

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Nikola Korytová

Genetická hranice druhů u perlooček (Crustacea, Cladocera)

Genetic delineation of species in cladocerans (Crustacea, Cladocera)

Bakalářská práce

Vedoucí/školitel: RNDr. Veronika Sacherová, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

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

V Praze dne 8. 6. 2020

Nikola Korytová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Veronice Sacherové, PhD. za její pomoc, ochotu a vstřícnost při zpracovávání této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu.

Abstrakt

Perloočky (Crustacea, Branchipoda) jsou bohatou skupinou planktonních korýšů. Vyskytuje se v nich mnoho kryptických druhů, které jsou zařazovány do druhových komplexů. Tato práce se zabývá zástupci čeledí Daphniidae a Chydoridae, kteří obývají vodní útvary po celém světě, ale nemají dodnes úplně objasněné všechny taxonomické vztahy. Pro rozpoznávání druhů se využívají morfologické i genetické analýzy. Jelikož ale u nich dochází k hybridizaci, je v některých případech lepší studovat jejich genetické vzdálenosti. Pro genetickou analýzu daného taxonu se využívají genetické markery, což jsou úseky DNA, které jsou pro každý druh jedinečné. Využívají se i jaderné geny, nicméně na úrovni druhů poskytují lepší výsledky geny mitochondriální. Nejvíce se využívá první podjednotka cytochrom c oxidázy (COI), dále 12S a 16S rDNA. Tyto geny často poskytují dobře podporované fylogenetické stromy, nicméně situace je u Daphniidae i Chydoridae natolik komplikovaná, že určení pravidel pro hranice druhů není v tuto chvíli možné. Budoucí studie by se měly (pokud to lze) více zabývat i datováním událostí a vytvářet molekulární hodiny, zejména pro čeleď Chydoridae, která i přes své druhové bohatství zůstává často opomíjená.

Klíčová slova: Daphniidae, Chydoridae, genetické markery, COI 12S rDNA, 16S rDNA

Abstract

Cladocera (Crustacea, Branchipoda) are a diverse group of planktonic crustaceans. There are many cryptic species which form species complexes. Families Daphniidae and Chydoridae who live in water bodies around the whole world, have not completely resolved taxonomy so far. Morphological and genetic analyses are used for identifying species. It is often preferable to study their genetic distances, because they frequently hybridize. The genetic markers (DNA sequences that are unique to each species) are used for the genetic analysis of taxa. Although mitochondrial genes provide better results on a species level, nuclear genes may also be used. Cytochrome c oxidase subunit I (COI), 12S and 16S rDNA are the most used mitochondrial genes. However, the situation in families Daphniidae and Chydoridae is complicated and assigning precise genetic distance for delineation of the species is not easy, although these genes allow well-supported phylogenetic trees. The future studies should examine more closely the dating events and create molecular clocks, especially for the family Chydoridae, which is often neglected despite its species diversity.

Key words: Daphniidae, Chydoridae, genetic markers, COI, 12S rDNA, 16S rDNA

Obsah

1. ÚVOD	1
2. CHARAKTERISTIKA SKUPINY CLADOCERA	2
2.1 TAXONOMIE	2
2.2 ANATOMIE A MORFOLOGIE	2
2.2.1 Rozmnožování a disperze	3
2.3 EKOLOGIE	3
3. GENETICKÉ MARKERY	4
3.1 MARKERY JADERNÉ DNA	4
3.1.1 18S rDNA	4
3.1.2 28S rDNA	5
3.1.3 ITS-1, ITS-2	5
3.2 MARKERY MITOCHONDRIÁLNÍ DNA	5
3.2.1 Cytochrom c oxidáza podjednotka 1 (COI)	5
3.2.2 12S rDNA	6
3.2.3 16S rDNA	6
3.3. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ GENETICKÉ VZDÁLENOSTI	7
3.4. VYUŽITÍ GENETICKÝCH MARKERŮ U JINÝCH SKUPIN KMENE ARTHROPODA	8
4. POUŽITÍ GENETICKÝCH MARKERŮ U ČELEDI DAPHNIIDAE	9
4.1 PODROD <i>DAPHNIA</i>	9
4.1.1 Druhový komplex <i>Daphnia longispina</i>	9
4.1.2 Druhový komplex <i>Daphnia pulex</i>	12
4.1.3 Druhový komplex <i>Daphnia obtusa</i>	14
4.1.4 Druhový komplex <i>Daphnia laevis</i>	14
4.2 PODROD <i>HYALODAPHNIA</i>	15
4.2.1 Druhový komplex <i>Daphnia curvirostris</i>	15
4.3 PODROD <i>CTENODAPHNIA</i>	15
4.3.1 Druhový komplex <i>Daphnia carinata</i>	16
5. POUŽITÍ GENETICKÝCH MARKERŮ U ČELEDI CHYDORIDAE	18
5.1 ROD <i>CHYDORUS</i>	18
5.1.1 Druhový komplex <i>Chydorus sphaericus</i>	18
5.2 ROD <i>PLEUROXUS</i>	19
5.3 ROD <i>ALONA</i>	19
5.4 ROD <i>LEBERIS</i>	20
5.5 ROD <i>OXYURELLA</i>	20
6. JE URČENÍ GENETICKÉ HRANICE (NE)MOŽNÉ?	22
7. ZÁVĚR	23
8. SEZNAM LITERATURY	24

1. ÚVOD

Perloočky jsou planktonní korýši žijící převážně ve sladkovodním prostředí. Obývají dočasné i trvalé vodní nádrže. Jedná se o mikroskopické organismy, které jsou často menší než 1 mm. Jsou morfologicky i geneticky velmi variabilní a dodnes je jejich taxonomie nejasná. Mezi druhy mohou vznikat i hybridy, kteří jsou morfologicky těžce rozeznatelní. Vysoká genetická odlišnost se u perlooček vyskytuje jak mezidruhová, tak v rámci druhů (Elías-Gutiérrez et al., 2008; Fryer, 1991; Korhola & Rautio, 2001; Korovchinsky, 1997; Spears & Abele, 2000).

Při určování morfologicky obtížně identifikovatelných druhů a při sestavování fylogenetických stromů nám mohou pomoci molekulární analýzy, při kterých se využívají genetické markery. Tyto markery jsou krátké úseky genetické informace, které se mezidruhově i vnitrodruhově liší. Na základě těchto rozdílů můžeme stanovit příbuznosti analyzovaných druhů nebo odhalit kryptickou diverzitu (Patwardhan et al., 2014; Petrussek et al., 2008a; Xu et al., 2018). Vzácněji se genetická vzdálenost měří pomocí variability počtu chromozomů, která vzniká duplikací celého genomu a/nebo hybridizací (Dufresne & Jeffery, 2011).

K molekulární analýze se využívají jaderné i mitochondriální úseky DNA. Mitochondriální geny se vyvíjí rychleji než jaderné, což pomáhá identifikaci blízce příbuzných druhů (Hebert et al., 2003, 2004; Xu et al., 2018), nicméně pro analýzy hlubších fylogenetických vztahů je použití jaderných genů výrazně úspěšnější. Vzhledem k tomu, že se mitochondriální geny dědí po mateřské linii, není vždy možné identifikovat hybridy (Saccone et al., 1999).

Jako molekulární markery jaderné DNA se často využívají 18S rDNA, 28S rDNA a ITS (vnitřní transkribované spacery). Z mitochondriálních genů se nejvíce využívá první podjednotka protein kódujícího genu cytochrom c oxidázy (COI), 12S a 16S rDNA.

Cílem této práce je zjistit, jaké genetické markery se nejvíce využívají pro identifikaci příbuzenských vztahů mezi perloočkami, konkrétně u čeledí Daphniidae a Chydoridae, a popsat genetickou variabilitu v těchto čeledích. Dále je cílem určit, jaké genetické vzdálenosti se objevují mezi druhy a v rámci druhů, a zda lze tyto rozdíly u vybraných genů zobecnit, ať už v rámci druhů nebo mezi jinými taxonomickými úrovněmi. Na základě zjištěných údajů se chci také pokusit navrhnout další možnosti, jak tuto problematiku řešit v budoucnu.

2. CHARAKTERISTIKA SKUPINY CLADOCERA

2.1 Taxonomie

Perloočky jsou skupinou planktonních živočichů, patřících do podkmene korýšů (Crustacea). Pro lepší přehlednost je můžeme dělit do dalších skupin – Anomopoda, Ctenopoda, Haplopoda a Onychopoda, jedná se ale jen o jeden možný pohled na jejich taxonomii. Celý řád Cladocera je monofyletický, stejně jako skupiny Anomopoda, Onychopoda a Haplopoda (Richter et al., 2007; Sacherová & Hebert, 2003; Spears & Abele, 2000; deWaard et al., 2006). Ctenopoda jsou sesterskou skupinou ke všem ostatním podřádům a zároveň podřád Anomopoda je sesterský k podřádům Haplopoda a Onychopoda (Martin & Cash-Clark, 1995). Zástupci skupin Anomopoda a Ctenopoda jsou primárně filtrátoři, zatímco Onychopoda a Haplopoda jsou predátoři (Spears & Abele, 2000). Skutečná diverzita perlooček je mnohokrát vyšší, než se předpokládalo a ve skupině se vyskytuje mnoho kryptických druhů. Zástupci perlooček se mohou třídit do druhových komplexů, mezi kterými dochází ke křížení druhů (Forró et al., 2008; Huang et al., 2014).

Perloočky jsou starobylou skupinou. Předek perlooček pravděpodobně žil již v prvohorách a přibližně před 300 miliony lety (v permu) se ze společného předka oddělily tři linie vedoucí k dnešním perloočkám (z první linie Ctenopoda, ze druhé Anomopoda a ze třetí Onychopoda) (Negrea et al., 1999). Linie, ze které pochází zástupci čeledi Chydoridae se pravděpodobně objevila již před 400 miliony lety na začátku prvohor (Sacherová & Hebert, 2003). Fosilní záznam, ze kterého je patrné, že se jistě jedná o předka perlooček lze datovat do druhohor. V tomto období nejspíš docházelo k velkému šíření perlooček. Po rozpadu Pangey (před 200 miliony lety) se od sebe začaly nově vzniklé kontinenty vzdalovat, stejně jako populace starobylých perlooček (Korovchinsky, 2006; Kotov & Taylor, 2010). Na počátku třetihor postihlo perloočky, stejně jako ostatní druhy, vymírání kvůli změnám klimatu. Nicméně mnoho druhů přežilo jak masivní vymírání na konci křídly, tak i období střídání dob ledových ve čtvrtohorách, zejména díky refugiím, ve kterých se zástupci perlooček dále specializovali (Korovchinsky, 2006). Na úrovni rodů a druhových komplexů docházelo k diverzifikaci přibližně před 180 miliony lety, většina dnešních druhů perlooček se diverzifikovalo přibližně před 20 až 3 miliony lety (Colbourne & Hebert, 1996; Cox & Hebert, 2001; Cristescu & Hebert, 2002).

2.2 Anatomie a morfologie

Perloočky jsou velké 0,3 - 6 mm (Olesen, 2014). Tělo je kryté schránkou a dělí se na hlavový štít a karapax, který je u dravých perlooček redukovaný. Hlavový štít vybíhá v rostrum, které je výrazné zejména u zástupců čeledi Chydoridae. K pohybu slouží antény, což jsou velká tykadla prvního páru.

Malé anteny, tykadla druhého páru, fungují jako smyslový orgán. Hrud' nese pět až šest párů nesegmentovaných končetin (Fryer, 1968).

2.2.1 Rozmnožování a disperze

Perloočky se rozmnožují tzv. cyklickou partenogenezí, v některých případech se může objevovat obligátní partenogeneze. Partenogenetické samice rodí živé juvenilní jedince, kteří jsou podobní dospělým. Pokud se podmínky prostředí mění, jak abioticky (změna teploty, vysychání vody, změna délky dne), tak bioticky (úbytek potravy), začnou samice klást haploidní vajíčka, ze kterých se líhnou samci (Fryer & Frey, 1981). Dochází k oplodnění samic a ze zygoty vznikají odolná vajíčka schopná diapauzy, která jsou uložena v efípiu, jenž se nachází na hřbetě perloočky (kromě rodu *Leptodora*, který je má na abdomenu; Rossi, 1980). Efípium se uvolní buď svlečením karapaxu perloočky při růstu nebo po úhynu perloočky. V efípiu zůstávají rezistentní vajíčka, která vyčkávají na vhodné podmínky prostředí (Cáceres & Schwalbach, 2001). Z nich se pak líhnou partenogenetické samice. Při zlepšení podmínek se ale nemusí vylíhnout všechna diapauzní vajíčka, některá zůstávají neaktivní. Jedná se o tzv. bet-hedging strategii, která uchovává část vajíček pro budoucnost pro případ, že se z důvodu předčasného vyschnutí lokality nepodaří první vlně potomků dosáhnout dospělosti a rozmnožit se (Cáceres & Tessier, 2003). Tato vajíčka jsou životaschopná po velmi dlouhou dobu, až po několik století (Cáceres, 1998; Hairston et al., 1995). Vajíčka se navíc mohou šířit pomocí zoochorie (v peři nebo v trusu vodních ptáků, u *Daphnia magna* např. v trusu kachen) nebo větrem (Cáceres & Soluk, 2002; Frisch et al., 2007), případně vlivem lidské činnosti. Vajíčka v některých případech tvoří v nádržích mnohem větší druhovou a genetickou diverzitu, než aktivní obyvatelé těchto stanovišť (Brendonck & De Meester, 2003). Partenogenetický cyklus s krátkou generační dobou je výhodný v podmínkách, ve kterých není možné obnovovat populaci během celého roku (Fryer, 1991).

