Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Ekologie

Bc. Pavel Karel Bystřický

Habitatové preference a párování koexistujících západokarpatských linií blešivců druhového komplexu *Gammarus fossarum*

Habitat and pairing preferences among coexisting lineages of the *Gammarus fossarum* species complex in the Western Carpathians

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: **prof. RNDr. Adam Petrusek, Ph.D.**

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze, 8. 8. 2020

Podpis

Poděkování

Chtěl bych obzvláště poděkovat mému školiteli Adamu Petruskovi za dlouhodobou spolupráci, pomoc a podporu ve všech praktických i teoretických aspektech mého studia. Dále pak děkuji Magdaleně Gajdošové a Tereze Rutové za pomoc při řešení některých laboratorních problémů a za spoluúčast při sběru vzorků. Se zpracováním části vzorků pomáhal Vojtěch Brož a přítomnost microsporidií v mých vzorcích testovala Nataša Katanić. V neposlední řadě děkuji i mým rodičům za jejich podporu, kterou mi vždy poskytli v době studia. Zvláštní dík patří mojí mamce, která mi v rámci jednoho termínu odběru posloužila jako osobní řidič a objela se mnou všechny potřebné lokality, protože jsem neměl jinou možnost vlastní dopravy.

Abstrakt

V posledních letech byla díky molekulárním metodám rozkryta značná míra kryptické diverzity napříč mnoha taxony. Výjimkou nejsou ani sladkovodní různonožci (blešivci), kteří díky snížené možnosti disperze a rekolonizace představují skvělý modelový systém pro zkoumání možných ekologických interakcí mezi geneticky výrazně vzdálenými liniemi při opětovném kontaktu. Ve své práci se zabývám kryptickým druhovým komplexem *Gammarus fossarum*. Z předchozího výzkumu jsme věděli, že v oblasti Vsetínska dochází ke kontaktu několika vysoce divergentních linií. Tato práce se zabývá dvěma hlavními otázkami. Existuje mezi příslušníky stejné linie preference ke společnému párování (existuje prezygotická reprodukční bariera mezi liniemi)? Tuto hypotézu jsem testoval jak sběrem párů z přirozených podmínek, tak (v omezené míře) i akvarijním pokusem. Druhou hypotézou je, zda mezi liniemi v kontaktní zóně existuje tendence k obsazení odlišných mesohabitatů (tůň versus proud), což by mohlo naznačovat kompetici mezi liniemi a možnou diverzifikaci jejich ekologických nik. Výzkum probíhal na devíti lokalitách s předpokládaným výskytem vždy dvou ze tří vybraných linií. Výsledky nicméně prokázaly, že ve více jak polovině případů se jednalo o kontakt všech tří studovaných linií s jasnou dominancí jedné z nich (více jak 64 %). V přirozených podmínkách jsem ze 102 testovaných prekopulačních párů našel pouze jeden jediný případ, kdy samec a samice náleželi do různých linií. To potvrzuje silné tendence k párování v rámci stejné linie a existenci prezygotické reprodukční bariery mezi liniemi v přirozených podmínkách. V rámci párovacího experimentu ovšem ke vzniku párů mezi příslušníky odlišných linií docházelo, a to jak v pokusných skupinách, kde jsem předpokládal přístup k partnerům z obou linií, tak i v pokusných skupinách, kde jsem předpokládal přístup pouze k partnerovi z odlišné linie. Výsledky párů z terénu podporují předchozí molekulární data naznačující, že mezi liniemi není genový tok a lze je považovat ze reprodukčně izolované druhy. Odlišné preference pro rychlejší či pomalejší úseky toku mezi liniemi pozorovány nebyly, ale je nutno podotknout, že celkové množství analyzovaných jedinců na sezónu, lokalitu a habitat bylo relativně nízké a průkaznost těchto zjištění by bylo vhodné podpořit větším množstvím dat. Nenalezení odlišností v habitatových preferencích na takto hrubé škále ovšem neznamená, že se tyto linie nemohou lišit v jiných ekologických a behaviorálních faktorech, které mohou ovlivňovat jejich koexistenci.

Klíčová slova: druhový komplex *Gammarus fossarum*, habitatové preference, kryptická diverzita, párovací preference.

Abstract

In recent years, due to the development of molecular methods, a great level of cryptic diversity across multiple taxa was discovered. One of these groups are freshwater amphipods. Amphipods due to lower dispersal and recolonization abilities present a suitable model system for studying potential ecological interactions among genetically distant lineages during their secondary contact. In this thesis, I studied the cryptic species complex *Gammarus fossarum* in a contact zone of several genetically divergent lineages known from the previous research in the Vsetin region. I focused on two main questions: Firstly, whether there are preferences among individuals from different lineages for sexual partners from the same lineage rather than from the different one (i.e., I test for the potential existence of prezygotic reproduction barrier between the lineages). I tested this hypothesis by collecting pairs from natural contact zone and also (in a limited extent) by an aquarium experiment. Secondly, I tested whether these lineages differ in mesohabitat (pool versus riffle) distribution in syntopy, which may indicate competition among lineages and potential diversification of their ecological niches. Animals from nine localities (with expected contact of two lineages per locality) were examined. In more than half of the cases, I also detected a third lineage at the respective locality. At all localities one lineage was dominant (more than 64 % of identified individuals). In natural conditions, only one precopulatory pair out of 102 examined ones was formed by a male and a female from different lineages. This confirms the existence of an efficient prezygotic reproduction barrier among these lineages. However, in the pairing experiment, I observed the formation of pairs between individuals from different lineages (in the treatment with access to potential partners of both own and different lineage, as well as in the no-choice treatment with access only to a partner from another lineage). Results from the field support previous molecular evidence indicating that there is no recent gene flow between the lineages, which we can consider as reproductively isolated species. I did not detect differences in distribution of lineages between different mesohabitat (pool vs. riffle). However, the total amount of samples analyzed per season, locality and habitat was relatively low and for a better examination of this topic is necessary to increase the number of analyzed samples in the future. The absence of differences on this relatively rough ecological scale does not exclude other possible ecological differences among studied lineages, which may affect their coexistence.

Keywords: species complex *Gammarus fossarum*, habitat preferences, cryptic diversity, pairing preferences.

Obsah

1 Úvod ... 1

1.1 Biologie a ekologie sladkovodních blešivců ... 2

Diverzita sladkovodních blešivců ... 2

Biologie a ekologický význam sladkovodních blešivců ... 3

Rozmnožování sladkovodních blešivců ... 4

Faktory ovlivňující koexistenci sladkovodních blešivců ... 6

1.2 Druhový komplex *Gammarus fossarum* ... 8

Faktory ovlivňující koexistenci a ekologii druhového komplexu *Gammarus fossarum* ... 9

Párovací preference u druhového komplexu *Gammarus fossarum* ... 10

2 Cíle práce ... 12

3 Metodika ... 13

3.1 Výběr lokalit a sběr vzorků ... 13

3.2 Párovací pokus v akvarijních podmínkách ... 15

3.3 Izolace DNA ... 16

3.4 PCR a elektroforéza ... 17

3.4 Purifikace a sekvenace ... 18

3.5 Zpracování dat ... 19

4 Výsledky ... 20

4.1 Kontakt linií na studovaných lokalitách ... 20

4.2 Časové (sezónní) změny v poměrech linií na lokalitách ... 21

4.3 Mesohabitatové preference ... 22

4.4 Párovací preference v přirozených podmínkách ... 24

4.5 Párovací experiment ... 24

5 Diskuze ... 26

5.1 Zastoupení linií na lokalitách a možné časové změny ... 26

5.2 Mesohabitatové preference a distribuce v rámci toku ... 28

5.3 Párovací preference ... 31

5.4 Účinnost liniově specifických primerů 32

6 Závěr 34

7 Seznam citované literatury 35

8 Seznam příloh 42

1 Úvod

V posledních letech byla objevena celá řada nových a velmi divergentních linií uvnitř řady velmi rozšířených taxonů sladkovodních korýšů. Kromě celé řady různonožců z rodu *Gammarus* (*G. pulex* (Lagrue et al., 2014), *G. roeseli* (Grabowski et al., 2017), *G. balcanicus* (Copilaş-Ciocianu & Petrusek, 2017) či *G. fossarum* (Copilaş-Ciocianu & Petrusek, 2015)) byl výskyt kryptických linií pozorován například i u stejnonožců, konkrétně u druhového komplexu *Asellus aquaticus* (Sworobowicz et al., 2015). Tato práce se zabývá možnými rozdíly v habitatových a párovacích preferencích mezi kryptickými liniemi druhového komplexu *G. fossarum* v Západních Karpatech (linie CWE A, CEA a EEQ). Úzce navazuje na fakta zjištěná v rámci diplomové práce Terezy Rutové, která zkoumala diverzitu a distribuci těchto kryptických linií na Vsetínsku. Mimo jiné pozorovala, že v této oblasti existuje vysoké množství lokalit (30 ze 61 celkově zkoumaných) s výskytem více než jedné linie (Rutová, 2018).

Na těchto konkrétních liniích ještě nedošlo k (téměř) žádnému studiu možných rozdílů v jejich ekologii. Výjimkou bylo otestování, zda se distribuce těchto linií liší v závislosti na nadmořské výšce, což nakonec nebylo pozorováno (Copilaş-Ciocianu et al., 2017). Mezi dříve objevenými liniemi ze západní Evropy ovšem byly pozorovány odlišnosti v habitatových preferencích (Müller et. al, 2000; Eisenring et al., 2016) či v tolerance ke znečištění (Feckler et. al, 2012; Feckler et al., 2014). Práce Terezy Rutové porovnáním jaderného genu 28S s daty z mitochondriálního genu pro cytochrom oxidázu I (COI) ukazuje, že mezi výše zmíněnými liniemi nedochází v současnosti ke genetickému toku (Rutová, 2018). Existence prezygotické reprodukční bariery či míra reprodukční interference mezi těmito liniemi ještě nebyla studována. Výsledky párovacích pokusů na liniích ze západní Evropy vedou k předpokladu, že mezi západokarpatskými liniemi *G. fossarum* pravděpodobně bude také existovat silná preference pro párování s příslušníkem stejné linie, a že reprodukční interference bude minimální (Lagrue et al., 2014; Galipaud et. al, 2015).

Cílem mé práce bylo prostudovat detailněji výskyt linií a možné rozdíly v mesohabitatových preferencích mezi třemi nejrozšířenějšími liniemi, jež se vyskytují na karpatských lokalitách v ČR (CWE A, CEA a EEQ). Pro tento účel jsem vytipoval 9 lokalit na Vsetínsku, vždy s potvrzeným kontaktem dvou ze tří linií. Tři lokality jsem vybral s předpokládaným kontaktem linií CWE A a EEQ, další tři s kontaktem CWE A a CEA a v poslední trojici lokalit jsem očekával kontakt linií CEA a EEQ. Také jsem chtěl ověřit existenci preferenčního párování

v rámci stejné linie, a to jak sběrem párů z přirozených podmínek, tak i v akvarijním experimentu. Prostorová distribuce blešivců v rámci toku i jejich párovací chování může ovlivnit celá řada biotických i abiotických faktorů, které blíže rozeberu v následujících kapitolách.

1.1 Biologie a ekologie sladkovodních blešivců

Diverzita sladkovodních blešivců

Blešivci jsou laterálně zploštělí různonozí korýši (Crustacea: Amphipoda) (obr. 1). Jedná se o obzvláště diverzifikovanou skupinu se širokým ekologickým záběrem. Sladkovodní blešivci se vyskytují jak v povrchových vodách (především skupina Gammaridae), tak i v podpovrchových (například většina zástupců čeledí Niphargidae či Crangonyctidae) (Väinölä et al., 2008), ovšem i v těchto skupinách se mohou ojediněle vyskytovat epigeické druhy (Väinölä et al., 2008; Copilaş-Ciocianu et al., 2018). K výrazným adaptivním radiacím a diverzifikaci blešivců došlo ve starých jezerech. Příkladem jsou druhy z rodu *Gammarus* v jezeře Bajkal (Kamaltynov, 1999), anebo příslušníci rodu *Hyalella* v jezeře Titicaca (Coleman & Gonzalez, 2006).

V poslední době byla díky rozvoji molekulárních technik navíc objevena vysoká míra genetické diverzity u značně morfologicky podobných (potenciálně kryptických) druhů. Studovány byly zejména druhové komplexy *Hyallela azteca* (Cothran et al., 2013b), *Gammarus pulex* (Lagrue et al., 2014), *G. roeseli* (Grabowski et al., 2017; Weigand et. al., 2020), *G. balcanicus* (Mamos et. al, 2016; Copilaş-Ciocianu & Petrusek, 2017) anebo *G. fossarum* (Müller, 2000; Westram et. al, 2011; Copilaş-Ciocianu & Petrusek, 2015).

Obr. 1 – blešivec potoční (*Gammarus fossarum*). Autor Denis Copilaș-Ciocianu.

Existence těchto kryptických druhů vyvolává celou řadu otázek o jejich biologii, ekologii a mechanismech možné koexistence, které doposud nebyly uspokojivě vysvětleny. Je důležité porozumět procesům vzniku těchto kryptických druhů a jejich vzájemným ekologickým interakcím, mimo jiné z důvodů ochrany přírody a druhové diverzity (Feckler et al., 2014; Fišer et al., 2018; Weigand et. al., 2020). Blešivci, obzvláště *Gammarus fossarum*, se také běžné využívají jako modelové organismy při studium vlivu různých toxických látek na společenstva vodních živočichů (Andreï et al., 2016; Arambourou et al., 2017). Již nyní jsou zaznamenané rozdíly v toleranci na kvalitu prostředí mezi kryptickými druhy tohoto komplexu (Feckler et al., 2012; Eisenring et al., 2016), což může mít výrazný dopad na věrohodnost celé řady studií uvažujících taxon *G. fossarum* jako uniformní druh s porovnatelnými reakcemi.

Biologie a ekologický význam sladkovodních blešivců

Blešivci jsou ekologicky významní a známí především jako drtiči rostlinného opadu (Kelly et al., 2002; Truhlar et al., 2014). Kromě drcení rostlinného opadu se mohou chovat i dravě a konzumovat jiné vodní bezobratlé (Macneil et al., 1997; Syrovátka et al., 2020; Georgievová et al., 2020). Ve svém životním cyklu postrádají larvální anebo dormantní stádium (Sutcliffe,

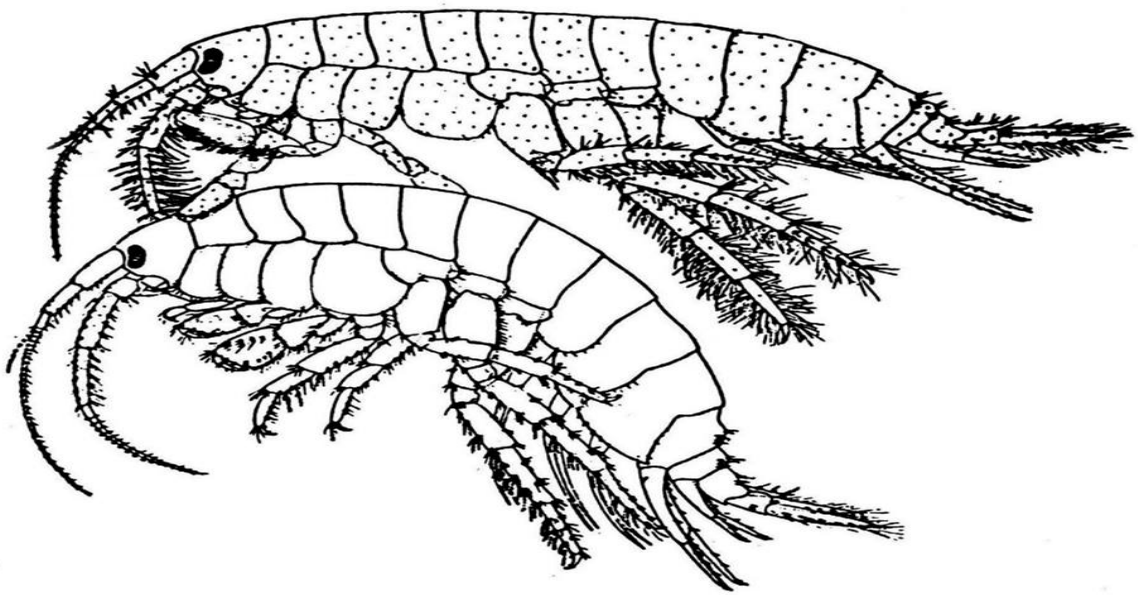
1992). To do značné míry snižuje jejich migrační a rekolonizační schopnosti a zvyšuje tím možnou geografickou izolaci mezi populacemi, což může v dlouhodobém časovém horizontu vést ke zvýšení genetické diverzity mezi populacemi. Genetická diferenciace může vést ke vzniku reprodukčně izolovaných linií, u který se mohou objevit i rozdíly v morfologii (Hou et al., 2014).

