

**Bakalářská práce**

**Mezidruhová hybridizace u perlooček rodu  
*Daphnia* (Crustacea: Cladocera)**

Interspecific hybridization in *Daphnia*  
(Crustacea: Cladocera)

(literární rešerše)

**Štěpánka Ruthová**

Katedra ekologie  
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

**Školitel: RNDr. Adam Petrusek**

**květen 2006**

Děkuji svému školiteli, RNDr. Adamu Petruskovi, za vedení mé bakalářské práce a za obětavost, kterou při tom prokázal. Děkuji také svým rodičům za to, že za mnou po celou dobu mého bakalářského studia stáli.

## **ABSTRAKT**

Mezidruhové křížení je široce rozšířeným fenoménem v rostlinné i živočišné říši. K mezidruhové hybridizaci dochází na místech, kde se do přímého kontaktu dostávají druhy, mezi nimiž nejsou dostatečně vyvinuty reprodukční bariéry. Biologická zdatnost hybridů F<sub>1</sub>-generace bývá v porovnání se zdatností rodičovských druhů nízká, ale neplatí to všeobecně. Mezidruhová kříženci perlooček rodu *Daphnia* jsou pravidelně nacházeni společně s jedním nebo oběma rodičovskými druhy ve stojatých sladkých vodách napříč celou Evropou. Z trvalých vajíček s hybridním genotypem se za vhodných podmínek líhnou samičky, které se rozmnožují partenogeneticky. Několik málo hybridních samiček tak může založit celé populace a stát se ekologicky významnou složkou zooplanktonních společenstev. Někteří hybridní jsou vzácně schopni zpětného křížení a mohou tedy ovlivnit i genofond rodičovských druhů. Studium hybridizace rodu *Daphnia* tedy přispívá nejen k pochopení ekologických nároků a dynamiky populací, ale také k pochopení fylogenetických vztahů a taxonomie tohoto rodu. Tradiční metody determinace hybridů na základě morfologických znaků nejsou příliš spolehlivé, protože fenotypová plasticita rodu *Daphnia* je velká a do značné míry ovlivněná faktory vnějšího prostředí. Současné studie proto zpravidla kombinují morfologické určení hybridů spolu s molekulárními metodami. Kombinace několika metod navíc minimalizuje riziko nesprávného určení druhu a nabízí mnohem komplexnější pohled na strukturu populací než metoda jediná.

## OBSAH

ÚVOD .....	4
1. HYBRIDIZACE V PŘIROZENÉM PROSTŘEDÍ.....	6
1.1. Definice .....	6
1.2. Historický přehled .....	6
2. HYBRIDIZACE RODU <i>DAPHNIA</i> .....	7
2.1. Původní práce o hybridech rodu <i>Daphnia</i> .....	7
2.2. Hybridizace u perlooček.....	9
2.2.1. Druhový komplex <i>D. pulex</i> .....	10
2.2.2. Austrálie .....	11
2.2.3. Druhový komplex <i>D. longispina</i> .....	11
2.3. Proč dochází k hybridizaci .....	13
2.4. Kdy dochází k hybridizaci.....	15
2.5. Morfologické vlastnosti hybridů rodu <i>Daphnia</i> .....	17
3. EKOLOGICKÉ VZTAHY .....	18
3.1. Fitness hybridů rodu <i>Daphnia</i> .....	18
3.2. Modely hybridních zón .....	19
3.3. Temporal hybrid superiority hypothesis .....	20
3.3.1. Predační tlak .....	21
3.3.2. Dostupnost potravy .....	22
3.3.3. Další ekologické faktory.....	22
4. EVOLUČNÍ DŮSLEDKY HYBRIDIZACE RODU <i>DAPHNIA</i> .....	23
4.1. Stabilizace hybridních linií.....	24
4.2. Důsledky hybridizace v přirozeném prostředí.....	26
4.2.1. Introgrese .....	27
4.2.2. Speciace cestou hybridizace .....	29
4.2.3. Polyploidní linie .....	30
5. METODY DETEKCE HYBRIDŮ RODU <i>DAPHNIA</i> .....	32
5.1. Detekce na základě morfologických znaků.....	32
5.2. Molekulárně–biologické metody detekce .....	33
5.2.1. Aloxymová elektroforéza .....	34
5.2.2. ITS-RFLP .....	35
ZÁVĚR.....	37
SEZNAM LITERATURY .....	38
PŘÍLOHA.....	43

## ÚVOD

Perloočky rodu *Daphnia* jsou drobní planktonní korýši, kteří obývají stojaté sladkovodní ekosystémy na všech světadílech. Jako filtrátoři tvoří podstatnou složku potravních řetězců a hrají klíčovou roli v dynamice potravních sítí ve sladkovodním prostředí. Už na přelomu devatenáctého a dvacátého století jim byla věnována pozornost v mnoha laboratorních i terénních studiích (klíčové práce byly například: Weismann 1877; Forbes 1893; Banta 1913) a postupně se staly významným modelovým organismem v ekologii, ekotoxikologii a populační genetice (Lynch 1983; Dodson 1989; Mort 1991) podobně jako *Drosophila* v genetice nebo *Caenorhabditis elegans* ve vývojové biologii. Jejich využití pro výzkumné účely také podpořilo to, že je lze bez potíží chovat v laboratorních podmínkách, snadno se množí, mají krátkou generační dobu (Mort 1991) a lze je množit klonálně.

Přestože je rod *Daphnia* nejlépe prostudovanou skupinou planktonních korýšů, fylogenetické vztahy a taxonomie tohoto rodu zůstávají do značné míry nevyřešené (Hrbáček 1987; Schwenk et al. 2000; Benzie 2005). Situace je komplikována nejen vysokou morfologickou variabilitou jednotlivých druhů, ale v některých skupinách také přítomností mezidruhových kříženců, zpětných kříženců a rekombinantů dalších generací. Hybridi se po celý život nebo po jeho velkou část rozmnožují nepohlavně (partenogeneticky). Za vhodných podmínek tak mohou dosáhnout vysokých populačních hustot a stát se ekologicky významnou složkou planktonních společenstev. Tento fakt je zásadním způsobem odlišuje od hybridů obligátně sexuálních organismů a činí z nich unikátní objekt pro studium selekčních faktorů a dynamiky hybridních zón. Někteří hybridy jsou navíc schopni pohlavního rozmnožování. Tím je otevřena cesta k zásahům do genofondu rodičovských druhů a význam hybridů tak přesahuje z ekologické do evoluční problematiky. Hybridy rodu *Daphnia* jsou tedy důležitou skupinou z hlediska taxonomického, ekologického i evolučního a měla by jim proto být věnována maximální pozornost.

Ve své bakalářské práci jsem se pokusila shrnout dosavadní poznatky o hybridizaci rodu *Daphnia* a diskutovat je z několika různých aspektů. Úvodní kapitoly jsou zaměřeny na samotný akt hybridizace, na procesy, které ho předcházejí, a na morfologické a fyziologické vlastnosti hybridů. Stěžejní část práce je věnována ekologickým vztahům, zejména koexistenci hybridů a jejich rodičovských druhů a selekčním faktorům utvářejícím strukturu dílčích populací; a dále také evolučním důsledkům hybridizace, především polyploidizaci

obligátně partenogenetických linií a introgresi. Samostatná kapitola je věnována také metodám detekce hybridů.

Po konzultaci se svým školitelem jsem se rozhodla do textu bakalářské práce nezařazovat vlastní výsledky, neboť téma hybridizace rodu *Daphnia* je samo o sobě dosti rozsáhlé. K práci ale přikládám rukopis „**Intragenomic sequence variation necessitates a new genetic method to distinguish species and hybrids in the *Daphnia longispina* complex**”, jehož jsem spoluautorem a ve které jsou zahrnuty některé výsledky mé práce během bakalářského studia.

# 1. HYBRIDIZACE V PŘIROZENÉM PROSTŘEDÍ

## 1.1. Definice

Termín *hybridizace* bývá stejně jako například *druh* ve vědecké literatuře interpretován několika způsoby. Jednotlivé definice hybridizace se neshodují zejména v úrovni genetické divergence jedinců, mezi kterými dochází k hybridizaci. Setkáme se i s extrémními definicemi, které na jedné straně definují hybridizaci jako křížení mezi geneticky rozdílnými jedinci nebo na druhé straně jako křížení jedinců různých druhů (Harrison 1993, podle Arnold 1997). Ve své práci chápu termín *hybridizace* jako všechna úspěšná křížení mezi jedinci dvou populací nebo skupin populací rozlišitelných na základě alespoň jednoho dědičného znaku. Analogicky je *hybrid* jedinec vzniklý křížením jedinců ze dvou populací nebo skupin populací rozlišitelných na základě alespoň jednoho dědičného znaku (Harrison 1990). Za hybridy považuji i jedince vykazující určitý stupeň fertility, protože právě fertilita hybridů může mít nedozírné důsledky na genetickou stavbu i evoluční vývoj populací.

## 1.2. Historický přehled

Zájem vědců o hybridizaci je stejně starý jako nejstarší koncepty druhů. Už v polovině osmnáctého století založil Carl Linné svůj druhový koncept na reprodukční izolaci druhů. Nicméně brzy experimentálně zjistil, že mezi definovanými druhy dochází ke křížení, a tak o několik let později navrhl model speciace cestou hybridizace (Linné 1774, podle Arnold 1997). V devatenáctém století sice byla hybridizace v přirozeném prostředí považována za běžný jev (Lyll 1832, podle Taylor et al. 2005), ale hybridům byly přisuzovány nečnosti jako naprostá neplodnost a snížená životaschopnost:

*„Pure species have of course their organs of reproduction in a perfect condition, yet when intercrossed they produce either few or no offspring. Hybrids, on the other hand, have their reproductive organs functionally impotent.“* (Darwin 1859, podle Arnold 1997)

Přelomovými se staly práce Lotsyho (1916; 1931, podle Arnold). Lotsy si všiml, že hybridizace může být jedním z primárních mechanismů evolučních změn a že křížením jedinců z různých syngameonů („*an habitually interbreeding community*“) dochází ke speciaci. Lotsyho práce ve třicátých letech dvacátého století nastartovala vlnu intenzivního výzkumu hybridizace, která vyústila formulováním celé řady druhových konceptů, modelů hybridních zón a teorií popisujících původ a evolučně biologické důsledky hybridizace. Už na počátku se vědecká komunita rozdělila do dvou proudů. První skupina, tvořená hlavně botaniky, chápala hybridizaci jako důležitý evoluční proces. Podařilo se jim prokázat, že hybridizace je velmi

rozšířená v rostlinné říši a že díky ní může docházet ke vzniku nových adaptivních vlastností. Hybridní jedinci tak mohou obsazovat nová stanoviště a být zakladateli nových druhů. Druhá skupina, tvořená hlavně evolučními biology studujícími živočišné druhy, naopak viděla v hybridizaci nástroj sloužící k pochopení procesu speciace. Zdůrazňovali, že hybridizace je maladaptivní proces, protože hybridi jsou sterilní nebo méně plodní než rodičovští jedinci. Tento předpoklad vedl k vytvoření modelu, ve kterém hybridizace slouží jako proces vedoucí ke konečnému vybudování reprodukčních bariér (Dobzhansky 1937, podle Arnold 1997). Práce ze třicátých a čtyřicátých let později posloužily jako podklad a jako inspirace výzkumům z druhé poloviny dvacátého století i ze současnosti.

S rozvojem a dostupností molekulárně biologických metod v současnosti vzrůstá počet známých případů hybridizace v rostlinné i živočišné říši. Uvádí se, že 50 až 70 % kvetoucích rostlin vzniklo procesem hybridizace mezi druhy stejných nebo jiných rodů (Stace 1987). Oproti tradičním předpokladům se podařilo prokázat, že hybridizace je poměrně častá i mezi živočichy (např. Carson et al. 1975; Barton 1980; Campton a Utter 1985). U ptáků a hmyzu dokonce hybridizuje až deset procent druhů (Grant a Grant 1992, Bullini 1994). Současné studie hybridizace se zaměřují na několik zvláštních tematických okruhů. Jsou jimi: (1) původ hybridizujících linií (sympatrický nebo alopatrický), (2) dynamika hybridních zón (stabilizace hybridních linií, udržování hybridních zón), (3) genetické a evoluční důsledky hybridizace (introgrese, alopolyploidie), (4) speciace a reprodukční izolace (druhovité koncepty, reprodukční bariéry, bezvýběrové páření) a (5) sledování fitness (vlivy prostředí, ekologická izolace). Jinou možností je věnovat se všem těmto okruhům v rámci jedné skupiny organismů.

## **2. HYBRIDIZACE RODU *DAPHNIA***

### **2.1. Původní práce o hybridech rodu *Daphnia***

Přestože už v devatenáctém století byly znalosti o rodu *Daphnia* poměrně rozsáhlé, první ucelené vědecké práce o hybridizaci mezi druhy tohoto rodu jsou poměrně pozdního data. Celý rod je z taxonomického hlediska velice komplikovaný, protože morfologická variabilita v rámci jednoho druhu může být velká (Flössner 2000, Benzie 2005) a zároveň existuje i řada morfologicky v podstatě neodlišitelných kryptických druhů (např. Taylor a Hebert 1992; Taylor et al. 1998). Bez znalosti fixních morfologických znaků a bez znalosti korelace morfologické variability a genetické příbuznosti je problémem i rozlišování geneticky dobře definovaných druhů, natož jejich hybridů. Kromě toho dochází při hybridizaci a zpětném křížení ke vzniku mnoha rozličných přechodných fenotypových forem. Obecně se dá říct, že před zavedením molekulárních metod do ekologie bylo obtížné,

ne-li nemožné, identifikovat hybridy rodu *Daphnia* a co víc, potvrdit domněnku, že se o hybridy skutečně jedná.

Obrazovou dokumentaci a popisy hybridů z komplexu *D. longispina* můžeme nalézt už v některých pracích z konce devatenáctého století (Hellich 1877, Burckhardt 1899, Lilljeborg 1901, vše podle Flössner 1993), ale ve všech těchto studiích jsou hybridy popsáni jako samostatný druh nebo forma, nikoli jako mezidruhový kříženec. Většina prací z této doby obsahuje o hybridech jen kusé a nepřesné informace a některé studie jsou z dnešního pohledu dokonce zcela scestné. Slepou uličkou byly pokusy o mezidruhové křížení perlooček, které prováděl W. E. Agar (1920). Nejprve křížil rody *Daphnia* a *Simocephalus*, ale nedosáhl sebemenšího úspěchu. Proto se rozhodl pro křížení příbuznějších jedinců a pro svůj experiment zvolil údajné druhy *Daphnia „pulex“* a *D. „obtusa“*. Nejenže se mu podařilo získat „hybridy“, ale „hybridní“ samice byly navíc nesmírně plodné – úspěšnost jejich pohlavního rozmnožování při zpětném křížení byla stejná jako úspěšnost pohlavního rozmnožování jedinců stejného druhu. O mezidruhové hybridy v pravém slova smyslu tedy nešlo. Dnes už se těžko dozvíme, co Agar ve dvacátých letech pářil, ale pravděpodobně se jednalo o morfotypy jednoho druhu. Hybridy druhů označovaných v současné době v USA jako *D. „pulex“* a *D. „obtusa“* nejsou známi.

Jednou z prvních kvalitních prací o hybridizaci rodu *Daphnia* je studie Ulricha Einsleho zaměřená na druhový komplex *D. longispina* v Bodamském jezeře (Bodensee) (Einsle 1966). Všiml si, že kromě malých forem s přilbovitým protažením hlavy (*D. cucullata*) a klabonosých forem bez přilbovitého protažení hlavy (*D. longispina f. hyalina*) jsou běžné ještě přechodné formy, které zařadil do druhu *D. galeata*. Vzhledem k tomu, že se zde vyskytly různé morfologické přechody, formuloval hypotézu, že *D. galeata* je mezidruhovým křížencem dvou výše zmíněných druhů (Obrázek 1). Jak se však ukázalo, situace je ještě komplikovanější, neboť v té době již v Bodamském jezeře koexistovaly a hybridizovaly všechny zmíněné druhy (Straile a Geller 1998; Jankowski 2002). Nemalou měrou přispěl ke studiu hybridizace rodu *Daphnia* také Ulrich Lieder, který jako první popsal introgresivní hybridizaci tohoto rodu (Lieder 1956).

Až do devadesátých let dvacátého století byla přítomnost hybridních linií u rodu *Daphnia* považována spíše za výjimečnou odchylku. Hybridům by pravděpodobně ani nebyla věnována pozornost, kdyby nepůsobili problémy při morfologické klasifikaci druhů. Frey v roce 1982 napsal: „...*how to define species among the Cladocera is up for grabs*“, and „...*a continuing frustration*“ a Lieder (1983) o rok později přitakal: „*Allgemein gelten diese Genera [Daphnia a Bosmina] als eines der dunkelsten Gebiete der Evolutionsgenetik und ein*

*enfant terrible der zoologischen Taxonomie*“. Pověst taxonomicky problematických jedinců tak hybridům oprávněně zůstala od doby objevení ještě další desetiletí. Z tohoto období tak v podstatě nemáme žádné studie, které by srovnávaly morfologii, populační genetiku a ekologii hybridů a jejich rodičovských druhů. Zlom nastal až na počátku devadesátých let s materiální a finanční dostupností molekulárně-biologických metod v ekologii a s příchodem genetických markerů, které vyjasnily mnohé fylogenetické vztahy a umožnily detekci hybridů.

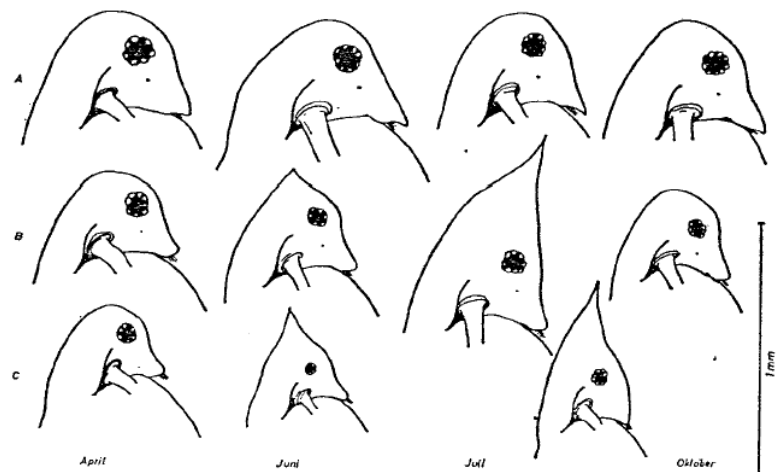


Abb. 9: A. *Daphnia longispina hyalina*; B. *Daphnia galeata*; C. *Daphnia cucullata*  
Mindelsee 1965

**Obrázek 1. Zástupci druhového komplexu *Daphnia longispina* z Bodensee (Einsle 1966)**

Všichni jedinci označení jako *D. galeata* a jedinec v řadě C zcela vlevo jsou pravděpodobně mezidruhovní kříženci druhu *D. cucullata* s *D. longispina* nebo *D. galeata*.

**2.2. Hybridizace u perlooček**

I přesto že je hybridizace velmi rozšířená u rodu *Daphnia* a dostává se jí tudíž velké pozornosti, mezi ostatními perloočkami je poměrně vzácná. Většinu rodů v rámci skupiny tvoří poměrně dobře reprodukčně izolované druhy. Z přirozeného prostředí jsou mezidruhovní kříženci známi pouze u rodů *Daphnia*, *Simocephalus* a možná také u rodu *Bosmina*. Experimentálně v laboratorních podmínkách hybridizuje také rod *Pleuroxus* (Shan a Frey 1968, 1983) a několik dalších zástupců čeledi Chydoridaea. Absence hybridizace u čeledi Chydoridae a dalších litorálních perlooček v přirozeném prostředí je někdy vysvětlována jako důsledek vysoké proměnlivosti podmínek prostředí, ve kterém žijí (Schwenk 1997). Jestliže jsou hybridy schopni pouze partenogenetického rozmnožování, tzn. neprodukují trvalá vajíčka potřebná pro přečkání nepříznivých podmínek, jejich šance na přežití v podmínkách se zvýšenou disturbancí v dlouhodobějším měřítku je minimální. Dalším faktorem může být také stáří druhů a s tím spojené vytvoření reprodukčních bariér.

Introgresivní hybridizací byla tradičně vysvětlována morfologická rozmanitost rodu *Bosmina*. Paleolimnologické a morfologické studie tohoto rodu naznačovaly, že v minulosti opakovaně došlo k hybridizaci sympatrických populací *B. longispina longispina* a *B. coregoni coregoni*. Kompetitivní vyloučení obou rodičovských linií mohlo stabilizovat populaci hybridů, která by se tak mohla stát základem některých dnešních populací (Hofmann 1991). Hypotézu také podpořila analýza současné morfologické variability, ze které vyplývalo, že obě tyto formy poměrně často hybridizují i v současnosti (Lieder 1996). Studie z poslední doby analyzující variabilitu jaderné a mitochondriální DNA ale ukazují, že výše zmíněné rodičovské linie jsou ve skutečnosti zřejmě jeden druh (Taylor et al. 2002; Haney a Taylor 2003). O tom, zda v rámci rodu *Bosmina* skutečně dochází k mezidruhovému hybridizaci, tedy zatím můžeme jen spekulovat. Rod *Simocephalus* (Hann 1987) a rod *Daphnia* tak zůstávají jedinými rody perlooček, u kterých byla hybridizace v přirozeném prostředí s jistotou prokázána.

### 2.2.1. Druhový komplex *D. pulex*

Na americkém kontinentu hybridizují druhy *D. „pulex“*<sup>1</sup> a *D. pulicaria* (Hebert et al. 1989; Hebert et al. 1993). Oba druhy nejsou geneticky příliš vzdálené a hybridizace mezi nimi je poměrně častá. Oblast Mexika a centrální část Severní Ameriky obývají diploidní hybridní linie. Populace hybridů se zdají být na většině stanovištích tvořeny jediným klonem, který se množí obligátní partenogenezi<sup>2</sup>. Usuzuje se, že k hybridizační události došlo v jiné oblasti, protože klonální diverzita diploidních severoamerických hybridů je velmi nízká a jen málo lokalit obývají hybridi spolu s oběma rodičovskými druhy. Také vzácný výskyt *D. „pulex“* v této oblasti ukazuje na to, že se tam hybridi dostali teprve disperzí (Hebert a Finston 1996). Zajímavé jsou populace hybridů *D. „pulex“* a *D. pulicaria* z arktických oblastí Severní Ameriky (Kapitola 4.2.3.). Kromě toho, že jsou mnohem heterogennější i v rámci jedné lokality, jejich genom je tvořen čtyřmi chromosomovými sádkami. Jsou tedy tetraploidní (Dufresne a Hebert 1994). Polyploidní hybridy z druhového komplexu *D. „pulex“/pulicaria* jsou známi i z vysokých nadmořských výšek tropického pásu (Mergeay et al., in MS) a z jižního cípu Jižní Ameriky (Adamowicz et al. 2002). Zatím nevíme, hybridizací kterých druhů vznikají, protože systematika jihoamerických zástupců rodu *Daphnia* je značně

---

<sup>1</sup> Druhové jméno *D. „pulex“* je uvedeno v uvozovkách, protože se nejedná o shodnou linii s evropskou *D. pulicaria* v pravém slova smyslu. Podobná situace je i u dalších druhových jmen uváděných v uvozovkách níže v textu.

