UNIVERZITA KARLOVA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra zoologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Petr Kůs

MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ STUDIE VRÁPENCŮ VÝCHODNÍHO STŘEDOMOŘÍ (CHIROPTERA: RHINOLOPHIDAE: RHINOLOPHUS)

Školitel: RNDr. Petr Benda, Ph.D.

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Petra Bendy, Ph.D. v molekulární laboratoři Národního muzea v Praze, Horních Počernicích a za použití uvedených literárních pramenů.

V Praze dne 2. května 2008

Petr Kůs

Děkuji svému školiteli RNDr. Petru Bendovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, za užitečné rady a v neposlední řadě za přátelský přístup. Dále bych chtěl velmi poděkovat Mgr. Václavu Gvoždíkovi za pomoc a rady po metodické stránce a kamarádský přístup. Současně patří mé poděkování RNDr. Ivanu Čepičkovi, Ph.D. za konzultace a pomoc s fylogenetickými analýzami. Za poskytnutí materiálu pro analýzy děkuji svému školiteli, dále pak prof. RNDr. Ivanu Horáčkovi, CSc. a RNDr. Pavlu Hulvovi, Ph.D.

Děkuji i své rodině za podporu a vytvoření pevného zázemí, které mi umožnilo nerušeně studovat a za trpělivost během psaní diplomové práce.

Obsah

1 Úvod 6
1.1 Stručná charakteristika Středomoří 6
1.2 Středomoří jako „horký bod“ evoluce palearktické fauny v kvartéru 7
1.3 Stručná historie chiropterologického výzkumu v oblasti Středomoří 8
1.4 Využití molekulárně genetických metod se zřetelem k taxonomii, fylogenezi a postavení řádu Chiroptera 9
1.5 Podstata molekulárně genetických metod využívaných v taxonomii 12
1.6 Charakteristika čeledi Rhinolophidae a její recentní rozšíření 13
1.6.1 Stručný přehled taxonomie čeledi Rhinolophidae 14
1.6.2 Přehled taxonomie druhů rodu *Rhinolophus* ve středomořské oblasti 15
1.7 Cíl práce 22
2 Materiál a metodika 24
2.1 Materiál 24
2.2 Metodika 29
2.2.1 Izolace DNA 29
2.2.2 PCR 30
2.2.3 Elektroforéza 32
2.2.4 Purifikace 32
2.2.5 Sekvenace 32
2.2.6 Vyhodnocení chromatogramu a tvorba alignmentu 32
2.2.7 Fylogenetické analýzy 33
2.2.8 Haplotypové sítě (Haplotype networks) 34
3 Výsledky 35
3.1 Přehled fylogenetických analýz jednotlivými metodami 36
3.1.1 Maximální parsimonie (Maximum Parsimony, MP) 36
3.1.2 Maximální věrohodnost (Maximum likelihood, ML) 39
3.1.3 Bayesovská analýza (Bayesan analyses, BA) 41
3.1.4 Distanční metody 43
3.2 Rozdíly mezi jednotlivými liniemi 47
3.3 Parciální analýzy jednotlivých druhů 48
3.3.1 Rhinolophus ferrumequinum 48
3.3.2 Rhinolophus hipposideros 53

3.3.3 Rhinolophus blasii 58
3.3.4 Rhinolophus euryale 60
4 Diskuze 62
5 Závěr 69
6 Literatura 71

1 Úvod

Řád letounů (Chiroptera), který je z hlediska evoluce neobyčejně úspěšnou skupinou (tvoří zhruba čtvrtinu všech savčích druhů), patří k nejkomplexněji zkoumaným skupinám savců. Taxonomický, biogeografický a ekologický výzkum letounů má nejdelší tradici v Evropě, přestože palearktické druhy tvoří necelých deset procent druhové diverzity řádu (Horáček et al. 2000). Maximální druhové diverzity dosahují letouni v tropech a subtropech, kde také leží pravděpodobná vývojová centra současných skupin (Bogdanowicz et Owen 1992) a odkud se opakovaně po ústupech kvartérního zalednění šířili do temperátních oblastí. Z pohledu chiropterologie zaujímá význačné místo v rámci Palearktidy oblast Středomoří, představující z hlediska vývoje evropské flóry a fauny v kvartéru území mimořádného významu (Bilton et al. 1998, Ložek et Horáček 2004a, b). Dlouholetý a detailní chiropterologický výzkum nashromáždil z tohoto území velké množství informací, které je možno za využití nových metod a přístupů interpretovat ve světle nejnovějších fylogeografických poznatků.

1.1 Stručná charakteristika Středomoří

Středomořská podoblast palearktické oblasti zaujímá severní část Afriky, jižní Evropu – od Kanárských ostrovů, Iberského poloostrova po Bosporskou úžinu a dále zahrnuje Přední Asii až po Kaspické jezero a Perský záliv (Buchar 1983). Východněji jsou k ní přiřazovány jižní oblasti u Kaspického jezera pod severními svahy pohoří Elborz (hyrkánská provincie) a úzký pruh eremiálních území při pobřeží Arabského moře až k západní hranici indomalajské oblasti. Poslední zmíněná oblast bývala někdy přiřazována i ke středoasijské podoblasti.

Ve Středomoří je možno nalézt množství rozmanitých endemických taxonů, z nichž mnohé náležejí do skupin s výrazně tropickým rozšířením. Leží zde centra, v nichž podle donedávna obecně rozšířených představ přečkávala invazní arboreální fauna eurosibiřské podoblasti období glaciálů. Za nejdůležitější zoogeografické centrum a glaciální refugium celé oblasti západní Palearktidy považuje Středomoří de Lattin (1967). Jeho jádrem jsou území přiléhající ke Středozemnímu moři (které je součástí Atlantského oceánu), náležejí však k němu i oblasti vzdálené od pobřeží stovky kilometrů, hovoří se o tzv. holomediteránu. De Lattin (1967) jej dělí na devět podoblastí: atlantomediterránní, adriatomediterránní, pontomediterránní, tyrrhenskou, kanárskou, mauretánskou, kyrénskou, krétskou a kyperskou.

Přirozeným centrem Středomoří je pánev Středozemního moře. Z geografického hlediska se rozkládá od Gibraltarské úžiny na západě po Marmarské moře, Bosporskou úžinu a Levantské moře na východě. Zatímco Marmarské moře je chápáno běžně jako součást Středozemního moře, Černé moře za jeho součást považováno nebývá. V nejvýchodnější části je Středozemní moře spojeno uměle vytvořeným Suezským průplavem s Rudým mořem. Mělký podmořský hřbet táhnoucí se od Sicílie k pobřeží Tuniska dělí Středozemní moře na dvě části/podoblasti: západní Středomoří a východní Středomoří. Významnou součástí Středozemního moře jsou velké ostrovy – Sardinie, Sicílie, Korsika, Malta, Kréta a Kypr. Flóra a fauna těchto ostrovů je tvořena unikátními společenstvy a je pozoruhodná z hlediska fylogeneze a fylogeografie.

1.2 Středomoří jako „horký bod“ evoluce palearktické fauny v kvartéru

Středomoří je přisuzována klíčová úloha v evoluci evropské fauny a flóry v období kvartéru, kdy docházelo ke střídání glaciálních a interglaciálních údobí. Toto území bylo v minulosti všeobecně považováno za refugium druhů a společenstev, které nebyly schopné přežívat v severních zeměpisných šířkách v době kvartérních zalednění. Podle donedávna přijímaných představ se areály organismů s nastupujícími obdobími glaciálů stahovaly na jih do středomořské oblasti, odkud se ze dvou až tří refugií v době interglaciálů šířily zpět do původních oblastí na severu (de Lattin 1967, Buchar 1983, Špinar 1986). Výzkumy posledního desetiletí však naznačují, že dosavadní představy opakovaných migrací a ústupů ze severněji ležících oblastí do Středomoří a následných rekolonizací bude nutno revidovat. Ukazuje se, že existují druhy, u nichž se s nástupem glaciálů ústup na jih předpokládal a přitom jejich výskyt v oblasti Středomoří v době glaciálu nelze doložit. To znamená, že tyto druhy musely nepříznivé údobí zalednění přežívat na stanovištích mnohem výše na severu než se doposud předpokládalo (Bilton et al. 1998, Ložek et Horáček 2004a, b). Ve světle nových poznatků se Středomoří daleko více jeví jako území vyznačující se značným druhovým endemismem než oblastí, která sloužila jako základna pro postglaciální kolonizaci středoevropského regionu (Bilton et al. 1998). Oblast Středomoří je považována za „horký bod“ v evoluci diverzity palearktické fauny, za křižovatku společenstev lesů mírného pásma západní Palearktidy a společenstev semiaridního pásu jižní Palearktidy (Gaton et Divid 1994).

Studium míry diferenciace mezi středoevropskými a středomořskými populacemi blízce příbuzných taxonů je jedním z aktuálních úkolů systematické zoologie a fylogeografie, a to zejména v souvislosti s měnícím se pohledem na vývoj fauny střední a jižní Evropy

v meziledových dobách. V širších souvislostech se naskýtá možnost využít taxonů zmíněné oblasti jako modelové druhy pro sledování evolučních procesů a fylogeografických vztahů nejen evropské, ale i světové fauny. Řád Chiroptera a jeho čeledi k takovým modelovým skupinám patří, jak o tom svědčí pokračující intezivní výzkum využívající nejmodernější biologické a biochemické metody.

1.3 Stručná historie chiropterologického výzkumu v oblasti Středomoří

Chiropterologické výzkumy mají v rámci inventarizace evropské a palearktické fauny poměrně dlouhou tradici. Netopýři jsou díky specifické tělesné stavbě a způsobu života skupinou, která vždy upoutávala pozornost odborníků i laiků. Zprvu se systematický výzkum zaměřoval na vytváření kolekcí dokladových exemplářů druhů a subspecií pro muzejní sbírky a jejich katalogizaci a to zejména v západní Evropě (Miller 1912). Po druhé světové válce se do centra výzkumu netopýrů dostala také východní Evropa, včetně Balkánu, který je považován za jedno z nejdůležitějších center biodiverzity celého Středomoří (Hanák 1964, Uhrin et al. 1996, Benda et al. 2003, Kryštufek 2004). Dalšími oblastmi na něž se soustředila pozornost chiropterologů je severní Afrika, oblast tzv. Maghrebu (Alžírsko, Tunisko, Maroko) a Libye, tvořící jižní hranici palearktické oblasti na styku s oblastí afrotropickou (Cockrum 1976, Gaisler 1983, 1984, Hanák et Elgadi 1984, Benda et al. 2004). Tato oblast zřejmě sehrála klíčovou úlohu při fylogenezi vrápenců z čeledi Rhinolophidae i dalších druhů řádu Chiroptera z tropického pásu a jejich adaptaci a postupnou kolonizaci temperátních biotopů Eurasie (Csorba et al. 2003).

V posledních desetiletích se pozornost chiropterologů stále více zaměřuje na méně prozkoumanou východní část Středomoří. Mimo již zmíněný Balkánský poloostrov a ostrovy Kréta a Kypr je to oblast Blízkého východu, hlavně Sýrie, Turecko, Írán a Irák (DeBlase et Martin 1973, Benda et al. 1999a, b, 2006). Z faunistického hlediska jsou velmi zajímavé také středoasijské republiky bývalého Sovětského svazu ležící na jižním okraji palearktické oblasti geograficky a klimatologicky související s oblastí Blízkého východu. Vzhledem ke geopolitické situaci po 2. světové válce zde měli sporadickou příležitost provádět výzkum zoologové ze zemí bývalého východního bloku. Chiropterologickým výzkumům se věnovali i sovětští zoologové. Jejich odborná sdělení však neměla velkou šanci vyvolat pozornost v zahraničí, protože vycházela v těžko dostupných periodikách regionálních výzkumných ústavů. Navíc byla psána v ruštině, pro Západ těžko akceptovatelné. Jen občas byla doplněna krátkým souhrnem v angličtině (např. Strelkov 1997). Situace se změnila až v 80. a 90. letech

minulého století, kdy řada ruských autorů začala publikovat i v anglicky psaných odborných periodikách (Strelkov 2000), podobná situace byla i v Číně.

1.4 Využití molekulárně genetických metod se zřetelem k taxonomii, fylogenezi a postavení řádu Chiroptera

Obtížná určitelnost některých taxonů i skupin a poznání jejich evoluční historie jsou hlavní důvody, proč se k systematickým výzkumům a vytváření evolučních modelů začaly využívat metody molekulární genetiky, podobně jako byla dříve využívána karyologie (Zima 1982, 2004, Zima et al. 1992a, Bickham et al. 2004). Týká se se to i druhově velmi početného a z ekologického hlediska adaptibilního řádu Chiroptera (Wilkinson et al. 1998, Nikaido et al. 2000, Wang et al. 2003, Tian 2004, Miller-Butterworth et al. 2005, Bilgin et al. 2006 a další). Soustavná systematika a biogeografie této skupiny má dlouhou tradici vycházející z obrovského množství dat získaných klasickými morfologickými metodami. Relativně nedávno se v klasické systematice začaly využívat obecně biologické metody jako je serologie, imunologie či již zmíněná karyologie (Zima 1982, 2004, Zima et al. 1992a). Aplikace metod molekulární genetiky znamenaly začátek nové etapy a umožnily do běžné laboratorní praxe převést metodiky pracující se základními jednotkami živé hmoty, jako jsou nukleové kyseliny a jednotlivé geny a s jejich pomocí se pokusit proniknout do dávné evoluční minulosti (Nei et Kumar 2000). Do klasické morfologické taxonomie postupně stále více vstupují matematické a statistické metody, které nejprve umožnily objektivní zpracování základních dat a dnes v rámci genetických molekulárních analýz slouží k vytváření a testování komplexních fylogenetických hypotéz.

Výsledky těchto studií pomáhají potvrzovat či zpochybňovat dosavadní systematické poznatky, aktualizovat a revidovat stávající zoologické třídění, přispívat k determinaci obtížně rozlišitelných, alopatrických a kryptických druhů letounů (Mayer et von Helversen 2001, Mayer et al. 2007, Kiefer et al. 2002, Li et al. 2003, Hulva et al. 2004, 2007, Juste et al. 2004, Miller-Butterworth et al. 2005, Russo et al. 2005, Li et al. 2006, 2007, Chen 2006). Podobně je tomu v rámci druhových komplexů u jiných skupin savců (Nikaido et al. 2001, Triant et DeWoody 2006, Lebedev et al. 2006) nebo nižších obratlovců, např. lososovitých ryb vytvářejících množství morfologicky obtížně rozlišitelných forem (Radchenko 2004). Molekulární genetické metody lze za jistých omezení využít i při fylogenetických a fylogeografických studiích využívajících zoologický materiál z muzejních sbírek (Su et al. 1999). Někteří autoři využívají k taxonomickým a fylogenetickými studiím letounů

kombinaci morfometrických metod doplněných molekulární analýzou (Peters et al. 2002, Benda et al. 2004). Absence zřetelných morfologických rozdílů mezi druhy ztěžuje přesnou identifikaci druhů u mnoha skupin obratlovců (Giannini et al. 2006). Mayer et al. (2007) a Ibáñez et al. (2006) se pokusili u netopýrů ze západní Palearktidy porovnat druhovou determinaci pomocí klasické morfologie s metodou využití sekvencí mitochondrálního genu nd1 (NADH dehydrogenase subunit 1). Genetická analýza ukázala, že v rámci zmíněného regionu existuje neočekávaně vysoký počet dosud nepopsaných kryptických taxonů. Fylogenetická systematika založená na molekulárně genetických metodách je důležitou vědeckou metodou, bez níž se současná taxonomie neobejde (Teeling et al. 2005).

U řádu Chiroptera je význam molekulární genetiky podtržen skutečností, že druhý nejpočetnější řád třídy Mammalia je skupinou, u níž existují nepříliš početné paleontologické nálezy. Z nich je možno jen omezeně usuzovat na evoluční trendy (Horáček 1976, Woloszyn 1987, Roček 2002, Jones 2005) a je proto obtížné sledovat evoluci jednotlivých taxonů v rámci řádu. Některé druhy řádu Chiroptera se vyznačují značnou mobilitou a schopností migrovat na velké vzdálenosti a reagovat tak na nejrůznější podněty jako jsou například klimatické změny, pestrost potravního spektra apod. (Robinson et al. 2005). Tato adaptibilita vedla k neobyčejně bohaté ekologické a behaviorální diverzifikaci umožňující jednotlivým druhům adaptovat se na téměř všechny terestrické biotopy a zaujmout důležité role v rámci nik jednotlivých ekosystémů (Jones 2005). Např. Bickham et al. (2004) uvádějí, že rod *Myotis* je charakteristický vysokou druhovou, ale velmi nízkou karyotypickou diverzitou. Přitom patří k nejrozšířenějším a nejpočetnějším savčím rodům zahrnujícím 90 druhů a 4 podrody (Simmons 2005) a je možno jej považovat za kosmopolitní rod. Chybí pouze v Antarktidě, stejně jako ostatní zástupci rodu Chiroptera.

Metody molekulární genetické analýzy jsou důležitým vodítkem pro taxonomické revize i mapování fylogeneze řádu, ale mohou přinést i nové poznatky týkající se biologie, ekologie a etologie daného druhu, intraspecifickou variabilitu v rámci taxonů nevyjímaje (van den Bussche et al. 1993, Kerth et al. 2000, Rossiter et al. 2000, 2000a, 2001, Newton et al. 2003, Pestano et al. 2003, Sakai et al. 2003, Piaggio et al. 2005, Hulva et al. 2007a).

Příkladem toho, jak dalece mohou genové analýzy změnit panující náhled na taxonomii celých řádů, je nový pohled na řád Chiroptera jako celek. Až do konce 20. století byl všeobecně přijímán tradiční pohled monofyletického řádu s dvěma hlavními větvemi, podřády Megachiroptera a Microchiroptera. V 80. letech se objevila hypotéza předpokádající polyfyletičnost řádu Chiroptera, podřád Megachiroptera byl považován za příbuzný poloopicím z podřádu Prosimia (Pettigrew 1994, 1995). Tato hypotéza, známá pod názvem

„flying primates“, se stala velmi populární. Její autoři předpokládali, že řád Chiroptera je součástí skupiny Archonta, kam se řadili primáti, tany a letuchy, nicméně fylogenetické rekonstrukce na základě molekulární analýzy pro ni nepřinesly žádné důkazy (Pumo et al. 1998, Teeling et al. 2002). Současné výsledky založené na hybridizaci DNA a poměrů A+T/C+G nasvědčují tomu, že nadčeleď Rhinolophoidea je sesterskou skupinou čeledi Pteropodidae (Megachiroptera), nikoliv však ostatních ze skupiny Microchiroptera. Tato parafyletická hypotéza byla podpořena nejnovějšími studiemi (Teeling et al. 2002, 2005). Pumo et al. (1998) a Nikaido et al. (2000) na základě analýzy kompletní mitochondriální DNA kaloně *Pteropus dasymallus* dospěli k názoru, že řád Chiroptera je monofyletický a má blízko ke skupině Ferungulata, zahrnující řády Carnivora, Perissodactyla, Cetartiodactyla a Pholidota.

Co možná nejpřesnější taxonomická determinace má velký význam i v rámci ochrany ohrožených druhů obratlovců (Su et. al. 1999, Rossiter 2000). Početná skupina druhů z řádu Chiroptera je v důsledku destruktivních zásahů člověka do ekosystémů ohrožena vyhubením. K nejvíce ohroženým patří také vrápenci (Baillie et al. 2004, Bontadina et al. 2002). Není výjimkou, že nově popsané druhy bývají známy z jediné lokality, což vyžaduje ochranářská opatření (Hulva et Horáček 2002, Dávalos 2005). Záchranné programy *in situ* a především *ex situ* u kriticky ohrožených druhů obratlovců velmi často vycházejí z chovu několika málo desítek posledních jedinců, mnohdy nejasného taxonomického a genetického původu. V rámci příbuzných druhů schopných plodného křížení hrozí genová eroze. Genetická populační analýza by měla být součástí managementu populací všech ohrožených druhů a to jak v záchranných chovech, tak v chráněných územích. Je předpokladem stanovení optimálního postupu vycházejícího z biologických charakteristik jednotlivých taxonů (Ransome et Hudson 2000). To se týká také všech evropských druhů řádu Chiroptera, dnes chráněných zákony jednotlivých evropských zemí i v rámci Bonnské konvence o stěhovavých druzích. Rozsáhlé civilizační a klimatické změny v ekologii krajiny většiny evropských zemí (středomořskou oblast nevyjímaje) se projevily negativním způsobem na početnosti téměř všech druhů netopýrů (Bontadina et al. 2002) a vyžadují opatření vycházející z komplexního posouzení situace. Monitoring a taxonomický výzkum druhů, doplněné metodami molekulární taxonomie přinášejí i v tak dlouhodobě faunisticky sledovaném regionu jako je Evropa stále nové poznatky, které je možno využít z teoretického i praktického hlediska.

1.5 Podstata molekulárně genetických metod využívaných v taxonomii

Živočišná mitochondriální DNA je malá kruhová molekula o velikosti 15−20 kb. Skládá se z okolo 37 genů kódujících 22 tRNA, 2 rRNA a 13 mRNA, které později kódují proteiny zapojené do transportu elektronů a oxidativní fosforylace v mitochondrii. Pro malé rozměry a kompaktní stavbu se mitochodriální DNA (mtDNA) stala v biologii důležitým prostředkem a vodítkem pro pochopení evolučních vztahů v rámci živočišné říše − vztahů mezi populacemi, druhy a vyššími taxony (Wilkinson et al. 1997). Mitochondriální DNA je charakterizována absencí rekombinace a vysokou frekvencí nukleotidových substitucí a tedy rychlou evolucí. Vysoká mutační rychlost je výhodná pro studium rozmnožování, paternity a struktury blízce příbuzných populací (Macholán et Munclinger 2004). Další specifickou vlastností mtDNA je skutečnost, že je předávána pouze po mateřské linii a je haploidní. To je významné z hlediska genetických a fylogeografických analýz. V souvislosti s poznatky o genech lokalizovaných na chromozomu Y, u biparentálně přenášených jaderných genech může poskytnout informace o rozdílech v chování či migraci mezi pohlavími (Kerth et al. 2003). Do té doby byly takové výzkumy realizovány pomocí restrikčních endonukleáz. S objevem polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction − PCR) se otevřela možnost získávat sekvence mtDNA u mnoha taxonů, což jinak představovalo časově velmi náročnou práci (Irwin et al. 1991). PCR je metoda, která umožňuje amplifikovat *in vitro* požadovaný specifický úsek DNA, fragment definované délky. Metoda není náročná na množství původního vzorku DNA, postačí i extrémně malé množství, teoreticky i jedna jediná molekula z původního vzorku DNA. Princip metody spočívá v kopírování sekvence templátu v několika po sobě jdoucích cyklech, přičemž v každém cyklu se počet kopií zdvojnásobí, protože fragmenty, které se nasyntentizovaly v předchozích cyklech slouží zároveň jako matrice v následujících cyklech, tím množství DNA postupně narůstá.. Dalším krokem je sekvenování, spočívající v určení sekvence nukleotidů (resp. bází) v jednom z řetězců DNA, druhý řetězec je komplementární (Macholán et Munclinger 2004).

Fylogenetická analýza materiálu použitého v této diplomové práci je založena na sekvencích mitochondriálního genu pro cytochrom *b*. Cytochrom *b* je protein účastnící se transportu elektronů a mitochondriální oxidativní fosforylace a gen, který ho kóduje je hojně využíván pro fylogenetické studie. Výsledky založené na analýze genu pro cytochrom *b* jsou snadno porovnatelné a je tedy využíván při fylogenetických studiích u všech skupin obratlovců (Halanych et al. 1998, Slowinski et Keogh 1999, Castresana 2001, Bradley et

Baker 2001, Li et al. 2003, Sakai et al. 2003, Wang et al. 2003, Hulva et al. 2004, Juste et al. 2004, Radchenko 2004, Tian et al. 2004, Miller-Butterworth et al. 2005 a další).

1.6 Charakteristika čeledi Rhinolophidae a její recentní rozšíření

V řádu letounů (Chiroptera) představuje monogenerická čeleď Rhinolophidae s více než 77 druhy rodu *Rhinolophus* zřetelně definovanou skupinu vyznačující se řadou typických znaků (na čenichu a kolem nozder jsou nápadné blanité výrůstky, které slouží k usměrňování zvuků vydávaných při echolokaci, nosní lístek je složený ze tří částí − podkova, sedlo a lanceta; boltce jsou bez tragu, ale s velkým antitragem; ocas i uropatagium jsou mírně redukovány). Na rozdíl od příslušníků čeledi Vespertilionidae jsou zvuky při echolokaci vydávané nosem (Anděra et Horáček 1982). Způsob echolokace vrápenců bývá považován za důležitý systematický znak naznačující evoluční vztahy čeledi Rhinolophidae v rámci řádu Chiroptera (Kingston et Rossiter 2004, Teeling et al. 2002, Eick et al. 2005). Za původní centrum vzniku čeledi Rhinolophidae jsou považovány tropy Starého světa – Afriky či Asie (Bogdanowicz et Owen 1992). V těchto oblastech dosahuje čeleď recentně maximální druhové diverzity (Nowak et Paradiso 1983).

Příslušníci čeledi jsou rozšířeni v tropickém a mírném pásmu Starého světa od Irska a jižní Afriky po Filipíny, Šalamounovy ostrovy a severovýchodní Austrálii. V Evropě zasahují po střední části kontinetu, Nizozemí, středního Německa a jižního Polska (Simmons 2005). Obývají nejrůznější biotopy v lesnaté i odlesněné krajině, od nížin až po horské oblasti. Úkryty vyhledávají především v jeskyních, stromových dutinách a druhotně i v lidských sídlech. Druhy žijící v mírném pásmu hibernují v podzemních úkrytech. Některé druhy žijí solitérně a jiné se shromažďují v koloniích. Jsou známy druhy, kde obě pohlaví žijí společně po celý rok; samice však pravidelně vytvářejí mateřské kolonie. Vrápenci jsou insektivorní, na lov vylétají později, než jiné druhy letounů. Obyčejně loví solitérně, ve výšce kolem šesti metrů a jsou schopni zmocnit se kořisti i na zemi (Nowak et Paradiso 1983).

Rod *Rhinolophus* popsal v roce 1799 Lacépède, chronologicky řazený seznam synonym rodu uvádí Miller (1912), recentní výčet všech známých druhů uvádí Csorba et al. (2003) a Simmons (2005); obě práce uvádějí seznam všech použitých synonym v rámci skupiny. K čeledi Rhinolophidae byla v minulosti jako podčeleď přiřazovaná čeleď Hipposideridae (Koopman 1993, Simmons 2005).

1.6.1 Stručný přehled taxonomie čeledi Rhinolophidae

Taxonomie čeledi Rhinolophidae, přestože je monogenerická, je poměrně složitá už vzhledem k tomu, že zahrnuje množství druhů s rozsáhlými areály rozšíření − od mírného pásu po tropické oblasti Starého světa. Populace jednotlivých druhů jsou vystaveny působení nejrůznějších selekčních faktorů − klimatu, který v severních částech areálu rozšíření stimuluje hibernaci, specifickým geomorfologickým podmínkám území, potravní nabídce či působení izolačních mechanismů. To vše se odráží v tělesné stavbě, fyziologii i v působení genetických a evolučních procesů v rámci regionálních subpopulací. Popisy stávajících druhů rodu *Rhinolophus* jsou založeny na morfologických znacích, jako je struktura nosního lístku, pozice horního premoláru a na kraniálních a tělesných rozměrech (Bogdanowicz 1992, Bogdanowicz et Owen 1992). První detailnější přehled taxonomie čeledi Rhinolophidae pochází od Andersena (Andersen 1905a, b, Andersen 1918). Na Andersenovy práce navázali ve 40. letech minulého století Tate et Archbold (1939) a Tate (1943), kteří vzali v úvahu i nově popsané formy. Taxonomické členění čeledi podle Andersona nedoznalo dlouhá desetiletí žádných podstatných změn. O nový pohled na systematiku čeledi Rhinolophidae se pokusil již zmíněný Bogdanowicz (1992) metodou numerické analýzy lebečních a tělesných rozměrů srovnáním s dosud publikovanými údaji. Na základě morfologické disperzní analýzy a fenogramů zrevidoval třídění Andersena (1905a, b), Tate et Archbolda (1939) a navrhl nové rozdělení podle skupin. Mediterránní druhy jsou podle tohoto třídění rozděleny na skupinu *ferumequinum* (*R. ferumequinum*), *euryale* (*R. euryale*, *mehelyi*) a *hipposideros* (*R. hipposideros*). *Rhinolophus blasii* je zařazen s otazníkem do skupiny *capensis* – podskupiny *landeri*. Zmíněný autor dospěl k závěru, že centrum vzniku čeledi Rhinolophidae leží v orientální oblasti s tím, že předek rodu *Rhinolophus* pravděpodobně obýval tropické deštné lesy. Čeleď Rhinolophidae s rodem *Rhinolophus* patří spolu s čeledí Hipposideridae k vývojově nejstarším formám letounů. Nejstarší známé fosilní nálezy zástupců pocházejí z období pozdního až středního eocénu a raného oligocénu. Mladší nálezy jsou známy z Afriky, Asie a Austrálie (Butler 1978, Hand 1984, Sige 1990, Hand et Kirsch 1998, Roček 2002).

