. (2012).** Bat fauna of Tunisia: review of records and new records, morphometrics and echolocation data. *Vespertilio*, 16, 211–239.
- Qumsiyeh, M. B. (1985).** The Bats of Egypt. *Special Publications, The Museum Texas Tech University*, 23, 1–101.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G. et Suchard, M. A. (2018).** Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67(5), 901–904.
- Rebelo, H., Tarroso, P. et Jones, G. (2010).** Predicted impact of climate change on European bats in relation to their biogeographic patterns. *Global Change Biology*, 16(2), 561–576.
- Reiter, A., Bartonička, T., Lučan R.K. et Řehák, Z. (2010a).** New records of *Hypsugo savii* in the Czech Republic. *Vespertilio*, 13–14, 121–125.
- Reiter, G., Wegleitner, S., Hüttmeir, U. et Pollheimer, M. (2010b).** Die Alpenfledermaus, *Hypsugo savii* (Bonaparte, 1837). *Mitteleuropa-Nyctalus*, 15(2–3), 158–170.
- Ronquist, F. et Huelsenbeck, J. P. (2003).** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572–1574.
- Rosevear, D. R. (1965).** *The Bats of West Africa*. British Museum (Natural History), London, 418pp.
- Ruedi, M. et Arlettaz, R. (1991).** Biochemical systematics of the Savi's bat (*Hypsugo savii*) (Chiroptera: Vespertilionidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 29(2), 115–122.
- Ruedi, M., Stadelmann, B., Gager, Y., Douzery, E. J. P., Francis, Ch. M., Lin, L. K., Guillén-Servent, A., Cibois, A. (2013).** Molecular phylogenetic reconstructions identify East Asia as the cradle for the evolution of the cosmopolitan genus *Myotis* (Mammalia, Chiroptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3), 437–449.
- Rybin, S. N., Horáček, I. et Červený, J. (1989).** Bats of southern Kirghizia: distribution and faunal status. 421–441 In: Hanák, V., Horáček, I. et Gaisler, J. (eds.): *European bat research 1987*, Praha, Charles University Press, 720pp.
- Salicini, I., Ibáñez, C. et Juste, J. (2011).** Multilocus phylogeny and species delimitation within the Natterer's bat species complex in the Western Palearctic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(3), 888–898.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. et Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shump, K. A. et Shump, A. U. (1982).** *Lasiurus borealis. Mammalian species*, (183), 1–6.
- Simmons, N. B. (2005).** Order Chiroptera. 312–529 In: Wilson, D. E., et Reeder, D. M. (eds.): *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference, Third edition, Volume 1.* The John Hopkins University Press, 743pp.
- Smith, M. F. et Patton, J. L. (1993).** The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50(3), 149–177.
- Spitzenberger, F. (1997).** Distribution and range expansion of Savi's bat (*Hypsugo savii*) in Austria. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 62(3), 179–181.
- Springer, M. S., Teeling, E. C., Madsen, O., Stanhope, M. J. et de Jong, W. W. (2001).** Integrated fossil and molecular data reconstruct bat echolocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 6241–6246.
- Stadelmann, B., Herrera, L. G., Arroyo-Cabrales, J., Flores-Martinez, J. J., May, B. P. et Ruedi, M. (2004).** Molecular systematics of the fishing bat *Myotis (Pizonyx) vivesi*. *Journal of Mammalogy*, 85(1), 133–139.
- Stadelmann, B., Lin, L. K., Kunz, T. H. et Ruedi, M. (2007).** Molecular phylogeny of New World *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. *Molecular phylogenetics and evolution*, 43(1), 32–48.
- Stojanovski, L. (1994).** Contribution to the knowledge of bats (Chiroptera, Mammalia) of Macedonia. *Macedonian Journal of Ecology and Environment*, 2(1), 59–62.
- Stoycheva, S., Georgiev, D., Pandourski, I. et Tilova, E. (2009).** Bat diversity in two large towns of the Upper Thrace, Bulgaria (Chiroptera). *Lynx, ns*, 40, 83–93.
- Strimmer, K., von Haeseler, A. et Salemi, M. (2009).** Genetic distances and nucleotide substitution models. *The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*, 111–141.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V. et Koptíková, J. (2005).** *Metody molekulární biologie.* Masarykova Univerzita, Brno, 194pp.
- Taanman, J. W. (1999).** The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1410(2), 103–123.
- Tamura, K., Stecher, G. et Kumar, S. (2021).** MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022–3027.
- Tate, G. H. H. (1942).** Review of the vespertilionine bats: with special attention to genera and species of the Archbold collections. *Bulletin of the American museum of natural history*, 80, 221–297.
- Teeling, E. C., Madsen, O., Van Den Bussche, R. A., de Jong, W. W., Stanhope, M. J. et Springer, M. S. (2002).** Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophoid microbats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), 1431–1436.
- Teeling, E. C., Springer, M. S., Madsen, O., Bates, P., O'brien, S. J. et Murphy, W. J. (2005).** A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science*, 307(5709), 580–584.
- Thomas, O. (1904).** On some small mammals collected by Mr. A. M. Mackilligin in the Eastern Desert of Egypt. *Annals and Magazine of Natural History, Series 7, 14*, 155–159.
- Thong, V. D., Puechmille, S. J., Denzinger, A., Bates, P. J. J., Dietz, C., Csorba, G., Soisook, P., Teeling, E. C., Matsumura, S., Furey, N. M. et Schnitzler, H. (2012).** Systematics of the *Hipposideros turpis* complex and a description of a new subspecies from Vietnam. *Mammal Review*, 42 (2), 166–192.

- Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A. et Minh, B. Q. (2016).** W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic acids research*, 44, 232–235.
- Uhrin, M., Hüttmeir, U., Kipson, M., Estók, P., Sachanowicz, K., Bücs, S., Karapandža, B., Paunovic, M., Presentik, P., Bashta, A–T., Maxinová, E., Lehotská, B., Lehotský, R., Barti, R., Csoz, I., Szoroday Paradi, F., Dombi, I., Gorfol, T., Boldogh, S. A., Csaba, J., Pocora, I. et Benda, P. (2016).** Status of Savi's pipistrelle *Hypsugo savii* (Chiroptera) and range expansion in Central and south-eastern Europe: a review. *Mammal Review*, 46(1), 1–16.
- Uvizl, M., Šmíd, J., Aghová, T., Varadínová-Kotyková, Z. et Benda, P. (2019).** Molecular phylogeny and systematics of the sheath-tailed bats from the Middle East (Emballonuridae: *Taphozous* and *Coleura*). *Acta Chiropterologica*, 21(1), 23–34.
- Veith, M., Mucedda, M., Kiefer, A. et Pidinchedda, E. (2011).** On the presence of pipistrelle bats (*Pipistrellus* and *Hypsugo*; Chiroptera: Vespertilionidae) in Sardinia. *Acta Chiropterologica*, 13(1), 89–99.
- Vernier, E. (1995).** Presence and distribution of bats in the town of Padova. *Myotis*, 32–33, 193–195.
- Volleth, M. et Heller, K. G. (1994).** Phylogenetic relationships of vespertilionid genera (Mammalia: Chiroptera) as revealed by karyological analysis. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 32(1), 11–34.
- Waring, M. J. (1965).** Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of molecular biology*, 13(1), 269–282.
- Williams, D. F. et Findley, J. S. (1979).** Sexual size dimorphism in vespertilionid bats. *American Midland Naturalist*, 102(1), 113–126.
- Wilmer, J. W., Moritz, C., Hall, L. et Toop, J. (1994).** Extreme population structuring in the threatened ghost bat, *Macroderma gigas*, evidence from mitochondrial DNA. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 257(1349), 193–198.
- Yalden, D. W. et Morris, P. A. (1975).** *The lives of bats*. Times books, 247pp.
- Yom-Tov, Y., Makin, D. et Shalmon, B. (1992).** The insectivorous bats (Microchiroptera) of the Dead Sea area, Israel. *Israel Journal of Zoology*, 38(2), 125–137.

Přílohy

Příloha č. 1 Seznam vzorků použitých pro molekulárně-genetickou analýzu. Celá jména autorů vzorků jsou k dispozici ve zkratkách a také pod přílohou č. 1

název vzorku	vzorek od	sbírkové číslo	druh	země	lokality	název genu					
						Cyt-b	D-loop	COPS	ACOX	STAT	Rag2
pb 1692	P.B.	48409	<i>Hypsugo arabicus</i>	Írán	Pir Sohrab				H6	H7	H1
pb 1693	P.B.	48410	<i>Hypsugo arabicus</i>	Írán	Pir Sohrab				H6		H1
pb 1694	P.B.	48411	<i>Hypsugo arabicus</i>	Írán	Pir Sohrab					H7	
pb 1695	P.B.	48412	<i>Hypsugo arabicus</i>	Írán	Pir Sohrab	H1				H7	H1
pb 1696	P.B.	48413	<i>Hypsugo arabicus</i>	Írán	Pir Sohrab			H1		H7	
pb 1699	P.B.	48416	<i>Hypsugo arabicus</i>	Írán	Pir Sohrab	H3		H1			
pb 1700	P.B.	48417	<i>Hypsugo arabicus</i>	Írán	Pir Sohrab	H2					H1
pb 1701	P.B.	48418	<i>Hypsugo arabicus</i>	Írán	Pir Sohrab	H2		H1			H1
pb 1702	P.B.	48419	<i>Hypsugo arabicus</i>	Írán	Pir Sohrab				H6		
pb 1703	P.B.	48420	<i>Hypsugo arabicus</i>	Írán	Pir Sohrab				H6		
pb 4427	P.B.	92624	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Al Aqar	H4	H5	H2	H7		
pb 4468	P.B.	92665	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Al Nakhar	H7	H6				
pb 4469	P.B.	92666	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Al Nakhar	H4	H5		H7	H8	H1
pb 4579	P.B.	92774	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Muqal	H4	H5	H2	H7		H1
pb 4584	P.B.	92779	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Dibab				H7	H8	H1
pb 4587	P.B.	92782	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Mansaft	H4	H7		H7		H1
pb 4588	P.B.	92783	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Mansaft				H7		
pb 4589	P.B.	92784	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Mansaft	H4	H5		H7	H9	
pb 4886	P.B.	93733	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Layh	H4	H5	H2	H7		H1
pb 4887	P.B.	93734	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Layh			H2	H7		H1
pb 4892	P.B.	93739	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Al-Aqor, Wadi Tiwi	H4		H2	H7		H1
pb 4893	P.B.	93740	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Al-Aqor, Wadi Tiwi	H4	H5	H2	H7	H10	H1
pb 4894	P.B.	93741	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Al-Aqor, Wadi Tiwi	H4	H8		H7		H1
pb 4895	P.B.	93742	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Al-Aqor, Wadi Tiwi	H4			H7	H10	H1
pb 4913	P.B.	93760	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Wadi Al-Hawasina	H9			H7	H10	H1
pb 4914	P.B.	93761	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Wadi Al-Hawasina	H9	H9	H2	H7		
pb 4939	P.B.	93785	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Misfat Al-Khawater	H5		H2	H7	H10	H1
pb 4940	P.B.	93786	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Misfat Al-Khawater			H2	H7		H1