<sup>2</sup> Při obligátní partenogenezi dochází u perlooček k produkci klasických partenogenetických vajíček i vajíček trvalých nepohlavní cestou. Jedinci, kteří se líhnou z trvalých vajíček, jsou tudíž geneticky identičtí se svou matkou.

komplikovaná a některé nově objevené druhy nejsou ani formálně popsány (Adamowicz et al. 2004). Hypotéza, že argentinské polyploidní populace jsou důsledkem náhodného výsadku hybridů *D. „pulex“* × *D. pulicaria* ze Severní Ameriky (Adamowicz et al 2002), je nicméně značně nepravděpodobná (Mergeay et al., in MS).

Ke vzácné hybridizaci dochází i mezi některými dalšími americkými druhy komplexu *D. „pulex“/pulicaria*. *D. „obtusa“* a *D. pileata* jsou většinou striktně ekologicky izolované druhy obývající typově odlišná stanoviště. V několika periodických tůních v Texasu byly ale nalezeny sympatrické populace obou druhů i s mezidruhovými hybridy (Hebert a Finston 1996). Hybridy však nejsou schopni produkovat trvalá vajíčka. Tím je snížena stabilita populací i pravděpodobnost disperze a většina populací hybridů tak v krátkém časovém měřítku vymírá. Podobný stupeň sterility vykazují i hybridy druhů *D. cheraphila* a *D. prolata* známí z několika lokalit v Mexiku (Hebert a Finston 1996). Dosahují sice vyšších populačních hustot a větší stability, ale to je pravděpodobně dáno stálostí stanovišť, která umožňuje dlouhodobější přežívání partenogenetických linií.

### 2.2.2. Austrálie

Přestože výzkum rodu *Daphnia* je centralizovaný v Evropě a v Severní Americe, hybridní linie je popsána i z australského kontinentu. Hybrid druhů *D. carinata* a *D. cephalata* obývá spolu se svými rodičovskými druhy jezera ve východní Austrálii. Tradičně byl řazen do samostatného druhu *D. wankeltae*, ale později byl prokázán jeho hybridní původ a fakt, že k hybridizaci mezi rodičovskými druhy dochází opakovaně (Hebert 1985). Přestože v laboratorních podmínkách proběhlo úspěšné sexuální rozmnožování těchto hybridů, v přírodě nebyli nalezeni žádní F<sub>2</sub> hybridy, zpětní kříženci ani známky introgrese. V přirozeném prostředí tak pravděpodobně mají další generace hybridů a zpětní kříženci selekční nevýhodu oproti F<sub>1</sub> hybridům a oběma rodičovským druhům.

### 2.2.3. Druhový komplex *D. longispina*

Druhový komplex *D. longispina* tvoří jednu z dominantních složek zooplanktonu trvalých stojatých vod v holarktické oblasti. I přesto že jsou jednotlivé druhy geneticky poměrně divergentní (genetická divergence cca 5-16 % na základě sekvencí malé mitochondriální ribozomální podjednotky, Schwenk et al. 2000; Petrussek et al., in prep.), je to nejagresivněji hybridizující skupina rodu *Daphnia*. Absence funkčních reprodukčních bariér mezi některými druhy bývá doprovázena téměř kompletním překryvem areálů rozšíření. Situace, kdy jednu lokalitu obývá dvojice a větší množství různých druhů tohoto komplexu

není nijak vzácná a značnou měrou usnadňuje samotný akt hybridizace. Mnoho studií založených na morfologii (Gießler 2001), alozymové analýze (Taylor a Hebert 1992; Spaak 1996), AFLP (amplified fragment length polymorphism) (Gili et al. 2004), mikrosatelitech (Ender et al. 1996), sekvencích mtDNA (Schwenk 1993) a RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Hobaek et al. 2004; Taylor et al. 2005) prokázalo, že hybridí komplexu *D. longispina* jsou v přirozeném prostředí běžní, někdy dokonce početnější než jejich rodičovské druhy, a že k hybridizaci dochází snadno a opakovaně.

V Palearktické oblasti hybridizují druhy *D. galeata*, *D. longispina*<sup>3</sup> a *D. cucullata*, a to každý s každým. F<sub>1</sub> hybridí tvoří sympatrické populace se svými rodičovskými druhy a v závislosti na podmínkách vnějšího prostředí jim více či méně konkurují (Kapitola 3.). Kromě těchto tří linií hybridů byli na východě Norska objeveni ještě mezidruhoví kříženci *D. lacustris* a *D. galeata* (Hobæk et al. 2004). Toto zjištění bylo velmi překvapivé, neboť sekvence mitochondriální DNA *D. lacustris* a *D. galeata* se liší o více než 15 % (Schwenk et al. 2001; Hobæk et al. 2004). Hybridizace mezi takto geneticky divergentními druhy je v přirozeném prostředí ojedinělá. Rekombinantní genotypy, jako jsou F<sub>2</sub> hybridí a zpětní kříženci, jsou v rámci druhového komplexu *D. longispina* také známy (Spaak 1996, Jankowski a Straile 2004), ale jsou mnohem vzácnější. Částečná schopnost pohlavního rozmnožování hybridů všech čtyř druhů navíc vede k horizontálnímu toku genů mezi jednotlivými druhy a má významný vliv na genofond současných i budoucích populací (Kapitola 4.2.1.).

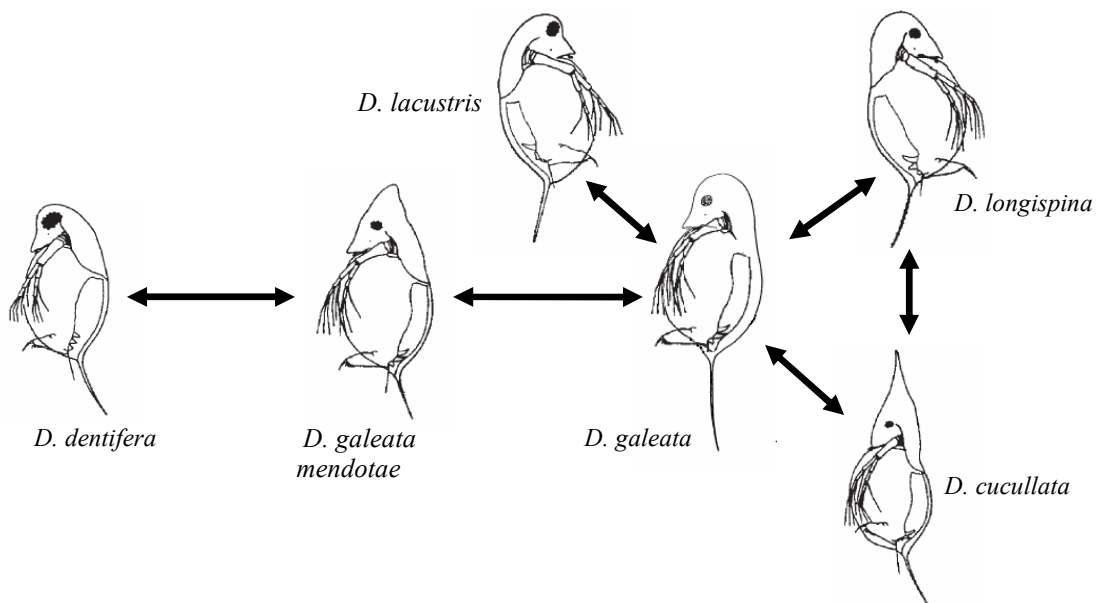
Na území nearktické biogeografické oblasti dochází k hybridizaci mezi *D. galeata mendotae* a *D. dentifera*<sup>4</sup> (Taylor a Hebert 1992, 1993a, b; Duffy et al. 2004). Důležitým reprodukčně – izolačním mechanismem těchto druhů jsou různé ekologické preference. *D. galeata mendotae* preferuje velká jezera, zatímco *D. dentifera* spíše malé nádrže bez ryb. Hybridí obývají jezera střední velikosti spolu s jedním z rodičovských druhů nebo samostatně. Druhý rodičovský druh bývá v minoritním zastoupení nebo je zcela eliminován. V podmínkách jezer střední velikosti jsou asi hybridí selekčně zvýhodněni, protože jejich populační hustota bývá vysoká a jednotlivé klonální linie na stanovištích stabilně setrvávají i několik let. Hybridí jsou navíc schopni zpětného křížení, v důsledku čehož dochází k horizontálnímu přenosu genů (Taylor a Hebert 1993b). Hybridizace *D. galeata mendotae* a *D. dentifera* je tedy introgresivní.

---

<sup>3</sup> Pelagická forma druhu *D. longispina* je v mnoha studiích označována jako *D. hyalina*, nicméně se nejedná o samostatný druh.

<sup>4</sup> Ve starších pracích ze severoamerického kontinentu bývá tento druh označován jako *D. rosea*.

Zajímavým případem je hybridizace mezi nearktickou *D. galeata mendotae* a palearktickou *D. galeata* (Taylor a Hebert 1993c). Tyto dvě linie byly po dlouhou dobu odděleny geografickou bariérou oceánu. Na konci sedmdesátých let nebo na počátku osmdesátých let dvacátého století invadovala evropská *D. galeata* do oblasti Velkých jezer na severovýchodě USA. Do Ameriky se pravděpodobně dostala spolu s balastní vodou velkých zaoceánských lodí podobně jako řada dalších invazních druhů. Invaze sice úspěšná nebyla, protože nika už byla obsazená morfologicky i ekologicky podobným druhem *D. galeata mendotae*, ale došlo k hybridizaci těchto dvou druhů (Kapitola 4.2.2.). Přestože jedinci s genotypem evropské *D. galeata* jsou v oblasti Velkých jezer vzácní, F<sub>1</sub> hybridy a zpětné křížence je možné detekovat poměrně často. Případ hybridizace mezi druhy *D. galeata mendotae* a *D. galeata* svědčí o tom, jak snadné je přehlédnutí ekologických a evolučních procesů rodu *Daphnia*, jestliže nemáme k dispozici moderní molekulární nástroje, a jak křehké mohou hranice mezi některými druhy být.



**Obrázek 2. Hybridizující druhy druhového komplexu *D. longispina* (schémata jednotlivých druhů Taylor et al. 2005).**

Šipky znázorňují, které druhy mezi sebou hybridizují. Druhy *D. dentifera* a *D. galeata mendotae* jsou nearktické, ostatní druhy jsou palearktické.

### 2.3. Proč dochází k hybridizaci

Z hlediska speciace bývá přítomnost hybridizace vysvětlována dvěma způsoby. Druhové komplexy jsou buď chápány jako evoluční krok k rozštěpení druhu do dvou různých linií, kde je mezidruhová hybridizace průvodním jevem procesu speciace (sympatrická speciace); nebo k hybridizaci dochází při druhotném kontaktu druhů, které od sebe byly delší dobu izolovány vnějšími izolačními mechanismy (alopatrická nebo parapatrická speciace)

(Harrison 1990). Jak ukazují některé genetické a biogeografické studie, sympatrická speciace je vzácná a většina druhů, stejně jako druhy rodu *Daphnia*, speciuje alopatricky. Uvážíme-li evoluční věk hybridizujících druhů rodu *Daphnia*, který je v řádu milionů let (genetická divergence cca 5-16 % na základě sekvencí malé mitochondriální ribozomální podjednotky; Petrušek et al., in prep.), je myslitelné, že střídání období zalednění a období osidlování nových habitatů v dobách meziledových mohlo v minulosti vést k druhotnému kontaktu dříve izolovaných linií a následně také k hybridizaci (Schwenk et al. 2000). Alopatrická diferenciace patrně hraje při speciaci rodu *Daphnia* velmi důležitou roli. Většina druhů je endemická pro jednotlivé kontinenty, protože překonání geografické bariéry oceánu je pro perloočky obtížné. V rámci jednoho kontinentu může k alopatrii docházet v důsledku preference různých na zeměpisné šířce závislých faktorů, jako je průměrná roční teplota (např. *D. galeata* a *D. lacustris* (Hobæk et al. 2004)), což je spíše výjimečné. Většina hybridizujících druhů je sympatrická a areály jejich rozšíření se téměř překrývají. Některé druhy i přesto, že obývají stejnou oblast, preferují ekologicky různá stanoviště a k hybridizaci dochází pouze na lokalitách, které mají přechodné vlastnosti mezi oběma typy stanovišť preferovanými rodičovskými druhy (*D. dentifera* a *D. galeata mendotae* (Taylor a Hebert 1992, 1993a, b)). Hybridizace těchto zástupců rodu *Daphnia* je spojena s fúzí ekologických nik (Lieder 1983) – tzv. hybridizací habitatu (Anderson 1948). Pokud tedy k izolaci populací dochází, nejedná se pouze o důsledek rozdílné schopnosti disperse jednotlivých linií, ale míra izolace je ovlivněna také polohou kontinentů, distribucí ekologicky podobných stanovišť a tolerancí jednotlivých linií k podmínkám vnějšího prostředí (Schwenk et al. 2000).

Některé z dnešních hybridizujících druhů rodu *Daphnia* se dostaly do druhotného kontaktu vinou člověka. Člověk může sloužit jako vektor při rozšiřování trvalých vajíček (např. vlastním tělem, lodní dopravou) a některá vajíčka tak mohou být přepravována i na, pro perloočky neobvykle, velké vzdálenosti (Taylor a Hebert 1993c). Tím že člověk mění přirozenou skladbu krajiny, velkou měrou přispívá i ke změnám ve společenstvech vodních ekosystémů. Například stavba nádrží se stojatou sladkou vodou, jakými jsou rybníky a přehradní nádrže, rozšiřuje nabídku potenciálních stanovišť pro vodní organismy. Tím je usnadněna také kolonizace lokalit, které byly dříve vzdálené. Existují také důkazy o tom, že eutrofizace vod v několika posledních desetiletích podporuje kolonizaci původně oligotrofních lokalit novými druhy, protože mizí problém limitace potravou a otevírají se nové niky (Straile a Geller 1998). Činnost člověka tedy může být přinejmenším stejně významným činitelem zprostředkovávajícím sekundární kontakt izolovaných linií jako faktory vnějšího prostředí nebo schopnost disperse.

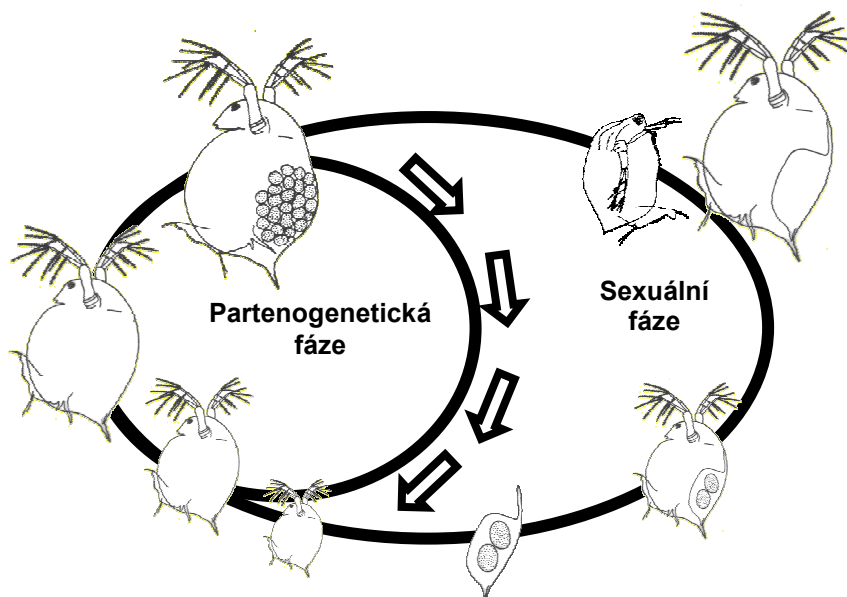
## 2.4. Kdy dochází k hybridizaci

Druhotný kontakt izolovaných linií je pouze jedním z předpokladů pro to, aby došlo k úspěšné hybridizační události. U dobře reprodukčně izolovaných druhů k hybridizaci nedochází ani v případě, kdy se vyskytují ve stejném časoprostoru. Stejně tak nemůže dojít k úspěšné hybridizaci, jestliže není životní cyklus a rozmnožovací cyklus obou hybridizujících druhů sladěn. Úspěch mezidruhového křížení sympatrických populací tak závisí na celé škále faktorů, jakými jsou prostorová a časová synchronizace, pohlavní výběr nebo hustota populace. Velká genetická divergence hybridizujících druhů rodu *Daphnia* svědčí o tom, že se reprodukční bariéry mezi jednotlivými druhy vyvíjejí velmi pomalu (Schwenk et al. 2000, Hobæk et al. 2004, Petrusek et al. in prep.). Většina prezygotických reprodukčně-izolačních mechanismů, jako je selektivita při výběru sexuálního partnera, pravděpodobně není vyvinuta (Petrusek, osobní sdělení) a dokončení vývoje reprodukční izolace druhů je tak zcela závislé na vzniku postzygotických reprodukčně-izolačních mechanismů.

Zástupci rodu *Daphnia*, stejně jako většina ostatních perlooček, se po většinu sezóny rozmnožují nepohlavně (partenogeneticky) a samci a sexuální samice vznikají pouze v krátkém období, obvykle jen několik týdnů dlouhém. Tento fenomén je známý jako cyklická partenogeneze (Obrázek 3). K hybridizaci dochází v období sexuální fáze životního cyklu za předpokladu, že se na jedné lokalitě a ve stejném čase vyskytují samci a pohlavní samice dvou různých druhů. Jestliže reprodukčně-izolační mechanismy nejsou zcela funkční a sexuální samice je úspěšně oplodněna samcem jiného druhu, vznikají trvalá vajíčka s rekombinantním genotypem. Velká část hybridních zárodků je pravděpodobně neživotaschopná, ale z některých vajíček se za vhodných podmínek líhne hybridní partenogenetická samice F<sub>1</sub>-generace, která se po dospění množí nepohlavně (partenogeneticky).

Faktorů, které vedou k indukci sexuální fáze u perlooček je celá škála, ale mechanismy jejich působení a podstatu jejich interakcí zatím neznáme. Většinou jde o faktory stresové, jako je zkrácení fotoperiody, limitace potravou, zvýšení hustoty populace nebo nízké teploty. Líhnutí samců je indukováno poněkud jinými faktory než vznik sexuálních samic. Zatímco přechod samic do sexuální fáze životního cyklu je podmíněn převážně kombinací faktorů vnějšího prostředí, líhnutí samců je ve velké míře zprostředkováno i chemickými podněty, které jsou uvolňovány při zvýšení populační hustoty perlooček (Hobæk a Larson 1990). Zajímavé je, že tyto chemické signály nejsou druhově

specifické a vyvolávají líhnutí samců i mezi vzdáleně příbuznými druhy (Hobæk a Larson 1990). Jestliže tedy samičky dvou druhů vstupují do sexuální fáze životního cyklu v různých částech roku, samci jsou vždy v kontaktu pouze se sexuální samičkou jednoho druhu a případná hybridizace je tak silně asymetrická (Jankowski a Straile 2004). K asymetrii v mezidruhovém páření také dochází, jestliže je jeden z rodičovských druhů vzácný (Dowling et al. 1989; Taylor a Hebert 1993). Čistě statisticky, pro jedince vzácnějšího druhu je pravděpodobnost nalezení sexuálního partnera mezi jedinci hojnějšího druhu větší než pravděpodobnost nalezení sexuálního partnera v rámci druhu vlastního. Podle tohoto scénáře by tedy měl být mateřským druhem většinou druh hojnější, ale některé studie ukazují, že tomu tak vždy není. Schwenk et al. (in MS) se domnívají, že asymetrii při hybridizaci rodu *Daphnia* může způsobit různá životaschopnost různých hybridních potomků. Tuto teorii dokládá laboratorní pokus, ve kterém byly kříženy různé klony dvou různých druhů rodu *Daphnia* (Schwenk et al. 2001). Úspěšnost jednotlivých páření se lišila počtem produkovaných trvalých vajíček, počtem vylíhnutých hybridních potomků i počtem potomků doživších se dospělosti. Podobné mechanismy mohou způsobit asymetrii i při zpětném křížení (Schwenk et al. in prep.; Taylor a Hebert 1993b), což v krajním případě vede k jednosměrné introgresi.



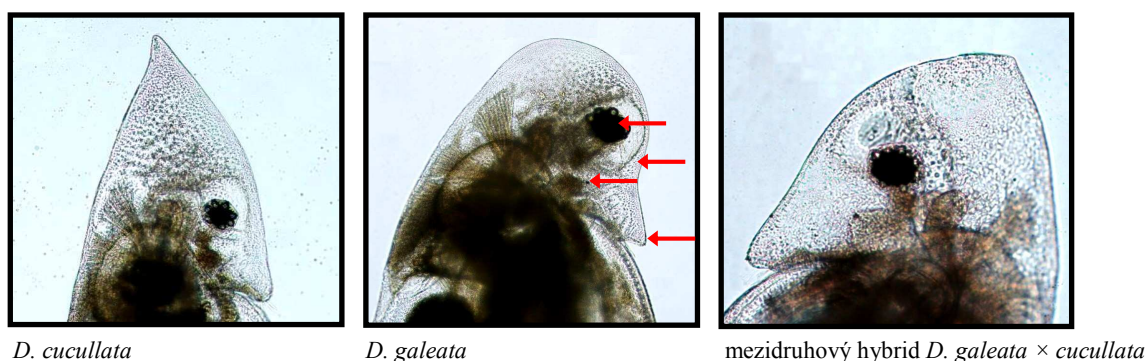
**Obrázek 3. Životní cyklus perlooček rodu *Daphnia* (autoři schématu: K. De Meester, K. De Gelas a A. Petrusek; popis dle Mort 1991 a Spaak 2000).**

Životní cyklus cyklicky partenogenetických perlooček má dvě fáze – fázi partenogenetickou a fázi sexuální. Po většinu sezóny jsou na lokalitě pouze asexuální samice, které produkují partenogenetická vajíčka. Počet vajec ve snůšce se může lišit a závisí především na velikosti a kondici samic. Z partenogenetických vajíček se opět líhnou asexuální samice, které jsou geneticky identické se svou matkou. Při vstupu do sexuální fáze životního cyklu se z některých partenogenetických vajíček líhnou samci, kteří jsou diploidní a geneticky identičtí se svou matkou. Samice se připravují na pohlavní rozmnožování tak, že vytvoří eřpium. Sexuální fáze obvykle trvá pouze několik týdnů a dochází v ní k pohlavnímu rozmnožování mezi samci a pohlavními

samicemi. Oplodněná samice zpravidla nese dvě trvalá vajíčka, která jsou při svlékání uvolněna v efiptiu do volného prostoru. Vajíčka jsou v takto konzervovaném stavu schopna přežít i dlouhá období nepřízně a slouží zároveň jako odolná i jako dispersní stádia. Za vhodných podmínek se z trvalého vajíčka líhne partenogenetická samice, která je rekombinantem obou rodičovských genotypů.