Popisy nových druhů rodu *Rhinolophus* (např. Kock et. al. 2000) a výsledky molekulárně genetických analýz dosud popsaných taxonů naznačují, že bude zapotřebí provést celkovou revizi systematiky čeledi Rhinolophidae, včetně dělení příbuzných druhů do jednotlivých skupin. Návrh nového dělení v porovnání se stávajícím dělením Bogdanowicze (1992) uvádějí Csorba et al. (2003). Základní taxonomickou a morfologickou charakteristiku

evropských příslušníků čeledi Rhinolophidae podává Krapp (2001). Podrobný popis a přehled evropských druhů rodu *Rhinolophus*, včetně karyotypů, areálu rozšíření, výčtu subspecií, příbuzenských vztahů a paleontologických nálezů udávají pro *Rhinolophus ferrumequinum* Gaisler (2001a); *Rhinolophus hipposideros* Roer et Schober (2001); *Rhinolophus euryale* Gaisler (2001b) *Rhinolophus blasii* Kryštufek et Đulič (2001); *Rhinolophus mehelyi* Gaisler (2001c). Pro palearktickou oblast shrnuli taxonomické a biogeografické poznatky pro čeleď Rhinolophidae do úrovně subspecií Horáček et al. (2000), komplexní poznatky pro zmíněnou čeleď ve východním Středomoří shrnují Benda et Horáček (1998) a Benda et al. (2003, 2006). Přehled v rámci globálního rozšíření čeledi pak podávají Csorba et al. (2003), obecné informace uvádějí van den Brink (1968), Vaughan (1986), Görner et Hackenthal (1987), Schober et Grimmberger (1997) a další.

1.6.2 Přehled taxonomie druhů rodu *Rhinolophus* ve středomořské oblasti

Vrápenec velký *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber 1774)

Původně popsán jako *Vespertilio ferrum-equinum*.

Typová lokalita: Burgundsko, Francie (Miller 1912)

Rozšíření: Alžírsko, Maroko a Tunisko; jižní Evropa od Portugalska po Řecko, severně po jižní oblasti Anglie, Nizozemsko, jižní Německo, Rakousko, Česko, Slovensko a Bulharsko; Turecko, Kypr, Gruzie, Ázerbajdžán; Ukrajina, Krym, Kavkaz; pobřeží Středozemního moře od Turecka po Izrael a Jordánsko; severovýchodní Irák, Írán, Turkmenistán, Uzbekistán, jižní Kazachstán, Pákistán, severní Indie, Nepál, Sikkim, Čína, Korea a Japonsko včetně malých ostrovů (Gaisler 2001a, Csorba et al. 2003, Simmons 2005). Nálezy na některých lokalitách v západní a střední Evropě (Nizozemsko, Polsko) odrážejí dočasné šíření a příležitostné zálety na severním okraji areálu (Simmons 2005).

V rámci čeledi je to druh s největším areálem rozšíření – od západní Evropy až po Japonsko. Je považován za typický prvek fauny jižní Palearktidy (Benda et al. 2006) a polytypický druh (Andersen 1905a, Felten et al. 1977, Horáček et al. 2000, Gaisler 2001a, Csorba et al. 2003, Simmons 2005). Ze všech palearktických vrápenců je největší a nejrobustnější, délka těla se pohybuje od 54 do 71 mm (Gaisler 2001a). Vzhledem k velkému areálu rozšíření, rozdílným klimatickým podmínkám a morfologické variabilitě se

setkáváme u tohoto druhu s vysokým množstvím taxonů, které jsou dnes považovány z velké části za synonyma (Miller 1912, Csorba et al. 2003).

Podle Thomase (1997, ex Csorba et al. 2003) mají platnost tyto subspecie: *Rhinolophus f. ferrumequinum* z Evropy a severní Afriky; *R. f. creticus* z Kréty; *R. f. irani* z Iráku, Íránu a Turkménie; *R. f. proximus* z Afghánistánu, Uzbekistánu a Kašmíru; *R. f. tragatus* ze severní Indie až východní Číny; *R. f. korai* z Koreje a *R. f. nippon* z Japonska a východní Číny.

V roce 1904 popsal Cabrera ze Španělska, z oblasti Valencie, subspecii *R. f. obscurus*, jejíž validita byla následně vztažena na severoafrické populace *R. ferrumequinum*. Oproti nominátní subspecii *R. f. ferrumequinum* se měla vyznačovat menšími tělesnými rozměry. Miller (1912) však oprávněnost popisu této subspecie po prozkoumání dokladového materiálu zpochybňuje. Recentně Thomas (1997, ex Csorba et al. 2003) dospěl na základě odchytu několika exemplářů v severozápadní Africe k názoru, že příslušníci populací *Rhinolophus ferrumequinum* ze severozápadní Afriky se velikostí zřetelně liší od evropských populací a popis subspecie *obscurus* by mohl být oprávněný. DNA analýza materiálu z Evropy a Alžírska však nic takového neprokázala, porovnávané populace náležejí tedy k nominátní subspecii. Skutečnost, že tělesná variabilita jednotlivých subpopulací může být ovlivňována ve velké míře klimatickými faktory, nikoli jen genetickou konstitucí, dokládá popis subspecie *R. f. martinoi* Petrov, 1941 z Makedonie (Gaisler 2001a), která je některými autory považována za validní subspecii (Felten et al. 1977, Iliopoulou-Georgudaki et Ondrias 1986) i když Kryštufek (1993) na základě multivariátní statistické analýzy dokazuje, že rozdíly ve velikosti těla mezi nominátní formou a *R. f. martinoi* jsou dány vlivem klimatických faktorů a zmíněnou subspecii považuje za synonymum nominotypické formy. Konvergentní vývoj provázený morfologickou adaptací na specifické podmínky prostředí může vést k obtížné rozlišitelnosti i na úrovni druhu, jak dokládá Strelkov (1971) na příkladu sympatrického výskytu druhů *Rhinolophus ferrumequinum* a *Rhinolophus bocharicus*. Zmíněný autor uvádí, že populace *Rhinolophus ferrumequinum*, obývající poušť Karakum, jsou světle zbarvené a dorůstají menších rozměrů, takže se, co se velikosti týče, podobají se populacím blízce příbuzného *R. bocharicus*. Velikost těla jako jedno z rozhodujících kritérií nemusí mít z taxonomického hlediska vždy dostatečně vypovídající hodnotu, protože je ovlivněna množstvím ekologických faktorů. Již zmíněný Kryštufek (1993) na základě fenetické analýzy dat 368 exemplářů *R. ferrumequinum* z jihovýchodní Evropy, které podle lokalit rozdělil do 24 geografických vzorků, zmiňuje paradoxní jev – příslušníci populací z teplejších oblastí jsou větší než příslušníci severněji žijících populací. To je v rozporu s Bergmannovým

zoogeografickým pravidlem a Geist (1987, 1990 ex Krištufek 1993) na základě zmíněné skutečnosti dokonce vyvozuje, že Bergmannovo pravidlo neplatí. Vysvětlení (podle Kryštufka 1993) patrně spočívá v tom, že *R. ferrumequinum* jakožto insektivorní hibernátor reaguje na nabídku potravy a v teplých, tzn. „příznivých", měsících kumuluje energii pro výdej v zimních měsících během hibernace. Poměr délky aktivního období s hojností a dostupností potravy k době hibernace je pro jižní populace podstatně příznivější a umožňuje jim dorůstat větších tělesných rozměrů (Rossiter et al. 2000, Robinson 2005). Tento jev – zmenšování tělesné velikosti u severských populací − však není mezi evropskými netopýry pravidlem, například Bogdanowicz (1990) u *Myotis daubentonii* naopak platnost Bergmannova pravidla potvrzuje. Podrobný přehled všech dosavadních popisů subspecií druhu *Rhinolophus ferrumequinum* předkládají Felten et al. (1977). Na základě dokladového materiálu různých částí Evropy a západního Středomoří dospěli k názoru, že poddruh *Rhinolophus f. ferrumequinum* reprezentovaný vzorky ze střední Evropy, Balkánu a západní Anatolie, se osteometricky liší od subspecie *R. f. obscurus* (materiál z Iberského poloostrova, Sardinie a Korsiky), *R. f. martinoi* (Makedonie a Sicílie) a stejně tak jako *R. f. irani*. U materiálu z Francie konstatuje, že exempláře z jižních oblastí státu náleží k subspecii *R. f. obscurus*, zatímco vzorky pocházející z Itálie vykazují znaky příslušnosti k nominátní subspecii *R. f. ferrumequinum*. Stejně tak, jako vzorky z Kréty. Východoanatolské a levantské populace řadí rovněž k poddruhu *R. f. ferrumequinum*. Uvádí, že příslušníci afghánských a íránských populací jsou menší a tudíž se zřetelně odlišují od nominátní subspecie a patří k subspecii *R. f. irani*. Zároveň vyslovuje otázku, zda *R. f. irani* není synonymum s *R. f. proximus*.

Subspecie *R. f. creticus* byla popsána na základě jedinců nalezených v jeskyni Milatos na Krétě v roce 1974 (Iliopoulou-Georgudaki et Ondrias 1986). Oproti nominátní subspecii má být menších tělesných rozměrů a světlejšího zbarvení.

Z taxonomického hlediska je zajímavá asijská subspecie *R. f. nippon* Temminck, 1835 považovaná za samostatný druh. V roce 1876 byla Dobsonem (ex Csorba et al. 2003) označena za taxon konspecifický s *R. ferrumequinum.* Recentně Thomas (1997 ex Csorba et al. 2003) zjistil na základě analýzy mitochondriální DNA mezi subspeciemi *R. f. ferrumequinum* a *R. f. nippon* značnou distanci sekvencí (21,6−24,5 %), což podporuje hypotézu, že *R. f. nippon* může být skutečně samostaný druh.

Vrápenec malý *Rhinolophus hipposideros* (Borkhausen, 1797)

Gmelin (1788) a Bechstein (1789), jej uvádí jako *Vespertilio ferrum-equinum*, Kerr (1792), jako *Vespertilio ferrum-equinum minor*. V roce 1797 publikuje Borkhausen jméno *Noctilio Hipposideros* (vše viz Miller 1912).

Typová lokalita: Francie (Miller 1912)

Rozšíření: Irsko, severní Evropa po Iberský poloostrov a Maroko, jižní Evropa a severní Afrika, Bulharsko, Izrael, Jordánsko, Arabský poloostrov, Súdán, Etiopie, Džibuti, Kyrgyzstán, Kašmír. Nálezy z některých lokalit v severozápadní a severní Evropě (Nizozemsko) zřejmě souvisejí s dočasnou změnou severní hranice areálu rozšíření, případně s častějšími zálety migrujících jedinců (Simmons 2005)

Jeden z nejmenších druhů rodu *Rhinolophus* a nejmenší z evropských vrápenců. Délka těla se pohybuje mezi 40−45 mm. Je považován za polytypický druh (Benda et al. 2006). Orientaci v systematické klasifikaci druhu komplikuje velké množství synonym a to jak na úrovni druhu, tak poddruhů (Miller 1912, Csorba et al. 2003) dané nedostatečnou početností výchozího materiálu a morfometrické variabilitě dílčích populací. Gaisler (2001a) uvádí následující subspecie: *Rhinolophus h. hipposideros*, vyskytující se v kontinentální Evropě, severně od Alp, východním směrem pak přes Arménii a severozápadní Írán. Britské ostrovy, včetně Irska obývá *Rhinolophus h. minutus.* V oblasti Středomoří, včetně Korsiky, Sardinie, Kypru, ale také Arábie, Súdánu a Eritrey žije subspecie *Rhinolophus h. minimus.* Vzhledem k tomu, že druh jako celek se vyznačuje velkou regionální a klimaticky podmíněnou variabilitou, bývá někdy toto dělení zpochybňováno, včetně izolovaných populací na Britských ostrovech. Roer et Schober (2001) citují sdělení Bauera (1960), že v kontaktních zónách od střední Francie, severní Itálie, úpatí Alp, až po Karpaty existují hybridní populace subspecií *R. h. hipposideros* a *R. h. minimus.* Koopman (1994) uvádí ze severní Afriky (terra typica Mogador, Maroko) subspecii *Rhinolophus h. escalarae*, z jižní Evropy a východní části Středomoří, včetně několika ostrovů a Etiopie a Súdánu již zmíněnou subspecii *R. h. minimus;* z Korsiky *R. h. majori;* z Britských ostrovů *R. h. minutus*; nominátní subspecie *R. h. hipposideros* podle autora obývá kontinentální Evropu, až po východní část Černého moře. Z oblasti Zakavkazí, Iráku, Kazachstánu a Kašmíru uvádí subspecii *R. h. midas.* Palmeirim (1990) je přesvědčen, že variabilita druhu *R. hipposideros* se odvíjí od lokálních klimatických podmínek a tudíž i velikost tělesných rozměrů v celém Středomoří, neodráží přímé evoluční vztahy mezi populacemi. Podle autora je dělení druhu *R. hipposideros* na jednotlivé subspecie v rámci kontinentální Evropy bezpředmětné. Benda et al. (2006) konstatují, že existují dva základní pohledy na taxonomii *R. hipposideros*. První z nich, konzervativnější, vycházející

z práce Andersona (1905a) je založený na morfometrických rozdílech délky předloktí porovnávaných exemplářů. To převzala celá řada autorů a na základě tohoto bylo rozlišeno několik forem v rámci Středomoří a přilehlých oblastí. Jiného názoru jsou Felten et al. (1977), kteří sledovali rozdíly v morfologii a rozměrech lebky. S jejich výsledky se ztotožnil také Corbet (1978), který uvádí v rámci celého druhu pouze dvě subspecie: *R. h. hipposideros* v Evropě a *R. h. midas* ve východní části areálu druhu, od Iráku po Kašmír. Felten et al. (1977) navíc oddělili populace z Kréty a Eritrey jako příslušníky subspecie *R. h. minimus*. Karyologická analýza (Zima et al. 1992, Zima 2004) však naznačuje jiné skutečnosti a nabízí třetí typ geografické variability *R. hipposideros.* Zatímco exempláře ze střední Evropy (Česko, Slovensko), Balkánu (Bulharsko, Řecko), Zakavkazí (Ázerbajdžán) mají v diploidní sadě 56 chromozomů, exempláře z Blízkého východu (Anatolie, Sýrie, Jordánsko) mají 58 chromosomů. Třetí skupina z Kyrgyzstánu s 62 chromozomy by mohla reprezentovat zvláštní druh. Na základě porovnání karyotypů dochází Zima et al. (1992) k představě dvou navzájem evolučně izolovaných skupin. První z nich, vyskytující se v Evropě až po Kavkaz, druhá pak na Blízkém východě. Taková představa zpochybňuje koncept *R. hipposideros* jako polytypického druhu podle Koopmana (1994), Csorby et al. (2003), ale není v přímém rozporu s představou Feltena et al. (1977), resp. Corbeta (1978).

Vrápenec Blasiův *Rhinolophus blasii* Peters, 1867

V roce 1857 jej Blasius uvádí pod názvem *Rhinolophus clivosus*. Jméno však již bylo preokupováno jménem *R. clivosus* Cretzschmar, 1830, a proto Peters (1867) zavedl nové jméno *R. blasii* (Benda et al. 2006).

Typová lokalita: Blasius (1857) uvádí Itálii, Sicílii, Istrii a Dalmácii, Miller (1912) „jihovýchodní Evropu“, Ellerman et Morrison-Scott (1951) však vymezují typovou lokalitu na Itálii, s největší pravděpodobností na Terst nebo jeho okolí.

Rozšíření: druh s mediteránním a afrotropickým rozšířením. V Palearktidě se vyskytuje v oblasti Maghrebu, v jihovýchodní Evropě a na Balkáně (včetně ostrovů východního Středomoří) přes Zakavkazí, Blízký východ až po jihozápadní Turkmenistán, Afghánistán a Pákistán. V afrotropické oblasti zahrnuje rozšíření jihozápadní Arábii a pásmo savan východní a jižní Afriky, od Eritrey po Natal (Benda et al. 2006).

Vrápenec střední velikosti, o něco větší než *Rhinolophus euryale.* Délka těla se pohybuje mezi 42–62 mm. Systematické vztahy tohoto polytypického druhu k ostatním příslušníkům čeledi nejsou jasné, Kryštufek et Đulič (2001) udávají, že je blízce příbuzný *R.*

euryale a *R. mehelyi*. Autoři citují Andersena (1918), který řadí zmíněné 3 druhy do podskupiny *garoensis*, skupiny *pusillus.* Koopman (1994) rozeznává subspecii *R. b. blasii* ze severozápadní Afriky a jižní Evropy a jihozápadní Asie; *R. b. meyeroehmi* z Íránu, Turkménie, Afghánistánu a Pákistánu; *R. b. andreinii* z Etiopie a Somálska a *R. b. empusa* rozšířenou v jihovýchodní Africe od jižního Konga po Transvaal. Systematiku druhu založenou na morfologii jedinců komplikuje ostrůvkovitý areál rozšíření. Jednotlivé recentní populace jsou izolovány a vzdáleny od sebe tisíce kilometrů, obývají rozdílná životní prostředí a liší se tedy tělesnými rozměry a zbarvením (Csorba et al. 2003). Felten et al. (1977) na základě materiálu padesáti exemplářů *R. blasii* z celé palearktické oblasti dělí druh do dvou subspecií: *R. b. blasii*, vyskytující se v celém Středomoří, na Kypru a po západní Turecko a Levantu a již zmíněnou, v té době jím nově popsanou subspecii *R. b. meyeroehmi* z Afghánistánu a Íránu. Tento názor je obecně přijímán ve většině pozdějších prací (Horáček et al. 2000, Csorba et al. 2003).

Vrápenec jižní *Rhinolophus euryale* Blasius, 1853

Typová lokalita: Miláno, Itálie (Miller 1912)

Rozšíření: Od Zakavkazí po Turecko, Izrael, Jordánsko; jižní Evropa od Portugalska, střední Francie po jižní Slovensko, Maďarsko, Slovinsko, Balkánský poloostrov a Rumunsko; Turkmenistán, Írán, Alžírsko, Maroko, Tunisko, mediteránní ostrovy (Gaisler 2001b, Simmons 2005).

Středně velký druh vrápence dorůstající délky 43–58 mm, v rámci areálu rozšíření uvádějí Csorba et al. (2003) dvě subspecie: *R. e. euryale* ze severozápadní Afriky, Jižní Evropy, mediteránních ostrovů, Turkmenistánu a Íránu; *R. e. judaicus* ze Sýrie, jižního Iráku a Izraele. Forma *judaicus* byla na základě devíti exemplářů pocházejících z oblasti Jeruzaléma popsána jako zvláštní druh podrodu *Euryalus* Matschie, 1901. Revize tělesných rozměrů a dalších znaků holotypu *R.* (*Euryalus*) *judaicus* včetně dentálních charakteristik ukazuje, že jméno *R.* (*Euryalus*) *judaicus* je mladší synonymum jména *R. mehelyi* a není použitelné pro označení levantských populací *R. euryale* (Benda et al. 2006). Ostatně *R. euryale* a *R mehelyi* byli dlouhou dobu zaměňováni. DeBlase (1972) shrnul kriteria použitelná pro rozlišení těchto dvou druhů (délka předloktí, poměr článků čtvrtého prstu, velikost a tvar nosního lístku, utváření dentice a délka lebky) a zjistil, že nejspolehlivějšími determinačními znaky jsou utváření lancety a zygomatická šířka lebky, nicméně i zde dochází k určitému překrývání kraniálních a dentálních rozměrů, včetně zygomatické šířky. Felten et al. (1977) navrhují

použít k odlišení obou druhů rozptyl hodnot lebečních znaků a struktury humerální epifýzy. Dalším druhem, který bývá s *R. euryale* zaměňován je *Rhinolophus blasii.* Paunovič et Stamenkovič (1998) zjistili metodou multivariátní analýzy křídelních znaků (článek čtvrtého prstu a zápěstí) a dvou lebečních znaků (kondylobazální délka a zygomatická šířka) průkazné rozdíly mezi dvěma taxony. Gaisler (2001b) konstatuje, že přes určitou morfologickou variabilitu vypadají populace zmíněného druhu od Iberského poloostrova po Balkán velmi podobně, s výjimkou Korsiky, odkud pochází série odchytů jedinců menších tělesných rozměrů. Příslušníci některých populací ze Sardinie a jižní Evropy byli v minulosti popsáni pod jmény *Euryalus toscanus*, *E. atlanticus* a *E. cabrerae* (Miller 1912, Simmons 2005). Tato jména jsou považována za synonyma nominotypické formy. Z Korsiky však zatím žádná subspecie popsána nebyla, což ovšem v budoucnosti, a při použití nových taxonomických metod, není vyloučeno. Ze severní Afriky byly na konci 19. století a na počátku 20. století popsány 3 formy: *Rhinolophus algirus* Loche, 1867; *Euryalus barbarus* Andersen et Matschie, 1904 a *Euryalus meridionalis* Andersen et Matschie, 1904. Vzájemná odlišnost těchto forem a jejich vztah k nominotypické formě je však velmi problematická (Gaisler 2001b). Podobně diskutabilní postavení má subspecie *R. e. nordmanni* Satunin 1911, popsaná ze Zakavkazí (Benda et al. 2006).

Vrápenec Mehelyův *Rhinolophus mehelyi* Matschie, 1901

Typová lokalita: Bukurešť, Rumunsko (Miller 1912)

Rozšíření: Portugalsko, Španělsko, Francie, Rumunsko, Bulharsko, Řecko, Srbsko, Černá Hora; Zakavkazí; Maroko, Tunisko, Alžírsko, Lybie; Egypt a mediterránní ostrovy, Turecko, Kypr, Írán, Irák, Izrael a Jordánsko; Afghánistán (Simmons 2005).

Druhý největší evropský vrápenec, který se ale vyznačuje velkou variabilitou tělesných rozměrů, takže může být zaměněn se středně velkými druhy, zejména s *R. euryale* (Gaisler 2001c). K záměně obou zmíněných druhů přispívá i skutečnost, že často obývají stejné biotopy, nicméně jak zjistili Russo et al. (2005), liší se nároky na habitat. Velikost těla je 42–64 mm. Velká variabilita tělesných rozměrů *R. mehelyi* se odráží i v taxonomii. Koopman (1994) uvádí u tohoto druhu 2 subspecie: *R. m. mehelyi* z Evropy a *R. m. tuneti* ze severní Afriky; Gaisler (1983) řadí k této subspecii alžírské populace druhu. Popis subspecie *R. m. tuneti* vychází z morfologických odlišností − delší ocas, uši a 4. metakarpus a kratší tibie v porovnání s nominotypickou subspecií (Cockrum 1976). V roce 1904 popsal Cabrera na základě jedince odchyceného ve Španělsku tento druh jako *Rhinolophus carpetanus*

(Miller 1912). Později byl ale tento taxon považován za subspecii vrápence Mehelyova *R. m. carpetanus* odlišující se od nominátní subspecie většími rozměry. Kahman (1958) na základě analýzy externích a kraniálních rozměrů *R. m. carpetanus* a *R. mehelyi* dospěl k závěru, že v rámci druhu neexistuje prokazatelná variabilita na úrovni subspecií. Podobně považují tento druh za monotypický Felten et al. (1977), Corbet (1978) a Gaisler (2001c). Podle Horáčka (2000) je jedním z hlavních důvodů proč se *R. mehelyi* jeví jako monotypický druh skutečnost, že je k dispozici zatím poměrně málo poznatků týkajících se jeho geografické variability.

1.7 Cíl práce

Jak již bylo uvedeno, Středomoří patří v rámci Palearktidy k oblastem vyznačujícím se neobyčejnou biodiverzitou. Velmi zajímavým územím z hlediska fylogeografických studií a úvah je jeho východní část, na pomezí Palearktidy a orientální a afrotropické oblasti. Díky různorodým klimatickým podmínkám se vyznačuje existencí specifických, často diametrálně odlišných biotopů a fytogeografických celků (Zohary 1973), což se zásadním způsobem projevuje ve všech aspektech biologie taxonů zdejší fauny. V obecném přehledu je na základě literárních pramenů vypracován stručný přehled současného stavu druhové diverzity netopýří fauny Středomořské oblasti, včetně porovnání údajů a nálezů u diskutovaných taxonů východního Středomoří (Benda et al. 2006, 2007, Benda et Horáček 1998).

Taxonomická determinace materiálu zpracovávaného v předkládané práci vychází z klasických morfologických metod doplněných matematickými analýzami osteometrických dat (Benda et al. 2006). Metody molekulární genetiky nabízejí při řešení fylogeografické problematiky možnosti získat zcela nové údaje a ty pak porovnat s dosavadními taxonomickými poznatky získanými pomocí „klasických“ metod (Hulva et al. 2007). Cílem předkládané diplomové práce bylo proto pomocí molekulární analýzy mitochondriální DNA vybraných druhů rodu *Rhinolophus* přispět k doplnění stávajících poznatků a pokusit se zjistit, zda a do jaké míry se geneticky liší haplotypy jednotlivých populací rodu *Rhinolophus* ve sledovaných geografických lokalitách východního Středomoří.

Na základě dostupné literatury týkající se dosavadních poznatků o fylogenezi čeledi Rhinolophidae v rámci Středomoří i některých dalších regionů a z údajů získaných molekulární genetickou analýzou tkání z exemplářů druhů *Rhinolophus ferrumequinum*, *R. hipposideros*, *R. blasii* a *R.euryale* ze středomořských, středoevropských a blízkovýchodních

populací jsem se pokusil posoudit fylogeografická a taxonomická specifika diverzifikace zmíněné čeledi.

Stanovené cíle práce:

- Molekulární analýza genu pro cytochrom *b* druhů *Rhinolophus ferrumequinum*, *R. hipposideros*, *R. blasii* a *R. euryale* z oblasti Středomoří.
- Porovnání získaných výsledků se stávajícím taxonomickým členěním rodu *Rhinolophus*.
- Problematika subspecifického dělení *Rhinolophus ferrumequinum* v rámci Palearktidy se zřetelem na oblast východního Středomoří.
- Totéž u druhů *Rhinolophus hipposideros*, *R. blasii* a *R. euryale.*
- Posouzení získaných údajů jednotlivých populací výše zmíněných druhů v kontextu fylogeografických vztahů a literárních údajů.

2 Materiál a metodika

2.1 Materiál

K analýze bylo použito celkem 113 vzorků 4 druhů čeledi Rhinolophidae: *Rhinolophus hipposideros*, *R. ferrumequinum*, *R. euryale* a *R. blasii*. Všechny vzorky, které byly použity pro molekulární analýzu, pocházejí z exemplářů získaných odchytem ve volné přírodě. Část z nich byla usmrcena, fixována v ethanolovém konzervačním roztoku a nechána jako dokladový muzejní materiál, uložený v Národním muzeu v Praze (NMP). Další část vzorků pochází z jedinců, kteří byli po odebrání tkáně vypuštěni zpět do přírody. Vzorky poskytl Dr. Petr Benda z Národního muzea, prof. Ivan Horáček a Dr. Pavel Hulva z Přírodovědecké fakulty UK. Kompletní přehled vzorků studovaných taxonů, příslušných lokalit a autorů sběrů je uveden v tabulce 1.

Tab. 1. Seznam lokalit a zdrojů analyzovaných vzorků.