pb 4941	P.B.	93787	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Misfat Al-Khawater	H8	H5	H2	H7		H1
pb 4966	P.B.	93812	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Subakh, Hatta Pools	H7	H10	H2	H7		H1
pb 4967	P.B.	93813	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Subakh, Hatta Pools	H4	H10	H2	H7	H10	H1
pb 4968	P.B.	93814	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Subakh, Hatta Pools	H10	H11	H2	H7	H10	H1
pb 4976	P.B.	93822	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Al-Zihaymi	H6	H12	H2	H7	H10	H1
pb 4977	P.B.	93823	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Al-Zihaymi	H11	H9	H3	H7		
pb 5336	P.B.	93997	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Sal Aalah	H10	H9		H7	H10	
pb 5340	P.B.	94001	<i>Hypsugo arabicus</i>	Omán	Wadi Banah	H10	H9	H2	H7		H2
pb 3022	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Hauf			H4	H1	H1	H3
pb 3023	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Hauf	H12	H1		H2	H1	H3
pb 3024	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Hauf			H5	H3	H1	H3
pb 3025	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Hauf	H12		H4	H1	H1	H3
pb 3026	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Hauf	H13			H2	H1	H3
pb 3027	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Hauf				H2	H1	
pb 3028	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Hauf	H12		H4	H1	H1	H4
pb 3029	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Hauf	H12	H3		H1	H1	
pb 3030	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Hauf	H12			H1		H4
pb 3050	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Damqawt	H16		H5	H1	H2	H3
pb 3051	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Damqawt	H17			H1		H3
pb 3052	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Damqawt	H12				H2	H3
pb 3054	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Sayhut				H2		H3
pb 3055	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Sayhut	H16	H2	H4			H3
pb 3058	P.B.		<i>Hypsugo ariel</i>	Jemen	Al Nueimah	H17				H2	H3
pb 4022	P.B.	92380	<i>Hypsugo ariel</i>	Jordánsko	Tall Numeira				H3	H5	
pb 4169	P.B.	92487	<i>Hypsugo ariel</i>	Jordánsko	Al Ghal			H5	H4		H3
pb 4170	P.B.	92488	<i>Hypsugo ariel</i>	Jordánsko	Al Ghal	H15	H2	H4	H2	H2	H3
pb 4171	P.B.	92489	<i>Hypsugo ariel</i>	Jordánsko	Al Ghal	H15		H5	H5		
pb 4172	P.B.	92490	<i>Hypsugo ariel</i>	Jordánsko	Al Ghal				H2	H2	
pb 4173	P.B.	92491	<i>Hypsugo ariel</i>	Jordánsko	Al Ghal	H15		H5	H5	H2	H3
pb 4174	P.B.	92492	<i>Hypsugo ariel</i>	Jordánsko	Al Ghal	H15			H4	H2	H3
pb 4175	P.B.	92493	<i>Hypsugo ariel</i>	Jordánsko	Al Ghal		H2	H5	H5	H3	
pb 4176	P.B.	92494	<i>Hypsugo ariel</i>	Jordánsko	Al Ghal	H15	H2	H5	H5	H2	H3
pb 4559	P.B.	92754	<i>Hypsugo ariel</i>	Omán	Jufa			H4	H3	H3	
pb 4618	P.B.	92597	<i>Hypsugo ariel</i>	Egypt	El A'aqab	H18	H4	H4	H1	H6	H3