Jednotlivé druhy se liší ve svých sklonech k predaci a obecně ve své agresivitě, což je nejvíce prozkoumáno hlavně u interakcí původních a invazních druhů (Dick et al., 1993; Dick & Platvoet, 2000; MacNeil & Dick, 2014). Obzvláště významná je tzv. intragildová predace (IGP), což je konzumace příslušníka jiného druhu, který ovšem okupuje v ekosystému obdobnou niku. Kromě predace tak dochází i k odstranění konkurenta o zdroje jako jsou například potrava anebo prostor (Dick et al., 1993; Dick & Platvoet, 1996; Dick, 2008). U blešivců je také běžný výskyt kanibalismu, obzvláště na juvenilních či čerstvě svlečených jedincích (Dick et al., 1993; Lewis et al., 2010).

Rozmnožování sladkovodních blešivců

Je důležité zmínit, že stejně jako u celé řady jiných ektotermních živočichů závisí i u blešivců rychlost vývoje, růstu, množství vyvedených snůšek a celá řada dalších procesů ovlivňujících jejich životní strategie na teplotě prostředí (vody) a podléhá tedy značným sezónním (časovým) změnám (Goedemakers, 1981).

Samice blešivce může být oplodněna pouze krátce po svléknutí kutikuly. Oplodněná vajíčka se následně vyvíjejí v marsupiu, které mláďata opouštějí až jako plně zformovaní jedinci. Pohlavní dospělosti dosahují po několikerém svlékání (Sutcliffe, 1992). Při páření dochází mezi samcem a samicí k vzniku prekopulačního páru (prekopuly; obr. 2), kdy samec drží samici z dorsální strany jejího těla. Prekopula může trvat několik dní až týdnů (Cothran et al., 2013b; Lagrue et al., 2014). Délka tohoto párování se odvíjí od teploty vody. V chladnější vodě jsou blešivci v prekopule déle (Sutcliffe, 1992), pravděpodobně kvůli většímu časovému intervalu mezi jednotlivými svleky kutikuly u samic. Prekopulační párování může být kromě teploty ovlivněno mnoha faktory. Jako jeden z nejdůležitějších se uvádí blízkost samičího svlékání (ekdyze), což u blešivců koresponduje s blízkostí možné reprodukční příležitosti. Čím je samice blíže ekdyzy, tím je tendence k párování větší (Dick & Elwood, 1992; Galipaud et al., 2015).



Obr. 2 – prekopulační pár blešivců z rodu *Gammarus*. Horní jedinec je samec a dolní je samice. Upraveno a převzato z (Borowsky, 1984).

Obecně platí, že větší samci bývají úspěšnější při pokusech o spárování i při snaze o udržení partnerky (Adams & Greenwood, 1983; Naylor & Adams, 1987; Wellborn & Bartholf, 2005) a samci jsou v rámci prekopuly většinou větší než samice (Adams & Greenwood, 1983; Wellborn & Bartholf, 2005).

Nutnost navazovat prekopulační pár (kvůli krátkému času, kdy je samice fertilní) má celou řadu specifických dopadů na biologii blešivců. Prekopula přináší výhodu při obraně proti bezobratlým predátorům, jako jsou například larvy vážek (Cothran, 2004). Také se u jedinců v prekopule snižuje riziko unesení proudem (Adams & Greenwood, 1983). Nevýhodou může být vyšší riziko predace rybami (Cothran, 2004)

Prekopulační pár (obzvláště s menším samcem) může iniciovat i samice, pokud se blíží její ekdyze a hrozí promarnění reprodukční příležitosti (Cothran, 2008). V případě setkání příslušníků odlišných druhů anebo různých linií druhového komplexu se ukazuje, že míra genetické příbuznosti může odrážet možnou ochotu k formování prekopuly. Příbuznější jedinci se preferenčně párují více mezi sebou, než s geneticky více odlišnými jedinci (Cothran et al., 2013b; Galipaud et al., 2015). Čas strávený pokusy o spárování se samicemi z jiného druhu může být delší, jedná-li se o „naivní“ samce, kteří nemají se samicemi jiného druhu předchozí zkušenost. Tuto informaci jsem nalezl pouze ve studii mezi druhy *Gammarus pulex* a *Gammarus duebeni* (Dick & Elwood, 1992).

Faktory ovlivňující koexistenci sladkovodních blešivců

Prostorová distribuce blešivců v rámci toku závisí na mnoha faktorech, které spolu často interferují. Mimo biotických vlivů, jakými může být výskyt jiných druhů blešivců a s nimi spojená kompetice (Dick et al., 1993; van Riel et al., 2007; Cothran et al., 2013a), může jejich distribuci ovlivnit i přítomnost predátorů (Starry et al., 1998). Chování blešivců je ovlivněno i pokud je ve vodě přítomná pouze „chemická stopa“ (kairomon) predátora (Starry et al., 1998; Baumgärtner et al., 2003). Denní a noční distribuce se může také výrazně měnit, hlavně vlivem nočního driftu. Zvýšená plovací aktivita po setmění pravděpodobně vede k nižšímu riziku predace vizuálně orientovanými predátory, např. rybami (Elliott, 2005). Jsou také prokázány změny v denzitě populací blešivců v rámci toku a v míře pohybové aktivity blešivců v závislosti na sezóně, a to pravděpodobně vlivem zvýšené teploty vody, což nejspíše vede ke zrychlení životních procesů a k rychlému nárustu populace (Goedemakers, 1981).

Dalším významným, byť poněkud specifickým, faktorem ovlivňujícím chování a distribuci blešivců v rámci toku je napadení parazity (MacNeil et al., 2003a; MacNeil et al., 2003b). Nejvýznamnější, a tudíž i nejstudovanější paraziti blešivců spadají do dvou skupin. První z nich jsou vrtejši (Acanthocephala), u nichž blešivec často slouží jen jako mezihostitel a teprve jejich predátor (často pták či jiný obratlovec) je terminálním hostitelem (MacNeil et al., 2003b). Druhou významnou skupinu tvoří intracelulární parazitické mikrosporidie, které se často (i když ne výhradně) přenášejí z matky na potomstvo (Kelly et al., 2004).

U napadení vrtejši (MacNeil et al., 2003b) i mikrosporidiemi (MacNeil et al., 2003a) bylo prokázáno, že může dojít k ovlivnění chování infikovaného blešivce, například směrem k nižší agresivitě a nižší míře IGP na menších jedincích, a naopak vést k vyššímu riziku predace. Dále se po napadení vrtejši objevuje pozitivní fototaxe a větší míra času stráveného plováním ve volném vodním sloupci. Parazit tímto způsobem manipuluje mezihostile (blešivce) za účelem zvýšení pravděpodobnosti sežrání rybami anebo ptáky, tj. finálními hostiteli (Bauer et al., 2005). Když je samec blešivce infikován mikrosporidiemi, může vlivem suprese androgenní žlázy dojít k ovlivnění jeho vývoje směrem k samičímu pohlaví. Takoví jedinci mívají snížené reprodukční schopnosti a můžeme pozorovat i existenci intersexuálních jedinců (Kelly et al., 2004). Z literatury tedy vyplývá, že tito nejčetnější paraziti blešivců mohou ovlivnit obě hlavní témata této práce (habitatovou distribuci i sexuální aktivity).

Koexistence více druhů blešivců v rámci jedné lokality je relativně dobře popsaný jev (Goedemakers, 1981; Mayer et al., 2012; Copilaş-Ciocianu & Boroş, 2016) často studovaný

zejména u interakcí invazních a původních druhů (Bauer et al., 2000; MacNeil & Prenter, 2000; Dick, 2008; Mayer et al., 2012). Mechanismů přispívajících anebo ovlivňujících koexistenci různých druhů blešivců je mnoho, nejvýznamnější z nich shrnuji níže, ale detailněji jsem se jim věnoval ve své bakalářské práci (Bystřický, 2017).

Nejčastěji se uvažují a studují možné rozdíly v životních strategiích či biologických vlastnostech druhů, které by umožňovaly koexistencí na základě odlišných ekologických nik (Goedemakers, 1981; Wellborn & Cothran, 2004; Copilaş-Ciocianu & Boroş, 2016). Může se jednat například o odlišnou prostorovou distribuci v rámci habitatu, jako tomu je u tří linií druhového komplexu *Hyalla azteca*, které spolu žijí ve stejném jezeře (Wellborn & Cothran, 2007) anebo o odlišnou míru tolerance ke znečištění prostředí (Eisenring et al., 2016). Dále může ke koexistenci přispět různá míra promořenosti parazity (Westram et al., 2011a) či odlišný vliv parazitů na chování nakažených jedinců. Pozorováno bylo například snížení agresivity a IGP u invazního druhu *G. pulex*, což mohlo napomoci k „vyrovnání sil“ a usnadnění koexistence anebo alespoň zpomalení kompetičního vytlačení původních druhů *G. duebeni celticus* (MacNeil et al., 2003b).

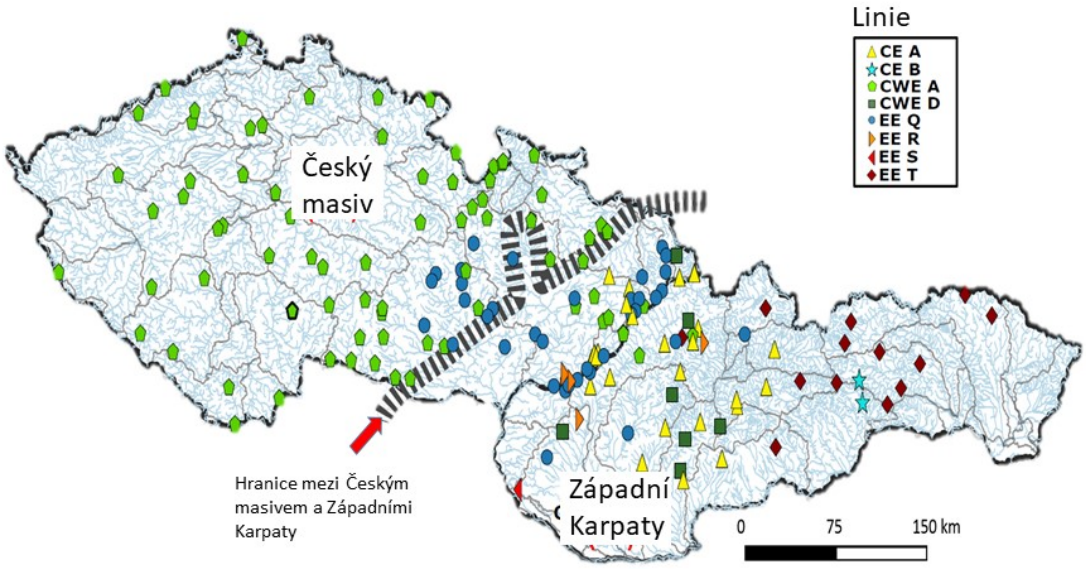
Často jsou hledané i morfologické rozdíly, obzvláště pokud je lze vztáhnout a interpretovat z hlediska odlišného využívání potravních zdrojů (Mayer et al., 2012) či kompetice o ně (Wellborn & Cothran, 2004). Morfologické znaky jsou také důležité z hlediska studia odlišné míry obrany před predátory (například ostny na dorzální straně těla snižující riziko predace rybami) (Wellborn & Cothran, 2004; Bollache et al., 2006). Rozdíly ve velikosti těla u syntopicky se vyskytujících morfologicky velmi podobných příslušníků z druhového komplexu *Hyallela azteca* mohou být způsobeny odlišnou mírou rybí predace vůči příslušníkům odlišných linií (Wellborn & Cothran, 2004). U jinak morfologicky velmi podobných druhů se tedy pod vlivem tlaku prostředí (jako je predace) mohou projevit morfologické změny (například velikost těla).

Nicméně je možné, obzvláště při koexistenci výrazně podobných až kryptických druhů, jež se ekologicky nijak výrazně neliší, že hlavními mechanismy za jejich syntopickým výskytem jsou náhodné procesy a neutrální dynamika společenstva (Leibold & Mcpeek, 2006). Dva druhy s vysokou mírou genetické rozdílnosti, ale výraznou podobností v morfologii se mohou chovat podle modelu neutrální teorie. Rozdíly v jejich ekologii mohou být tak malé, že jejich distribuce v rámci společného habitatu může být dána více náhodnými procesy než kompeticí (Leibold & Mcpeek, 2006). Mezi příklad takové situace může posloužit tzv. efekt priority - tzn. ten, kdo

první rekolonizoval lokalitu po výrazné disturbanci (např. úplném či částečném vyschnutí toku) bude mít dominantní zastoupení v rámci lokality (Little & Altermatt, 2018).

1.2 Druhový komplex *Gammarus fossarum*

V rámci druhového komplexu *G. fossarum* byly poprvé popsány kryptické linie v západní Evropě CWE A a CWE B v povodí řeky Mázy (Müller, 1998). Později byla popsána třetí linie CWE C (Müller, 2000; Westram et al., 2011b), s tím, že například v západním Švýcarsku dochází ke kontaktu linií A a B na některých zkoumaných lokalitách (většina lokalit je ovšem jednoliniových) (Westram et al., 2011b). Homogenní výskyt linie CWE A je zmapován přes oblast téměř celého Českého masivu (Copilaş-Ciocianu et al., 2017). Největší množství genetické diverzity bylo pozorováno v jihozápadních Karpatech, kde bylo určeno minimálně 16 linií až miocénního stáří, u kterých byl navíc pozorován syntopický výskyt velmi divergentních linií. Tato oblast je pravděpodobně nejvýznamnější centrem diverzity tohoto druhového komplexu (Copilaş-Ciocianu & Petrusek, 2015). Na rozmezí mezi Českým masivem a Západními Karpaty se nalézá kontaktní oblast několika kryptických linií s vysokou genetickou diverzitou (obr. 3) a odhadovaným stářím původu až 18 milionů let (Miocén) (Copilaş-Ciocianu et al., 2017).



Obr. 3 – mapa výskytu linií druhového komplexu *G. fossarum* (na základě jednoho jedince na lokalitu). Převzato a upraveno z (Copilaş-Ciocianu et al., 2017).