Kód	Inventární číslo	Číslo terénního protokolu	Rod	Druh	Země	Lokalita	Datum sběru	Coll.
CH007	NMP 90433	pb2835	Rhinolophus	blasii	Kypr	Kalavasos, 3 km NW	19.4.2005	P. Benda et al.
CH128		pb2908	Rhinolophus	blasii	Jemen	Sana, Sana'a	5.10.2005	P. Benda
CH132	NMP 91072	pb3379	Rhinolophus	blasii	Řecko	Crete, Omalos	1.10.2006	P. Benda et al.
CH134	NMP 91085	pb3392	Rhinolophus	blasii	Řecko	Crete, Amnisos, 1 km S	4.10.2006	P. Benda et al.
CH147	NMP 91793	pb3472	Rhinolophus	blasii	Libanon	Kfar Zabad	24.1.2007	P. Benda et al.
CH149	NMP 91795	pb3474	Rhinolophus	blasii	Libanon	Kfar Zabad	24.1.2007	P. Benda et al.
CH175		pb2907	Rhinolophus	blasii	Jemen	Sana, Sana'a	5.10.2005	P. Benda
CH179	NMP 91794	pb3473	Rhinolophus	blasii	Libanon	Kfar Zabad	24.1.2007	P. Benda et al.
CH190	NMP 90930	pb3336	Rhinolophus	blasii	Kypr	Troodos Forest, valley N of Kakopetria	27.7.2006	P. Benda
CH204		pb2908	Rhinolophus	blasii	Jemen	Sana, Sana'a	5.10.2005	P. Benda
CH224	NMP 90929	pb3335	Rhinolophus	blasii	Kypr	Troodos Forest, valley N of Kakopetria	27.7.2006	P. Benda
CH226	NMP 91792	pb3471	Rhinolophus	blasii	Libanon	Kfar Zabad	24.1.2007	P. Benda et al.
CH230		pb2078	Rhinolophus	blasii	Kosovo	Bubel	27.10.2001	P. Benda
CH114		pb2907	Rhinolophus	blasii	Jemen	Sana, Sana'a	5.10.2005	P. Benda
CH145	NMP 91771	pb3449	Rhinolophus	euryale	Libanon	Haqel el Azime	21.1.2007	P. Benda et al.
CH187	NMP 90631	pb2843	Rhinolophus	euryale	Slovensko	Nandraž	1.8.2005	P. Benda
CH213	NMP 91804	pb3483	Rhinolophus	euryale	Libanon	Aamchite	28.1.2007	P. Benda et al.
CH001	NMP 91225	CH161	Rhinolophus	ferrumequinum	Kypr	Troodos Forest, 4,5 km SW of Kakopetria	14.10.2005	I. Horáček et al.
CH026	NMP 91204	CH106	Rhinolophus	ferrumequinum	Kypr	Akamas Pen., Smigies Trail	12.10.2005	I. Horáček et al.
CH038	NMP 90432	pb2834	Rhinolophus	ferrumequinum	Kypr	Kalavasos, 3 km NW	19.4.2005	P. Benda et al.
CH049	NMP 91250	CH028	Rhinolophus	ferrumequinum	Kypr	Akamas Pen., Smigies Trail	27.3.2005	I. Horáček et al.
CH053	NMP 91205	CH107	Rhinolophus	ferrumequinum	Kypr	Akamas Pen., Smigies Trail	12.10.2005	I. Horáček et al.
CH054	NMP 91206	CH118	Rhinolophus	ferrumequinum	Kypr	Akamas Pen., Smigies Trail	12.10.2005	I. Horáček et al.
CH057	NMP 91235	CH254	Rhinolophus	ferrumequinum	Kypr	Afendrika	17.10.2005	I. Horáček et al.
CH078	NMP 90490		Rhinolophus	ferrumequinum	Turecko	Muradiye	23.6.2003	J. Hotový
CH098	NMP 48270	pb1539	Rhinolophus	ferrumequinum	Izrael/Sýrie	Nimrod Fortress, Golan Hights	18.7.1999	P. Benda
CH108	NMP 48936	pb1983	Rhinolophus	ferrumequinum	Sýrie	Qala'at Samaan	3.6.2001	P. Benda et al.
CH112	NMP 48352	pb1635	Rhinolophus	ferrumequinum	Írán	Deh Bakri	7.4.2000	P. Benda et al.
CH121		pb2081	Rhinolophus	ferrumequinum	Kosovo	Mrasor	27.10.2001	P. Benda

CH125		CG x	Rhinolophus	ferrumequinum	Černá Hora	Stari Bar	19.9.2001	J. Hotový
CH130	NMP 91092	pb3399	Rhinolophus	ferrumequinum	Řecko	Crete, Gerani	6.10.2006	P. Benda et al.
CH131	NMP 91104	pb3411	Rhinolophus	ferrumequinum	Řecko	Crete, Milatos, 1 km E	7.10.2006	P. Benda et al.
CH133	NMP 91120	pb3427	Rhinolophus	ferrumequinum	Řecko	Crete, Kolymvari	9.10.2006	P. Benda et al.
CH137		LE113	Rhinolophus	ferrumequinum	Libanon	Afqa Cave	26.6.2006	I. Horáček et al.
CH142	NMP 91084	pb3391	Rhinolophus	ferrumequinum	Řecko	Crete, Amnisos, 1 km S	4.10.2006	P. Benda et al.
CH150	NMP 91788	pb3467	Rhinolophus	ferrumequinum	Libanon	Bcharré	23.1.2007	P. Benda et al.
CH155	NMP 91796	pb3475	Rhinolophus	ferrumequinum	Libanon	Ras al Assi	25.1.2007	P. Benda et al.
CH159	NMP 91071	pb3378	Rhinolophus	ferrumequinum	Řecko	Crete, Omalos	1.10.2006	P. Benda et al.
CH164		LE195	Rhinolophus	ferrumequinum	Libanon	Ras el Assi, Deir Mar Maroun Monastery	29.6.2006	I. Horáček et al.
CH171	NMP 91750	pb3428	Rhinolophus	ferrumequinum	Libanon	Mrouj	19.1.2007	P. Benda et al.
CH181	NMP 48892	pb1939	Rhinolophus	ferrumequinum	Sýrie	Qala'at Sheisar (Hama)	31.5.2001	P. Benda et al.
CH182		pb2080	Rhinolophus	ferrumequinum	Kosovo	Mrasor	27.10.2001	P. Benda
CH189		pb2794	Rhinolophus	ferrumequinum	Slovensko	Silica	26.1.2005	P. Benda
CH193		pb2795	Rhinolophus	ferrumequinum	Slovensko	Hodruša-Hámre	27.1.2005	P. Benda
CH206	NMP 91752	pb3430	Rhinolophus	ferrumequinum	Libanon	Mrouj	19.1.2007	P. Benda et al.
CH207		pb2826	Rhinolophus	ferrumequinum	Kypr	Cinarli, 4 km SE	17.4.2005	P. Benda et al.
CH214	NMP 48935	pb1982	Rhinolophus	ferrumequinum	Sýrie	Qala'at Samaan (Halab)	3.6.2001	P. Benda et al.
CH217	NMP 91768	pb3446	Rhinolophus	ferrumequinum	Libanon	Haqel el Azime	21.1.2007	P. Benda et al.
CH223	NMP 91081	pb3388	Rhinolophus	ferrumequinum	Řecko	Crete, Patsos, 1,5 km N	3.10.2006	P. Benda et al.
CH225		LE210	Rhinolophus	ferrumequinum	Libanon	Ras el Assi, Deir Mar Maroun Monastery	29.6.2006	I. Horáček et al.
CH228	NMP 91070	pb3377	Rhinolophus	ferrumequinum	Řecko	Crete, Omalos	1.10.2006	P. Benda et al.
CH229	NMP 91105	pb3412	Rhinolophus	ferrumequinum	Řecko	Crete, Milatos, 1 km E	7.10.2006	P. Benda et al.
CH234	NMP 91249	CH027	Rhinolophus	ferrumequinum	Kypr	Akamas Pen., Smigies Trail	27.3.2005	I. Horáček
CH010	NMP 91270	CH057	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Cinarli, 4 km SE	6.4.2005	I. Horáček
CH034	NMP 90424	pb2825	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Cinarli, 4 km SE	17.4.2005	P. Benda et al.
CH043	NMP 91830	CH230	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Cinarli, 4 km SE	15.10.2005	I. Horáček
CH065	NMP 91823	CH023	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Akamas Pen., Smigies Trail	27.3.2005	I. Horáček
CH135	NMP 91090	pb3397	Rhinolophus	hipposideros	Řecko	Crete, Gerani	6.10.2006	P. Benda et al.
CH136	NMP 91801	pb3480	Rhinolophus	hipposideros	Libanon	Faraya	27.1.2007	P. Benda et al.
CH138	NMP 91097	pb3404	Rhinolophus	hipposideros	Řecko	Crete, Milatos, 1 km E	7.10.2006	P. Benda et al.

CH139	NMP 91825	CH025	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Akamas Pen., Smigies Trail	27.3.2005	I. Horáček et al.
CH140	NMP 91821	CH020	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Akamas Pen., Smigies Trail	27.3.2005	I. Horáček et al.
CH141	NMP 90926	pb3332	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Troodos Forest, valley N of Kakopetria	27.7.2006	P. Benda et al.
CH146	NMP 48054	pb1159	Rhinolophus	hipposideros	Sýrie	Crac des Chevaliers	28.6.1998	P. Benda et al.
CH148	NMP 91261	CH040	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Troodos Forest, 1,5 km N of Troodos	29.3.2005	I. Horáček et al.
CH153	NMP 91755	pb3433	Rhinolophus	hipposideros	Libanon	Mrouj	19.1.2007	P. Benda et al.
CH156	NMP 48097	pb0934	Rhinolophus	hipposideros	Írán	Emam Sadeh	1.5.1997	P. Benda
CH157	NMP 91263	CH042	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Troodos Forest, 5 km SW of Kakopetria	29.3.2005	P. Benda et al.
CH161	NMP 90924	pb3330	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Troodos Forest, valley N of Kakopetria	27.7.2006	P. Benda
CH162	NMP 91753	pb3431	Rhinolophus	hipposideros	Libanon	Mrouj	19.1.2007	P. Benda et al.
CH163	NMP 91091	pb3398	Rhinolophus	hipposideros	Řecko	Crete, Gerani	6.10.2006	P. Benda et al.
CH166	NMP 90424	pb2825	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Cinarli, 4 km SE	17.4.2005	P. Benda et al.
CH174	NMP 91809	pb3488	Rhinolophus	hipposideros	Libanon	Nabaa es Safa	29.1.2007	P. Benda et al.
CH176	NMP 90923	pb3329	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Troodos Forest, valley N of Kakopetria	27.7.2006	P. Benda
CH183	NMP 91822	CH021	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Akamas Pen., Smigies Trail	27.3.2005	I. Horáček et al.
CH184		pb2793	Rhinolophus	hipposideros	Slovensko	Silica	26.1.2005	P. Benda
CH186		pb2796	Rhinolophus	hipposideros	Slovensko	Hodruša-Hámre	27.1.2005	P. Benda
CH188		pb2792	Rhinolophus	hipposideros	Slovensko	Zlatno	25.1.2005	P. Benda
CH192		pb2797	Rhinolophus	hipposideros	Česká rep.	Mořina	2.2.2005	P. Benda
CH197	NMP 49028	pb2054	Rhinolophus	hipposideros	Řecko	Kombotades (Lamia)	31.8.2001	P. Benda
CH199		pb2791	Rhinolophus	hipposideros	Slovensko	Licince	25.1.2005	P. Benda
CH200	NMP 91262	CH041	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Troodos Forest, 1,5 km N of Troodos	29.3.2005	I. Horáček et al.
CH203	NMP 91824	CH024	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Akamas Pen., Smigies Trail	27.3.2005	P. Benda et al.
CH208	NMP 91229	CH166	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Troodos Forest, 4,5 km SW of Kakopetria	14.10.2005	I. Horáček et al.
CH209		LE36	Rhinolophus	hipposideros	Libanon	Port al Khalars	23.6.2006	P. Benda et al.
CH211	NMP 91769	pb3447	Rhinolophus	hipposideros	Libanon	Haqel el Azime	21.1.2007	P. Benda et al.
CH212	NMP 90928	pb3334	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Troodos Forest, valley N of Kakopetria	27.7.2006	P. Benda et al.
CH216	NMP 91827	CH047	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Troodos Forest, 1,5 km N of Troodos	29.3.2005	I. Horáček et al.
CH219	NMP 91798	pb3477	Rhinolophus	hipposideros	Libanon	Antelias	25.1.2007	P. Benda et al.
CH222	NMP 91775	pb3453	Rhinolophus	hipposideros	Libanon	Aaqura	22.1.2007	P. Benda et al.
CH227	NMP 91790	pb3469	Rhinolophus	hipposideros	Libanon	Bcharré	23.1.2007	P. Benda et al.

CH236		CH131	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Troodos Forest, 4.5 km SW of Kakopetria	13.10.2005	I. Horáček et al.
CH237		CH151	Rhinolophus	hipposideros	Kypr	Troodos Forest, 1.5 km N of Troodos	13.10.2005	I. Horáček et al.
CH239		CH138	Rhinolophus	ferrumequinum	Kypr	Troodos Forest, 4.5 km SW of Kakopetria	13.10.2005	I. Horáček et al.
CH240		CH139	Rhinolophus	ferrumequinum	Kypr	Troodos Forest, 4.5 km SW of Kakopetria	13.10.2005	I. Horáček et al.
CH241		CH152	Rhinolophus	ferrumequinum	Kypr	Troodos Forest, 3 km W of Troodos	14.10.2005	I. Horáček et al.
CH243		LE200	Rhinolophus	ferrumequinum	Libanon	Ras el Assi, Deir Mar Maroun Monastery	29.6.2006	I. Horáček et al.
CH245	NMP 91234	CH231	Rhinolophus	ferrumequinum	Kypr	Cinarli, 4 km SE	15.10.2005	I. Horáček et al.
CH246		H7	Rhinolophus	ferrumequinum	Itálie	Castelcivita, camp u řeky Calore	20.6.2007	P. Hulva
CH247		H8	Rhinolophus	ferrumequinum	Itálie	Castelcivita, camp u řeky Calore	20.6.2007	P. Hulva
CH248		H12	Rhinolophus	ferrumequinum	Itálie	Castelcivita, camp u řeky Calore	20.6.2007	P. Hulva
CH249		H13	Rhinolophus	ferrumequinum	Itálie	Castelcivita, camp u řeky Calore	20.6.2007	P. Hulva
CH250		H14	Rhinolophus	ferrumequinum	Itálie	Castelcivita, camp u řeky Calore	20.6.2007	P. Hulva
CH251		H15	Rhinolophus	ferrumequinum	Itálie	Castelcivita, camp u řeky Calore	20.6.2007	P. Hulva
CH252		H16	Rhinolophus	ferrumequinum	Itálie	Castelcivita, camp u řeky Calore	20.6.2007	P. Hulva
CH254		CH137	Rhinolophus	ferrumequinum	Kypr	Castelcivita, camp u řeky Calore	20.6.2007	P. Hulva
CH257		LE113	Rhinolophus	ferrumequinum	Libanon	Afqa Cave	26.6.2006	I. Horáček et al.
CH258		LE036	Rhinolophus	hipposideros	Libanon	Port al Khalars	23.6.2006	I. Horáček et al.
CH260		H6	Rhinolophus	ferrumequinum	Itálie	Castelcivita, camp u řeky Calore	20.6.2007	P. Hulva
CH261		H4	Rhinolophus	ferrumequinum	Itálie	Castelcivita, camp u řeky Calore	20.6.2007	P. Hulva
CH262		H3	Rhinolophus	ferrumequinum	Itálie	Castelcivita, camp u řeky Calore	20.6.2007	P. Hulva
CH263		H2	Rhinolophus	ferrumequinum	Itálie	Castelcivita, camp u řeky Calore	20.6.2007	P. Hulva

K výslednému souboru získaných sekvencí byly přidány pro porovnání další sekvence publikované v internetové databázi PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed). Jedná se o kompletní sekvence genu pro cytochrom *b* rodu *Rhinolophus*. Jako outgroup byly do analýz použity kompletní sekvence cytochromu *b* druhů *Myotis mystacinus* (Kuhl, 1817), *Miniopterus magnater* Sanborn, 1931, *Pteropus rufus* (Tiedermann, 1808) a *Hipposideros armiger* (Hodgson, 1836) (tab. 2).

Tab. 2. Seznam použitých sekvencí publikovaných v internetové databázi PubMed

PubMed	Rod	Druh	Region	Citace
EF544402	*Rhinolophus*	*ferrumequinum*	Henan Province (Čína)	Niu et al. 2007
EF544414	*Rhinolophus*	*ferrumequinum*	Henan Province (Čína)	Niu et al. 2007
EF544417	*Rhinolophus*	*ferrumequinum*	Henan Province (Čína)	Niu te al. 2007
AB085722	*Rhinolophus*	*ferrumequinum*	Japonsko	Sakai et al. 2003
DQ351847	*Rhinolophus*	*ferrumequinum*	Čína	Feng et al. 2006
AB085723	*Rhinolophus*	*ferrumequinum*	Japonsko	Sakai et al. 2003
DQ297575	*Rhinolophus*	*ferrumequinum*	Yunnan (Čína)	Li et al. 2007
DQ297586	*Rhinolophus*	*hipposideros*	Upper Langford (Velká Británie)	Li et al. 2007
DQ297596	*Rhinolophus*	*luctus*	Huibei (Čína)	Li et al. 2007
DQ297589	*Rhinolophus*	*pusillus*	Sichuan (Čína)	Li et al. 2007
DQ865344	*Rhinolophus*	*blythi*	–	Xu et al. 2006
DQ297581	*Rhinolophus*	*monoceros*	Yangmingshan (Taiwan)	Li et al. 2007
AB061526	*Rhinolophus*	*pumilus*	Japonsko	Nikaido et al. 2001
DQ297592	*Rhinolophus*	*cornutus*	Okupirika, Hokkaido (Japonsko)	Li et al. 2007
EF555788	*Rhinolophus*	*monoceros*	Henan Province (Čína)	Niu te al. 2007
EF544418	*Rhinolophus*	*affinis*	Henan Province (Čína)	Niu et al. 2007
DQ987605	*Rhinolophus*	*affinis*	–	Xu et al. 2006
EF517303	*Rhinolophus*	*sinicus*	Guizhou (Čína)	Cui et al. 2007
EF544424	*Rhinolophus*	*pearsoni*	Henan Province (Čína)	Niu et al. 2007
EF517309	*Rhinolophus*	*pearsoni*	Guizhou (Čína)	Cui et al. 2007
EF517310	*Rhinolophus*	*pearsoni*	Yunnan (Čína)	Cui et al. 2007
AY665140	*Myotis*	*mystacinus*	–	Tsytsulina et al. 2005
EF517308	*Miniopterus*	*magnater*	Hainan (Čína)	Cui et al. 2007
AB085732	*Pteropus*	*rufus*	Madagaskar	Sakai et al. 2003
DQ297585	*Hipposideros*	*armiger*	Guangxi (Čína)	Li et al. 2007

2.2 Metodika

2.2.1 Izolace DNA

Materiál pro izolaci DNA byl odebírán z usmrcených jedinců, kteří byli fixováni v denaturovaném ethanolu. Část křídelní blány (velikosti přibližně 3×3 mm) byla po odstřižení vložena do 1,5 ml mikrozkumavek s čistým 96% ethanolem. Tkáň byla rozstříhána

na co možno nejmenší kousky a umístěna do sterilních 1,5 ml mikrozkumavek. Po odpaření ethanolu byla následně provedena izolace podle postupu komerčně dodávané soupravy pro izolaci DNA-Dneasy Tissue Kit od firmy Qiagen, dle protokolu dodávaného s izolační sadou.

Po izolaci byla ověřena přibližná koncentrace pomocí elektroforézy (5 µl DNA + 2 µl vkládacího pufru bylo nanášeno na agarózový gel). Všechny vzorky izolované DNA byly označeny a uloženy při −18 °C do mrazícího boxu.

2.2.2 PCR

Sledovaný gen pro cytochrom *b* byl amplifikován pomocí primeru uvedeného v tabulce 3. Sekvence primeru byla převzata z práce Sakaie et al. (2003). Délka amplifikovaných úseků je přibližně 1200 bp.

Tab. 3. Sekvence primeru použitého pro amplifikaci studovaného genu. Označení primeru odpovídá názvu, který je uveden v příslušné publikaci (Sakai et al. 2003)

Gen	**Označení primeru**	**F/R**	**Sekvence primeru**
Cytochrom *b*	CytbF1	forward	5´-GACCAATGATATGAAAACCATCGTT-3´
	CytR1	reverse	5´-GGCCCTCCTCCCCTGGTTTACAAGAC-3´

Reakční směs byla připravena vždy do celkového objemu 25 µl na vzorek, přesné složení směsi je uvedeno v tabulce 3. Do předem připravené směsi bylo standardně přidáváno 5 µl dané DNA. V případě, že koncentrace výsledného produktu byla nedostačující, opakoval jsem reakci, ale voda v reakční směsi byla kompletně nahrazena příslušnou DNA vzorku. Složení směsi, s přidáním 5 µl dané DNA je v tabulce 4 označeno jako „a“ a složení směsi, kde byla voda nahrazena příslušnou DNA je označeno jako „b“. PPP Master Mix je komerční směs firmy Top-Bio, s. r. o., obsahující veškeré komponenty s výjimkou primerů, potřebné pro provedení PCR reakce (Taq polymeráza, dNTP, pufr s $MgCl_2$ a stabilizátory).

Tab. 4. Složení reakční směsi pro PCR (množství jednotlivých chemikálií v µl a vztaženo na jednu reakci)

	a	**b**
PPPMMix	12,5	12,5
H_2O	6,2	-
Forvard (10µl)	0,65	0,65
Reverse (10µl)	0,65	0,65
	20	13,8
DNA	5	11,2
Total	25	25

PCR reakce probíhaly v termocyklerech Mastercycler gradient (Eppendorf). Programy použité v PCR reakcích jsou uvedeny v tabulce 5.

Tab. 5. PCR program použitý pro amplifikaci studovaného genu

Fáze	**Počet opakování**	**Teplota**	**Čas**
Počáteční denaturace	1×	94 °C	3 min
Denaturace	35×	94 °C	40 s
Nasedání		51 °C	40 s
Prodlužování		60 °C	3 min
Konečné prodlužování	1×	60°C	10 min
Chlazení	1×	4 °C	20 min

Pro vzorky z exemplářů druhu *R. hipposideros* pocházejících z Kypru musel být PCR program upraven. Původní teplota nasedání (51 °C) musela být snížena na 41 °C, ostatní nastavení parametrů zůstalo nezměněno (tab. 5)

2 µl PCR produktu byly naneseny na 0,8% agarózový gel a pomocí elektroforézy byla následně ověřena kvalita a přibližná koncentrace produktu. V PCR reakcích se vždy amplifikoval pouze požadovaný úsek. Získané produkty byly zamraženy a připraveny k dalšímu zpracování.

2.2.3 Elektroforéza

Horizontální elektroforéza byla prováděna na agarózovém gelu při 110 V. Jako pufr byl použit 1x koncentrovaný TAE. Gel byl standardně připravován z 0,8% agarózy, pro pozdější vizualizaci DNA pod UV zářením byl do každého gelu o objemu 60 ml přidán 1 µl ethidiumbromidu (EtBr).

2.2.4 Purifikace

PCR produkty byly purifikovány ethanolovou precipitací. Produkt byl převeden do 1,5 ml mikrozkumavky. Následně byla přidána 1/10 objemu 3M octanu sodného, dále 50 µl 100% vymrazeného ethanolu a 10−15 minut byla směs ponechána v mrazícím boxu. Následovala centrifugace 20 minut při 13.000 otáčkách. Poté byl ethanol odsát, v dalším kroku následovalo přidání 100 µl 75% ethanolu. Pokračovalo se další centrifugací po dobu 10 minut při 13 000 ot. a po jejím skončení byl ethanol opět odsát. Následovalo sušení produktu 15 min. při 40 °C a poté bylo přidáno 22 µl sterilní destilované vody. Po purifikaci byly k 5 µl přečištěného PCR produktu přidány 2 µl vkládacího pufru a provedena elektroforéza k zjištění přibližné koncentrace produktu.

2.2.5 Sekvenace

Purifikované PCR produkty byly zaslány spolu s odpovídajícím párem primerů firmě Macrogen, která vlastní osekvenování produktů provedla.

2.2.6 Vyhodnocení chromatogramu a tvorba alignmentu

Úsek studované DNA byl sekvenován z obou konců tak, aby se sekvence uprostřed překryly. Analýza chromatogramu a kontrola sekvencí byla provedena pomocí programu Chromas 2.31, který je zdarma dostupný na webové stránce http://www.technelysium.com.au /chromas.html. Všechny sekvence byly na obou koncích upraveny tak, aby začínaly a končily ve stejné pozici.

Alignment sekvencí byl proveden v programu Clustal W (Thompson et al. 1997), který je součástí programu BioEdit (Hall 1999). Ve stejném programu byly i získané sekvence obou polovin studovaného genu spojeny.

2.2.7 Fylogenetické analýzy

Ještě před provedením fylogenetických analýz byl datový soubor veškerých zpracovaných jedinců obohacený publikovanými sekvencemi genu pro cytochrom *b* rodu *Rhinolophus* a srovnávacích (outgroupových) skupin rozřazen na jednotlivé haplotypy. Bylo to provedeno pomocí programu Collapse 1.2 (Posada 2006). Seznam získaných haplotypů je uveden v tabulce 6.

Fylogenetické stromy jsou tvořené ze sekvencí haplotypů uvedených v tabulce 6. Jedná se o sekvence druhů *R. ferrumequinum*, *R. hipposideros*, *R. blasii* a *R. euryale*; jako outgroup byly použity sekvence druhů *Pteropus rufus*, *Myotis mystacinus* a *Miniopterus magnater*. Fylogenetické stromy byly konstruovány metodami maximální parsimonie (maximum parsimony, MP), maximální věrohodnost (maximum likelihood, ML), distanční metody – neighbor-joining (NJ) a Fitch-Margoliash s maximum likelihood (MLdist) a s LogDet (LDdist) distancemi a Bayesovskou analýzou (Bayesan analysis, BA).

Pro vyhodnocení fylogenetických stromů MP byl využit program PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002). Stromy byly konstruovány 10 replikáty heuristického vyhledávání. Počáteční strom byl vytvořen procedurou „stepwise addition" s náhodným přidáváním taxonů a poté byl „swapován" algoritmem „tree bisection and reconnection" (TBR). Pro každou analýzu byly zaznamenány počty maximálně parsimonních stromů. Statistická podpora jednotlivých uzlů byla zjištěna využitím bootstrapové analýzy s 1000 pseudoreplikáty.

Pro ML a MLdist byl substituční model určen pomocí hierarchického likelihood ratio testu v programu Modeltest 3.7 (Posada et Crandall 1998). Pro výpočet nejlepšího fylogenetického stromu byl opět použit program PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002) a pro následný výpočet statistické podpory uzlů metodou bootstrapu s 1000 pseudoreplikátů byl využit program PhyML v2.4.4. (Guindon et Gascuel 2003).

Bayesovská metoda počítaná programem MrBayes 3.1 (Ronquist et Huesenbeck 2003) je založena na vyhledávání nejlepších stromů pomocí Markov chain Monte Carlo algoritmu (Larget et Simon 1999). Analýza byla ukončena po proběhnutí 6 x 10^6 generací. Každých 100

generací došlo k uložení stromu. Po zkontrolování ustálené frekvence stromů došlo k odstranění prvních 1 500 000 generací (15 000 stromů) a vytvoření konsensuálního stromu.

Pomocí programu PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002) byl vypočten strom pro distanční metodu NJ (Saitou et Nei 1987). Strom byl počítán bez modelu, dále pak s *p* distancemi a také s K2P modelem. Statistická podpora jednotlivých uzlů byla zjištěna využitím bootstrapové analýzy s 1000 pseudoreplikáty.

Pro výpočet stromu Fitch Margoliashovou metodou s ML a LD byl použit opět program PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002). Statistická podpora jednotlivých uzlů byla zjištěna využitím bootstrapové analýzy, u MLdist s 1000 pseudoreplikáty a u LDdist s 450 replikáty.

2.2.8 Haplotypové sítě (Haplotype networks)

Byl použit program TCS v 1.21 (Clement et al. 2000). Na základě metody parsimonie vytváří haplotypové sítě. Každý krok znamená substituci. Velikost oválů vyjadřuje počet vzorků, které reprezentují jednotlivé haplotypy. Pravděpodobnostní limit parsimonie byl nastaven na 95 % výjimkou druhu *R. hipposideros*, kde byl ručně snížen a nastaven limit 65 kroků.