## 2.5. Morfologické vlastnosti hybridů rodu *Daphnia*

Morfologická variabilita zástupců rodu *Daphnia* je velká a do značné míry ovlivněná faktory vnějšího prostředí (např. predační tlak, turbidita, dostupnost potravy) (Benzie 1986). Přesto lze u některých druhů nalézt morfologické znaky, které kromě toho, že jsou druhově specifické, umožňují také identifikaci mezidruhových kříženců. Hybridní mají přechodný fenotyp v porovnání s oběma rodičovskými druhy (např. Brooks 1957; Lieder 1983; Wolf a Mort 1986; Jankowski a Straile 2004) a kombinují tedy morfologické vlastnosti obou rodičovských druhů. Morfologická variabilita hybridů je nicméně přinejmenším stejně velká, jako variabilita rodičovských druhů (Schwenk et al. in MS). V důsledku toho jsou někteří hybridní jasně odlišitelní od obou rodičovských druhů a jiní se naopak podobají jednomu rodičovskému druhu natolik, že je na základě morfologie téměř nelze odlišit. Hybridní F<sub>1</sub>-generace se od rodičovských druhů zpravidla liší celkovým tvarem těla i dílčími morfologickými znaky. Pro odlišení F<sub>1</sub> hybridů druhového komplexu *D. longispina* se například tradičně využívají znaky, které se nacházejí v oblasti hlavy (viz Obrázek 4) (Wolf a Mort 1986, Gießler et al. 1999). Zpětní kříženci se morfologicky více podobají jednomu rodičovskému druhu (Jankowski a Straile 2004) a jejich odlišení od jednoho z rodičů je na základě morfologických znaků téměř nemožné. Podobně je tomu také s hybridy F<sub>2</sub>-generace a dalšími rekombinanty.



**Obrázek 4. Srovnání morfologických znaků *D. cucullata*, *D. galeata* a jejich F<sub>1</sub> hybridu (foto: Š. Ruthová)**

Oba rodičovské druhy i F<sub>1</sub> hybrid se od sebe na první pohled morfologicky liší, ale přesné definování rozdílů mezi jednotlivými liniemi může být značně komplikované. K odlišení hybridů od rodičovských druhů zpravidla slouží fixní morfologické znaky, jako je velikost a poloha oka, sklon frontální části hlavy, přítomnost naupliového oka a vzdálenost místa inzerce antenul od vrcholu rostra (označeno šipkami). Mezidruhový hybrid má přechodný tvar hlavy mezi oběma rodičovskými druhy. Od obou druhů se liší polohou antenul (oproti druhu *D. galeata* došlo k posunu místa inzerce antenul blíže k vrcholu rostra), od druhu *D. galeata* velikostí a polohou oka i tvarem hlavy a na rozdíl od druhu *D. cucullata* má tento hybrid vyvinuté naupliové oko.

### 3. EKOLOGICKÉ VZTAHY

#### 3.1. Fitness hybridů rodu *Daphnia*

Fitness hybridů rodu *Daphnia* může být studována ze dvou různých aspektů. Ekologické studie zpravidla sledují fitness hybridů z krátkodobého hlediska v partenogenetické části životního cyklu a nezabývají se úspěšností hybridů ve fázi sexuální (např. Spaak a Hoekstra 1997). Evolučně biologické studie, které studují dlouhodobý evoluční význam hybridních linií, naopak sledují i reprodukční úspěch hybridů v sexuální fázi životního cyklu a jejich genetický příspěvek do dalších generací (např. Schwenk a Spaak 1995). Hybridní linie, které jsme schopni detekovat, se po celý život nebo po jeho velkou část s úspěchem rozmnožují nepohlavně. Klíčovým faktorem ovlivňujícím jejich relativní fitness jsou proto především selekční faktory vnějšího prostředí (Kapitola 3.2.). Mnohé empirické studie dokazují, že hybridní rodu *Daphnia* mohou být lokálně velmi úspěšnou skupinou, která díky výhodné kombinaci vlastností obou rodičovských druhů spojenou se schopností nepohlavního rozmnožování obsazuje nové niky nebo s úspěchem koexistuje s oběma rodičovskými druhy na jedné lokalitě (Spaak a Hoekstra 1995; 1997; Declerck a De Meester 2003) (Kapitola 3.3.1.). Z tohoto pohledu se fitness hybridů rodu *Daphnia* zásadním způsobem liší od tradičních představ, ve kterých jsou hybridní všeobecně považováni za méně zdatnou linii (Barton a Hewitt 1985). Na druhé straně, jestliže se hybridní rozmnožují pouze partenogeneticky, míra jejich adaptace k podmínkám vnějšího prostředí závisí pouze na mutačních změnách. V důsledku toho mohou být sice lokálně úspěšnou skupinou, nicméně jejich evoluční význam a tedy i dlouhodobá relativní zdatnost jsou zanedbatelné.

Hybridní druhového komplexu *D. longispina* jsou jedinou známou skupinou hybridů rodu *Daphnia*, která je schopna pohlavního rozmnožování. Pomocí molekulárních nástrojů se v několika posledních letech podařilo detekovat F<sub>2</sub> hybridy i zpětné křížence tohoto komplexu na různých lokalitách v Evropě i v Severní Americe (např. Schwenk a Spaak 1995; Taylor a Hebert 1993a; Spaak et al. 2004). K jejich nálezům dochází ve srovnání s počtem hybridů F<sub>1</sub>-generace poměrně vzácně, což svědčí o snížené plodnosti F<sub>1</sub> hybridů. Přesný rozsah limitace schopnosti pohlavního rozmnožování u hybridů způsobený poškozením v průběhu meiózy (sterilita hybridů) (Schwenk 1997) nicméně zatím není znám. Pravděpodobnost dokončení embryonálního vývoje F<sub>1</sub> hybridů je ovlivněna směrem mezidruhového křížení a vlastnostmi rodičovských jedinců (Schwenk et al. 2001). Při křížení stejných druhů může být podíl úspěšně vylíhnutých hybridních vajíček poměrně vysoký i roven nule. Podobné vztahy fungují i při zpětném křížení (Schwenk et al. in MS), ale u zpětných kříženců a jejich potomků by se mohla fertilita opět zvyšovat.

Při studiu přirozených populací naší pozornosti zcela unikají hybridy, kteří buď nejsou schopni partenogenetického rozmnožování nebo se nevylíhnou z trvalých vajíček. V ojedinělém laboratorním pokusu, kde byla experimentálně křížena *D. galeata* a *D. cucullata* (Schwenk et al. 2001) se z vyprodukovaných trvalých vajíček dožilo dospělosti pouze 2,8 % hybridů. Ve většině prací sledujících historii druhového složení perlooček ve sladkovodních ekosystémech jsou analyzováni pouze vylíhlí jedinci (Faustová et al. 2004; Spaak a Keller 2004) a o tom, jaký je skutečný podíl hybridních vajíček v přirozeném prostředí tak zatím máme jen kusé informace. Výsledky ekologicky i evolučně zaměřených studií, které ve své práci dále cituji, tedy byly logicky získány při studiu těch nejúspěšnějších hybridních linií. Domnívám se, že právě tento úspěch z nich činí ideální modely pro studium ekologických i evolučních procesů.

### **3.2. Modely hybridních zón**

Snahou populačních ekologů druhé poloviny devatenáctého století se stalo vytvoření souhrnného modelu popisujícího vznik, stabilizaci a chování hybridních zón. Brzy se ukázalo, že navrhnout univerzální model tak, aby vyhovoval požadavkům všech hybridizujících druhů, je velice složité, ne-li nemožné. Zatímco hybridizací některých druhů vznikají jedinci zcela neplodní se zanedbatelnou fitness oproti rodičovským druhům, hybridizací jiných druhů vznikají jedinci částečně plodní, kteří navíc mohou kombinovat vlastnosti obou rodičovských druhů tak, aby byli zvýhodněni v lokálních podmínkách (Arnold 1997). Kromě toho se také liší charakter hybridních zón. U druhů se spojitým areálem hybridní zóna vzniká na překryvu areálu obou populací. Naopak u druhů s ostrůvkovitým rozšířením, kterými jsou také organismy obývající stojaté vody, hybridní zóna v pravém slova smyslu neexistuje nebo má charakter slepence jednotlivých populací („patchwork of populations“ (Harrison a Rand 1989)). Ve snaze vyhovět těmto předpokladům byly navrženy jednak modely ekologické (např. mosaic models (Howard 1986; Harrison 1986), bounded hybrid superiority model (Moore 1977)), ve kterých je selekce ovlivněna faktory vnějšího prostředí, tak i modely, které předpokládají nezávislost selekčních procesů na faktorech vnějšího prostředí (tension zone models (Barton 1979; Barton a Hewitt 1985)). Nezávislostí na faktorech vnějšího prostředí se myslí, že snížená životaschopnost nebo snížená plodnost hybridů je způsobena výhradně endogenními faktory, jako je částečná genetická inkompabilita rodičovských genomů.

### 3.3. Temporal hybrid superiority hypothesis

Všechny výše uvedené a široce užívané modely hybridních zón byli původně navrženy pro suchozemské a obligátně sexuální organismy. Pro modelování populačních změn rodu *Daphnia* tedy nejsou příliš vhodné. Zástupci rodu *Daphnia* mají nespojitě areály ostrovního charakteru, kde je migrace mezi jednotlivými subpopulacemi uskutečňována dálkovým transportem. Životní prostředí jednotlivých stanovišť je navíc velice homogenní v porovnání se suchozemským prostředím. Není tedy nijak neobvyklé, že se areály subpopulací více druhů nebo rodičovských druhů a jejich hybridů zcela překrývají a dochází k sympatrii (Taylor a Hebert 1992,1993b). Hybridní zóna sensu stricto tak v podstatě neexistuje (Schwenk a Spaak 1995). Výjimku by mohly tvořit dlouhé průtočné korytovité nádrže, kde se na vertikálním i horizontálním profilu tvoří gradienty abiotických i biotických faktorů (např. živiny, rybí predace) (Seďa a Devetter 2000). Nabídka různých stanovišť v rámci jedné lokality se tak rozšíří. Modely popisující dynamiku hybridních zón obligátně sexuálních organismů navíc předpokládají, že je hybridní zóna udržována opakovanými hybridizačními událostmi. U partenogeneticky se rozmnožujících zástupců rodu *Daphnia* toto není nezbytné, protože ke vzniku populace hybridů teoreticky stačí jedna hybridizační událost. Z přírody skutečně známe několik lokalit, kde je celá populace tvořena pouze jedním hybridním klonem (Hebert et al. 1989). Usnadněna je také následná stabilizace klonální linie, protože partenogeneze umožňuje obcházet problémy spojené s pohlavním rozmnožováním (tzv. *hybrid breakdown*).

Jako model vysvětlující koexistenci hybridů a rodičovských druhů a lokální reprodukční úspěch hybridů rodu *Daphnia* byla navržena hypotéza „*temporal hybrid superiority*“ (Spaak a Hoekstra 1997). Ta konstatuje, že na časově proměnlivých lokalitách, jako jsou jezera mírného pásu, mohou hybridy koexistovat se svými rodičovskými druhy, protože v některých částech roku a za vhodných podmínek vnějšího prostředí mají větší fitness. To je v zásadním rozporu s široce rozšířeným modelem tenzních zón (Barton a Hewit 1985), který předpokládá, že hybridy mají nižší fitness než rodičovské druhy a že je tento handicap kompenzován opakovanou produkcí hybridů. Studie zabývající se populační dynamikou hybridů rodu *Daphnia* ukázaly, že hybridy sice mají přechodný fenotyp mezi oběma rodičovskými druhy, ale jejich reprodukční strategie se více podobá reprodukční strategii jednoho rodičovského druhu (Weider 1993; Spaak 1995; Spaak a Hoekstra 1995). Ve fázi partenogenetického množení tak mohou kombinovat menší velikost, která je selekčně výhodná za specifických podmínek vnějšího prostředí (např. zvýšený predační tlak, limitace potravou - Kapitola 3.3.1 a 3.3.2.) s poměrně vysokou reprodukční rychlostí.

### 3.3.1. Predační tlak

Klíčovým faktorem vysvětlujícím koexistenci hybridů s rodičovskými druhy a dočasný velký populační růst hybridů v přirozených podmínkách bývá zvýšený predáční tlak ryb. Selekcční tlak pozitivně koreluje s velikostí jedinců (O'Brien et al. 1976; Zaret 1980 dle Spaak a Hoekstra 1995) a s jejich viditelností. To znamená, že drobné druhy a druhy s nepigmentovaným karapaxem mají oproti větším nebo pigmentovaným druhům selekcční výhodu. V populacích některých druhů rodu *Daphnia* (např. *D. galeata*) a jejich hybridů je běžné, že při zvýšeném predáčním tlaku ryb (resp. v přítomnosti rybích kairomonů), dochází ke zmenšování průměrné velikosti těla jedinců (Boersma et al. 1998; Declerck a Weber 2003; Spaak et al. 2000).

Spaak a Hoekstra (1995;1997) a Declerck a De Meester (2003) studovali vliv predáčního tlaku ryb na sympatrický hybridní komplex *D. galeata*/*D. cucullata*. Zatímco bez přítomnosti ryb byl nejúspěšnější největší a nejplodnější druh *D. galeata*, po introdukci ryb měla nejvyšší vnitřní rychlost růstu populace hybridů. Reprodukční úspěch hybridů při silném predáčním tlaku ryb je dán tím, že hybridi slučují poměrně malou tělesnou velikost snižující riziko predace s vysokou reprodukční rychlostí. Jsou tedy úspěšnější než velká *D. galeata*, která silněji podléhá predáčnímu tlaku, i než malá *D. cucullata*, která nemá tak výhodnou reprodukční strategii. Situace se může vyvíjet i jiným způsobem. Flik a Vijverberg (2003) sledovali na jednom stanovišti populace velkého druhu *D. pulicaria* a menších hybridů *D. galeata* × *D. longispina*. Při introdukci ryb na lokalitu začali obě linie vertikálně migrovat, ale později při zvýšení predáčního tlaku se jejich strategie odlišily. *D. pulicaria*, která je na stanovišti bez ryb kompetičně zdatnější, byla náhle oproti malým hybridům selekčně znevýhodněna a uchýlila se do vrstev hypolimnia. Tím sice získala refugium před rybími predátory, ale vlivem nízkých teplot se její růstová rychlost a tím i fitness snížila. Naopak drobnější hybridi využívali přes den refugia v hypolimniu, ale v noci vyplouvali do teplé metabolicky výhodnější povrchové vrstvy (Flik a Vijverberg 2003). Rychlý populační růst hybridů byl tak podpořen nejen menším predáčním tlakem, ale i diferenciací nik.

Kombinací morfologických i behaviorálních vlastností rodičovských druhů mohou hybridi získat výhodu i v přítomnosti bezobratlých predátorů. Spaak (1995) pozoroval, že juvenilní stádia hybridů *D. cucullata* × *D. galeata*, která nejvíce podléhají predáčnímu tlaku bezobratlých predátorů, mají tělesný růst v podstatě shodný s *D. galeata*, ale jejich cyklomorfóza je více podobná druhu *D. cucullata*. První instar hybridů tedy kombinuje relativní délku přilbovitého protažení hlavy a spiny *D. cucullata* a rychlejší růst *D. galeata*.

### 3.3.2. Dostupnost potravy

Predační tlak nemusí být klíčovým faktorem utvářejícím populační strukturu za všech podmínek. Na mnoha přirozených lokalitách vůbec planktonožravé ryby nejsou, nebo mají malé populační hustoty. Některé studie také ukazují, že vliv rybí predace se stává důležitým až v pozdním období vegetační sezóny, kdy je přítomno dostatečné množství juvenilních ryb (Boersma et al. 1991). Jestliže je predací tlak ryb nízký, dochází ke vzrůstu populačních hustot filtrátorů ve vodním sloupci nádrže. Filtrátoři odfiltrávají velké množství řas v nádrži a limitujícím faktorem se může stát dostupnost potravy. Potravní dostupnost je pro rod *Daphnia* klíčovým faktorem také na oligotrofních a ultraoligotrofních stanovištích, kde je růst řas redukován nízkou dostupností základních živin.

Boersma a Vijverberg (1994a, b) provedli laboratorní pokus, ve kterém sledovali populační dynamiku populací *D. galeata*, *D. cucullata* a jejich mezidruhových hybridů v různých koncentracích potravy. Zjistili, že při limitaci potravou jsou ve výhodě, ve shodě se *size-efficiency hypothesis* (Brooks a Dodson 1965)<sup>5</sup>, větší jedinci (tzn. *D. galeata* a hybridi) a že dojde ke kompetičnímu vyloučení nejmenšího druhu (*D. cucullata*). Zajímavý byl výsledek pokusu s vysokou koncentrací potravy, kdy měli nejvyšší vnitřní rychlost růstu hybridi. Za situace, kdy víme, jak moc se mohou vlastnosti klonů v rámci jednoho taxonu lišit, zůstává otázkou, nakolik výsledek ojedinělého laboratorního pokusu odpovídá situaci v přirozeném prostředí. Kromě dostupnosti potravy má na strukturu populací vliv i kvalita potravy a velikost částic (Repka 1996). Úspěch nebo neúspěch jednotlivých linií ve výše zmíněném experimentu tak může být artefaktem, protože kvalita potravy nebyla brána v úvahu (pokusné klony byly krmeny pouze dvěma druhy řas). Současné výzkumy přirozených sympatrických populací rodu *Daphnia* vliv predace a vliv dostupnosti potravy shrnují v rámci jedné studie, protože striktní oddělení obou faktorů v prostředí větších nádrží a jezer je téměř nemožné.

### 3.3.3. Další ekologické faktory

Znalost klíčového faktoru ovlivňujícího úspěšnost populací jednotlivých druhů rodu *Daphnia* a jejich hybridů do značné míry zjednoduší interpretaci a následné modelování populačních změn. Při studiu vztahů mezi populacemi a životním prostředím však nesmíme

---

<sup>5</sup> Size-efficiency hypothesis (Brooks a Dodson 1965) říká, že:

- 1) planktonní herbivoři otevřených vod soutěží o potravní partikule vhodných rozměrů (1 až 15  $\mu\text{m}$ )
- 2) větší jedinci mají filtraci účinnější a mohou také pozřít větší partikule
- 3) proto, když je intenzita predace nízká, budou malí planktonní herbivoři kompetitivně vyloučeni velkými formami

zapomínat na to, že vnější prostředí je tvořeno celým souborem ekologických faktorů. Relativní význam abiotických a biotických faktorů je navíc často obtížně definovatelný, protože mohou působit jak ve stejném, tak v opačném směru. Výsledky laboratorních studií zaměřených na jediný faktor se tak nemusí shodovat se skutečností, protože směr selekce při působení jednoho faktoru a výsledný směr selekce při působení celé škály faktorů se může značně lišit. Populace rodu *Daphnia* mají navíc poměrně dynamický vývoj a i malá změna v některém z faktorů vnějšího prostředí může způsobit velké změny ve struktuře a početnosti populací. Predační tlak ani dostupnost potravních zdrojů by tak rozhodně neměly být považovány za jediné faktory ovlivňující fitness hybridů, jejich distribuci v rámci stanoviště a sílu „mezidruhové“ konkurence.

Kromě vlivu predace a dostupnosti potravy byla popsána celá řada faktorů, kterými je možno vysvětlit vztahy populací hybridů a jejich rodičovských druhů. Je to například parazity (Wolinska et al. 2004), morfometrické parametry jezera (Schwenk, nepublikováno podle Schwenk 1997), fluktuace teplot během roku (Spaak a Hoekstra 1997), nebo dostupnost základních prvků. Zástupci rodu *Daphnia* jsou často limitováni fosforem (Sterner a Essen 1994), nenasycenými mastnými kyselinami (Wacker a von Elert 2001), ale podobně i kombinacemi chloridů a křemičitanů (Schwenk 1997). Obecně se dá říct, že přítomnost hybridů na jednotlivých lokalitách a jejich koexistence s rodičovskými druhy je ovlivněna jak historicko-demografickými faktory, tak současnými environmentálními podmínkami a jejich změnami. Vždy však musíme striktně oddělovat faktory ovlivňující lokální a dočasný reprodukční úspěch hybridů od faktorů, které mají vliv na samotný vznik hybridních linií, jejich reprodukční úspěch cestou pohlavního rozmnožování a možnost jejich dlouhodobého přežívání; ty jsou spíše endogenního charakteru.

Taxon	Predační tlak					Vnitřní rychlost růstu za průměrných podmínek
	Predační tlak ryb	bezobratlých predátorů	Mezidruhová kompetice	Limitace potravou	Parazitace	
<i>D. galeata</i>	vysoký	nízký	nízká	nízká	nízká	vysoká
<i>D. cucullata</i>	střední	vysoký	nízká	vysoká	nízká	nízká
hybridi	nízký	střední	vysoká	střední	vysoká	vysoká

Tabulka 1. Ekologické charakteristiky *D. galeata*, *D. cucullata* a jejich mezidruhových kříženců.

