

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ZOOLOGIE



**Z Malé Asie k Dunaji: fylogeografie a kolonizační cesty
sekavcovité ryby *Cobitis strumicae***

Out of Asia Minor into Danube Drainage: Phylogeography
and colonisation pathways in the loach fish *Cobitis
strumicae*

Diplomová práce

Zuzana Majtánová

Školitel: RNDr. Lukáš Choleva, Ph.D.

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, s použitím citované literatury a pod vedením školitele.

V Praze dne: 31.8.2010

.....

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě je mou milou povinností poděkovat a vyslovit uznání všem, bez kterých by tato práce určitě nevznikla. V první řadě je to školitel RNDr. Lukáš Choleva, Ph.D., jemuž děkuji za výborné vedení, uvedení do laboratorní praxe, za pomoc při získávání výsledků a zvláště pak za jeho cenné rady, obrovskou trpělivost a ochotu mi vždy a s čímkoliv pomoci. Dále děkuji Doc. Ing. Petru Rábovi, DrSc. za možnost pracovat na své práci v laboratoři genetiky ryb na UŽFG AV ČR v Liběchově a ostatním kolegům z laboratoře, kteří zde vytvořili příjemné a přátelské pracovní prostředí. Michaele Bílé mnohokrát děkuji za grafické a finální úpravy, Marii Doležálkové za pomoc se zpracováním analýz a Heleně Šifrové za konzultace při tvorbě map.

Zvláštní poděkování patří mým rodičům, kteří mně po celou dobu studia podporovali a věřili v jeho zdárné ukončení. Děkuji i svým přátelům, kteří mně i přesto, že občas nechápali, čím a proč se vlastně zabývám, vždy vyslechli.

ABSTRAKT

Sekavec *Cobitis strumicae* je drobná při dně žijící sladkovodní ryba, jejíž předkové kolonizovali jihovýchodní Evropu z Blízkého Východu Malou Asií. Dnešní geografická distribuce druhu doslova krouží kolem pohoří Staré Planiny (pohoří Balkánu), druh obývá povodí Dunaje a řeky tekoucí do Černého a Egejského moře. Využitím mitochondriálního (gen cytochrom *b*) a jaderného (první intron genu *S7*) DNA markeru jsme rekonstruovali druhovou distribuci a fylogenetické vztahy 44 populací druhu *C. strumicae* napříč areálem jeho rozšíření. Současně jsme analyzovali sesterský druh *C. punctilineata*, jež žije uvnitř areálu *C. strumicae*. Fylogenetické analýzy potvrzují monofylii a druhový statut *C. punctilineata* i jeho endemitu, objeveny však byly stopy sekundární hybridizace s *C. strumicae*. Analýza networku metodou median-joining poukazuje na hlubokou divergenci obou druhů. Aplikace čtyř fylogenetických přístupů v genu pro cytochrom *b* potvrdila monofylii druhu *C. strumicae*, dále vykazující hluboké vnitřní členění na minimálně dvě kryptické linie, naznačující proces lokální speciace. Fylogenetické analýzy genu *S7* sice nepodpořily monofylii a druhový statut *C. strumicae*, avšak vymezipily dva samostatné monofyletické klády v rámci druhu *C. strumicae*. Využitím statistického přístupu Isolation with Migration (IM) jsme dále studovali směr historického kolonizačního scénáře druhu *C. strumicae* z mediteránní oblasti na sever do povodí Dunaje. Provedená IM analýza dvou genových datasetů potvrzuje obousměrnou migrační kolonizační cestu mezi Egejskou oblastí a dolním Dunajem podél pobřežních řek (dříve historického šelfu) Černého moře v Bulharsku. Kolonizace alternativní západní migrační trasou do Dunaje z Egejské oblasti řekou Struma nebyla potvrzena, avšak v obou markerech v IM analýzách byla shodně nalezena jednosměrná migrace v opačném směru, tj. z Dunaje do horní Strumy. Jedná se zřejmě o sekundární migraci zpět z úmoří moře Černého do úmoří moře Egejského.

Klíčová slova: Sekavec strumanský (*Cobitis strumicae*), fylogenetika, fylogeografie, mitochondriální DNA (mtDNA), jaderná DNA, ribozomální gen *S7*, Balkánský poloostrov, izolace a migrace

ABSTRACT

The spiny loach *Cobitis strumicae* is a small bottom-dwelling freshwater fish whose progenitor colonised the Balkan Peninsula from the Near East through the Asia Minor. The current geographic distribution of *C. strumicae* forms a ring around the Stara Planina (Balkan mountains), inhabiting Danube Basin and coastal rivers of Black Sea and Aegean Sea. Using one marker of mitochondrial DNA (gene for cytochrom *b*) and one marker of nuclear DNA (*S7* gene, first intron), we reconstructed the species distribution and phylogenetic relationship of 44 populations throughout *C. strumicae* distribution. We also analysed its sister species, *C. punctilineata*, which lives inside the distribution area of *C. strumicae*. Application of four phylogenetic approaches confirm the monophyly and species status and endemism of *C. punctilineata*, and, moreover, the evidence of secondary hybridization with *C. strumicae* was found. The network analysis using median-joining method showed deep divergence between the both species. Phylogenetic analyses for *cyt b* gene confirmed the monophyly of *C. strumicae*, with internal substructure into at least two well divided lineages, which suggests the process of local speciation. Phylogenetic analyses of *S7* gene did not support the monophyly of *C. strumicae*. Instead, the two separated monophyletic clades for *C. strumicae* were found. Using Isolation with Migration (IM) approach, we studied a direction of historical colonisation scenario from Mediterranean region to Danube Basin in *C. strumicae*. IM analyses with two datasets (one for *cyt b* and second for *S7* marker) confirmed bidirectional migration within colonisation route between Aegean region and the region of lower Danube Basin along the coastal rivers (historical coastal shelf) of Black Sea in Bulgaria. Colonisation by alternative migration route from Aegean region into Danube Basin via Struma River wasn't confirmed. However, both markers supported the opposite direction, i.e. from Danube to upper Struma. This suggests the secondary migration after the colonisation of Danube system, namely from Black Sea drainage back into Aegean Sea drainage.

Key words: Spined loach, *Cobitis strumicae*, phylogeny, phylogeography, mitochondrial DNA (mtDNA), ribosomal *S7* gene, Balkan Peninsula, isolation with migration

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
1.1	Fylogeografie	8
1.2	Klimatické události čtvrtohorní Evropy	10
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	12
2.1	Biogeografie.....	12
2.2	Taxonomie rodu <i>Cobitis</i>	15
2.3	Diverzita rodu <i>Cobitis</i>	18
2.4	Migrační trasy druhu <i>Cobitis strumicae</i>	20
2.5	Cíle práce	21
3	MATERIÁL A METODIKA.....	23
3.1	Původ vzorků.....	23
3.2	Výběr molekulárních markerů a volba molekulárních technik.....	23
3.2.1	Využití mitochondriálního markeru	23
3.2.2	Využití jaderného markeru	25
3.2.3	Volba molekulárních technik.....	25
3.2.4	Izolace DNA	26
3.2.5	Polymerázová řetězcová reakce (PCR).....	26
3.2.6	Elektroforéza na agarózovém gelu, purifikace.....	27
3.2.7	Metoda přímého sekvenování	28
3.3	Zpracování dat.....	28
3.3.1	Datasety.....	30
3.3.2	Fylogenetické analýzy.....	30
3.3.3	Network.....	31
3.3.4	Metoda Neighbour-Joining (NJ)	31
3.3.5	Metoda Maximum parsimony (MP).....	31
3.3.6	Analýza Isolation with Migration.....	32
3.3.7	Modeltest.....	33
3.3.8	Metoda Maximum Likelihood (ML)	33
3.3.9	Bayesiánská analýza (BA).....	34
3.3.10	TreeView	34
4	VÝSLEDKY.....	35
4.1	Molekulární analýzy a genetická variabilita.....	35
4.2	Fylogenetické analýzy.....	35
4.2.1	Network.....	36
4.2.2	Rekonstrukce fylogenetických stromů.....	38
4.2.3	Výsledky analýzy Isolation with Migration	42

5	DISKUZE	43
5.1	Fylogenetické vztahy	43
5.1.1	<i>Cobitis punctilineata</i>	43
5.1.2	<i>Cobitis strumicae</i>	45
5.2	<i>Cobitis punctilineata</i> separátně odvozená samostatná linie skupiny Bicanestrinia, avšak <i>Cobitis strumicae</i> – více než jeden druh?	47
5.3	Biogeografie <i>C. strumicae</i> a historické migrační cesty východním Balkánem.....	48
5.3.1	Biogeografie předka <i>C. strumicae</i>	48
5.3.2	Migrace <i>C. strumicae</i> podél egejského pobřeží.....	49
5.3.3	Migrace <i>C. strumicae</i> mezi úmořími Egejského a Černého moře, testování hypotéz kolonizace dunajských přítoků.....	49
6	ZÁVĚR	52
7	SEZNAM LITERATURY	53
8	PŘÍLOHY	1