2.3 Ekologie

Daphniidae jsou primárně filtrátory ve sladkovodním prostředí (Olesen, 2014; Spears & Abele, 2000). Obývají různé typy stanovišť – od malých, často efemerních vod po velká jezera (Fryer, 1991), většinou jsou to obyvatelé volné vody (pelagiálu).

Zástupci skupiny Chydoridae jsou litorálně bentiční živočichové, svým způsobem obživy jsou vázáni k povrchům vodních rostlin, kamenů nebo sedimentu, ze kterých seškrábávají potravu, ovšem někteří Chydoridae mohou být i fakultativními filtrátory (Adamczuk, 2014). K drcení potravy mají přizpůsobené mandibuly, které jsou velmi silné (Dole-Olivier et al., 2000). Druhová bohatost i šíře habitatů je u Chydoridae výrazně větší než u Daphniidae.

3. GENETICKÉ MARKERY

Genetické markery jsou úseky DNA, které představují pro dané organismy jedinečné sekvence DNA, díky kterým můžeme sestavovat fylogenetické stromy. Genetické markery jsou využívány k identifikaci druhů, v systematice, ve forenzních vědách a podobně (Yang et al., 2017). Pomáhají nám zejména při identifikaci blízce příbuzných druhů, které je složité rozpoznávat pomocí morfologie (Xu et al., 2018). Sekvence markerů mohou být u různých druhů různě dlouhé, jelikož míra molekulární evoluce se mezi různými úseky genomu a napříč taxony liší (Hebert et al., 2003; Kabir et al., 2018). Pro využití genetických markerů je důležitá jejich odlišnost, která je dostatečná pro rozlišení samostatných druhů, ale zároveň nesmí být odlišná příliš, abychom mohli dobře určit pozici daného taxonu na zvolené taxonomické úrovni. Aby byl určitý genetický marker vhodný pro praktické využití, nesmí být příliš dlouhý a musí být relativně dobře izolovatelný (Yang et al., 2017).

V praxi se využívají různé genetické markery. V současné době se nejvíce využívá sekvence podjednotky I cytochrom c oxidázy, která je součástí mitochondriálního genomu, a proto je velmi vhodná pro zkoumání genetické variability na úrovni druhů. Zároveň je ale jasné, že pro širší využití a správnost identifikace druhů musíme využívat více markerů zároveň. Pokud totiž analyzujeme pouze jednu sekvenci, výsledné fylogenetické stromy se mohou lišit v závislosti na tom, jestli pocházejí z jaderné či mitochondriální DNA. Další z využívaných mitochondriálních genetických markerů je gen 12S rDNA nebo 16S rDNA (např. Taylor et al., 1998; Thielsch et al., 2017; Zuykova et al., 2013a).

Nejenom pro zkoumání hlubších fylogenetických vztahů se často využívají genetické markery z jaderných genů. Používaným markerem z jaderných genů i u perlooček jsou geny 18S rDNA, 28S rDNA nebo vnitřní transkribované spacery (ITS); např. Spears & Abele, 2000; Taylor et al. 2002). U jiných skupin živočichů (např. Anthozoa, Monogenea nebo Arachnida) se může používat i gen 5,8S rDNA (např. Hansen et al., 2020; de Matos et al., 2014; Thomas & Hedin, 2008), ovšem u perlooček se téměř nevyužívá.

3.1 Markery jaderné DNA

3.1.1 18S rDNA

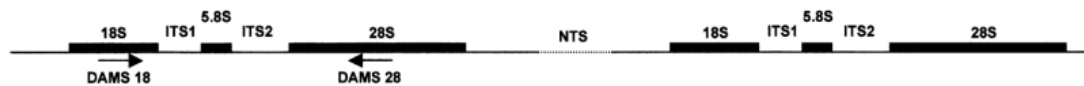
18S rDNA je ve studiích využívána zejména pro vztahy vyšších taxonomických celků od podčeledí k třídám (pro Branchiopoda například Sacherová & Hebert, 2003; Spears & Abele, 2000; deWaard et al., 2006), jelikož se vyvíjí pomaleji (Hillis & Dixon, 1991).

3.1.2 28S rDNA

Ve studiích se tento genetický marker osvědčil jako vhodný pro zkoumání vyšších fylogenetických vztahů, někdy i na úrovni druhů, ale většinou v kombinaci s jiným, například mitochondriálním genem (Decker, 2016; Dömel et al., 2015; Mukha et al., 2002).

3.1.3 ITS-1, ITS-2

U eukaryotických organismů se nachází jaderné rRNA geny, které jsou organizovány do klastrů. Tyto klastry obsahují podjednotky genů 18S, 5,8S a 28S. Mezi těmito podjednotkami se nachází vnitřní transkribované spacery (ITS), které jednotlivé geny oddělují. Gen 18S a 5,8S odděluje ITS-1, geny 5,8S a 28S odděluje ITS-2 (Belyaeva & Taylor, 2008; Fritz et al., 1994; Gómez-Zurita et al, 2000). S pomocí těchto markerů můžeme zjišťovat fylogenetické vztahy na mnoha úrovních (Hershkovitz & Lewis, 1996; Vierna et al., 2010). V těchto jaderných markerech se vyskytuje mnoho inzercí a delecí, které mohou obsahovat substituce nebo dochází ke změně délek repeticí (Mukha et al., 2002; Schwenk et al., 2000).



Obr. 3: Schéma eukaryotických tandemicky se opakujících úseků rDNA; 18S, 5.8S, 28S-příslušné ribosomální RNA geny; ITS1 a ITS2-příslušné vnitřní transkribované spacery; NTS-netranskribovaný spacer. Upraveno a převzato z Mukha et. al., 2002.

3.2 Markery mitochondriální DNA

Mitochondriální genom je v mnoha znacích pro určování nižších taxonů lepší než jaderný, jelikož neobsahuje introny a v buňkách se nachází ve větším počtu kopií. U mitochondriálních genomů ale dochází k dědičnosti po mateřské linii, což může zkomplikovat identifikaci hybridních populací (Saccone et al., 1999). Perloočky se nicméně rozmnožují cyklickou partenogenezí a převažuje dědičnost po mateřské linii. Mitochondriální genom se využívá více než jaderný, jelikož se rychleji vyvíjí (Hillis & Dixon, 1991). Rychlejší vývoj genu vede k hromadění variací mezi blízkými druhy.

3.2.1 Cytochrom c oxidáza podjednotka 1 (COI)

Cytochrom c oxidáza podjednotka I (dále jen COI) je gen kódující protein v mitochondriálním genomu. Nukleotidy COI vykazují ve třetí pozici vysoký výskyt substitucí bází, což naznačuje dostatečně rychlý vývoj, který umožňuje rozlišení nejen příbuzných druhů, ale také fylogenetických skupin v rámci jednoho druhu. To zajišťuje poměrně dobré určení fylogenetických vztahů (Hebert et al., 2003). Tento úsek DNA byl také navržen pro tzv. barcoding, tedy využití u širokého spektra

bezobratlých tak, aby bylo možné srovnání i mezi taxonomicky vzdálenějšími skupinami (Hebert et al., 2003). Jejím přínosem pro taxonomické studie je možné odhalení kryptických druhů (Elías-Gutiérrez et al., 2008).

COI tak již v minulosti byla úspěšně použita k identifikaci mnoha druhů živočichů, například ptáků (Hebert et al., 2004), pavouků (Barret & Hebert, 2005), korýšů (Costa et al., 2007; Elías-Gutiérrez et al., 2008), ryb (deWard et al., 2006) a hmyzu (Hebert et al., 2003), ale i perlooček (Cox & Hebert, 2001). COI může být vhodnějším markerem pro určování druhů, než markery 12S a 16S rDNA, jak se ukázalo ve studii perlooček rodu *Daphnia* (Colbourne et al., 2006).

COI má dvě výhody, zaprvé má větší rozsah fylogenetického signálu než jiný mitochondriální gen a zadruhé můžeme využívat univerzální primery, které umožňují její amplifikaci (Hebert et al., 2003). COI většinou neobsahuje indely, což jsou inserce či delece bází v genomu, které často vedou k posunu ve čtecím rámci (výjimka např. u 5 řádů pavoukoců-Mesostigmata, Opiliones, Pseudoscorpiones, Sarcoptiformes, Trombidiformes [Young & Hebert, 2015]). Většinou se využívá úsek dlouhý ~650 bp v blízkosti 5' konce COI (Costa et al., 2007). Její nevýhodou je však její podstata – jedná se o mitochondriální gen, který se podle pravidel dědí po mateřské linii. To může způsobovat nejasnosti u hybridizace, kdy potenciální hybrid získá alelu mitochondriálního genu pouze od matky a na první pohled se tedy v mitochondriální DNA jeví jako jeden druh. Kvůli tomu vznikají zmatky v taxonomii a systematice, což můžeme pozorovat i u perlooček (deWard et al., 2006).

Využívání sekvence COI bylo navrženo, kromě živočichů, i pro molekulární analýzu skupin Fungi nebo Protista (Inagaki et al., 1998), naopak jako nevhodná se ukázala v případě rozpoznávání druhů rostlin. U rostlin je totiž divergence sekvencí mitochondriální DNA mnohem nižší (Kress et al., 2005)

3.2.2 12S rDNA

Gen 12S rDNA se vyvíjí až 1,5 krát rychleji než gen 16S rDNA, z tohoto důvodu byl v některých případech při sestavování fylogenetických stromů přínosnější než gen 16S rDNA (Taylor et al., 1998; Zuykova et al., 2013a).

3.2.3 16S rDNA

Fragment genu 16S rDNA se vyvíjí až 1,5 krát pomaleji než 12S rDNA (Taylor et al., 1996; Zuykova et al., 2013a). U rodu *Daphnia* gen 16S rDNA lépe identifikuje druhy a skupiny blíže příbuzných druhů než hluboké evoluční větve, jakými jsou například vztahy mezi podrody *Daphnia* a *Ctenodaphnia* (Zuykova et al., 2016). Podobná zjištění i při analýze Chydoridae (Sacherová & Hebert, 2003). V některých případech se gen 16S rDNA projevil jako velice užitečný. V případě, kdy gen COI vykazoval malé fylogenetické signály, u genu 16S rDNA tomu bylo naopak. U krabů rodu *Austinica* se stal užitečným pro identifikaci fylogenetických vztahů na úrovni druhů (Harrison, 2004).

3.3. Faktory ovlivňující genetické vzdálenosti

Mezi nejdůležitější faktory ovlivňující genetickou variabilitu patří izolovanost/propojenost stanovišť, možnost přenosu mezi těmito stanovišti (disperze), a evoluční historie dané skupiny, tedy vývoj daného taxonu v čase. Velikou roli hraje též způsob rozmnožování a tím i dědičnost použitých genů, jak je zmíněno výše.

Při zkoumání genetických vzdáleností má na míru odlišnosti vliv **izolace** stanovišť. Populace nemusí být příliš geograficky vzdálené, aby vykazovaly vyšší rozdíly ve zkoumaných genech. (např. populace z Argentiny; Adamowicz et al., 2004). Zkoumaní jedinci z těchto druhů obývali vodní nádrže ve střední a jižní části Argentiny. Je tedy možné, že takto vysoké rozdíly v genu COI mohou být způsobené geografickou bariérou, kterou v tomto případě jsou Andy. Druhy se tedy nemohou dobře šířit pomocí vektorů, anebo jim to trvá delší dobu.

Vektory pro své **šíření** využívají různé členové zooplanktonu, včetně perlooček. Může jím být vítr nebo déšť, ale využívají i vektory zvířecí, zejména vodních ptáků. Efípie se mohou dostat např. na ptačí peří (tzv. epizoochorie), ve kterém jsou přenesena na jiná stanoviště. Další důležitý způsob, jak se mohou perloočky šířit pomocí zoochorie je endozoochorie, kdy se efípie mohou dostat do jiných oblastí trusem ptáků. Tento případ šíření byl pozorován například u druhu *Daphnia magna*, která byla schopna se vylíhnout z trusu kachen (Frisch et al., 2007). Přenos pomocí ptačích vektorů se považuje za vysvětlení v případech, kdy je nalezena genetická podobnost populací z míst, která leží na migračních trasách ptáků (například Adamowicz et al., 2009).

Dalším způsobem, jak se mohou perloočky dostat na nová stanoviště je lidskou činností. Tento příklad invazi byl několikrát v historii pozorován v Austrálii a výjimkou nejsou ani perloočky. Byl zde totiž objeven druh rodu *Chydorus*, který v Austrálii nevykazoval žádné genetické rozdíly v genu COI. Při porovnání se zástupcem druhu *Chydorus sphaericus* z Německa byl objeven rozdíl v genu COI 3 %. Je tedy možné, že se nějaký jedinec z evropské populace mohl dostat do Austrálie, kde se rozšířil. Na takovou vzdálenost je vysoce pravděpodobné, že to bylo s lidským přičiněním (Hebert & Cristescu, 2002, Sharma & Kotov, 2014).