#### 4. EVOLUČNÍ DŮSLEDKY HYBRIDIZACE RODU *DAPHNIA*

V předchozí kapitole jsem se pokusila ukázat, jak kombinace morfologických i fyziologických vlastností obou rodičovských druhů spolu se schopností nepohlavního

rozmnožování usnadňuje hybridům rodu *Daphnia* založení populace, která je nejen schopna obstát v podmínkách vnějšího prostředí, ale za správné konstelace také úspěšně konkurovat oběma rodičovským druhům. Nepohlavní rozmnožování je výsadou skýtající ohromný potenciál – nejen že nemusí docházet k produkci samců, ale základem celé populace se navíc může stát jediná hybridní samice. Taková situace pochopitelně není možná u žádného obligátně sexuálního organismu, kde je jedinou možností jak stabilizovat hybridní zóny opakovaná hybridizační událost. Na druhé straně, při absenci pohlavního rozmnožování zůstávají jediným zdrojem variability náhodné mutace a přizpůsobivost asexuálních linií na nové vnější podmínky je proto minimální. Otázka dlouhodobého přežívání hybridních linií a evolučních důsledků z toho plynoucích je tak ve srovnání s dočasným ekologickým významem hybridů značně komplikovaná.

#### 4.1. Stabilizace hybridních linií

Délka setrvání hybridů na stanovišti je ovlivněna dvěma faktory: 1) podmínkami vnějšího prostředí (chemické a fyzikální faktory, interakce s jinými organismy) a 2) schopností hybridů přežít nepříznivá období (fyziologické vlastnosti). Jestliže jsou podmínky vnějšího prostředí vhodné a dostatečně stálé, může jedna klonální linie na lokalitě setrávat i mnoho desítek let (Jankowski a Straile 2004). Naopak na lokalitách, které podléhají fluktuacím, je produkce trvalých vajíček pro udržení populace perlooček nezbytná. Různí hybridy rodu *Daphnia* jsou různou měrou uzpůsobeni k udržení hybridních linií v obdobích, kdy je pro ně společné působení biotických a abiotických faktorů nepříznivé. Populace, které se množí partenogeneticky bez produkce trvalých vajíček, jsou nejméně stabilní. Absence odolných dispersních stádií zvyšuje citlivost populace na sezónní výkyvy podnebí, čímž je zvýšena také pravděpodobnost extinkce. Příkladem jsou hybridy *D. „obtusá“* a *D. pileata* obývající periodické tůně v Severní Americe (Hebert a Finston 1996). Tůně pravidelně vysychají, což vede k zániku místních populací perlooček. Zatímco populace obou rodičovských druhů se po opětovném zavodnění obnovují z banky trvalých vajíček, hybridní linie může vzniknout pouze opakovanou hybridizací, protože F1 hybridy jsou zřejmě sterilní.

Možností jak zvýšit stabilitu klonálních linií je obligátní partenogeneze, která je běžná například u arktických tůňových populací rodu *Daphnia* (Hebert et al. 1989; Hebert et al. 1993), ale také ve vysokohorských podmínkách (Mergeay et al, in MS) Obligátně partenogenetické samice jsou schopny vytvářet vedle klasických partenogenetických vajíček také vajíčka trvalá, čímž je vyřešen problém sezónních výkyvů ve faktorech vnějšího prostředí. Trvalá vajíčka jsou generována nepohlavní cestou a posléze se z nich líhnou jedinci

geneticky identičtí se svou matkou. Variabilita v rámci žijící populace i v rámci disperzních stádií je proto v důsledku absence pohlavního rozmnožování minimální. Dlouhodobá perspektiva obligátně partenogenetických linií je tedy v podstatě stejná jako perspektiva linií neprodukujících odolná dispersní stadia. Přestože obligátně partenogenetické linie snadno přecházejí sezónní výkyvy ekologických faktorů, délka jejich persistence na stanovišti je zcela závislá na dlouhodobé stabilitě vnějšího prostředí. Hrozba vymření lokálních populací hybridů tedy není zažehnána, pouze oddálena na dobu, kdy dojde k natolik zásadní změně ekologických podmínek, že se jí uniformní populace hybridů nebudou schopny přizpůsobit.

Některé obligátně partenogenetické hybridy se dokonce často uvádějí jako samostatné druhy (např. severoamerické arktické populace označované jako *D. „middendorffiana“* (Dufresne a Hebert 1994)). Populace obligátně partenogenetických hybridů se skutečně jeví jako dobře morfologicky i ekologicky definované druhy, dokud není provedena genetická analýza. Vzhledem k opakovanému vzniku hybridních linií však o speciaci v pravém slova smyslu nejde.

Hybridy z druhového komplexu *D. longispina* jsou příkladem třetí možné životní strategie: neztrácejí zcela schopnost pohlavního rozmnožování a jsou tudíž stejně jako rodičovské druhy schopni rozmnožovat se cyklickou partenogenezí. Přestože v partenogenetické části životního cyklu bývají hybridy tohoto druhového komplexu velmi úspěšní, jejich pohlavní rozmnožování je komplikovanější. O snížené plodnosti  $F_1$  hybridů svědčí poměrně vzácné případy detekce  $F_2$  hybridů a zpětných kříženců (Wolf 1987, Spaak 1996) (Kapitola 3.1.). Přestože se pohlavní rozmnožování  $F_1$  hybridů zdá být v porovnání s frekvencí úspěšného pohlavního rozmnožování rodičovských druhů relativně vzácnou událostí, může mít významné důsledky. Zpětné křížení otevírá cestu k zásahům do genofondu obou rodičovských druhů a teoreticky může dojít i k evoluci a případně dlouhodobější stabilizaci hybridní linie geograficky oddělené od jednoho či obou rodičovských druhů (Kapitola 4.2.2.).

<b>Životní cyklus</b>	<b>Citlivost na krátkodobé (sezónní) fluktuace</b>	<b>Citlivost na dlouhodobé fluktuace</b>
Partenogeneze bez disperzního stadia	Vysoká	Vysoká
Obligátní partenogeneze	Nízká	Vysoká
Cyklická partenogeneze	Nízká	Nízká

**Tabulka 2. Míra citlivosti taxonů s různými životními strategiemi k různě dlouhým fluktuacím ekologických faktorů.**

## 4.2. Důsledky hybridizace v přirozeném prostředí

Jedinec, který vzniká procesem hybridizace, má zcela nový genotyp, který se zásadním způsobem liší od genofondu obou rodičovských druhů. Hybridizace je tedy v přirozeném prostředí především zdrojem variability. V porovnání s rychlostí změn v genofondu, které vznikají jako důsledek mutací a rekombinace, se hybridizace jeví jako dramatický proces, kdy k významným evolučním změnám může docházet již během jedné generace. Právě díky rychlosti, se kterou hybridizace tvoří nové kombinace genů a se kterou hybridní jedince vystavuje působení selekce, je hybridizace ideálním modelem pro studium evoluce.

Důsledků, kterými v přirozeném prostředí ústí hybridizační události, je celá řada a různou měrou ovlivňují jak samotné hybridy, tak i oba rodičovské druhy. Interakce hybridů a rodičovských druhů v hybridních zónách jsou často chápány jako balancování mezi splýváním mezidruhových hranic (*fusion*) a posilováním reprodukčních bariér mezi rodičovskými druhy (*reinforcement*) (Harrison 1990). Výsledek závisí především na dlouhodobé fitness hybridů a na stupni prezygotické reprodukční izolace hybridizujících druhů, zejména na selektivitě při výběru partnera (Wilson 1965, podle Harrison 1990). Jestliže je relativní fitness hybridů nízká, dochází k posílení prezygotických reprodukčních bariér rodičovských druhů. V důsledku toho se sníží i frekvence hybridizačních událostí a zformují se dobře reprodukčně izolované druhy (*reinforcement*). Naopak vysoká relativní fitness hybridů podpoří horizontální tok genů a oba rodičovské druhy i se svými hybridy postupně splynou v homogenní (pravděpodobně polymorfní) populaci (*fusion*) (Harrison 1990). V některých případech bývá hybridizace následována izolací hybridů od obou rodičovských druhů, čímž může být nastartován proces speciace. Mechanismem speciace u populací hybridů vzniklých pohlavním rozmnožováním rodičovských druhů může být (Grant 1981, podle Harrison 1990):

- 1) oddělení hybridů vnějšími izolačními mechanismy, které mohou být ekologické (například konkurenční vyloučení rodičovských druhů, osídlení typově nového stanoviště), časové nebo behaviorální (Kapitola 4.2.2.);
- 2) rekombinační speciace<sup>6</sup>, kdy se rekombinanti pocházející z křížení hybridů F<sub>1</sub>-generace pohlavně rozmnožují mezi sebou, ale nekříží se s rodičovskými druhy nebo s jinými rekombinantními genotypy (Flégr 2005);

---

<sup>6</sup> Rekombinační speciace je v přirozeném prostředí vzácná a dochází k ní především u rostlin. Žádný známý druh rodu *Daphnia* tímto způsobem pravděpodobně nespocioval.

3) nebo proces alopolyloidizace, kdy u hybridů dochází k násobení počtu chromosomů (viz. Kapitola 4.2.3.).

Jak už jsem ukázala výše, různí hybridi rodu *Daphnia* se zásadním způsobem liší historií svého vzniku, svou relativní fitness i svou životní strategií. Evolučních důsledků z toho plynoucích je proto celá škála, liší se hybrid od hybrida a nabízí pole neorané mnohým evolučním biologům. Narozdíl od ekologie hybridů rodu *Daphnia*, která velkou měrou neodpovídá univerzálním modelům hybridních zón, jsou evoluční důsledky hybridizace tohoto rodu v souladu se současnými představami o dynamice a evoluci populací hybridů a jejich rodičovských druhů. Evolučním důsledkem hybridizace rodu *Daphnia* je pak především introgrese, speciace a polyploidizace hybridních linií.

#### 4.2.1. Introgrese

Nejzásadnějším, ale zároveň poměrně častým evolučním procesem, který hybridizaci rodu *Daphnia* provází, je horizontální tok genů (introgrese). Tento proces můžeme definovat jako výměnu genů mezi druhy, poddruhy, rasami nebo jinými soustavami populací (Rieseberg a Wendel 1993, podle Schwenk 1997), ale stejný termín byl použit i pro pojmenování několika dalších fenoménů (Harrison 1990). Proces introgrese zahrnuje cytoplazmatickou introgresi (přenos mitochondriálních nebo chloroplastových genomů) i introgresi jaderné DNA, přičemž k oběma typům toku genů nemusí docházet současně nebo jejich síla nemusí být stejná. Z přirozeného prostředí známe mnoho případů, kdy je cytoplazmatický tok genů silnější než jaderný nebo naopak. Přesné mechanismy těchto nesouladů nejsou známy, ale výchytky mohou být způsobeny například selekcí vůči cizorodým genům (Rieseberg et al. 1991) nebo asymetrickou reproduktivní izolací (Aubert a Solignac 1990). Intenzivní studie introgrese u rostlin (např. Ellstrand et al. 1999, Hardig et al. 2000, Rieseberg 1998) a u živočichů (např. Aubert et al. 1997, Dowling a Hoeh 1991, Epifanio a Philipp 2000) v několika posledních letech ukázaly, že introgrese je mocným nástrojem evoluce a že její vliv na variabilitu a genetickou diverzitu přirozených populací může být významný; a to ať v pozitivním (Stebbins a Daly 1961) nebo negativním (Rhymer a Simberloff 1996) slova smyslu.

V rámci rodu *Daphnia* dochází k horizontálnímu přenosu genů procesem tzv. „introgresivní hybridizace“. Tento termín poprvé užili Anderson a Hubricht (1938) k popisu důsledků opakovaného zpětného křížení hybridů a rodičovských druhů. K přenosu genů dochází tehdy, jestliže se hybridi F<sub>1</sub>-generace kříží zpětně s jedním nebo druhým rodičovským

druhem (reciproční křížení). Polovina genomu, kterou do rozmnožování vkládá hybrid obsahuje geny obou rodičovských druhů, protože při meióze dochází k separaci chromozómů náhodně. Zpětný kříženec tak teoreticky má tři čtvrtiny genomu od jednoho druhu a jednu čtvrtinu od druhého.

Podmínkou introgresivní hybridizace je alespoň částečná fertilita hybridů a zpětných kříženců. Tento požadavek splňují v rámci rodu *Daphnia* především hybridy druhového komplexu *D. longispina* (Kapitola 2.2.). Introgrese byla u této skupiny také několikrát nezávisle pozorována (například Gießler 1997; Spaak 1996), ale ve všech případech šlo o introgresi jaderné DNA. Horizontální přenos mitochondriální DNA nebyl u rodu *Daphnia* nikdy pozorován (Schwenk 1993, Taylor a Hebert 1993b), což je poměrně překvapivé, protože mitochondriální DNA je obvykle k introgresi mnohem více náchylná než jaderná DNA (Harrison 1990). Absence cytoplazmatické introgrese může být vysvětlena nízkou fertilitou hybridních samic, které často produkují prázdná nebo jinak poškozená eřipia (Carvalho a Wolf 1989). Někdy je také počet sexuálních samic hybridů v porovnání s počtem samců nízký (Taylor nepublikováno, podle Taylor a Hebert 1993b) a příspěvek sexuálních samic hybridů při zpětném křížení je tak nepozorovatelný.

Jestliže je populační hustota jednoho rodičovského druhu v porovnání s populační hustotou druhého rodičovského druhu nízká, hybridy se s větší pravděpodobností páří s hojnějším druhem. V důsledku nerovnoměrného zpětného křížení pak introgrese u rodu *Daphnia* probíhá asymetricky a někdy je dokonce jednosměrná (Taylor a Hebert 1993b).

Rozsah přenosu genů mezi populacemi je závislý především na schopnosti dispersního šíření jedinců a na pravděpodobnosti jejich úspěšného páření s domácími populacemi na nově osídlené lokalitě. Zástupci rodu *Daphnia* mají nespojitý areál ostrovního charakteru a k introgresi tak dochází především mezi populacemi různých druhů v rámci jedné lokality nebo lokalit blízkých. Výstavba rezervoárů se stojatou vodou, jakými jsou například přehradní nádrže a rybníky, a eutrofizace vod významným způsobem rozšiřuje nabídku potenciálních stanovišť. Usnadněna je také migrace, protože vzdálenosti mezi jednotlivými lokalitami se zkracují. V důsledku výše uvedených jevů se do přímého kontaktu dostávají i druhy, které se dříve setkávaly jen výjimečně (Petrušek, osobní sdělení). Jestliže jsou hybridy schopni pohlavního rozmnožování, jak je tomu u hybridů druhového komplexu *D. longispina*, fungují jako spojka mezi oběma rodičovskými druhy, přes kterou dochází k přelévání genů. V důsledku toho má evoluce obou rodičovských druhů síťovitý charakter („*reticulate evolution*“), s čímž je spojen také nesoulad druhově specifických markerů (Schwenk et al.

1995). Studium introgrese je poměrně komplikované a vyžaduje sofistikované metody molekulární detekce introgresantů.

O přesných důsledcích přenosu genů rodu *Daphnia* toho tedy zatím není příliš známo a výsledky jednotlivých studií většinou nelze zobecnit pro všechny populace daného druhu. Domnívám se, že u ekologicky dobře oddělených taxonů (např. *D. galeata mendotae* a *D. dentifera*) je introgrese především nápomocným faktorem při procesu osidlování nových stanovišť, ale její vliv na genofond rodičovských druhů je relativně malý. Důsledky introgrese u druhů, které obývají podobná stanoviště a areály jejich rozšíření se téměř překrývají (*D. galeata* a *D. cucullata*), je složitější odhadnout. Nelze vyloučit, že masivní introgrese povede postupně k unifikaci rodičovských genotypů a ke splývání populací hybridů a rodičovských druhů na lokalitách, kde se oba rodičovské druhy vyskytují současně.

#### 4.2.2. Speciace cestou hybridizace

Složitost fylogenetických vztahů rodu *Daphnia* zaskočila nejednoho badatele, který se jim snažil přijít na kloub (Kapitola 2.1.). Dnes už víme, že mnohé komplikace působí častá hybridizace a introgrese, v důsledku kterých se cesty fylogenetického vývoje některých druhů opakovaně spojují, rozdělují a kříží (*reticulate evolution*). O to víc je překvapující, že následkem hybridizace v rámci tohoto rodu může být i speciace – tedy odštěpení zcela nové nezávislé linie.

Nearktická *D. galeata mendotae* je již pár desítek let považována za samostatný druh (Brooks 1957) a oprávněnost tohoto statutu byla potvrzena několika nezávislými studiemi (Taylor a Hebert 1993c; Hebert a Colbourne 1996). Taylor et al. (2005) publikovali komplexní fylogenetickou studii, ve které porovnávali sekvence mitochondriálního genu pro malou ribosomální podjednotku (12S rDNA), sekvence ITS<sup>7</sup> a restrikční místa na ITS tohoto druhu s některými dalšími severoamerickými a evropskými zástupci druhového komplexu *D. longispina*. Mitochondriální sekvence *D. galeata mendotae* byly podle očekávání velice podobné sekvencím evropského druhu *D. galeata* a oba druhy spolu na základě analýzy mtDNA<sup>8</sup> tvořily monofylum. Fylogram založený na srovnávací analýze sekvencí ITS z jaderné DNA se ale zásadním způsobem lišil. Druh *D. galeata mendotae* se prolínal hned dvěma větvemi. Většina jedinců tvořila těsné seskupení s druhem *D. dentifera* a několik zbylých individuí bylo tradičně přiřazeno k druhu *D. galeata*. Tedy zatímco mtDNA

---

<sup>7</sup> Internal transcribed spacer (Kapitola 5.2.2.)

<sup>8</sup> Mitochondriální DNA.

*D. galeata mendotae* je blízce příbuzná mtDNA *D. galeata*, její jaderné sekvence ITS obsahují četné známky introgrese z *D. dentifera*.

Tento zdánlivý rozpor vyřešili autoři studie elegantním způsobem. Domnívají se, že druh *D. galeata mendotae* vznikl procesem izolace rekombinantů vnějšími ekologickými faktory. Přesněji, že hybridizaci druhů *D. galeata* a *D. dentifera* následovalo několik zpětných křížení hybridů F<sub>1</sub>-generace s druhem *D. galeata*, přičemž rekombinanti byli posléze odděleni od obou rodičovských druhů vnějšími izolačními mechanismy (rozdílná preference stanovišť (Duffy et al. 2004), geografická bariéra při zalednění). Tím je vysvětlena jak vysoká podobnost mitochondriálních sekvencí *D. galeata mendotae* a *D. galeata*, tak introgrese z *D. dentifera*. Hybridní původ tohoto druhu dokládá také restriční vzor ITS, kde *D. galeata mendotae* sdílí většinu restričních míst s oběma rodičovskými druhy. *D. galeata mendotae* je tak pravděpodobně zcela unikátním případem speciace cestou hybridizace v rámci celého rodu *Daphnia*.

#### 4.2.3. Polyploidní linie

Zajímavým důsledkem hybridizace je vznik a stabilizace polyploidních populací. Tento fenomén, kdy dochází k hybridizaci následované reprodukční izolací hybridů v důsledku jednoho nebo více zdvojení nebo znásobení chromosomové sádky, je poměrně častý u rostlin, ale známe ho i z živočišné říše (Soltis a Soltis 1993). Populace polyploidních hybridů rodu *Daphnia* sice jsou reprodukčně izolovány od rodičovských linií, ale rozmnožují se pouze obligátní partenogenezí (Hebert et al. 1989). O speciaci cestou alopolyploidizace, u které je podmínkou schopnost pohlavního rozmnožování mezidruhových kříženců, se tedy nejedná.

U rodu *Daphnia* jsou známy populace polyploidních hybridů i populace polyploidů vzniklých pouze znásobením počtu chromosomů jednoho druhu. Polyploidie je poměrně častá v arktických oblastech Severní Ameriky a Evropy (Weider et al. 1987), zatímco směrem na jih polyploidních linií postupně ubývá. Na jižní polokouli jsou polyploidní populace známy z nejjihnějších oblastí Jižní Ameriky (Adamowicz 2002) a z vysokých nadmořských výšek Bolivijských And (Mergeay et al., in MS). Tento čistý vztah mezi zeměpisnou šířkou, nadmořskou výškou a stupněm ploidie je v souladu s tvrzením, že polyploidie je selektována v extrémních životních podmínkách. Studie založené na alozymových analýzách ukázaly, že klonální diverzita arktických polyploidních hybridů je velmi vysoká, ale populace na

jednotlivých stanovištích jsou obvykle tvořeny méně než třemi klony<sup>9</sup> (Hebert a Crease 1983; Wilson a Hebert 1992). Z toho je zřejmé, že k hybridizačním událostem a následné polyploidizaci dochází opakovaně.

Všechny známé polyploidní linie náleží do skupiny *D. pulex*. V arktických oblastech žijí populace polyploidních jedinců druhu *D. „middendorffiana“*<sup>10</sup> a *D. „tenebrosa“* a polyploidní mezidruhová kříženci druhů *D. pulicaria* a *D. „pulex“* (Weider a Hebert 1987). Taxon *D. „middendorffiana“* je tvořen apomiktickými polyploidními jedinci s pigmentovanou kutikulou. Většina jedinců je tetraploidní, ale malé procento některých populací je pravděpodobně tvořeno i pentaploidy (Beaton a Hebert 1988). Druh *D. „tenebrosa“* se vyskytuje jako diploidní i jako polyploidní forma a může být, ale nemusí být pigmentovaný. Žádná souvislost mezi stupněm ploidie a pigmentací ale nebyla prokázána (Dufresne a Hebert 1995). Některé polyploidní klony z Jižní Ameriky mohou být také hybridního původu (Adamowicz 2002), ale nelze to tvrdit s jistotou, protože systematika jihoamerických perlooček je zatím neúplná.

Jedinci taxonu *D. „middendorffiana“* jsou geneticky velmi heterogenní (Weider a Hebert 1987) a jejich mitochondriální DNA bývá velmi podobná mtDNA *D. pulicaria* nebo mtDNA *D. melanica* (Dufresne a Hebert 1994). Dufresne a Hebert (1994) se proto domnívají, že v minulosti došlo k mezidruhovému křížení samců *D. „pulex“* a samic *D. pulicaria* nebo *D. melanica* a následnému zdvojení chromosomové sádky diploidního hybridu do dnešní tetraploidní podoby. Tuto teorii podporuje také to, že všechny arktické polyploidní linie hybridů *D. „pulex“* × *D. pulicaria* mají mitochondriální DNA po *D. pulicaria*, zatímco diploidní F<sub>1</sub> hybridi těchto druhů z oblastí mírného pásu mají mtDNA typickou pro *D. „pulex“* (Crease et al. 1989). Zdá se tedy, že přítomnost polyploidie by mohla být kontrolována směrem mezidruhového křížení. Diploidní hybridi vzniknou, jestliže je mateřským druhem *D. „pulex“*, polyploidi, jestliže je mateřským druhem *D. pulicaria* nebo *D. melanica* (Dufresne a Hebert 1994).