1 ÚVOD

1.1 Fylogeografie

Fylogeografie je relativně mladou a bouřlivě se rozvíjející vědní disciplínou, jež se zabývá prostorovým uspořádáním genetických linií, obzvláště mezi blízkými příbuznými druhy (Avice 2009). Pojem fylogeografie byl zaveden v roce 1987 (Avice 1987). Avšak již o dekádu dříve se k zodpovězení otázek týkajících se šíření a rozšíření organismů (jejich historického vývoje, současného stavu, obecných charakteristik apod.) využívala informace uložená v DNA studovaných organismů. Za předpokladu, že dvě populace byly v minulosti geograficky odděleny, pak mohou vhodné fylogeografické analýzy toto historické rozdělení odhalit a datovat tak klíčovou událost v minulosti druhu. Pro získání těchto informací je nutné ověřovat jedince napříč areálem rozšíření druhu či populace a následně provést studii vhodným markerem. V dnešní době již dominují markery genetické. Hojně využívaná je mitochondriální DNA (mtDNA), jež je vhodná pro odhad genealogických vztahů mezi současnými populacemi a jejich předky. Ve fylogeografii se dále využívají variabilní markery jako AFLP (Amplified fragment length polymorphisms) (např. Takács et al. 2008) nebo mikrosatelity (např. Hänfling et al. 2002). Pomocí vhodně zvolené analýzy lze vytvořit fylogenetický strom, tvořený jednotlivými haplotypy, který odráží evoluční vztahy, mezi samotnými jedinci i mezi populacemi (Avice et al. 1987, Arbogast et Kenagy 2001). Fylogeografie zjišťuje příbuznost studovaných jedinců a z ní odvozuje historii šíření a distribuci druhu na studovaném území. Klasické fylogeografické práce studují postglaciální rekolonizaci Evropy (Hewit 2004, Koskinen et al. 2000, Pearson et al. 2003). Zabývají se jak ústupem (a návratem) živočichů a rostlin do klimaticky vhodnějších jižních refugií (a zpět na sever), tak například příbuzností živočichů z evropských hor (Alpy, Karpaty, atd.) se stejnými nebo blízkými příbuznými druhy severní Evropy a Arktidy. Analýza DNA poskytuje nejkvalitnější výstupy, a proto ji zatím nelze nahradit žádnou jinou metodou. V poslední době je díky tomu hojně využívána a poskytuje odpovědi na neobjasněné systematické, fylogeografické a taxonomické otázky.

Sladkovodní ryby byly ve fylogeografických studiích až donedávna poněkud opomíjenou skupinou živočichů. Recentně se však i jim dostává patřičné pozornosti. Daly vznik publikací, jež se zabývají problematikou jejich geografické strukturalizace

(Taberlet et al. 1998). Tyto studie napomáhají k objasnění průběhu historických událostí i (re)kolonizačního scénáře daného druhu, respektive území. V prostředí říčních systémů historicky docházelo k dramatickým změnám, při nichž se měnily jak trasy jednotlivých řek, tak hranice jejich povodí. V průběhu geologického formování území docházelo k četným spojením, přeměrováním a zkracováním vodních systémů. V závislosti na těchto změnách se razantně měnila také distribuce druhů, které obývaly jednotlivé řeky a docházelo zde četným obdobím vikariance a lokální izolace (Bohlen et al. 2006). Podobně, jako se měnily jednotlivé říční systémy, docházelo ke změnám i ve větších vodních tělesech. Například Černé moře je dnes vnitrozemní moře, nacházející se mezi jihovýchodní Evropou, Kavkazem a Anatólií. Během posledního zalednění však bylo sladkovodním jezerem, jehož hladina byla až o 150 m níže než dnes. Následně, v ranném Holocénu (před 7500 lety), bylo toto území zaplaveno slanou vodou ze Středozemního moře (Ryan et al. 1997). Předpokládá se, že sladkovodní jezero fungovalo jako migrační cesta pro mnohé druhy ryb, jež se dnes vyskytují v řekách tekoucích do Černého moře, avšak po následné salinifikaci se toto území změnilo v migrační bariéru. V prostředích říčních systémů si můžeme klást řadu otázek. Např.: Jak se liší genetická variabilita druhu na dolním a na horním toku? Šíří se vodní organismy i mezi povodími nebo výhradně říční sítí? Jsou populace v jednotlivých povodích vzájemně ostře geneticky divergované, nebo mezi nimi dochází k výměně genů? Podporovaly opakující se izolace druhů v separátních jižních refugích jejich divergenci? Jak je v jednotlivých povodích rozmístěná vnitrodruhová diverzita? Existují u daného druhu běžné modely divergence a kolonizace? A mnohé další.

Tato práce studuje možné kolonizační cesty východního Balkánského poloostrova (zejména území dnešního Bulharska, řecké Thrácie a evropské části Turecka) pro sladkovodní biotu. Jako modelový druh byl použit zástupce sekavcovitých ryb rodu *Cobitis*, sekavec strumanský (*Cobitis strumicae*, Karaman, 1955, Obr. č. 1). K výběru druhu vedlo několik skutečností: na studovaném území Balkánu jde o druh rozšířený ve všech hlavních říčních systémech a obývá tak jak systémy úmoří Egejského moře, tak moře Černého. Pro sekavce jsou navíc k dispozici vhodné jaderné i mitochondriální markery, s jejichž pomocí máme k dispozici spolehlivý nástroj k odhalení vztahů mezi studovanými jedinci, respektive populacemi, napříč studovaným územím a povodími.

Obr. 1: *Cobitis strumicae* (foto A. Šedivá)



1.2 Klimatické události čtvrtohorní Evropy

Distribuce rostlinných a živočišných druhů je v čase a prostoru extrémně variabilní a reflektuje jak klimatické, tak geologické události daného území. Klimatické oscilace během čtvrtohor, vzniklé změnou v oběžné dráze Země (Hays et al. 1976), dramaticky ovlivnily geografickou distribuci, demografii a tím i evoluční historii většiny druhů. Efekt tohoto období na fylogeografii dnešní Evropské fauny a flóry je protojedním z hlavních výzkumných témat posledního desetiletí. Opakující se glaciální a interglaciální cykly v Evropě přinutily temperátní druhy k tomu, aby před rozšiřujícím se ledem a permafrostem ustoupily do tzv. glaciálních refugií, jež poskytovaly vhodné podmínky pro život. Díky ústupovým migracím docházelo k fragmentaci areálu a možné alopatrikové speciaci. Během interglaciálního oteplování jim umožnily zpětně expandovat a rekolonizovat území (Hewitt 1996). Opakované cykly expanzí a zmenšování areálů se odrážejí v současné genetické struktuře populací (Avise et al. 1987, Hewitt 2000). Ledová pokrývka začala růst přibližně před 2.5 miliony let a hlavní klimatické oscilace probíhaly během posledních 700 tisíc let (Webb et Bartlein, 1992). Během pozdního Pleistocénu navíc uvnitř těchto cyklů vznikaly další krátkodobé cykly (130 tis. let až 10 tis. let) s vysokým rozpětím klimatických změn (Roy et al. 1996). Po posledním zalednění, které proběhlo asi před 18 000 – 20 000 lety (Taberlet et al. 1998), se živočichové začali vracet zpět na sever. Změny v rozšíření druhů byly historicky studovány na základě chronologických analýz (např. lokalizace zdrojových distribučních oblastí) a dále pomocí fosilních záznamů. Řada těchto studií byla později podpořena genetickými analýzami,

jejichž výsledky ve většině případů překonávají klasické metody a často jsou schopny odhalit nesprávné interpretace chronologických analýz i nedostatky ostatních klasických metod (Schmitt 2006).