Neopomenutelnou součástí posuzování významu genetických vzdáleností je **evoluční historie** daného taxonu, tedy jeho stáří a oddělení od dalších vývojových linií. Časovou osu nám mohou pomoci odhadnout tzv. molecular clocks, které jsou ale nejpřesnější tam, kde známe nějakou událost, která dané linie od sebe oddělila (fosilní nálezy, oddělení kontinentu, zdvih pohoří atd.) (např. Cristescu & Hebert, 2002; Van Damme & Kotov, 2016). Díky molecular clocks například víme, že skupina Chydoridae se diverzifikovala dříve, než skupina Daphniidae (před 400 miliony lety) (Negrea et al., 1999; Sacherová & Hebert, 2003).

3.4. Využití genetických markerů u jiných skupin kmene Arthropoda

I u jiných skupin kmene Arthropoda se hojně využívá COI jako genetický marker (např. Bennet et al., 2016; Decker, 2016; Knox et al., 2011). U každé skupiny je míra genetických vzdáleností odlišná, nicméně v rámci druhů je poměrně nízká (až na výjimky se pohybuje v rozmezí do 5 %, u vyšších rozdílů se může jednat o kryptické druhy - např. rod sekáčů *Fumontana* nebo některé linie druhu pavouka *Pallenopsis patagonica* (Harder et al., 2016; Raschmanová et al., 2017; Thomas & Hedin, 2008).

Podobně vyrovnané hodnoty rozmezí genetické variability u genu COI můžeme pozorovat i při porovnání rozdílných druhů. U různých druhů pavoukoců se mezidruhové rozdíly pohybují pro gen COI mezi 11-20 % (Dömel et al., 2015; Harder et al., 2016; Weis et al., 2014). Obdobně vyrovnané hodnoty pro gen COI (i když řádově odlišné) můžeme pozorovat mezi druhy chvostoskoků (19,2 – 24 %) nebo stonožek (5,30 - 8,20 %) (Decker, 2016; Raschmanová et al., 2017). V porovnání se zcela odlišnými rozmezími odlišností mezi druhy perlooček (u jedné z nejnižších hodnot 3,5 % u *Daphnia carinata* x *D. nivalis* až po jednu z nejvyšších u *D. curvirostris* x *D. hrabceki*, která dosahuje odlišnosti až 23 %; Burns et al., 2017; Juračka et al., 2010) se zdají být taxonomické vztahy u jiných skupin Arthropoda jasnější. Tyto genetické rozdíly u perlooček ale mohou být způsobeny vysokým výskytem kryptických druhů nebo velmi krátké generační doby (Jeffery et al., 2011; Patwardhan et al., 2014; Xu et al., 2018).

4. POUŽITÍ GENETICKÝCH MARKERŮ U ČELEDI DAPHNIIDAE

Ve své práci se chci zaměřit na genetické vzdálenosti u perlooček. Nejvíce prostudovanou skupinou ze všech perlooček jsou právě Daphniidae. Ačkoli se v této skupině nachází více podrodů, nejlépe prostudovaní jsou zástupci podrodu *Daphnia*, který je monofyletický (Coulbourne & Hebert, 1996). Pomocí genetických markerů byly nalezeny a popsány nové druhy (např. Juračka et al., 2010), řada kryptických druhů ale na své popsání zatím čeká. Rod *Daphnia* se skládá z několika podrodů, z nichž představím ty nejlépe prostudované. U podrodu *Daphnia* se zaměřím i na několik významných druhových komplexů.

4.1 Podrod *Daphnia*

Podrod *Daphnia* je největší skupinou perlooček čeledi Daphniidae, vykazuje největší druhovou diverzitu. Druhy řadíme do celkem šesti komplexů, které se začaly diversifikovat přibližně před 180 miliony lety (Coulbourne & Hebert, 1996). U zástupců se hojně vyskytuje hybridizace, která může být způsobena pomalejším vývojem reprodukční izolace, než je rychlost vývoje u izolace genetické (Schwenk et al., 2000).

4.1.1 Druhový komplex *Daphnia longispina*

Tento druhový komplex je jeden z nejběžnějších v holarktické oblasti. Do tohoto komplexu řadíme druhy *D. longispina*, *D. galeata*, *D. dentifera*, *D. lacustris*, *D. cucullata*, *D. hyalina*, *D. rosea*, *D. thorata* a *D. umbra*. Nejčastěji používanými markery ve fylogenetických studiích byly mitochondriální geny 12S rDNA, 16S rDNA a COI (např. Zuykova et al., 2013b, 2016, Schwenk et al., 2000 a další). Druhy z komplexu *Daphnia longispina* jsou si morfologicky velmi podobné a často mezi nimi dochází k hybridizaci (Petrušek et al., 2008a). Vnitrodruhová hybridizace a introgrese mají velký vliv na změny fenotypu, proto je náročné zařadit jedince ke správnému druhu pomocí morfologie. K vyřešení tohoto problému nám mohou pomoci genetické studie (Dlouhá et al., 2010; Taylor et al. 1998; Xu et al., 2018). U populací ze severní části Palearktidy (asijská část Ruska) vytvořila *Daphnia longispina* společně s druhy *D. galeata*, *D. cucullata*, *D. dentifera* a *D. umbra* monofyletickou skupinu (Zuykova et al., 2013a, 2013b, 2018b).

Daphnia longispina je velmi variabilní druh, u kterého se vyskytuje vysoký vnitrodruhový polymorfismus. Tento vysoký polymorfismus by mohl být způsoben kombinací introgrese a hybridizace mezi blízkými příbuznými druhy, mezi kterými se dostatečně nevyvinula reprodukční izolace. Tyto jevy můžeme pozorovat například u druhu *Daphnia longispina* s druhy *D. galeata* (Coulbourne & Hebert, 1996; Geßler & Engbrecht, 2009; Marková et al., 2017; Nilssen et al., 2007; Schwenk et al. 2000; Zuykova et al., 2013b, 2016;).

Zuykova a kolektiv (2013a, 2016) zkoumali příbuznost populací druhu *D. longispina* v horských jezerech pohoří Altaj a Sajany. Zjistili, že na úrovni genu 16S rDNA se vnitrodruhové rozdíly pohybují kolem 0,6 %. Podobně tomu bylo i na úrovni genu 12S rDNA, kde byly rozdíly poněkud vyšší, a když byly ke zkoumaným populacím přidány sekvence získané z GenBank (Německo, Nizozemí, Česká republika), zvýšily se vnitrodruhové rozdíly na 1,3 %. Autoři z těchto zjištění vyvozují, že rozdíly jsou poměrně velké a zkoumané populace v sobě skrývají i kryptické druhy nebo se jedná o počáteční fázi speciace (Zuykova et al., 2013a, 2016).

Pokud se vrátíme k již zmiňovaným ruským populacím druhu *D. longispina*, a porovnáme jejich genetické vzdálenosti od druhu *D. galeata* ze stejné oblasti, pozorujeme pro gen 16S rDNA rozdíly v rozmezí od 7,8 do 9,9 %. Při zkoumání dalšího genu, konkrétně genu 12S rDNA, byl mezidruhový rozdíl velmi podobný, a to 8,1 % (Zuykova et al., 2013a, 2013b). Při studiu nově rozpoznávaných kryptických linií (I, IV, V, VI) *Daphnia longispina* s jedinci *D. galeata* ze střední a severní části Evropy (Petrušek et al., 2012) byly ale objeveny vyšší hodnoty mezidruhových rozdílů pro gen 12S rDNA - 10,8 až 17,6 %. Ve stejné studii byla zkoumána i odlišnost genu COI, která dosahovala hodnoty 12,4 %. Populace zahrnuté v této studii ovšem pochází z geograficky velmi odlišných oblastí od Španělska, Itálie a Řecka na jihu po Skandinávii a deltu řeky Pečory na severu. V rámci zkoumaných populací v této práci tak byla pozorována bohatá kryptická rozmanitost (zejména v oblasti delty řeky Pečora), která mohla být způsobena absencí ledovce na této lokalitě během většiny poslední doby ledové a mohlo se tak jednat o významné refugium. U těchto populací je ale nutné provést další studie, včetně morfologických, aby bylo možné s jistotou určit, o jaké druhy se jedná (Petrušek et al., 2012).

Podobných hodnot genetických vzdáleností jako při srovnání *D. longispina* a *D. galeata* v genu 12S rDNA vykazovala i analýza mezidruhových rozdílů 12S rDNA u *D. longispina* a *D. umbra*, která byla ve studii různých populací (Evropa a Severní Amerika) 12 % (Schwenk et al., 2000).

Dalším druhem, který spadá do komplexu *D. longispina* a tvoří s druhem *D. longispina* monofyletickou skupinu je druh *Daphnia dentifera*. Jedná se o druh, který v mírných oblastech obývá malé sladkovodní nádrže. Nejnižší mezidruhové vzdálenosti tento druh vykazoval v porovnání se svou sesterskou skupinou, *D. thorata*, které se v genu 12S rDNA lišily o pouhých 0,23 %. Tyto dva sesterské druhy (populace ze Severní Ameriky) se od svých protějšků z Evropy (populace *D. rosea* a *D. hyalina*) lišily o 4,2 % pro gen 12S rDNA a o 8,3 % pro gen COI (Schwenk et al., 2000; Zuykova et al., 2018a).

Rozšířeným druhem z komplexu *Daphnia longispina* je i již zmiňovaný druh *D. galeata*, který tvoří společně s *D. longispina* monofyletickou skupinu. *D. galeata* vykazuje v genu 16S rDNA nízký vnitrodruhový rozdíl (0,4 %). Podobnou genetickou vnitrodruhovou variabilitu vykazoval druh *D. galeata* i na úrovni genu COI, která byla v průměru 0,8 % (Zuykova et al., 2013a, 2013b, 2016). Podobně nízkou vnitrodruhovou variabilitu přineslo srovnání klonů *D. galeata* z různých oblastí Evropy (Španělsko, Itálie, Norsko a Island), která byla v průměru 0,79 % (Schwenk et al., 2000).

Jak jsem již zmínila výše, mezidruhový rozdíl v genu COI byl mezi druhy *D.galeata* a *D. longispina* 12,4 % (Petrusek et al., 2012). Podobné hodnoty vykazovalo i srovnání mezidruhové variability v genu 12S rDNA, která byla u druhů *D. galeata* a *D. cucullata* 10 %. Tuto hodnotu však nepřekročila. Podstatně nižší mezidruhovou variabilitu najdeme mezi druhy *D. galeata* a *D. mendotae*, která u genů 12S rDNA a COI nepřekročila hranici 1 %. Pokud se ale výše zmíněné evropské klony *D. galeata* porovnály s jedinci *D. dentifera* ze Severní Ameriky, vzrostl mezidruhový rozdíl na 1,25 %. V této studii byly mimo jiné zkoumány i jaderné geny ITS-1 a ITS-2, které odhalily mezidruhové odlišnosti u *D. galeata* a *D. cucullata* (0,3 %) a mezi *D. galeata* a *D. umbra* (2,6 %) (Schwenk et al., 2000).

Taxonomické postavení druhu *Daphnia umbra* není dodnes zcela jasné. Morfologicky je velmi podobná *D. longispina*, dříve byla přiřazována k různým druhům (např. k *D. longispina* nebo k *D. dentifera*). Možná se jedná o sesterský druh *Daphnia lacustris* a tvoří spolu větev v komplexu *D. longispina* (Nilssen et al., 2007), jiné analýzy toto seskupení příliš nepodporovaly (Petrusek et al., 2008a). Rozsah vnitrodruhových rozdílů je u *D. umbra* velmi variabilní. Pro gen 16S rDNA nebyly žádné odlišnosti v rámci druhu nalezeny, v dané studii se ale analyzovalo pouze pět sekvencí z relativně malého území (Zuykova et al., 2016). Při porovnání sekvencí 12S rDNA byly mezi populacemi tohoto druhu rozdíly v rozmezí 1,2-3,1 % (Schwenk et al., 2000; Zuykova et al., 2013a, 2018a).

Blízkou příbuznost *D. umbra* a *D. lacustris* potvrdila analýza genu COI, kde byl rozdíl mezi druhy 2,6 % a zároveň byl potvrzen monofyletický vztah *D. umbra* a *D. lacustris*. Sibiřské linie druhu *D. umbra* tvoří oddělené mitochondriální větve od evropských populací, nicméně v jiné studii (Nilssen et al., 2007) byla objevena genetická vzdálenost mezi *D. umbra* a *D. lacustris*, která dosahovala hodnot až 18 % pro gen 12S rDNA. Tyto genetické rozdíly mohou být způsobeny dlouhodobou geografickou izolací (Nilssen et al., 2007; Zuykova et al., 2018a).

Vnitrodruhové vzdálenosti u druhu *Daphnia lacustris* byly pro gen 12S rDNA velmi nízké (0-1,0 %). populace se lišily pouze jednobodovými nebo dvoubodovými mutacemi, přestože srovnávané populace byly z geograficky rozsáhlé oblasti zejména z Norska a Finska s jednou populací z Polska (Nilssen et al., 2007).