3 Výsledky

Celkem bylo analyzováno 113 vzorků 4 západopalearktických taxonů čeledi Rhinolophidae: *Rhinolophus hipposideros*, *R. ferrumequinum*, *R. euryale a R. blasii* (tab. 1). Pro analýzu byl použit gen pro cytochrom *b*. Délka jednotlivých alignmentů musela být z původních cca 1200 bp na počátcích a na koncích ořezána z důvodu nedostatečné kvality. Alignment byl ořezán s ohledem na jednotlivé kodony, celková délka sekvencí ve finálním alignmentu je 1128 bp. Kompletní soubor sekvencí všech získaných haplotypů je k dispozici na přiloženém CD. Výsledný soubor sekvencí použitých pro fylogenenetické analýzy čítá celkem 113 sekvencí z mnou analyzovaných vzorků a 25 sekvencí převzatých z internetové databáze GenBank. Z celkového počtu 1128 znaků bylo 627 proměnlivých a z nich je 415 parsimonně informativních. Sekvence vykazují vyšší podíl A/T (A = 0,346, T = 0,196) a nižší podíl C + G (0,457) což je typické pro savce (Irwin et al. 1991). Soubor získaných sekvencí, byl rozřazen na jednotlivé haplotypy, jejichž kompletní seznam je uveden v tabulce 6.

Tab. 6. Seznam haplotypů a jednotlivých exemplářů jimi zastoupených, včetně lokalit.

Haplotyp	Vzorek	Region
Rhinolophus blasii		
RB 1	CH007	Kypr
RB 2	CH114, CH175	Jemen
RB 3	CH128, CH204	Jemen
RB 4	CH132, CH134, CH230	Kréta, Kosovo
RB 5	CH147, CH224	Libanon, Kypr
RB 6	CH149, CH179, CH226, CH213	Libanon
RB 7	CH190	Kypr
Rhinolophus euryale		
RE 1	CH145	Slovensko
RE 2	CH187	Libanon
Rhinolophus ferrumequinum		
RF 1	CH001, CH026, CH038, CH049, CH053, CH054, CH234, CH239, CH240, CH241, CH254	Kypr
RF 2	CH057, CH098, CH108, CH137, CH150, CH155, CH164, CH171, CH181, CH206, CH207, CH214, CH217, CH225, CH245, CH257	Kypr, Libanon, Izrael/Sýrie, Sýrie
RF 3	CH078	Turecko
RF 4	CH112	Írán
RF 5	CH121, CH125, CH130, CH133, CH159, CH189, CH193, CH228, CH229	Kosovo, Černá Hora, Řecko (Kréta), Slovensko

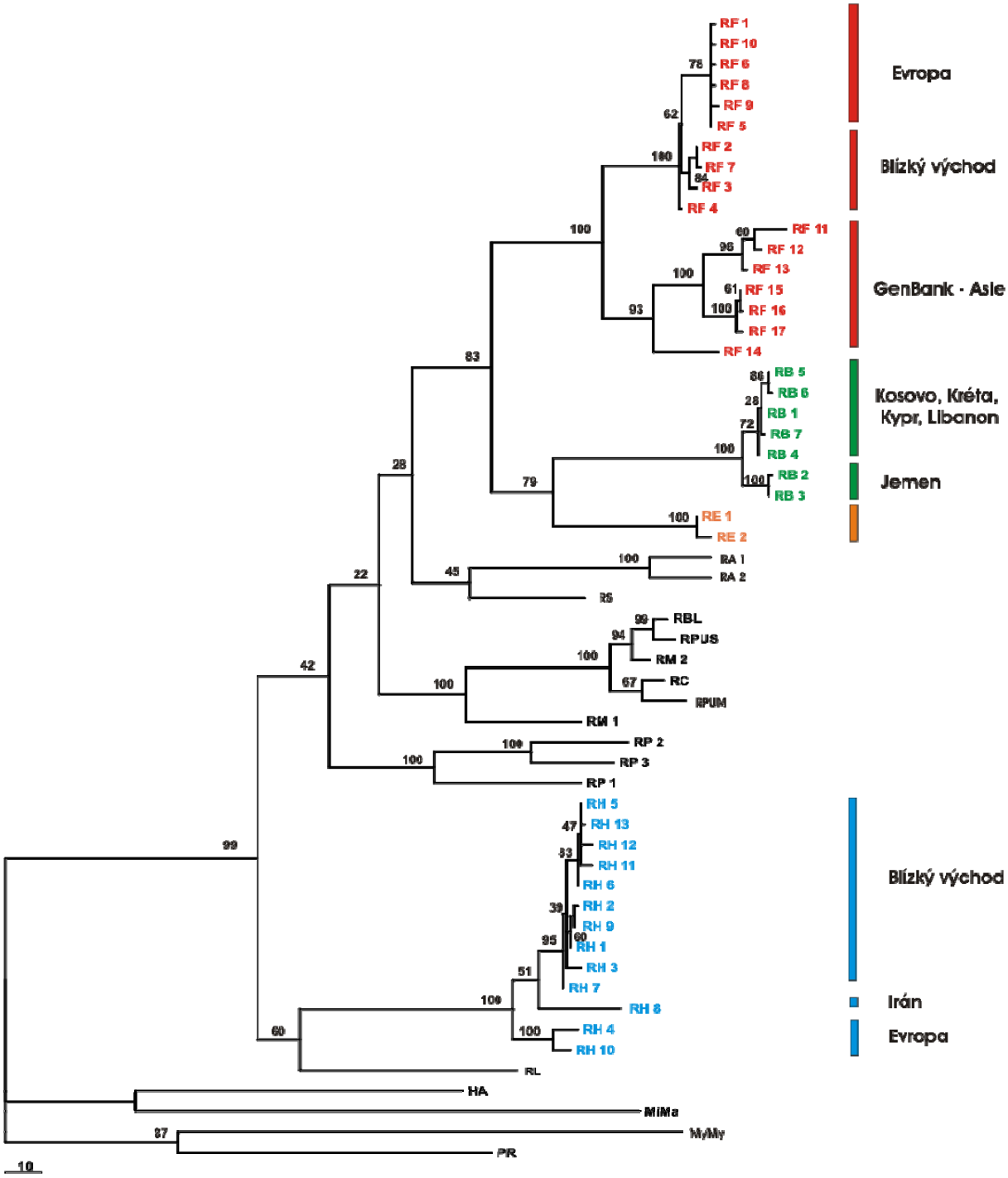
RF6	CH182	Kosovo
RF 7	CH243	Libanon
RF 8	CH142, CH223	Řecko (Kréta)
RF 9	CH131	Řecko (Kréta)
RF 10	CH246, CH247, CH248, CH249, CH250, CH251, CH252, CH260, CH261, CH262, CH263	Itálie (Sicílie)
RF 11	EF544417	Čína
RF 12	EF544414	Čína
RF 13	EF544402	Čína
RF 14	DQ297575	Čína
RF 15	DQ351847	Čína
RF 16	AB085723	Japonsko
RF 17	AB085722	Japonsko
Rhinolophus hipposideros		
RH 1	CH010, CH043, CH141	Kypr
RH 2	CH034	Kypr
RH 3	CH065, CH139, CH140, CH176, CH183, CH203, CH212	Kypr
RH 4	CH135, CH138, CH163	Řecko (Kréta)
RH 5	CH136, CH153, CH162, CH174, CH219	Libanon
RH 6	CH146	Sýrie
RH 7	CH148, CH157, CH161, CH200, CH208, CH216, CH236, CH237	Kypr
RH 8	CH156	Írán
RH 9	CH166	Kypr
RH 10	CH184, CH186, CH188, CH192, CH197, CH199, DQ297586 (GenBank)	Slovensko, Česká republika, Řecko, Velká Británie (GenBank)
RH 11	CH209, CH258	Libanon
RH 12	CH211	Libanon
RH 13	CH222, CH227	Libanon

3.1 Přehled fylogenetických analýz jednotlivými metodami

3.1.1 Maximální parsimonie (Maximum Parsimony, MP)

Na topologii fylogenetického stromu vytvořeného pomocí metody maximální parsimonie (MP), který je znázorněn na obr. 1 jsou klady jednotlivých druhů. Jsou patrné dvě bazální větve. Jedna tvoří klad druhu *Rhinolophus hipposideros* a *Rhinolophus luctus* a druhá se dále větví. Nejvíce odvozený je v této větvi klad druhů *Rhinolophus ferrumequinum*, *R. blasii* a *R.*

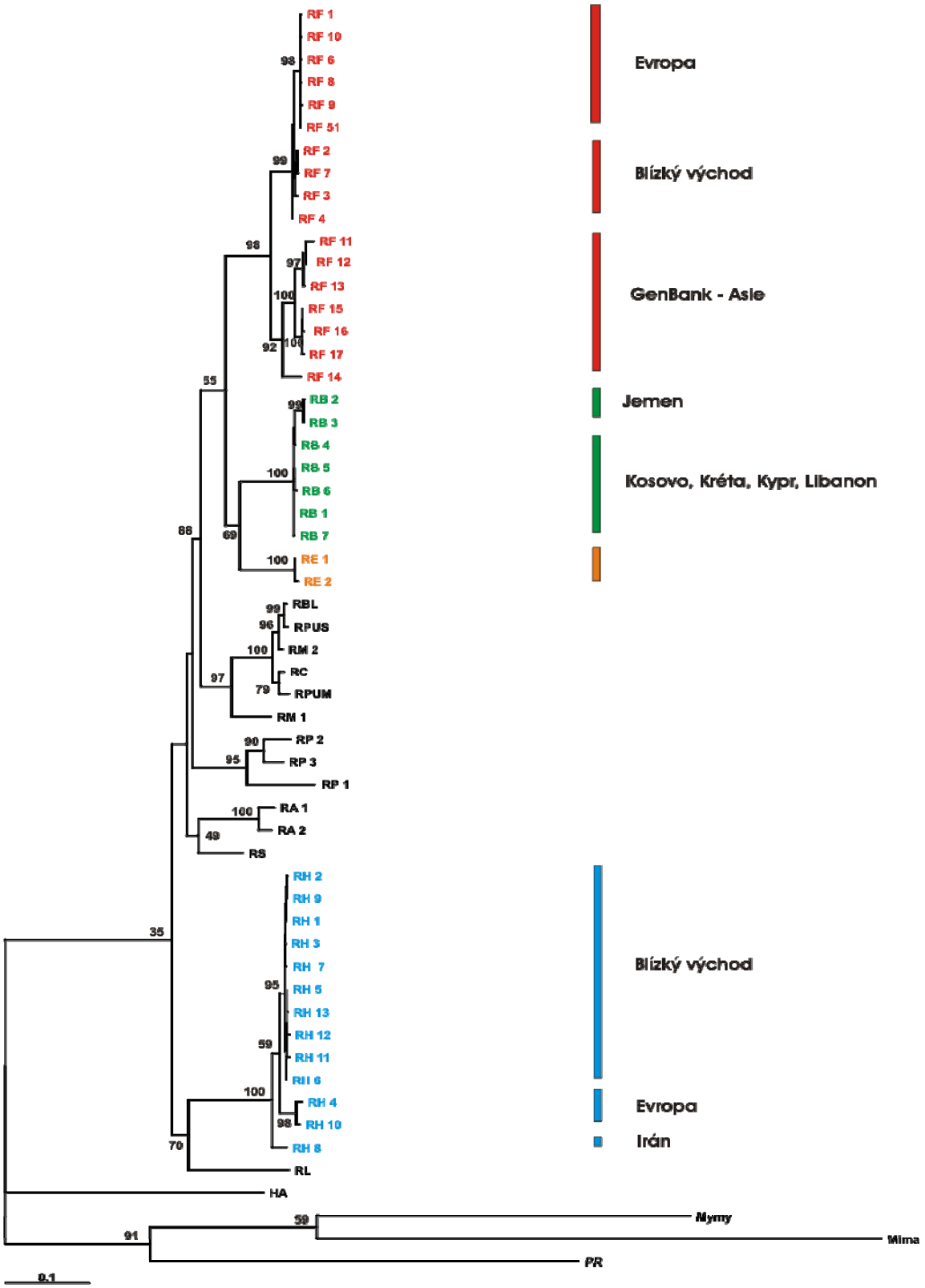
euryale, ve kterém jsou patrné dvě linie. První linie je dále členěna na další dvě skupiny. První skupinu tvoří haplotypy z Blízkého východu a druhou skupinu tvoří haplotypy evropské. Druhou linii kladu *R. ferrumequinum* tvoří haplotypy z východní Asie. Ke kladu druhu *R. ferrumequinum* je sesterský klad, který je tvořen liniemi druhu *Rhinolophus blasii* a *Rhinolophus euryale*. Linie druhu *R. blasii* je dále členěna na dvě skupiny. První skupinu tvoří haplotypy z Jemenu a druhou skupinu tvoří haplotypy z Kosova, Kréty, Kypru a Libanonu, jejichž monofyletičnost není však příliš vysoce podpořena. Ke kladům druhů *R. ferrumequinum*, *R. blasii*, *R. euryale* je sesterský klad, který je tvořený liniemi druhů *Rhinolophus armiger* a *Rhinolophus sinicus*. Ke kladům rodů *R. ferrumequinum*, *R. blasii*, *R. euryale*, *R. armiger* a *R. sinicus* je dále sesterský klad tvořený liniemi druhů *Rhinolophus blythi*, *Rhinolophus pusilus*, *Rhinolophus monoceros*, *Rhinolophus cornutus* a *Rhinolophus pumilus*. V rámci celé větve je nejvíce bazálně umístěn klad linií druhu *Rhinolophus pearsoni*. Detailní popis jednotlivých linií je uveden v parciálních analýzách pro jednotlivé druhy.



Obr. 1. Fylogenetický strom sestrojený ze sekvencí cytochromu *b* metodou MP. Čísla v uzlech znamenají hodnotu bootstrapu. CI = 0,461; RI = 0,786. (RB − *Rhinolophus blasii*, RE − *Rhinolophus euryale*, RH − *Rhinolophus hipposideros*, RA − *Rhinolophus armiger*, RBL − *Rhinolophus blythi*, RL − *Rhinolophus luctus*, RM − *Rhinolophus monoceros*, RP − *Rhinolophus pearsoni*, RPUM − *Rhinolophus pumilus*, RPUS − *Rhinolophus pusilus*, RS − *Rhinolophus sinicus*, RC − *Rhinolophus cornutus*, HA − *Hipposideros armiger*, MyMy − *Myotis mystacinus*, MiMa − *Miniopterus magnater*, PR − *Pteropus rufus*)

3.1.2 Maximální věrohodnost (Maximum likelihood, ML)

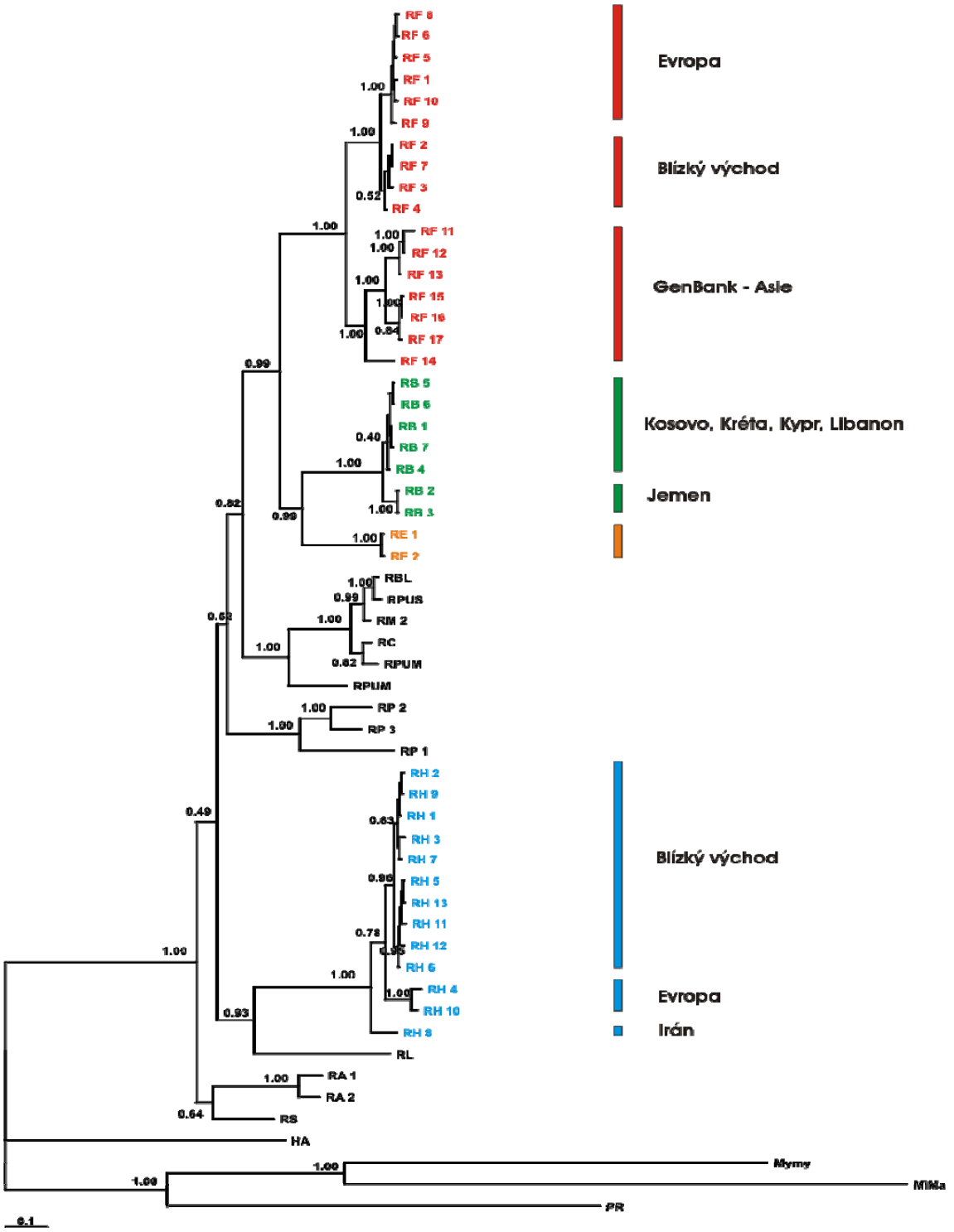
Topologie fylogenetického stromu zkonstruovaného pomocí metody maximální věrohodnosti (ML) odpovídá svojí topologií, členěním jednotlivých kladů a linií stromu tvořeného metodou MP. Fylogenetický strom je uveden na obr. 2. Kladu druhů *R. ferrumequinum*, *R. blasii*, *R. euryale* je příbuzný klad tvořený liniemi druhů *Rhinolophus blythi*, *Rhinolophus pusilus*, *Rhinolophus monoceros*, *Rhinolophus cornutus* a *Rhinolophus pumilus* a k těmto třem kladům je sesterský klad, který je tvořen liniemi druhu *Rhinolophus pumilus.* V rámci celé větve je nejvíce bazálně umístěn klad tvořený haplotypy druhů *R. armiger* a *R. sinicus.*



Obr. 2. Fylogenetický strom sestrojený ze sekvencí cytochromu *b* metodou ML. Čísla v uzlech znamenají hodnotu bootstrapu. (RB − *Rhinolophus blasii*, RE − *Rhinolophus euryale*, RH − *Rhinolophus hipposideros*, RA − *Rhinolophus armiger*, RBL − *Rhinolophus* blythi, RL − *Rhinolophus luctus*, RM − *Rhinolophus monoceros*, RP − *Rhinolophus pearsoni*, RPUM − *Rhinolophus pumilus*, RPUS − *Rhinolophus pusilus*, RS − *Rhinolophus sinicus*, RC − *Rhinolophus cornutus*, HA − *Hipposideros armiger*, MyMy − *Myotis mystacinus*, MiMa − *Miniopterus magnater*, PR − *Pteropus rufus*)

3.1.3 Bayesovská analýza (Bayesan analyses, BA)

Další metodou využitou pro tvorbu fylogenetických stromů použitých v předkládané práci je metoda Bayesovské analýzy (BA). Fylogenetický strom vytvořený pomocí této metody je znázorněn na obr. 3. Stejně jako u předchozího fylogenetického stromu, i topologie stromu BA odpovídá výše popsané topologii fylogenetického stromu konstruovaného metodou MP. Rozdíl je pouze v umístění kladu tvořeného liniemi druhu *Rhinolophus armiger* a *Rhinolophus sinicus*, který je zde uveden bazálně od všech druhů rodu *Rhinolophus*, jejichž haplotypy byly zahrnuty do analýzy.



Obr. 3. Fylogenetický strom sestrojený ze sekvencí cytochromu *b* metodou BA. Strom byl proveden pro 6 x 10^6 generací. Čísla v uzlech udávají hodnotu posteriorních pravděpodobností (posterior probabilities). (RB − *Rhinolophus blasii*, RE − *Rhinolophus euryale*, RH − *Rhinolophus hipposideros*, RA − *Rhinolophus armiger*, RBL − *Rhinolophus blythi*, RL − *Rhinolophus luctus*, RM − *Rhinolophus monoceros*, RP − *Rhinolophus pearsoni*, RPUM − *Rhinolophus pumilus*, RPUS − *Rhinolophus pusilus*, RS − *Rhinolophus sinicus*, RC − *Rhinolophus cornutus*, HA − *Hipposideros armiger*, MyMy − *Myotis mystacinus*, MiMa − *Miniopterus magnater*, PR − *Pteropus rufus*)

3.1.4 Distanční metody

3.1.4.1 Neighbor-joining (NJ)

První distanční metodou, která byla použita, je metoda neighbor-joining (obr. 4). Stejně jako u předchozích stomů (MP, ML, BA) i zde je zachována základní topologie jednotlivých kladů sledovaných druhů). Topologie je identická s popsanou topologií fylogenetického stromu zkonstruovaného metodou MP. Zobrazený strom je počítán bez modelu. Stromy s nejlepším modelem a K2P mají stejnou topologii větví, proto nejsou zobrazeny.

3.1.4.2 Fitsch-Margoliash

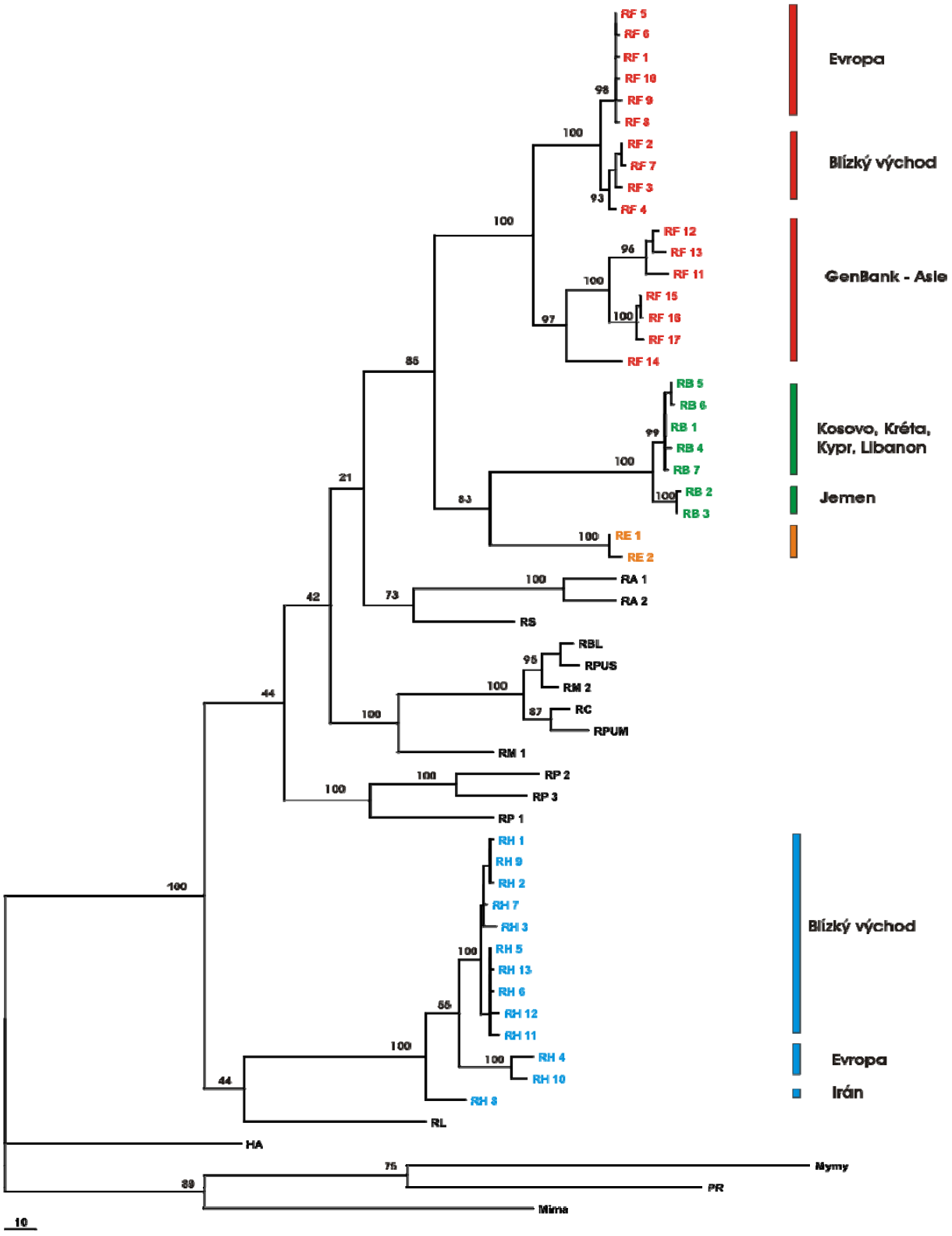
Jako druhá z distančních metod byla použita metoda Fitsch-Margoliash.

3.1.4.2.1 MLdist

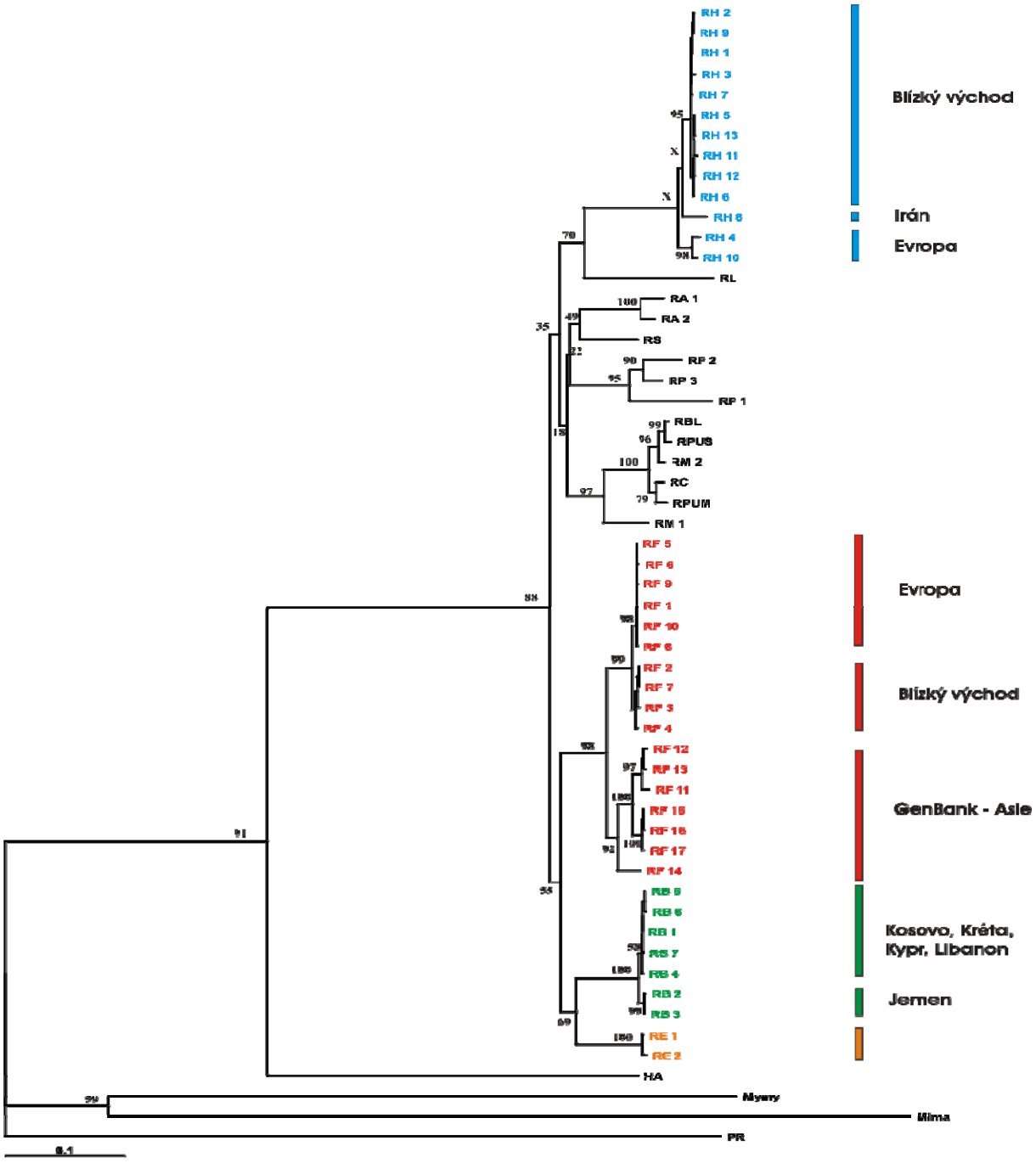
Topologie fylogenetického stromu počítaného z ML distancí (obr. 5) se liší v umístění východoasijských druhů, které jsou zde sesterské ke kladu *R. hipposideros* a *R. luctus*, zatímco v ostatních stromech tvoří monofylum s klady druhů *R. ferrumequinum*, *R. blasii* a *R. euryale*. Statistická podpora je ale nízká. Hlavní klady jsou ale zachovány, tak jako u předchozích fylogenetických stromů, jen je odlišná topologie.