Tyto linie pravděpodobně přetrvaly v Západních Karpatech ve stabilních malých tocích, nejspíše napájených stabilními hlubinnými prameny, které mohly posloužit jako refugium během klimatických fluktuací v dobách ledových (Copilaş-Ciocianu et al., 2017). Recentní

objev nové linie označované jako RMO v rámci studia kryptických linií v povodí řeky Kinzig v Německu podporuje teorii o existenci přetrvávajících severněji položených refugií (Weigand et al., 2020). Ze „západokarpatských" linií zmíním na tomto místě linie EEQ a CEA, kterými se (kromě „západní" linie CWE A) budu zabývat ve své práci. Obě dvě tyto linie divergovaly pravděpodobně v Miocénu (před 14-18 miliony let) a u linie EEQ, která jako jediná zasahuje do Českého masivu, jsou podle molekulárních dat patrné známky recentní geografické expanze (Copilaş-Ciocianu et al., 2017).

V rámci recentní studie v povodí řeky Kinzig v Německu, která mimo jiné zahrnuje i studium druhového komplexu *G. fossarum,* je diskutováno, že vysoká míra diverzity u *G. fossarum* může být dána jeho preferencí pro horní úseky toku, a tím i vysokou izolovaností jednotlivých populací. Horní úseky toku podle autorů mohou pravidelně procházet disturbancemi, jako například vysychání, což může vést k zmenšení populace a působení genetického driftu, a tím ke zvyšování genetické diverzity mezi populacemi. Kromě působení genetického driftu je ale možné, že genetickou diverzitu z části zvyšuje i protiproudová migrace (re)kolonizujících jedinců (Weigand et al, 2020).

Faktory ovlivňující koexistenci a ekologii druhového komplexu *Gammarus fossarum*

Za typický habitat pro taxon *Gammarus fossarum* (sensu lato) se považují hlavně menší, rychle tekoucí a hodně prokysličené toky s dostatečným množstvím rostlinného opadu (Goedemakers, 1981; Copilaş-Ciocianu et al., 2014; Eisenring et al., 2016). Doposud všechny provedené výzkumy na rozdíly v habitatových preferencích anebo nárocích na kvalitu prostředí byly provedeny v západní Evropě na liniích (CWE) A a B (Müller et al., 2000; Feckler et al., 2014; Eisenring et al., 2016).

V rámci těchto linií proběhly i pokusy o porovnání morfologických znaků za účelem rozlišení těchto linií. Byly nalezly signifikantní rozdíly mezi typem A a B v relativní délce některých tělních segmentů vůči celkové velikosti těla jedinců z odlišných linií. Ovšem značná část jedinců se v těchto parametrech překrývala a v porovnání s výraznou genetickou odlišností tato zjištění ukazují spíše na značnou morfologickou stázi v rámci procesu speciace (Müller et al., 2000). Mezi těmito liniemi ovšem byly pozorovány rozdíly v distribuci vzhledem k typu habitatu, což bylo studováno v oblasti povodí řeky Rýn ve Švýcarsku (Eisenring et al., 2016) a vliv některých environmentální parametrů na jejich distribuci, s tím, že jako nejvýznamnější se ukazoval vliv nadmořské výšky a pH (Müller et al., 2000). Lokality s čistým výskytem linie A (v kontrastu ke smíšeným populacím anebo populacím pouze s výskytem linie B) jsou

charakteristické vyšší nadmořskou výškou, jemnějším (štěrkovitým) substrátem, vyšším pH a vyšší mírou stínění vegetací (Müller et al., 2000).

Novější studie (Eisenring et al., 2016) v zásadě potvrdila tento předpoklad. U linie B byl pozorován signifikantně častější výskyt v méně zalesněných (zastíněných) oblastech s vyšším vlivem člověka na tok, což může naznačovat vyšší toleranci ke znečištění (Eisenring et al., 2016). Jako podpora pro tato zjištění by mohl posloužit fakt, že při experimentech, kdy byly obě dvě linie vystaveny chemickým stresorům (jako například fungicidy a insekticidy), se linie A ukazovala jako citlivější oproti linii B (Feckler et al., 2012). Podobný efekt vyšší citlivosti linie A oproti linii B se potvrdil i vůči zatížení NH_3 (Feckler et al., 2014).

V rámci nověji objevených a geneticky více diverzifikovaných linií se zatím porovnávaly jenom možné rozdíly vzhledem k nadmořské výšce, a to na základě vzorků z území Čech a Slovenska. Porovnávány byly linie EEQ, CEA, EET a široce rozšířená středoevropská linie CWE A. Distribuce linií v závislosti na nadmořské výšce se však nelišila (Copilaş-Ciocianu et al., 2017).

V povodí řeky Kinzig se syntopicky vyskytují druhové komplexy *G. fossarum*, *G. pulex* a *G. roeseli*. Při studiu genetické diverzity a preferencí k určitým parametrům prostředí mezi příslušníky těchto druhových komplexů bylo pozorováno, že u druhového komplexu *G. fossarum* je nejvyšší míra výskytu endemických haplotypů (v porovnání s dvěma výše zmíněnými druhovými komplexy ve stejném povodí). Příslušníci druhového komplexu *G. fossarum* měli největší haplotypovou diverzitu ve svém preferovaném habitatu (horní úsek toku s nižší teplotou vody). V nížinných vodách byl *G. fossarum* výrazně méně zastoupen a jednalo se vždy o dva nejběžněji rozšířené haplotypy (Weigand et al., 2020).

V rámci linií A a B ve Švýcarsku byly zkoumány také rozdíly v promořenosti parazity. Linie B v tomto případě vycházela jako častěji infikovaná různými druhy vrtejšů (Westram et al., 2011a). Vliv parazitů na kryptické linie blešivců je doposud velmi málo studovaný, i když nesmírně zajímavý faktor, vzhledem k vlivům, které tito paraziti mohou mít na koexistenci blešivců.

Párovací preference u druhového komplexu *Gammarus fossarum*

Jak jsem již uvedl, k oplodnění samice u blešivců může dojít jenom těsně po svlečení karapaxu a samci se samicemi utvářejí prekopulační páry, které mohou trvat až několik dní (Cothran et al., 2013b; Lagrue et al., 2014). Párovací tendence mezi geneticky odlišitelnými příslušníky různých linií či druhů v rámci druhových komplexů se prozatím zkoumaly u

druhových komplexů *H. azteca* (Cothran et al., 2013b), *G. pulex* (Lagrue et al., 2014) či *G. fossarum* (Lagrue et al., 2014; Galipaud et al., 2015).

Dosavadní studium kryptických linií blešivců ukazuje, že jak příslušníci západních linií druhového komplexu *G. fossarum* (Lagrue et al., 2014; Galipaud et al., 2015), tak i jedinci z druhového komplexu *H. azteca* (Cothran et al., 2013b) mají vysokou tendenci párovat se v rámci stejné linie, a že mezi liniemi existují prekopulační reprodukční bariéry. Navíc při kompetici mezi dvěma samci o stejnou samici má větší tendenci zvítězit samec ze stejné anebo velmi příbuzné linie (rozdíl do 3,5 % u genu pro COI), i když tento výsledek může ovlivnit výrazná blízkost ekdyze samice, která vede k vyšší tendenci k páření, včetně toho s více geneticky divergentními partnery (Galipaud et al., 2015). Mezi příslušníky odlišných „kryptických" linií může být také rozdíl v celkové velikosti těla samců, daný například působením predačního tlaku. Středně velcí jedinci mohou být pod tlakem predace při páření stejně úspěšní jako velcí jedinci, protože ti trpí predací nejvíce (Wellborn & Bartholf, 2005). Je třeba otestovat, zda uvedená zjištění, týkající se existence prezygotických reprodukčních bariér mezi příslušníky geneticky vzdálených linií platí všeobecně v rámci druhového komplexu *G. fossarum*, a to i u recentně objevených a geneticky divergentnějších linií ze Západních Karpat.

2 Cíle práce

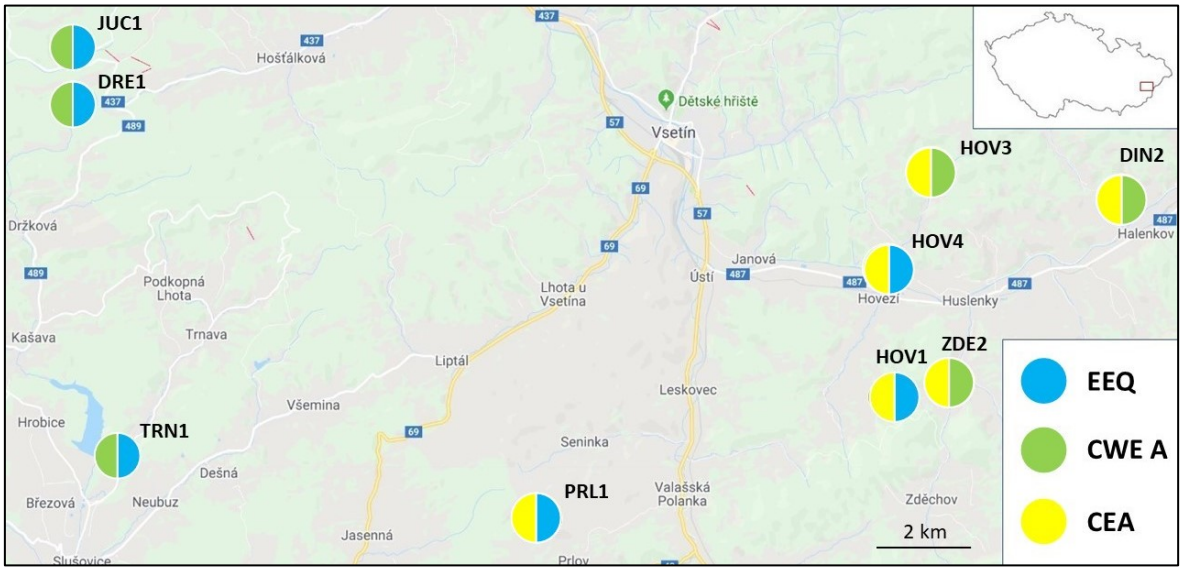
Cílem mé práce je prozkoumat některé ekologické interakce mezi třemi syntopicky se vyskytujícími liniemi druhového komplexu *Gammarus fossarum* v oblasti Vsetínska (Západní Karpaty). Jak již jsem psal v úvodu, tuto oblast jsem zvolil na základě předchozího výzkumu v našem týmu (Rutová, 2018) a věděl jsme tedy, že na mnou vybraných lokalitách dochází ke kontaktu alespoň dvou linií. Chtěl jsem otestovat, zda na poměrně hrubé škále (rychle versus pomalu tekoucí úsek toku) existují rozdíly v distribuci linií, které by naznačovaly diverzifikaci jejich nik. Další zkoumanou otázkou bylo, zda mezi liniemi existuje prezygotická reprodukčí bariera, jak předpokládáme na základě doposud provedených výzkumů na jiných liniích v rámci druhového komplexu *Gammarus fossarum* ze západní Evropy. Ve své práci jsem testoval dvě hlavní hypotézy:

1. Jedinci z odlišných linií v rámci toku, kde se vyskytují společně, preferují odlišný (meso)habitat.
2. Mezi příslušníky odlišných linií existuje preference pro partnery ze stejné linie (tj. prezygotická reprodukční bariera).

3 Metodika

3.1 Výběr lokalit a sběr vzorků

Pro zkoumání habitatových a párovacích preferencí mezi liniemi jsem zvolil 9 lokalit v povodí Moravy na Vsetínsku (obr. 4). Podle předchozího výzkumu Terezy Rutové, založeném na molekulární identifikaci 2-7 jedinců na lokalitu, dochází na těchto lokalitách ke kontaktu alespoň dvou linií (Rutová, 2018). Lokality jsem vybral tak, abych pokryl všechny možné kombinace kontaktu mezi liniemi EEQ, CWE A a CEA, a to ve třech nezávislých replikátech (kódy lokalit jsem převzal od Terezy Rutové). Z těchto 9 lokalit jich byla většina na odlišných potocích. Výjimku tvoří dvě odběrová místa (HOV3 a HOV4) na toku Hovízky, která od sebe byla vzdálena přes 2 kilometry a na nichž byla detekována koexistence různých dvojic linií. Za zmínku stojí větší toky, skrze které mohla být odběrová místa propojena. Toky Dinotice (DIN2), Hovízky (dvě lokality HOV3 a HOV4), Zděchovka (ZDE2), Prlovský potok (PRL1) a Hořanský potok (HOV1) náleží do povodí Vsetínské Bečvy. Potok Trnávka (TRN1) ústí do dalšího potoku, na kterém probíhal můj výzkum, a to do Dřevnice. Lokality na těchto dvou tocích jsou od sebe ovšem vzdálené přes 10 kilometrů. Dřevnice (DRE1) ústí do řeky Moravy. Poslední lokalita Juhyně (JUC1) se vlévá do Bečvy, která následně ústí také do řeky Moravy.



Obr. 4 – mapa mnou studovaných lokalit na Vsetínsku a předpokládaná přítomnost linií na základě dat Terezy Rutové (Rutová, 2018). Barevné výseče v bodech nepředstavují poměry linií, ale označují pouze potvrzenou přítomnost dané linie na lokalitě. Pro přehlednost jsou linie zde i ve zbytku práce graficky odlišeny barvami: linie EEQ modře, CWE A zeleně a CEA žlutě.

Vzorky jsem sbíral dvakrát ročně (na jaře a na podzim) a v rámci každé lokality jsem odlišoval dva kontrastní „mesohabitaty“, které jsem označoval jako tůň a proud. Tůň byla oproti proudivému úseku pomaleji tekoucí a většinou obsahovala na dně větší množství rostlinného detritu. V rámci každé lokality jsem vždy vybral nejkontrastnější místa odběru, která ovšem byla vždy blízko u sebe (cca do 15 metrů, většinou však méně). Mesohabitaty jsem odlišoval hlavně na základě hloubky toku a rychlosti proudu, spíše než podle šířky toku anebo množství rostlinného opadu (obr. 4). Abych mohl habitaty kvantitativně odlišit, zaznamenával jsem u každého odběru šířku, hloubku a rychlost proudu, kterou jsem odhadoval na základě času, za který plovoucí objekt na hladině (prázdná lahvička na vzorky) urazí jeden metr. Naměřené proměnné jsou shrnuty v příloze 1.

Obr. 4 – konkrétní příklad pomalu tekoucího habitatu (vlevo) a rychle tekoucího úseku (vpravo) na potoce Hovízky (lokalita HOV3). Kontrast v mesohabitatech je zde v šířce toku a v rychlosti proudu, ale dostupnost rostlinného opadu (předpokládaného hlavního potravního zdroje) je na obou místech vysoká.