Dalším zkoumaným druhem je *Daphnia hyalina*. Vnitrodruhové rozdíly genu 12S rDNA mezi evropskými a africkými populacemi *D. hyalina* byly 0,7 %. Blízce příbuzným druhem *D. hyalina* je *D. rosea*, mezi nimiž jsou pozorovány morfologické odlišnosti. Nicméně rozdíly na úrovni genu 12S rDNA a COI mezi těmito druhy nepřekročily 1 %. Je tedy možné, že se morfologické znaky mění v závislosti na lokálních přírodních podmínkách a ve skutečnosti se může jednat o jeden druh, který je morfologicky velmi plastický (Geißler et al. 1999; Petrusek et al., 2008a; Schwenk et al., 2000).

V některých studiích jsou porovnávány i rozdíly mezi druhy z různých druhových komplexů. Takovým příkladem je například *D. longispina* s *D. pulex*. Vysoké hodnoty mezidruhových genetických

vzdáleností na úrovni genu 16S rDNA byly nalezeny mezi sibiřskými populacemi *D. longispina* a *D. pulex*, konkrétně 19 %. Mnohem vyšší hodnoty byly popsány mezi severoamerickými populacemi *D. longispina* a *D. pulex* na úrovni genu 12S rDNA, které byly v rozsahu 26,8-29 %. Kromě toho, že *D. pulex* patří do jiného druhového komplexu, jednalo se také o geograficky vzdálené populace (Colbourne & Hebert, 1996; Zuykova et al., 2013a).

Zcela nejvyšších hodnot při porovnání mezidruhových genetických vzdáleností dosáhla analýza genu 12S rDNA mezi *D. longispina* a podrodu *Ctenodaphnia*, která dosahovala hodnot 30,8 %, což ale potvrzuje příslušnost *D. longispina* k podrodu *Daphnia* (Colbourne & Hebert, 1996).

Dá se tedy říci, že pokud jsou druhy komplexu *D. longispina* geograficky blízké, rozdíly jsou v rámci druhu i mezi druhy nízké. Se zvyšující se geografickou vzdáleností se genetické rozdíly v genech také zvyšují. Vnitrodruhové rozdíly jsou mezi druhy komplexu *D. longispina* v rozmezí 0-3,1 % u mitochondriálních genů. Toto rozmezí je i v souladu s návrhem N. W. Jefferyho a kol. (2011), že zástupci jednoho druhu nevykazují více než 3 % genetické vzdálenosti. Mezidruhové rozdíly byly více variabilní, hodnoty se velmi často pohybovaly pro mitochondriální geny okolo 10 % (např. Zuykova et al., 2013a, 2013b), ovšem byly nalezeny i výrazně větší odchylky (až do 29 %) (např. Colbourne & Hebert, 1996; Petrussek et al., 2012; Zuykova et al., 2013b). Velmi nízké rozdíly byly objeveny při porovnání druhů *D. dentifera* x *D. thorata* a *D. galeata* x *D. mendrotae*, které nepřekročily 1,25 % v genu 12S rDNA (Schwenk et al., 2000). Tyto skupiny by jistě bylo dobré znovu zanalyzovat a zjistit genetické vzdálenosti i pro ostatní geny. Pro jaderné genetické markery ITS-1 a ITS-2 byly rozdíly mezi druhy v rozmezí 0,3-2,6 % (Schwenk et al., 2000). Pro jaderné markery to ale není příliš nízká odlišnost, jelikož se jaderný genom vyvíjí pomaleji než mitochondriální (Hillis & Dixon, 1991). Zvláštní pozornost by se v budoucnosti mohla věnovat druhu *Daphnia umbra*, která vykazovala vysokou vnitrodruhovou variabilitu v genu 12S rDNA až 3 % (Zuykova et al., 2018a), ale od *D. lacustris* ji dělil rozdíl v genu 12S rDNA pouze 0,5 % a v genu COI jen 0,9 % (Zuykova et al., 2018a). V jiné studii byly ale genetické vzdálenosti mnohem vyšší (až 18 % v genu 12S rDNA; Nilssen et al., 2007). Je tedy opravdu možné, že se jedná o sesterské taxony (Nilssen et al., 2007), v případě nízkých odlišností se může jednat o hybridizaci nebo o kryptické druhy nebo mohlo dojít k záměně druhů.

4.1.2 Druhový komplex *Daphnia pulex*

Jedná se o jeden z nejvíce různorodých druhových komplexů, nachází se zde druhy jak s cyklickou, tak obligátní partenogenezí (Crease et al., 1990; Hebert, 1981). Do této skupiny řadíme *D. pulex*, *D. pulicaria*, *D. tenebrosa*, *D. melanica*, *D. middendorffiana* a další. Komplex se dělí do tří hlavních větví: - *D. pulex*, *D. pulicaria* a *D. tenebrosa* (Colbourne et al., 1998). Ve vývoji komplexu hrály velkou roli hybridizace a introgrese (Vergilino et al., 2011). Nejvíce zkoumaným markerem byly mitochondriální geny COI, 12S rDNA a 16S rDNA, z jaderných genů 18S rDNA.

Mezi lokálními populacemi *Daphnia pulex* byla zaznamenána nízká diverzita, která se pro gen 16S rDNA u populací v Číně pohybovala v rozmezí 0-1 % (Wang et al., 2016), u jiné populace (jezero Čany v Rusku) byla vnitrodruhová divergence až 3 % (Zuykova et al., 2013b). Pokud se regionální populace z Číny analyzovaly s geograficky vzdálenými oblastmi (Kanada, Rusko), hodnoty pro gen 16S rDNA vystoupaly z rozmezí 0-1 % až na hodnotu 9,8 % (Wang et al., 2016). Zcela jiným příkladem byla studie z Mongolska, kde se u druhu *D. pulex* ze jednoho jezera jedinci lišili v genu 16S rDNA až o 8,6 % (Zuykova et al., 2016). Takto vysoké hodnoty mohou být známkou přítomnosti komplexu druhů nebo kryptických druhů (Zuykova et al., 2013a)

I v rámci genu 12S rDNA byly u *D. pulex* objeveny vysoké vnitrodruhové rozdíly, které se pohybovaly okolo 8 %. Vysoké mezidruhové rozdíly pro genu 12S rDNA byly objeveny mezi *D. pulex*, *D. longispina* a *D. curvirostris*, které se od *D. pulex* lišily až o 29 %, respektive o 26,9 % (Colbourne & Hebert, 1996; Zuykova et al., 2016).

Pro gen COI byly objeveny lokálně nízké rozdíly mezi čínskými populacemi (0-1,5 %), ale jako v případě genu 16S rDNA se při srovnání s geograficky vzdálenými populacemi (Kanada) stejného druhu tyto hodnoty zvýšily až na 10,5 % (Wang et al., 2016).

Jaderný gen 18S rDNA také vykazoval nízkou vnitrodruhovou diverzitu v rámci jedné lokality (0-2 %). Na rozdíl od genů 16S rDNA a COI, - se rozdíly na úrovni genu 18S rDNA -, při srovnání se vzdálenými populacemi z Kanady nezvýšila. Naopak, rozdíly se mezi geograficky vzdálenými populacemi pohybovaly v rozmezí 0,45-0,64 % (Wang et al., 2016).

Druhová bariéra mezi druhy *Daphnia pulex* a *D. pulicaria*, je velmi nízká. Jsou si navzájem morfologicky velmi podobné, situaci navíc komplikuje častá hybridizace mezi těmito příbuznými druhy (Crease et al., 2012). I když se dříve uvažovalo o možnosti, že se jedná o sesterské taxony, tento názor byl vyvrácen. Tyto dva druhy se zřejmě oddělily před 82 tisíci lety (Omilian & Lynch, 2009). Hybridí *D. pulex* a *D. pulicaria* se v přírodě rozmnožují obligátní partenogenezí, avšak bylo pozorováno i potomstvo vyprodukované pohlavním rozmnožováním, ale jen v laboratorních podmínkách (Heier & Dudycha, 2009). Tyto druhy se také liší svojí ekologií - *D. pulex* se obvykle vyskytuje v efemerních vodách bez přítomnosti ryb, zatímco *D. pulicaria* obývá především jezera (Omilian & Lynch, 2009).

O tomto druhovém komplexu je celkově méně dostupných informací, vnitrodruhové rozdíly se opět pohybovaly v rozmezí 0-3 % (Wang et al., 2016; Zuykova et al., 2013b), v některých případech tuto hranici rozdíly překročily (např. Zuykova et al., 2016). Opět můžeme pozorovat tendenci, kdy se geograficky vzdálené populace (z jiných kontinentů) odlišují více (např. Wang et al., 2016). Nejvyšší mezidruhová variabilita byla pozorována u *D. pulex* s *D. longispina* (až 29 % pro gen 12S rDNA), což ale může potvrzovat příslušnost těchto druhů k jiným druhovým komplexům (Colbourne & Hebert et al., 1996). Co se týká jaderného genu 18S rDNA, navrhuji další genetické analýzy, jelikož se v jednom

případě až 2% odchylky u geograficky blízkých populací při srovnání s populacemi z jiného kontinentu snížily pod 1 % (Wang et al., 2016).

4.1.3 Druhový komplex *Daphnia obtusa*

Daphnia obtusa se dnes vyskytuje na všech kontinentech kromě Antarktidy, před více než dvaceti lety byla pravděpodobně zavlečena do Austrálie (Benzie & Hodges, 1996). Podle Adamowiczové a kol. (2009) se komplex skládá z dvanácti druhů, které tvoří na jednotlivých kontinentech monofyletické skupiny, pro Severní Ameriku jsou to například druhy: *Daphnia obtusa*, *D. pileata*, *D. prolata*, *D. izpovdala*, *D. neoobtusa* a *D. cheraphila* (Adamowicz et al., 2009). Při analýze genetických vzdáleností byl nejvíce používán gen COI.

Na úrovni tohoto genu byl mezi populacemi z Argentiny u druhu *Daphnia obtusa* poměrně velký rozdíl, hodnoty dosahovaly 4,3 % (Adamowicz et al., 2004). Podobný rozdíl byl mezi dvěma geograficky oddělenými populacemi *D. neo-obtusa* ze severoamerických států Oregon a Kalifornie, který dosahoval hodnoty 5,2 %. Autoři z tohoto rozdílu vyvozují, že se jedná o geograficky dobře oddělené fylogenetické linie (Penton et al., 2004).

Dalšími druhy, pro které jsem v literatuře našla údaje, jsou *Daphnia izpovdala* a *D. pileata*. Vnitrodruhové rozdíly u prvního druhu byly na úrovni genu COI v rozmezí 0,4-0,7 %. Při porovnání sekvencí COI mezi *D. izpovdala* a jeho nejbližší příbuzného druhu *D. pileata* byly zaznamenány vysoké genetické vzdálenosti - 17,9 %. Jedná se tedy o dobře oddělené druhy (Kotov & Taylor, 2010).

Tento druhový komplex zřejmě na svou revizi čeká. I když se u *D. izpovdala* vnitrodruhové rozdíly pro gen COI pohybovaly v rozmezí 0,4-0,7 % (Kotov & Taylor, 2010), vnitrodruhové rozdíly u *D. obtusa* a *D. neo-obtusa* dosahovaly hodnoty až 5,2 % (Adamowicz et al., 2004; Penton et al., 2004). Může se tedy jednat o hybridizaci nebo o kryptické druhy, jelikož zkoumané populace nerozdělovala velká geografická vzdálenost (střed až jih Argentiny). Je ale možné, že pohoří Andy tyto populace dobře geograficky odděluje po dlouhou dobu.

4.1.4 Druhový komplex *Daphnia laevis*

Do tohoto amerického komplexu druhů řadíme nejméně pět morfologicky kryptických druhů - *D. laevis laevis*, *D. laevis gessneri*, *D. magniceps*, *D. magniceps pacifica* a *D. dubia*. Mezidruhový rozdíl na úrovni genu 16S rDNA se v tomto komplexu pohybuje v rozmezí 5-8 %. Vzhledem k jejich relativně nízké odlišnosti mezi geograficky vzdálenými populacemi (západ až východ Severní Ameriky) je velmi pravděpodobné, že se jedinci mohou velmi rychle rozptýlit z jedné zdrojové lokality (Taylor, 1998). Mezidruhové vzdálenosti genu 12S rDNA byly mezi *D. laevis* a *D. curvirostris* (podrod *Hyalodaphnia*) 22 % (Schwenk et al., 2000). Bohužel pro podrobnější shrnutí tohoto komplexu chybí dostatek dostupné literatury.