Polyploidní *D. „tenebrosa“* je morfologicky i na základě alozymových dat velmi podobná diploidní formě. Polyploidní jedinci tedy bývají charakterizováni jako autopolyploidi. Nicméně mitochondriální divergence mezi jednotlivými klony je velmi vysoká a není vyloučeno, že dochází k hybridizaci i mezi jednotlivými liniemi

---

<sup>9</sup> Jedinci byli označeni jako klony, protože se shodovali ve všech analyzovaných lokusech. Nicméně nelze vyloučit, že při využití většího množství genetických markerů by klonálních linií bylo rozpoznáno více.

<sup>10</sup> Některé druhy rodu *Daphnia* z amerického kontinentu uvádím v uvozovkách, protože systematika a názvosloví perlooček z této oblasti jsou často založené pouze na morfologické podobnosti s některými euroasijskými druhy a jejich nomenklatura je nesprávná.

*D. „tenebrosa“* (Dufresne a Hebert 1995). Polyploidní *D. „tenebrosa“* tak mohou mít i alopolyloidní původ.

Kromě výše zmíněných polyploidů píše Dufresne a Hebert (1994) ještě o dalším, poměrně unikátním tetraploidním nemelanizovaném klonu z jezera Churchill v Kanadě. Tento klon měl jadernou DNA typickou pro druh *D. „pulex“* a byl homozygotní ve většině zkoumaných lokusů. Jeho mitochondriální haplotyp byl ale velmi podobný mitochondriálnímu haplotypu *D. „tenebrosa“*. Autoři studie tento fakt vysvětlují tím, že v minulosti došlo k hybridizaci samic *D. „tenebrosa“* a samců *D. „pulex“*. Hybridizaci pak mohlo následovat umlčení (silencing) mateřského jaderného genomu a replikace jaderného genomu *D. „pulex“* do tetraploidní podoby. Tím by byla vysvětlena také chybějící heterozygotnost těchto klonů. Pokud jsou všechny teorie o vzniku polyploidních linií správné, heterozygotnost polyploidů je dána genetickou divergencí obou rodičovských druhů. Hybridizace blízké příbuzných druhů, jako je *D. „pulex“* a *D. pulicaria*, následovaná zdvojením chromosomové sádky diploidního hybridu povede ke vzniku vysoce heterozygotních populací. Naopak hybridizace geneticky vzdálenějších druhů, jako je *D. „tenebrosa“* a *D. „pulex“*, následovaná umlčením mateřského genomu by vedla ke vzniku homozygotů (Dufresne a Hebert 1994).

## **5. METODY DETEKCE HYBRIDŮ RODU *DAPHNIA***

V několika posledních desetiletích byla použita takřka desítky metod umožňujících determinaci druhů rodu *Daphnia*. Většinu z nich lze zároveň využít k detekci mezidruhových kříženců. Jednotlivé metody se liší svou přesností, časovou náročností a cenovou dostupností. Pro získání základního přehledu, odhadu frekvence výskytu hybridů a případně pro ověření dílčích výsledků obvykle stačí určení hybridů na základě morfologických znaků. Většina moderních metod detekce je však založena na molekulárních znacích a využívány jsou jak metody znakové, tak distanční. Současné studie se zpravidla nespolehají na výsledky získané jedinou metodou, ale kombinují více způsobů detekce hybridů a dalších rekombinantů. Z vlastní zkušenosti vím, že výsledky získané jedinou metodou nebo získané na základě jednoho molekulárního znaku nemusí být spolehlivé i přesto, že byly odzkoušeny na stovkách individuí.

### **5.1. Detekce na základě morfologických znaků**

Detekce hybridů na základě morfologických znaků vyžaduje buď jistou dávku zkušeností nebo sofistikovaný počítačový program. K detekci se obvykle využívají dospělé

samice, u kterých předpokládáme, že už nebude docházet v posunu sledovaných morfologických znaků. Samci prakticky využívání nejsou, protože jsou mnohem vzácnější než samice a jejich morfologie není tak dobře popsána. Hybridy F<sub>1</sub>-generace lze často rozeznat podle celkového vzezření, protože jejich fenotyp bývá v porovnání s oběma rodičovskými druhy přechodný (Wolf a Mort 1986; Giebler 1997), tj. dochází k posunu morfologických znaků (například velikost těla, vzdálenost místa inserce antenul od vrcholu rostra nebo sklon frontální části hlavy) do středních hodnot mezi oběma rodičovskými druhy (Obrázek 4). Taková metoda však stěží odhalí zpětné křížence, kteří jsou morfologicky podobní jednomu rodičovskému druhu, a další generace hybridů. V přirozeném prostředí navíc dochází posunu morfologických znaků pod tlakem vnějších selekčních faktorů a plasticita fenotypu hybridů a obou rodičovských druhů je velká (Brooks 1957; Benzie 1986). Rozsah znaku jednotlivých taxonů se proto může překrývat.

V morfologických studiích rodu *Daphnia* jsou často využívány metody morfometrie. Při tradičním postupu (Giebler et al. 1999, Giebler 2001) je proměřována celá sada kvantitativních (např. délka těla, šířka těla, vzdálenost oka od vrcholu rostra) i kvalitativních (např. poloha antenul, sklon frontální části hlavy, velikost a poloha oka) morfologických znaků a morfologická divergence jedinců je vyhodnocována některou mnohorozměrnou statistickou metodou (např. analýza hlavních komponent PCA, mnohorozměrná klasifikace objektů MDS, analýza diskriminačních funkcí DFA, shluková analýza). Výsledkem je graf, kde jedinci s podobnou morfologií tvoří samostatné skupiny. Jednotlivé skupinky však většinou nejsou dobře oddělené a metoda se proto nepoužívá přímo pro determinaci druhů, ale zpravidla se kombinuje s nějakou další molekulárně-biologickou metodou. Další možností je využití geometrické morfometrie. Pro rod *Daphnia* byla zatím odzkoušena eliptická Fourierova analýza obrysu (Schwenk et al. in MS), kdy je tvar sledovaného objektu nejprve vyjádřen větším počtem bodů podél jeho obrysu a zkoumaný obrys je následně popsán sérií několika harmonických funkcí. Výsledky všech analýz jsou vyhodnocovány počítačovými programy. Pro vyhodnocení výsledků tradičních morfometrických metod obvykle stačí komerčně dostupné programové balíky (SPSS, Statistica, SPLUS, NCSS), pro účely geometrické morfometrie většinou slouží programy specializované (tpsDig, EFA) (Zima a Macholán 2004).

## 5.2. Molekulárně–biologické metody detekce

Velká morfologická variabilita a absence stabilních morfologických znaků byla po dlouhou dobu příčinou velkého zmatku v systematice rodu *Daphnia* (Flössner 2000; Benzie

2005). Situace se usnadnila až se zpřístupněním molekulárně–biologických nástrojů, které umožnily na základě druhově specifických molekulárních znaků poměrně přesnou determinaci druhů i mezidruhových kříženců. Pro určování hybridů i rodičovských druhů tohoto rodu byla po dlouhou dobu jedinou dostatečně spolehlivou a cenově dostupnou metodou elektroforéza proteinů (alozymová elektroforéza) (Wolf a Mort 1986; Hebert a Beaton 1989; Giessler 1997). V současnosti máme k dispozici i metody, které jsou založené na amplifikaci DNA metodou PCR, jako je sekvenace jaderné a mitochondriální DNA (Taylor et al. 2005), RFLP (Billiones et al. 2004), RAPD (Ender a Schierwater 1993; Schwenk et al. 1995) nebo AFLP (Gili et al. 2004).

### 5.2.1. Alozymová elektroforéza

Podstatou alozymové elektroforézy je oddělení alozymů, tedy různých alelických forem téhož enzymu, v elektrickém poli podle elektromobility. Elektromobilita enzymů je určena jejich nábojem, velikostí a tvarem. Změna v mobilitě proteinů je pak podmíněna změnami v sekvencích DNA, které daný protein kódují. Základními předpoklady pro použití alozymových dat je dědičnost vizualizovaných znaků, kodominantní charakter exprese proteinů a selekční neutralita alternativních alel na daném lokusu (Macholán 2004).

Pro účely alozymové elektroforézy se používají čerstvé nebo v tekutém dusíku zmražené vzorky (Macholán 2004). Po homogenizaci jsou jednotlivé vzorky nanášeny na gel a celý gel je vložen do komory, kde probíhá samotná elektroforéza. Výsledky jsou nakonec vizualizovány barvením. Pro analýzu alozymů zástupců rodu *Daphnia* je v současné době využíván téměř výhradně celulózo–acetátový gel (Hebert a Beaton 1993) a enzymy jsou barveny specificky – přeměnou specifického substrátu. Pro determinaci jednotlivých druhů i mezidruhových kříženců rodu *Daphnia* jsou využívány enzymy, jejichž jednotlivé alelické formy jsou druhově specifické. Elektromobilita alozymů se tedy liší mezi jednotlivými druhy. Rodičovské druhy jsou v těchto znacích homozygotní, zatímco mezidruhoví kříženci jsou heterozygotní a vykazují oba typy rodičovských alel. Vhodným druhově specifickým lokusem je zejména aspartát aminotransferáza (sAAT) (Wolf a Mort 1986), dále se využívá i aldehyd oxidáza (AO) (Giessler 1997). Zkušenosti s jeho využitím u českých populací rodu *Daphnia* jsou však problematické (Petrušek, osobní sdělení). V populačních studiích jsou využívány i lokusy druhově nespecifické, jako je fosfoglukomutáza (PGM) nebo fosfoglukóza izomeráza (PGI) (Wolf a Mort 1986; Keler a Spaak 2004; Spaak et al. 2004).

Alozymová elektroforéza je pro účel určování druhů a mezidruhových kříženců rodu *Daphnia* velmi dobře odzkoušenou a spolehlivou metodou. Kromě toho je to metoda poměrně

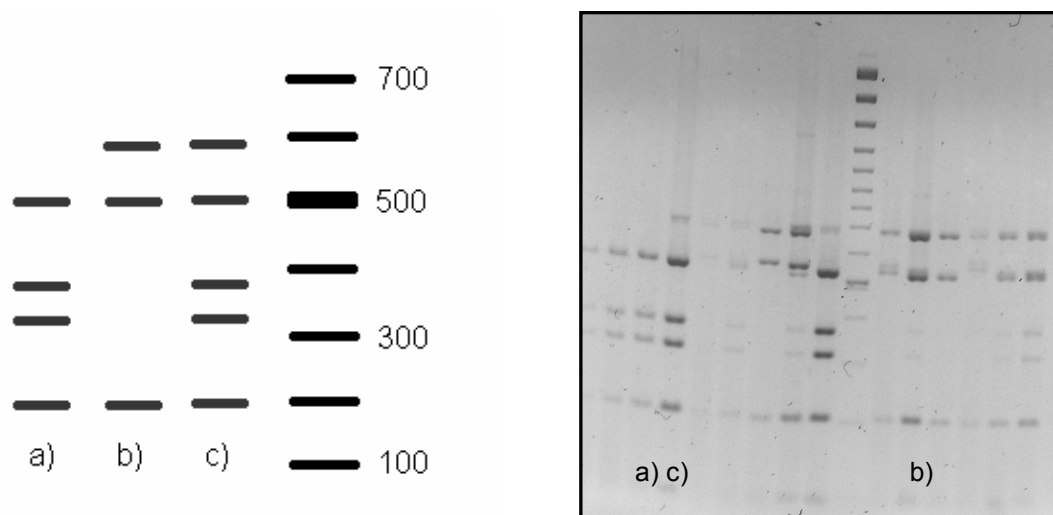
levná a rychlá a hodí se pro zpracování velkého množství vzorků (v řádu tisíců). Na druhé straně, všechny vzorky musí být čerstvé nebo zmražené v tekutém dusíku, což je pro odběry ve volné přírodě nepraktické. Někdy jsou také špatně odečitatelné výsledky z gelů, například jestliže mají jednotlivé alely podobnou elektromobilitu. Vzhledem k relativně nízké variabilitě alozymů (ve srovnání s metodami založenými na analýze DNA) může dojít také k přehlédnutí atypických genotypů (včetně případných odlišných taxonů), které se na sledovaných markerech neliší od běžně nalézaných druhů.

### 5.2.2. ITS-RFLP

Metoda ITS-RFLP byla na rozdíl od alozymové elektroforézy pro druhový komplex *D. longispina* rovnou navržena tak, aby umožnila determinaci jednotlivých druhů a mezidruhových kříženců tohoto komplexu (Billiones et al. 2004). ITS-RFLP je restriční analýza (RFLP = *restriction fragment length polymorphism*) (Dowling et al. 1996) části jaderného genomu kódujícího ribosomální RNA, která obsahuje nekódující přepisovanou oblast (*internal transcribed spacer* = ITS) a gen pro 5.8S rRNA. Oblast ITS je velmi proměnlivá a výborně se hodí pro studium blízce příbuzných druhů především tam, kde jednotlivé druhy nebo mezidruhové křížence nelze odlišit podle morfologických znaků, jak je tomu i u druhového komplexu *D. longispina* (Taylor et al. 2005). Velkou výhodou této metody je, že lze analyzovat jak čerstvé (popř. zmražené), tak i lihové vzorky. Metoda je ve srovnání s jinými náročnějšími metodami, jako je sekvenování nebo AFLP, relativně levná, rychlá a jednoduchá, ale zároveň i stejně účinná. Výborně se hodí k detekci kryptických druhů, invazivních druhů a mezidruhových hybridů (Billiones et al. 2004). Na rozdíl od alozymové elektroforézy lze tímto způsobem zpracovávat i nevylíhlá eřipiální vajíčka a metoda ITS-RFLP se proto stává vynikajícím pomocníkem při analýze banky trvalých vajíček ze sedimentu ve studiích rekonstruuujících ekologické a evoluční procesy ve sladkovodních nádržích (Billiones et al. 2004; Vaníčková, nepublikováno). Naopak nevýhodou metody je, že stěží odhaluje hybridy F<sub>2</sub>-generace, zpětné křížence a další rekombinanty. Úsek ITS se navíc v genomu vyskytuje v mnoha kopiích a teoreticky tak může docházet ke vzniku nesmyslných restričních vzorů v důsledku procesů, jakými jsou konverze genů nebo synchronizovaná evoluce (*concerted evolution*) (Dover et al. 1993).

Při restriční analýze se postupuje tak, že požadovaná oblast je u každého jedince nejprve amplifikována metodou PCR. Amplifikáty jsou posléze rozštěpeny na kratší fragmenty pomocí restričních enzymů. Rozštěpené vzorky jsou naneseny na agarózový gel a jednotlivé fragmenty jsou podle délky rozděleny na elektroforéze. Výsledek je vizualizován

pod UV lampou pomocí ethidiumbromidu, který po navázání na DNA intenzivně fluoreskuje. Každá restriční endonukleáza rozpoznává specifickou palindromickou sekvenci a v její blízkosti nebo přímo v ní DNA štěpí. Pro účel determinace jednotlivých druhů a mezidruhových hybridů druhového komplexu *D. longispina* byly na základě známých sekvencí vybrány restriční enzymy tak, aby výsledné restriční vzory byly druhově specifické a hybridi F<sub>1</sub>-generace měli restriční vzor kombinující vzory obou rodičovských druhů (Obrázek 5). V původní variantě ITS-RFLP byly pro restriktce navrženy endonukleázy Mwo I a Sau96 I (Billiones et al. 2004). Nicméně po aplikaci této varianty na některé populace ze střední a severní Evropy se ukázalo, že metoda často vede ke špatnému určení druhů. Přesněji, že druh *D. galeata* vykazuje kromě typického restriční vzoru ještě další dva vzory zaměnitelné se vzory jiných druhů (Skage et al., in MS). Následná sekvenace úseku ITS prokázala vnitrodruhovou i vnitropopulační variabilitu v rozpoznávacích sekvencích restričního enzymu Mwo I druhu *D. galeata*, což nastartovalo vývoj nové varianty ITS-RFLP pro druhový komplex *D. longispina*, na kterém se podílela také naše laboratoř (Skage et al., in MS) (viz. Příloha). Nový protokol vyvinutý na základě velkého množství sekvencí ITS různých druhů využívá souběžné restriktce dvěma jinými endonukleázami a zatím se zdá, že není postižen variabilitou ovlivňující cílová restriční místa.



**Obrázek 5. Restriční vzor *D. galeata*, *D. cucullata* a jejich mezidruhového hybrida vzniklý rozštěpením úseků ITS restriční endonukleázou MwoI a následným rozdělením fragmentů na elektroforéze.**

Na obrázku vlevo je schematicky znázorněn restriční vzor a) *D. galeata*, b) *D. cucullata* a c) mezidruhového křížence. Na obrázku vpravo je označeno totéž na fotografii skutečného gelu.

## ZÁVĚR

Zajímavé ekologické vztahy mezi hybridy rodu *Daphnia* a jejich rodičovskými druhy a evoluční procesy spojené s hybridizací tohoto rodu přitahují od počátku devadesátých let zájem řady světových laboratoří. Intenzivní výzkum hybridizace rodu *Daphnia* napomohl v několika posledních letech k vyřešení četných taxonomických problémů. Hybridizací se také podařilo osvětlit rozšíření a genetické vlastnosti některých druhů a linií, které byly původně za samostatné druhy považovány. Přestože už dnes máme k dispozici dostatek molekulárně–biologických nástrojů, které nám umožňují sledovat distribuci hybridů v přirozeném prostředí, velká část ekologických studií stále pracuje s laboratorně chovanými klony. Skutečné ekologické nároky a preference jednotlivých linií v přirozeném prostředí tedy bude ještě potřeba studovat.

Moje bakalářská práce je stručným shrnutím dosavadních poznatků o hybridizaci rodu *Daphnia* a měla by sloužit jako podkladový materiál pro moji budoucí magisterskou diplomovou práci. Ta je součástí projektu sledujícího distribuci jednotlivých druhů druhového komplexu *D. longispina* a jejich mezidruhových kříženců v korytovitých přehradních nádržích v České republice (GA ČR 206/04/0190). Mým úkolem bude v první řadě srovnání přesnosti a spolehlivosti alozymové elektroforézy a ITS-RFLP při detekci hybridů a dále charakterizace atypických genotypů vyskytujících se v některých českých nádržích.

## SEZNAM LITERATURY

- Adamowicz S.J., Gregory T.R., Marinone M.C. & Hebert P.D.N. (2002) New insights into the distribution of polyploid *Daphnia*: the Holarctic revisited and Argentina explored *Molecular Ecology*, 11, 1209-1217
- Adamowicz S.J., Hebert P.D.N. & Marinone M.C. (2004) Species diversity and endemism in the *Daphnia* of Argentina: a genetic investigation. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 140, 171-205
- Agar W.E. (1920) The genetics of a *Daphnia* hybrid during parthenogenesis. *Journal of Genetics*, 10, 303-330
- Anderson E. & Hubricht L. (1938) Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. *American Journal of Botany*, 25, 396-402
- Anderson E. (1948) Hybridization of the habitat. *Evolution*, 2, 1-9
- Arnold M.L. (1997) Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, New York, U.S.A.
- Aubert J. & Solignac M. (1990) Experimental evidence for mitochondrial DNA introgression between *Drosophila* species. *Evolution*, 44, 1272-1282
- Aubert J., Barascud B., Descimon H. & Michel F. (1997) Ecology and genetics of interspecific hybridization in the swallowtails, *Papilio hospiton* gene and *P. machaon* I, in Corsica (Lepidoptera, Papilionidae). *Biological Journal Of the Linnean Society*, 60, 467-492
- Banta A.M. (1913) One hundred parthenogenetic generations of *Daphnia* without sexual forms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 11, 180-182
- Barton N.H. & Hewitt H.H. (1985) Analysis of hybrid zones. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 16, 113-148
- Barton N.H. (1979) The dynamics of hybrid zones. *Heredity*, 43, 341-359
- Barton N.H. (1980) The fitness of hybrids between two chromosomal races of the grasshopper *Podisma pedestris*. *Heredity*, 45, 47-59
- Beaton M.J. & Hebert P.D.N. (1988) Geographical parthenogenesis and polyploidy in *Daphnia pulex*. *American Naturalist*, 132, 837-845
- Benzie J.A.H. (1986) Phenetic and cladistic analyses of the phylogenetic relationships within the genus *Daphnia* worldwide. *Hydrobiologia*, 140, 105-124
- Benzie J.A.H. (2005) Cladocera: the genus *Daphnia* (including *Daphniopsis*). Kenobi Productions, Backhuys Publishers, Ghent, Leiden.
- Billiones R., Brehm M., Klee J. & Schwenk K. (2004) Genetic identification of *Hyalodaphnia* species and interspecific hybrids. *Hydrobiologia*, 526, 43-53
- Boersma M. & Vijverberg J. (1994) Resource depression in *Daphnia galeata*, *Daphnia cucullata* and their interspecific hybrid: Life history consequences. *Journal of Plankton Research*, 16, 1741-1758
- Boersma M. & Vijverberg J. (1994) Seasonal variations in the condition of two *Daphnia* species and their hybrid in a eutrophic lake: Evidence for food limitation. *Journal of Plankton Research*, 16, 1793-1809
- Boersma M., Spaak P. & De Meester L. (1998) Predator-mediated plasticity in morphology, life history, and behavior of *Daphnia*: The uncoupling of responses. *American Naturalist*, 152, 237-248
- Boersma M., van Densen W.L.T. & Vijverberg J. (1991) The effect of predation by smelt (*Osmerus eperlanus*) on *Daphnia hyalina* in a shallow eutrophic lake. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, 24, 2438-2442
- Brooks J.L. & Dodson S.I. (1965) Predation, body size, and composition of plankton. *Science*, 150, 28-35
- Brooks J.L. (1957) The systematics of North American *Daphnia*. *Mem. Connect. Acad. Arts. Sci.*, 13, 1-180
- Bullini L. (1994) Origin and evolution of animal hybrid species. *Trends Ecol. Evol.*, 9, 422-426
- Burckhardt G. (1899) Faunistische und systematische Untersuchungen über das zooplankton der größeren Seen der Schweiz und ihrer Grenzgebiete. *Revue Suisse Zool.*, 7, 353-715
- Campton D.E. & Utter F.M. (1985) Natural hybridization between steelhead trout (*Salmo gairdneri*) and coastal cutthroat trout (*Salmo clarki clarki*) in 2 Puget Sound Streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42, 110-119
- Carson H.L., Nair P.S. & Sene F.M. (1975) *Drosophila* hybrids in nature: Proof of gene exchange between sympatric species. *Science*, 189, 806-807
- Carvalho G.R. & Wolf H.G. (1989) Resting eggs of lake-*Daphnia*. I. Distribution, abundance and hatching of eggs collected from various depths in lake sediments. *Freshwater Biology*, 22, 459-470