pb 4619	P.B.	92598	<i>Hypsugo ariel</i>	Egypt	El A'aqab	H18	H4	H4	H1	H6	
pb 4708	P.B.	92804	<i>Hypsugo ariel</i>	Jordánsko	Wadi al-Hassa	H15		H5	H2		
pb 5412	P.B.	94073	<i>Hypsugo ariel</i>	Omán	Rima, Wadi Gharah			H4	H3	H3	
pb 5413	P.B.	94074	<i>Hypsugo ariel</i>	Omán	Rima, Wadi Gharah	H14		H5	H3		
pb 5414	P.B.	94075	<i>Hypsugo ariel</i>	Omán	Rima, Wadi Gharah	H14				H3	
pb 5415	P.B.	94076	<i>Hypsugo ariel</i>	Omán	Rima, Wadi Gharah	H14			H3	H4	
68347	F.Z.		<i>Hypsugo savii</i>	Rakousko	Pilzgasse 23	H28	H13				
BG252	H.D.		<i>Hypsugo savii</i>	Bulharsko	jeskyně Dupka	H36					H13
BG276	H.D.		<i>Hypsugo savii</i>	Bulharsko	Kladnitsa	H39					H14
BG279	H.D.		<i>Hypsugo savii</i>	Bulharsko		H48	H35	H26			
BG368	H.D.		<i>Hypsugo savii</i>	Bulharsko	Balgarevo						H14
BG383	H.D.		<i>Hypsugo savii</i>	Bulharsko	Momina klisura	H37	H36	H27			H14
BG397	H.D.		<i>Hypsugo savii</i>	Bulharsko	Spahievo	H38	H35	H30			H21
G1	I.N.		<i>Hypsugo savii</i>	Gruzie				H16	H27	H45	H15
G2	I.N.		<i>Hypsugo savii</i>	Gruzie		H51	H20	H31	H11	H36	H14
GTHU751	T.G.		<i>Hypsugo savii</i>	Maďarsko	Budapešť	H25	H17				H13
GTHU752	T.G.		<i>Hypsugo savii</i>	Maďarsko	Budapešť	H26				H11	H13
GTHU753	T.G.		<i>Hypsugo savii</i>	Maďarsko	Pécs						H13
GTHU754	T.G.		<i>Hypsugo savii</i>	Maďarsko		H26	H13				H13
GTHU755	T.G.		<i>Hypsugo savii</i>	Maďarsko	Szekszárd	H26	H13				
GTHU91	T.G.		<i>Hypsugo savii</i>	Maďarsko	Szekszárd	H25	H13				
HS 1	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina						H13
HS 10	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina					H34	H13
HS 102	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Paklenica	H47					H14
HS 11	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina			H20			H13
HS 112	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Paklenica	H47	H32				
HS 12	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina						H13
HS 13	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina					H33	H13
HS 14	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina			H21			H13
HS 15	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina			H23		H34	H22
HS 16	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina						H13
HS 17	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina						H13
HS 2	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina					H33	H13
HS 3	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina						H13

HS 4	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina					H34	H13
HS 6	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina						H13
HS 7	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina	H47	H32				H13
HS 8	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina						H13
HS 9	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Rtina	H47	H32				H13
HS 95	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Paklenica	H47	H33			H34	H11
HS 97	M.K. a M.Š.		<i>Hypsugo savii</i>	Chorvatsko	Paklenica	H47	H35	H23			H14
Hsa10	J.A.		<i>Hypsugo savii</i>	Španělsko-Katalánsko	Font Terrers	H21			H29		H7
Hsa19	J.A.		<i>Hypsugo savii</i>	Španělsko-Katalánsko	Font Terrers		H17		H28	H15	H13
Hsa01	J.A.		<i>Hypsugo savii</i>	Španělsko-Katalánsko	Font Terrers					H14	H6
Hsa22	J.A.		<i>Hypsugo savii</i>	Španělsko-Katalánsko	Font Terrers	H19		H9	H30	H14	H12
Hsa02	J.A.		<i>Hypsugo savii</i>	Španělsko-Katalánsko	Font Terrers				H28	H15	H19
Hsa03	J.A.		<i>Hypsugo savii</i>	Španělsko-Baskicko							H13
Hsa04	J.A.		<i>Hypsugo savii</i>	Španělsko-Katalánsko	Font Terrers				H28	H16	H13
Hsa05	J.A.		<i>Hypsugo savii</i>	Španělsko-Katalánsko	Font Terrers	H19			H16		H13
Hsa06	J.A.		<i>Hypsugo savii</i>	Španělsko-Katalánsko	Font Terrers	H19	H17	H8	H28		H13
Hsa07	J.A.		<i>Hypsugo savii</i>	Španělsko-Katalánsko	Font Terrers	H19			H31	H16	H7
Hsa08	J.A.		<i>Hypsugo savii</i>	Španělsko-Katalánsko	Font Terrers	H20				H15	
Hsa09	J.A.		<i>Hypsugo savii</i>	Španělsko-Katalánsko	Font Terrers						H7
Hsav01	D. R. a L. A.		<i>Hypsugo savii</i>	Itálie	Řím	H25	H13	H12			H8
Hsav02	D. R. a L. A.		<i>Hypsugo savii</i>	Itálie	Ardea	H27	H13			H19	H7
Hsav03	D. R. a L. A.		<i>Hypsugo savii</i>	Itálie	Ostia	H29	H18			H20	H7
Hsav04	D. R. a L. A.		<i>Hypsugo savii</i>	Itálie	Umbria	H32		H13		H12	H7
Hsav05	D. R. a L. A.		<i>Hypsugo savii</i>	Itálie	Řím	H29	H17			H19	
Hsav06	D. R. a L. A.		<i>Hypsugo savii</i>	Itálie	Viterbo	H25				H19	H7
Hsav07	D. R. a L. A.		<i>Hypsugo savii</i>	Itálie	Řím	H29		H10			H7
Hsav08	D. R. a L. A.		<i>Hypsugo savii</i>	Itálie	Umbria	H29	H13	H14			H7
Hsav09	D. R. a L. A.		<i>Hypsugo savii</i>	Itálie	Řím	H29					H8
M1287a	M. R.		<i>Hypsugo savii</i>	Švýcarsko	Ženeva	H25				H24	
M1475	M. R.		<i>Hypsugo savii</i>	Švýcarsko	Valais	H19	H19		H17	H25	H18
M1593	M. R.		<i>Hypsugo savii</i>	Švýcarsko	Valais	H28	H13		H16	H23	H18
M706	M. R.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Milos, Kikis	H37	H35	H23			H19
M734	M. R.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Serres	H48	H35	H33			
M815	M. R.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	jeskyně Corycian	H40	H34	H24			H14