3.1.4.2.2 LDdist

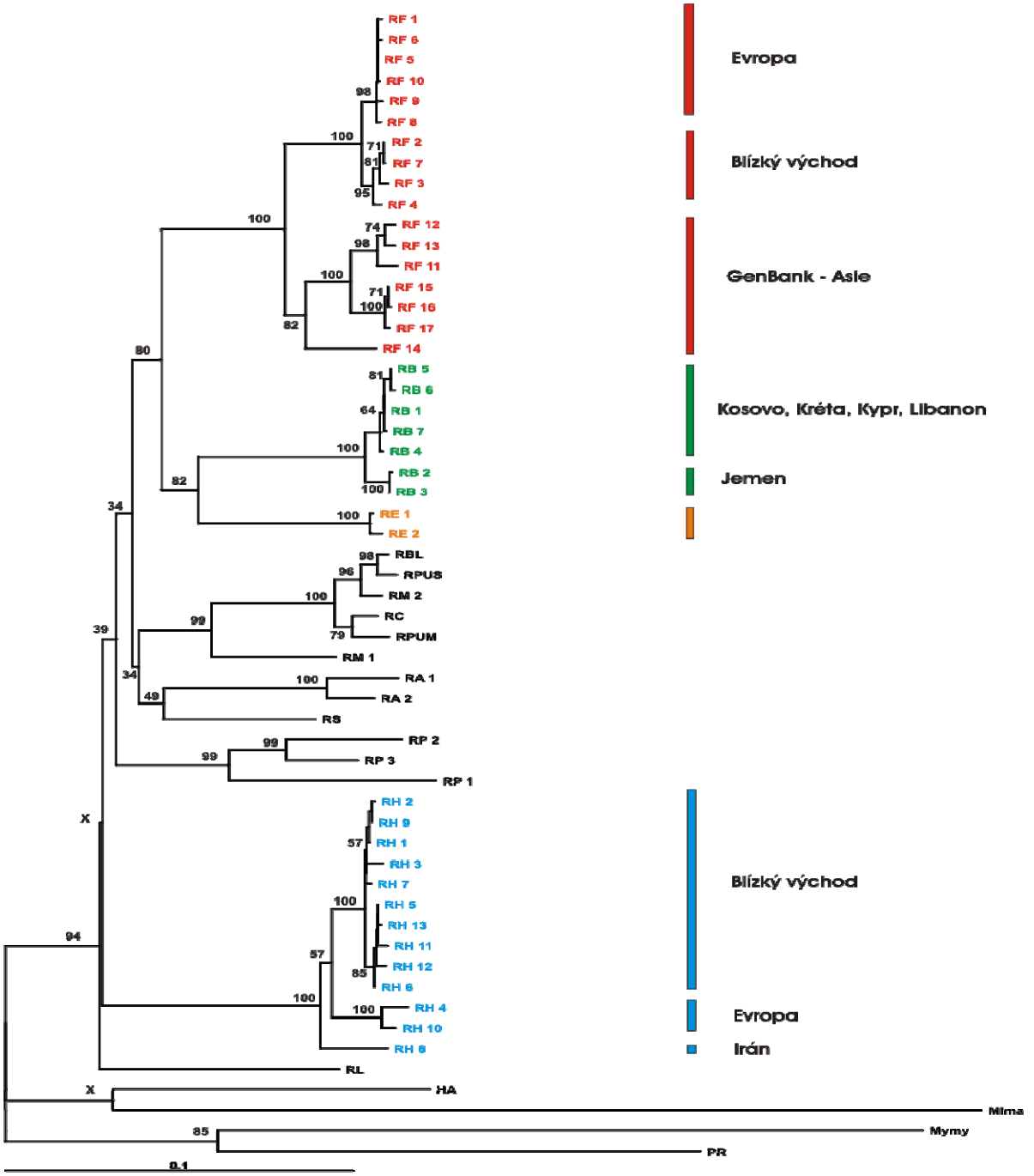
Fylogenetický strom zkonstrovaný metodou Fitsch-Margoliash s logdet distancemi (obr. 6) má také stejné bazální členěnění jednotlivých kladů všech druhů, jako je tomu u fylogenetického stromu tvořeného metodou MP. Rozdíl je v umístění linie druhu *Rhinolophus armiger* a *R. sinicus.* Tato linie je zde umístěna jako sesterská k liniím druhů *Rhinolophus blythi*, *Rhinolophus pusillus*, *Rhinolophus monoceros*, *Rhinolophus cornutus* a *Rhinolophus pumilus.* Dále je zde patrný rozdíl v umístění linie druhu *R. luctus*, která je zde sesterská ke všem ostatním druhům rodu Rhinolophus, je zde však velmi nízká statistická podpora.



Obr. 4. Fylogenetický strom sestrojený ze sekvencí cytochromu *b* metodou NJ. Čísla v uzlech uvádějí hodnotu bootstrapu. (RB − *Rhinolophus blasii*, RE − *Rhinolophus euryale*, RH − *Rhinolophus hipposideros*, RA − *Rhinolophus armiger*, RBL − *Rhinolophus blythi*, RL − *Rhinolophus luctus*, RM − *Rhinolophus monoceros*, RP − *Rhinolophus pearsoni*, RPUM − *Rhinolophus pumilus*, RPUS − *Rhinolophus pusilus*, RS − *Rhinolophus sinicus*, RC − *Rhinolophus cornutus*, HA − *Hipposideros armiger*, MyMy − *Myotis mystacinus*, MiMa − *Miniopterus magnater*, PR − *Pteropus rufus*)



Obr. 5. Fylogenetický strom sestrojený ze sekvencí cytochromu *b* metodou Fitch-Margoliash s MLdistancemi. Čísla v uzlech znamenají hodnotu bootstrapu. (RB − *Rhinolophus blasii*, RE − *Rhinolophus euryale*, RH − *Rhinolophus hipposideros*, RA − *Rhinolophus armiger*, RBL − *Rhinolophus blythi*, RL − *Rhinolophus luctus*, RM − *Rhinolophus monoceros*, RP − *Rhinolophus pearsoni*, RPUM − *Rhinolophus pumilus*, RPUS − *Rhinolophus pusilus*, RS − *Rhinolophus sinicus*, RC − *Rhinolophus cornutus*, HA − *Hipposideros armiger*, MyMy − *Myotis mystacinus*, MiMa − *Miniopterus magnater*, PR − *Pteropus rufus*)



Obr. 6. Fylogenetický strom sestrojený ze sekvencí cytochromu *b* metodou Fitsch-Margoliash s LD distancemi. Čísla v uzlech znamenají hodnotu bootstrapu. Symbol „x“ znázorňuje velmi nízkou hodnotu bootstrapu. (RB − *Rhinolophus blasii*, RE − *Rhinolophus euryale*, RH − *Rhinolophus hipposideros*, RA − *Rhinolophus armiger*, RBL − *Rhinolophus blythi*, RL − *Rhinolophus luctus*, RM − *Rhinolophus monoceros*, RP − *Rhinolophus pearsoni*, RPUM − *Rhinolophus pumilus*, RPUS − *Rhinolophus pusilus*, RS − *Rhinolophus sinicus*, RC − *Rhinolophus cornutus*, HA − *Hipposideros armiger*, MyMy − *Myotis mystacinus*, MiMa − *Miniopterus magnater*, PR − *Pteropus rufus*)

3.2 Rozdíly mezi jednotlivými liniemi

Tab. 7. Hodnoty rozdílů(K2P) mezi jednotlivými liniemi, vyjádřené v % pro gen pro cytochrom *b* (1128 bp).
(RB − *Rhinolophus blasii*, RE − *Rhinolophus euryale*, RH − *Rhinolophus hipposideros*, RA − *Rhinolophus armiger*, RBL − *Rhinolophus blythi*, RL − *Rhinolophus luctus*, RM − *Rhinolophus monoceros*, RP − *Rhinolophus pearsoni*, RPUM − *Rhinolophus pumilus*, RPUS − *Rhinolophus pusilus*, RS − *Rhinolophus sinicus*, RC − *Rhinolophus cornutus*, HA − *Hipposideros armiger*, MyMy − *Myotis mystacinus*, MiMa − *Miniopterus magnater*, PR − *Pteropus rufus*)

		1	2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	**RF**													
2	**RB**	10,3–11,8												
3	**RE**	9,9–10,9	8,9–10,0											
4	**RA**	11,4–13	12.6–13,9	11,9–13,3										
5	**RBL, RPUS, RM, RC, RPUM**	10,4–13,7	10,2–12,8	11,3–12,6	11,5–12,8									
6	**RP**	12,0–14.5	11,4–15,5	11,8–15,1	12,1–13,9	11,7–14,5								
7	**RH**	12,7–14,1	12,8–13,7	12,8–14,0	12,5–14,4	12,3–14,6	12,3–14,9							
8	**HA**	18,1–20,0	17,8–18,3	17,5–18	18,1–18,9	19,0–19,6	18,8–20,6	18,6–19,2						
9	**MiMa**	26,5–28,7	25,4–25,8	25,0–25,7	26,5–26,6	23,8–25,2	25,1–26,7	26,2–27,4	24,1					
10	**MyMy**	24,7–26,0	26,9–27,9	26,4–27,2	25,6–27,2	25,3–26,3	27,3–26,0	25,1–25,5	26,9	29,8				
11	**PR**	22,1–23,5	22,3–22,9	22,0–22,4	22,4–22,6	21,8–23,4	22,1–23,2	23,1–23,5	22,9	26,5	23,6			
12	**RS**	10,4–12,0	10,2–10,6	10,3	9,4	10,0–10,4	11,0–12,0	12,3–13,1	16,3	25,1	26,1	21,7		
13	**RL**	12,7–13,8	12,4–13,2	12,3–12,8	13,8–14,2	12,0–14,5	12,8–14,5	12,5–13,1	19,1	24,9	24,7	22,7	11,1	

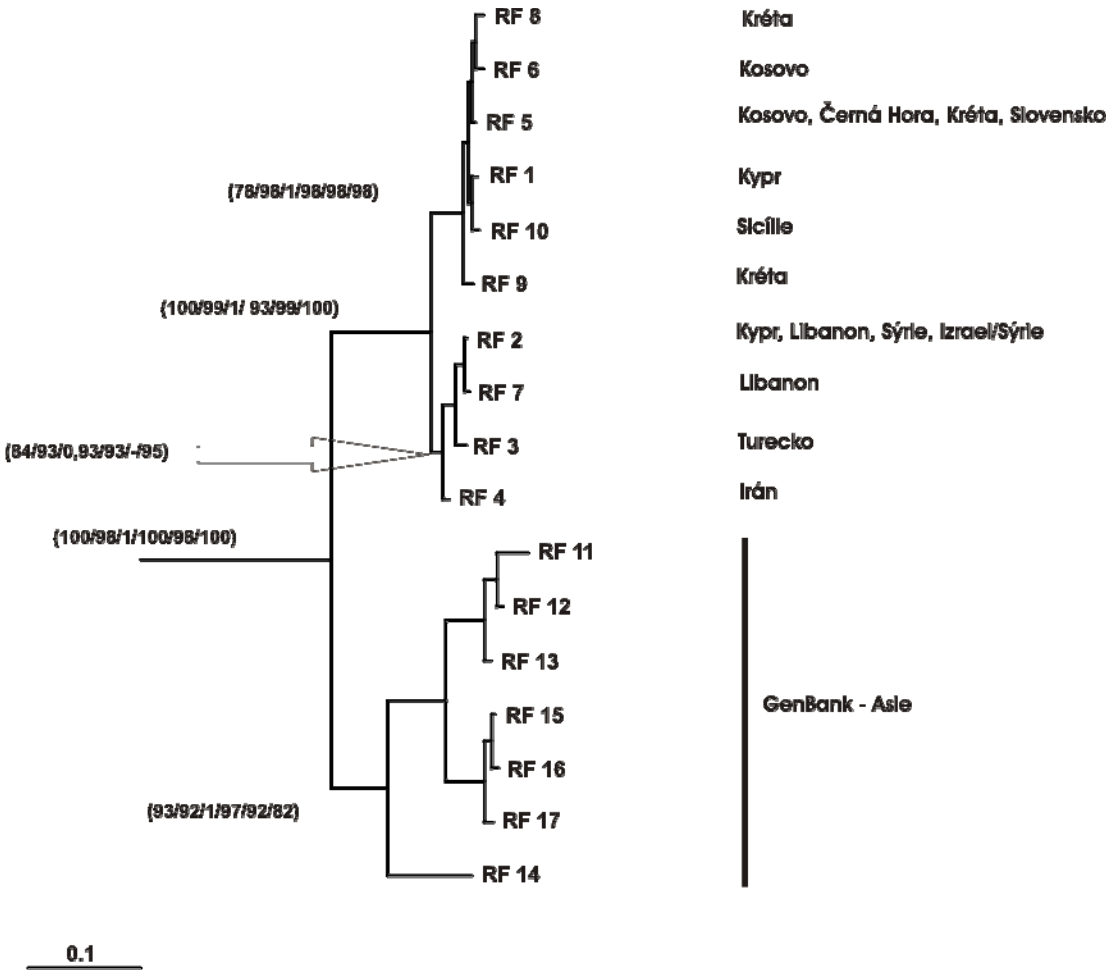
3.3 Parciální analýzy jednotlivých druhů

3.3.1 Rhinolophus ferrumequinum

Do fylogenetických analýz bylo zahrnuto celkem 54 sekvencí, které reprezentují 10 haplotypů. K tomuto souboru sekvencí byly přidány sekvence převzaté z internetové databáze, těch bylo celkem 7 a dohromady reprezentují 7 haplotypů. Celkem tedy bylo u druhu *R. ferrumequinum* do fylogenetických analýz zahrnuto 61 sekvencí, reprezentujících 17 haplotypů. Úseky mtDNA sekvencí cytochromu *b* jsou o délce 1128 bp. Lokality haplotypů, včetně čísel vzorků jsou souhrně uvedeny v tabulce 6.

Jednotlivé topologie stromů, které byly zkonstruovány pomocí metod MP, ML, BA, NJ, MLdist, LDdist jsou si velmi podobné. Hodnoty boostrapu jednotlivých analýz jsou uvedeny v závorkách (ve stejném pořadí jako zkratky fylogenetických analýz v předešlé větě). Celý klad druhu *Rhinolophus ferrumequinum* (100/98/1/100/98/100) obsahuje bazální větvení, které vedlo k rozlišení na tři odlišné linie. První je evropská linie (78/98/1/98/98/98), která je tvořena velmi podobnými haplotypy. Zahrnuje haplotypy z Kosova (RF 5, RF 6), Černé Hory (RF 5), Sicílie (RF 10), Kréty (RF 5, RF 8, RF 9), Kypru (RF 1) a Slovenska (RF 5). Druhá, blízkovýchodní linie (84/93/0,93/93/–/95) má větší vzdálenosti mezi haplotypy a zahrnuje haplotypy z Turecka (RF 3), Kypru (RF 2), Sýrie (RF 2), z Golanských výšin na hranici Izraele a Sýrie (RF 2), dále pak haplotypy z Libanonu (RF 7) a Íránu (RF 4). Obě tyto linie jsou si sesterské (100/99/1/99/100). Třetí zřetelná linie (93/92/1/97/92/82) je tvořena haplotypy sekvencí pocházejích z internetové databáze, přesné lokality nejsou uvedeny, ale jedná se vždy o sekvence pocházející z jedinců z oblasti východní Asie. Na Kypru byly zjištěny dvě zmíněné linie (evropská, RF 1 a blízkovýchodní, RF 2).

Haplotypy patřící k evropské linii jsou si navzájem velmi podobné (nekorigovaná *p* distance se pohybuje v rozmezí 0,1−0,3 %). To samé lze říci i o linii blízkovýchodní, kde se hodnota nekorigované *p* distance pohybuje v rozmezí 0,1−0,6 %. Rozdíl mezi evropskou a blízkovýchodní linií se pohybuje v rozmezí 0,9−1,3%. Třetí linie se vyznačuje větší variabilitou (nekorigovaná *p* distance v rámci linie 0,1−4,2 %). Podrobný přehled všech hodnot nekorigovaných *p* distancí a počet substitucí mezi jednotlivými haplotypy je uveden v tab. 8.



Obr. 7. Výsek fylogenetického stromu (BA) pro druh *Rhinolophus ferrumequinum* se znázorněním podpory jednotlivých uzlů. Hodnoty podpory jsou uvedeny v závorkách (MP, ML, BA, NJ, MLdist, LDdist).

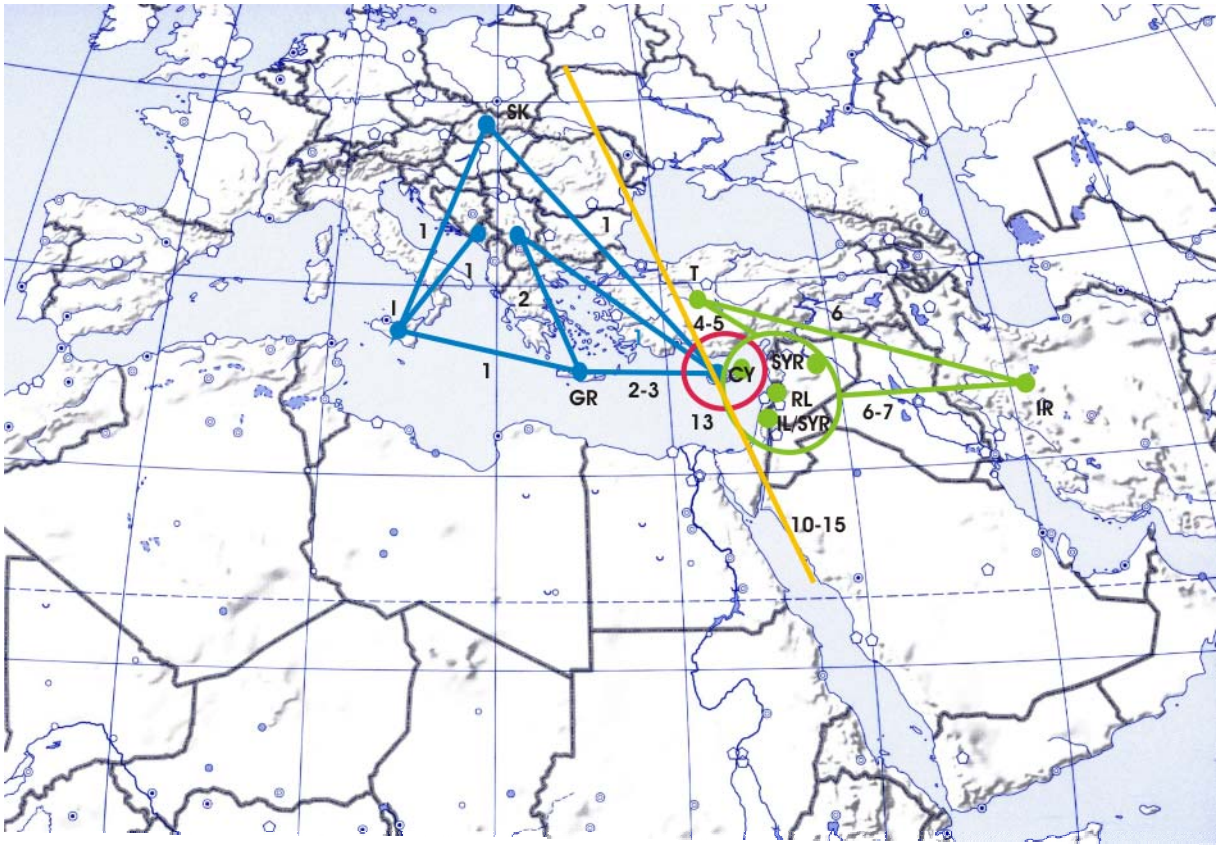
Na obr. 8 je přehled zemí, v nichž leží lokality zastoupených haplotypů. Nejsou zde již uvedeny haplotypy sekvencí z internetové databáze, které sloužily pro porovnání při konstrukci fylogenetických stromů. Numerické hodnoty uvedené mezi jednotlivými haplotypy znazorňují počet vzájemných substitucí. Jak již bylo uvedeno v předchozích analýzách, jsou zde patrné 2 linie. Počet substitucí mezi evropskou a blízkovýchodní linií se pohybuje v rozmezí 10–15. Malé množství substitucí uvnitř jednotlivých liní ukazuje na vzájemnou podobnost zastoupených haplotypů. Počty substitucí jsou uvedeny v tabulce 8.

Tab. 8. Zjištěné vzdálenosti mezi jednotlivými haplotypy *R. ferrumequinum.* Dolní matice udává hodnoty nekorigované *p* distance, horní matice počty substitucí mezi haplotypy.

	RF 1	RF 2	RF 3	RF 4	RF 5	RF 9	RF 8	RF 6	RF 7	RF 10	RF 11	RF 12	RF 13	RF 14	RF 15	RF 16	RF 17
RF 1		13	13	11	1	3	2	2	12	2	61	64	62	57	59	58	58
RF 2	0,012		4	6	12	14	13	13	1	13	56	61	59	58	60	59	57
RF 3	0,012	0,004		6	12	14	13	13	5	13	58	63	61	58	62	61	59
RF 4	0,010	0,005	0,005		10	12	11	11	7	11	54	59	57	54	58	57	57
RF 5	0,001	0,011	0,011	0,009		2	1	1	11	1	60	63	61	56	58	57	57
RF 9	0,003	0,012	0,012	0,011	0,002		3	3	13	3	60	63	61	58	60	59	59
RF 8	0,002	0,012	0,012	0,010	0,001	0,003		2	12	2	59	62	60	55	57	56	56
RF 6	0,002	0,012	0,012	0,010	0,001	0,003	0,002		12	2	61	64	62	57	59	58	58
RF 7	0,011	0,001	0,004	0,006	0,010	0,012	0,011	0,011		12	57	62	60	59	61	60	58
RF 10	0,002	0,012	0,012	0,010	0,001	0,003	0,002	0,002	0,011		61	64	62	57	59	58	58
RF 11	0,054	0,050	0,051	0,048	0,053	0,053	0,052	0,054	0,051	0,054		11	13	46	29	30	30
RF 12	0,057	0,054	0,056	0,052	0,056	0,056	0,055	0,057	0,055	0,057	0,010		6	47	24	25	25
RF 13	0,055	0,052	0,054	0,051	0,054	0,054	0,053	0,055	0,053	0,055	0,012	0,005		43	22	23	23
RF 14	0,051	0,051	0,051	0,048	0,050	0,051	0,049	0,051	0,052	0,051	0,041	0,042	0,038		42	43	43
RF 15	0,052	0,053	0,055	0,051	0,051	0,053	0,051	0,052	0,054	0,052	0,026	0,021	0,020	0,037		1	3
RF 16	0,051	0,052	0,054	0,051	0,051	0,052	0,050	0,051	0,053	0,051	0,027	0,022	0,020	0,038	0,001		4
RF 17	0,051	0,051	0,052	0,051	0,051	0,052	0,050	0,051	0,051	0,051	0,027	0,022	0,020	0,038	0,003	0,004	

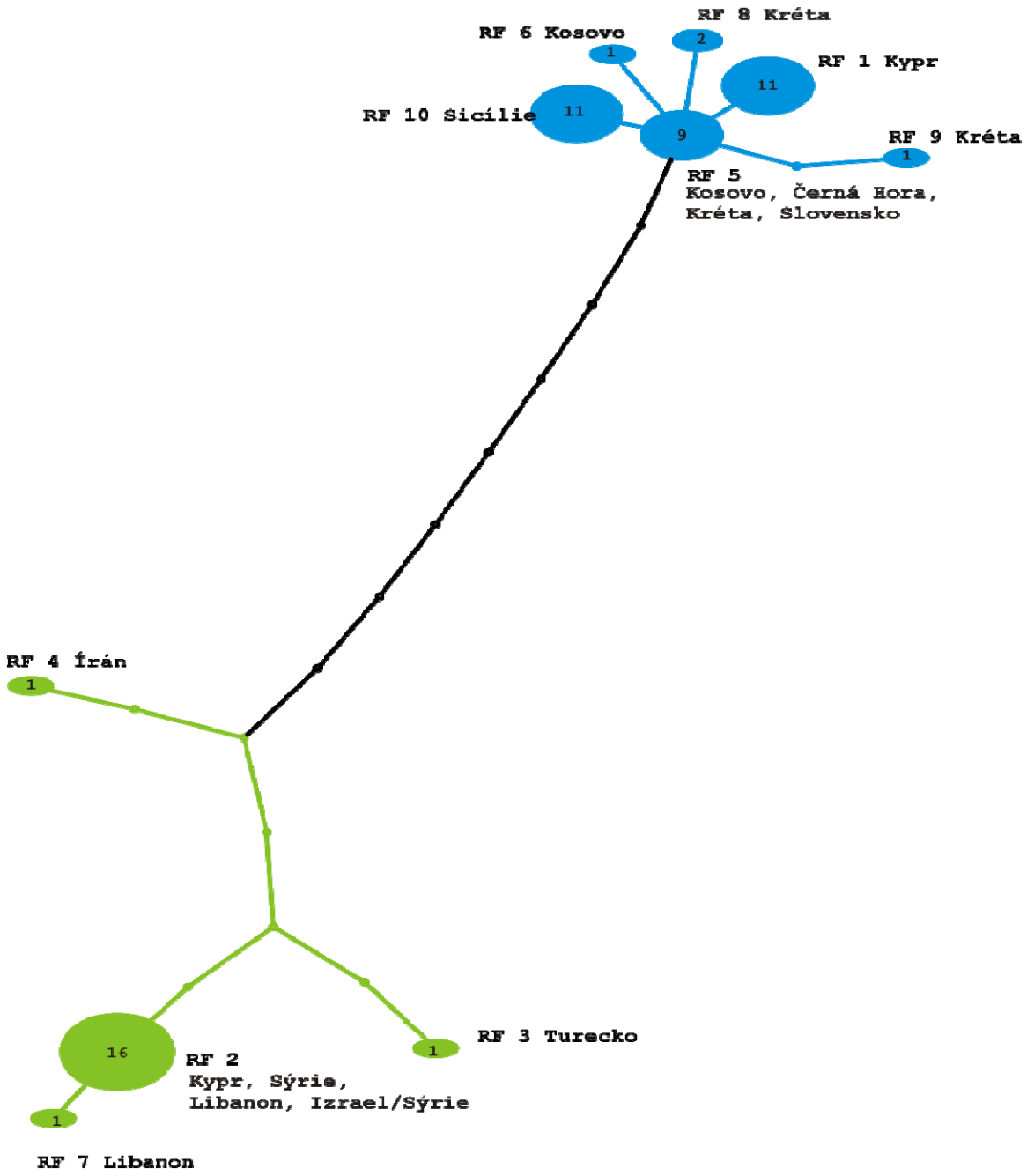
Tab. 9. Přehled jednotlivých zemí s výčtem haplotypů druhu *Rhinolopus ferrumequinum* v nich zastoupených.

Region		**Haplotypy**
Slovensko	SK	RF 5
Itálie (Sicílie)	I	RF 10
Černá Hora	MNE	RF5
Kosovo	K	RF 5, RF 6
Řecko (Kréta)	GR	RF 5, RF 8, RF 9
Kypr	CY	RF 1, RF 2
Írán	IR	RF 4
Sýrie	SYR	RF 2
Izrael/Sýrie	IL/SYR	RF 2
Libanon	L	RF 2, RF 7
Turecko	T	RF 3



Obr. 8. Znázornění geografické distribuce mtDNA haplotypů vrápenců velkých, *Rhinolophus ferrumequinum*, ve střední a východní Evropě, východním Středomoří a na Blízkém východě

Pomocí programu TCS byla vytvořena síť haplotypů, která je uvedena na obr. 9. I zde je patrné rozdělení na dvě linie. Jednotlivé úseky, ohraničené uzly, znázorňují rovněž počet substitucí mezi jednotlivými haplotypy.