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

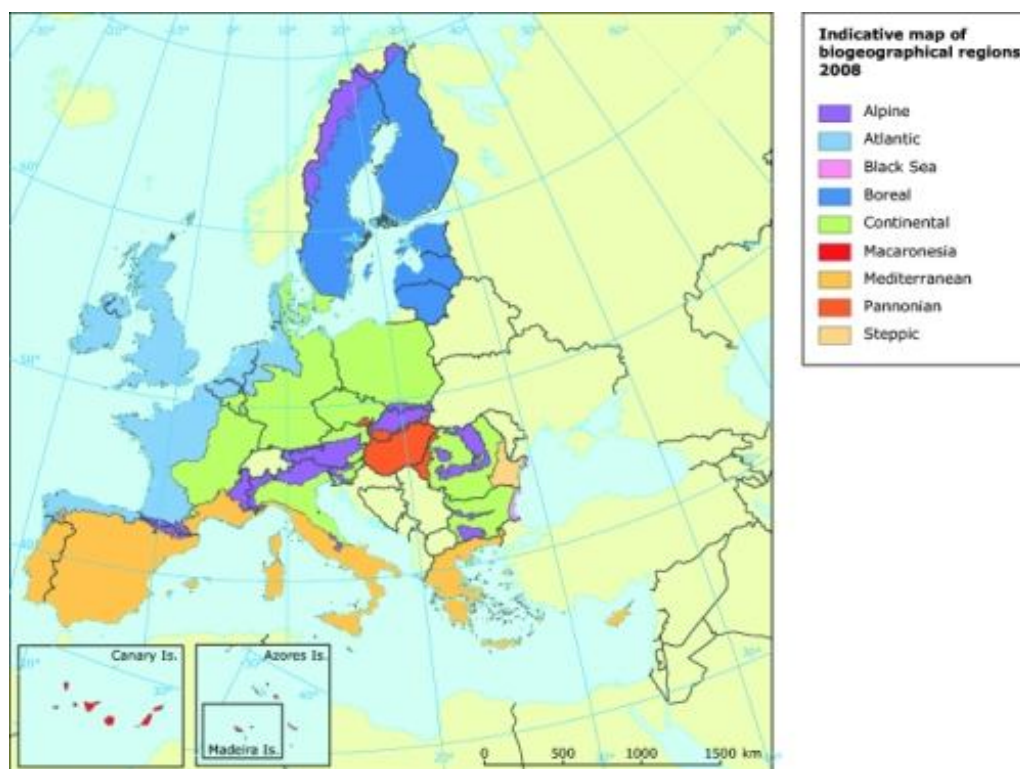
2.1 Biogeografie

Genový tok mezi populacemi sladkovodních ryb je značně omezen bariérami tvořenými krajinou a mořskou vodou. Tato omezení (izolace a následná diverzifikace) vytváří variabilní vzor v distribuci alel genetických markerů a odráží historii těchto populací (Nesbo et al. 1999). Potvrdila to například studie sladkovodních ryb v Severní Americe, jež odhalila silnou korelaci mezi distribucí genetických linií a postglaciální migrací z jednotlivých refugií (Bernatchez et Wilson 1998). Rovněž v Evropě již vznikly první fylogeografické studie modelující postglaciální migrace sladkovodních ryb na příkladu ryb z rodu *Rhodeus* (Bohlen et al. 2006b), *Cobitis* (Janko et al. 2005), *Rutilus* (Kotlik et al. 2008), či *Perca* (Nesbo et al. 1999). Většina těchto studií sladkovodních a anadromních ryb naznačuje silný vliv glaciálů na geografickou distribuci vnitrodruhového polymorfismu.

V Evropě jsou rozlišovány tři hlavní biogeografické skupiny organismů: mediteránní druhy s mediteránní distribucí a centry expanze; kontinentální druhy s extra-mediteránními centry expanze a alpské a/nebo arktické druhy, jež se dodnes vyskytují v alpských a/nebo arktických oblastech (Schmitt 2006). Pro tuto diplomovou práci je zvláště významná mediteránní biogeografická skupina. Mediteránní oblast zahrnuje sever Afriky, včetně Kanárských ostrovů, jižní Evropu okolo Středozemního moře po Kaspické moře a většinu Arabského poloostrova až po Perský záliv (Obr. 2). Mediteránní oblast lze z důvodu geografické a genetické izolace rozdělit na dílčí podjednotky. Riening (1950) popsal toto rozdělení pomocí chronologických analýz jež byly recentně podpořeny analýzami genetickými, díky kterým byla u mnoha taxonů prokázána silná strukturalizace uvnitř mediteránního subcentra. Recentní práce rovněž potvrdily, že rapidní postglaciální kolonizace Evropy probíhala ze čtyř glaciálních refugií, a to Iberského, Italského, Balkánsko-Řeckého a Ponto-Kaspického regionu (jež ale nepatří do mediteránní oblasti) (Culling et al. 2006). Mediteránní biogeografická skupina je charakterizována tím, že druhy do ní náležící využívaly jako glaciálního refugia přinejmenším jednoho z jeho subcenter (Hewitt 1996, Hewitt 1999, Hewitt 2000, Aspöck 2008). Mnoho široce

rozšířených druhů využívalo dokonce všech. Ve většině případů se v populacích těchto regionů vyskytovala nulová, nebo jen velmi omezená výměna jedinců s jinými regiony. Populace se tak vyvíjely nezávisle, což často vedlo k diferenciaci taxonomických a genetických linií (Taberlet et al. 1998, Hewitt 2004). Pomocí vhodně zvoleného genetického markeru vykazující příslušnou variabilitu a vzorkováním rozsáhlého území mohou být zrekonstruovány modely kolonizace severních částí Evropy jedinci s variabilitou v genomu (Taberlet et al. 1998, Hewitt 2000). Počet takovýchto studií v posledních letech výrazně roste. Podle příbuznosti DNA se ukazuje, že v Evropě dominují druhy rozšířené z Balkánského refugia, následuje Iberské a pak Italské refugium (Hewitt 2004). Vzniká tak mozaika genomů napříč dnešní Evropou, zpravidla ohraničená ostrými hybridními zónami. V Evropě jsou tyto zóny často seskupené do kontaktních zón vedoucích podél Alp a Pyrenejí, centrální Evropou a napříč Skandinávií, kde se mnoho expandujících linií genomů stýká (Hewitt 2004). Studium genetické variability poskytuje mnohem jemnější rozlišení diverzity fauny Evropy a pochopení historických událostí, než je možné dosáhnout pomocí fosilních záznamů (Hewitt 2004).

Obr. 2: Znázornění biogeografických regionů v Evropě (EEA 2008). Oblast mediteránu je značena oranžovou barvou.



Oblast Malé Asie a Balkánu je jeden z nejdůležitějších výchozích areálů pro kolonizaci rozsáhlých území Evropy živočichy a rostlinami, jež poskytla most pro Africké savce během časného Miocénu a později sloužila jako refugium a zdrojové území kolonizačních migrací na sever s ústupem Pleistocénních zalednění (Hewitt 1999, Rögl 1998). Nejvýznamnější zoogeografickou událostí na Balkánském poloostrově bylo uzavření moře Tethys v pozdním Oligocénu až ranném Miocénu. Během tohoto období proběhl střet Africké a Arabské litosférické desky s deskou Euroasijskou, což způsobilo vyzvednutí Balkánského pohoří a pohoří Pindus, s následnou izolací sladkovodních říčních systémů Balkánského poloostrova od zbytku Evropy (Rögl 1998). Dále se formovalo spojení se západní Asií, jež poskytlo přístup do Evropy živočichům z východu (Bohlen et al. 2006). Komplexní geologická historie také umožnila několikanásobná spojení, přesměrování a zkracování vodních systémů, jež významně ovlivnily složení fauny v těchto systémech a vedly k četným obdobím vikariance a účinné lokální izolace. Díky nim se na území Balkánského poloostrova vytvořila vysoká míra endemismu mnoha druhů (Economidis et Bănărescu 1991). Ačkoliv bylo publikováno mnoho recentních fylogeografických studií, jež popisují oblast „východního“ mediteránu jako refugia pro množství temperátních druhů, pro sladkovodní organismy, které jsou vázány na hydrogeografický systém a jeho distribuci, zatím není význam toho území, jeho hydrogeografická historie a vlivy na kolonizační historii sladkovodní fauny dostatečně prostudován. Přitom disperze organismů vázaných na vodní prostředí může historické události odrážet mnohem lépe, než je tomu u jiných skupin organismů (Avice 2000).

Z geografického hlediska je dnešní pojetí Balkánu vymezeno v Evropě severní hranicí od delty řeky Dunaj, tokem Dunaje proti proudu na západ po soutěsku Železná vrata v Karpatech a městem Bělehrad k severnímu výběžku Jadranu. Jižní hranici tvoří Peloponés. Vnitrozemské části poloostrova dominují masivní pohoří, jmenovitě Stará planina, Rodopy, Rila, Pirin, pohoří Pindos a Dinárské pohoří. Přítomnost těchto pohoří silně ovlivňuje hydrologii a hydrogeografii území. Severní část poloostrova odvádí řeky povodí Dunaje, který ústí do Černého moře. Východní stranu poloostrova odvádí relativně krátké samostatné říční toky přímo do Černého moře. Největší řekou je zde Kamčia. Významnou část Bulharska a evropského Turecka odvádí do Egejského moře řeka Maritza (Evros), z významnějších řek pak dále na východě řeky Mesta (Nestos) a Struma

(Strymon). Řeky jihu poloostrova tečou na východ do moře Egejského, na západě do moře Jónského a jižně od Dinárského pohoří tečou krátké říční systémy do Jadranu.