M877	M. R.		<i>Hypsugo savii</i>	Španělsko	Rio Lobos	H24				H21	H13
M953	M. R.		<i>Hypsugo savii</i>	Švýcarsko	Vex	H25	H13	H9	H16	H22	H19
M960	M. R.		<i>Hypsugo savii</i>	Švýcarsko	Sion	H19				H26	H18
Mor1	T.B. a Z.Ř.		<i>Hypsugo savii</i>	Česká republika	Brno	H25					H5
Mor2	T.B. a Z.Ř.		<i>Hypsugo savii</i>	Česká republika	Brno				H9		H5
Mor3	T.B. a Z.Ř.		<i>Hypsugo savii</i>	Česká republika	Znojmo	H25	H13	H13			H5
Mor4	T.B. a Z.Ř.		<i>Hypsugo savii</i>	Česká republika	Brno	H25	H13				H5
pb 1143	P.B.	48048	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Yabroud	H53					
pb 1179	P.B.	48064	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Slinfeh						H14
pb 1180	P.B.	48065	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Slinfeh			H24			
pb 1181	P.B.	48066	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Slinfeh	H61		H27			
pb 1182	P.B.	48067	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Slinfeh	H66					
pb 1183	P.B.	48068	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Slinfeh					H43	
pb 1187	P.B.	48072	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Slinfeh			H20	H18		
pb 1197	P.B.	48076	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Qala'at Sheisar						H14
pb 1891	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Barqash	H55					
pb 1966	P.B.	48919	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Hayalien	H64		H19	H21	H42	H20
pb 1967	P.B.	48920	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Hayalien	H56			H24		H11
pb 1968	P.B.	48921	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Hayalien				H26	H40	H19
pb 1969	P.B.	48922	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Hayalien			H18			
pb 1970	P.B.	48923	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Hayalien					H40	
pb 1979	P.B.	48932	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Qatura	H63	H23			H41	
pb 1980	P.B.	48933	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Qatura	H63		H17			H19
pb 1981	P.B.	48934	<i>Hypsugo savii</i>	Sýrie	Qatura	H67	H25			H35	
pb 2055	P.B.	49029	<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Anthiro	H37	H35				
pb 2389	P.B.	90209	<i>Hypsugo savii</i>	Černá Hora	Strp-Risan	H47	H35				
pb 2390	P.B.	90210	<i>Hypsugo savii</i>	Černá Hora	Strp-Risan				H10		
pb 2400	P.B.	90220	<i>Hypsugo savii</i>	Černá Hora	Gurec	H47				H31	H19
pb 2401	P.B.	90221	<i>Hypsugo savii</i>	Černá Hora	Gurec	H49			H12		
pb 2403	P.B.	90223	<i>Hypsugo savii</i>	Černá Hora	Gurec	H47				H32	
pb 2683	P.B.	90070	<i>Hypsugo savii</i>	Maroko	Tamtattouchte	H30		H6			
pb 2811	P.B.	90410	<i>Hypsugo savii</i>	Kypr	Troodos	H57	H26				
pb 2832	P.B.	90431	<i>Hypsugo savii</i>	Kypr	hrad Kantara				H19		
pb 3225	P.B.	90824	<i>Hypsugo savii</i>	Írán	Mina	H52	H21	H34			H19