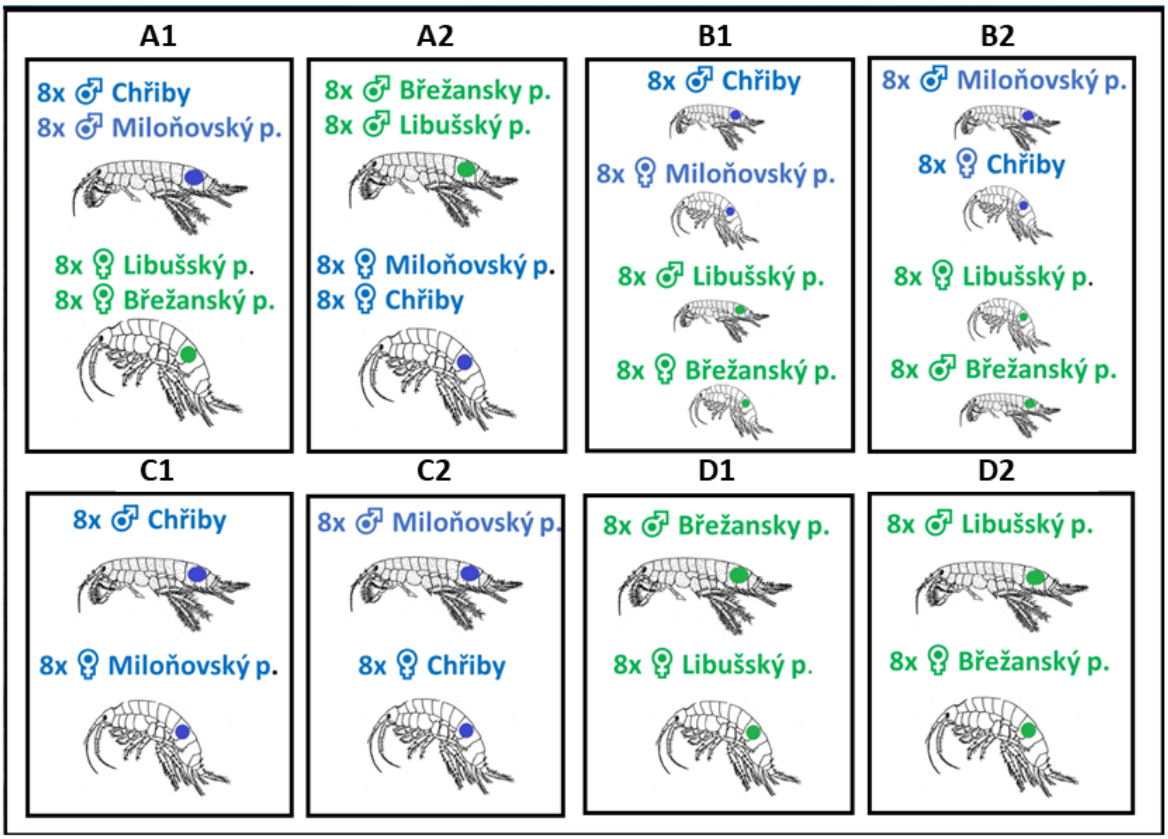
Při každé návštěvě lokality jsem se snažil odebrat minimálně 20 blešivců na mesohabitat pro zkoumání habitatových preferencí (a poměru linií na lokalitě). Na každé lokalitě jsem se také snažil odchytit 14 prekopulačních párů, ideálně z každého mesohabitatu 7. Při podzimních odběrech však reprodukční sezóna obvykle již skončila a nebylo možné páry odebrat. Očividně parazitované jedince jsem do výše zmíněných sběrů nezahrnul. Na lokalitě Dřevnice (DRE1) mezi podzimem 2017 a jarem 2018 došlo k výrazné změně toku vlivem úprav koryta, takže nebylo možné dodržet vzorkování na naprosto stejném úseku toku. Ke konzervaci vzorků jsem používal 96% etanol.

3.2 Párovací pokus v akvarijních podmínkách

Kromě sběru párů z oblastí s ověřeným kontaktem dvou linií jsem se pokusil i o pilotní akvarijní experiment, jehož cílem bylo hlavně vyzkoušet proveditelnost převozu a udržení párů v kontrolovaných podmínkách. Na základě předběžných výsledků (do 5 molekulárně určených jedinců na lokalitu) jsem vytipoval 3 potoky s předpokládaným výskytem pouze jedné linie. Jednalo se o dva pražské toky Libušský potok (LIB, souřadnice: 50°00'16", 14°25'19") a Břežanský potok (BRE, 49°58'11", 14°24'10") s předpokládaným výskytem linie CWE A a v oblasti Vsetínska o Miloňovský potok (MIL, 49°23'08", 18°19'25") s předpokládaným výskytem linie EEQ. Další potok s předpokládaným výskytem této linie byl zvolen na základě odhadu z mapy rozšíření linií na velké geografické škále (Copilaş-Ciocianu et al., 2017) u obce Zástřizly na západních svazích pohoří Chřiby (CHR, 49°8´28", 17°13´52"). V rámci výše zmíněných potoků jsem souběžně se sběrem párů odebral i jedince na přesnější určení výskytu linií na těchto lokalitách.

Z každé lokality jsem ve dnech 6. – 7. 5. 2018 odebral 100 párů a spolu s malým množstvím organického detritu ze dna potoka jsem je převezl v plastových boxech do Prahy. Přepravky byly prokysličovány přenosným vzduchovacím přístrojem. Po převozu jsem nechal přepravky stát v místnosti, kde jsem následně mezi 10. a 11. 5. 2018 prováděl pokus.

Několikadenní prodlevu mezi odběry a pokusem jsem zvolil kvůli aklimatizaci zvířat na laboratorní podmínky, a také abych zjistil, jestli je možné páry uchovat po několik dní, než se začne s pokusy. Teplota místnosti i vody byla přibližně 17 °C a osvětlení bylo nastaveno na 14 hodin světla a 10 hodin tmy. Design experimentu jsem zvolil tak, abych otestoval ochotu vytvářet prekopulační páry za třech odlišných podmínek. První varianta byla bez přístupu k partnerovi ze stejné linie (obr. 5, A). Druhou plánovanou možností byla situace, kdy měli být k dispozici partneři z obou linií ve shodném poměru (obr. 5, B). Kontrolní skupiny umožňovaly pouze párování s příslušníky stejné linie, ale odlišné lokality (obr. 5, C a D). Pro každou z uvedených skupin existovala varianta s jiným původem použitých jedinců, což byl důvod, proč jsem blešivce odebíral z více potoků, abych měl jistotu, že případné pozorované jevy budou platné mezi liniemi, a nikoliv pouze mezi populacemi. Samce od samic jsem odlišoval podle pozice v páru (samec je přichycen z dorzální strany samice).



Obr. 5 – design pilotního párovacího experimentu. Jedinci linie CWE A jsou označeni zeleně. Jedinci, u kterých jsme předpokládali linii EEQ, jsou označeni modře. Skupina A obsahující blešivce s přístupem pouze k partnerovi z odlišné linie. Skupina B s přístupem k partnerovi ze stejné i z jiné linie a pokusné skupiny C a D jsou kontrolní skupiny pro párování mezi jedinci ze stejné linie.

Po proběhnutí experimentu jsem z každého pokusného akvária odebral a individuálně zafixoval vzniklé páry a zbylé nespárované přeživší jedince jsem dal do směsného vzorku, abych mohl zpětně geneticky ověřit příslušnost všech jedinců v experimentu ke konkrétní linii. Teoreticky by šlo zpětně zjistit na základě morfologie i pohlaví zbylých jedinců, ale jelikož jsem jedince do pokusných skupin dával rozdělením právě probíhajících párů, předpokládám, že je poměr pohlaví 50:50. Pro sběr párů, aniž by se rozpadly, se ukázala jako nejúčinnější metoda vysátí plastovou trubicí o šířce přibližně 1 cm. Blešivce z experimentu jsem konzervoval pomocí 96% etanolu.

3.3 Izolace DNA

Z každého zpracovaného jedince jsem odebral na dorzální straně těla přibližně 1 mm^3 tkáně (převážně svalové), kterou jsem následně nechal vyschnutím na vzduchu zbavit etanolu. Zbytek blešivce jsem následně uchoval v 96% etanolu pro případné další zpracování. Mezi různými

jedinci jsem nástroje sterilizoval pomocí 30% roztoku peroxidu vodíku. Tkáň jsem poté vložil do směsi extrakčního pufru H3 s obsahem proteinázy K o objemu 200 µl (Schwenk et al., 1998). Vzorky jsem nechal přes noc inkubovat při teplotě 60 °C ve vodní lázni. Druhý den ráno jsem proteinázu K v izolátech zdenaturoval zahřátím na 95 °C po dobu 10 minut. DNA izoláty jsem skladoval v lednici při teplotě okolo 4 °C. Izoláty, u nichž jsem již určil genetickou příslušnost, jsem dlouhodobě skladoval při −20 °C.

3.4 PCR a elektroforéza

Molekulární identifikaci blešivců do jednotlivých linií (EEQ, CWE A a CEA) jsem prováděl převážně pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s využitím liniově specifických primerů pro mitochondriální gen pro velkou ribozomální podjednotku 16S, navržených pro práci v této geografické oblasti v diplomové práci T. Rutové (Rutová, 2018). Všechny liniově specifické primery využívají jako druhý primer v páru „univerzální“ primer 16Sbr (Palumbi et al., 2002). Očekávaná délka výsledných fragmentů je u linie EEQ 50 bp a u linií CWE A a CEA přibližně 200-300 bp (Rutová, 2018). Většinu vzorků jsem testoval v reakcích na detekci všech tří linií. Díky tomu jsem zjistil, že výjimečně může dojít k chybné identifikaci – celkem sedm vzorků amplifikovalo DNA při použití primerů jak pro linii CWEA, tak i CEA. Na základě sekvencí příslušného úseku genu pro 16S rRNA příslušných jedinců jsem proto upravil sekvence používaných primerů (tab. 1), aby k obdobným záměnám nedocházelo. Zároveň jsem ověřil všechny potenciálně sporné vzorky za pomocí nových specifických primerů anebo sekvenace 323 bp dlouhého fragmentu genu pro 16S rRNA (viz níže).

V případě, že DNA izolát nebyl amplifikován žádným z liniově specifických primerů, pokusil jsem se použít kombinaci univerzálních primerů pro 16S rRNA 16STf (Macdonald et al., 2005) a 16Sbr (Palumbi et al., 2002), jež byla úspěšně používána v předchozím výzkumu tohoto druhového komplexu (Copilaş-Ciocianu et al., 2017), viz tab. 1, a výsledný 323 bazí dlouhý fragment osekvenovat. Pakliže nebyla amplifikace úspěšná, vyzkoušel jsem ještě amplifikaci genu pro cytochrom oxidázu I s párem primerů UCOIF a UCOIR (Costa et al., 2009), které byly také dříve úspěšně používané při studiu tohoto druhového komplexu (Rutová, 2018). V případě neúspěchu všech výše uvedených analýz jsem zopakoval izolaci DNA z daného jedince, ovšem pouze u vzorků z výzkumu (meso)habitatových preferencí, nikoliv u spárovaných jedinců.

Gen	Typ	Pro linii	Název primeru	Sekvence 5´-3´
16S	Spec. primery	CWEA	CWEA_GR_PKB2_fwd	GAT GAA GGG TTA AAC AGG CTG
			16Sbr	CCG GTT TGA ACT CAG ATC ATG T
		EEQ	EEQ_BL_fwd	AAG AGG TCT ATA TGA AGA AGT AGG C
			16Sbr	CCG GTT TGA ACT CAG ATC ATG T
		CEA	CEA_YL_PKB2_fwd	TGA AGG TTA AAC AGA TTA AGG TGG
			16Sbr	CCG GTT TGA ACT CAG ATC ATG T
	Obecné p.		16STf	GGT AWH YTR ACY GTG CTA AG
			16Sbr	CCG GTT TGA ACT CAG ATC ATG T
COI			UCOIF	TAW ACT TCD GGR TGR CCR AAA AAY CA
			UCOIR	ACW AAY CAY AAA GAY ATY GG

Tab. 1 – přehled sekvencí použitých primerů.

Objem reakční směsi pro PCR byl obvykle 25 µl. Směs pro specifické primery obsahovala: 1,5 mM $MgCl_2$, PCR pufr s KCl, 0,2 mM směs deoxyribonukleotid trifosfátů (dNTP), 0,3 µM obou primerů, 0,625 jednotky Taq DNA polymerázy (výrobce: Thermo Fisher Scientific Inc.), 1 µl DNA izolátu a zbytek objemu byl doplněn sterilní PCR vodou.

PCR protokol, převzatý od Terezy Rutové, pro linie EEQ a CWE A obsahoval počáteční denaturaci po dobu 2,5 minuty při 94 °C. Poté následovalo 40 cyklů denaturace (40 vteřin při 94 °C), nasedání primerů (40 vteřin při 62 °C) a prodlužování (1 minuta 20 vteřin při 65 °C). Závěrečné prodlužování trvalo 8 minut při 65 °C. Program pro linii CEA i pro všeobecné 16S primery pro sekvenaci byl stejný, pouze teplota pro nasedání u CEA primerů byla vyšší (64 °C), zatímco teplota nasedání všeobecných primerů byla nižší (46 °C). Poměrně vysokou teplotu pro nasedání liniově specifických primerů jsem používal, aby spíše nedošlo k amplifikaci než k chybné identifikaci linie, kvůli nespecifickému přisednutí primerů. Při pokusech o amplifikaci úseku genu COI byl použit protokol používaný v předchozím výzkumu (Rutová, 2018): počáteční denaturace 5 minut při 95 °C, 37 cyklů denaturace (50 vteřin při 95°C), nasedání primerů (50 vteřin při 47 °C) a prodlužování (50 vteřin při 72 °C). Závěrečné prodlužování trvalo 5 minut při 72 °C.

Výsledek PCR reakce jsem následně ověřil pomocí agarozové elektroforézy v TBE (Tris/Borate/EDTA) pufru.

3.4 Purifikace a sekvenace

PCR produkty z amplifikace 16S rDNA, které bylo třeba odeslat na sekvenaci, jsem předem enzymaticky přečistil pomocí kitu ExoSap-IT. K 5 µl PCR produktu jsem přidal 1 µl sterilní

PCR vody a 1 µl ExoSap-IT (jedná se o poloviční množství, než je doporučeno v oficiálním protokolu a toto snížení je kompenzováno zdvojnásobením doby inkubace v termocykleru). Vzorky jsem nechal kultivovat v termocykleru po dobu 30 minut při 37 °C a následně 30 minut při 80 °C. Vzorky jsem poslal na sekvenaci do Laboratoře sekvenace PřF UK v Biocevu, kde byly zpracovány na kapilárovém sekvenátoru ABI 3130XL Prism Genetic Analyzer. Všechny sekvenace byly provedeny pouze v jednom směru s pomocí 16STf primeru.

Kontrolu kvality výsledných sekvencí sem prováděl v programu Chromas (verze 2.6.6.0), stejně tak jako nutné editace a ořezávání oblastí nasedání primerů. Pomocí MEGA7 (verze 1.0.0.0) jsem zkontrolované sekvence sloučil do alignmentu spolu s referenčními vzorky. Dendrogram umožňující snadné zařazení vzorků do jednotlivých linií jsem zkonstruoval pomocí metody Neighbor-Joining.