- Colbourne J.K. & Hebert P.D.N. (1996) The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): a molecular phylogenetic approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 351, 349-360
- Crease T.J., Stanton D.J. & Hebert P.D.N. (1989) Polyphyletic origins of asexuality in *Daphnia pulex*. II. Mitochondrial-DNA variation. *Evolution*, 43, 1016-1026
- Darwin C. (1859) On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life. John Murray, London.
- Declerck S. & De Meester L. (2003) Impact of fish predation on coexisting *Daphnia* taxa: a partial test of the temporal hybrid superiority hypothesis. *Hydrobiologia*, 500, 83-94
- Declerck S. & Weber A. (2003) Genetic differentiation in life history between *Daphnia galeata* populations: an adaptation to local predation regimes? *J. Plankton Res.*, 25, 93-102
- Dobzhansky T. (1937) Genetics and the origin of species. Columbia University Press, New York.
- Dodson S.I. (1989) The ecological role of chemical stimuli for the zooplankton: predator-induced morphology in *Daphnia*. *Oecologia*, 78, 361-367
- Dover G.A., Linares A.R., Bowen T. & Hancock J.M. (1993) Detection and quantification of concerted evolution and molecular drive. In: E.A. Zimmer, T.J. White, reducing the Biochemical Data, Academic Press Inc, Methods in Enzymology 224: 525-541,
- Dowling T. E., Moritz C., Palmer J. D. & Rieseberg L. H. (1996). Molecular Systematics, Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, MA, USA.
- Dowling T.E. & Hoeh W.R. (1991) The extent of introgression outside the contact zone between *Notropis cornutus* and *Notropis chrysocephalus* (Teleostei, Cyprinidae). *Evolution*, 45, 944-956
- Dowling T.E., Smith G.R. & Brown W.M. (1989) Reproductive isolation and introgression between *Notropis cornutus* and *Notropis chrysocephalus* (family Cyprinidae): Comparison of morphology, allozymes, and mitochondrial DNA. *Evolution*, 43, 620-634
- Duffy M.A., Tessier A.J. & Kosnik M.A. (2004) Testing the ecological relevance of *Daphnia* species designations. *Freshwater Biology*, 49, 55-64
- Dufresne F. & Hebert P.D.N. (1994) Hybridization and origins of polyploidy. *Biological Sciences*, 258, 141-146
- Dufresne F. & Hebert P.D.N. (1995) Polyploidy and clonal diversity in an arctic cladoceran. *Heredity*, 75, 45-53
- Einsle U. (1966) Einige Beobachtungen und Hypothesen zur Taxonomie der Gattung *Daphnia*. *Schriften des Vereins für Geschichte des Bodensees und seiner Umgebung*, 84, 1-17
- Ellstrand N.C., Prentice H.C. & Hancock J.F. (1999) Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual review of Ecology and Systematics*, 30, 539-563
- Ender A. & Schierwater B. (1993) Identification of nuclear markers in *Daphnia* hybrid complexes using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Verh. Dt. Zool. Ges.*, 86, 45
- Ender A., Schwenk K., Stadler T., Streit B. & Schierwater B. (1996) RAPD identification of microsatellites in *Daphnia*. *Molecular Ecology*, 5, 437-441
- Epifanio J. & Philipp D. (2000) Simulating the extinction of parental lineages from introgressive hybridization: the effects of fitness, initial proportions of parental taxa, and mate choice. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10, 339-354
- Faustová M., Petrušek A. & Černý M. (2004) Status of *Daphnia* resting egg banks in Bohemian Forest lakes affected by acidification. *Hydrobiologia*, 526, 23-31
- Flégr J. (2005) Specie. In. *Evoluční biologie*. Academia. Praha. 382-407
- Flik B. & Vijverberg J. (2003) Contrasting migration behaviour of *Daphnia pulicaria* and *D. galeata x hyalina*, in avoidance of predation by 0+perch (*Perca fluviatilis*). 491, 289-299
- Flössner D. (1972) Kiemen- und Blattfüsser, Branchiopoda, Fischläuse, Branchiura. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Flössner D. (1993) Zur Kenntnis einiger *Daphnia*-Hybriden (Crustacea: Cladocera).
- Flössner D. (2000) Die Haplopoda und Cladocera Mitteleuropas. Backhuys Publisher, Leiden.
- Forbes S.A. (1893) A preliminary report on the aquatic invertebrate fauna of Yellowstone National Park, Wyoming, and the Flathead region of Montana. *Bull. U.S. Fish. Comm.*, 11, 207-256
- Gießler S. (1997) Analysis of reticulate relationships within the *Daphnia longispina* species complex. Allozyme phenotype and morphology. *Journal of Evolutionary Biology*, 10, 87-105
- Gießler S. (1997) Gene flow in the *Daphnia longispina* hybrid complex (Crustacea, Cladocera) inhabiting large lakes. *Heredity*, 3, 231-241
- Gießler S. (2001) Morphological differentiation within the *Daphnia longispina* group. *Hydrobiologia*, 442, 55-66

- Gießler S., Mader E. & Schwenk K. (1999) Morphological evolution and genetic differentiation in *Daphnia* species complexes. *J. Evol. Biol.*, 12, 710-723
- Gili M., Monaghan M.T. & Spaak P. (2004) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) reveals backcrosses in the *Daphnia galeata-hyalina* species complex. *Hydrobiologia*, in press
- Grant P.R. & Grant B.R. (1992) Hybridization of bird species. *Science*, 256, 193-197
- Grant V. (1981) Plant speciation. *Columbia University Press, New York*
- Haney R.A. & Taylor D.J. (2003) Testing paleolimnological predictions with molecular data: the origins of Holarctic *Eubosmina*. *Journal of Evolutionary Biology*, 16, 871-882
- Hann B.J. (1987) Naturally occurring interspecific hybridization in *Simocephalus* (Cladocera, Daphniidae): its potential significance. *Hydrobiologia*, 145, 219-224
- Hardig T.M., Brunfeld S.J., Fritz R.S., Morgan M. & Orians C.M. (2000) Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (*Salix*) hybrid zone. *Molecular Ecology*, 9, 9-24
- Harrison R. G. (1990) Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7, 69-128
- Harrison R. G. (1993) Hybrids and hybrid zones: historical perspective. In: *Hybrid zones and the evolutionary process*. Oxford University Press. Oxford. 3-12
- Harrison R.G. & Rand D.M. (1989) Mosaic hybrid zones and the nature of species boundaries. In: *Speciation and its consequences* (eds. Otte D & Endler JA), pp. 111-133. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts
- Harrison R.G. (1986) Pattern and process in a narrow hybrid zone. *Heredity*, 56, 337-349
- Hebert P.D.N. & Beaton M.J. (1989) Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. Helena Laboratories, Beaumont, Texas.
- Hebert P.D.N. & Beaton M.J. (1993) Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis - a practical handbook. 2 edn. Helena Laboratories.
- Hebert P.D.N. & Finston T.L. (1996) A taxonomic reevaluation of North American *Daphnia* (Crustacea, Cladocera). 2. New species in the *Daphnia pulex* group from the South-Central United States and Mexico. *Canadian Journal of Zoology*, 74, 632-653
- Hebert P.D.N. (1983) Clonal diversity in cladoceran populations. In: *Population biology, retrospect and prospect* (eds. King CE & Dawson PS), pp. 37-60. Columbia University Press, New York
- Hebert P.D.N. (1985) Interspecific hybridization between cyclic parthenogens. *Evolution*, 39, 216-220
- Hebert P.D.N., Beaton M.J., Schwartz S.S. & Stanton D.J. (1989) Polyphyletic origins of asexuality in *Daphnia pulex*. I. Breeding-system variation and levels of clonal diversity. *Evolution*, 43, 1004-1015
- Hebert P.D.N., Schwartz S.S. & Ward R.D. (1993) Macrogeographic patterns of breeding system diversity in the *Daphnia pulex* group. I. Breeding systems of Canadian populations. *Heredity*, 70, 148-161
- Hellich B. (1877). *Die Cladoceren Böhmens*. Praha.
- Hobæk A. & Larsson P. (1990) Sex determination in *Daphnia magna*. *Ecology*, 71, 2255-2268
- Hobæk A., Skage M. & Schwenk K. (2004) *Daphnia galeata* x *D. longispina* hybrids in western Norway. *Hydrobiologia*, 526, 55-62
- Hofmann W. (1991) The late-glacial/holocene *Bosmina* (*Eubosmina*) fauna of Lake Constance (Untersee) (F.R.G.): traces of introgressive hybridization. *Hydrobiologia*, 225, 81-85
- Howard D. J. (1986) A zone of overlap and hybridization between two ground cricket species. *Evolution*, 40, 34-43
- Hrbáček J. (1987) Systematics and biogeography of *Daphnia* species in the northern temperate regions. In: *Daphnia* (eds. Peters RH & de Bernardi R), pp. 37-76, Pallanza
- Jankowski T. & Straile D. (2004) Allochronic differentiation among *Daphnia* species, hybrids and backcrosses: the importance of sexual reproduction for population dynamics and genetic architecture. *Journal of Evolutionary Biology*, 17, 312-321
- Jankowski T. (2002) From Diapause to Sexual Reproduction. *Evolutionary Ecology of the Daphnia Hybrid Complex from Lake Constance*. In: Universität Konstanz, Konstanz 1-104
- Keller B. & Spaak P. (2004) Nonrandom sexual reproduction and diapausing egg production in a *Daphnia* hybrid species complex. *Limnology and Oceanography*, 49, 1393-1400
- Lieder U. (1983) Introgression as a factor in the evolution of polytypical plankton Cladocera. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 68, 269-284
- Lieder U. (1996) Crustacea : Cladocera, *Bosminidae*. Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
- Lilljeborg V. (1901) Cladocera Sueciae. *Nova Acta r. Soc. Scient. Upsal.*, 3 (19), 701
- Linné C. (1774) *Systema vegetabilium*. Printed for Ray Society. London.
- Lotsy J. P. (1916) Evolution by means of hybridization. M. Nijhoff. The Hague.

- Lotsy J. P. (1931) On the species of the taxonomist in it's relation to evolution. *Genetica*, 13, 1-16
- Lyell C. (1832) Principles of Geology. John Murray. London.
- Lynch M. (1983) Ecological genetics of *Daphnia pulex*. *Evolution*, 37, 358-374
- Macholán M. (2004) Elektroforéza proteinů. In: Zima J., Macholán M., Muclinger P., Piálek J. (2004) Genetické metody v zoologii. Univerzita Karlova. Nakladatelství Karolinum 117-165
- Mergeay J., Aguilera X., Declerk S., Petrusek A., De Meester L.: The genetic legacy of polyploid Bolivian *Daphnia*: the tropical Andes as a source for the North and South American *D. pulex* complex. Nepublikovaný rukopis.
- Moore W.S. (1977) An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *The Quarterly Review of Biology*, 52, 263-277
- Mort M.A. (1991) Bridging the gap between ecology and genetics: The case of freshwater zooplankton. *Trends in Ecology & Evolution*, 6, 41-45
- O'Brien W.J., Slade N.A. & Vinyard G.L. (1976) Apparent size as the determinant of prey selection by bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Ecology*, 57, 1304-1310
- Petrusek A., Hobæk A., Nilssen J. P.ú, Skage M., Černý M., Brede N., Schwenk K.: A taxonomic reevaluation of the European *Daphnia longispina* complex. Nepublikovaný rukopis.
- Repka S. (1996) Inter- and intraspecific differences in *Daphnia* life histories in response to two food sources: the green-alga *Scenedesmus* and the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria*. *Journal of Plankton Research*, 18, 1213-1223
- Rhymer J.M. & Simberloff D. (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual review of Ecology and Systematics*, 27, 83-109
- Rieseberg L.H. & J.F. Wendel (1993) Introgression and its consequences in plants. In: R.G. Harrison
- Rieseberg L.H., Baird S.J.E. & Desrochers A.M. (1998) Patterns of mating in wild sunflower hybrid zones. *Evolution*, 52, 713-726
- Rieseberg L.H., Choi H.C. & Ham D. (1991) Differential cytoplasmic versus nuclear introgression in *Helianthus*. *J. Hered.*, 82, 489-493
- Seda J. & Devetter M. (2000) Zooplankton community structure along a trophic gradient in a canyon-shaped dam reservoir. *Journal of Plankton Research*, 22, 1829-1840
- Shan R.K. & Frey D.G. (1983) *Pleuroxus denticulatus* and *P. procurvus* (Crustacea: Chydoridae) in North America: distribution, experimental hybridization and the possibility of natural hybridization. *Can. J. Zool.*, 61, 1605-1617
- Shan R.K.C. & G. F.D. (1968) Induced interbreeding between two stocks of a chydorid cladoceran. *BioScience*, 18, 203-205
- Schwenk K., Mader E., Brehm M., Siedendorf B., Petrusek A.: The genetic and phenotypic consequences of interspecific hybridization and directional introgression in cyclically parthenogenetic *Daphnia*. Nepublikovaný rukopis.
- Schwenk K. & Spaak P. (1995) Evolutionary and ecological consequences of interspecific hybridization in cladocerans. *Experientia*, 51, 465-481
- Schwenk K. (1993) Interspecific hybridization in *Daphnia*: distinction and origin of hybrid matriline. *Mol. Biol. Evol.*, 10, 1289-1302
- Schwenk K. (1997) Evolutionary genetics of *Daphnia* species complex - Hybridism in syntopy. In: University of Utrecht
- Schwenk K., Bijl M. & Menken S.B.J. (2001) Experimental interspecific hybridization in *Daphnia*. *Hydrobiologia*, 442, 67-73
- Schwenk K., Ender A. & Streit B. (1995) What can molecular markers tell us about the evolutionary history of *Daphnia* species complexes? *Hydrobiologia*, 307, 1-7
- Schwenk K., Posada D. & Hebert P.D.N. (2000) Molecular systematics of European *Hyalodaphnia*: the role of contemporary hybridization in ancient species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 267, 1833-1842
- Skage M., Hobæk A., Ruthová Š., Keller B., Sed'a J., Petrusek A., Spaak P.: Intragenomic sequence variation necessitates a new genetic method to distinguish species and hybrids in the *Daphnia longispina* complex. Nepublikovaný rukopis.
- Soltis D. E. & Soltis P. S. (1993) Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical reviews in Plant Science*, 12, 243-273
- Spaak P. & Hoekstra J.R. (1995) Life history variation and the coexistence of a *Daphnia* hybrid with its parental species. *Ecology*, 76, 553-564
- Spaak P. & Hoekstra J.R. (1997) Fish predation on a *Daphnia* hybrid species complex: A factor explaining species coexistence? *Limnology and Oceanography*, 42, 753-762
- Spaak P. & Keller B. (2004) No evidence for adaptive micro-evolution to a decrease in phosphorus-loading of a *Daphnia* population inhabiting a pre- alpine lake. *Hydrobiologia*, 526, 15-21

- Spaak P. (1995) Sexual reproduction in *Daphnia*: interspecific differences in a hybrid species complex. *Oecologia*, 104, 501-507
- Spaak P. (1996) Temporal changes in the genetic structure of the *Daphnia* species complex in Tjeukemeer, with evidence for backcrossing. *Heredity*, 76, 539-548
- Spaak P. (2000) Evolutionary Ecology of *Daphnia*. In: *Department of Environmental Sciences of the*, p. 114. Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich
- Spaak P., Denk A., Boersma M. & Weider L.J. (2004) Spatial and temporal patterns of sexual reproduction in a hybrid *Daphnia* species complex. *Journal of Plankton Research*, 26, 625-635
- Spaak P., Vanoverbeke J. & Boersma M. (2000) Predator-induced life-history changes and the coexistence of five taxa in a *Daphnia* species complex. *Oikos*, 89, 164-174
- Stace C.A. (1987) Hybridization and the plant species. In: *Differentiation Patterns in Higher Plants*.
- Stebbins G.L. & Daly K. (1961) Changes in the variation pattern of a hybrid population of *Helianthus* over an eight-year period. *Evolution*, 15, 60-71
- Sterner R.W. & Hessen D.O. (1994) Algal nutrient limitation and the nutrition of aquatic herbivores. *Annual review of Ecology and Systematics*, 25, 1-29
- Straile D. & Geller W. (1998) Crustacean zooplankton in Lake Constance from 1920 to 1995: Response to eutrophication and re-oligotrophication. *Archiv für Hydrobiologie, Beiheft Ergebnisse der Limnologie*, 53, 255-274
- Taylor D.J. & Hebert P.D.N. (1993a) A reappraisal of phenotypic variation in *Daphnia galeata mendotae* - the role of interspecific hybridization. *Can. J. Fish. aquat. Sci.*, 50, 2137-2146
- Taylor D.J. & Hebert P.D.N. (1993b) Habitat-dependent hybrid parentage and differential introgression between neighboring sympatric *Daphnia* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7079-7083
- Taylor D.J. & Hebert P.D.N. (1993c) Cryptic intercontinental hybridization in *Daphnia* (crustacea) - the ghost of introductions past. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 254, 163-168
- Taylor D.J. (1992) *Daphnia galeata mendotae* as a cryptic species complex with interspecific hybrids. *Limnol Oceanogr*, 37, 658-665
- Taylor D.J., Finston T.L. & Hebert P.D.N. (1998) Biogeography of a widespread freshwater crustacean: Pseudocongruence and cryptic endemism in the North American *Daphnia laevis* complex. *Evolution*, 52, 1648-1670
- Taylor D.J., Ishikane C.R. & Haney R.A. (2002) The systematics of Holarctic bosminids and a revision that reconciles molecular and morphological evolution. *Limnology and Oceanography*, 47, 1486-1495
- Taylor D.J., Sprenger H.L. & Ishida S. (2005) Geographic and phylogenetic evidence for dispersed nuclear introgression in a daphniid with sexual propagules. *Molecular Ecology*, 14, 525-537
- Wacker A. & von Elert E. (2001) Polyunsaturated fatty acids: Evidence for non-substitutable biochemical resources in *Daphnia galeata*. *Ecology*, 82, 2507-2520
- Weider L. & Hebert P. (1987) Microgeographic genetic heterogeneity of melanistic *Daphnia pulex* at a low arctic site. *Heredity*, 58, 391-399
- Weider L.J. (1993) Niche breadth and life history variation in a hybrid *Daphnia* complex. *Ecology*, 74, 935-943
- Weider L.J., Beaton M.J. & Hebert P.D.N. (1987) Clonal diversity in high-arctic populations of *Daphnia pulex*, a polyploid apomictic complex. *Evolution*, 41, 1335-1346
- Weismann A. (1877) Beitrage zur Naturgeschichte der Daphnoiden - theil III., 28, 176-211
- Wilson E. O. (1965) The challenge from related species. In: *The genetics of colonizing species*. Academic Press. New York. 7-27
- Wilson C.C. & Hebert P.D.N. (1992) The maintenance of taxon diversity in an asexual assemblage: An experimental analysis. *Ecology*, 73, 1462-1472
- Wolf H.G. (1987) Interspecific hybridization between *Daphnia hyalina*, *D. galeata*, and *D. cucullata* and seasonal abundances of these species and their hybrids. *Hydrobiologia*, 145, 213-217
- Wolf H.G. & Mort M.A. (1986) Inter-specific hybridization underlies phenotypic variability in *Daphnia* populations. *Oecologia*, 68, 507-511
- Wolinska J., Keller B., Bittner K., Lass S. & Spaak P. (2004) Do parasites lower *Daphnia* hybrid fitness? *Limnology and Oceanography*, 49, 1401-1407
- Zaret T.M. (1980) Predation and freshwater communities. Yale University Press, New Haven.
- Zima J. & Macholán M. (2004) Analýza fenotypu. In: Zima J., Macholán M., Muclinger P., Piálek J. (2004) Genetické metody v zoologii. Univerzita Karlova. Nakladatelství Karolinum. 17-44

## PŘÍLOHA

### **Intragenomic sequence variation necessitates a new genetic method to distinguish species and hybrids in the *Daphnia longispina* complex**

Morten Skage<sup>(1)</sup>, Anders Hobæk<sup>(2)</sup>, Štěpánka Ruthová<sup>(3)</sup>, Barbara Keller<sup>(4)</sup>, Adam Petrusek<sup>(3)</sup>,  
Jaromír Sed'a<sup>(5)</sup> & Piet Spaak<sup>(4)</sup>

<sup>(1)</sup> Department of Biology, University of Bergen, Allégaten 41, N-5007 Bergen, Norway;  
e-mail: morten.skage@bio.uib.no

<sup>(2)</sup> Norwegian Institute of Water Research, Regional office Bergen, Nordnesboder 5, N-5005  
Bergen, Norway

<sup>(3)</sup> Department of Ecology, Charles University, Viničná 7, CZ-12844 Prague 2, Czechia

<sup>(4)</sup> Eawag, Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology, 8600 Dübendorf,  
Switzerland, and Institute of Integrative Biology, ETH Zurich, 8092 Zürich, Switzerland

<sup>(5)</sup> Biological Centre ASCR, Institute of Hydrobiology, Na Sádkách 7, CZ-37005 České  
Budějovice, Czechia

**Keywords:** *Daphnia longispina* species complex, ITS-RFLP, ribosomal DNA (rDNA), ITS, intragenomic, interspecific, cryptic species, hybrids

This paper has not been submitted elsewhere in identical or similar form, nor will it be during the first three months after its submission to *Hydrobiologia*.