Sladkovodní druhy ryb Balkánského poloostrova náleží k Holarktickým, nebo Euroasijským taxonům a nejhojnější zastoupení mají ve skupině *Cyprinidae* (Griffids et al. 2004). Kolonizační cesty, jimiž sladkovodní organismy migrovaly z Balkánského poloostrova do povodí Dunaje a dále do Evropy, nejsou dosud příliš objasněny. Většina sladkovodních ryb, včetně druhu *C. strumicae*, není schopna překonat bariéru tvořenou mořskou vodou, a proto je jejich disperze omezena na hydrogeografickou síť řek. Druhá disperze tedy plně odráží geomorfologický vývoj hydrogeografické sítě (při vyloučení antropogenních vlivů). Kolonizace jednotlivých povodí je však dlouhodobou záležitostí. Nastává např. při snížení hladiny moří, které umožňuje spojení mezi dolními toky jednotlivých povodí, nebo může docházet k tzv. efektu „river capture“, který popisuje geomorfologický proces, při němž je během orogeneze část vodního toku přeměrována z jednoho povodí do jiného. (BurrIDGE et al. 2007, Conner et SuttKus 1986, Banarescu 1990, 1992, Bianco 1995, Reyjol et al. 2007). River capture byl například dokázán u druhu *Cottus gobio* (Šlechtová et al. 2004).

2.2 Taxonomie rodu *Cobitis*

Systematické zařazení sekavců dle Taxonomicon et Systema Naturae 2000 (Brands, 2005)

Kmen:	Chordata – Strunatci
Podčeleď:	Vertebrata – Obratlovci
Třída:	Osteichthyes – Ryby
Podtřída:	Actinopterygii – Paprskoploutví
Nadoddělení:	Neopterygii
Pododdělení:	Teleostei – Kostnatí
Řád:	Cypriniformes – Máloostní
Čeleď:	Cobitidae - Sekavci
Rod:	<i>Cobitis</i>

Sekavci rodu *Cobitis* tvoří širokou skupinu cypriniformních, typicky při dně žijících ryb, jež osidlují území Evropy, Asie a severního Maroka v Africe (Nalbant et al. 2001). Tělo sekavce je protáhlé, z boků včetně hlavy zploštělé s průměrnou velikostí 10 cm. Anglicky se tyto ryby nazývají „spined loaches“ podle orbitální spiny - kostěného vztyčitelného trnu pod okem. Typické zbarvení sekavců charakterizují čtyři podélné zóny drobných tmavých skvrn po bocích a podél hřbetní středové čáry na světlém kožním podkladu a jedna nebo dvě skvrnky na ocasní ploutvi.

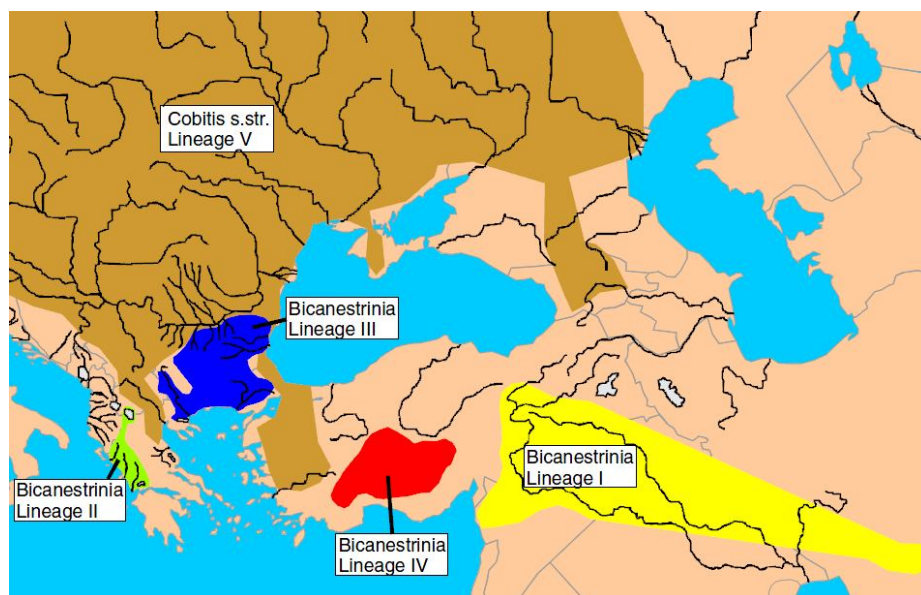
Evropští sekavci rodu *Cobitis* byli až donedávna považováni za zástupce jednoho široce rozšířeného druhu *Cobitis taenia* (Linnaeus, 1758), děleného do mnoha poddruhů. Mnoho z těchto „poddruhů“ je dnes díky genetickým analýzám považováno za samostatné druhy (Kottelat 1997). Obecnější trend postupného opouštění kategorie „subspecie“ je díky rozvoji moderních genetických markerů a přístupů pozorovatelný i u dalších skupin ryb. Revize skladby evropských ryb, kterou provedl Kottelat (1997), vedla k povyšování stávajících poddruhů na kategorii druhů a dále i k popsání druhů dosud neznámých. V Evropě je současně popsáno 25 druhů sekavců (Kottelat et Freyhof 2007). Celkem osmnáct z nich se vyskytuje v mediteránní oblasti a na Iberském poloostrově, zbylých sedm druhů se vyskytuje ve střední Evropě, v povodí Dunaje a v evropské části Ruska (Bohlen et Ráb 2001).

Podle recentních studií je rod *Cobitis* v Evropě reprezentován pěti hlavními mitochondriálními liniemi. Jsou to: bazální „Sibiřská linie“, její sesterská „Jadranská linie“ (v originálu „Adriatic lineage“), dále linie „*Iberocobitis*“, „*Bicanestrinia*“ a „*Cobitis s. str.*“, jež zatím nemá zcela vyjasněné fylogenetické vztahy (Perdices et Donario 2001). Pokud by byla linie *C. calderoni* chápána jako samostatná, zvýšil by se počet hlavních mitochondriálních linií na šest. Nejrozšířenější skupinou sekavců je *Cobitis s. str.*, jež obývá území od západní Francie k Volze v Evropě (Janko et al. 2007), na jih zasahuje podél západního břehu Černého moře až do evropské části Turecka, izolovaně pak jezera Stephanis v Řecku a řece Vardar (Bohlen et al. 2006a, Kottelat et Freyhof 2007). Kromě těchto mitochondriálních linií byl nedávno popsán monotypický podrod *Beysehiria*, jako endemická skupina z jezera Beysehir v Anatólii (Erkakan et al. 1999).

Linie *Bicanestrinia*, do níž náleží druh *C. strumicae*, je považována za endemickou skupinu Blízkého východu a Balkánu a obývá tak území od západního Iránu po Řecko, s výjimkou horských oblastí, systému řeky Vardar, jihozápadního pobřeží Černého moře a

oblasti západní Anatólie, ve kterých se vyskytuje linie *Cobitis s. str.* Území Blízkého východu je považováno za původní areál linie Bicanestrinia, odkud se tyto sekavci dále šířili do evropských povodí (Bohlen et al. 2006a). V předchozích fylogenetických studiích se linie Bicanestrinia jevila jako monofyletická skupina společně s druhy linie *Cobitis s. str.* (Perdices et Doadrio, 2001). Bohlen et al. (2006a) potvrdili výskyt čtyř monofyletických mitochondriálních skupin v rámci areálu linie Bicanestrinia: Bicanestrinia Lineage I s druhy *C. linea* (Heckel, 1846-49), *C. elazigensis* (Coad et Sarieyyüoglu, 1988) a *C. levantina* (Krupp et Moubayed, 1992), rozšířená od Mezopotámie po východní Turecko, Bicanestrinia Lineage II s druhy *C. arachthosensis* (Economidis et Nalbant, 1996), *C. hellenica* (Economidis, 1991), *C. trichonica* (Stephanidis, 1974), *C. meridionalis* (Karaman, 1924) s výskytem v západním Řecku, Bicanestrinia Lineage III s druhy *Cobitis punctilineata* (Economidis et Nalbant, 1996) a *C. strumicae*, Bicanestrinia Lineage IV s druhy *C. turcica* (Hanko, 1924) a *C. biseli* (Battalgil, 1942), která se vyskytuje na rozlehlém území od Mezopotámie po úmoří Jaderského moře. Recentní výskyt jednotlivých podskupin linie Bicanestrinia nepotvrzuje překrývání areálu linií I-IV. Takováto striktně alopatická distribuce naznačuje, že hlavní roli v jejich diverzifikaci hrála vikariance, konkrétně vyzvednutí horských masívů pod tlakem Africké litosférické desky v období Miocénu, jež podpořilo izolaci jednotlivých linií Bicanestrinia I-IV mezi sebou i mezi *Cobitis s. str.* V (Bohlen et al. 2006a).