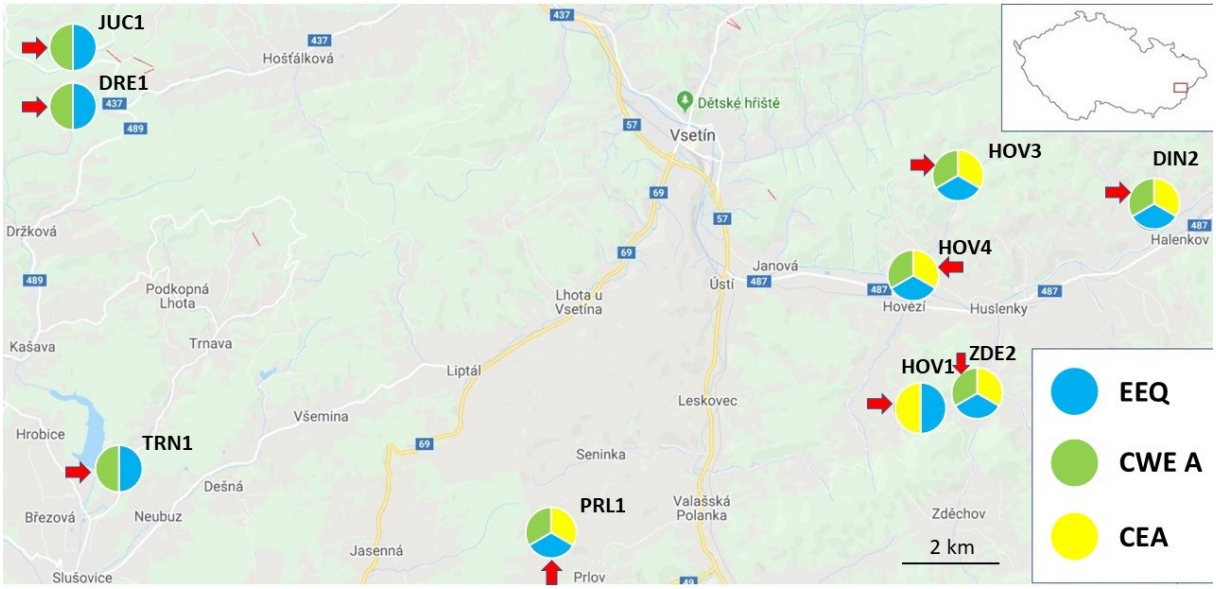
3.5 Zpracování dat

Ke zpracování dat jsem využil statistický programovací jazyk a prostředí R (verze 3.5.1.). K porovnání poměrů linií jsem použil Fisherův exaktní test (funkce: fisher.test()). Před analýzou možných rozdílů v habitatových preferencích jsem otestoval, zda dochází v čase (napříč sezónami) k významným změnám v poměrech linií (na každé konkrétní lokalitě, pro oba habitaty zvlášť). Následně jsem porovnával poměry linií na lokalitách mezi habitaty tůň a proud, a to pro každou sezónu zvlášť. Korekci hodnoty p na vícečetné testy jsem provedl pomocí Holm-Bonferroniho korekce (funkce: p.adjust(p, method = “holm“)). Celkem bylo provedeno 24 testů na rozdíly v preferencích pro mesohabitat a 8 testů pro změny v distribuci v souvislosti s časem pro mesohabitat „tůň“ a 8 testů pro mesohabitat „proud“. Preference pro párování blešivců v přirozených podmínkách jsem otestoval porovnáním poměrů jedinců na základě jejich linie a linie jejich partnera (opět Fisherův exaktní test).

4 Výsledky

4.1 Kontakt linií na studovaných lokalitách

V rámci 9 lokalit s předpokládaným kontaktem alespoň dvou linií jsem celkově úspěšně určil 427 jedinců odebraných z obou kontrastních mesohabitatů (spárovaní jedinci nejsou zahrnuti). Z toho 332 jedinců bylo identifikováno pomocí specifických primerů a 95 jedinců pomocí sekvenace. U 5 vzorků selhala analýza i po opakované izolaci DNA. Při detailnějším zkoumání lokalit jsem zjistil, že minimálně na pěti z devíti lokalit se současně syntopicky vyskytují nikoliv předpokládané dvě, ale dokonce všechny tři studované linie (obr. 6). Jedna z linií se na lokalitě vždy dala jasně označit jako dominantní s výskytem nad 64 % (tab. 2). Na všech tocích byly nalezeny linie, které jsme na základě předchozích výsledků očekávali.



Obr. 6 – mapa výskytu odlišných linií na lokalitách s původně předpokládaným výskytem pouze dvou linií (barevné segmenty označují pouze potvrzený výskyt linie, nikoliv poměr těchto linií). Červené šipky označují linii, která měla na dané lokalitě dominantní podíl (nad 64 %).

Lokalita	Kód	CWE A	CEA	EEQ	Celkem
Juhyně	JUC1	**36** (80 %)		**9** (20%)	**45**
Dřevnice	DRE1	**30** (64 %)		**17** (36 %)	**47**
Trnávka	TRN1	**39** (81 %)		**9** (19 %)	**48**
Prlovský p.	PRL1	**6** (12 %)	**9** (19 %)	**33** (69 %)	**48**
Hořanský p.	HOV1		**48** (100 %)	viz popis	**48**
Hovízky	HOV4	**4** (8 %)	**41** (87 %)	**2** (4 %)	**47**
Hovízky	HOV3	**36** (75 %)	**8** (17 %)	**4** (8 %)	**48**
Zděchovka	ZDE2	**32** (67 %)	**12** (25 %)	**4** (8 %)	**48**
Dinotice	DIN2	**39** (81 %)	**8** (17 %)	**1** (2 %)	**48**

Tab. 2 – shrnutí celkového počtu úspěšně určených jedinců na lokalitu napříč sezónami. Analyzovaní jedinci z mesohabitatů na lokalitě Hořanský potok (HOV1) náleželi všichni pouze k linii CEA, ale při zkoumání spárovaných jedinců se našli 4 příslušníci linie EEQ. Procenta jsou zaokrouhlena na celá čísla.

4.2 Časové (sezónní) změny v poměrech linií na lokalitách

Na většině zkoumaných lokalit byly poměry linií v čase stabilní (tab. 3). Lokalitu Hořanský potok (HOV1) jsem ze zkoumání změn v čase vynechal, protože jsem v mesohabitatových vzorcích nalezl jenom jedince z linie CEA (byť analýza dalších jedinců potvrdila i výskyt linie EEQ). Na lokalitě Prlovský potok (PRL1), v rámci habitatu „tůň“, došlo ke změnám distribuce linií v čase, a to i po Holm-Bonferroniho korekci na vícečetné testy ($p = 0,01$). V rámci Prlovského potoka se zdá (ovšem pouze v habitatu „tůň“), že na podzim roku 2017 byl vyšší výskyt linie CWE A a v následujících sezónách převládala linie EEQ (v rámci habitatu „proud“ převládala linie EEQ ve všech sezónách a žádné signifikantní rozdíly jsem nepozoroval). U lokality Trnávka (TRN1), opět v rámci habitatu „tůň“, jsem pozoroval trend k časovým změnám, pravděpodobně díky odchylce v datech na podzim 2017, kdy jsem v rámci tohoto habitatu u této lokality pozoroval zvýšený výskyt linie EEQ (před korekcí byl test signifikantní, $p = 0,01$, ale po korekci již nikoliv, $p=0,09$). Lokality Dinotice (DIN2, p před korekcí 0,07, po korekci 0,36) a Hovízky (HOV3, p před korekcí 0,05 a po korekci 0,34) v rámci habitatu „tůň“ také obsahují jisté fluktuace v zastoupení linií mezi sezónami, i když v obou těchto případech již rozdíly nebyly signifikantní ani před korekcí na vícenásobné testování.

4.3 Mesohabitatové preference

Všechny rozdíly v mesohabitatových preferencích vyšly nesignifikantní již před korekcí na vícečetné testy, a to s jedinou výjimkou. Na lokalitě Trnávka (TRN1) jsem v jednom případě, na podzim 2017, pozoroval naprosto obrácený poměr mezi liniemi v tůni a v proudném úseku. V rámci této sezóny v tůni převládala linie EEQ, zatímco v proudu linie CWE A. V následujících sezónách ovšem již vždy převládala linie CWE A (v obou typech mesohabitatů). Na dalších dvou lokalitách s výskytem stejných linií (CWE A a EEQ) Dřevnice (DRE1) a Juhyně (JUC1) vždy převládala linie CWE A, a to v obou typech mesohabitatů. Ve všech sezónách se u těchto dvou lokalit preference linií pro tůň a proud signifikantně nelišily (tab. 3).

			Tůň			Proud			Habitatové pref.		CWEA
	Kód	Sezóna	CWE A	CEA	EEQ	CWE A	CEA	EEQ	p	pK	CEA
Předpoklad: CWE A + EEQ		podzim 2017	6		1	6		2	1	1	
		jaro 2018	7		1	7		1	1	1	
		páry jaro 2018	6			5		1			
		podzim 2018	6			4		4	0,08	1	
	JUC1	Časové změny	p = 1; pK = 1			p = 0,40; pK =1					
		podzim 2017	6		1	6		2	1	1	
		jaro 2018	4		4	5		3	1	1	
		páry jaro 2018	6		1	6		1			
		podzim 2018	4		4	5		3	1	1	
	DRE1	Časové změny	p = 0,36; pK = 1			p = 1; pK = 1					
		podzim 2017	2		6	8			0,006*	0,16	
		jaro 2018	7		1	8			1	1	
		páry jaro 2018	3		1	5					
		podzim 2018	7		1	7		1	1	1	
	TRN1	Časové změny	p = 0,01*; pK = 0,09			p = 1; pK = 1					
Předpoklad: CEA + EEQ		podzim 2017	4	2	2		2	6	0,07	1	
		jaro 2018		1	7		3	5	0,56	1	
		páry jaro 2018	1	2	3			5			
		podzim 2018			8	2	1	5	0,2	1	
	PRL1	Časové změny	p = 0,001*; pK = 0,01*			p = 0,44; pK = 1					
		podzim 2017		8			8		x	x	
		jaro 2018		8			8		x	x	
		páry jaro 2018		7			5	2			
		podzim 2018		8			8		x	x	
	HOV1	Časové změny	x ; x			x ; x					
		podzim 2017		7			8		1	1	
		jaro 2018	2	5	1	1	7		0,56	1	
		páry jaro 2018		4	2		4				
		podzim 2018		7	1	1	7		1	1	
	HOV4	Časové změny	p = 0,39; pK = 1			p = 1; pK = 1					
Předpoklad: CWE A + CEA		podzim 2017	5	3		6	1	1	0,56	1	
		jaro 2018	5		3	7	1		0,2	1	
		páry jaro 2018	1	3	1	4	2				
		podzim 2018	6	2		7	1		1	1	
	HOV3	Časové změny	p = 0,05; pK = 0,34			p = 1; pK = 1					
		podzim 2017	4	4		6	2		0,60	1	
		jaro 2018	4	1	3	5	2	1	0,64	1	
		páry jaro 2018	5	1		6	1				1
		podzim 2018	6	2		7	1		1	1	
	ZDE2	Časové změny	p = 0,14; pK = 0,59			p = 0,83; pK = 1					
		podzim 2017	8			8			1	1	
		jaro 2018	4	3	1	8			0,07	1	
		páry jaro 2018	3	1		3					
		podzim 2018	4	4		7	1		0,28	1	
	DIN2	Časové změny	p = 0,07; pK = 0,36			p = 1; pK = 1					

Tab. 3 – podrobně rozepsaný výskyt linií napříč sezónami a vzhledem k odlišným mesohabitatům u všech lokalit, doplněný o určené páry ze sezóny jaro 2018 (jediný smíšený pár uvedený v posledním sloupci náleží k mesohabitatu „tůň“). Zkratkou p označuji p-hodnotu testu před korekcí na vícečetné testy a pK označuji hodnotu po Holm-Bonferroniho korekci na vícečetné testy. Písmeno x označuje neprovedení testu, protože postrádal smysl (například výskyt pouze jedné linie napříč všemi sezónami u lokality HOV1). Testy pro změny v čase a habitatové preference jsou počítány pouze na základě nespárovaných jedinců.

4.4 Párovací preference v přirozených podmínkách

Celkem se mi podařilo úspěšně určit 102 ze 126 odebraných párů (204 jedinců, 145 specifickými primery a 59 pomocí sekvenace). 30 jedinců ze zbylých 24 párů se určit nepodařilo (pravděpodobně kvůli špatné izolaci DNA). Všechny páry, s výjimkou jediného smíšeného páru z lokality Zděchovka (ZDE2), byly tvořeny jedinci stejné linie (tab. 4). Tento pár náležel do habitatu „tůň“ (samec z linie CWE A a samice z linie CEA). Blešivci se tedy nepárují náhodně, ale preferenčně s příslušníky stejné linie (Fisherův exaktní test, $p < 0{,}001$).

Název	Kód	CWE A páry	CEA páry	EEQ páry	CWE A + CEA	Celkem
Juhyně	JUC1	**11**		**1**		**12**
Dřevnice	DRE1	**12**		**2**		**14**
Trnávka	TRN1	**8**		**1**		**9**
Prlovský p.	PRL1	**1**	**2**	**8**		**11**
Hořanský p.	HOV1		**12**	**2**		**14**
Hovízky	HOV4		**8**	**2**		**10**
Hovízky	HOV3	**5**	**5**	**1**		**11**
Zděchovka	ZDE2	**11**	**2**		**1**	**14**
Dinotice	DIN2	**6**	**1**			**7**

Tabulka 4 – shrnutí všech párů, u kterých se podařilo určit oba jedince v prekopule.

4.5 Párovací experiment

V rámci párovacího pokusu vzniklo celkem 25 párů, z nichž se 1 nepodařilo molekulárně určit. Je nutno zmínit, že na základě testů jedinců odebraných z potoků souběžně s páry nebyl dodržen předpoklad, že lokality, z nichž byli jedinci odebraní, obsahují pouze jednu linii. U lokality Chřiby (CHR) se nalezla i linie CWE A (3 jedinci), a jelikož jsem pouze ověřoval, jestli jsou studované toky s výskytem jen jedné linie, netestoval jsem již zbylé vzorky na linii EEQ. Vzhledem k výsledkům uvedeným níže ale předpokládám, že linie EEQ tvoří přesto na lokalitě Chřiby většinový podíl. Zbylé tři potoky na základě určení různého množství jedinců působí

dojmem, že se v nich vyskytuje jenom jedna linie. Libušský potok (LIB) s celkem 13 určenými jedinci (linie CWE A) a Březanský potok celkem s 19 jedinci (CWE A). Tyto dvě lokality jsou navíc v oblasti Čech (konktrétně v Praze) a v tomto regionu je zřejmá dominance této linie (Copilaş-Ciocianu et al., 2017). Lokalita Miloňovský potok (MIL) byla vzhledem ke své poloze (výskyt v rámci kontaktní oblasti více linií na Vsetínsku) zkoumána důkladněji. Bylo z ní určeno 41 jedinců a všichni náleželi do linie EEQ.

V rámci každého akvária se celkem mohlo zformovat až 8 párů. V kontrolních skupinách s předpokládaným výskytem pouze jedné z linií se zformovaly pouze páry mezi jedinci ze stejné linie (tab. 5, skupiny C1 a C2 pro linie EEQ a skupiny D1 a D2 pro linii CWE A). Ve skupině, kde neměli mít blešivci možnost volby a měli mít přístup pouze k partnerovi z jiné linie, došlo skutečně ke vzniku pouze smíšených párů (tab. 5, skupiny A1 a A2). Při nabídnutí partnera z obou linií došlo k vytvoření jak párů v rámci jedinců stejné linie, tak i ke zformování smíšených párů (tab. 5, B1 a B2). Bohužel jsem z časových důvodů zvládl určit nespárované jedince jenom u dvou akvárií, kde měli mít blešivci přístup k partnerům z obou linií (tab. 5, B1 a B2). Poměry linií v akváriích měly být 16:16. V prvním replikátu vznikly 3 páry (1 se samcem i samicí z linie EEQ, a 2 kombinace CWE A a EEQ, v jednom případě byl samec z linie EEQ, a v tom druhém zase z linie CWE A). Poměry linií v tomto akváriu byly CWE A 12:14 EEQ (3 jedinci nebyli pomocí specifické PCR určeni a 3 uhynuli před koncem experimentu). V druhém replikátu vznikly také 3 páry, ovšem pouze mezi příslušníky stejné linie (1 pár CWE A a 2 páry EEQ). Poměry v tomto akváriu byly CWE A 14:14 EEQ (4 jedince se nepodařilo určit specifickými primery a k mortalitě v rámci tohoto akvária nedošlo).

Skupina	CWE A páry	EEQ páry	Smíšené páry	CWE A jedinci	EEQ jedinci	Zbytek
A1			3			27
A2			5			22
B1		1	2	10	10	3
B2	1	2		12	10	4
C1		2				28
C2		3				26
D1	2					28
D2	4					24

Tab. 5 – shrnutí výsledků pilotního párovacího pokusu mezi liniemi CWE A a EEQ. Značení těchto skupin koresponduje s designem experimentu na obr. 5 v metodice.