pb 3306	P.B.	90900	<i>Hypsugo savii</i>	Libanon	jeskyně Afqa	H62	H29	H28			H13
pb 3389	P.B.	91082	<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Kréta, Patsos		H35				H17
pb 3390	P.B.	91083	<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Kréta, Patsos	H42				H46	H13
pb 3395	P.B.	91088	<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Kréta, Meskla	H50	H30				
pb 3396	P.B.	91089	<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Kréta, Meskla	H42	H39		H20		H13
pb 3401	P.B.	91094	<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Kréta, Dramia	H42		H11			H14
pb 3402	P.B.	91095	<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Kréta, Dramia	H41		H19	H23		
pb 3403	P.B.	91096	<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Kréta, Dramia	H42	H31				
pb 3416	P.B.	91109	<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Kréta, Milatos	H43	H35		H23	H37	H13
pb 3417	P.B.	91110	<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Kréta, Milatos	H43					
pb 3418	P.B.	91111	<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Kréta, Milatos	H43		H24		H38	H14
pb 3461	P.B.	91783	<i>Hypsugo savii</i>	Libanon	jeskyně Afqa				H25	H36	H14
pb 3462	P.B.	91784	<i>Hypsugo savii</i>	Libanon	jeskyně Afqa			H29			H13
pb 3584	P.B.	92309	<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Kréta, Lefkogia	H42		H24			H19
pb 3585	P.B.	92310	<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Kréta, Lefkogia					H39	H13
pb 3854	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Maroko	Dadés Gordes	H31	H16	H7			H9
pb 3926	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Maroko	Takoumit	H34			H13	H17	H9
pb 3927	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Maroko	Takoumit	H34	H13		H8		H9
pb 3928	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Maroko	Takoumit	H35	H13				H9
pb 3929	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Maroko	Takoumit	H34					
pb 3930	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Maroko	Takoumit	H34	H14				H9
pb 3931	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Maroko	Takoumit	H34				H17	H9
pb 3932	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Maroko	Takoumit	H34			H16	H18	
pb 3933	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Maroko	Takoumit	H34	H15				H9
pb 4072	P.B.	93694	<i>Hypsugo savii</i>	Libanon	Jebel Haouerta	H54					
pb 4321	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Ukrajina – Krym	Krym, Laspi	H68		H19			H19
pb 4322	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Ukrajina – Krym	Krym, Laspi	H68	H24	H22			
pb 4648	P.B.	93527	<i>Hypsugo savii</i>	Libanon	Balaa	H64			H22	H29	
pb 4684	P.B.	93561	<i>Hypsugo savii</i>	Libanon	Arnoun	H56	H27			H30	H14
pb 4756	P.B.	93583	<i>Hypsugo savii</i>	Maroko	Derdara	H33			H14		H10
pb 5026	P.B.	93867	<i>Hypsugo savii</i>	Írán	Hesar-e-Dashtak	H69	H22	H19		H44	H15
pb 5027	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Írán	Hesar-e-Dashtak	H70	H22	H19			H13
pb 5028	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Írán	Hesar-e-Dashtak					H45	H11
pb 5029	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Írán	Hesar-e-Dashtak			H19		H47	H14

pb 5030	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Írán	Hesar-e-Dashtak			H32		H47	H15
pb 5436	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Rodos	H45					H15
pb 5445	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Symi, Ampeli						H13
pb 5446	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Symi, Ampeli	H65					H15
pb 5447	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Symi, Ampeli	H56					H16
pb 5452	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Symi, Agioi Anargyroi	H60	H28				
pb 5453	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Symi, Agioi Anargyroi	H46	H35	H34			H15
pb 5454	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Symi, Glyfonies	H56	H27	H15			H13
pb 5455	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Symi, Glyfonies	H45	H35	H24			
pb 5456	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Symi, Ampeli						H13
pb 5457	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Symi, Ampeli	H46	H37				
pb 5458	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Symi, Ampeli	H44	H38	H22			H13
pb 5462	P.B.		<i>Hypsugo savii</i>	Řecko	Rodos, Sfougaria	H45	H35			H45	H13
PP0533	P.P.		<i>Hypsugo savii</i>	Slovinsko	Celje						
PP0621	P.P.		<i>Hypsugo savii</i>	Slovinsko	Lublaň	H22					H13
PP0623	P.P.		<i>Hypsugo savii</i>	Slovinsko	Lublaň	H29			H16	H19	H7
PP0624	P.P.		<i>Hypsugo savii</i>	Slovinsko	Lublaň	H25				H13	H7
PP0694	P.P.		<i>Hypsugo savii</i>	Slovinsko	Kranj						H7
Praha1	H.J.		<i>Hypsugo savii</i>	Česká republika	Praha	H27	H13		H15		H13
Psa4	M.R.		<i>Hypsugo savii</i>	Švýcarsko	Valais	H19				H27	H7
Psa5	M.R.		<i>Hypsugo savii</i>	Švýcarsko	Rechy	H19		H13		H28	H7

Vzorky poskytnuty od:

PB – Petr Benda, **FZ** – Frank Zachos, **HD** – Heliana Dundarova, **IN** – Ioseb Natradze, **TG** – Tamás Görföl, **MK** a **MS** – Marina Kpison a Martin Šálek, **HJ** – Helena Jahelsková, **JA** – Joxerra Aihartza, **DR** a **LA** – Danilo Russo a Leonardo Ancillotto, **MR** – Manuel Ruedi, **TB** a **ZŘ** – Tomáš Bartonička a Zdeněk Řehák, **PP** – Primož Presetnik

Příloha č. 2 Seznam publikovaných vzorků/outgroupů použitých pro molekulárně-genetickou analýzu.