Obr.3.: Geografická distribuce pěti hlavních mitochondriálních linií rodu *Cobitis* (Bohlen et al. 2006a)



2.3 Diverzita rodu *Cobitis*

V Evropě je popsána mnohem větší diverzita sekavců na jihu, než severní polovině Evropy. Tento model se shoduje s geografickou diverzitou jiných sladkovodních živočichů, např. rodu *Barbus* (Donario et al. 2002) a *Thymalus* (Sušnik et al. 2001). Příčinou je pravděpodobně efekt četných zalednění v Pleistocénu, kdy sněhová pokrývka a permafrost učinili většinu území severně od horských oblastí (viz níže) neobyvatelné pro většinu organismů. Druhy tak opakovaně ustupovaly na jih a zpět. Naopak oblast mediteránu byla v těchto dobách již klimaticky poměrně stabilní a umožnila „poklidnou“ speciaci a endemismus. Sekavci jsou toho dobrým příkladem. U sekavců, jakož i jiných sladkovodních ryb, tvoří hranici mezi jižní (zejména mediteránní) a severní polovinou Evropy pohoří Pyreneje, Alpy, Dinárské hory a východní Balkán. Povodí Dunaje fungovalo jako refugium, a proto obsahuje vysoký počet druhů i dnes (Bănărescu 1990). Co se týče fauny sekavců, vykazuje Dunaj přechodné rysy. Obsahuje jak druhy, jež sdílí s východním Balkánem, tak druhy centrální a východní Evropy (Bohlen et Ráb 2001).

Diverzitu sekavců v Evropě zvyšuje přítomnost mezidruhových hybridů (zejména mezi druhy linie *Cobitis s. str.*) s gynogenetickým mechanismem rozmnožování. Tito hybridy, respektive klonální samice, žijí společně s biparentálně se rozmnožujícími druhy v jedné populaci a využívají samce druhu pro svou reprodukci (Bohlen et Ráb 2001). Jelikož je morfologická identifikace těchto hybridů téměř nemožná, k určení druhů a hybridů se využívají genetické markery (Ráb 2000, Bohlen et Ráb 2001, Janko et al. 2007, DeGelas et al. 2008).

Na území východního Balkánu, evropské části Turecka a přilehlé Malé Asie je zaznamenán výskyt 11 druhů sekavců (Bohlen, 2006a). V Dunajských přítocích žije vzácně *C. elongata* (Heckel et Kner, 1858, Adriatic lineage). Zde je rovněž rozšířen druh *C. elongatoides* (Bacescu et Maier, 1969, *Cobitis s. str.*) a dále nalezen v řece Kamčia (černomořský tok) (Janko et al. 2007). V Dunaji bulharského břehu byl nalezen druh *C. tanaïtica* (Bacescu et Maier, 1969 *Cobitis s. str.*) (Choleva et al. 2008), blízce příbuzný druh *C. taurica* resp. *C. pontica* (Vasilieva et Vasiliev, 2006) žije v řece Veleka (*Cobitis s. str.*) (Janko et al. 2005). Vzácným druhem je zde *Cobitis puncticulata* (Erkakan, Ekmeçi et Nalbant, 1998, Bicanestrinia), jehož výskyt byl popsán v povodí jezera Manyas v severozápadní Anatolii (Turecko) (Erk'akan et al. 1998, Vasilieva et Vasiliev 2006). Freyhof et al. (2008) popsali nově tento druh i v povodí dolního toku řeky Evros (Řecko) a

v řece Ulubat (západní Anatólie). Dalším druhem, jenž se vyskytuje na zmíněném území, je *Cobitis punctilineata* (Economidis et Nalbant, 1996; Bicanestrinia), patří do stejné skupiny Bicanestrinia Lineage III spolu s druhem *C. strumicae* (Bohlen et al. 2006), s výskytem omezeným na povodí řeky Aggitis, jedná se o levostranný přítok řeky Struma v Řecku. Tato krasová oblast naznačuje silnou historickou izolaci od řeky Struma a vysokou míru endemismu (např. Šedivá et al. 2010b). Dominantním druhem obývajícím území Malé Asie a Bulharska je nicméně *C. strumicae*, jehož původ (předek) je doložen z oblasti Blízkého Východu (Bohlen et al. 2006a). Rozšíření druhu je zaznamenáno v Řecku od východní Makedonie: povodí řeky Strymon, jezero Volvi a Koronia, systém řek Nestos, Bospos, Filiouros a Evros (Economidis 1996) (Obr. 4). Kromě Řecka se *C. strumicae* dále vyskytuje v Bulharsku v téměř všech dunajských přítocích, v povodí řeky Struma a přítocích Černého moře, s výjimkou řeky Veleka (Bohlen et al. 2006a, Janko et al. 2007a, Choleva et al. 2008).

Obr. 4: Areál rozšíření druhu *Cobitis strumicae* (IUCN 2010). Mapa znázorňuje východního Balkánského poloostrova (území dnešního Bulharska, Řecka a evropské části Turecka).



2.4 Migrační trasy druhu *Cobitis strumicae*

Na studovaném území východního Balkánu se protíná několik vzájemně si nepříbuzných linií. Zatímco druhy skupiny *Cobitis* s str., a zřejmě také Adriatické linie migrovaly do Evropy, potažmo na Balkán transsibiřsky, předci zástupců linie Bicanestrinia přimigrovali na Balkán z oblasti Blízkého Východu přes Malou Asii (Bohlen et al. 2006a). Poté došlo k protnutí a překrytí historických areálů a rozšíření linií (Bohlen et al. 2006a). Toto rozšíření poskytuje výborný model studia vlivu vikariance, kolonizace a lokální izolace na speciaci sladkovodních ryb celého území (Bohlen et al. 2006a). Dále umožňuje osvětlit fylogenetickou příbuznost fauny Malé Asie a Balkánu s faunou okolních oblastí (například mohutného evropského říčního systému Dunaje), což pomůže k detailní biogeografické rekonstrukci tohoto území (Bohlen et al. 2006a).

U druhu *C. strumicae* není přímá migrační cesta z jihu na sever přes přírodní bariéry, jež tvoří pohoří Staré Planiny v Bulharsku a Rodopy v Řecku, vyloučena, avšak je díky vysokému stáří pohoří, jež tvořilo stabilní geografickou bariéru, velice nepravděpodobná. Recentní literatura uvádí na základě genetické variability studovaných druhů tři základní migrační hypotézy pro Balkánský poloostrov jako takový. Podle těchto hypotéz probíhaly teoretické migrační cesty mezi Dunajem a Balkánem přes území dnešního i) Chorvatska, ii) Albánie, nebo iii) Srbska. Recentní publikace tyto cesty potvrzují. Zaměříme-li se na východní část Balkánského poloostrova od Černého moře po řeku Lom na severu a řeku Struma na jihu, patrně jsou přinejmenším dvě potenciální migrační trasy mezi oblastí mediteránu a povodím Dunaje. První z nich se jeví trasa mezi dolním Dunajem podél šelfu Černého moře a oblastí povodí řeky Maritza (Evros). Naznačují ji studie u několika druhů ryb, jejichž zástupci sdíleli haplotypy napříč územím, například u hořavek rodu *Rhodeus* (Bohlen et al. 2006b) či plotic rodu *Rutilus* (Kotlík et al. 2008). Také v rodu sekavec sdílí přinejmenším dva druhy toto rozšíření (Bohlen et al. 2006a, Kottelat et Freyhof 2007). Druhé hypotetické propojení jihu a severu napříč Balkánem naznačila Šedivá et al. (2010b) na příkladu mřenky *Oxynoemacheilus bureschi* (Balitoridae, Teleostei), jež obývá relativně malé území a vyskytuje se zejména ve třech říčních systémech: Vardar, Struma a Mesta, nicméně také ve dvou drobných tocích povodí Iskar (jež teče do Dunaje). Teoreticky zde tedy mohlo existovat i toto propojení řek, díky němuž byly sladkovodní organismy schopny migrovat napříč Balkánem, konkrétně mezi řekou Strumou (ústí do Egejského moře) a přilehlými dunajskými přítoky (Šedivá et al.