5 Diskuze

5.1 Zastoupení linií na lokalitách a možné časové změny

Tato práce značně upřesnila naši představu o distribuci a koexistenci linií EEQ, CEA a CWE A v kontaktní zóně v Západních Karpatech. Linie CWE A a EEQ jeví podle genetických ukazatelů známky recentní geografické expanze a výskyt těchto linií je zaznamenán až na území Českého masivu (Copilaş-Ciocianu et al., 2017). Lokality s výskytem pouze těchto dvou linií byly posunuty více na západ (10 km od nejbližší lokality Prlovský potok (PRL1)) od ostatních lokalit směrem k Českému masivu. Jedná se o toky Juhyně (JUC1), Dřevnice (DRE1) a Trnávka (TRN1). Jak píšu na začátku metodiky, na rozdíl od zbylých šesti lokalit se tyto tři toky vlévají do větších řek Bečvy a Moravy. Ostatních 6 východněji položených lokalit je v povodí Vsetínské Bečvy. Na pěti z těchto šesti lokalit byl nalezen výskyt třetí linie (k původním dvěma předpokládaným) (Rutová, 2018). Je možné, že zatímco větší řeka (například Morava) může působit pro blešivce potočního jako určitá migrační bariera (např. v důsledku vysoké predace ryb či nevyhovujícího habitatu), menší tok, jako Vsetínská Bečva, může naopak sloužit jako koridor pro případnou disperzi a rekolonizaci.

Výjimku z těchto lokalit spadajících do povodí Vsetínské Bečvy tvoří lokalita Hořanský potok (HOV1), kde ze 48 určených jedinců vzorkovaných z mesohabitatů byli všichni identifikovaní jako příslušníci linie CEA a až při analýze dalších 28 jedinců v rámci zkoumání prekopulačních párů se podařilo najít 4 příslušníky linie EEQ. Absenci třetí linie a naprosto dominantní zastoupení linie CEA vůči linie EEQ na lokalitě Hořanský potok (HOV1) si vysvětluji izolovaností tohoto odběrového místa. Tato lokalita je totiž relativně blízko pramene (přibližně 400 metrů), jedná se o malý potok s pravděpodobně velký rizikem alespoň částečného vyschnutí a je těsně nad silnicí, pod kterou je potok vedený rourou, ze které následně voda vytéká asi jeden a půl metrovým pádem. Protiproudovou migraci například po částečném vyschnutí si proto u této lokality umím představit jen velmi těžko. Je zajímavé, že Tereza Rutová ve své práci na základě 4 jedinců nalezla přítomnost linie EEQ (1 jedinec). Buďto se jedná o náhodu, nebo mohl tento úsek toku od roku 2016 do podzimu 2017 (kdy jsem prováděl první odběry já) projít fluktuací některých parametrů, která mohla vyústit ve větší převahu linie CEA. Tento příklad ilustruje, že poměry linií na lokalitách mohou být velmi nevyvážené.

Tento poznatek je zajímavý nejen z hlediska výzkumu koexistence linií, ale například i z pohledu ověřování potoků jako zdrojů taxonomicky homogenního materiálu (tj. „čisté linie“) pro případné budoucí experimenty. Ověřování homogenity populací v oblasti, kde se vyskytuje

více linií, rozhodně potřebuje otestování velkého množství vzorků, a i tak je potřeba uchovávat všechny použité jedince pro možnost zpětného určení linie pomocí molekulárních technik.

Ohledně ostatních lokalit napojených na Vsetínskou Bečvu (s výskytem všech tří studovaných linií) je třeba posoudit, jestli na těchto lokalitách došlo ke změnám ve složení společenstva anebo jestli tyto linie jednoduše nebyly podchyceny. Tereza Rutová určila maximálně sedm jedinců na lokalitu (ale obvykle méně), zatímco já (budeme-li uvažovat pouze nespárované jedince) jsem se snažil určit 48 jedinců na lokalitu. Dvě linie, které pozorovala Rutová, byly ve čtyřech z pěti případů také první a druhou nejvíce četnou linií v mých výsledcích pro danou lokalitu. Výjimku tvoří lokalita Hovízky (HOV4), kde byla podle mých dat dominantní linie CEA (43 jedinců) a linie EEQ (2 jedinci) a CWE A (4 jedinci) byly v mých datech zastoupeny ve velmi nízkém počtu. Tereza Rutová v rámci své práce na této lokalitě určila pouze 4 jedince (3 z linie EEQ a 1 z linie CEA). Vysoké zastoupení linie EEQ v jejích vzorcích by mohlo naznačovat změnu dominance linií mezi jejími a mými odběry.

Obecně platilo napříč všemi lokalitami, že jedna linie bývala dominantní (nad 30 jedinců tzn. nad 64 %) a na většině lokalit (6) to byla linie CWE A. Pakliže byla doložena přítomnost třetí linie, tato byla zastoupena ve velmi nízkém počtu (1-6 jedinců, tzn. 2-12,5 %). Vzhledem k těmto skutečnostem předpokládám, že tyto třetí linie na lokalitách byly přítomny i dříve, ale pouze vzhledem k své nízké četnosti nebyly podchyceny. Výsledek ovšem není úplně překvapivý, protože i když nebyla třetí linie dříve detekována v rámci dané lokality, vyskytovaly se všechny tři v povodí Vsetínské Bečvy a například v rámci toku Hovízky jsme u lokalit HOV3 a HOV4 předpokládali na základě dat Terezy Rutové (Rutová, 2018) výskyt jiné kombinace linií i přesto, že jsou na stejném toku pouze 2 kilometry od sebe.

Při testování mezisezónních změn v mém výzkumu jsem pozoroval průkazné změny pouze na lokalitě Prlovský potok (PRL1) v habitatu „tůň“ (p po korekci 0,01). Zdá se, že v tomto habitatu na podzim roku 2017 převládala linie CWE A, zatímco ve zbylých sezónách to již byla linie EEQ. Výsledky z proudivého úseku časové změny nepotvrzují a linie EEQ je dominantní ve všech třech sezónách. Ostatní lokality s výskytem všech tří linií se v čase průkazně nelišily ani v jednom mesohabitatu. Nejblíže signifikanci byly (opět v rámci habitatu „tůň“) lokality Dinotice (DIN2) a Hovízky (HOV3). Žádné ze změn ovšem nepůsobí konzistentně v porovnání s jinými lokalitami se společným výskytem stejných linií. Trend naznačující časové změny jsem pozoroval i u lokality Trnávka (TRN1, habitat „tůň“), a to pravděpodobně kvůli fluktuaci dat na podzim roku 2017, kdy jsem v tomto habitatu pozoroval vyšší množství linie EEQ než v ostatních sezónách. Vzhledem k relativně nízkému počtu vzorků a častému výskytu třetí linie

jsem si i přes neprůkaznost časových změn na většině lokalit netroufl slučovat jedince napříč sezónami a habitatové rozdíly jsem vyhodnocoval vždy pro každou jednotlivou sezónu na lokalitě zvlášť.

5.2 Mesohabitatové preference a distribuce v rámci toku

Rozdíly v distribuci linií mezi mesohabitaty vyšly nesignifikantně už před korelací na vícečetné testy. Jedinou výjimkou je podzim 2017 na lokalitě Trnávka (TRN1), kde před korekcí na vícečetné testy bylo $p = 0{,}006$, ale po korekci již bylo nesignifikantní ($p = 0{,}16$). Na této lokalitě se dominantně vyskytovala linie CWE A (81 %) a linie EEQ tvořila menšinový podíl (19 %). Na podzim 2017 v habitatu tůň ovšem převládala linie EEQ (6 jedinců) a linie CWE A byla v menšině (2 jedinci). V proudivém úseku pro tuto sezónu jsem nalezl pouze linii CWE A (8 jedinců) a žádného příslušníka linie EEQ.

Tento trend se neprokázal ani v následujících sezónách ani u jiných lokalit se stejným výskytem linií, kdy v kombinaci linií CWE A a EEQ ve všech ostatních případech také na lokalitách převládala linie CWE A (lokality Dřevnice, DRE1 a Juhyně, JUC1). Je možné, že se v tomto případě jednalo o pouhou náhodnou fluktuaci v datech danou nízkým množstvím zpracovaných vzorků. Navíc lokalita Trnávka (TRN1) je již poměrně velký potok (šířka přes 4 metry u tůně i proudivé oblasti) a v oblasti tůně byl tok vody v dané sezoně jenom 1,7x pomalejší než v rychle tekoucím úseku. Pakliže by se skutečně nejednalo o náhodu, ale o rozdíl v mesohabitatových preferencích, očekával bych takový výsledek spíše na lokalitě s větším kontrastem mezi mesohabitaty.

Významným problémem prezentovaných výsledků je relativně nízký počet vzorků na mesohabitat v rámci jedné sezóny a častý neočekávaný výskyt třetí linie na lokalitách. Design experimentu byl navržen tak, aby odhalil případné výrazné a mezi lokalitami konzistentní rozdíly v preferencích pro mesohabitat, což rozhodně pozorováno nebylo. Do budoucna považuji za klíčové celkově zvýšit množství určených jedinců na mesohabitat. Od takto doplněných dat si hlavně slibuji, že zpřesní údaje o potencionálních změnách ve výskytu linií na lokalitách v čase. Je možné i to, že zvýšení celkového počtu vzorků by odhalilo jemnější trendy v distribuci linií mezi habitaty, což při současném počtu pozorování jednoduše není možné. Kromě již zmíněné lokality Trnávka (TRN1) se jedná například o lokalitu Dinotice (DIN2), kdy ze začátku pokusu vyskytuje jen linie CWE A, ale v pozdějších sezónách se vyskytují ve stále větší míře i linie CEA a EEQ.

Jak již jsem psal výše, lokality na potoce Hovízky (HOV3 a HOV4) jsou na stejném potoce, s tím, že lokalita HOV4 se nalézá u ústí do většího toku (Vsetínská Bečva), zatímco lokalita HOV3 je posunutá cca 2,5 km nahoru proti proudu. Obě odběrová místa působí podle mých dat časově konzistentně, co se týče poměrů výskytu linií (i když u lokality HOV3 jsou jisté fluktuace, jak píši výše). Na obou lokalitách jsem potvrdil výskyt všech tří ze studovaných linií. Frekvence zastoupení linie EEQ je nízká na obou odběrových místech (souhrnně: HOV3 4 jedinci 8 % a HOV4 2 jedinci 4 %), ale dominantní linie se jasně změnila. Tento výsledek byl na základě dat Terezy Rutové očekávaný a potvrdil, že na relativně krátkém úseku se může rozložení linií výrazně změnit. Zatímco na lokalitě HOV4 je dominantní linie CEA (41 jedinců, 87 %), necelé 2,5 km proti proudu je to již na lokalitě HOV3 linie CWE A (36 jedinců, 75 %). Tyto poměry se jeví konzistentní v čase (viz tab. 3 v kapitole „Výsledky“). Rutová překvapivě určila na lokalitě HOV4 z celkového počtu 4 jedinců 3 příslušníky linie EEQ (podle mých výsledků nejvzácnější linie na lokalitě) a pouze jednoho jedince z linie CEA (u mě dominantní linie). To může, i když vzhledem k nízkému počtu vzorků nemusí, indikovat možné změny v poměrech linií na lokalitě v čase.

Jediným doposud testovaným faktorem potenciálně ovlivňujícím distribuci linii CWE A, CEA a EEQ je nadmořská výška, přičemž žádné rozdíly mezi liniemi nebyly pozorovány (Copilaş-Ciocianu et al., 2017). Je možné, že disproporční zastoupení linií po a proti proudu může být ovlivněno spíše náhodnými procesy, jako je například efekt priority po částečném vyschnutí toku anebo čistě na základě pořadí, ve kterém byl potok liniemi kolonizovaný (Little & Altermatt, 2018). V budoucnu by mohlo být zajímavé podívat se na potoky s koexistencí několika linií v ještě detailnějším měřítku a prostudovat poměry linií (a jejich časovou stabilitu) podél toku.

Vzhledem k tomu, že jsme blešivce vždy odebírali za denního světla, předpokládáme, že denní doba na prostorovou distribuci neměla vliv. To samé platí o rybí predaci, protože odběrová místa pro zkoumání mesohabitatů byla vždy blízko u sebe a lze na nich předpokládat stejný vliv predátorů. U některých lokalit (například toky Dřevnice anebo Hořanský potok) vliv rybí predace vzhledem k malé velikosti toku neočekávám vůbec. Z hlediska vlivu parazitů, existují lokality, jako například Zděchovka (ZDE2), kde obzvláště na podzim 2018 bylo vysoké množství jedinců infikováno vrtejši. Bylo snazší nalézat nakažené jedince než ty zdravé. Celá populace v rámci této lokality se vzhledem k vysoké prevalenci parazity může chovat odlišně a v budoucnu by určitě stála za bližší prozkoumání z hlediska dynamiky parazit/(mezi)hostitel (podobné vysoké míry nakaženosti vrtejši byly na této lokalitě pozorovány i při odběrech v roce

2019, které v této práci nejsou zahrnuty). Přestože jsem do mé práce vybíral jedince bez zjevných symptomů infekce parazity, při následném zpracovávání mých DNA izolátů Natašou Katanić se jí u značného množství mých vzorků (několik desítek případů) podařilo amplifikovat a osekvenovat DNA mikrosporidií. Nicméně nepředpokládám, že by tyto vizuálně nepostřehnutelné infekce měly výrazný vliv na prostorou distribuci blešivců.

Je důležité zmínit, že na mnou zkoumaných liniích zatím neproběhla žádná detailní morfologická analýza. Ovšem v rámci kryptických linií studovaných v (Copilaş-Ciocianu et al., 2017) byla linie EET následně popsána jako morfologický druh *Gammarus jazdzewskii* (Rudolph et al., 2018). Možné nalezení rozdílů v morfologii, obzvláště v částech (parametrech těla), které jsou spojovány s funkční morfologií (jako například velikost těla, morfologie příústních článků či ostny na dorzální straně těla) by mohly napovědět možné rozdíly v ekologii mezi těmito liniemi. Linie se sympatrickým a syntopickým výskytem by se mohly lišit v potravní ekologii, například v míře dravosti, což může korelovat i s vyššími sklony k agresivitě (IGP a kanibalismu) (Dick & Platvoet, 2000; Dick et al., 2002). Téma potravní ekologie by se dalo studovat například pomocí isotopové analýzy jedinců v tocích s kontaktem více linií (DeNiro & Epstein, 1978; MacAvoy et al., 2016).

V této práci jsem se (kromě ověřování existence prezygotické reprodukční bariéry) snažil nalézt rozdíly v mesohabitatových preferencích, které by mohly svědčit o diverzifikaci ekologických nik mezi liniemi. Tyto rozdíly jsem nepozoroval, takže je potřeba diskutovat možnost, že se linie v kontaktní zóně chovají jako ekologicky ekvivalentní druhy (druhy s velmi podobnou až identickou ekologií) a jejich distribuce je založena na základě neutrální dynamiky (Leibold & Mcpeek, 2006). Pro tuto hypotézu by mohl svědčit fakt, že míra koexistence kryptických linií na stejné lokalitě je ještě vyšší, než jsem původně předpokládal (často všechny tři studované linie), a že se navíc (alespoň podle dostupných dat z mé práce) jeví tato koexistence jako relativně stabilní v čase.