4.2 Podrod *Hyalodaphnia*

U podrodu *Hyalodaphnia* není dodnes zcela jasné, jestli se jedná o parařyletický nebo monofyletický taxon. Zatímco Colbourne & Hebert (1996) navrhuří, ře se jedná řávě o taxon parařyletický, naopak Schwenk et al. (2000) dospěl s kolegy k řávěru, ře je tento taxon monofyletický a je sesterský k podrodu *Daphnia*. Zástupci tohoto podrodu preferuří stanoviřtř trvalých sladkých vod, ve slaných, zakalených a v efemerních vodách se řéměř nevyskytuří. Větřina druhů je omezena na jeden kontinent. K rozdělení podrodů *Daphnia* a *Hyalodaphnia* dořlo řřibližně řřed 100 miliony lety a nejstarří liniř podrodu *Hyalodaphnia* je *Daphnia curvirostris*, která se diverzifikovala řřed více neř 64 miliony lety. Mnoho druhů podrodu *Hyalodaphnia* spolu v řřirodě hybridizuje (Coulbourne & Hebert, 1996; Schwenk et al., 2000). Jelikoř nejsou známa data ze všech druhových komplexů (napřříklad komplex *D. longiremis*), zaměřřím se pouze na komplex *Daphnia curvirostris*.

4.2.1 Druhový komplex *Daphnia curvirostris*

Nový druh *Daphnia hrbackei sp. nov.*, nalezená v roce 2010 ve střední Evropě, vykazuje nejbliřřší řřřibuznost s *Daphnia curvirostris*. Rozdřly v genu 12S rDNA byly 13 %, u COI 23 % a 41 % u genu ND2. Přesto pravděpodobně tvořř sesterské taxony. Od jiných druhů z komplexu se liřřil dokonce o 46,8 % pro gen ND2. Ve srovnání s *D. obtusa*, která se nacháři na podobných stanoviřtřích, byla divergence genu ND2 dokonce větřř než 62 %. (Juračka et al., 2010).

Ačkoli je podrod *Hyalodaphnia* na druhy relativně bohatý, v literatuře chybř dostatek studiř zaměřřujřících se na genetické vzdálenosti u jednotlivých druhů. Situaci navíc ztěřuje fakt, ře se studie nedokáři shodnout na řylogenetických vztazřích mezi ostatními podrody (viz. Colbourne & Hebert, 1996; Schwenk et al., 2000). A podobnou situaci lze vidět i u druhů podrodu *Hyalodaphnia* (napřř. patřř *Daphnia thorata* do podrodu *Daphnia* nebo do podrodu *Hyalodaphnia*?). Proto by si skupina *Hyalodaphnia* jistě zaslouřřila revizi genetických, ale i morfologických vlastností a vztahů.

4.3 Podrod *Ctenodaphnia*

Jedná se o podrod, který je velmi pravděpodobně odvozen od ostatních dvou podrodů-*Daphnia* a *Hyalodaphnia* a má nejniřřřř taxonomickou diverzitu (Coulbourne & Hebert, 1996). Do tohoto podrodu řřadřme mimo jiné významný modelový druh *Daphnia magna*. Mezi dalřř zástupce patřř *D. carinata*, *D. similis*, *D. similoides*, *D. tibetana*, *D. nivalis*, *D. cephalata*, *D. efemeralis*, *D. gibba*, *D. ornithocephalata*, *D. spinulata*, *D. sinensis* a dalřř. Nejčastěji studovanými markery byly COI a 12S rDNA. Nejvyšřř rozdřl mezi sekvencemi u genu 12S rDNA se mezi podrody *Ctenodaphnia* a *Daphnia* pohyboval v rozmeřř 18,8-22 % (Colbourne & Hebert, 1996).

Například u druhů *Daphnia similoides* nebo *D. ornithocephala* byly pro gen COI nalezeny velmi nízké vnitrodruhové rozdíly. Pro populace druhu *D. similoides* z Číny byly tyto variace v rámci druhu pro gen COI v rozmezí 0,2-0,9 % (Ma et al., 2016), u druhu *D. ornithocephala* byla hodnota velmi podobná - 0,3 % (Adamowicz et al., 2004). Zatímco u těchto druhů pozorujeme malé odchylky, v rámci druhu *D. spinulata* byl rozdíl pro gen COI vyšší, konkrétně 3,9 % (Adamowicz et al., 2004).

4.3.1 Druhový komplex *Daphnia carinata*

Druhový komplex *D. carinata* je velmi morfologicky variabilní. Jeho taxonomické zařazení bylo v minulosti nejasné, někteří autoři se domnívali, že se jedná o poddruhy jiných skupin. Nejvíce byl studován gen COI. Do komplexu řadíme druhy, jako jsou *D. carinata*, *D. thomsoni*, *D. projecta*, *D. tewaipounamu* a další.

Vnitrodruhová variabilita lokálních populací *D. carinata* se pro gen COI pohybovala okolo 1,7 % s maximální hodnotou 3 %, nicméně, tyto populace se vzorky geograficky vzdálených populací z GenBank lišily až o 15,7 % (Burns et al., 2017). Jiná analýza prokázala vnitrodruhové rozdíly 7 %. Při takto vysokých hodnotách vnitrodruhové genetické vzdálenosti se mohou ve vzorcích vyskytovat kryptické druhy (Sharma et al., 2014).

Mezidruhové rozdíly mezi *D. carinata* a *D. tewaipounamu sp. nov.* byly pro gen COI větší než 15 %. Nejnížší mezidruhové vzdálenosti *D. carinata* pro gen COI byly zaznamenány s druhy *D. nivalis* a *D. thomsoni* (3,5 %, respektive 4,9 %). Podstatně větší genetické vzdálenosti mezi druhy *D. tewaipounamu sp. nov.*, *D. cephalata* a *D. projecta*, se pohybovaly pro gen COI v rozmezí 15,4-16 %. (Burns et al., 2017).

I když je dostupné literatury pro tento komplex druhů málo, můžeme alespoň u druhu *D. carinata*, pozorovat zvyšující se genetické rozdíly se zvětšující se geografickou vzdáleností. Vysoké rozdíly v genu COI dosahujících 7 % můžeme vysvětlit kryptickými druhy (Sharma et al., 2014). Tento druhový komplex si jistě zaslouží revizi, abychom o něm získali více informací, zejména v oblasti fylogenetických vztahů určených pomocí genetických markerů.

Tab. 1. Genetické rozdíly v rámci čeledi Daphniidae pro geny COI, 12S, 16S a ITS rDNA. Data jsou rozdělena podle taxonomické jednotky a vzdálenosti studovaných populací. Zdroje: 1. Adamowicz et al., 2004, 2. Burns et al., 2017, 3. Colbourne & Hebert, 1996, 4. Juračka et al., 2010, 5. Kotov & Taylor, 2010, 6. Ma et al. 2016, 7. Nilssen et al., 2007, 8. Penton et al., 2004, 9. Petrusek et al., 2012, 10. Sharma et al., 2014, 11. Schwenk et al., 2000, 12. Wang et al., 2016, 13. Zuykova et al., 2013a, 14. Zuykova et al., 2013b, 15. Zuykova et al., 2016

uvnitř taxonomické jednotky/ geografická vzdálenost	druh	gen	hodnota (v %)	zdroj	uvnitř taxonomické jednotky/ geografická vzdálenost	druh	gen	hodnota (v %)	zdroj	uvnitř taxonomické jednotky/ geografická vzdálenost	druh	gen	hodnota (v %)	zdroj			
malá (do 500 km)	<i>D. longispina</i>	16S	0,6	15	střední (v rámci kontinentů) ~1000 km	<i>D. obtusa</i>	COI	0-25,4	1,8	velká (mezi kontinenty) >1000 km	<i>D. longispina</i>	12S	1,3	13			
	<i>D. galeata</i>	16S	0,4	15		<i>D. lacustris</i>	12S	0-1	7		<i>D. pulex</i>	16S	0-9,8	12			
	<i>D. galeata</i>	COI	0,8	13		<i>D. ambigua</i>	COI	0,9	1		<i>D. pulex</i>	COI	10,5	12			
	<i>D. pulex</i>	16S	0-8,3	15		<i>D. cf. carinata</i>	COI	<2,9	2		<i>D. umbra</i>	12S	1,1-1,6	11,13			
	<i>D. pulex</i>	COI	0-11,3	5,12							<i>D. obtusa</i>	COI	2,3	1			
	<i>D. pulex</i>	12S	4,2	14							<i>D. carinata</i>	COI	6	10			
	<i>D. pulex</i>	18S	0-2	12							<i>D. ambigua</i>	12S	0,9	11			
	<i>D. umbra</i>	16S	0	15							<i>D. parvula</i>	12S	0,2	11			
	<i>D. pulicaria</i>	COI	0,3	1							<i>D. hyalina</i>	12S	0,7	11			
	<i>D. obtusa (2)</i>	COI	1,3	1							<i>D. lumholtzi</i>	COI	9-15	10			
	<i>D. izpovdala sp.</i>	COI	0,4	5													
	<i>D. similides sinensis</i>	COI	0,2-0,9	6													
	<i>D. cornuta</i>	COI	0-1	10													
	<i>D. thomsoni</i>	COI	1,7	2													
druhový komplex		gen	hodnota (v %)	zdroj	druhový komplex		gen	hodnota (v %)	zdroj	druhový komplex		gen	hodnota (v %)	zdroj			
malá (do 500 km)	<i>D. longispina x D. galeata</i>	16S	7,8-9,9	13,14,15	střední (v rámci kontinentů) ~1000 km	<i>D. longispina x D. galeata</i>	COI	12,4	9	velká (mezi kontinenty) >1000 km	<i>D. longispina x D. umbra</i>	12S	12	11			
	<i>D. longispina x D. galeata</i>	12S	8,1	14		<i>D. longispina x D. galeata</i>	12S	10,8-17,6	9		<i>D. galeata x D. umbra</i>	ITS	2,6	11			
	<i>D. curvirostris x D. hrbackei</i>	COI	23	4		<i>D. galeata x D. cucullata</i>	12S	9,8	11		<i>D. obtusa x D. pileata</i>	COI	17,9	5			
	<i>D. curvirostris x D. hrbackei</i>	12S	13	4		<i>D. galeata x D. cucullata</i>	ITS	0,3	11		<i>D. cf. carinata x D. nivalis</i>	COI	3,5	2			
											<i>D. tewaipounamu x D. carinata</i>	COI	15,4	2			
											<i>D. tewaipounamu x D. proiecta</i>	COI	3,5	2			
											<i>D. dentifera+D. thorata x D. rosea+D. hyalina</i>	COI	8,3	11			
rod		gen	hodnota (v %)	zdroj	rod		gen	hodnota (v %)	zdroj	rod		gen	hodnota (v %)	zdroj			
malá (do 500 km)	<i>D. longispina x D. pulex</i>	16S	19	14	střední (v rámci kontinentů) ~1000 km	<i>D. longispina x D. pulex</i>	12S	26,8-29	3,14	velká (mezi kontinenty) >1000 km	<i>D. galeata x D. cristata</i>	12S	18,4	13			
	<i>D. obtusa x D. hrbackei</i>	ND2	63	4		<i>D. longispina x D. magna</i>	12S	25,9	14								
						<i>D. pulex x D. galeata</i>	12S	24,9	14								
						<i>D. galeata x D. magna</i>	12S	25,8	14								
						<i>D. pulex x D. magna</i>	12S	24,7	14								
						<i>D. obtusa x D. ambigua</i>	COI	21,2-22,7	1								
						<i>D. obtusa x D. pulicaria</i>	COI	20,3-23,8	1								
						<i>D. pulicaria x D. ambigua</i>	COI	25,3	1								
						<i>D. curvirostris x D. cristata</i>	16S	13,6	13								
						<i>D. curvirostris x D. cristata</i>	12S	19,9	13								
čeleď		gen	hodnota (v %)	zdroj	čeleď		gen	hodnota (v %)	zdroj	čeleď		gen	hodnota (v %)	zdroj			
malá (do 500 km)	<i>D. longispina x Ctenodaphnia</i>	12S	30,8	3	střední (v rámci kontinentů) ~1000 km	<i>D. curvirostris x D. longispina</i>	12S	18,1	14	velká (mezi kontinenty)							
						<i>D. curvirostris x D. galeata</i>	12S	18,9	14								
						<i>D. curvirostris x D. pulex</i>	12S	26,9	14								
						<i>D. curvirostris x D. magna</i>	12S	24,9	14								
						<i>D. curvirostris x D. laevis</i>	12S	22	11								

5. POUŽITÍ GENETICKÝCH MARKERŮ U ČELEDI CHYDORIDAE

Čeď Chydoridae zahrnuje celkem čtyři skupiny, dříve identifikované jako podčeďi Chydorinae, Aloninae, Eurycercinae a Saycinae. Zástupci podčeďi Eurycercinae a Saycinae se ale od prvních dvou významně liší nejen morfologicky, ale i na úrovni genetických markerů, a proto je v současné době považujeme za čeďi. Čeď Chydoridae tak nyní zahrnuje dvě podčeďi: Chydorinae a Aloninae. I přes své druhové bohatství je čeď Chydoridae v oblasti genetických vztahů velmi málo prostudována. Řada druhů vykazuje kryptickou diverzitu (Jeffery et al., 2011). Do této skupiny řadíme rody *Chydorus*, *Pseudochydorus*, *Alona*, *Pleuroxus*, *Acroperus*, *Disparalona*, *Parvalona* a další. Pro analýzy rozpoznávání druhů byl nejvíce využíván gen COI. Autoři se u čeďi Chydoridae zaměřují zejména na morfologické analýzy a genetické studie jsou ve výrazné menšině. Proto v následujících kapitolách představím nejlépe prostudované rody čeďi Chydoridae, případně dobře známé druhové komplexy.