2010b). Na stranu druhou, přítomnost “dunajských“ druhů v řekách Struma a Mesta je výjimečná (Šedivá et al. 2010b).

Zjevné historické propojení umožňující migraci muselo existovat rovněž v rámci východního Balkánu jako takového. Kupříkladu právě *C. strumicae* dnes obývá jak dunajské přítoky, tak řeky tekoucí do Černého moře ale i řeky tekoucí do moře Egejského (Bohlen et al. 2006a). Většina diverzity sladkovodních ryb se na území centrálního Balkánského poloostrova vyskytuje ve třech hlavních říčních systémech (Šedivá et al. 2010a). Ze západu na východ to jsou řeky Vardar (Axios), Struma (Strymon) a Mesta (Nestos). Také složení sladkovodní fauny řek Struma a Mesta je si navzájem podobné. Například Šedivá et al. 2010a uvádí nízký genetický polymorfismus mezi populacemi *Oxynoemacheilus*, což naznačuje, že tyto populace recentně sdílely společného předka, nebo u nich docházelo ke genovému toku (migraci). Ichtiofauna řeky Vardar je však nápadně rozdílná (Šedivá et al. 2010a). V této řece se vyskytuje mnoho druhů ryb s blízkou příbuzností k taxonům povodí Dunaje, pravděpodobně díky dřívějšímu spojení těchto dvou vodních systémů na hranici plio-pleistocénu (Economidis et Bănărescu 1991). Několik taxonů ryb se nicméně vyskytuje ve všech povodích řek Vardar (Axios), Struma (Strymon) a Mesta (Nestos) (Šedivá et al. 2010a). Tyto druhy pravděpodobně kolonizovaly východní Balkánský poloostrov z oblasti Malé Asie krátce po uzavření moře Tethys a poté došlo k jejich izolaci v řekách (Šedivá et al. 2010a). Biogeografická distribuce druhů, respektive haplotypů již řady druhů, naznačuje jisté migrační cesty a možná historická propojení dnes izolovaných říčních systémů. Studium kolonizačních scénářů sladkovodních druhů zájmové oblasti však dosud chybí.

2.5 Cíle práce

Druh *C. strumicae* je rozšířen napříč východním Balkánem a dnes obývá jak povodí Dunaje v Bulharsku, tak samostatné toky Bulharska do Černého moře a řeky povodí moře Egejského v Thrácii. Předchozí studie přitom naznačuje, že předek druhu (linie) přimigroval z Blízkého Východu, Malou Asií. Považujeme-li dnešní oblast povodí řeky Maritza (Evros) za oblast, kam imigroval předek a kde došlo ke speciaci, následně muselo dojít k další migraci a osídlení západního pobřeží Černého moře, jižních přítoků

dolního Dunaje, toků Řecké Thrácie při Egejském moři dále na západ či řeky Strumy. Kolonizační scénář je však neznámý. Studium vnitrodruhové variability druhu *C. strumicae* chceme v této diplomové práci identifikovat populační strukturu a geografickou distribuci jednotlivých genetických linií tohoto druhu a verifikovat jejich taxonomickou pozici. Dalším cílem je přinést nové poznatky týkající se fylogeografie druhu a přispět k detailní biogeografické rekonstrukci studovaného území, odvodit kolonizační scénář Dunaje a západního areálu rozšíření, potvrzením jedné z alternativních hypotéz, zda migrační trasa druhu do povodí Dunaje probíhala: a) severovýchodní cestou podél šelfu Černého moře, b) jihozápadně Řeckou Thrácií po řeku Struma a samotnou Strumou severně proti toku řeky a následným „river-capture“ do dunajských přítoků, c) oběmi migračními cestami.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Původ vzorků

Zpracované vzorky druhu *C. strumicae* pocházejí ze vzorkování studovaného území při terénních expedicích v letech 2005-2009. Sběr a morfologickou identifikaci těchto vzorků prováděl především RNDr. Lukáš Choleva, Ph.D. Část bulharských vzorků pak byla získána od kolegů z Bulharska, jmenovitě dr. Apostolos Apostolou, dr. Teodora Trichkova, dr. Petya Ivanova.

K analýzám mitochondriálního genu cytochrom *b* (dále jen cyt *b*) bylo použito 248 jedinců *C. strumicae*. Ryby pocházely ze 44 lokalit Turecka, Řecka a Bulharska (Příloha 1). Lokality zahrnují 7 řek povodí Dunaje v Bulharsku, 6 pobřežních bulharských řek tekoucích přímo do Černého moře a 18 řek Bulharska a (nebo) Řecka, které náleží úmoří Egejského moře. Analýzy jaderného genu *S7* byly provedeny z 94 jedinců z 29 lokalit, z 5 řek povodí Dunaje v Bulharsku, 5 pobřežních bulharských řek tekoucích přímo do Černého moře a 11 řek Bulharska a (nebo) Řecka, které náleží úmoří Egejského moře. Jedinci byli vybráni tak, aby co nejlépe pokryli druhový areál rozšíření. Z některých dalších jedinců se nepodařilo amplifikovat DNA produkt, zřejmě z důvodu předchozí špatné fixace a skladování vzorků, zejména kolegů z Bulharska. Seznam lokalit a počet jedinců na jednotlivých lokalitách je uveden v Příloze 5.

3.2 Výběr molekulárních markerů a volba molekulárních technik

3.2.1 Využití mitochondriálního markeru

Mitochondriální DNA je zatím pravděpodobně jednou z nejpobulárnějších molekul s nejefektivnějšími výstupy pro široké spektrum fylogenetických, fylogeografických a populačně genetických studií. Velká část studií mapujících DNA variaci v přírodních populacích zkoumá mtDNA, protože se jedná o relativně malou kruhovou molekulou

(přibližně 16 500 bází u obratlovců) (Brown et al. 1979), kterou lze snadno izolovat z genomické DNA. Navíc se v buňce vyskytuje jen jeden typ v tisících kopiích (Awise 1994). Využívání sekvencí mtDNA ve fylogenetických studiích je dáno několika dalšími charakteristikami: mtDNA je haploidní a uniparentálně (maternálně) děděná u většiny druhů, ve srovnání s jadernými sekvencemi má mtDNA 5–10x vyšší evoluční rychlost (Brown et al. 1979), až na výjimky (Ladoukakis et Zouros, 2001; Guo et al. 2006) nerekombinuje, většina substitucí se vyskytuje v podobě bodových mutací, a vzácněji v podobě inzercí/delecí (Awise 1994), navíc se vyznačuje absencí intronů a minimem nekódujících oblastí. Mitochondriální DNA u ryb (resp. většiny živočichů) obsahuje 37 genů: dva ribosomální geny (rRNA), 13 protein-kódujících genů a 22 transferových RNA (tRNA) genů (Boore, 1999).

Různé regiony se uvnitř mitochondriálního genomu vyvíjejí různou rychlostí, proto lze zvážit, který použijeme pro určitou studii. Pro analýzy vyšší systematické úrovně (podčeleď, čeleď, nadřád, řád) jsou u ryb používány především mírně konzervativní regiony, jako je velká (16S) a malá (12S) podjednotka ribosomální DNA (Hillis et Dixon 1991, Wiley et al. 1998, cit in Orrell 2000). Pro analýzu blízké příbuzných taxonů, kde vzrůstající variace může reflektovat nedávné evoluční události, je používán control region, který zahrnuje displacement (D)-loop s vysoce variabilní nekódující částí mezi velmi konzervativními funkčními oblastmi (Lockhart et al. 1995). Pro fylogenezi taxonů na úrovni čeledi a rodu mohou být vhodnější jiné mtDNA geny jako ATPase6, ATPase8, cytochrom *b* nebo NADH(*n*), protože tyto geny jsou variabilnější než rRNAs nebo COI, ale jsou méně variabilní než D-loop. Neplatí to ale všeobecně. Z mtDNA protein-kódujících genů se cytochrom *b* jeví jako robustní evoluční marker, odhalující fylogenetické vztahy na různých taxonomických úrovních u ryb (Schmidt et al. 1998, Cantatore et al. 1994, Finnerty et Block, 1995, cit. in Orrell, 2000).

V předkládané diplomové práci byl zvolen pro fylogenetické analýzy jeden mitochondriální marker, a to právě cytochrom *b* (*cyt b*). *Cyt b* patří k nejvyužívanějším markerům v těchto typech studií. V rámci rodů *Cobitis* bylo dosud publikováno několik dílčích prací, které tento marker využívají (např. Janko et al. 2007, Buj et al. 2008, Choleva et al. 2008).