Při studiu kryptických druhů se většinou určité rozdíly v jejich morfologii anebo ekologii nakonec naleznou (Müller et al., 2000; Wellborn & Cothran, 2004; Eisenring et al., 2016), je ale otázkou, jestli jsou tyto rozdíly dostatečně velké na to, aby reálně ovlivnily distribuci a koexistenci těchto druhů, anebo jestli je převáží náhodné vlivy jako fluktuace parametrů prostředí. Takovéto fluktuace mohou vést k zmenšování populací a genetickému driftu, který může být hlavním producentem kryptické diverzity mezi populacemi (Weigand et. al, 2020). Při studiu kryptických druhů z rodu Niphargus se pozorovalo, že i když tyto druhy působily na regionální úrovni ekologicky ekvivalentně, při bližším pohledu se rozdíly v jejich nikách

nalezly. Míra koexistence těchto druhů byla výrazně nižší než by se předpokládalo v případě, že by tyto druhy byly skutečně ekologicky zaměnitelné (a chovaly se podle neutrální dynamiky), ale nejsou pravděpodobně ani dostatečně ekologicky diverzifikované, aby mohly stabilně koexistovat přes limitace kompetice odlišným využíváním zdrojů (Fišer et. al, 2015). Vzhledem k tomu, jak málo víme o možných ekologických či morfologických rozdílech mezi liniemi studovanými v této práci je velmi těžké odhadnou, zda ke koexistenci linií dochází díky neutrální dynamice anebo jestli existují rozdíly v jejich ekologii dostatečné velké, aby limitovaly kompetici mezi liniemi.

5.3 Párovací preference

Z celkem 102 úspěšně určených párů odebraných v přirozených podmínkách jich 101 bylo mezi příslušníky stejné linie a pouze jeden byl smíšený (CWE A a CEA na lokalitě ZDE2), což ukazuje na existenci prezygotické reprodukční bariery. Samec byl v tomto případě z linie CWE A a samice z linie CEA. Tento výsledek koresponduje s předpokladem, že ve volné přírodě k párování (natož k hybridizaci) v přirozených podmínkách nedochází. Divergence mezi zkoumanými (sub)liniemi ze skupiny CWE ze západní Evropy byla mezi 3,5 a 17 % na genu pro COI (Galipaud et al., 2015), zatímco u linií studovaných v mé práci je tento rozdíl 18,5 až 30,4 % (Copilaş-Ciocianu et al., 2017). Západoevropští jedinci lišící se v sekvenci tohoto genu v míře 17 % mají silnou tendenci se nepárovat (Galipaud et al., 2015). Není tedy překvapivé, že linie zkoumané v mé práci (s ještě větší genetickou divergencí) se také nepárují. Toto zjištění je nicméně velmi důležité, protože nyní máme další empirický důvod uvažovat o těchto liniích jako o odlišných, navzájem se nekřížících druzích. Potvrzuje to dřívější porovnání rozdílů na jaderných a mitochondriálních markerech, které vedlo k závěru, že mezi liniemi nedochází k recentní hybridizaci (Rutová, 2018). V dávnější minulosti ke křížení možná docházelo, o čemž může svědčit diskrepance genetických dat při porovnání mitochondriálních genů a genu 28S pro RNA ribosomální podjednotku u druhového komplexu *G. fossarum* (Copilaş-Ciocianu et al., 2017). Pravděpodobně by stálo za zvážení pokusit se nalézt morfologicky stabilní rozdíly mezi liniemi a případné popsání alespoň některých z těchto linií jako druhy, mimo jiné z důvodu možné ochrany jejich diverzity.

Jak již jsem psal výše, poměry linií na syntopických lokalitách mohou být extrémně nevyrovnané, a i když k párování v přirozených podmínkách, zdá se, primárně dochází mezi příslušníky stejné linie, nabízí se otázka, jak tato situace probíhá při výrazné disproporci linií. V Hořanském potoce (HOV1) bylo 48 jedinců určeno v rámci studia habitatových preferencí jako linie CEA a ze 14 párů na této lokalitě jich bylo 12 tvořeno příslušníky linie CEA a pouze

2 páry byly tvořeny jedinci z linie EEQ. To naznačuje, že v přirozených podmínkách, i za značné nerovnoměrnosti linií, se jedinci stejné linie dokážou najít a správně spárovat.

Bylo by ovšem zajímavé sledovat, kolik času nevhodně spárovaným blešivcům zabere, než opustí nevhodného partnera. Při výrazně vyšším zastoupení příslušníků jedné z linií si lze představit situaci, kdy by několik málo kolonizujících jedinců z jiné linie mělo potíže najít vhodného partnera (Alleho efekt) a naprosto promarnilo reprodukční příležitost. Samice by se například mohla svléknout v prekopule s nevhodným partnerem. Situaci s možností přístupu k partnerovi z vlastní i odlišné linie i k přístupu pouze k partnerovi z linie jiné jsem se pokoušel testovat ve sém párovacím experimentu.

Na konci tohoto pokusu (doba trvání 24 hodin) se zformovalo celkem 10 smíšených párů (2 z nich v akváriích s přístupem k partnerům ze stejné i odlišné linie, kde poměr linií byl přibližně 50:50). Nejvíce smíšených párů vzniklo ve skupinách, kde jsme předpokládali, že nemají jinou možnost výběru (celkem 8 ze 32 maximálně možných vzniklých párů). V kontrolních skupinách vznikly pouze páry tvořené příslušníky stejné linie, což svědčí o tom, že i přes výskyt dvou linií na lokalitě Chřiby (CHR, linie CWE A a EEQ místo pouze EEQ) design experimentu nakonec přibližně odpovídal našim předpokladům. Relativně vysoká ochota (oproti datům z terénu) párovat se v akváriích s příslušníky jiné linie může být dána několika faktory. U samic jsme nemohli vědět, jak blízko jsou svlékání, když jsme je umisťovali do experimentálních skupin. Jestliže byly hodně blízko, mohlo to stimulovat samce k nevhodnému spárování (Dick & Elwood, 1992; Galipaud et al., 2015). Další možností, je, že blešivci neměli dostatek času na spárování s vhodným partnerem, respektive na odmítnutí partnera nevhodného, například proto, že většina jedinců v experimentu byla nejspíš z toků s výskytem pouze jedné linie, tudíž se jednalo o naivní jedince, u kterých tento proces rozpoznávání vhodného a nevhodného partnera může trvat déle (Dick & Elwood, 1992). Při dalším akvarijním pokusu by možná bylo vhodné odebrat páry z některých replikátů až po delší době. Otázka reprodukční interference, obzvláště při výrazném nepoměru linií, by mohla být velmi zajímavou a relativně jednoduše zodpověditelnou.

5.4 Účinnost liniově specifických primerů

Z celkového počtu 631 jedinců zahrnutých v této práci v rámci habitatových a párovacích preferencí jich 157 bylo třeba osekvenovat. Pokusil jsem se o velmi předběžné hledání možného problému nasedání specifických primerů, protože jsem předpokládal, že nefunkčnost specifické

PCR je dána bodovými mutacemi v oblasti nasedání specifických primerů. Tento předpoklad se ovšem nepotvrdil.

Primery pro linie CWE A a CEA byly navrženy na základě osekvenovaného úseku (gen 16S) na úplném začátku sekvence (Rutová, 2018). Všechny moje sekvence byly pouze v jednom směru. Tento úsek, podle kterého jsou tyto primery vytvořeny, byl v mých sekvencích ještě často nekvalitní a velmi často jsem značnou část z něj ořízl. V několika málo případech jsem našel kvalitní sekvenci i v této oblasti, ale nenalezl jsem zde mutace, které by mohly vést k nenasedáni primerů. Primery pro linii EEQ jsou zkonstruovány na základě koncového úseku sekvence (Rutová, 2018) a při vyhledávání sekvence primeru v mých datech se zdá, že když ne všechny, tak drtivá většina vzorků se měla amplifikovat i pomocí specifických primerů.

V rámci linie EEQ je ovšem třeba zmínit, že tento specifický primer amplifikuje velmi krátký úsek a občas tvoří dimery s párovým primerem (16Sbr). Rozdíl mezi dimerem a pozitivním signálem (obzvláště pokud byla amplifikace slabší) může být náročnější při elektroforéze rozeznat, a proto jsem při vyhodnocování této linie posílal všechny, byť jen trochu pochybné vzorky, na sekvenaci, aby nedošlo k chybné identifikaci linie. Prakticky ve všech případech, kdy jsem se domníval, že se jedná o amplifikaci DNA linie EEQ, se tento předpoklad potvrdil.

Je možné, že specifické primery v některých reakcích nefungují, protože metoda izolace DNA nezahrnuje žádnou přečišťovací fázi a v izolátu se tak objevují části kutikuly a další zbytky blešivců, které mohou některé PCR reakce inhibovat (Wong et al., 2014). Dalším alternativním vysvětlením je, že pro dosažení co největší specifičnosti primeru jsou teploty pro nasedání relativně vysoké (62 °C a 64 °C), zatímco teplota pro nasedání všeobecných primerů pro 16S je jenom 46 °C. S tímto parametrem bych ale raději neexperimentoval, protože považuji za lepší výsledek, když se část vzorků neamplifikuje a musí se osekvenovat, než chybné určení linie v důsledku nespecifického nasednutí primerů. V budoucnu bych rád za účelem zkvalitnění metody a snížení nákladů na sekvenaci doplnil (obzvláště u linií CWE A a CEA) sekvence i v druhém směru a pokusil se najít případné mutace komplikující nasedání primerů, které vzhledem k vysoké haplotypové bohatosti tohoto druhového komplexu (Copilaş-Ciocianu & Petrusek, 2015; Copilaş-Ciocianu et al., 2017; Weigand et al., 2020) pravděpodobně naleznu.

6 Závěr

Cílem této práce bylo prostudovat na detailnější škále kontakt a ekologické interakce koexistujících kryptických linií druhového komplexu *Gammarus fossarum* v jejich kontaktní oblasti na Vsetínsku v Západních Karpatech.

Míra koexistence mezi liniemi byla následně vyšší, než jsem původně předpokládal, protože na pěti z devíti lokalit se nakonec potkávaly všechny tři zkoumané linie současně. Také se ukázalo, že poměry mezi liniemi mohou být extrémně nevyrovnané v neprospěch jedné z nich. Mezi liniemi jsem nenalezl rozdíly v preferencích pro mesohabitat (tůň vs. proud). Ovšem relativně nízké množství vzorků v jednotlivých mesohabitatech na sezónu mi ztížilo statistickou interpretaci výsledků (obzvláště vývoj poměrů linií v čase) a pro účely mého budoucího výzkumu plánuji tento nedostatek adekvátně odstranit.

Sběr prekopulačních párů z terénu ukazuje na výskyt silných preferencí pro párování s příslušníky vlastní linie. Mezi liniemi tedy existuje prezygotická reprodukční bariera, což potvrzuje, že mezi liniemi v současné době pravděpodobně nedochází k hybridizaci (nebo jen zcela výjimečně) a je třeba o nich uvažovat jako o reprodukčně isolovaných druzích. Otázka vlivu reprodukční interference, obzvláště za výrazného nepoměru linií, ovšem zůstává otevřena. Za specifických podmínek (absence vhodného partnera) k pokusům o párování s příslušníky jiných linií, jak prokázal párovací experiment, dochází.

Tato diplomová práce představuje pouze prvotní nahlédnutí do tohoto zajímavého modelového systému a existuje celá řada ekologických faktorů, které mohou vést k vysoké diverzitě a koexistenci těchto linií. Jako jeden z klíčových považuji morfologické porovnání linií a ověření existence možných rozdílů. Dále se pak nabízejí otázky týkající se možných rozdílů v toleranci na kvalitu prostředí, odlišné potravní strategie anebo studium vývoje a stability poměrů linií v rámci celého toku v čase.

7 Seznam citované literatury

Adams J. & Greenwood P. (1983). Why are males bigger than females in precopula pairs of *Gammarus pulex*? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 13(4), 239–241.

Andrei J., Pain-Devin S., Felten V., Devin S., Giambérini L., Mehennaoui K., Cambier S., Gutleb A. C. & Guérold F. (2016). Silver nanoparticles impact the functional role of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda). *Environmental Pollution*, 208(B), 608–618.

Arambourou H., Decamps A., Quéau H., Dabrin A., Neuzeret D. & Chaumot A. (2017). Use of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) embryo for toxicity testing: A case study with cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(9), 2436–2443.

Bauer A., Haine E., Perrot-Minnot M. J. & Rigaud T. (2005). The acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* alters the geotactic and clinging behaviours of two sympatric amphipod hosts: the native *Gammarus pulex* and the invasive *Gammarus roeseli*. *Journal of Zoology*, 267(1), 39–43.

Bauer A., Trouvé S., Grégoire A., Bollache L. & Cézilly F. (2000). Differential influence of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) on the behaviour of native and invader gammarid species. *International Journal for Parasitology*, 30(14), 1453–1457.

Baumgärtner D., Koch U. & Rothhaupt K. O. (2003). Alteration of kairomone-induced antipredator response of the freshwater Amphipod *Gammarus roeseli* by sediment type. *Journal of Chemical Ecology*, 29(6), 1391–1402.

Bollache L., Kaldonski N., Troussard J. P., Lagrue C. & Rigaud T. (2006). Spines and behaviour as defences against fish predators in an invasive freshwater amphipod. *Animal Behaviour*, 72(3), 627–633.

Borowsky B. (1984). The use of the males gnathopods during precopulation in some Gammaridean Amphipods. *Crustaceana*, 47(3), 245–250.

Bystřický P. K. (2017). Ekologické interakce a diferenciace nik koexistujících sladkovodních blešivců. Bakalářsá práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra ekologie.

Coleman C.O. & Gonzalez E. R. (2006). New hyalellids (Crustacea, Amphipoda, Hyalellidae) from Lake Titicaca. *Organisms Diversity and Evolution*, 6(3), 218–219.

Copilaş-Ciocianu D. & Boroş B. V. (2016). Contrasting life history strategies in a phylogenetically diverse community of freshwater amphipods (Crustacea: Malacostraca). *Zoology*, 119(1), 21–29.

Copilaş-Ciocianu D., Fišer C., Borza P. & Petrusek A. (2018). Is subterranean lifestyle reversible? Independent and recent large-scale dispersal into surface waters by two species of the

groundwater amphipod genus Niphargus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 119, 37–49.

Copilaş-Ciocianu D., Grabowski M., Pârvulescu L. & Petrusek A. (2014). Zoogeography of epigean freshwater amphipoda (Crustacea) in Romania: Fragmented distributions and wide altitudinal variability. *Zootaxa*, 3893(2), 243–260.

Copilaş-Ciocianu D. & Petrusek A. (2015). The southwestern Carpathians as an ancient centre of diversity of freshwater gammarid amphipods: insights from the *Gammarus fossarum* species complex. *Molecular Ecology*, 24(15), 3980–3992.

Copilaş-Ciocianu D. & Petrusek A. (2017). Phylogeography of a freshwater crustacean species complex reflects a long-gone archipelago. *Journal of Biogeography*, 44(2), 421–432.

Copilaş-Ciocianu D., Rutová T., Pařil P. & Petrusek A. (2017). Epigean gammarids survived millions of years of severe climatic fluctuations in high latitude refugia throughout the Western Carpathians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 112, 218-229.

Costa F. O., Henzler C. M., Lunt, D. H., Whiteley N. M. & Rock J. (2010). Probing marine Gammarus (Amphipoda) taxonomy with DNA barcodes. *Systematics and Biodiversity,* 7(4), 365-379.

Cothran R. D. (2004). Precopulatory mate guarding affects predation risk in two freshwater amphipod species. *Animal Behaviour*, 68(5), 1133–1138.

Cothran R. D. (2008). The mechanistic basis of a large male mating advantage in two freshwater amphipod species. *Ethology*, 114(12), 1145–1153.

Cothran R.D., Henderson K. A., Schmidenberg D. & Relyea R. (2013a). Phenotypically similar but ecologically distinct: Differences in competitive ability and predation risk among amphipods. *Oikos*, 122(10), 1429–1440.