## Abstract

A collaborative research effort among different laboratories in Europe was initiated to investigate the robustness of a newly developed genetic tool for species identification of members in the morphologically variable *Daphnia longispina* species complex. The genetic method, based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the internal transcribed spacer region (ITS) of nuclear ribosomal DNA (rDNA) with restriction enzymes Mwo I and Sau96 I (Billiones et al., 2004), was applied to a large number of different populations (>220) throughout Europe. Individuals of most taxa were identified unambiguously, but atypical ITS-RFLP patterns were found in some species, particularly in *D. galeata*. Among the 43 investigated *D. galeata* populations (>700 specimen analysed by ITS-RFLP) nearly half of the populations (n=21) displayed atypical ITS-RFLP profiles for *D. galeata*, whereas the profiles from the remaining populations were in good agreement with morphology, allozymes (>4000 specimens), mitochondrial DNA (mtDNA) and cloned rDNA-ITS sequences. The atypical profiles could be attributed to a single loss of one restriction site in the ITS2 region of *D. galeata*. This loss made the distinction of *D. galeata* from other species unreliable, and hybrids could not be detected unambiguously. These shortcomings constitute a serious disadvantage to the established genetic key (Mwo I/Sau96 I), and we advise users to take care when using it. As a solution to this problem we present a new and improved genetic identification tool based on a simple double digestion of the rDNA-ITS region with the restriction enzymes BsrB I and Eag I. Sequence analyses of rDNA-ITS clones and preliminary testing show that the new protocol is not affected by the intragenomic rDNA variation which plagued the Mwo I/Sau96 I protocol.

## Introduction

The absence of stable morphological identification traits has long been a cause of confusion in the *Daphnia longispina* complex (Flössner, 2000; Benzie, 2005). As a consequence of this cryptic morphology, genetic techniques are often necessary to avoid dubious species designations. One such technique is allozyme electrophoresis, which for some time have been the safest tool in identification of *Daphnia* species and their hybrids (Wolf & Mort, 1986; Hebert & Beaton, 1989; Gißler, 1997). Allozymes are considered to be the method of choice by many researchers, particularly in population studies involving thousands of individuals. A disadvantage of allozyme electrophoresis, however, is its requirement for fresh or frozen material and the quite considerable amount of material needed. On the other hand, alternative methods based on DNA and the polymerase chain reaction (PCR) can be cost-prohibitive (Spaak et al. 2004). The main advantage of DNA-based methods is the applicability of ethanol-preserved material. Further, the small amount of DNA required enables analysis of diapausing eggs directly, and thus facilitates the reconstruction of ecological and evolutionary processes through time (Cousyn et al., 2001).

Restriction fragment length polymorphism analysis of amplified DNA (PCR-RFLP) is among the simplest PCR-based methods available to screen for known genetic differences. For the selection of appropriate restriction endonucleases (restriction enzymes), some primary knowledge about the amplified sequence is helpful. The main advantage of this method is the relatively low cost and the simple procedures involved. In addition, it is generally fast, equipment- and labour friendly compared to other and sometimes more sophisticated techniques (e.g. sequencing, microsatellites, or amplified fragment length polymorphism (AFLP)). ITS-RFLP, which is RFLP of the nuclear ribosomal DNA (rDNA) spanning the internal transcribed spacers (ITS) and the 5.8S region, has been used in a number of studies as a rapid method to distinguish between various species (e.g. Anderson et al., 2001; Fernández

et al., 2001; Palapala et al., 2002; Burgermeister et al., 2005). Since the level of sequence variation can be quite high in the ITS region, ITS-RFLP is especially helpful for discrimination among closely related species where morphological characters are ambiguous or lacking altogether (e.g. Aranishi 2005; Taylor et al., 2005). Recently, Billiones et al. (2004) developed an ITS-RFLP protocol to discriminate among European species within the traditional *Daphnia longispina* species complex (sensu Schwenk et al., 2000). This method soon became widely used, not only as a tool for identifying species (Billiones et al., 2004; Schwenk et al., 2004; Hobæk & Skage submitted; Nilssen et al., submitted), but also as a method for detecting hybridization events (Billiones et al., 2004; Hobæk et al., 2004). Nevertheless, as more and more data on *Daphnia* ITS-RFLP patterns have been generated (this study), RFLP patterns were found that could be explained neither by hybrid additivity nor by the uncertainty in scoring bands of seemingly similar size. Such ambiguous patterns are probably best explained either by the presence of new species or the existence of so far unknown rDNA variants. The latter explanation is more likely, since ITS length variants within and between individuals of the same species (using mitochondrial 12S rDNA sequences for species determination) were found in undigested ITS PCR-products and sequences (Hobæk et al., 2004, this study). Further, some of the Hinc II restriction patterns shown by Billiones et al. (2004) also suggested a common co-occurrence of multiple ITS variants within an individual, as the sum of fragment lengths exceeded the length of the original PCR product.

The experienced ITS length variation and atypical RFLP patterns are probably best explained by varying degrees of intragenomic sequence variation. This may seem somewhat surprising, since rDNA as a multigene family of tandem repeats presumably evolves under the process of concerted evolution (Arnheim, 1983; Dover, 1982; Dover et al., 1993), and thereby should be invariant in all repeats. This is of course far too simplistic, since we also know a number of cases where intra-individual heterogeneity of rDNA repeats were detected (Crease & Lynch 1991; Taylor et al., 2005; Vollmer & Palumbi, 2005; Hobæk & Skage submitted). In North American lineages of *D. galeata mendotae* (or Nearctic *D. galeata*) cloning and analyses of rDNA-ITS sequences revealed within-individual sequence variation (Taylor et al., 2005). It is likely that comparable variation occurs among European *Daphnia*, but to date little effort has been devoted to this particular question.

To get insight into the origin and extent of atypical RFLP patterns in the *D. longispina* complex (particular within *D. galeata*), we established a collaboration to investigate recently collected ITS-RFLP data, in addition to cloned rDNA-ITS sequences and allozymes from various European lakes. Given the new knowledge about intragenomic rDNA variation, we also explored the possibility of finding other restriction enzymes to unambiguously identify species and hybrids in the *D. longispina* species complex.

## Materials and methods

A large number of lakes have been sampled and *Daphnia* specimens were genotyped in previous and ongoing studies (Hobæk et al., 2004; Keller & Spaak, 2004; Hobæk & Skage, submitted; Nilssen et al., submitted). Individual specimens were identified following the genetic key of Billiones et al. (2004), but information from mtDNA (Schwenk et al., 2000), morphology (Flössner, 2000) and the diagnostic allozyme loci *AAT* (Wolf & Mort, 1986) and *AO* (Gießler, 1997) was also included.

DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) and ITS-RFLP were performed according to Schwenk et al. (2000), Billiones et al. (2004), Hobæk et al. (2004). ITS primers were from either Schwenk et al. (2000) or Billiones et al. (2004). Individuals representing all species were amplified for the ITS1 & 2 and then cloned into the pCR4- Topo cloning vector supplied

with the Topo TA cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) following the manufacturer's recommendation. Colonies were picked and screened for inserts using PCR with the M13 (-20) forward and M13 reverse primers. Positive transformants, as judged from the expected size of the PCR products, were purified enzymatically with Exosap IT (USB) before sequencing (Big Dye 3.1) with the M13 primers on an ABI3700 (Applied Biosystems). Sequences were edited in BioEdit (Hall, 1999) and aligned using Clustal W (Thomson et al., 1994) and further refined by eye. BLAST searches (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) confirmed the origin of our ITS sequences, showing close resemblance to recently published *Daphnia* sequences by Taylor et al. (2005). The cloned rDNA-ITS sequences will be submitted to GenBank in a subsequent study (Skage et al., unpublished). ITS sequences from GenBank and cloned ITS sequences were then subjected to virtual RFLP using a combination of WebCutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) and BioEdit, with the aim of finding unique enzymes to identify species of the *D. longispina* species complex. Selected enzymes (see below) were then compared with the established Mwo I cut pattern, based on identical PCR-products.

## Results

We investigated over 220 populations harbouring members of the *D. longispina* complex. Based on ITS-RFLP, *D. galeata* and/or *D. cucullata* were present in 85 of the localities. However, we had to limit our focus to 43 of these populations (Table 1) simply because we wanted to compare the ITS-RFLP data (Mwo I) with information from other molecular techniques (see methods). Note that in Table 1 we only included Swiss and Italian lakes where presence of *D. cucullata* could not be detected by allozyme electrophoresis (i.e. species-specific alleles at the allozyme loci AAT and AO were missing). More than 700 specimens of *D. galeata* and *D. cucullata* were analysed for ITS-RFLP variation and several thousand (>4000) for allozymes. Some populations containing interspecific hybrids were analysed as well, as indicated (Table 1). We found atypical *D. galeata* ITS-RFLP patterns in 21 of the investigated populations. This atypical Mwo I pattern, having lost the two diagnostic bands of approximately 320 and 350 base pairs (bp), resembles the RFLP profile of *D. longispina* (*D. rosea* and *D. hyalina* in Billiones et al., 2004) and *D. cucullata* (Fig. 1a, lane 7-8). Sequence analysis shows that the atypical pattern is caused by loss of one nucleotide in the sequence between the two GC recognition sites of Mwo I within the ITS2 region (Table 2). Another atypical pattern ('false hybrid') resembles a hybrid between *D. galeata* and *D. cucullata*, which indicates that not all of the rDNA repeat variants within individuals have lost the restriction site for Mwo I (Fig. 1a, lane 9-10, Table 2). A third RFLP pattern, previously unknown, was detected in a few populations from Czech reservoirs (Table 1), but further study is needed before the identity of these RFLP patterns are disclosed. Preliminary evidence suggest, however, hybrids between *D. galeata* and a rare rDNA variant of *D. lacustris*. Atypical ITS-RFLP patterns are rather rare in Norway (4 out of 20 populations), but in Czech and Swiss populations they seem to be relatively common. Coexistence of atypical patterns and false hybrids (see Fig. 1a, lane 7-10) in the same population was common, although one population in Norway (Stortjønna), one in Poland (Morskie Oko) and three in Switzerland (Ägerisee, Lej da Champfèr and Lej da Silvaplauna) contained only the atypical variant of *D. galeata* (Table 1).

Interspecific hybridization is frequent in Czech reservoirs, and Swiss and Italian lakes, and there are a number of localities where both *D. galeata* and *D. cucullata* co-occur (not shown). There is also quite frequent hybridization between atypical *D. galeata* and *D. longispina* in Swiss lakes (Table 1), but the hybrid pattern is easy to miss since *D. longispina* ITS fragment sizes are very similar to *D. cucullata* and atypical *D. galeata*. This RFLP

similarity is probably the reason why Mwo I was not used to separate *D. cucullata* and *D. longispina* by Billiones et al. (2004), who instead relied on an additional cut by Sau96 I. If we take a closer look at Lake Pfäffikersee, ITS-RFLP patterns indicated the presence of *D. cucullata* in the lake. However, no *D. cucullata* AAT-allozyme alleles have been found in the active pelagic lake population (>700 specimen analyzed), although it has been found in ephippial hatchlings from the sediments. It is in such complex cases a new restriction enzyme is needed to unambiguously separate *D. cucullata*, *D. galeata* and their hybrids, which is not feasible with the established Mwo I protocol of Billiones et al. (2004).

Based on virtual cuts of cloned sequences, we selected another restriction enzyme BsrB I (New England BioLabs) for testing on a number of populations previously screened with Mwo I. BsrB I reliably distinguished between *D. galeata* and *D. cucullata*, and all *D. galeata* with atypical Mwo I restriction patterns were unambiguously assigned to *D. galeata* with the new enzyme (Fig. 1b). The new enzyme cuts off a 75 bp band in all species of the *D. longispina* complex, but cuts one additional time in *D. cucullata*. These cuts produce two bands of approximately 650 and 775 bp in *D. cucullata*, which are clearly distinguishable from the single *D. galeata* band of approximately 1430 bp. Notice that the length of the bands may vary according to length variation found in different rDNA repeats, which again is primarily caused by indels and microsatellite regions in those repeats.

To allow unambiguous species discrimination, we selected one more enzyme that separated *D. longispina* from both *D. cucullata* and atypical as well as typical *D. galeata*. The restriction enzyme Eag I (New England Biolabs) reliably cuts the ITS products of *D. longispina* into two bands of approx. 900 and 540 bp in length, while both *D. cucullata* and *D. galeata* ITS products remain uncut.

Since one of the two new enzymes has less stringent reaction conditions than the other, a simple double digestion can be performed at 37°C (see appendix for protocol), which not only separates *D. longispina*, *D. cucullata* and *D. galeata*, but also separates the additional species *D. "umbra"* (250, 540, and 730 bp bands) and *D. lacustris* (*D. longispina* sensu Schwenk et al., 2000) into unique RFLP variants (Fig. 2b). *D. lacustris* is recognised by one band of 800-805 bp, and most often by one or both bands of 920 bp and 1150 bp, depending on the length of indels in the ITS1 repeats (but see Nilssen et al., submitted). The Lake Berse (Norway) RFLP variant shares the 800 bp band of *D. lacustris*, but has a smaller band of approx. 685 bp as well. This 685 bp band has also been found in two *D. lacustris* populations close to the city of Oslo, including the type locality of *D. lacustris* (see Nilssen et al. submitted), but always together with other typical *D. lacustris* bands in the same individual (e.g. 920, 1150 bp). The size of the Lake Berse RFLP bands makes it hard to distinguish from *D. cucullata*, but this can be overcome if the gel is run long enough to yield sufficient separation. Additionally, the Lake Berse lineage is morphologically very distinct from *D. cucullata* (see Petrusek et al., 2005). If material for morphological analysis is unavailable, the Mwo I cut can still be used to confirm the identification of these two species (see Fig. 2a).

Complete protocols and virtual ITS-RFLP patterns are presented in the appendix.

## Discussion

The *Daphnia longispina* complex contains eight well-known species. Three of them are nearctic or eastern palearctic (*Daphnia dentifera*, *D. mendotae* and *D. thorata*). The other 5 species *D. longispina* (= *D. hyalina/rosea*), *D. "umbra"*, *D. galeata*, *D. cucullata* and *D. lacustris* (= *D. longispina* sensu Schwenk et al., 2000) are mainly palearctic, but *D. galeata* is holoartic (Taylor et al., 2005). Interestingly, the holarctic species (*D. galeata*) seems to be very promiscuous, forming hybrids with nearly every other species (see Taylor et al., 2005 and references therein). There exists a range of genetic methods able to separate these

lineages, including allozymes (e.g. Wolf, 1987; Hobæk & Wolf, 1991; Spaak, 1996; Weider et al., 1997; Keller & Spaak, 2004), RAPD (Schwenk et al., 1995), microsatellites (Ender et al., 1996; Reid et al., 2000; Brede et al., 2006), AFLP (Gili et al., 2004), mitochondrial DNA sequences (Colbourne & Hebert, 1996; Schwenk et al., 2000) and nuclear DNA sequences (Schwenk et al., 2000; Billiones et al., 2004; Taylor et al., 2005; Hobæk & Skage, submitted). There are advantages and disadvantages to all of these techniques. However, RFLP of the rDNA-ITS region presently offers a fairly simple and inexpensive method for rapid identification of species and first generation hybrids within the *D. longispina* complex (see Billiones et al., 2004, this study). The method of Billiones et al. (2004) have been implemented in a digital genetic key for European *Daphnia* species (EDS; see <http://www.natur.cuni.cz/ekologie/EDS/>) as explained by Petrussek et al. (2005). However, when we screened a substantial number of European populations, several problems concerning the Mwo I protocol were detected. Based on our present knowledge, four different RFLP variants of *D. galeata* exist, and variable patterns also occur in *D. lacustris* (Nilssen et al., submitted). Further, a new rDNA variant in a population with unique mitochondrial 12S rRNA and cytochrome c oxidase subunit I (COI) sequences has been detected, although so far only in a single population in South Norway (Lake Berse). Finally, atypical *D. longispina* RFLP variants from Spain have also been identified, and at present at least eight additional ITS-RFLP patterns are known within this species complex. In this study, suspicion was aroused by *D. cucullata*-like RFLP patterns (atypical *D. galeata*), while information from allozymes, morphology and mtDNA contradicted the presence of this species. Having identified the sequence variation that led to restriction site polymorphism in *D. galeata* rDNA variants, the discrepancy of RFLP patterns and other markers could be explained. Inclusion of this uncovered rDNA variation in the digital key is not straightforward as the original protocol of Billiones et al. (2004) could not identify the atypical *D. galeata* patterns.

The intraspecific and intraindividual sequence variation made it difficult to correctly separate *D. galeata* from *D. cucullata* and their first generation hybrids. Because of this, species could have been misidentified and hybrids either falsely identified (individuals of *D. galeata* having both restriction-site variants showing presumably hybrid pattern) or missed altogether (atypical *D. galeata* x *D. cucullata* showing *D. cucullata* pattern). This had implications for the correct identification of *D. longispina* (= *D. hyalina/rosea*) hybrids as well, because the separation of *D. cucullata* x *D. longispina* from *D. galeata* x *D. longispina* hybrids relied also on a primary Mwo I restriction (followed by Sau96 I). Now, given the widespread and common occurrence of hybrids within this species complex (Schwenk & Spaak 1995; Taylor et al., 2005), the ability to reliably detect these hybrids is considered very important.

Recent studies support our view that heterogeneous ITS sequences are rather common within the *Daphnia longispina* complex (Taylor et al., 2005; Hobæk & Skage, submitted), and it is clear that this type of rDNA variation may pose a serious challenge for the development of any new RFLP-based species-specific ITS protocol. However, we believe that careful inspection of ITS clones for restriction site variation, followed by testing of new enzymes in a wide geographic area, is the best way of overcoming this problem. The drawback of this approach is in the time-consuming and expensive cloning and screening steps. Nevertheless, in this case the benefit of cloning is far greater than any of the drawbacks, and surely it has proved its success in the development of new RFLP based protocols for genetic identification of European and North-American members of the *Daphnia longispina* group (Taylor et al., 2005; this study). The new double digest based on BsrB I and Eag I clearly separates all members of the *D. longispina* species complex (Figs. 1 & 2, appendix). Similarly to the Mwo I protocol, the new double digestion is additive for hybrid rDNA (Fig. 2), at least for the first generation hybrids (Billiones et al., 2004; Hobæk et al., 2004; Taylor et al., 2005). The main

prerequisite for a new protocol is that it must resolve the uncertainty experienced with the Mwo I/Sau96 I protocol. We believe it does, as seen from the gel pictures of Figs 1 & 2. However, it is also clear that in some species (e.g. *D. lacustris*) more than one rDNA variant will be common, simply because of the unusual ITS length variation in this lineage.

In summary, we find the method of Billiones et al. (2004) to be inadequate due to extensive restriction site variation, and we advise users to take care when using the Mwo I/Sau96 I protocol. The problems encountered with the protocol were of course unknown at its conception, and surfaced only when it was applied to more populations from additional regions, and compared with data obtained independently by other methods. It is of course impossible to predict the occurrence of hitherto undetected variation that could potentially involve loss or gain of restriction sites. Moreover, the recent detection of a new and undescribed species in Norway (Lake Berse) indicates that still more surprises may turn up. The new protocol proposed here differs primarily in being based directly on a substantial body of sequence information, as well as being tested (virtually and practically) on populations from a wider region, including those known to create difficulties with the earlier protocol. Hence, it should be a more robust approach, which we hope will serve its purpose for several years to come.

### Acknowledgements

We thank Colleen Durkin, Piotr Madej, Marina Manca, Esther Keller, Christoph Tellenbach and Justyna Wolinska for help to obtain zooplankton samples of Swiss and Italian lakes and help in the laboratory. This study was supported by the University of Bergen, Norwegian Institute of Water Research, the Norwegian research council (Grant 121181/720), the Czech Science Foundation (project 206/04/0190) and the Czech Ministry of Education (MSM0021620828).

### References

- Anderson, I. C., S. M. Chambers & J. W. G. Cairney 2001. ITS-RFLP and ITS sequence diversity in *Pisolithus* from central and eastern Australian sclerophyll forests. *Mycological Research* 105:1304-1312.
- Aranishi, F. 2005. Rapid PCR-RFLP method for discrimination of imported and domestic mackerel. *Marine Biotechnology* 7: 571-575.
- Arnheim, N. 1983. Concerted evolution of multigene families, p. 38-61. *In* M. Nei & R.K. Koehn (eds.), *Evolution of genes and proteins*. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Benzie, J. A. H. 2005. The genus *Daphnia* (including *Daphniopsis*): (Anomopoda, Daphniidae) *In* H.J.F. Dumont (ed.) *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*, no 21. Backhuys Publishers, Leiden, 376 pp.
- Billiones, R., M. Brehm, J. Klee, & K. Schwenk. 2004. Genetic identification of *Hyalodaphnia* species and interspecific hybrids. *Hydrobiologia* 526: 43-53.
- Brede, N., A. Thielsch, C. Sandrock, P. Spaak, B. Keller, B. Streit, and K. Schwenk. 2006. Microsatellite markers for European *Daphnia*. *Molecular Ecology Notes* 5: in press.
- Burgermeister, W., K. Metge, H. Braasch, & E. Buchbach. 2005. ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution. *Russian Journal of Nematology* 13: 29-42.
- Colbourne, J. K. & P. D. N. Hebert. 1996. The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): A molecular phylogenetic approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 351: 349-360.