3.2.2 Využití jaderného markeru

Pro komplexnější pochopení vztahů mezi jedinci druhu *C. strumicae* byla využita i fylogenetická informace, kterou poskytoval single-copy nuclear locus 1. intronu S7 ribozomálního proteinu (S7). Jaderná DNA je alternativou k mtDNA jako zdroj genů, ze kterých lze dovozovat nezávislé fylogenie. Jaderná DNA se od mtDNA liší především svou lokalizací v buňce, strukturou, sekvencí, množstvím obsaženém v buňce a způsobem dědičnosti (Butler, 2005). Mnoho jaderných genů obsahuje v důsledku rekombinací inserce/delece (indely) a introny, které často komplikují amplifikaci celého genu během PCR. Inzertovaná DNA a introny mohou přerušit kódující region genu nebo také zvětšit velikost amplifikovaného produktu. Pokud indel naruší primerové vazebné místo, může inhibovat amplifikaci genu. První intron S7 ribozomálního proteinu začíná být v současnosti hojně využíván v systematických a taxonomických studiích čeledi Cobitidae, jakož i jiných čeledí ryb (Bernardi et Lape, 2005, Choleva 2008, Janko 2007, Perdices 2007). S rostoucím počtem studií věnovaných jaderným intronovým sekvencím začínáme více chápat a odborněji vyhodnocovat jejich užitečnost a také posuzovat sílu fylogenetického signálu v tomto jaderném genetickém materiálu. Chow et Hazama (1998) navrhli využívat tento marker pro studium genetické struktury uvnitř druhů a také pro zkoumání fylogenetických vztahů u blízce příbuzných druhů díky významným vnitrodruhovým rozdílům v 1. a 2. intronu genu S7 v populacích *Thunnus albacares* (Bonnaterre, 1788).

3.2.3 Volba molekulárních technik

V předkládané diplomové práci bylo použito těchto molekulárně-biologických technik:

- Izolace DNA
- Polymerázová řetězcová reakce (PCR)
 - úseku mitochondriální (mt)DNA
 - intronů jaderné (n)DNA
- Elektroforéza na agarózovém gelu
- Purifikace
- Metoda přímého sekvenování

3.2.4 Izolace DNA

DNA byla získána z ploutví a svaloviny, uchovávaných v ethanolu (98%), zmražených vzorků a živých ryb chovaných v akváriích v areálu UŽFG AV ČR, v.v.i. Liběchov. Před izolací byly vzorky kompletně zbaveny ethanolu, který by mohl negativně ovlivňovat průběh dalšího zpracování tkáně. Izolace DNA byla provedena standardním způsobem pomocí DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Získaná DNA byla uchovávána při teplotě - 20°C.

3.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda PCR (Polymerase Chain Reaction) umožňuje amplifikaci vybrané sekvence DNA pomocí opakování cyklů separace a replikace řetězce DNA (Clark, 2005). Hlavní složky potřebné pro uskutečnění této reakce jsou templátová DNA, primery, které umožní polymeráze nasednout na templát a ohraničí vybranou sekvenci na 3' a 5' konci DNA a jsou potřebné k inicializaci reakce, DNA polymeráza, dNTPs (deoxynukleotid trifosfáty) z nichž vznikají nové řetězce DNA a pufr, který upraví chemické prostředí potřebné pro správnou funkci polymerázy. Takováto PCR reakční směs je v termocykleru zahřívána a ochlazována na teploty, potřebné pro jednotlivé kroky reakce, kterými jsou denaturace DNA a nasednutí primerů a polymerázy a prodlužování primerů. Tyto kroky se opakují mnoha, předem definovaných cyklech, čímž je dosažena mnohonásobná amplifikace daného úseku DNA. Gen *cyt b* byl amplifikován pomocí primerů L15267, ThrR, L1 a H2. Sekvence primerů jsou uvedeny v Obr. 5. Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla prováděna v objemu 25µL. PCR reakční směs obsahovala:

- 5µL DNA
- 1µL každého z dvojice použitých primerů,
- 12,5 µL PPP Master Mixu společnosti Top-Bio (2x koncentrovaný reakční pufr s 4 mM MgSO₄, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, Taq DNA polymerázu (50 U/ml), monoklonální protilátka anti-Taq, SYBR Green I, stabilizátory a aditiva) a
- 5,5 µL PCR H₂O společnosti Top-Bio

PCR byla prováděna za následujících podmínek: 2 min při 93°C, 40x (1 min při 93°C, 1 min při 46°C, 1 min při 72°C), 10 min při 72°C, 5 min při 4°C. Jaderné geny byly

amplifikovány u jedinců, jejichž haplotypy genu *cyt b* se od sebe výrazně lišily. K získání fragmentu z jaderného genu *S7* byly použity univerzální primery *S7RPEX1F* a *S7RPEX2R* (Obr. 5) Složení PCR reakční směsi bylo následující:

- 10 μ L DNA,
- 2 μ L primeru *S7RPEX1F*, 2 μ L primeru *S7RPEX2R*,
- 25 μ L PPP Master Mixu společnosti Top-Bio (2x koncentrovaný reakční pufr s 4 mM MgSO₄, 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, Taq DNA polymerázu (50 U/ml), monoklonální protilátka anti-Taq, SYBR Green I, stabilizátory a aditiva) a
- 11 μ L PCR H₂O společnosti Top-Bio

PCR byla prováděna za následujících podmínek: 2 min 94°C, 36x (30s při 94°C, 1 min při 60°C, 1 min při 72°C), 8 min při 72°C, 5 min při 4°C. PCR reakce probíhaly v cykleru Techne TC-4000 Thermal Cyclers (Bibby Scientific). U každé PCR byla pro ověření provedena negativní kontrola (bez DNA).

Obr. 5: Seznam použitých primerů a jejich sekvence

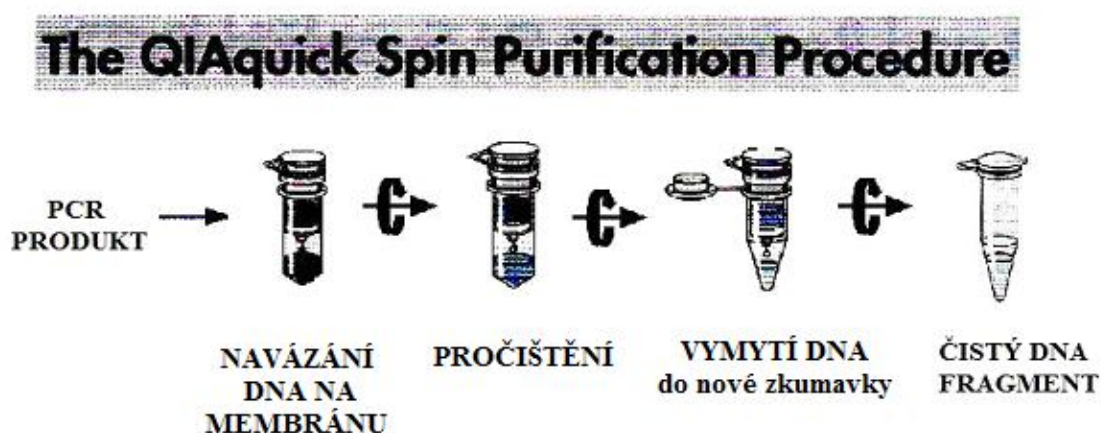
Název primeru	Sekvence	Citace
<i>S7RPEX1F</i>	TGGCCTCTTCCTTGGCCGTC	Chow et Hazama (1998)
<i>S7RPEX2R</i>	AACTCGTCTGGCTTTTCGCC	Chow et Hazama (1998)
L15267	AATGACTTGAAGAACCACCGT	Tsigenopoulos et Berrebi (2000)
ThrR	ACCTCCGATCTTCGGATTACAAGACCG	Doadrio et al. (2002)

3.2.6 Elektroforéza na agarózovém gelu, purifikace

Hrubé rozdělení amplifikovaných fragmentů DNA dle velikosti a tím i kontrola výsledku PCR byla provedena s pomocí horizontální elektroforézy na 0,8% agarózovém gelu při 100V, po dobu přibližně 30 minut. Během této doby migrují vzorky DNA směrem ke kladné elektrodě a dělí se dle velikosti. Po dokončení elektroforézy byly vzorky na gelu zanalyzovány pod UV zářičem, kde je lze díky navázanému barvivu REDgreen pozorovat jako světlé proužky na tmavém podkladě. Vzorky jevící se jako pozitivní (tj. proběhla u nich správná amplifikace) byly použity k následujícím krokům – purifikaci a sekvenaci. U negativních vzorků, nebo vzorků s nízkou koncentrací bylo nutné opakovat PCR reakci se změněnými parametry reakční směsi (zvýšené množství DNA na úkor PCR H₂O). Pozitivní PCR produkty byly přečištěny pomocí kitu QIAquick PCR purification Kit

(Qiagen), dle návodu výrobce. Tato sada umožňuje přímou purifikaci PCR produktů pomocí membránových zkumavek s využitím mikrocentrifugy a speciálních pufrů. Během jednotlivých reakcí je DNA očištěna od zbytků primerů použitých při PCR, dále také od nukleotidů, polymerázy a solí (viz Obr. 6). DNA byla vyeluována o 30 µl ddH₂O a uchovávána v -20 °C. Po přečištění DNA vzorků následovala druhá kontrolní elektroforéza. Podle známé koncentrace standardu, byla odečtena koncentrace přečištěného PCR produktu.