druh	země	lokality	číslo GenBank	název genu	Převzato z	číslo v analýzách
<i>Myotis emarginatus</i>			OL889630	D-loop	Frants et al. 2021	O1
<i>Myotis myotis</i>	Španělsko		KM235244	D-loop	Furman et al. 2014	O2
<i>Myotis nattereri</i>	Chorvatsko	Dubrovnik	JN601529	ACOX	Salicini et al. 2011	O3
<i>Myotis nattereri</i>	Srbsko	Valjevo	JN601533	ACOX	Salicini et al. 2011	O4
<i>Myotis nattereri</i>	Velká Británie	Essex	JN601535	ACOX	Salicini et al. 2011	O5
<i>Myotis nattereri</i>	Chorvatsko	Dubrovnik	JN601597	COPS	Salicini et al. 2011	O6
<i>Myotis nattereri</i>	Černá Hora	Podgorica	JN601600	COPS	Salicini et al. 2011	O7
<i>Myotis nattereri</i>	Velká Británie	Essex	JN601603	COPS	Salicini et al. 2011	O8
<i>Myotis nattereri</i>	Chorvatsko	Dubrovnik	JN591504	cyt <i>b</i>	Salicini et al. 2011	O9
<i>Myotis nattereri</i>	Černá Hora	Podgorica	JN591506	cyt <i>b</i>	Salicini et al. 2011	O10
<i>Myotis nattereri</i>	Irsko	County Cork	JQ806256	D-loop	Boston et al. 2012	O11
<i>Myotis nattereri</i>	Sýrie		KF312567	RAG2	Reudi et al. 2013	O12
<i>Myotis schaubi</i>	Írán		JN601560	ACOX	Salicini et al. 2011	O13
<i>Myotis schaubi</i>	Írán		JN601629	COPS	Salicini et al. 2011	O14
<i>Myotis schaubi</i>	Írán		JN591511	cyt <i>b</i>	Salicini et al. 2011	O15
<i>Myotis Welwitschi</i>	Keňa	Kakamega	MK799726	ACOX	Patterson et al. 2019	O16
<i>Myotis Welwitschi</i>	Tanzánie	Ruaha	MK799730	ACOX	Patterson et al. 2019	O17
<i>Myotis Welwitschi</i>	Keňa	Kakamega	MK799751	COPS	Patterson et al. 2019	O18
<i>Myotis Welwitschi</i>	Tanzánie	Ruaha	MK799755	COPS	Patterson et al. 2019	O19
<i>Myotis Welwitschi</i>	Keňa	Kakamega	MK799691	cyt <i>b</i>	Patterson et al. 2019	O20
<i>Myotis Welwitschi</i>	Tanzánie	Ruaha	MK799700	cyt <i>b</i>	Patterson et al. 2019	O21
<i>Myotis Welwitschi</i>	Keňa	Kakamega	MK799801	STAT	Patterson et al. 2019	O22
<i>Myotis Welwitschi</i>	Keňa	Kisumu	MK799802	STAT	Patterson et al. 2019	O23

<i>Myotis Welwitschi</i>	Tanzánie	Ruaha	MK799805	STAT	Patterson et al. 2019	O24
<i>Neoromicia brunneus</i>	Gabon	Estuaire provincie	HM568366	STAT	Lack et al. 2010	O25
<i>Neoromicia nanus</i>	Jihoafrická republika	KwaZulu-Natal Province	GU328062	RAG2	Lack et al. 2010	O26
<i>Neoromicia nanus</i>	Jihoafrická republika	KwaZulu-Natal Province	GU328376	STAT	Lack et al. 2010	O27
<i>Neoromicia rendalli</i>	Keňa	Coast province	HM568367	STAT	Lack et al. 2010	O28
<i>Neoromicia somalicus</i>	Keňa	Coast province	HM561671	RAG2	Lack et al. 2010	O29
<i>Neoromicia somalicus</i>	Keňa	Coast province	HM568368	STAT	Lack et al. 2010	O30
<i>Nycticeinops schlileffeni</i>	Keňa	Eastern Province	GU328095	RAG2	Lack et al. 2010	O31
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Jemen	Mashgab	KX375158	cyt <i>b</i>	Benda et al. 2016	O32
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Jemen	Shibam	KX375159	cyt <i>b</i>	Benda et al. 2016	O33
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Jemen	Shibam	KX375160	cyt <i>b</i>	Benda et al. 2016	O34
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Jemen	Shibam	KX375161	cyt <i>b</i>	Benda et al. 2016	O35
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Chorvatsko		vz. od Mariny Kipson	cyt <i>b</i>	vzorek Mariny Kipson	O36
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Chorvatsko		vz. od Mariny Kipson	cyt <i>b</i>	vzorek Mariny Kipson	O37
<i>Hypsugo savii</i>	Španělsko		DQ120863	cyt <i>b</i>	Ibáñez et al. 2006	H23
<i>Hypsugo savii</i>	Švýcarsko		AJ504450	cyt <i>b</i>	Stadelmann et al. 2004	H19
<i>Hypsugo savii</i>	Turecko	Karaman	KF218376	cyt <i>b</i>	Çoraman et al. 2013	H58
<i>Hypsugo savii</i>	Turecko	Konya	KF218377	cyt <i>b</i>	Çoraman et al. 2013	H59