5.1 Rod *Chydorus*

5.1.1 Druhový komplex *Chydorus sphaericus*

U tohoto druhového komplexu byla nalezena vysoká morfologická i genetická rozmanitost. Podle fylogenetické analýzy genu COI se může jednat o monofyletický komplex, nicméně do této analýzy nebyly zahrnuty všechny druhy z komplexu, navíc pro přesvědčivější výsledky by bylo zapotřebí zanalyzovat i některý z jaderných genů. Tento druhový komplex se vyskytuje zejména v holarktické oblasti, pravděpodobně se diverzifikoval v terciéru, nejmladší linie se mohly diverzifikovat před 2 miliony lety (Belyaeva & Taylor, 2008). Do tohoto druhového komplexu lze spolehlivě zařadit druhy *C. sphaericus* s. str. (palearktický), *Chydorus biovatus* (severní část nearktické oblasti), a *Chydorus brevilabris* (jižní část nearktické oblasti). Dalšími několika druhy má nejasné taxonomické postavení a řada z nich je považována za synonyma jiných (Frey, 1980, 1985).

Genetické rozdíly mezi různými holarktickými populacemi (Severní Amerika, Evropa, Sibiř) *Chydorus sphaericus* byly v genu COI v rozmezí 0-22,8 %. Podobné výsledky přinesla i analýza genu ITS-2, u kterého se maximální rozdíl mezi liniemi vyšplhal až na 26,2 % (Belyaeva & Taylor, 2008). Vnitrodruhové rozdíly v genu COI byly druhu *C. brevilabris* nižší, než u *C. sphaericus* (2,9 %). (Belyaeva & Taylor, 2008).

Genetické rozdíly genu COI mezi australskými populacemi *Chydorus sp.* byly nulové, zatímco mezidruhová variabilita s *Chydorus sphaericus* byla 3 % (Sharma & Kotov, 2014). Vysoká mezidruhová

genetická vzdálenost byla objevena mezi druhy *Chydorus sphaericus* a *Chydorus brevilabris*, která u genu COI překročila hodnotu 17 % (17,6 %). Zde se ale jedná o jednoznačně oddělené druhy odlišitelné morfologicky a obývající různé kontinenty – jejich oddělení je tedy dáno oddělením Evropy od Severní Ameriky (Elías-Gutiérrez et al., 2008).

Vysoké rozdíly v genu COI u holarktických populací *C. sphaericus* (až 22,8 %; Belyaeva & Taylor, 2008) můžeme vysvětlit velkou geografickou vzdáleností, jelikož se jednalo o populace z oblasti západu Severní Ameriky, přes Grónsko, Německo, Skandinávii až po západní oblast Sibiře (Belyaeva & Taylor, 2008). Pokud porovnáme takhle vysoké rozdíly v rámci jednoho druhu (až 22,8 % v genu COI) s nízkými odchylkami mezi druhy *Chydorus sp.* a *C. sphaericus* (3 % v genu COI; Sharma & Kotov, 2014), vidíme velký nepoměr. V obou případech se jedná o velkou geografickou vzdálenost (v rámci druhu *C. sphaericus* ze západu Severní Ameriky až po Sibiř, mezi druhy *Chydorus sp.* z Austrálie a *C. sphaericus* z Německa), nicméně takto nízkou mezidruhovou variabilitu lze snad vysvětlit zejména zapojením lidských činností.

5.2 Rod *Pleuroxus*

Druhy v rámci tohoto rodu jsou geneticky velmi variabilní, podle některých názorů se ve skutečnosti v rodě *Pleuroxus* vyskytuje více rodů, a proto by se měl rod rozdělit. Tato hypotéza byla potvrzena i porovnáním genetických rozdílů v genu COI, která byla mezi druhy *P. varidentatus* a *P. denticulatus* vyšší než 20 % (Elías-Gutiérrez et al., 2008; Sacherová & Hebert, 2003; Smirnov, 1996). Ovšem ne všechny studie s tímto názorem souhlasily. Chiambeng & Dumont (2004) nepodpořili návrh, aby se podrod *Pirincipleuroxus* stal rodem v čeledi Chydoridae (Chiambeng & Dumont, 2004).

5.3 Rod *Alona*

Jedná se o jednu z největších skupin Chydoridae, která je pravděpodobně parafyletická (Elías-Gutiérrez et al., 2008; Kattel & Augustinus, 2010; Sacherová & Hebert, 2003; Silva et al., 2014). Vztahy v rámci tohoto rodu jsou velmi zmatené, často dochází k zaměňování druhů. (Silva et al., 2014). Například druh *Alona iheringula* byl dříve chybně zařazován ke komplexu *Alona rustica*. Dnes víme, že patří do komplexu *Alona costata*. *A. iheringula* se v genu COI odlišovala až o 23,1 % oproti jiným druhům rodu *Alona* (Silva et al., 2014). Rodu *Alona* se autoři věnují zejména po stránce morfologické (např. Alonso & Sinev, 2017, Van Damme et al., 2010), ale jistě by si zasloužila větší pozornost i na úrovni genetické.

5.4 Rod *Leberis*

Rozdíly v genu COI mezi druhy *Leberis davidi* a *L. chihuahuensis* sp. nov. byla minimálně 14,3 %, odlišnost mezi *L. davidi* a *Alona glabra* byla mezi 19,3-20,8 %. Díky tomu můžeme říct, že se zcela jistě jedná o různé druhy. Tyto molekulární rozdíly podpořily i morfologické analýzy. Genetické rozdíly mezi populacemi *L. davidi* vzdálených méně než 300 kilometrů nebyly zřejmé (Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno, 2008).

5.5 Rod *Oxyurella*

Vnitrodruhové rozdíly u druhu *Oxyurella longicaudis* byly pro gen COI u regionálních populací 0-0,2 %, zatímco mezi geograficky vzdálenými populacemi v rozmezí 7-7,2 %. Zkoumané populace byly z oblastí Střední a Jižní Ameriky (Castilho et al., 2015). U tohoto druhu tedy pozorujeme, že čím větší geografická vzdálenost, tím větší vzdálenost genetická. Mezidruhové rozdíly pro gen COI byly mezi *O. longicaudis* a ostatními druhy čeledi Chydoridae (*Alona setulosa*, *Alona* sp., *Oxyurella* sp. a *Karualona penuelasi*) v rozmezí od 16,8 do 20,1 % (Castilho et al., 2015).

Tab. 2. Genetické rozdíly v rámci čeledi Chydoridae pro gen COI rDNA. Data jsou rozdělena podle taxonomické jednotky a vzdálenosti studovaných populací. Zdroje: 1. Belyaeva & Taylor, 2008, 2. Castilho et al., 2015, 3. Elías-Gutiérrez et al., 2008, 4. Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno, 2008, 5. Silva et al., 2014

uvnitř taxonomické jednotky/geografická vzdálenost	druh	mezi populacemi	druhový komplex	rod	čeleď
malá (do 500 km)		Leberis davidi, COI, do 300km nejsou zřejmé ⁴	P. varidentatus x P. denticulatus, COI, 20 % ³ Leberis davidi x L. chihuahuensis, COI, 14,3 % ⁴		
střední (v rámci kontinentů,-1000 km)					L. davidi a Alona glabra, COI, 19,3-20,8 % ⁵
velká (více než 1000 km)	Chydorus sphaericus A1,COI,4,1 % ¹ C. brevilabris C7,COI, 2,9 % ¹ Oxyurella longicaudis, COI, 7-7,2 % ²		Chydorus sphaericus x C. brevilabris, COI, 17,6 % ³	Alona iheringulax A. dentifera, COI, 18, 5% ⁵ A. iheringula x A. glabra, COI, 21,1 % ⁵	A. iheringula x Leberis davidi, COI, 20 % ⁵ A. iheringula x L. chihuahuensis, COI, 22,3 % ⁵ O. longicaudis x Kauralona penuelasi, COI, 18,8 % ² O. longicaudis x A. setulosa, COI, 20,1 % ²

6. Je určení genetické hranice (ne)možné?

Z dostupných zdrojů je těžké určit nějaká pravidla, jak bychom mohli rozeznávat druhy pouze pomocí genetických markerů. Tyto zákonitosti jistě existují, ale vzhledem k malému počtu genetických studií pro mnou zkoumané skupiny perlooček (zejména u čeledi Chydoridae) není možné v tuto chvíli daná pravidla přesně stanovit. Někteří autoři (např. Jeffery et al., 2011) zastávají názor, že pokud se u druhu vyskytuje genetická vzdálenost vyšší než 3 % (pro COI), jedná se již o jiný druh. Tato hranice ale u perlooček neplatí vždy. I když jsou genetické rozdíly v rámci druhů velmi často okolo 3% hranice, existuje zde více výjimek. Například obrovská vnitrodruhová variabilita v genu COI pozorovaná u druhu *Chydorus sphaericus*, která dosahovala hodnot až 22,8 %. Vzorky byly sbírány napříč celou holarktickou oblastí (Belyaeva & Taylor, 2008). Takto vysoké rozdíly lze přisoudit velké geografické vzdálenosti nebo se může jednat o kryptické druhy.

V práci jsem také shrnula literární údaje o genetických vzdálenostech do tabulek, které mi měly pomoci dané údaje zobecnit (Tabulka 1 a Tabulka 2). Ze shromážděných údajů je ale vidět, že ačkoli existují určité trendy a genetické vzdálenosti se se vzrůstající vzdáleností geografickou i taxonomickou zvětšují, je vždy nutné současně vyhodnotit i faktory, které je ovlivňují, tedy izolaci, disperzi a historii taxonu. Mezidruhové rozdíly jsou u všech druhů velmi variabilní. Můžeme se setkat s velmi nízkými odlišnostmi (<1 %; např. Schwenk et al., 2000), v takových případech je to většinou v rámci jednoho druhového komplexu (např. *D. galeata* x *D. mendotae*). Výjimku tvoří například *D. longispina* a *D. galeata*, u kterých byla pozorována vysoká variabilita v genu 12S rDNA - 8,1 % a v genu 16S rDNA až 9,9 % (Zuykova et al., 2013a, 2013b). Může se také jednat o možnou záměnu druhů, kdy jsou druhy chybně rozpoznány a ve skutečnosti se jedná o jeden druh, který je morfologicky plastický (např. *D. hyalina* x *D. rosea*) (Petrusek et al., 2008a). U členů jiných druhových komplexů jsou mezidruhové rozdíly většinou výrazně vyšší (např. *D. longispina* x *D. pulex*, pro 16S rDNA 19 %, pro gen 12S rDNA až 29 %; Colbourne & Hebert, 1996; Zuykova et al., 2013a). Vysoké rozdíly pozorujeme samozřejmě i při porovnání druhů z jiných rodů, což je vidět zejména u čeledi Chydoridae (např. rody *Oxyurella* x *Alona*-16,8-20,1 % pro COI nebo *Leberis* x *Alona* - 19,3-20,8 % pro COI; Castilho et al., 2015, Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno, 2008).

7. Závěr

V této bakalářské práci jsem se zaměřila na genetickou variabilitu perlooček, konkrétně u čeledí Daphniidae a Chydoridae, a pokusila se zjistit, jestli je možné pomocí genetických markerů určit hranice druhů a jaké hranice případně pro vybrané genetické markery u daných skupin platí.

Nejvíce využívaným markerem u perlooček je mitochondriální gen cytochrom c oxidáza a její podjednotka I (COI), dále jsou často využívány 12S, 16S a ITS rDNA.

Na základě mnou získaných informací není možné zjistit a určit obecná pravidla pro genetické hranice druhů u perlooček, nicméně to neznamená, že neexistují. Pokud žádná pravidla nenacházíme, spíše neznáme důvody, proč tomu tak je (například historie kolonizace daného území nebo geografické bariéry). Proto by bylo vhodné se v budoucnosti více zabývat i datováním událostí a vytvářením molekulárních hodin (pokud to lze). Pokud ale nezhodnotíme čas a kontakt populací, nelze ani žádný genetický rozdíl hodnotit. Jestliže bychom určili čas a disperzi, mohli bychom hranice pro dané skupiny lépe definovat.

Rozdílný musí být i pohled na genetické vzdálenosti u Daphniidae a Chydoridae. Chydoridae se totiž začali diverzifikovat dříve než Daphniidae a jiné pelagické perloočky, konkrétně v devonu přibližně před 400 miliony lety. U skupiny Chydoridae můžeme tedy očekávat větší akumulaci mutací, a tedy i větší rozdíly na genetické úrovni, jelikož jsou starší.

Je zcela jisté, že nám chybí ještě mnoho informací o genetických vzdálenostech u čeledí Daphniidae a Chydoridae. Gen COI se osvědčil jako dobrý genetický marker. To platí i pro ostatní nejčastěji využívané mitochondriální geny 12S rDNA a 16S rDNA. V některých studiích se ale nevyžíval žádný jaderný gen, i když jsou pro určování fylogenetických vztahů také důležité – zejména pro vyšší taxonomické jednotky. Nelze samozřejmě opomenout význam morfologických studií, protože nejlepším způsobem, jak rozpoznat druhy je kombinace morfologických a genetických studií.