Obr. 9. Grafické znázornění rozdílů mezi haplotypy druhu *Rhinolophus ferrumequinum* pomocí programu TCS. Jednotlivé úseky mezi uzly vyjadřují počty substitucí mezi haplotypy. Velikost oválů vyjadřuje množství vzorků, které reprezentují jednotlivé haplotypy a číslo v nich udává počet vzorků dotyčného haplotypu.

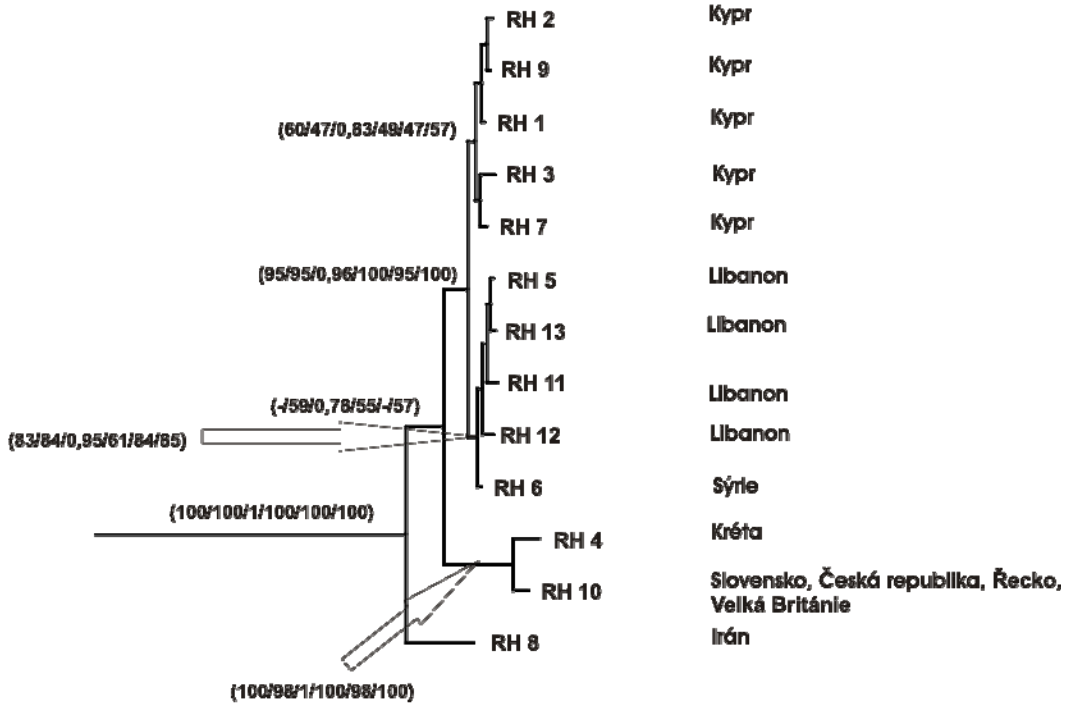
3.3.2 *Rhinolophus hipposideros*

Do fylogenetických analýz bylo zahrnuto celkem 42 sekvencí, které reprezentují 13 haplotypů. Úseky mtDNA sekvencí cytochromu *b* jsou o délce 1128 bp. Lokality haplotypů, včetně čísel vzorků jsou uvedeny v tabulce 6.

Jednotlivé topologie stromů, které byly zkonstruovány pomocí metod MP, ML, BA, NJ, MLdist, LDdist si jsou navzájem velmi podobné. Hodnoty boostrapu jednotlivých analýz jsou uvedeny v závorkách (ve stejném pořadí jako zkratky fylogenetckých analýz v předešlé větě). Celkový klad druhu *Rhinolophus hipposideros* (100/100/1/100/100/100) je členěn na 3 linie (evropská, blízkovýchodní a íránská). Evropská linie (100/98/1/100/98/100) zahrnuje haplotypy z Řecka a to jak z pevniny (RH 10), tak z Kréty (RH 4), dále jsou zde haplotypy z České republiky (RH 10), Slovenska (RH 10) a Velké Británie (RH 10, z GenBanku). Linie blízkovýchodní (95/95/0,96/100/95/100) obsahuje haplotypy z Libanonu (RH 5), Sýrie (RH 6) a z Kypru (RH 1, RH 2, RH 7). Poslední je íránská linie, která je zastoupená pouze haplotypem jednoho exempláře z Íránu (RH 8). Oproti ostatním dvěma liniím je postavena bazálněji.

Haplotypy, které tvoří blízkovýchodní linii jsou si velmi podobné, nekorigovaná *p* distance se pohybuje v rozmezí 0,1−0,8 %. Hlubší divergence je patrná u linie evropské, kde je hodnota nekorigované *p* distance mezi oběma zjištěnými haplotypy 1,1 %. Rozdíl mezi blízkovýchodní a evropskou liní se pohybuje v rozmezí 2,6−3,2 % a rozdíl mezi těmito dvěma liniemi a linií íránskou je 2,7−4,4 %. Podrobný přehled všech hodnot nekorigovaných *p* distancí a počet substitucí mezi jednotlivými haplotypy je uveden v tabulce 10.

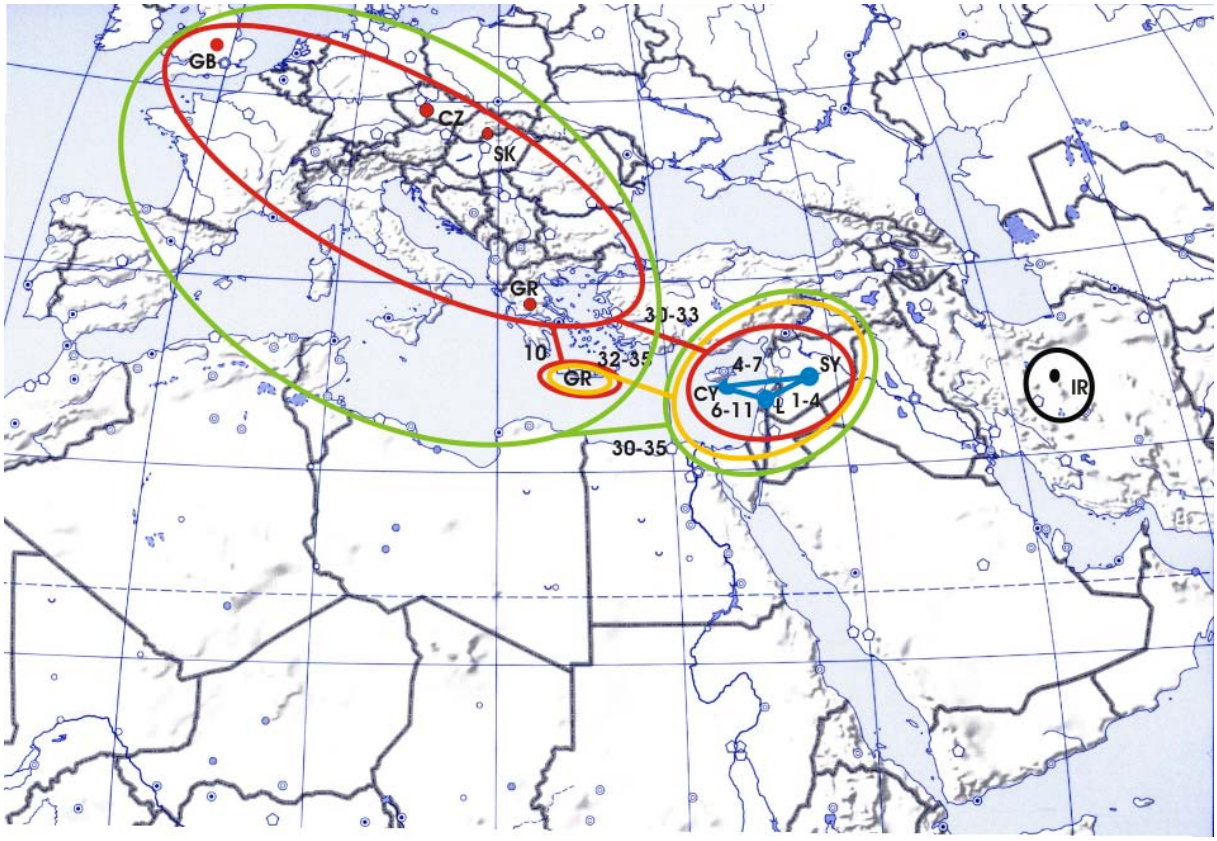
Přehled zemí, v nichž se lokality jednotlivých haplotypů nacházejí je uveden na obr. 11. Jak vyplývá z předchozích výsledků, jsou zde patrné tři linie. Počty substitucí uvnitř jednotlivých linií (evropská a blízkovýchodní) ukazují na nízkou haplotypovou variabilitu sledovaných populací, zatímco počty substitucí mezi liniemi v rámci celku ukazují na vzájemné odlišení. Nejvíce vzdálená je íránská linie, ta je ale zastoupena pouze jedním haplotypem, který reprezentuje pouze jeden vzorek. Počet substitucí mezi jednotlivými haplotypy je uveden v tabulce 10.



Obr. 10. Výsek fylogenetického stromu (BA) pro druh *Rhinolophus hipposideros* se znázorněním podpory jednotlivých uzlů. Hodnoty podpory jsou uvedeny v závorkách (MP, ML, BA, NJ, MLdist, LDdist).

Tab. 10. Zjištěné vzdálenosti mezi jednotlivými haplotypy *R. hipposideros.* Dolní matice udává hodnoty nekorigované *p* distance, horní matice počty substitucí mezi haplotypy.

	RH 1	RH 2	RH 3	RH 4	RH 5	RH 6	RH 7	RH 8	RH 9	RH 10	RH 11	RH 12	RH 13
RH 1		2	5	32	5	4	2	32	1	30	8	7	6
RH 2	0,002		7	34	7	6	4	34	1	30	8	9	8
RH 3	0,004	0,006		35	8	7	5	33	6	33	11	10	9
RH 4	0,028	0,030	0,031		34	33	32	48	33	12	35	35	35
RH 5	0,004	0,006	0,007	0,030		1	5	34	6	32	3	3	1
RH 6	0,004	0,005	0,006	0,029	0,001		4	33	5	31	4	4	2
RH 7	0,002	0,004	0,004	0,028	0,004	0,004		30	3	30	8	7	6
RH 8	0,028	0,030	0,029	0,043	0,030	0,029	0,027		33	46	35	35	35
RH 9	0,001	0,001	0,005	0,029	0,005	0,004	0,003	0,029		29	7	8	7
RH 10	0,027	0,027	0,029	0,011	0,028	0,027	0,027	0,041	0,026		31	33	33
RH 11	0,007	0,007	0,010	0,031	0,003	0,004	0,007	0,031	0,006	0,027		6	4
RH 12	0,006	0,008	0,009	0,031	0,003	0,004	0,006	0,031	0,007	0,029	0,005		4
RH 13	0,005	0,007	0,008	0,031	0,001	0,002	0,005	0,031	0,006	0,029	0,004	0,004	

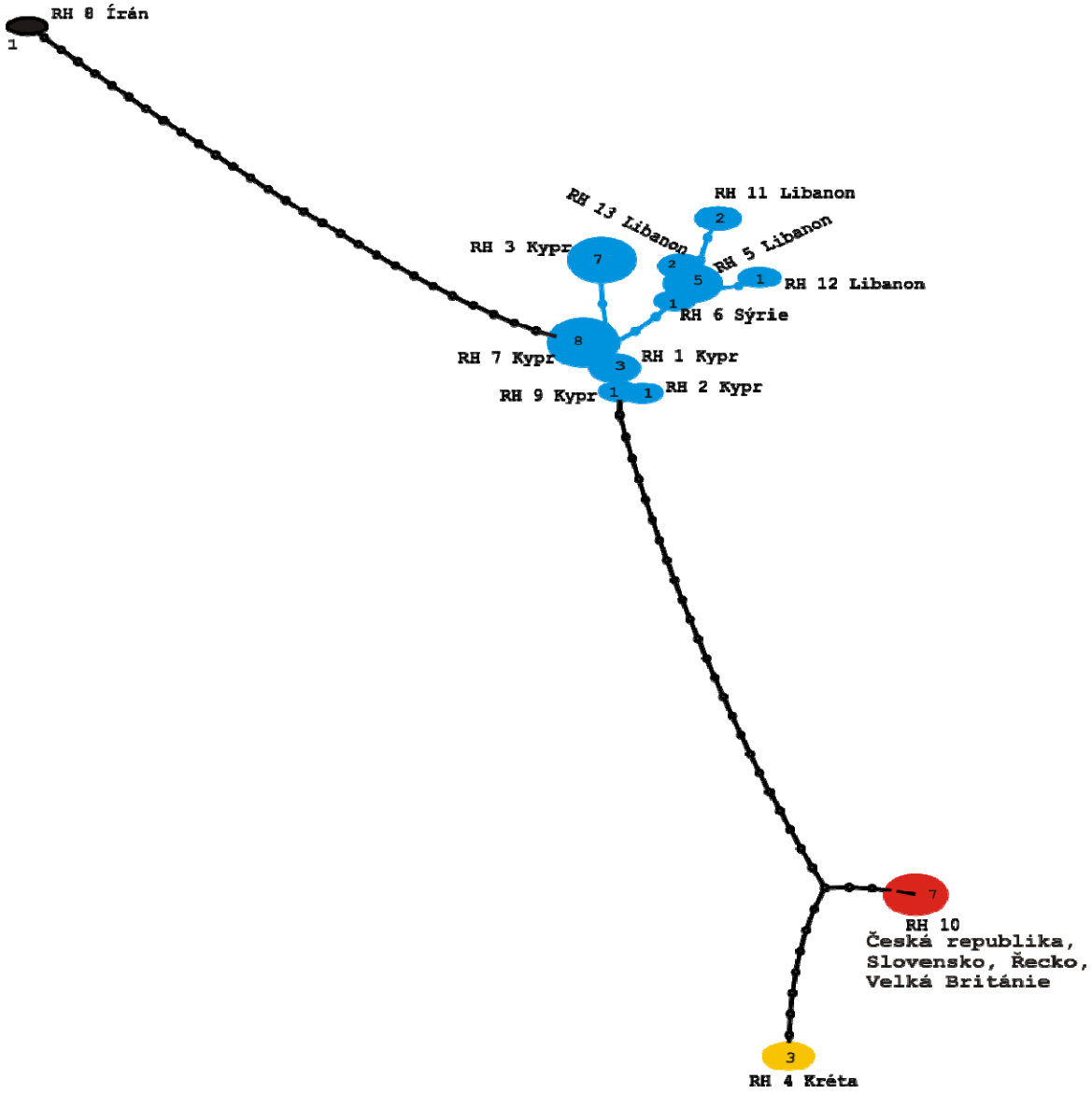


Obr. 11. Znázornění geografické distribuce mtDNA haplotypů vrápenců malých, *Rhinolophus hipposideros*, v Evropě, východním Středomoří a Blízkém východě

Tab. 11. Přehled jednotlivých zemí s výčtem haplotypů druhu *Rhinolopus hipposideros* v nich zastoupených.

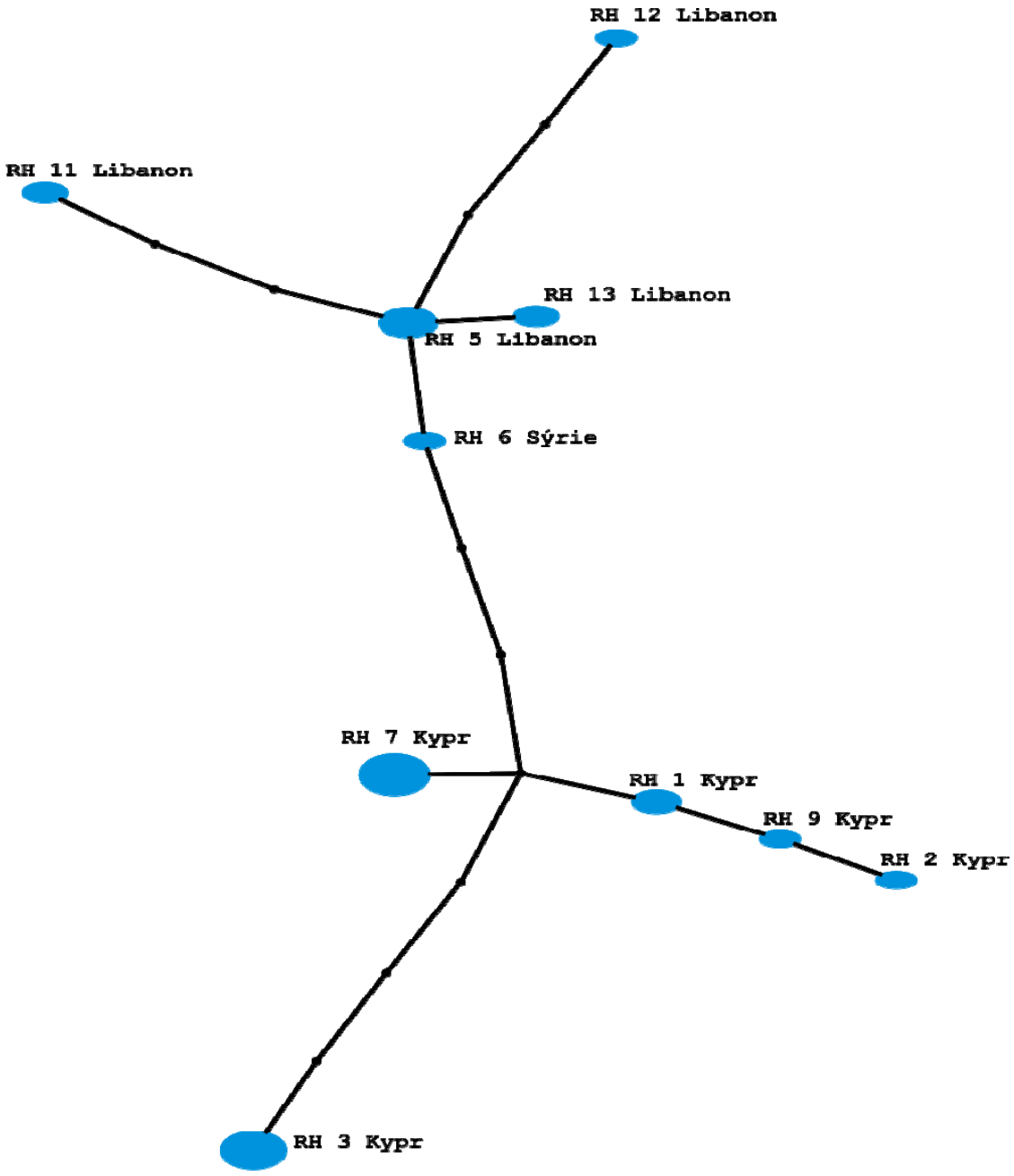
Region		Haplotypy
Česká republika	**CZ**	**RH 10**
Slovensko	**SK**	**RH 10**
Řecko (pevnina)	**GR**	**RH 10**
Velká Británie	**GB**	**RH 10**
Řecko (Kréta)	**GR**	**RH 4**
Sýrie	**SYR**	**RH 6**
Írán	**IR**	**RH 8**
Kypr	**CY**	**RH 1, RH 2, RH 3, RH7, RH 9**
Libanon	**L**	**RH 5, RH 11, RH 12, RH 13**

Pomocí programu TCS byla vytvořena síť haplotypů, která je uvedena na obrázku 12. I zde je patrné rozdělení na tři linie. Jednotlivé uzly, znázorňují počet substitucí mezi jednotlivými haplotypy.



Obr. 12. Grafické znázornění rozdílů mezi haplotypy druhu *Rhinolophus hipposideros* pomocí programu TCS. Jednotlivé uzly vyjadřují počty substitucí mezi haplotypy. Velikost oválů vyjadřuje počet vzorků, které reprezentují jednotlivé haplotypy a číslo v nich udává jejich počet.

Pro přehlednější znázornění je na obrázku 13 zobrazen výsledek separátní analýzy jen pro blízkovýchodní linii druhu *Rhinolophus hipposideros*.

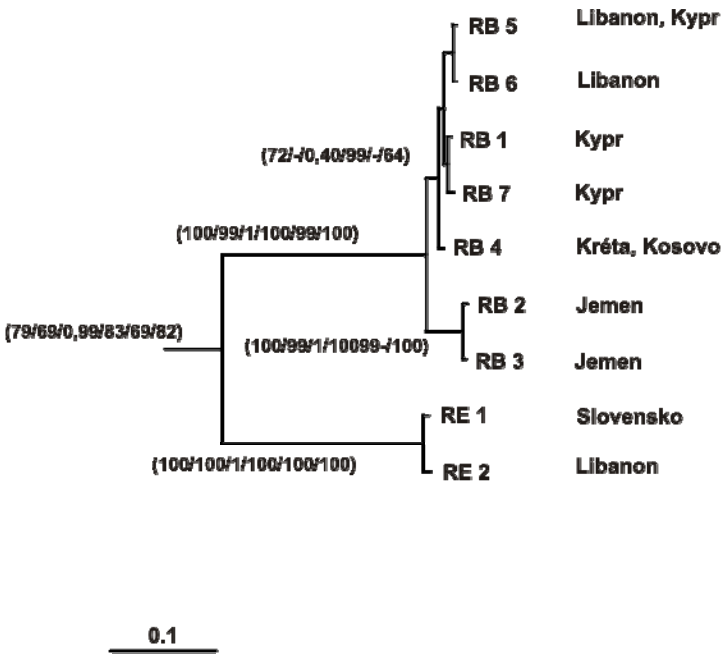


Obr. 13. Grafické znázornění rozdílů mezi haplotypy blízkovýchodní linie druhu *Rhinolophus hipposideros* pomocí programu TCS. Jednotlivé úseky mezi uzly vyjadřují počty substitucí mezi haplotypy. Velikost oválů vyjadřuje relativní množství vzorků, které reprezentují jednotlivé haplotypy.

3.3.3 Rhinolophus blasii

Celkem bylo analyzováno 15 sekvencí, které reprezentují celkem 7 haplotypů. Úseky mtDNA sekvencí cytochromu *b* jsou o délce 1128 bp. Lokality haplotypů, včetně čísel vzorků jsou uvedeny v tabulce 5.

Jednotlivé topologie stromů, které byly zkonstruovány pomocí metod MP, ML, BA, NJ, MLdist, LDdist si jsou navzájem velmi podobné. Hodnoty boostrapu jednotlivých analýz jsou uvedeny v závorkách (ve stejném pořadí jako zkratky fylogenetických analýz v předešlé větě). Na fylogenetických stromech jsou patrné dvě linie. První linie (72/–/0,40/99/–/64) je tvořená haplotypy, které jsou si blízce příbuzné: z Kosova (RB 4), Kréty (RB 4), Kypru (RB 1, RB 5, RB 7) a Libanonu (RB 6). Druhou linii (100/99/1,00/100/99/100) u tohoto druhu tvoří haplotypy z Jemenu (RB 2, RB 3).



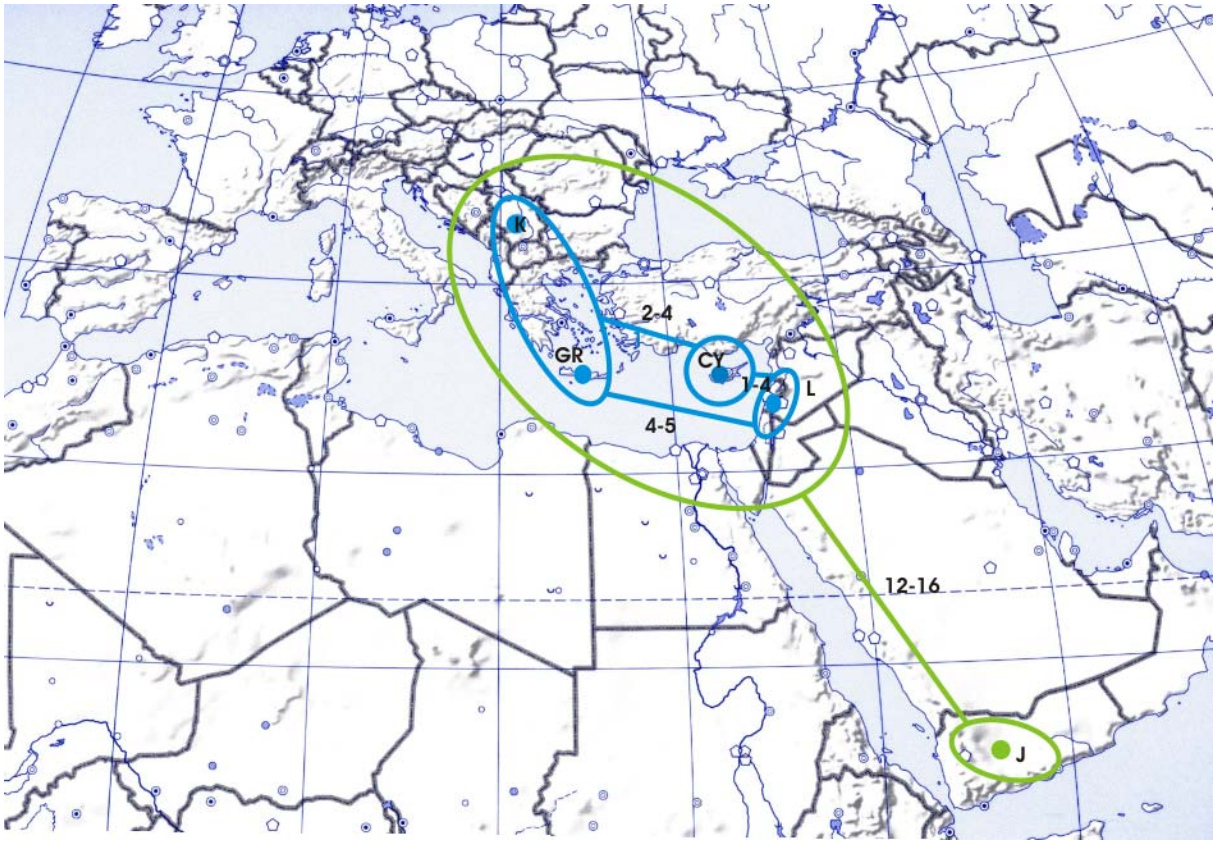
Obr. 14. Výsek fylogenetického stromu (BA) pro druhy *Rhinolophus blasii* a *Rhinolophus euryale* se znázorněním podpory jednotlivých větví. Hodnoty podpory jsou uvedeny v závorkách (MP, ML, BA, NJ, MLdist, LDdist).

Nekorigovaná *p* distance se v rámci první linie pohybuje v rozmezí 0,1−0,4 % a v rámci druhé linie je její hodnota 0,1 %. Rozdíl mezi oběma liniemi se pohybuje v rozmezí 1,1−1,4 %. Podrobný přehled všech hodnot nekorigovaných *p* distancí a počet substitucí mezi jednotlivými haplotypy je uveden v tabulce 12.

Tab. 12. Zjištěné vzdálenosti mezi jednotlivými haplotypy *R. blasii*. Dolní matice udává hodnoty nekorigované *p* distance, horní matice počty substitucí mezi haplotypy.

	RB 1	RB 2	RB 3	RB 4	RB 5	RB 6	RB 7
RB 1		13	12	2	2	3	1
RB 2	0,012		1	13	15	16	14
RB 3	0,011	0,001		12	14	15	13
RB 4	0,002	0,012	0,011		4	5	3
RB 5	0,002	0,013	0,012	0,004		1	3
RB 6	0,003	0,014	0,013	0,004	0,001		4
RB 7	0,001	0,012	0,012	0,003	0,003	0,004	

Přehled zemí, z jejichž lokality jednotlivé haplotypy pocházejí je uvedeno na obrázku 15. Jak vyplývá z předchozích výsledků, jsou zde patrné dvě linie, které jsou od sebe poměrně zřetelně odlišené. Počet substitucí mezi nimi je znázorněn na témže obrázku (obr. 15). Výčet všech substitucí je uveden v tabulce 12.



Obr. 15. Znázornění geografické distribuce mtDNA haplotypů vrápenců Blasiových, *Rhinolophus blasii*, ve východní Evropě, východním Středomoří a Blízkém východě.