Cothran R. D., Stiff A. R., Chapman K., Wellborn G. & Relyea R. (2013b). Reproductive interference via interspecific pairing in an amphipod species complex. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 67(8), 1357–1367.

DeNiro M. J. & Epstein S. (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *42*(5), 495–506.

Dick J. T. A. (2008). Role of behaviour in biological invasions and species distributions; lessons from interactions between the invasive *Gammarus pulex* and the native *G. duebeni* (Crustacea: Amphipoda). *Contribution to Zoology*, 77(2), 91–98.

Dick J. T. A. & Elwood R. W. (1992). Coexistence and exclusion among Gammarus species: behavioral avoidance of interspecific precopulation by male *G. pulex* (Amphipoda). *Oikos*, 64(3), 541–547.

Dick J. T. A., Montgomery W. I. & Elwood R. W. (1993). Replacement of the indigenous amphipod *Gammarus duebeni celticus* by the introduced *G. pulex:* differential cannibalism and mutual predation. *Journal of Animal Ecology*, 62(1), 79–88.

Dick J. T. A. & Platvoet D. (1996). Intraguild predation and species exclusions in amphipods: the interaction of behaviour, physiology and environment. *Freshwater Biology*, 36(2), 375–383.

Dick J. T. A. & Platvoet D. (2000). Invading predatory crustacean *Dikerogammarus villosus* eliminates both native and exotic species. *Proceedings of the Royal Society B – Biological Sciences*, 267(1447), 977–983.

Dick J. T. A., Platvoet D. & Kelly D. W. (2002). Predatory impact of the freshwater invader *Dikerogammarus villosus* (Crustacea: Amphipoda). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(6), 1078–1084.

Eisenring M., Altermatt F., Westram A. M. & Jokela J. (2016). Habitat requirements and ecological niche of two cryptic amphipod species at landscape and local scales. *Ecosphere*, 7(5), (e01319).

Elliott J. M. (2005). Day-night changes in the spatial distribution and habitat preferences of freshwater shrimps, *Gammarus pulex*, in a stony stream. *Freshwater Biology*, 50(4), 552–566.

Feckler A., Thielsch A., Schwenk K., Schulz R. & Bundschuh M. (2012). Differences in the sensitivity among cryptic lineages of the *Gammarus fossarum* complex. *Science of the Total Environment*, 439(C), 158–164.

Feckler A., Zubrod J. P., Thielsch A., Schwenk K., Schulz R. & Bundschuh M. (2014). Cryptic species diversity: An overlooked factor in environmental management? *Journal of Applied Ecology*, 51(4), 958–967.

Fišer C., Robinson C. T., & Malard F. (2018). Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept. *Molecular Ecology*, 27(3), 613–635.

Fišer Ž., Altermatt F., Zakšek V., Knapič T. & Fišer C. (2015). Morphologically cryptic amphipod species are "ecological clones" at regional but not at local scale: a case study of four *Niphargus* species. *PloS ONE*, 10(7), e0134384.

Galipaud M., Gauthey Z., Turlin J., Bollache L. & Lagrue C. (2015). Mate choice and male–male competition among morphologically cryptic but genetically divergent amphipod lineages. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69(12), 1907–1916.

Georgievová B., Zhai M., Bojková J., Šorfová V., Syrovátka V., Polášková V., Schenková J. & Horsák, M. (2020). Does predation by the omnivorous *Gammarus fossarum* affect small-scale distribution of macroinvertebrates? A case study from a calcareous spring fen. *International*

Review of Hydrobiology, pouze online (https://doi.org/10.1002/iroh.202002046).

Goedemakers A. (1981). Population dynamics in three gammarid species (Crustacea, Amphipoda) in french chalk stream. *Bijdragen tot de Dierkunde,* 51(1), 31–69.

Grabowski M., Mamos T., Bacela-Spychalska K., Rewicz T. & Wattier R. A. (2017). Neogene paleogeography provides context for understanding the origin and spatial distribution of cryptic diversity in a widespread balkan freshwater amphipod. *PeerJ*, 5, e3016.

Hou Z., Li J. & Li S. (2014). Diversification of low dispersal crustaceans through mountain uplift: a case study of *Gammarus* (Amphipoda: Gammaridae) with descriptions of four novel species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 170(4), 591–633.

Kamaltynov R. M. (1999). On the higher classification of Lake Baikal amphipods. *Crustaceana*, 72(8), 933–944.

Kelly A., Hatcher M. J. & Dunn A. M. (2004). Intersexuality in the amphipod (*Gammarus duebeni*) results from incomplete feminization by the vertically transmitted parasitic sex ratio distorter (*Nosema granulosis*). *Evolutionary Ecology*, 18(2), 121–132.

Kelly D. W., Dick J. T. A. & Montgomery W. I. (2002). The functional role of Gammarus (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? *Hydrobiologia*, 485, 199–203.

Lagrue C., Wattier R., Galipaud M., Gauthey Z., Rullmann J. P., Dubreuil C., Rigaud T. & Bollache L. (2014). Confrontation of cryptic diversity and mate discrimination within *Gammarus pulex* and *Gammarus fossarum* species complexes. *Freshwater Biology*, 59(12), 2555–2570.

Leibold M. A. & McPeek M. A. (2006). Coexistence of the niche and neutral perspectives in community ecology. *Ecology*, 87(6), 1399–1410.

Lewis S. E., Dick J. T. A., Lagerstrom E. K. & Clarke H. C. (2010). Avoidance of filial cannibalism in the amphipod *Gammarus pulex*. *Ethology*, 116(2), 138–146.

Little C. J. & Altermatt, F. (2018). Do priority effects outweigh environmental filtering in a guild of dominant freshwater macroinvertebrates? *Proceeding of Royal Society B*, 285(1876), 20180205.

MacAvoy S. E., Braciszewski A., Tengi E. & Fong D. W. (2016). Trophic plasticity among spring vs. cave populations of *Gammarus minus*: examining functional niches using stable isotopes and C/N ratios. *Ecological Research*, 31(4), 589–595.

Macdonald K. S., Yampolsky L., & Duffy J. E. (2005). Molecular and morphological evolution of the amphipod radiation of Lake Baikal. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35(2), 323–343.

MacNeil C. & Dick J. T. A. (2014). Physicochemical tolerance, habitat use and predation are drivers of patterns of coexistence and exclusion among invasive and resident amphipods. *Freshwater Biology*, 59(9), 1956–1969.

MacNeil C., Dick J. T. A. & Elwood R. W. (1997). The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda): Problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Reviews*, 72(3), 349–364.

MacNeil C., Dick J. T. A., Hatcher M. J., Terry R. S., Smith J. E. & Dunn A. M. (2003a). Parasite mediated predation between native and invasive amphipods. *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences*, 270(1521), 1309–1314.

MacNeil C., Fielding N. J., Dick J. T. A., Briffa M., Prenter J., Hatcher M. J. & Dunn A. M. (2003b). An acanthocephalan parasite mediates intraguild predation between invasive and native freshwater amphipods (Crustacea). *Freshwater Biology*, 48(12), 2085–2093.

MacNeil C. & Prenter J. (2000). Differential microdistributions and interspecific interactions in coexisting native and introduced *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Zoology*, 251(3), 377–384.

Mamos T., Wattier R., Burzyński A. & Grabowski M. (2016). The legacy of a vanished sea: A high level of diversification within a European freshwater amphipod species complex driven by 15 My of Paratethys regression. *Molecular Ecology*, *25*(3), 795–810.

Mayer G., Maas A. & Waloszek D. (2012). Coexisting native and non-indigenous gammarideans in Lake Constance - comparative morphology of mouthparts (Crustacea, Amphipoda, Gammaridea). *Spixiana*, 35(2), 269–285.

Müller J. (1998). Genetic population structure of two cryptic *Gammarus fossarum* types across a contact zone. *Journal of Evolutionary Biology*, 11(1), 79–101.

Müller, J. (2000). Mitochondrial DNA variation and the evolutionary history of cryptic *Gammarus fossarum* types. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 15(2), 260–268.

Müller J., Partsch E. & Link A. (2000). Differentiation in morphology and habitat partitioning of genetically characterized *Gammarus fossarum* forms (Amphipoda) across a contact zone. *Biological Journal of the Linnean Society*, 69(1), 41–53.

Naylor C. & Adams J. (1987). Sexual dimorphism, drag constraints and male performance in *Gammarus duebeni*. *Oikos*, 48(1), 23–27.

Palumbi S., Martin A., Romano S., McMillan O. M., Stice L., & Grabowsi G. (2002). The simple fool´s guide to PCR. Version 2. *University of Hawaii, Honolulu*.

Rudolph K., Coleman C. O., Mamos T. & Grabowski M. (2018). Description and post-glacial

demography of *Gammarus jazdzewskii sp. nov.* (Crustacea: Amphipoda) from Central Europe. *Systematics and Biodiversity*, 16(6), 587–603.

Rutová T. (2018). Distribuce kryptických linií blešivců druhového komplexu *Gammarus fossarum* na rozhraní Českého masivu a Západních Karpat. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra ekologie.

Schwenk K., Sand A., Boersma M., Brehm M., Mader E., Offerhaus D. & Spaak P. (1998). Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the cladocera. *Aquatic Ecology*, 32(3), 37–51.

Starry O., Wanzenböck J. & Danielopol D. L. (1998). Tendency of the amphipod *Gammarus roeseli* Gervais to colonize coarse sediment habitats under fish predation pressure. *International Review of Hydrobiology*, 83(5), 371–380.

Sutcliffe D. W. (1992). Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): basic processes. *Freshwater Forum*, 2(2), 102–128.

Sworobowicz L., Grabowski M., Mamos T., Burzyński A., Kilikowska A., Sell J. & Wysocka A. (2015). Revisiting the phylogeography of *Asellus aquaticus* in Europe: Insights into cryptic diversity and spatiotemporal diversification. *Freshwater Biology*, 60(9), 1824–1840.

Syrovátka V., Zhai M., Bojková J., Šorfová V. & Horsák M. (2020). Native *Gammarus fossarum* affects species composition of macroinvertebrate communities: evidence from laboratory, field enclosures, and natural habitat. *Aquatic Ecology*, 54(2), 505–518.

Truhlar A. M., Dodd J. A. & Aldridge D. C. (2014). Differential leaf-litter processing by native (*Gammarus pulex*) and invasive (*Dikerogammarus villosus*) freshwater crustaceans under environmental extremes. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 24(1), 56–65.

Väinölä R., Witt J. D. S., Grabowski M., Bradbury J. H., Jazdzewski K. & Sket B. (2008). Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 241–255.

van Riel M. C., Healy E. P., van der Velde C. & bij de Vaate A. (2007). Interference competition among native and invader amphipods. *Acta Oecologica*, 31(3), 282–289.

Weigand A. M., Kozma-Michler D., Kuemmerlen M. & Jourdan J. (2020). Substantial differences in genetic diversity and spatial structuring among (cryptic) amphipod species in a mountainous river basin. *Freshwater Biology*, pouze online (https://doi.org/10.1111/fwb.13529).

Wellborn G. A. & Bartholf S. E. (2005). Ecological context and the importance of body and gnathopod size for pairing success in two amphipod ecomorphs. *Oecologia*, 143(2), 308–316.

Wellborn G. A. & Cothran R. D. (2004). Phenotypic similarity and differntiation among sympatric cryptic species in a freshwater amphipod species complex. *Freshwater Biology*, 49(1), 1–13.

Wellborn G. A. & Cothran R. D. (2007). Niche diversity in crustacean cryptic species: complementarity in spatial distribution and predation risk. *Oecologia*, 154(1), 175–183.

Westram A. M., Baumgartner C., Keller I. & Jokela, J. (2011a). Are cryptic host species also cryptic to parasites? Host specificity and geographical distribution of acanthocephalan parasites infecting freshwater *Gammarus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 1083–1090.

Westram A. M., Jokela, J. Baumgartner C. & Keller I. (2011b). Spatial distribution of cryptic species diversity in European freshwater amphipods (*Gammarus fossarum*) as revealed by pyrosequencing. *PloS ONE*, 6(8), e23879.

Wong W. H., Tay Y. C., Puniamoorthy J., Balke M., Cranston P. S. & Meier R. (2014). "Direct PCR" optimization yields a rapid, cost-effective, nondestructive and efficient method for obtaining DNA barcodes without DNA extraction. *Molecular Ecology Resources*, 14(6), 1271–1280.

8 Seznam příloh

Příloha 1 – souhrn lokalit a naměřených parametrů pro (meso)habitatové rozdíly.

Kód	Lokalita	Souřadnice	Sezóna	Datum	Hloubka (m)	Šířka (m)	Proud (m/s)	Hloubka (m)	Šířka (m)	Proud (m/s)
JUC1	Juhyně	49°21'9", 17°47'52"	podzim 2018	29.09.2018	0.070	3.10	0.06	0.045	3.60	0.17
			jaro 2018	05.05.2018	0.110	3.40	0.04	0.050	2.10	0.21
			podzim 2017	21.10.2017	0.100	1.50	0.06	0.100	1.50	0.18
			podzim 2018	29.09.2018	0.070	1.20	0.15	0.030	0.77	0.22
DRE1	Dřevnice	49°20'31", 17°47'50"	jaro 2018	05.05.2018	0.045	1.30	0.04	0.040	0.65	0.12
			podzim 2017	21.10.2017	0.120	2.00	0.03	0.050	1.00	0.20
			podzim 2018	29.09.2018	0.095	4.70	0.14	0.065	4.20	0.24
			jaro 2018	05.05.2018	0.350	4.70	0.04	0.040	2.50	0.15
TRN1	Trnávka	49°15'59", 17°48'49"	podzim 2017	21.10.2017	0.070	3.70	0.07	0.120	2.70	0.56
			podzim 2018	29.09.2018	0.090	1.30	0.02	0.060	0.56	0.15
			jaro 2018	06.05.2018	0.040	2.30	0.07	0.035	0.90	0.27
PRL1	Prlovský p.	49°15'11", 17°57'7"	podzim 2017	21.10.2017	0.070	1.10	0.05	0.040	0.50	0.25
			podzim 2018	30.09.2018	0.100	0.36	0.01	0.040	0.38	0.06
			jaro 2018	06.05.2018	0.070	0.60	0.08	0.030	0.40	0.19
HOV1	Hořanský p.	49°16'42", 18°3'57"	podzim 2017	21.10.2017	0.050	0.70	0.01	0.060	0.50	0.11
			podzim 2018	30.09.2018	0.040	3.20	0.02	0.040	4.05	0.26
			jaro 2018	06.05.2018	0.110	3.40	0.09	0.045	2.40	0.26
HOV4	Hovízky	49°18'25", 18°3'49"	podzim 2017	21.10.2017	0.220	1.30	0.09	0.110	1.40	0.27
			podzim 2018	30.09.2018	0.095	3.10	0.06	0.090	0.75	0.26
			jaro 2018	06.05.2018	0.065	2.30	0.13	0.080	0.85	0.37
HOV3	Hovízky	49°19'31", 18°4'38"	podzim 2017	21.10.2017	0.070	2.30	0.10	0.120	0.50	0.34
			podzim 2018	30.09.2018	0.120	5.60	0.11	0.080	2.20	0.20
			jaro 2018	06.05.2018	0.220	5.40	0.06	0.080	3.60	0.20
ZDE2	Zděchovka	49°16'55", 18°5'4"	podzim 2017	21.10.2017	0.200	3.30	0.08	0.070	2.70	0.36
			podzim 2018	30.09.2018	0.135	5.70	0.07	0.080	3.05	0.49
			jaro 2018	06.05.2018	0.110	5.30	0.08	0.060	3.70	0.23
DIN2	Dinotice	49°19'8", 18°8'22"	podzim 2017	21.10.2017	0.120	3.80	0.08	0.220	4.50	0.14