8. SEZNAM LITERATURY

- Adamczuk M. (2014). Niche separation by littoral-benthic Chydoridae (Cladocera, Crustacea) in a deep lake – potential drivers of their distribution and role in littoral-pelagic coupling. *Journal of Limnology*, 73(3), 490-501. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2014.884>
- 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(2), 171-205. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2003.00089.x>
- Adamowicz S. J., Petrussek A., Colbourne J. K., Hebert P. D. N., Witt J. D. S. (2009). The scale of divergence: A phylogenetic appraisal of intercontinental allopatric speciation in a passively dispersed freshwater zooplankton genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50(3), 423-436. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.11.026>
- Alonso M. & Sinev A. Y. (2017). Relocation of *Alona manueli* Sinev & Zawisza 2013 and a new closely related species from the Ecuadorian Andes to the new genus *Alpinalona* (Cladocera, Chydoridae, Aloninae). *Zootaxa*, 4350(3), 563-573. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4350.3.8>
- Barret R. D. H. & Hebert P. D. N. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 83, 481-491. <https://doi.org/10.1139/Z05-024>
- Belyaeva M. & Taylor D. J. (2008). Cryptic species within the *Chydorus sphaericus* species complex (Crustacea: Cladocera) revealed by molecular markers and sexual stage morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50(3), 534-546. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.11.007>
- Bennett K. R., Hogg I. D., Adams B. J. & Hebert P. D. N. (2016). High levels of intraspecific genetic divergences revealed for Antarctic springtails: evidence for small-scale isolation during Pleistocene glaciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 119(1), 166-178. <https://doi.org/10.1111/bij.12796>
- Benzie J. A. H. & Hodges A. M. A. (1996). *Daphnia obtusa* Kurz, 1874 emend Scourfield, 1942 from Australia. *Hydrobiologia*, 333(3), 195-199. <https://doi.org/10.1007/BF00013433>
- Brendonck L. & De Meester L. (2003). Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia*, 491(1-3), 65-84. <https://doi.org/10.1023/A:1024454905119>
- Burns C. W., Duggan I. C., Banks J. C., Hogg I. D. (2017). A new, subalpine species of *Daphnia* (Cladocera, Anomopoda) in the *D. carinata* species complex, in the South Island, New Zealand. *Hydrobiologia*, 798, 151-169. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2702-1>
- Castilho M. C. A., Wisniewski M. J. S., Abreu C. B. & Orlando T. C. (2015). Life history and DNA barcode of *Oxyurella longicaudis* (Birgei, 1910) (Cladocera, Anomopoda, Chydoridae). *Zoological Studies*, 54, 20. <https://doi.org/10.1186/s40555-0104-5>
- Cáceres C. E. (1998). Interspecific variation in the abundance, production, and emergence of *Daphnia* diapausing eggs. *Ecology*, 79(5), 1699-1710. <https://doi.org/10.2307/176789>
- Cáceres C. E. & Schwalbach M. S. (2001). How well do laboratory experiments explain field patterns of zooplankton emergence? *Freshwater Biology*, 46(9), 1179-1189. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00737.x>

- Cáceres C. E., Soluk D. A. (2002). Blowing in the wind: a field test of overland dispersal and colonization by aquatic invertebrates. *Oecologia*, 131(3), 402-408. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-0897-5>
- Cáceres C. E. & Tessier A. J. (2003). How long to rest: the ecology of optimal dormancy and environmental constraint. *Ecology*, 84(5), 1189-1198. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2003\)084\[1189:HLTRTE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2003)084[1189:HLTRTE]2.0.CO;2)
- Chiambeng G. Y., Dumont H. J. (2004). The genus *Pleuroxus* Baird, 1843 (Crustacea: Anomopoda: Chydoridae) in Cameroon, Central-West Africa. *Annales de Limnologie – International Journal of Limnology*, 40(3), 211-229. <https://doi.org/10.1051/limn/2004019>
- Costa F. O., deWaard J. R., Boutillier J., Ratnasingham S., Dooh R. T., Hajibabaei M. & Hebert P. D. N. (2007). Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64(2), 272-295. <https://doi.org/10.1139/f07-008>
- Colbourne J. K., Crease T. J., Weider L. J., Hebert P. D. N., Dufresne F. & Hobæk A. (1998). Phylogenetics and evolution of a circumarctic species complex (Cladocera: *Daphnia pulex*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 65(3), 347-365. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1998.tb01146.x>
- 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 B Biological Sciences*, 351(1337), 349-360. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0028>
- Colbourne J. K., Wilson C. C. & Hebert P. D. N. (2006). The systematics of Australian *Daphnia* and *Daphniopsis* (Crustacea: Cladocera): a shared phylogenetic history transformed by habitat-specific rates of evolution. *Biological Journal of the Linnean Society*, 89(3), 469-488. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2006.00687.x>
- Cox A. J. & Hebert P. D. N. (2001). Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology*, 10(2), 371-386. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2001.01188.x>
- Crease T. J., Lynch M. & Spitze K. (1990). Hierarchical Analysis of Population Genetic Variation in Mitochondrial and Nuclear Genes of *Daphnia pulex*. *Molecular Biology and Evolution*, 7(5), 444-458. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040618>
- Crease T. J., Omilian A. R., Costanzo K. S., Taylor D. J. (2012). Transcontinental Phylogeography of the *Daphnia pulex* Species Complex. *PLoS ONE*, 7(10):e46620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046620>
- Cristescu M. E. A. & Hebert P. D. N. (2002). Phylogeny and adaptive radiation in the Onychopoda (Crustacea, Cladocera): evidence from multiple gene sequences. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(5), 838-849. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2002.00466.x>
- Decker P. (2016). Integrative taxonomic revision of the polymorphic flat-millipede genera *Oncocladosoma* and *Somethus* in South Australia (Diplopoda: Polydesmida: Paradoxosomatidae). *Invertebrate Systematics*, 30(3), 201-218. <https://doi.org/10.1071/IS15047>
- Dlouhá Š., Thielsch A., Kraus R. H. S., Seda J., Schwenk K., Petrussek A. (2010). Identifying hybridizing taxa within the *Daphnia longispina* species complex: a comparison of genetic methods and phenotypic approaches. *Hydrobiologia*, 643(1), 107-122. <http://doi.org/10.1007/s10750-010-0128-8>

- Dole-Olivier M. - J., Galassi D. M. P., Marmonier P. & Des Châtelliers M. C. (2000). The biology and ecology of lotic microcrustaceans. *Freshwater Biology*, 44(1), 63-91. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2000.00590.x>
- Dömel J. S., Convey P. & Leese F. (2015). Genetic data support independent glacial refugia and open ocean barriers to dispersal for the southern ocean sea spider *Austropallene Cornigera* (Möbius, 1902). *Journal of Crustacean Biology*, 35(4), 480-490. <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002351>
- Dufresne F. & Jeffery N. (2011). A guided tour of large genome size in animals: what we know and where we are heading. *Chromosome Research*, 19(7), 925-938. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9248-x>
- Elías-Gutiérrez M., Jerónimo F. M., Ivanova N. V., Valdez-Moreno M. & Hebert P. D. N. (2008). DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. *Zootaxa*, 42(1839), 1-42. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1839.1.1>
- Elías-Gutiérrez M. & Valdez-Moreno M. (2008). A new cryptic species of *Leberis* Smirnov, 1989 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) from the Mexican semi-desert region. Highlighted by DNA barcoding. *Hidrobiológica*, 18(1), 63-74.
- Forró L., Korovchinsky N. M., Kotov A. A., Petrusek A. (2008). Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 177-184. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9013-5>
- Frey D. G. (1980). On the plurality of *Chydorus sphaericus* (O. F. Müller) (Cladocera, Chydoridae), and designation of a neotype from Sjaelsø, Denmark. *Hydrobiologia*, 69(1-2), 83-123. <https://doi.org/10.1007/BF00016540>
- Frey D. G. (1985). A New Species of the *Chydorus sphaericus* Group (Cladocera, Chydoridae) from Western Montana. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 70(1), 3-20. <https://doi.org/10.1002/iroh.19850700102>
- Frisch D., Green A. J. & Figuerola J. (2007). High dispersal capacity of a broad spectrum of aquatic invertebrates via waterbirds. *Aquatic Sciences*, 69(4), 568-574. <https://doi.org/10.1007/s00027-007-0915-0>
- Fritz G. N., Conn J., Cockburn A. & Seawright J. (1994). Sequence Analysis of the Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer 2 from Populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Molecular Biology and Evolution*, 11(3), 406-416. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040122>
- Fryer G. (1968). Evolution and Adaptive Radiation in the Chydoridae (Crustacea: Cladocera): A Study in Comparative Functional Morphology and Ecology. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, 254(795), 221-385.
- Fryer G. (1991). Functional morphology and the adaptive radiation of the Daphniidae (Branchiopoda: Anomopoda). *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, 331(1259), 1-99. <https://doi.org/10.1098/rstb.1991.0001>
- Fryer G. & Frey D. G. (1981). Two-egged ehippia in the chydorid Cladocera. *Freshwater Biology*, 11(4), 391-394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1981.tb01270.x>

- Giebler S. & Englbrecht C. C. (2009). Dynamic Reticulate Evolution in a *Daphnia* Multispecies Complex. *Journal of Experimental Zoology Part A Ecological Genetics and Physiology*, 311(7), 530-548. <https://doi.org/10.1002/jez.550>
- Giebler S., Mader E. & Schwenk K. (1999). Morphological evolution and genetic differentiation in *Daphnia* species complexes. *Journal of Evolutionary Biology*, 12(4), 710-723. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1999.00065.x>
- Gómez-Zurita J., Juan C. & Petitpierre E. (2000). Sequence, secondary structure and phylogenetic analyses of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in the *Timarcha* leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Molecular Biology*, 9(6), 591-604. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00223.x>
- Hairston N. G., Jr., Van Brunt R. A., Kearns C. M. & Engstrom D. R. (1995). Age and survivorship of diapausing eggs in a sediment egg bank. *Ecology*, 76(6), 1706-1711. <https://doi.org/10.2307/1940704>
- Hansen H., Alvestad A. H., MacKenzie K., Darrud M., Karlsbakk E., Hemmingsen W., Arneberg P. (2020). *Gyrodactylus triglopsi* n. sp. (Monogenea: Gyrodactylidae) from the Gills of *Triglops nybelini* Jensen, 1944 (Teleostei: Cottidae) in the Barents Sea. *Acta Parasitologica*. <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00208-z>
- Harder A. M., Halanych K. M., Mahon A. R. (2016). Diversity and distribution within the sea spider genus *Pallenopsis* (Chelicerata: Pycnogonida) in the Western Antarctic as revealed by mitochondrial DNA. *Polar Biology*, 39, 677-688. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1823-8>
- Harrison J. S. (2004). Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16s and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinixa* (Decapoda: Pinnotheridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(3), 743-754. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00250-1](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00250-1)
- Hebert P. D. N. (1981). Obligate Asexuality in *Daphnia*. *The American Naturalist*, 117(5), 784-789. <https://doi.org/10.1086/283761>
- Hebert P. D. N. & Cristescu M. E. A. (2002). Genetic perspectives on invasions: the case of the Cladocera. *The Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(7), 1229-1234. <https://doi.org/10.1139/f02-091>
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L. & deWaard J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of The Royal Society of London B*, 270(1512), 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemlak T. S., Francis C. M. (2004). Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*, 2(10):e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Heier C. R. & Dudycha J. L. (2009). Ecological speciation in a cyclic parthenogen: Sexual capability of experimental hybrids between *Daphnia pulex* and *Daphnia pulex*. *Limnology and Oceanography*, 54(2), 492-502. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.2.0492>
- Hershkovitz M. A. & Lewis L. A. (1996). Deep-Level Diagnostic Value of the rDNA-ITS Region. *Molecular Biology and Evolution*, 13(9), 1276-1295. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025693>
- Hillis D. M. & Dixon M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66(4), 411-453. <https://doi.org/10.1086/417338>