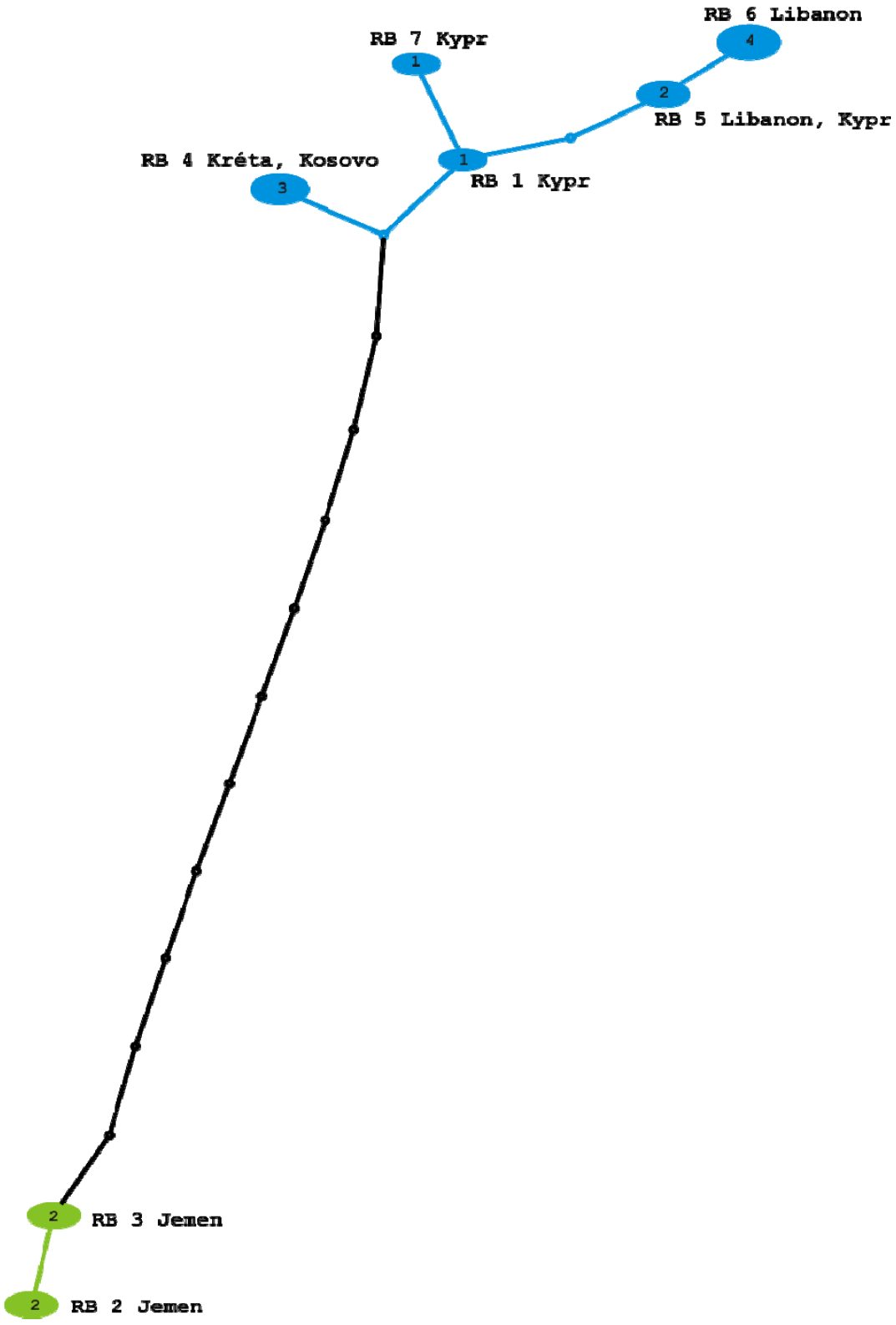
Tab. 13. Přehled jednotlivých zemí s výčtem haplotypů druhu *Rhinolopus blasii* v nich zastoupených

Region		**Haplotypy**
Kosovo	K	RB 4
Řecko	GR	RB 4
Kypr	CY	RB 1, RB 5, RB 7
Libanon	L	RB 5, RB 6
Jemen	J	RB 2, RB 3

Pomocí programu TCS byla vytvořena síť haplotypů, která je uvedena na obrázku 16. I zde je patrné rozdělení na dvě linie. Jednotlivé uzly znázorňují počet substitucí mezi jednotlivými haplotypy.

3.3.4 Rhinolophus euryale

Do fylogenetických analýz byly zahrnuty pouze dvě sekvence, z nichž každá zastupuje samostatný haplotyp. Úseky mtDNA sekvencí cytochromu *b* jsou o délce 1128 bp. Lokality haplotypů, včetně čísel vzorků uvádí tabulka 5. Jednotlivé topologie stromů, které byly zkonstruovány pomocí metod MP, ML, BA, NJ, MLdist, LDdist jsou totožné. Haplotyp ze Slovenska (RE 1) a halotyp z Libanonu (RE 2) byly vždy sesterské a jejich divergence je 0,4 % a jsou mezi nimi 4 substituce.



Obr. 16. Grafické znázornění rozdílů mezi haplotypy druhu *Rhinolophus blasii* pomocí programu TCS. Jednotlivé úseky mezi uzly vyjadřují počty substitucí mezi haplotypy. Velikost oválů vyjadřuje množství vzorků, které reprezentují jednotlivé haplotypy a číslo v nich udává jejich počet.

4 Diskuze

Faunistický výzkum východní části mediteránu přinesl v posledních letech mnoho nových poznatků týkající se řádu Chiroptera (Benda et Horáček 1998, Benda et al. 1999a, b, 2003, 2006, 2007, Hanák et al. 2001). K dispozici je množství nových údajů a autentických pozorování a dokladů o výskytu jednotlivých druhů, jejich areálech rozšíření, biologii a ekologických nárocích jednotlivých populací. Podařilo se získat velký objem dat, která je zapotřebí zpracovávat a připravit k dalšímu využití v kontextu fylogenetických studií a úvah o diverzitě druhů v příslušných lokalitách. Základem stávajícího taxonomického třídění řádu Chiroptera jsou morfometrická a morfologická data z nichž vychází i popisy holotypů a dokladových exemplářů ve sbírkách (Miller 1912, Corbet 1978). Morfometrické a morfologické údaje však ne vždy umožňují jednoznačnou taxonomickou determinaci. To se týká zejména polytypických druhů s klinální variabilitou znaků, kde může být interpretace často nepatrných rozdílů v osteometrických a dalších morfologických znacích zatížena subjektivním přístupem. Ani použití statistiky a dalších matematických metod nemusí dát jasnou odpověď, protože hodnota rozdílů bývá někdy na hranici průkaznosti (Bogdanowicz 1992). V době, kdy byla morfologie převládající taxonomickou metodou, bylo popsáno velké množství později synonymizovaných taxonů a to často na základě několika málo jedinců z jedné lokality, ze vzorku vypovídajícího o zlomku přirozené variability populace (Miller 1912, Roer et Schober 2001). Použití obecných biologických metod jako je karyotypie chromozomů či serologie v mnoha případech přineslo řešení (Zima 1982, 2004, Zima et al. 1992). U některých taxonů však tyto metody nelze k determinaci dost dobře využít, vzhledem k jejich nízké karyotypické diverzitě (Bickham et al. 2004).

Molekulární analýza založená na využití mitochondriální DNA představuje metodu jejíž pomocí můžeme dospět k novým pohledům na úrovni druhů, subspecií, ale i vyšších taxonomických jednotek (Teeling et al. 2005, Stadelmann et al. 2007). Porovnáním haplotypů sledovaných taxonů v topografii fylogenetických stromů máme možnost usuzovat nejen na fylogenetické, ale i biogeografické aspekty vývoje sledovaných skupin a sledovat morfologické adaptace vzniklé v evoluci konvergentním a paralelním vývojem nepříbuzných skupin (Stadelmann et al, 2007). Při posuzování fylogeografických vztahů sledovaných taxonů je optimálním řešením využití jak klasických morfologických a osteometrických metod a porovnání je s výsledky molekulární analýzy, pokusit se porovnat genetické a fenotypické diference (Peters et al. 2002, Dávalos 2005, Miller-Butterworth 2005).

Taxonomie čeledi Rhinolophidae, přestože obsahuje jen jeden rod, je poměrně složitá a to hlavně vzhledem k obrovským areálům rozšíření některých druhů. Odlišné klimatické poměry v jednotlivých oblastech se projevují ve značné velikostní variabilitě jedinců a populací v rámci jednoho druhu obývajících různé biomy a biotopy (Strelkov 1971, Kryštufek 1993, Benda et al. 2006). Častým jevem je i konvergentní vývoj, kdy klimatické podmínky modelují a unifikují tělesné rozměry blízce příbuzných, nebo i odlišných druhů (Strelkov 1971). Schopnost adaptability jednotlivých druhů na různé či měnící se podmínky životního prostředí do značné míry předurčuje jejich evoluční úspěch. Příkladem takové adaptivní ekologie v rámci rodu *Rhinolophus* je evoluční historie *Rhinolophus ferrumequinum*, druhu afrického původu s největším rozšířením v rámci Palearktidy (Bogdanowicz 1992, Bogdanowicz et Owen 1992). Adaptace na sezónní dynamiku ekosystémů aridní Afriky zřejmě predisponovala africké klady komplexu *R. ferrumeqiunum* pro úspěšnou kolonizaci temperátních oblastí Palearktidy (podobně tomu bylo zřejmě u vrápenců *Rhinolophus blasii*, *R. euryale* a *R. mehelyi*), čehož nikdy nedosáhly asijské klady (Csorba et al. 2003).

Předmětem řady odborných sdělení je otázka vztahu mezi fenotypem a genotypem zástupců řádu Chiroptera v kontextu evolučních a fylogeografických souvislostí a změn genetické variability (Miller-Butterworth et al 2005, Pestano et al. 2005, Robinson et al. 2005, Russon et al. 2005, Rossiter et al. 2007). Ukazuje se, že fenotypické vlastnosti jedinců a populací ovlivňují především klimatické podmínky a s ním spojené podmínky alimentární a to do té míry, že se vymykají zoogeografickým pravidlům (Kryštufek 1993, Benda et al. 2006). Klimatické faktory mají na populace netopýrů vliv po celý rok ve všech částech areálů rozšíření druhů, v mírném pásmu Palearktidy však vystupuje vliv chladného počasí. Mírné zimy prodlužují potravní nabídku, chladná jara posouvají dobu březosti, údobí porodů a ovlivňují mortalitu a přežívání mláďat v prvním roce života (Rossiter et al. 2000, Robinson et al. 2005). Má se zato, že toto zpoždění je způsobeno redukovanou potravní nabídkou, protože chladné počasí omezuje výlet hmyzu. Robinson et al. (2005) zpochybňují představu, že *R. ferrumequinum* se na celém území svého rozšíření živí stejnou potravou. Většina těchto studií ale pochází ze severozápadního okraje areálu rozšíření druhu. Potrava těchto populací se zásadně liší od potravy populací žijící v teplých regionech jižní Evropy. Je proto zapotřebí dalších studií a definice potenciálu predace hmyzí kořisti v různých geografických podmínkách. Je zřejmé, že klimatické vlivy limitují rozšíření druhů především v severní části areálů, ale velmi málo je známo o působení klimatických vlivů na populační dynamiku populací letounů v teplých a suchých jižních oblastech (Randsome et Hutson 2000).

Další otázkou je, zda se mechanismus vlivu prostředí na populace netopýrů v jednotlivých lokalitách projevuje i genotypicky. Sakai et al. (2003) provedli u *R. ferrumequinum* molekulární analýzu pomocí mitochondriálního genu pro cytochrom *b* u 61 exemplářů japonských populací získaných na 16 lokalitách. Autoři zjistili celkem 11 haplotypů, které však byly zastoupeny ve všech populacích jedinců v 15 ze 16 lokalit, žádný z haplotypů nebyl pro danou lokalitu specifický. Sakai et al. došli k závěru, že neexistuje závislost mezi pozicí jednotlivých haplotypů ve výsledném fylogenetickém stromu a geografickým původem populací, na blízkých lokalitách byly nalezeny zcela nepříbuzné haplotypy. Ani u dalšího druhu *R. cornutus* se nepodařilo dokázat souvislost mezi rozšířením jednotlivých alel a lokací populace z níž vzorky pocházely. Další autoři však dospěli k jiným zjištěním. Tak například Tian et al. (2004) na základě analýzy mtDNA u *Miniopterus schreibersii* zjistil, že míra procentuální diference sekvencí španělských a orientálně-australasijských kladů se pohybuje mezi 15,8−18,9 % a mezi čínsko-japonskými klady a klady australskými byla tato diference 10,9 %. Z toho vyvozují, že evropské, asijské a australské klady *Miniopterus schreibersii* představují tři rozdílné druhy.

Rhinolophus ferrumequinum

Z výsledků analýzy haplotypů exemplářů *R. ferrumequinum* pocházejících z nejvýchodnější části Středomoří: Sýrie (3 ex.), Libanonu (10 ex.), Izraele (1 ex.), Turecka (1 ex.), Íránu (1 ex.), Kypru (14 ex.) a západněji ležících lokalit – Kréty (8 ex.), Černé Hory (1 ex.), Kosova (2 ex.) a Slovenska (2 ex.) jsou patrné dvě geograficky oddělené linie − evropská a blízkovýchodní. Vzájemná genetická divergence těchto linií se pohybuje v rozmezí 0,9−1,2 %. Zajímavé je, že v obou kladech se objevují jedinci pocházející z lokalit na Kypru. Z přítomnosti dvou skupin rozdílných haplotypů v jednom území, zastoupených jak v blízkovýchodní, tak evropské linii (obr. 7) lze usuzovat na opakovanou kolonizaci ostrova různými populacemi *R. ferrumequinum*. U kyperských jedinců je mezi zmíněnými liniemi je nekorigovaná *p* distance 1,0 %, odpovídající 13 substitucím. Dva haplotypy 8 exemplářů z Kréty jsou od sebe vzdáleny 0,3 % nekorigované *p* distance a s minimálním počtem substitucí (3), jsou ve stejném kladu jako haplotypy ze Slovenska, Kosova, Černé Hory, Kypru a Sicílie, např. krétský haplotyp RF 5 (obr. 7) je identický s haplotypy exemplářů ze Slovenska, Kosova a Černé Hory. Tyto výsledky nepodporují dosavadní taxonomické závěry

a evokují otázku platnosti popisu krétské subspecie *R. f. creticus* Ilioupoulou-Georgudaki et Ondrias, 1986.

Kolonizace ostrovů jednotlivými druhy a populacemi letounů představuje klasickou situaci pro vytváření fylogeografických modelů, kde je možno ověřovat různé hypotézy týkající se genetické variability taxonů, toku genů a intraspecifické evoluce v čase a prostředí (Maharadatunkamsi et al. 2000). Pestano et al. (2003) zabývající se fylogeografií druhů tribu Plecotini na Kanárských ostrovech zjistil na základě analýzy mtDNA, že dva mladší ostrovy byly kolonizovány téměř současně z geologicky staršího ostrova, neboť haplotypy endemického druhu *Plecotus teneriffae* na obou zmíněných ostrovech jsou velmi podobné, s nekorigovanou *p* distancí 0,4 %.

Vše nasvědčuje skutečnosti, že popis *R. f. creticus* není dostatečně oprávněný, neboť kolonizace zřejmě proběhla velmi recentně a populace nebyly vystaveny účinku izolačních mechanismů. Bude tedy zapotřebí revidovat aparát znaků, který vedl k popisu zmíněné subspecie.

Další analýzy budou zapotřebí u íránských populací druhu. V materiálu pro analýzu mtDNA byly íránské populace zastoupeny jedním exemplářem, jehož haplotyp je ve společném kladu s haplotypy exemplářů z Kypru, Libanonu, Izraele, Sýrie a Turecka, *p* distance jsou mezi nimi minimální a pohybují se v rozmezí 0,5–0,6 %. Pokud by se tento výsledek molekulární analýzou dále potvrdil, znamenalo by to, že subspecie *R. f. irani* Cheesman, 1921, nemusí být validní. Zatím však nelze vyvozovat žádné širší závěry, bude zapotřebí dalších analýz

Co se týče exemplářů ze Sýrie, byly v genetické analýze zastoupeni třemi jedinci, nesoucími totožný haplotyp (obr. 7), společný také s exempláři pocházejícími z Kypru, Libanonu a pomezí Izraele a Sýrie. Zmíněný klad se od nejbližšího kladu reprezentovaného exemplářem z Libanonu liší jednou substitucí a *p* distancí 0,1 %.

Porovnáním lebečních rozměrů exemplářů tří skupin *R. ferrumequinum* pocházejících ze tří různých regionů Sýrie a biotopů (pouštní oblast, lesnatá krajina) dospěli Benda et al. (2006) k závěru, že se od sebe liší, přestože lokality odchytu jsou od sebe vzdáleny jen 150−300 km. Jedinci s největšími lebečními rozměry pocházejí ze středomořského pobřeží Sýrie, zatímco nejmenší lebky náležely jedincům z oblastí ležících v blízkosti iráckých hranic a středního toku Eufratu. Hraniční hodnoty kraniálních rozměrů těchto dvou skupin se jen slabě překrývají v hodnotách lebeční šíře. Třetí skupina sestává z exemplářů z horního toku syrského Eufratu – přechodného území mezi mediteránní a nejaridnějšími oblastmi Sýrie.

Jedinci této skupiny se nacházejí v intermediátní pozici co se velikosti týče mezi oběma zmíněnými skupinami.

Podobné intergradace jako ve velikosti jsou patrné také ve zbarvení srsti. Vrápenci velcí z mediteránního pobřeží Sýrie jsou hnědošedí, zatímco jedinci z dolního toku Eufratu jsou světle hnědí až béžoví. Mezi třemi zmíněnými skupinami je patrný klinální posun ve velikosti i zbarvení, od největších a nejtmavších z pobřeží mediteránu, po nejmenší a nejsvětlejší z aridních oblastí vnitrozemí. O podobně výrazné velikostní variabilitě a barevné proměnlivosti u populací *R. ferrumequinum* v Turkmenistánu a Uzbekistánu na nepříliš vzájemně vzdálených lokalitách (nejvýše 300 km) referuje Strelkov (1971), žádné taxonomické závěry z tohoto faktu však nevyvozuje.

Benda et al. (2006) konstatují, že je otázkou zda větší tělesné rozměry jedinců *R. ferumequinum* z vlhčích a tedy úživnějších oblastí Sýrie mohou být důvodem k taxonomickým závěrům nebo zda jsou to morfologické změny recentního charakteru vyvolané intensivními environmentálními vlivy. Podle Bendy et al. (2006) odpovídají rozdíly ve velikosti mezi západosyrskými a východosyrskými jedinci *R. ferrumequinum* rozdělení populací druhu na Blízkém východě na dvě subspecie – nominátní západní *R. f. ferrumequinum* a východní *R. f. irani.* Větší jedinci druhu ze západní Sýrie se co do velikosti podobají příslušníkům nominátní formy z Balkánu, střední Evropy, Turecka a Kypru, zatímco exempláře z východní části areálu se velikostně blíží rozměrům *R. f .irani*. Vzorky z oblasti horního Eufratu stojí velikostně mezi oběma zmíněnými skupinami. Výsledky provedené molekulární analýzy zatím výše uvedené závěry o subspecifickém dělení nepotvrzují, bude však nepochybně třeba analýzy dalších vzorků rozsáhlejšího geografického původu.

Rhinolophus hipposideros

Genetická analýza mtDNA byla provedena ze 40 vzorků z jedinců pocházejících z Česka (1 ex.), Slovenska (4 ex.), Kréty (3 ex.), pevninského Řecka (1 ex.), Kypru (20 ex.), Sýrie (1 ex.), Libanonu (10 ex.) a Íránu (1 ex.). Ke zmíněným vzorkům byla přiřazena sekvence exempláře z Velké Británie převzatá z GenBanku. Z topologie fylogenetického stromu (obr. 10) jsou patrné tři linie (evropská, blízkovýchodní a íránská). Haplotypy, které tvoří blízkovýchodní linii jsou si velmi blízké, nekorigovaná *p* distance se u nich pohybuje v rozmezí 0,1−0,8 %. V rámci evropské linie je variabilita mezi exempláři z Česka,

Slovenska, pevninského Řecka a Velké Británie nulová (exempláře jsou zastoupeny jedním haplotypem), pouze haplotyp z Kréty je mírně vzdálen (1,1 %).

Podle Bendy et Horáčka (1998) a Bendy et al. (2006) je *R. hipposideros* druh s převážně mediteránním typem rozšíření, v aridních oblastech se vyskytuje jen velmi vzácně nebo chybí. Je považován za polytypický druh s velkým množstvím subspecií. Csorba et al. (2003) uvádí šest subspecií s tím, že tyto stávající taxony bude zapotřebí zrevidovat. Populace druhu z východního mediteránu dělí Felten et al. (1977) na základě kraniálních a tělesných rozměrů na čtyři skupiny v rámci tří subspecií. Do nominátní subspecie *R. h. hipposideros* zahrnují autoři exempláře ze západního mediteránu, střední Evropy, Balkánu, Korsiky a Izraele, což až na haplotyp jednoho exempláře z Kréty odpovídá výsledkům provedené molekulární analýzy (obr. 10). Příslušníky krétské populace *R. hipposideros* řadí Felten et al. (1977) k subspecii *R. h. minimus*, přičemž měli k dispozici pouze dva exempláře – holotyp z východní Afriky a jedince z Kréty lišícího se od holotypu rozměry, sami však usoudili, že se jedná o jedince, který ještě nemusel dorůst konečných tělesných rozměrů. Ke třetí subspecii *R. h. midas* řadí Felten et al. (1977) populace ze severovýchodní Anatolie a Afghánistánu. Corbet (1978) dělí druh pouze na dvě subspecie – *R. h. hipposideros* obývající Maghreb, Evropu a západní část Blízkého východu a *R. h. midas* z východních částí od Iráku po Kašmír. Nader (1982 ex Benda et al. 2006) přiřazuje populace druhu z jižní Arábie k poddruhu *R. h. minimus.*

Zjištěné 3 linie jsou vzájemně relativně dobře odlišitelné (2,5−3,5 %), mohou tedy představovat samostatné subspecie. Výsledky korespondují také s členěním, definovaným na základě karyologických výsledků (Zima et al. 1992a) a podporují představu (obr. 12), že nominátní subspecie *R. h. hipposideros* zahrnuje populace z Evropy (Česko, Slovensko, Řecko, včetně Kréty a Velká Británie), subspecie *R. h. midas* je v analýze zastoupena jedním haplotypem z Íránu a je zřetelně odlišitelná, zatímco haplotypy levantských populací z Libanonu, Sýrie a z Kypru vytvářejí třetí odlišnou skupinu.

Skutečnost, že jeden haplotyp může reprezentovat geograficky značně vzdálené populace (Velká Británie vs. Řecko) naznačuje, že nemusí existovat striktní souvislost mezi rozšířením jedotlivých haplotypů a lokalitou z nichž jednotlivé vzorky pocházely (obr. 11), podobně jako zjistil Sakai et al. (2003).

Rhinolophus blasii

Do fylogenetické analýzy bylo celkem zahrnuto 14 vzorků druhu *R. blasii* pocházejících od jedinců z Kosova (1 ex.), Kréty (2 ex.), Kypru (3 ex.), Libanonu (4 ex.) a Jemenu (4 ex.), Z topologie fylogenetického stromu jsou patrné dvě linie (obr. 14). První je tvořena velmi příbuznými haplotypy z Libanonu, Kypru, Kosova a Kréty, druhou linii tvoří haplotypy z Jemenu. Haplotypy v rámci první linie jsou si velmi blízce příbuzné, nekorigovaná hodnota *p* distance se pohybuje v rozmezí 0,1–0,4 %. Druhou linii tvoří dva haplotypy z Jemenu, hodnota jejich vzájemné *p* distance je 0,1 %. Z výsledků molekulární analýzy (obr. 16) se nabízí představa rozdělení druhu na dvě separátní skupiny populací. Vzhledem k tomu, že hodnota *p* distance mezi zmíněnými liniemi se pohybuje pouze mezi 1,1−1,4 %, však nelze uvažovat o tom, že jemenské populace zastoupené v analýze by mohly být příslušníky formy *R. b. andreinii*. Podle Bradleyho et Bakera (2001), pokud je *p* distance <2 %, jedná se nepochybně o intraspecifickou variabilitu, podobně i dle Mayera et al. (2007). V úvahu nepřichází ani subspecie *R. b. meyeroehmi* Felten et al., 1977, haplotypy populací první linie zřejmě náleží k západní, nominátní subspecii *R. b. blasii* (Horáček et al. 2000, Csorba et al. 2003).

Rhinolophus euryale

Pro druh *R. euryale* byly pro genetickou analýzu k dispozici pouze tři vzorky z jedinců pocházejících z Libanonu (2 ex.) a Slovenska (1 ex.), reprezentující pouze dva haplotypy (viz obr. 14). Jeden je reprezentován exemplářem ze Slovenska a druhý exempláři z Libanonu. Hodnota *p* distance mezi těmito dvěma haplotypy je 0,4 %, tedy jsou mezi nimi pouze 4 substituce. Pro malý počet vzorků ale není možné vyvodit žádné vypovídající závěry a získané výsledky lze považovat pouze za orientační. Benda et al. (2006) navrhují na základě velikostních rozdílů definovat levantskou populaci *R. euryale* jako samostatnou subspecii, avšak výsledek analýzy takovýto závěr zatím nepodporuje a bude zapotřebí analyzovat větší množství vzorků.

5 Závěr

Předkládaná diplomová práce zabývající se molekulárně genetickou analýzou genu pro cytochrom *b* exemplářů čtyř druhů rodu *Rhinolophus* (*R. ferrumequinum*, *R. hipposideros*, *R. blasii* a *R. euryale*). Je příspěvkem k mapování genetické variability populací vrápenců rodu *Rhinolophus* ve východní části Středomoří v kontextu nových fylogeografických poznatků, které by klasickými morfologickými metodami byly jen obtížně zjistitelné a průkazné. Studiem této problematiky jsem dospěl k následujícím závěrům.

U **vrápence velkého (*Rhinolophus ferrumequinum*)** byly zjištěny dvě blízce příbuzné linie. Evropská, tvořená haplotypy z Balkánu, střední Evropy, Kréty a Kypru a linie blízkovýchodní s haplotypy z Turecka, Sýrie, Libanonu, Íránu a Kypru. Vzhledem k blízkosti haplotypů obou linií nelze na základě získaných výsledků uvažovat o subspecifickém dělení zmíněného druhu v rámci západní Palearktidy, přestože u jednotlivých populací byly zjištěny morfologické rozdíly. Zajímavým zjištěním je nález dvou haplotypů na Kypru repezentujících jak evropskou, tak blízkovýchodní linii, což nasvědčuje dvojí kolonizaci ostrova zmíněným druhem, patrně jak ze západu tak z východu.

Analýzou exemplářů **vrápenec malého (*Rhinolophus hipposideros*)** byly nalezeny tři separátní linie. Evropská zahrnuje haplotypy z Velké Británie, střední Evropy, Balkánu, Kréty; blízkovýchodní z Libanonu, Sýrie a Kypru; třetí linie je zastoupena haplotypem z Íránu. Tyto tři relativně vzdálené linie (2,5−3,0 %) naznačují existenci tří subspecií, z nichž dvě (*R. h. hipposideros* z Evropy a *R. h. midas* z Íránu) jsou nomenklatoricky definovány.

V rámci dostupného materiálu **vrápence Blasiova (*Rhinolophus blasii*)** byly nalezeny dvě linie. První sestává z haplotypů z Kosova, Kréty, Kypru a Libanonu. Druhou tvoří haplotypy z Jemenu. Vzhledem k nízké hodnotě distance (max. 1,4 %) není důvod uvažovat o dělení na subspecie.

U **vrápence jižního (*Rhinolophus euryale*)** byly k dispozici pouze dva haplotypy s minimální distancí. Není proto možné vyvodit žádné závěry týkající se uvažované definice levantských populací jako nové subspecie. Získané výsledky však vzhledem k počtu vzorků lze považovat pouze za orientační.

Získané poznatky molekulární analýzy čtyř druhů vrápenců ve Středomoří jsou příspěvkem k doplnění stávajících taxonomických názorů na členění rodu *Rhinolophus* na úrovni subspecií, vycházejících doposud převážně z klasických morfometrických dat a karyologických výzkumů.

6 Literatura

ANDERSEN K., 1905a: A list of the species and subspecies of the genus *Rhinolophus*, with some notes on their geographical distribution. Ann. Mag. Natur. Hist., S. 7, 16: 648–662.