Příloha č. 3 Rozšířený seznam p-distancí sekvencí genu pro Cyt-*b* v procentech. Geograficky rozděleno podle zemí (v případě Řecka podle oblastí).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	<i>H. arabicus</i> Írán	0,66																										
2	<i>H. arabicus</i> Omán	4,2	0,2																									
3	<i>H. ariel</i> Egypt	12,42	12,08	0																								
4	<i>H. ariel</i> Jemen	13,08	12,37	6,41	0,62																							
5	<i>H. ariel</i> Jordánsko	12,93	12,28	6,07	0,85	0																						
6	<i>H. ariel</i> Omán	12,86	12,28	6,45	0,96	0,65	0																					
7	<i>H. savii</i> Bulharsko	13,44	12,97	12,28	12,81	12,96	12,96	0,26																				
8	<i>H. savii</i> Černa Hora	13,47	13,01	12,24	12,66	12,8	12,8	0,19	0,05																			
9	<i>H. savii</i> CZ	12,42	12,3	11,49	11,83	11,58	11,77	8,93	8,78	0,05																		
10	<i>H. savii</i> Gruzie	13,38	12,93	12,52	12,31	12,34	12,34	1,85	1,66	9,15	0																	
11	<i>H. savii</i> Chorvatsko	13,47	13,02	12,24	12,66	12,8	12,8	0,17	0,02	8,8	1,68	0																
12	<i>H. savii</i> Írán	13,44	12,87	12,59	12,47	12,49	12,48	1,62	1,44	9,02	0,72	1,46	0,37															
13	<i>H. savii</i> Itálie	12,32	12,12	11,38	11,77	11,54	11,7	8,89	8,74	0,25	9,15	8,75	8,97	0,35														
14	<i>H. savii</i> Kréta	13,4	12,91	12,17	12,59	12,73	12,73	0,36	0,21	8,78	1,8	0,19	1,59	8,74	0,16													
15	<i>H. savii</i> Kypr	13,7	12,93	12,71	12,5	12,52	12,52	2,12	1,94	9,08	1,03	1,96	0,87	9,03	2,08	0												
16	<i>H. savii</i> Libanon	13,61	13,09	12,83	12,52	12,59	12,59	2,06	1,87	9,29	0,91	1,89	0,8	9,24	2,01	0,54	0,55											
17	<i>H. savii</i> Maďarsko	12,27	12,12	11,35	11,69	11,44	11,63	8,77	8,63	0,08	9,01	8,64	8,85	0,27	8,63	8,92	9,13	0,06										
18	<i>H. savii</i> Maroko	12,77	12,25	11,46	11,86	11,59	11,64	8,66	8,52	1,02	9,09	8,53	8,74	1,12	8,52	8,81	8,98	1,04	0,61									
19	<i>H. savii</i> pev. Řecko	13,43	12,98	12,29	12,8	12,94	12,94	0,23	0,19	8,93	1,85	0,16	1,63	8,89	0,3	2,13	2,06	8,77	8,66	0,27								
20	<i>H. savii</i> Rakousko	12,58	12,48	11,7	12,03	11,79	11,98	9,1	8,94	0,17	9,34	8,96	9,18	0,4	8,93	9,25	9,46	0,25	1,18	9,03	0							
21	<i>H. savii</i> Rhod a Simi	13,63	13,15	12,47	12,73	12,81	12,81	1,12	0,96	9,06	1,53	0,95	1,34	9,01	1,09	1,42	1,46	8,9	8,79	1,11	9,22	1,3						
22	<i>H. savii</i> Slovinsko	12,29	12,12	11,53	11,96	11,81	11,9	8,68	8,56	2,92	8,79	8,57	8,66	2,96	8,54	8,72	8,86	2,92	3,49	8,67	3,05	8,72	5,73					
23	<i>H. savii</i> Španělsko	12,22	12,04	11,85	12,43	12,46	12,46	8,17	8,1	8,47	8,044	8,11	7,99	8,42	8,03	8,04	8,04	8,41	8,29	8,14	8,53	8,07	5,73	0,23				
24	<i>H. savii</i> Švýcarsko	12,33	12,15	11,72	12,24	12,16	12,17	8,45	8,35	5,41	8,45	8,36	8,35	5,44	8,32	8,41	8,48	5,38	5,65	8,43	5,47	8,43	4,72	3,25	4,62			
25	<i>H. savii</i> Sýrie	13,69	13,22	12,94	12,65	12,72	12,73	2,07	1,88	9,36	0,97	1,9	0,8	9,32	2,02	0,62	0,46	9,2	9,02	2,07	9,52	1,49	8,92	8,08	8,53	0,48		
26	<i>H. savii</i> Turecko	13,23	12,59	12,3	12,02	12,05	12,05	1,84	1,67	8,86	1,17	1,67	0,84	8,76	1,81	0,31	0,74	8,71	8,52	1,89	9,07	1,36	8,59	8,32	8,51	0,81	0,12	
27	<i>H. savii</i> Ukr. Krym	13,56	13,12	12,52	12,5	12,52	12,52	1,57	1,38	9,08	0,84	1,4	0,86	9,03	1,52	0,56	0,49	8,92	8,81	1,57	9,25	1,18	8,6	7,7	8,18	0,5	0,68	0