- Huang X., Shi X., Kotov A. A. & Gu F. (2014). Confirmation through Genetic Analysis of the Existence of Many Local Phyloclades of the Genus *Simocephalus* (Crustacea: Cladocera) in China. *PLoS ONE*, 9(11):e112808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112808>
- Inagaki Y., Ehara M., Watanabe K. I., Hayashi-Ishimaru Y. & Ohama T. (1998). Directionally Evolving Genetic Code: The UGA Codon from Stop to Tryptophan in Mitochondria. *Journal of Molecular Evolution*, 47(4), 378-384. <https://doi.org/10.1007/PL00006395>
- Jeffery N. W., Elías-Gutiérrez M., Adamowicz S. J. (2011). Species Diversity and Phylogeographical Affinities of the Branchiopoda (Crustacea) of Churchill, Manitoba, Canada. *PLoS ONE*, 6(5):e18364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018364>
- Juračka P. J., Kořínek V. & Petrušek A. (2010). A new Central European species of the *Daphnia curvirostris* complex, *Daphnia hrbaceki* sp. nov. (Cladocera, Anomopoda, Daphniidae). *Zootaxa*, 2718(2718), 1-22. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2718.1.1>
- Kabir T., Shemonti A. S. & Rahman A. H. (2018). Species Identification using Partial DNA Sequence: A Machine Learning Approach. *2018 IEEE 18th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1109/BIBE.2018.00052>
- Kattel G. R. & Augustinus P. C. (2010). Biogeography and taxonomy of New Zealand Cladocera (Anomopoda, Chydoridae): a review. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 40(3-4), 209-224. <http://doi.org/10.1080/03036758.2010.512626>
- Knox M. A., Hogg I. D. & Pilditch C. A. (2011). The role of vicariance and dispersal on New Zealand's estuarine biodiversity: the case of *Paracorophium* (Crustacea: Amphipoda). *Biological Journal of the Linnean Society*, 103(4), 863-874. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01675.x>
- Korhola A. & Rautio M. (2001). Cladocera and other branchiopod crustaceans. In ed. Smol J. P., Birks H. J. B. & Last W. M. (Ed), *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments, Volume 4: Zoological Indicators*. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*, 1-37. doi.org/10.1007/0-306-47671-1_2
- Korovchinsky N. M. (1997). On the history of studies on cladoceran taxonomy and morphology, with emphasis on early work and causes of insufficient knowledge of the diversity of the group. *Hydrobiologia*, 360(1), 1-11. <https://doi.org/10.1023/A:1003156802800>
- Korovchinsky N. M. (2006). The Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) as a relict group. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 147(1), 109-124. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2006.00217.x>
- Kotov A. A. & Taylor D. J. (2010). A new African lineage of the *Daphnia obtusa* group (Cladocera: Daphniidae) disrupts continental vicariance patterns. *Journal of Plankton Research*, 32(6), 937-949. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbq018>
- Kress W. J., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Weigt L. A. & Janzen D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), 8369-8374. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503123102>
- Ma X., Wolinska J., Petrušek A., Gießler S., Hu W. & Yin M. (2016). The phenotypic plasticity in Chinese populations of *Daphnia similoides sinensis*: recurvate helmeted forms are associated with the presence of predators. *Journal of Plankton Research*, 38(4), 855-864. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbw031>

- Marková S., Maurone C., Racchetti E., Bartoli M., Rossi V. (2017). *Daphnia* diversity in water bodies of the Po River Basin. *Journal of Limnology*, 76(2), 261-271. <http://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1531>
- Martin J. W. & Cash-Clark C. E. (1995). The external morphology of the onychopod 'cladoceran' genus *Bythotrephes* (Crustacea, Branchiopoda, Onychopoda, Cercopagididae), with notes on the morphology and phylogeny of the order Onychopoda. *Zoologica Scripta*, 24(1), 61-90. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.1995.tb00475.x>
- de Matos V., Gomes-Pereira J. N., Tempera F., Ribeiro P. A., Braga-Henriques A., Porteiro F. (2014). First record of *Antipathella subpinnata* (Anthozoa, Antipatharia) in the Azores (NE Atlantic), with description of the first monotypic garden for this species. *Deep-Sea Research II*, 99, 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.07.003>
- Mukha D., Wiegmann B. M., Schal C. (2002). Evolution and phylogenetic information content of the ribosomal DNA repeat unit in the Blattodea (Insecta). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(9), 951-960. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00164-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00164-3)
- Negrea S., Botnariuc N. & Dumont H. J. (1999). Phylogeny, evolution and classification of the Branchiopoda (Crustacea). *Hydrobiologia*, 412, 191-212. <https://doi.org/10.1023/A:1003894207100>
- Nilssen J. P., Hobæk A., Petrusek A., Skage M. (2007). Restoring *Daphnia lacustris* G. O. Sars, 1862 (Crustacea, Anomopoda): a cryptic species in the *Daphnia longispina* group. *Hydrobiologia*, 594(1), 5-17. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9076-3>
- Olesen J. (2014). Cladocera: Anomopoda. In ed. Martin J. W., Olesen J. & Høeg J. T. (Ed), Atlas of crustacean larvae. *Johns Hopkins University Press, Baltimore*, 63-68.
- Omilian A. R. & Lynch M. (2009). Patterns of Intraspecific DNA Variation in the *Daphnia* Nuclear Genome. *Genetics*, 182(1), 325-336. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.099549>
- Patwardhan A., Ray S. & Roy A. (2014). Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology*, 2, 2. <http://doi.org/10.4172/2329-9002.1000131>
- Penton E. H., Hebert P. D. N. & Crease T. J. (2004). Mitochondrial DNA variation in North American populations of *Daphnia obtusa*: continentalism or cryptic endemism? *Molecular Ecology*, 13(1), 97-107. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02024.x>
- Petrusek A., Hobæk A., Nilssen J. P., Skage M., Černý M., Brede N. & Schwenk K. (2008a). A taxonomic reappraisal of the European *Daphnia longispina* complex (Crustacea, Cladocera, Anomopoda). *Zoologica Scripta*, 37(5), 507-519. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2008.00336.x>
- Petrusek A., Seda J., Macháček J., Ruthová Š. & Šmilauer P. (2008b). *Daphnia* hybridization along ecological gradients in pelagic environments: the potential for the presence of hybrid zones in plankton. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, 363(1505), 2931-2941. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0026>
- Petrusek A., Thielsch A. & Schwenk K. (2012). Mitochondrial sequence variation suggests extensive cryptic diversity within the Western Palearctic *Daphnia longispina* complex. *Limnology and Oceanography*, 57(6), 1838-1845. <https://doi.org/10.4319/lo.2012.57.6.1838>

- Raschmanová N., Žurovcová M., Kováč L., Paučulová L., Šustr V., Jarošová A. & Chundelová D. (2017). The cold-adapted population of *Folsomia manolachei* (Hexapoda, Collembola) from a glaciated karst doline of Central Europe: evidence for a cryptic species? *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 55(1), 19-28. <https://doi.org/10.1111/jzs.12150>
- Richter S., Olesen J. & Wheeler W. C. (2007). Phylogeny of Branchiopoda (Crustacea) based on a combined analysis of morphological data and six molecular loci. *Cladistics*, 23(4), 301-336. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2007.00148.x>
- Rossi F. (1980). Comparative observation on the female reproductive system and parthenogenetic oogenesis in Cladocera. *Italian Journal of Zoology*, 47(1-2), 21-38. <https://doi.org/10.1080/11250008009440317>
- Saccone C., De Giorgi C., Gissi C., Pesole G. & Reyes A. (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238(1), 195-209. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00270-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00270-X)
- Sacherová V. & Hebert P. D. N. (2003). The evolutionary history of the Chydoridae (Crustacea: Cladocera). *Biological Journal of the Linnean Society*, 79(4), 629-643. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2003.00216.x>
- 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 B Biological Sciences*, 267(1455), 1833-1842. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1218>
- Sharma P., Elías-Gutiérrez M. & Kobayashi T. (2014). Identification of common cladocerans and calanoids in two south Australian reservoirs using DNA barcoding and morphological analysis: an integrative approach. *Crustaceana*, 87(7), 834-855. <https://doi.org/10.1163/15685403-00003333>.
- Sharma P., Kotov A. A. (2014). Establishment of *Chydorus sphaericus* (O. F. Müller, 1785) (Crustacea: Cladocera) in Australia: consequences of mass fish stocking from Northern Europe? *Journal of Limnology*, 74(2), 225-233. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2014.1037>
- Silva E. d. S., Abreu C. B. d., Orlando T. C., Wisniewski C., Santos-Wisniewski M. J. d. (2014). *Alona iheringula* Sinev & Kotov, 2004 (Crustacea, Anomopoda, Chydoridae, Aloninae): Life Cycle and DNA Barcode with Implications for the Taxonomy of the Aloninae Subfamily. *PLoS ONE*, 9(5):e97050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097050>
- Smirnov, N. N. (1996). Cladocera: The Chydorinae and Saycinae (Chydoridae) on the world. In ed. H.J. Dumont (Ed.), *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. Amsterdam: SPB Academic
- Spears T. & Abele L. G. (2000). Branchiopod monophyly and interordinal phylogeny inferred from 18S ribosomal DNA. *Journal of crustacean biology*, 20(1), 1-24. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990012>
- 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(6), 1648-1670. <https://doi.org/10.2307/2411338>
- Taylor D. J., Hebert P. D. N. & Colbourne J. K. (1996). Phylogenetics and Evolution of the *Daphnia longispina* Group (Crustacea) Based on 12S rDNA Sequence and Allozyme Variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(3), 495-510. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/mpev.1996.0045>

- 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(5), 1486-1495. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.5.1486>
- Thielsch A., Knell A., Mohammadyari A., Petrusek A. & Schwenk K. (2017). Divergent clades or cryptic species? Mito-nuclear discordance in a *Daphnia* species complex. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 227. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1070-4>
- Thomas S. M. & Hedin M. (2008). Multigenic phylogeographic divergence in the paleoendemic southern Appalachian opilionid *Fumontana deprehendor* Shear (Opiliones, Laniatores, Triaenonychidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46(2), 645-658. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.10.013>
- Van Damme K. & Kotov A. A. (2016). The fossil record of the Cladocera (Crustacea: Branchiopoda): Evidence and hypotheses. *Earth-Science Reviews*, 163, 162-189. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2016.10.009>
- Van Damme K., Kotov A. A. & Dumont H. J. (2010). A checklist of names in *Alona* Baird 1843 (Crustacea: Cladocera: Chydoridae) and their current status: an analysis of the taxonomy of a lump genus. *Zootaxa*, 2330(2330), 1-63. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2330.1.1>
- Vergilino R., Markova S., Ventura M., Manca M. & Dufresne F. (2011). Reticulate evolution of the *Daphnia pulex* complex as revealed by nuclear markers. *Molecular Ecology*, 20(6), 1191-1207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05004.x>
- Vierna J., Martínez-Lage A. & González-Tizón A. M. (2010). Analysis of ITS1 and ITS2 sequences in *Ensis* razor shells: suitability as molecular markers at the population and species levels, and evolution of these ribosomal DNA spacers. *Genome*, 53(1), 23-34. <https://doi.org/10.1139/g09-080>
- de Waard J. R., Sacherova V., Cristescu M. E. A., Remigio E. A., Crease T. J. & Hebert P. D. N. (2006). Probing the relationships of the branchiopod crustaceans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39(2), 491-502. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.11.003>
- Wang W., Zhang K., Deng D., Zhang Y.-N., Peng S., Xu X. (2016). Genetic Diversity of *Daphnia pulex* in the Middle and Lower Reachers of the Yangtze River. *PLoS ONE*, 11(3):e0152436. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0152436>
- Weis A., Meyer R., Dietz L., Dömel J. S., Leese F. & Melzer R. R. (2014). *Pallenopsis patagonica* (Hoek, 1881) – a species complex revealed by morphology and DNA barcoding, with description of a new species of *Pallenopsis* Wilson, 1881. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 170(1), 110-131. <https://doi.org/10.1111/zoj.12097>
- Xu L., Lin Q., Xu S., Gu Y., Hou J., Liu Y., Dumont H. J., Han B.-P. (2018). *Daphnia* diversity on the Tibetan Plateau measured by DNA taxonomy. *Ecology and Evolution*, 8(2), 5069-5078. <https://doi.org/10.1002/ece3.4071>
- Yang C.-H., Wu K.-C., Dahms H.-U., Chuang L.-Y., Chang H.-W. (2017). Single nucleotide polymorphism barcoding of cytochrome c oxidase I sequences for discriminating 17 species of Columbiidae by decision tree algorithm. *Ecology and Evolution*, 7(14), 4717-4725. <https://doi.org/10.1002/ece3.3045>
- Young M. R. & Hebert P. D. N. (2015). Patterns of Protein Evolution in Cytochrome c Oxidase 1 (COI) from the Class Arachnida. *PLoS ONE*, 10(8):e0135053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135053>

- Zuykova E. I., Bochkarev N. A., Katokhin A. V. (2013a). Identification of the *Daphnia* species (Crustacea: Cladocera) in the lakes of the Ob and Yenisei River basins: morphological and molecular phylogenetic approaches. *Hydrobiologia*, 715(1), 135-150. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1423-3>
- Zuykova E. I., Bochkarev N. A. & Katokhin A. V. (2013b). Molecular Genetic Identification and Phylogeny of *Daphnia* Species (Crustacea, Cladocera) from Water Bodies of the Lake Chany Basin. *Russian Journal of Genetics*, 49(2), 206-213. <https://doi.org/10.1134/S1022795412120186>
- Zuykova E. I., Bochkarev N. A. & Sheveleva N. G. (2016). Genetic Polymorphism, Haplotype Distribution, and Phylogeny of *Daphnia* (Cladocera: Anomopoda) Species from the Water Bodies of Russia as Inferred from the 16S mtDNA Gene Sequencing. *Russian Journal of Genetics*, 52(6), 585-596. <https://doi.org/10.1134/S102279541604013X>
- Zuykova E. I., Simonov E. P., Bochkarev N. A., Abramov S. A., Sheveleva N. G., Kotov A. A. (2018b). Contrasting phylogeographic patterns and demographic history in closely related species of *Daphnia longispina* group (Crustacea: Cladocera) with focus on North-Eastern Eurasia. *PLoS ONE*, 13(11):e0207347. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207347>
- Zuykova E. I., Simonov E. P., Bochkarev N. A., Taylor D. J. & Kotov A. A. (2018a). Resolution of the *Daphnia umbra* problem (Crustacea: Cladocera) using an integrated taxonomic approach. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 184, 969-998. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zly015>