ANDERSEN K. 1905b: On some bats of the genus *Rhinolophus*, with remarks on their mutual affinities, and descriptions of twenty-six new forms. Proc. Zool. Soc. Lond. 2: 75–145

ANDERSEN K. 1918: Diagnoses of new bats of the families *Rhinolophidae* and *Megadermatidae*. Ann. Mag. Nat. Hist., Ser. 9, 2: 374–384

ANDĚRA M., HORÁČEK I., 1982: Poznáváme naše savce. Mladá fronta, Praha. 256pp

BAILLIE E. M., HILTON-TAYLOR C., STUART N. S., 2004: A global species assessment. IUCN Red List of Threatened Species. Cambridge. 191 pp

BENDA P., HORÁČEK I., 1998: Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean. Part I. Review of ditribution and taxonomy of bats in Turkey. Acta Soc. Zool. Bohem., 62: 255–313

BENDA P., ANDREAS M., UHRIN M., 1999a: The bat fauna of Syria. Abstracts VIIIth Eur. Bat Res. Symp., Kraków: 5–6

BENDA P., OBUCH J., ANDREAS M., REITER A., UHRIN M., 1999b: New records of bats of Iran. Abstracts VIIIth Eur. Bat. Res. Symp. Kraków: 6–7

BENDA P., IVANOVA T., HORÁČEK I., HANÁK V., ČERVENÝ J., GAISLER J., GEORGIEVA A., PETROV B., VOHRALÍK V., 2003: Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean. Part 3. Review of bat distribution in Bulgaria. Acta Soc. Zool. Bohem. 67: 245–356

BENDA P., KIEFER A., HANÁK V., VEITH M., 2004a: Systematic status of African populations of long-eared bats genus *Plecotus* (Mammalia: Chiroptera). Fol. Zool., 53 (1): 1–47

BENDA P., HULVA P, GAISLER J., 2004b: Systematic status of African populations of *Pipistrellus pipistrellus* complex (Chiroptera: Vespertilionidae), with description of a new species from Cyreanaica, Libya. Acta Chiropterol., 6 (2): 193–217

BENDA P., ANDREAS M., KOCK D., LUČAN R. K., MUNCLINGER P., NOVÁ P., OBUCH J., OCHMAN K., REITER A., UHRIN M., WEINFURTOVÁ D., 2006: Bats (Mammalia: Chiroptera) of Eastern Mediterranean. Part 4. Bat fauna of Syria: distribution systematics ecology. Acta Soc. Zool. Bohem. 70: 1–329

BENDA P., HANÁK V., HORÁČEK I., HULVA P., LUČAN R., RUEDI M., 2007: Bats (Mammalia: Chiroptera) of the eastern Mediterranean. Part. 5. Bat fauna of Cyprus: rewiew of records with confirmation of six species new for the island and description of a new subspecies. Acta Soc. Zool. Bohem. 71: 71–130

BICKHAM J. W., PATTON J. C., SCHLITTER D. A., RAUTENBACH I. L., HONEYCUT R. H., 2004: Molecular phylogenetics, karyotypic diversity, and partition of the genus Myotis (Chiroptera: Vespertilionidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 33: 333–338

BILGIN R., KARATAŞ A., CORAMAN E., PANDURSKI I., PAPADATOU E., MURALES J. C., 2006: Molecular taxonomy and phylogeography of *Miniopterus schreibersii* (Kuhl, 1817) (Chiroptera: Vespertilionidae) in the Eurasian transition. Biological Journal of the Linnean Society 87: 577–582

BILTON D. T., MIROL P. M., MASCHERETTI S., FREDA K., ZIMA J., SEARLE B., 1998: Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. Proc. R. Soc. Lond. B 265, 1219–1226

BOGDANOWICZ W, 1990: Geographic variation and taxonomy of Daubenton´s bat, Myotis daubentoni, in Europe. J. Mammal. 71: 205–218

BOGDANOWICZ W., 1992: Phenetic relationships among bats of the family Rhinolophidae. Acta Theriol., 37: 213–240

BOGDANOWICZ W, OWEN R.D., 1992: Phylogenetic analyses of the bat family Rhinolophidae. Ztschr. zool. Syst. Evolut.-Forsch. 30: 142–160.

BONTADINA F., SCHOFIELD H., NAEF-DAENZER B., 2002: Radio-tracking reveals that lesser horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*) forage in woodland. J. Zool. Lond. 258: 281–290

BRADLEY R. D., BAKER R. J., 2001: A test of the genetic species concept: cytochrome-*b* sequences and mammals. Journal of Mammalogy 82 (4): 960–973

BRINK VAN DEN F.H., 1968: Die Säugetiere Europas. Paul Parey, Hamburg und Berlin, 217 pp.

Buchar J., 1983: Zoogeografie, SPN Praha, 107 pp

BUSSCHE R. A. VAN DEN, BAKER R. J., WICHMAN H. A., HAMILTON M. J., 1993: Molecular phylogenetics of stenodermatini bat genera: congruence of data from nuclear and mitochondrial DNA. Mol. Biol. Evol. 10 (5): 944–959

CASTRESANA J., 2001: Cytochrome *b* phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals. Mol. Biol. Evol. 18 (4): 465–471

CLEMENT M., POSADA D., CRANDALL K. A., 2000: TCS: a computer progam to estimate gene genealogies. Mol. Ecol. 9:1657–1659

COCKRUM E. L., 1976: Status of the name of Rhinolopid bat, *Rhinolophus euryale tuneti* Deleuil and Labbe, 1955. Mammalia 40 (4): 685–686

CSORBA G., UJHELYI P., THOMAS N., 2003: Horseshoe bats of the world (Chiroptera: Rhinolophidae). Alana books, Shropshire, 160 pp

CORBET G. B., 1978: The Mammals of the Palearctic Region: a taxonomic review. British Museum (Natural History) and Cornell University Press, London and Ithac 314 pp

DÁVALOS L. M., 2005: Molecular phylogeny of Funnel-eared bats (Chiroptera: Natalidae), with notes on biogeography and conservation. Mol. Phyl. Evol. 37: 91–103

DEBLASE A. F., 1972: *Rhinolophus euryale* and *Rhinolophus mehelyi* (Chiroptera, Rhinolophidae) in Egypt and Southwest Asia. Isr. J. Zool. 21: 1–12

DE LATTIN G., 1967: Grundriss der Zoogeographie, Gustav Fischer Verlag Jena, 602 pp.

ELLERMANN J.R., MORRISON-SCOTT T.C.S., 1951: Checklist of Palaearctic and Indian mammals 1758 to 1946. British Museum (Natural History), London

EICK G. N., JACOBS D. S., MATTHEE C. A., 2005: A nuclear DNA phylogenetic perspective on the evolution of echolocation and historical biogeography of extant bats (Chiroptera). MBE advance access, Oxford University Press 54 pp

FELTEN H., SPITZENBERGER F., STORCH G., 1977: Zur Kleinsäugetierfauna West-Anatoliens. Teil IIIa. Senckenbergiana biologica 58: 1–44

GAISLER J., 1983: Nouvelles données sur les Chiropteres du Nort Algérien. Mammalia, 43: 359–369

GAISLER J., 1984: Bats of Northern Algeria and their winter activity. Myotis, 21–22: 89–95

GAISLER J., 2001a: Rhinolophus ferrumequinum (Schreber 1974) – Grosse Hufeisennase. Pp: 15–37. In: Krapp (ed.): Handbuch der Säugetiere Europas. Band 4: Fledertiere. Teil I: Chiroptera Rhinolophidae, Vespertilionidae I. Aula-Verlag Wiebelsheim, 603 pp

GAISLER J., 2001b: Rhinolophus euryale Blasius, 1853 – Mittelmeerhufeisennase. Pp: 59–74. In: Krapp (ed.): Handbuch der Säugetiere Europas. Band 4: Fledertiere. Teil I: Chiroptera Rhinolophidae, Vespertilionidae I. Aula-Verlag Wiebelsheim, 603 pp

GAISLER J., 2001c: Rhinolophus mehelyi Matschie, 1901 – Mehelyihufeisennase. Pp: 91–104. In: Krapp (ed.): Handbuch der Säugetiere Europas. Band 4: Fledertiere. Teil I: Chiroptera Rhinolophidae, Vespertilionidae I. Aula-Verlag Wiebelsheim, 603 pp

GATON K. J., DIVID R., 1994: Hot spots across Europe. Biodiv.Let.2: 108–116

GIANNINI N. P., ALMEIDA F. C., SIMONS N. B., SALLE R. DE, 2006: Phylogenetics relationships of the enigmatic harpy fruit bat, *Harpyionycteris* (Mammalia: Chiroptera: Pteropodidae). American Museum Novitates 3533: 1–12

GÖRNER M., HACKETAL H., 1987: Säugetiere Europas. Neumann Verlag, Leipzig Radebeul, 370 pp

GRIFFITHS H. I., KRYŠTUFEK B., REED J. M., 2004: Balkan biodiversity. Kluwer Academic Publishers, 357 pp

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

HALANYCH K. M., DEMBOSKI J. R., WUUREN B. J. VAN, KLIEN D. R., COOK J. A., 1999: Cytochrome *b* Phylogeny of North American hares and jackrabbits (*Lepus*, Lagomorpha) and the effects of saturation in outgroup taxa. Mol. Phyl. Evol. 11 (2): 213–221

HALL T. A., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and alalysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Series 41: 95–98.

HANÁK V., 1964: Zur Kenntnis der Fledermausfauna Albaniens. Věstník Československé Společnosti zoologické 28: 66–68

HANÁK V., BENDA P., RUEDI M., HORÁČEK I., 2001: Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean. Part 2. New records and review of distribution of bats in Greece. Acta Societatis Zool. Bohem., 65: 279–346

HANÁK V., ELGADI A., 1984: On the bat fauna (Chiroptera) of Libya. Věst. Čs. Spol. Zool., 48: 165–187

HORÁČEK I., 1976: Přehled kvartérních netopýrů (Chiroptera) Československa. Lynx n. s. 18: 35–50

HORÁČEK I., ZIMA J., 1996: Evolutionary divergence in the lesser horseshoe bat. Bat Research News 37 (2–3): 67–68

HORÁČEK I., HANÁK V., BENDA P., 1998: Bats (Chiroptera) of the Eastern Mediterranean: a biogeographic summary. Z. F. Säugetierk., 63 Sonderheft: 26

HORÁČEK I., HANÁK V., GAISLER J., 2000: Bats of the palearctic region: A taxonomic and biogeographic rewiew. Proceedings of the VIIIth ERBS 1 11–157

HEWITT G., 2000: The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature 405: 907–913

HULVA P., HORÁČEK I., 2002: *Craseonycteris thonglongyai* (Chiroptera: Craseonycteridae) is a rhinolophid: molecular evidence from cytochrome *b*. Acta Chiropterologica 4 (2): 107–120

HULVA P., HORÁČEK I., STRELKOV P. P., BENDA P., 2004: Molecular architecture of *Pipistrellus pipistrellus/ P. pygmaeus* complex (Chiroptera: Vespertilionidae): further species and Mediterranean origin of the diference. Mol. Phyl. Evol., 32: 1023–1035

HULVA P., HORÁČEK I., BENDA P. 2007a: Molecules, morphometrics and new fossils provide an integrated view of the evolutionary history of Rhinopomatidae (Mammalia: Chiroptera). BMC Evol Biol. 7: 165.

HULVA P., BENDA P., HANÁK V., EVIN A., HORÁČEK I., 2007b: New mitochondrial lineages within the *Pipistrellus pipistrellus* complex from Mediterranean Europe. Folia Zool., 56(4): 378–388.

ILIOPOULOU-GEORGUDAKI J., ONDRIAS J. C., 1986: The greater horseshoe bat Rhinolophus ferrumequinum (Schreber, 1774) in Greece, with description of a new subspecies. Occasional papers the Museum Texas Tech University 102: 1–8

IBÁÑEZ C., GARCÍA-MUDARRA J. L., RUEDI M., STADELMANN B., 2006: The Iberian contribution to cryptic diversity in European bats. Acta Chiropterologica 8(2): 277–297

IRWIN D.M., KOCHER T.D., WILSON A.C., 1991: Evolution of the Cytochrome *b* Gene of Mammals. J. Mol. Evol. 12: 128–144

CHEN S-F, ROSSITER J., FAULKES C. G., JONES G., 2006: Population genetic structure and demographic history of the endemits Formosan lesser horseshoe bat (*Rhinolophus monoceros*). Mol. Ecol. 15: 1643–1656

JONES K. E., BININDA-AMONDS R. P., GITTLEMAN J. L., 2005: Bats, clocks, and rocks: Diversification patterns in Chiroptera. Evolution 59 (10): 2243–2255

JUSTE J., IBÁÑEZ C., MUÑOZ J., TRUJILLO D., BENDA P., KARATAŞ A., RUEDI M., 2004: Mitochondrial phylogeography of the long-eared bats (*Plecotus*) in the Mediterranean Palearctic and Atlantic Islands. Mol. Phyl. Evol. 31: 1114–1126

KAHMANN H. 1958: Die Fledermaus Rhinolophus mehelyi Matschie 1901 als Glied der Säugetierfauna in Tunisien. Zool. Anz. 161: 227–237

KERTH G., MAYER F., KÖNIG B., 2000: Mitochondrial DNA (mtDNA) reveals that female Bechstein´s bats live in closed societies. Molecular Ecology 9: 793–800

KIEFER A., MAYER F., KOSUCH J., HELVERSEN O., VEITH M., 2002: Conflicting molecular phylogenies of European long-eared bats (*Plecotus*) can be explained by cryptic diversity. Mol. Phyl. Evol. 25: 557–566.

KINGSTON T., ROSSITTER J. S., 2004: Harmonic – hopping in Wallacea´s bats. Nature. 429: 654–657

KOCK D., CSORBA G., HOWELL K.M., 2000: Rhinolophus maendeleo n.sp. from Tanzania, a horshoe bat noteworthy for its systematics and biogeografy (Mammalia: Chiroptera: Rhinolophidae). Senckenbergiana Biol. 80: 233–239

KOOPMAN K.F., 1993: Order Chiroptera. In: Wilson D.E., Reeder D.A.M. (eds): Mammal species of the world. A taxonomic and geographic Reference. Third edition. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 743 pp

KOOPMAN K. F., 1994: Chiroptera: Systematics. Handbook of Zoology. Mammalia, Part 60. Walter de Gruyter, Berlin.

KRAPP F., 2001: Ordnung Chiroptera – Fledertiere. Pp 1–7. In: Krapp F. (ed.).Handbuch der Säugetiere Europas, Band 4: Fledertier. Teil I: Chiroptera I. Rhinolophidae, Vespertilionidae 1. Wiebelsheim: Aula-Verlag. 603 pp

KRYŠTUFEK B., 1993: Geographic variation in the Greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum* in south-eastern Europe. Acta Theriologica 38 (1): 67–69

KRYŠTUFEK B., ĐULIČ B., 2001: Rhinolophus blasii Peters, 1866 – Blasius´Hufeisennnase. Pp 75–90. In: Krapp F. (ed.): Handbuch der Säugetiere Europas. Band 4: Fledertiere. Teil I: Chiroptera I. Rhinolophidae, Vespertilionidae I. Wiebelsheim: Aula-Verlag, 603 pp

KRYŠTUFEK B., 2004: A quantitative assessment of Balkan Mammal Diverisity. H.I. Griffiths et al. (eds.). Balkan diversity: 79–108. Kluwer Academic Publisher

LARGET B., SIMON D.L. 1999: Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 750 – 759.

LI M., TAMATE H. B., WEI F-W, WANG X-M, MASUDA R., SHENG H-L, OHTAISHI N., 2003: Phylogenetic relationships among deer in China derived from mitochondrial DNA cytochrome *b* sequences. Acta Theriologica 48 (2): 207–219

LI G., JONES G., ROSSITER S. J., CHEN S-F., PARSONS S., ZHANG S., 2006: Phylogenetics of small horseshoe bats from East Asia based on mitochondrial DNA sequence variation. J. Mammal. 87 (6): 1234–1240

LI G., LIANG B., WANG Y., ZHAO H., HELGEN K. M., LIN L., JONES G., ZHANG S., 2007: Echolocation calls, diet, and phylogenetic relationships of Stoliczka´s trident bat, *Aselliscus stoliczkanus* (Hipposideridae). J. Mammal. 88 (3): 736–744

LOŽEK V., HORÁČEK I., 2004a: Ledová doba z pohledu zoologa, I. Glaciální fauna a historie její výpovědi. Živa, LII (XC): 5–8

LOŽEK V., HORÁČEK I., 2004b: Ledová doba z pohledu zoologa, II. Glaciál ve světle rozboru fosilních zoocenóz. Živa, LII (XC): 50–54

MAHARADATUNKAMSI, HISHEH S., KITCHENER D.J. SCHMITT L.H. 2000: Genetic and morphometric diversity in Wallacea: geographical patterning in the horse shoe bat, *Rhinolophus affinis*. Journal of Biogeography. 27: 193–201

MACHOLÁN M. ET MUNCLINGER P., 2004: Analýza nukleových kyselin. In: Zima et al.: Genetické metody v zoologii. Karolinum, Praha 239 pp

MAYER F., HELVERSEN O. von, 2001: Kryptic diversity in European bats. Proc. R. Soc. Lond. 268: 1825–1832

MAYER F., DIETZ CH., KIEFER A., 2007: Molecular species identification boots bat diversity. Frontiers in zoology 1–5

MILLER G. S., 1912: Catalogue of the Mammals of Western Europe. British Museum, London, 1019 pp

MILLER-BUTTERWORTH M. C., EICK G., JACOBS S. D., CORRIE SCHOEMAN M., AND HARLEY H. E., 2005: Genetic and phenotypic differences between South african long-fingered bats, with a global miniopterine phylogeny. J. Mammal. 86(6): 1121–1135

NEI M., KUMAR S., 2000: Mol. Evol. Phyl. Oxford University Press, Inc., New York, 333 pp

NEWTON L. R., NASSAR J. M., FLEMING T. H., 2003: Genetic population structure and mobility of two nectar-pheeding bats from Venezuelan deserts: inferences from mitochondrial DNA. Mol. Ecol. 12: 3191–3198

NIKAIDO M., HARADA M., CAO Y., HASEGAVA M., OKADA N., 2000: Monophyletic origin of the order Chiroptera and its phylogenetic position among Mammalia, as inferred from the complete sequence of the mitochondrial DNA of a japanese megabat, the Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). J. Mol. Evol. 51: 318–328

NOWAK R. M., PARADISO J. L., 1983: Walker´s Mammals of the world. The Johns Hopkins University Press, 1362 pp.

PALMEIRIM J. M., 1990: Bats of Portugal: Zoogeography and systematics. Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. Misc. Publ. 82: 1–53

PAUNOVIČ M., STAMENKOVIČ S., 1998: Revision of the distribution and status of *Rhinolophus euryale* Blasius 1853 and *Rhinolohus blasii* Peters 1866 (Rhinolophidae) in Yugoslavia based on the discrimination properties of distinctive morphological character. Myotis 36: 7–23

PETTIGREW J. D., 1994: Genomic evolution. Flying DNA. Curr. Biol. 4: 277–280

PETTIGREW J. D, 1995: Flying primates crashed or crashed through? In: Racey P.A., Swift S. M.: Ecology, evolution and behaviour of bats. Oxford Clarendon Press 26 pp.

PESTANO J., BRAUN R. P., SUÁREZ N. M., BENZAL J., FAJARDO S., 2003: Intraspecific evolution of Canary Island Plecotine bats, based on mtDNA sequences. Heredity 90: 302–307

PETERS S. L., LIM B. K., ENGSTROM M. D., 2002: Systematics of Dog-faced bats (*Cynomops*) based on molecular and morphometric data. Journal of Mammalogy 83 (4): 1097–1110

PIAGGIO A. J., PERKINS S. L., 2005: Molecular phylogeny of Nort American long – eared bats (Vespertilionidae: *Corynorhinus*); inter- and intraspecific relationships inferred from mitochnondrial and nuclear DNA sequences. Mol. Phyl. Evol. 37: 762–775

POSADA D., CRANDALL K. A., 1998: MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817–818.

POSADA D., 2006: Collapse: Describing haplotypes from sequence alignments.

PUMO D. E., FINAMORE P. S., FRANEK W. R., PHILLIPS C. J., TARZAMI S., BALZARANO D., 1998: Complete Mitochondrial Genome of a Neotropical Fruit Bat, *Artibeus jamaicensis*, and a New Hypothesis of the Relationships of Bats to Other Eutherian Mammals. J. Mol. Evol. 47: 709–717

RADCHENKO O. A., 2004: Variability of nucleotide sequences of mitochondrial DNA cytochrome *b* gene in chars of the genus *Salvenilus*. Russian Journal of Genetics 40 (3): 244–254

RANSOME R. D., HUTSON A. M., 2000: Action plan for the conservation of the greater horseshoe bat in Europe (*Rhinolophus ferrumequinum*). Nature and Enviroment, Council of Europe Publishing, 109: 7–54

ROBINSON R. A., LEARMONTH A., HUSTON A. M., MACLEOD C. D., SPARKS T. H., LEECH D. I., PIERCE G. J., REHFISCH M. M., CRICK H. Q. P., 2005: Climate Change and Migratory Species. British Trust for Ornithology, Norfolk, 304 pp

ROČEK Z., 2002: Historie obratlovců. Academia Praha, 512 pp

ROER H., SCHOBER W., 2001: Rhinolophus hipposideros (Bechstein, 1800) – Kleine Hufeinsennase. Pp: 39–58. In: Krapp F. (ed.): Handbuch der Säugetiere Europas. Band 4: Fledertiere. Teil I: Chiroptera I. Rhinolophidae, Vespertilionidae 1. Wiebelsheim: Aula-Verlag. 603 pp

RONQUIST F., HUELSENBECK J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.

ROSSINA V. R., BARYSHNIKOV G.F., WOLOSZYN B.W., 2006: Dynamics of the Pleistocene bat fauna from Matuzska Paleolithic site (Nothern Caucasus, Russia) (Chiroptera). Lynx, n.s, 37:229–240

ROSSITER J. S., JONES G., RANSOME D. R., BARRATT M. E., 2000: Genetic variation and population structure in the endangered greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. Molecular Ecology. 9: 1131–1135

ROSSITER J. S., JONES G., RANSOME D. R., BARRATT M. E., 2000a: Parentage reproductive success and breeding behaviour in the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*). Proc. R. Soc. Lond. 267: 545–551

ROSSITER J. S., JONES G., RANSOME D. R., BARRATT M. E., 2001: Outbreeding increases offpring survival in wild greater horseshoe bats (*Rhinolophus ferrumequinum*). Proc. R. Soc. Lond. 268:1–7

ROSSITER J. S., BENDA P., DIETZ CH. ZHANG S., JONES G., 2007: Rangewide phylogeography in the greater horseshoe bat inferred from microsatellites: implications for population history, taxonomy and conservation. Mol. Ecol. 16(22): 4699–4717

RUSSO D., ALMENAR D., AIHARTZA J., GOITI U., SALSAMENDI E., GARIN I., 2005: Habitat selection in sympatric *Rhinolophus mehelyi* and *R. euryale* (Mammalia: Chiroptera). J. Zool. Lond. 266: 327–332

SAITOU N., NEI M. 1987: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**: 406–425.

SAKAI T., KIKKAWA Y., KIMIYUKI T., HARADA M., KANOE M., YOSHIYUKI M., YONEKAWA H., 2003: Molecular phylogeny of Japanese Rhinolophidae based on variations in the complete sequence of the mitochondrial cytochrome *b* gene. Genes Genet. Syst. 78: 179–189

SCHOBER W., GRIMMBERGER E., 1997: The bats of Europe & North America, T. F. H. Publications, Inc., 239 pp

SIMMONS N. B. 2005: Order Chiroptera. In: Wilson D. E. and Reeder D. M.(eds.): Mammals species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference. Third edition. Volume 1. Baltimore: The John Hopkins University Press. 743 pp

SLOWINSKI J. B., Keogh J. S., 2000: Phylogenetics relationships of elapid snakes based on cytochrome *b* mtDNA sequences. Mol. Phyl. Evol. 15 (1): 157–164

STORCH G., 1970: Holozäne Kleinsäugerfunde aus der GharDalam-Höhle, Malta (Mammalia: Insectivora, Chiroptera, Rodentia). Senckenbergiana Biologia 51 (3/4): 135–145

STRELKOV P. P., 1971: Bolšije (Rhinolophus ferrumequinum) i bucharskije (R. bocharicus) podkovonosy (Chiroptera) iz pustyni Karakumy. Zoologičeskij žurnal L, 6 893–907

STRELKOV P. P., 1997: Oblast' vyvedenija potomstva i ee položenie v predelah areala u pereletnyh vidov rukokrylych (Chiroptera, Vespertilionidae) vostočnoj Evropy i smežnych territorij. Soobščenie 1 (Breeding area and its position in range of migratory bats species (Chiroptera, Vespertilionidae) in East Europe and adjacent territories. Zool. Žurnal 76: 1073–1082

STRELKOV P. P. 2000: Seasonal distribution of migratory bat species (Chiroptera, Vespertilionidae) in eastern Europe and adjacent territories: nursing area. *Myotis* **37**: 7–25.

SU B., WANG Y., LAN H., WANG W., ZHANG Y., 1999: Phylogenetic study of complete cytochrome *b* genes in musk deer (genus *Moschus*) using museum samples. Mol. Phyl. Evol. 12 (3): 241–249

SWOFFORD D. L., 2002: *PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony.* Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

TABERLET P., FUMAGALLI L., WUST-SAUCY A.-G., COSSON J.-F., 1998: Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. Molecular Ecology 7: 453–164

TATE G. H. H., 1943: Results of the Archbold expeditions. No.49. Further notes on the *Rhinolophus phillipiensis* group (*Chiroptera*). Am. Mus. Novit. 1219: 1–7

TATE G. H. H. and ARCHBOLD R., 1939: Results of the Archbold expeditions. No 24. Oriental *Rhinolophus*, with special reference to material from the Archbold collections. Am. Mus. Novit. 1036: 1–12

TEELING C.T., MADSEN O., BUSSCHE R.A. VAN DEN, WILFRIED W. DE JOŃG, STANHOPE M.J., SPRINGER M.S., 2002: Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophid microbats. PNAS, 99 (3): 1431–1436.

TEELING E. C., SPRINGER M. S., MADSEN O., BATES P., O´BRIEN S. J., MURPHY W. J., 2005: A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. Science 307: 580–584

THOMPSON D. J., GIBSON T. J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN F. & HIGGINS D. G. 1997: The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignments aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research* 24: 4876–4882.

TRIANT D. A., DEWOODY J. A., 2006: Accelerated molecular evolution in *Microtus* (Rodentia) as assesed via complete mitochondrial genome sequences. Genetica 128: 95–108

TIAN L., LIANG B., MAEDA K., METZNER W., ZHANG S., 2004: Molecular studies on the classification of Miniopterus schreibersii (Chiroptera: Vespertilionidae) inferred from mitochondrial cytochrome *b* sequences. Folia Zool. 53(3): 303–311

UHRIN M., HORÁČEK I., ŠÍBL J., BEGO F., 1996: On the bats (Mammalia: Chiroptera) of Albania: survey of the records. Acta Soc.Zool. Bohem. 60: 63–71

VAUGHAN T.A., 1986: Mammalogy. Saunders College Publishing, 576 pp.

WANG H., LIANG B., FENG J., SHENG L., SHANG S., 2003: Molecular phylogenetics of Hipposiderids (Chiroptera: Hipposideridae) and Rhinolophids (Chiroptera: Rhinolophidae) in China based on mitochondrial cytochrome *b* sequences. Folia Zool. 52 (3): 259–268

WILKINSON G. S., MAYER F., KERTH G., PETRI B., 1997: Evolution of repeated sequence arrays in the D-Loop region of bat mitochondrial DNA. Genetics 146: 1035–1048

WOLOSZYN B. W., 1987: Microevolutionary trends among tertiary and quartenary bats from southern Poland. European bat research, Charles University Press, Praha. 718 pp

ZIMA J., 1982: Karyotypy tří druhů vrápenců (Rhinolophus ferrumequinum, R. hipposideros, R. euryale) z Československa. Lynx n. s. 21: 121–123

ZIMA J., 2004: Karyotypic variation in mammals of the Balkan Peninsula. Balkan Biodiversity, Kluwer Academic Publishers, 109–133

ZIMA J., VOLLETH M., HORÁČEK I., ČERVENÝ J., ČERVENÁ A., PRŮCHA K., MACHOLÁN M., 1992: Comparative karyology of rhinolophid bats (Chiroptera: Rhinolophidae). Pp. 237–242. In: Horáček I. et Vohralík V. (eds.): Prague Studies in Mammalogy. Charles Univ. Press, Praha.

ZIMA J., MACHOLÁN M., MUNCLINGER P., PIÁLEK P., 2004: Genetické metody v zoologii. Karolinum, Praha, 239 pp.

ZOHARY M., 1973: Gebotanical Foundation of the Middle East. Vol. I. Stuttgart & Amsterdam: Gustav Fischer Verlag, Swets & Zetlinger, 340 pp.