- Cousyn, C., L. De Meester, J. K. Colbourne, L. Brendonck, D. Verschuren, & F. Volckaert. 2001. Rapid, local adaptation of zooplankton behavior to changes in predation pressure in the absence of neutral genetic changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 98: 6256-60.
- Crease, T. J. & M. Lynch. 1991. Ribosomal DNA Variation in *Daphnia-pulex*. *Molecular Biology and Evolution* 8: 620-640.
- Dover, G. A. 1982. Molecular drive: a cohesive model of species evolution. *Nature* 299: 111-117.
- Dover, G. A., A.R. Linares, T. Bowen & J.M. Hancock. 1993. Detection and quantification of concerted evolution and molecular drive. *Methods in Enzymology* 224: 525-541.
- Ender, A., K. Schwenk, T. Stadler, B. Streit, & B. Schierwater. 1996. RAPD identification of microsatellites in *Daphnia*. *Molecular Ecology* 5: 437-441.
- Fernandez, A., T. Garcia, L. Asensio, M.A. Rodriguez, I. Gonzalez, P.E. Hernandez, & R. Martin. 2001. PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species. *Journal of Food Science* 66: 657-661.
- Flössner, D. 2000. Die Haplopoda und Cladocera (ohne Bosminidae) Mitteleuropas. Backhuys Publishers, Leiden 428 pp.
- Giessler, S. 1997. Analysis of reticulate relationships within the *Daphnia longispina* species complex. Allozyme phenotype and morphology. *Journal of Evolutionary Biology* 10: 87-105.
- Gili, M., M. T. Monaghan, & P. Spaak 2004. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) reveals species-specific markers in the *Daphnia galeata-hyalina* species complex. *Hydrobiologia* 526: 63-71.
- Hall, T. 1999. BioEdit sequence alignment editor. Department of Microbiology, North Carolina State University.
- Harris, D. J., & K. A. Crandall. 2000. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): Implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Molecular Biology and Evolution* 17: 284-291.
- Hebert, P. D. N. & M. J. Beaton. 1989. Methodologies for Allozyme Analysis using Cellulose Acetate Electrophoresis. Helena Laboratories, Beaumont, TX.
- Hobæk, A., M. Skage, & K. Schwenk. 2004. *Daphnia galeata x D-longispina* hybrids in western Norway. *Hydrobiologia* 526: 55-62.
- Hobæk, A., & H. G. Wolf. 1991. Ecological genetics of Norwegian *Daphnia*: II. Distribution of *Daphnia longispina* genotypes in relation to short-wave radiation and water colour. *Hydrobiologia* 225: 229-243.
- Hobæk, A. & M. Skage. submitted. Distribution and genetic variation of *Daphnia umbra* in Northern Europe.
- Keller, B. & P. Spaak. 2004. Nonrandom sexual reproduction and diapausing egg production in a *Daphnia hybrid* species complex. *Limnology And Oceanography* 49: 1393-1400.
- Nilssen, J. P., A. Petrusek, A. Hobæk & M. Skage. submitted. Revival of *Daphnia lacustris* G.O. Sars, 1862 following the partitioning of *Daphnia longispina* (O.F. Müller, 1776). *Hydrobiologia*.
- Palapala, V. A., T. Aimi, S. Inatomi, & T. Morinaga. 2002. ITS-PCR-RFLP method for distinguishing commercial cultivars of edible mushroom, *Flammulina velutipes*. *Journal of Food Science* 67: 2486-2490.
- Petrusek, A., F. Bastiansen & K. Schwenk. 2005. European *Daphnia* Species (EDS) - Taxonomic and genetic keys. [Build 2006-01-12 beta]. CD-ROM, distributed by the authors. Department of Ecology and Evolution, J.W. Goethe-University, Frankfurt am Main, Germany & Department of Ecology, Charles University, Prague, Czechia.

- Reid, V. A., G. R. Carvalho & D. G. George. 2000. Molecular genetic analysis of *Daphnia* in the English Lake District: species identity, hybridisation and resting egg banks. *Freshwater Biology* 44: 247-253.
- Schwenk, K., A. Ender & B. Streit. 1995. What can molecular markers tell us about the evolutionary history of *Daphnia* species complexes?. *Hydrobiologia* 307: 1-7.
- Schwenk, K., P. Junntila, M. Rautio, F. Bastiansen, A. Knapp, O. Dove, R. Billiones & B. Streit. 2004. Ecological, morphological, and genetic differentiation of *Daphnia* (*Hyalodaphnia*) from the Finnish and Russian subarctic. *Limnology and Oceanography* 49: 532-539.
- Schwenk, K., D. Posada, & P. D. N. Hebert. 2000. Molecular systematics of European *Hyalodaphnia*: the role of contemporary hybridization in ancient species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267: 1833-1842.
- Schwenk, K., & P. Spaak. 1995. Evolutionary and ecological consequences of interspecific hybridization in Cladocerans. *Experientia* 51: 465-481.
- Spaak, P. 1996. Temporal changes in the genetic structure of the *Daphnia* species complex in Tjeukemeer, with evidence for backcrossing. *Heredity* 76: 539-548.
- Spaak, P., A. Denk, M. Boersma & L.J. Weider 2004. Spatial and temporal patterns of sexual reproduction in a hybrid *Daphnia* species complex. *Journal of Plankton Research* 26: 625-635.
- Taylor, D. J., H. L. Sprenger, & S. Ishida. 2005. Geographic and phylogenetic evidence for dispersed nuclear introgression in a daphniid with sexual propagules. *Molecular Ecology* 14: 525-537.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Vollmer S. V. & S. R. Palumbi. 2005. Testing the utility of internally transcribed spacer sequences in coral phylogenetics. *Molecular Ecology* 13: 2763-2772.
- Weider L. J., W. Lampert, M. Wessels, J. K. Colbourne & P. Limburg 1997. Long-term genetic shifts in a microcrustacean egg bank associated with anthropogenic changes in the Lake Constance ecosystem. *Proceedings of the Royal Society Series B: Biological Sciences* 264: 1613 - 1618
- Wolf, H. G. & M. A. Mort 1986. Interspecific hybridization underlies phenotypic variability in *Daphnia* populations. *Oecologia* 68: 507-511.
- Wolf, H. G. 1987. Interspecific hybridization between *Daphnia hyalina*, *Daphnia galeata*, and *Daphnia cucullata* and seasonal abundances of these species and their hybrids. *Hydrobiologia* 145: 213-217.

**Table 1.** Studied populations across Europe containing *D. galeata*, *D. cucullata* and interspecific hybrids as determined from morphology, allozymes and PCR-RFLP of rDNA-ITS with the enzyme Mwo I. ● denotes positive identification of one of the categories listed, **n** indicates the number of individuals analysed from each lake. Atypical *D. galeata* RFLP variants were considered to be present in the population when all other evidence did not agree with the identification based on Mwo I restriction analysis.

Country (type of locality)	Sample site (name of lake and district)	n	Taxa / RFLP patterns present					unclear RFLP pattern
			<i>galeata</i> (typical)	<i>galeata</i> (atypical)	<i>cucullata</i>	<i>galeata</i> x <i>cucullata</i>	<i>galeata</i> x other species	
<b>Norway</b> (lakes)	Gjellumvann, Akershus	7			●			
	Akersvann, Vestfold	10			●	●		
	Østensjøvann, Oslo	8	●				●	
	Stendavatnet, Hordaland	10	●					
	Haukelandsvann, Hordaland	48	●				●	
	Møkkelandsvatn, Troms	8	●					
	Jernsteinsvann, Finnmark	13	●					
	Langavatn, Hordaland	31	●				●	
	Grunntjørn, N-Trøndelag	14	●					
	Torkelvatn, N-Trøndelag	5	●					
	Mjøsa, Oppland	24	●	●				
	Grimevatn, Hordaland	27	●	●			●	
	Mildevatn, Hordaland	24	●				●	
	Movatn, N-Trøndelag	5	●					
	Andsvatn, Troms	5	●					
	Storavatn, Hordaland	10	●	●				
	Grunnevatn, Troms	13	●					
	Kalandsvatn, Hordaland	20	●					
	Stortjønna, N-Trøndelag	13	●	●				
	Trollvann, Oslo	6	●			●		
<b>Poland</b> (lakes)	Morskie Oko (PL)	7		●				
<b>Slovakia</b> (lakes)	Štrbské pleso (SK)	7	●					
	Nížné Temnosmrečinské pleso (SK)	4	●					
<b>Czech Republic</b> (reservoirs)	Seč	13	●			●		
	Sedlice	15	●	●	●		●	
	Švihov (Želivka)	8	●	●			●	
	Žlutice	5	●	●			●	
	Římov	9	●	●			●	
	Vír	28	●	●		●	●	
	Kníničky (Brno)	16	●	●			●	
	Stanovice	12	●	●			●	
<b>Switzerland</b> (lakes)	Greifensee	200	●	●			●	
	Ägerisee	10		●			●	
	Lej da Champfèr	10		●				
	Lej da Segl (Silzersee)	10	●	●			●	
	Lej da Silvaplauna	10		●				
	Pfäffikersee	10	●	●			●	
	Thunersee	10					●	
	Vierwaldstädtersee	10	●				●	
	Walensee	10	●				●	
<b>Italy</b> (lakes)	Lago Comabbio	10	●	●				
	Lago Como	10	●	●			●	
	Lago Lugano	10	●	●				

**Table 2.** *Daphnia galeata* DNA sequences with restriction sites of Mwo I inside the rDNA-ITS2 region. The recognition site of Mwo I (**GCnn\_nnn'nnGC**) is marked in bold. Open space means missing nucleotide, i.e. loss of the restriction site. The labels in front of sequences indicate locality (e.g. Stortjønnna), individual (a) and clone (4), respectively. Notice that individual Mjøsa (c) had both normal (clone 5) and atypical (clone 8) ITS-RFLP variants, and could be mistaken for a hybrid *D. cucullata* x *D. galeata* (referred to as a false hybrid in the text).

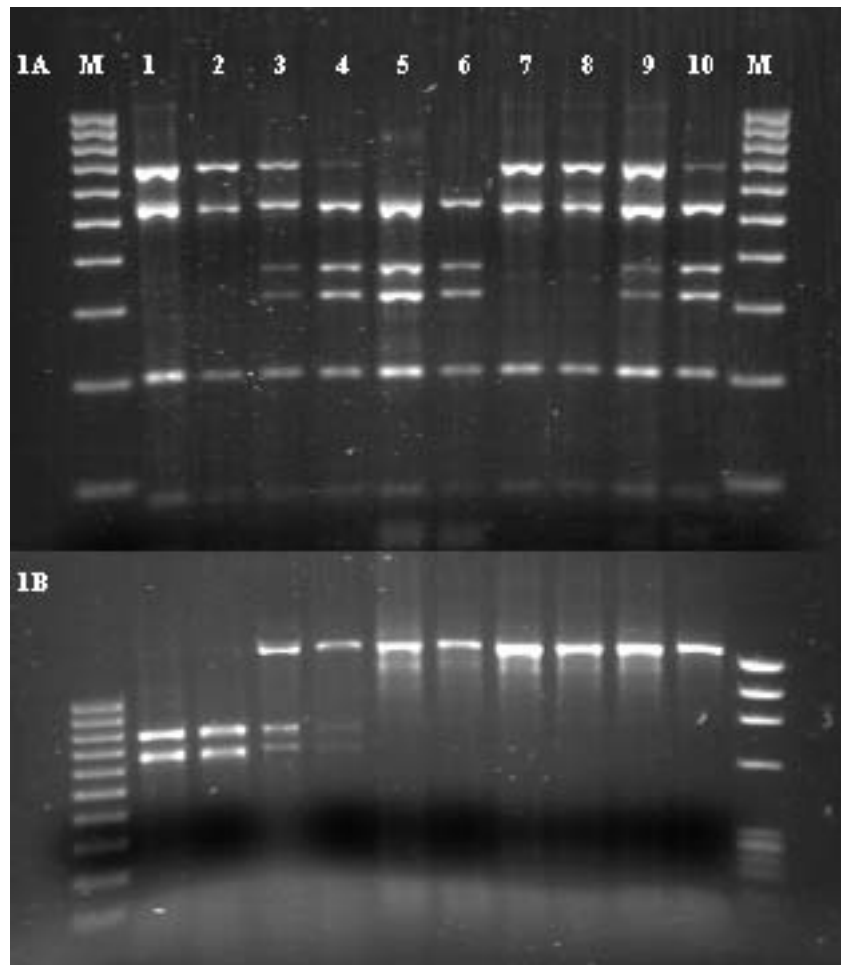
Stortjønnna (a-4)	AGCGT TTTT <b>GCGCGA</b>	atypical <i>D. galeata</i>
Mjøsa (c-8)	AGCGT TTTT <b>GCGCGA</b>	atypical <i>D. galeata</i>
Mjøsa (c-5)	AGCGTTTTTT <b>GCGCGA</b>	normal <i>D. galeata</i>
Kalandsvann (a-1)	AGCGTATTTT <b>GCGCGA</b>	normal <i>D. galeata</i>

**Figure captions:**

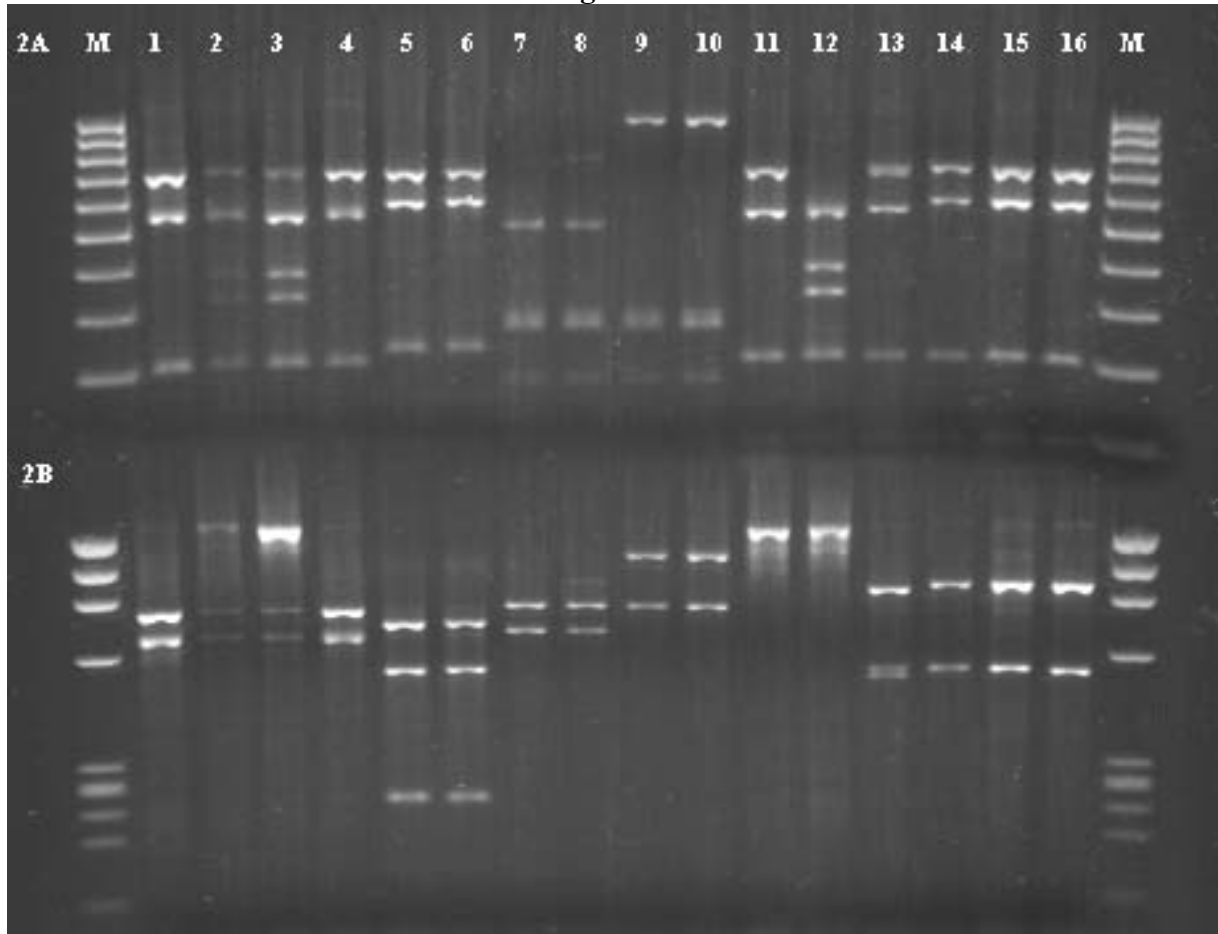
**Figure 1.** Mwo I (Fig. 1A) and BsrB I/Eag I (Fig. 1B) restriction patterns of the rDNA-ITS region from selected populations of *D. cucullata* (lane 1-2), *D. cucullata* x *D. galeata* (lane 3-4), normal *D. galeata* (lane 5-6), atypical *D. galeata* similar to *D. cucullata* (lane 7-8) and false hybrids (lane 9-10). Note that in Fig. 1B, no atypical and/or false hybrids are detected with the new double digest. M denotes marker lanes (100 bp ladder or PhiX174 DNA/Hae III).

**Figure 2.** Comparison of rDNA-ITS restriction digestions with Mwo I (Fig. 2A) and the double digest with BsrB I and Eag I (Fig. 2B) for lineages within the *D. longispina* species complex. *D. cucullata* (lane 1 & 4), *D. cucullata* x *D. galeata* (lane 2-3), *D. "umbra"* (lane 5-6), Lake Berse (lane 7-8), *D. lacustris* (lane 9-10) *D. galeata* (lane 11-12; one atypical) and *D. longispina* (lane 13-16; old name *D. hyalina/rosea*). A 100 bp marker (lane M) was used in Fig. 2A and PhiX174 DNA/Hae III in Fig. 2B.

**Figure 1.**



**Figure 2.**



## Appendix

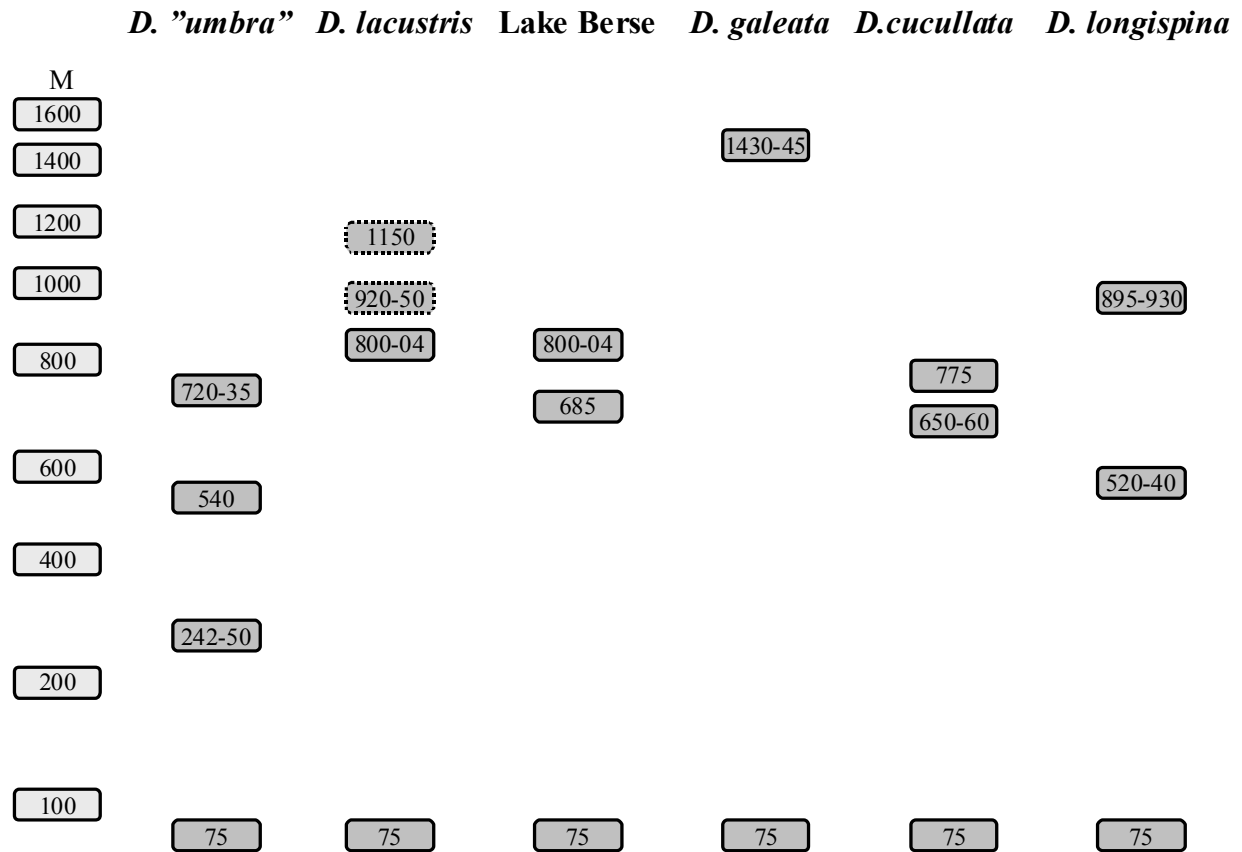
### **A complete ITS-RFLP protocol for the *Daphnia longispina* species complex**

**PCR protocol:** One typical PCR contained (in 25 µl reaction volume) 0.5 µM of both ITS primers (5'-CAC ACC GCC CGT CGC TAC TAC CGA TTG-3' and 5'-CGG TGG TCG ACA CTT CGA CAC GC-3'; Schwenk et al., 2000), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each dNTPs, 0.6 U *Taq* DNA Polymerase, 1x PCR reaction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.5). Good results have been obtained with a ready to use PCR Master-Mix (0.8-1X) from Promega (Cat.no. M7502) but chemicals from other manufacturers (e.g. Fermentas) have been successfully used as well.

**Cycling conditions:** 3 min at 95°C initial denaturation, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, annealing at 60-65°C for 1 min, extension at 72°C for 1 min; final extension step of 8 min at 72°C, before ending with a hold step at 4-10°C.

**Restriction digestion:** a double digest with the enzymes BsrB I (R0102) and Eag I (R0505) from New England Biolabs. Digest 10 µl of the PCR product with 1 unit of both enzymes in 20µl of 1.5x NEB buffer 3 for at least 1 hour at 37 °C. Longer incubations (e.g. overnight), and volume reduction (e.g. 10 µl of PCR product in 15 µl of total volume) are possible as well. The reaction volume should be optimised according to the electrophoretic setup and gel documentation system used. Digested products are separated on 1.5% agarose gels for 1-2 hours following standard procedures.

Alternatively, isoschizomers (i.e. restriction endonucleases that recognize the same sequence) may be used. We have successfully tested the enzymes Mbi I (alternative to BsrB I) and Eco52 I (alternative to Eag I) supplied by Fermentas in 15 µl reaction volume, containing 10 µl of PCR product, 1 unit of each enzyme, and 1x Eco52I buffer. In such a case, however, we recommend a longer incubation time, as Mbi I has suboptimal performance in the buffer system used. Note that if other primers than those given by Schwenk et al. (2000) are used, the 75 bp band is not obtained. In general it is important to include positive controls, such as *D. cucullata* or *D. longispina*, to confirm a complete digestion. This is especially important when only *D. galeata* is analysed, since this digest produces only a 75 bp band and a 1430-50 bp band. As an alternative control, undigested *D. galeata* PCR products may be run on the gel in parallel lanes to digested samples, which should give you two large bands of ca.1500 and 1430 bp (i.e. a visible 75 bp difference). Complete double digested ITS-RFLP patterns from all analysed species are visualized in Fig. 3.



**Figure 3.** Schematic ITS-RFLP pattern of members of the *Daphnia longispina* species complex based on a double digestion of the rDNA-ITS region with restriction enzymes BsrB I and Eag I. Numbers inside bands (rectangles) indicate length of bands in base pairs. M denotes a virtual size marker. Note that the 800-04 bp band is always present in *D. lacustris*, while either one or both bands of 920-50 bp and 1150 bp (marked by dotted borders) can be found. The 685 bp band typical for specimens from Lake Berse has also been found in *D. lacustris* (see Nilssen et al., this issue, for further details).