Obr. 6: Schéma kroků vedoucích k pročištění PCR vzorků dle QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Německo)



3.2.7 Metoda přímého sekvenování

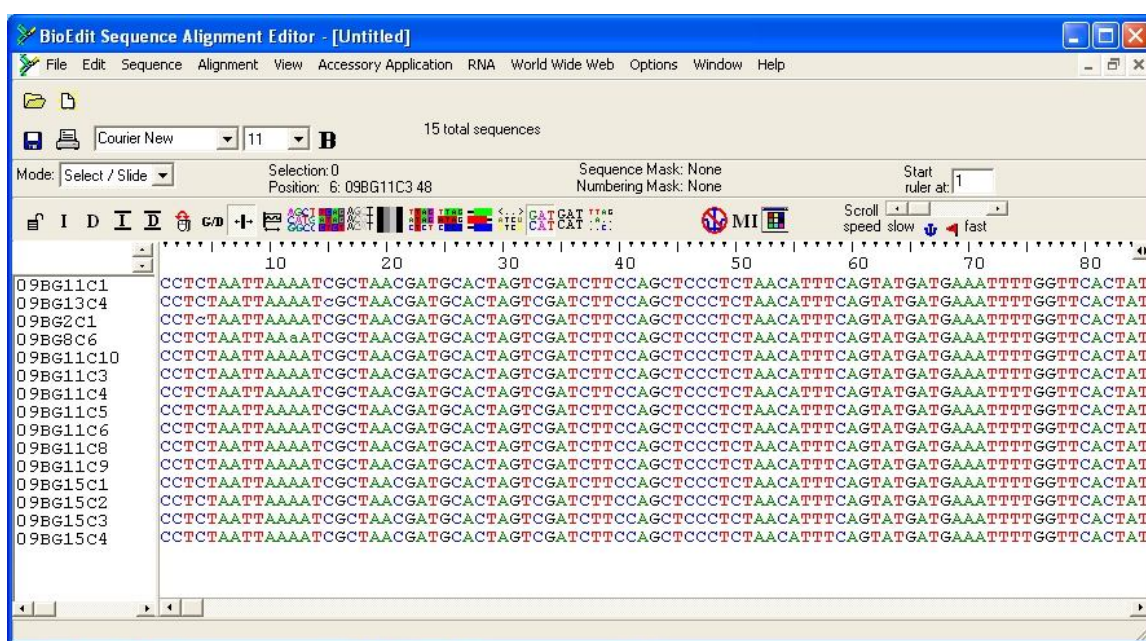
Sekvence byly získány přímým sekvenováním ve firmě Macrogen (Jižní Korea). Měření fluorescenčně obarvených nukleotidových fragmentů zde probíhala na automatickém DNA sekvenátoru (ABI Prism 377, Applied Biosystems). Primery použité pro sekvenování byly stejné jako při PCR reakci. Analyzovaný fragment mitochondriální DNA každého vzorku byl sekvenován z obou 3' a 5' konců, u genu S7 byly vzorky sekvenovány z 3' konce.

3.3 Zpracování dat

Pro práci se sekvencemi byly použity programy BioEdit (Biological sequence alignment editor v. 7.0.9.0 (Hall, 1999) (Obr. 6), aplikace ClustalW (Thompson et al.

1994) a Chromas 2.33 (dostupný na <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). DNA sekvence byly alignovány v programu BioEdit, u cyt *b* bez nutnosti úpravy delecí a insercí. Kontrolní identifikace sekvencí byla prováděna srovnáváním s publikovanými sekvencemi kompletního genu cyt *b* a S7 druhu *C. strumicae* a *C. punctilineata*, dostupnými v internetové databázi „National Center for Biotechnology Information BLAST” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Accession no. AY191575.1, AY191579.1, EU295701.1).

Obr. 6: Ukázka editace a alignmentu sekvencí v programu BioEdit.



Nalezené SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) - substituce, delece, inserce - byly zkontrolovány podle chromatogramů a případné chyby byly korigovány. Pro následné analýzy byla každá sekvence upravena tak, aby vždy začínala první pozicí tripletu a končila třetí pozicí tripletu. Po seřazení a upravení genů byly všechny sekvence přepsány do proteinů v programu MEGA v. 4.1 (Kumar et al. 2004), za využití univerzálních tripletových kódů pro obratlovce k nalezení případných stop kodonů v genu. Pro výpočet vnitrodruhové a mezidruhové sekvenční variability byl použit program MEGA v. 4.1 (Kumar et al. 2004) a DnaSP v. 5.10.01 (Rozas et al. 2003). V tomto programu byly rovněž kalkulovány průměrné a net genetické vzdálenosti v genu cyt *b*, jak mezi fylogeneticky vymezenými skupinami populací *C. strumicae*, tak mezi tímto druhem jako takovým a druhem *C. punctilineata*. Genetická variabilita byla určena na základě nukleotidové

diverzity P_i a haplotypové diverzity H_d , které byly počítány podle počtu polymorfních míst v sekvencích. McDonald–Kreitman (MK) test (McDonald et Kreitman, 1991) a neutrality index (NI) byl kalkulován pro test neutrality v mezidruhové sekvenční divergenci programem DnaSP v. 5.10.01 (Rozas et al. 2003).

3.3.1 Datasetsy

Pro každý gen byl vytvořen dataset, který obsahoval sekvence všech analyzovaných jedinců. Dataset genu *cyt b* genu obsahoval 250 sekvencí, dataset genu *S7* obsahoval 95 sekvencí. Dále byly vytvořeny datasetsy, které zahrnovaly po jednom zástupci každého unikátního haplotypu. Pro fylogenetické analýzy (Maximální Parsimonie (MP) a NeighbourJoining (NJ), byly tyto datasetsy upraveny tak, aby vždy každá sekvence začínala první tripletovou pozicí a končila třetí tripletovou pozicí. Pro Bayesiánskou analýzu (BA) byly navíc vytvořeny datasetsy prvních, druhých a třetích tripletových pozic jednotlivých genů a pro každý dataset vypočítán nejvhodnější evoluční model (viz dále).

3.3.2 Fylogenetické analýzy

Pro znázornění nejpravděpodobnějšího evolučního scénáře, odpovědného za distribuci daných haplotypů (linií) byly vytvořeny fylogenetické stromy separátně pro každý gen zvlášť. Pro fylogenetické analýzy byly použity programy Network v. 4.5.1.6. (Huson et Bryant 2006, Fluxus Technology Ltd 1999-2009), PAUP v. 4.0b10 (Swofford 2002) a MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist et Huelsenbeck 2003). Programy vyžadovaly NEXUS formát vstupních datasetsy (file.nex), který byl generován programem BioEdit. V analýzách byly využity algoritmy Markov Chain Monte Carlo (MCMC), konkrétně NeighbourJoining (NJ, Saitou et Nei 1987), Maximum Parsimony (MP, Cavalli-Sforza et Edwards 1967), Maximum Likelihood (ML) a Bayesiánská metoda. Pro konstrukci a zakořenění fylogenetických stromů byla k datasetům přidána výše zmíněná sekvence příslušného úseku genů *cyt b* a *S7* z kompletní sekvence mitochondriálního a jaderného genomu druhu *C. melanoleuca*.

3.3.3 Network

Fylogenetické stromy odrážejí vztahy mezi jednotlivými haplotypy. Pokud je v populaci přítomná hybridizace, může však být tato situace zkreslená (např. Gómez-Zurita et Vogler 2006). Retikulující sítě umožňují spojení s několika blízkými příbuznými jedinci a mohou tak lépe reflektovat hybridní původ haplotypů (Gómez-Zurita et Vogler 2006). Jako první přístup byl proto použit program Network v. 4.5.1.6. (Fluxus Technology Ltd 1999-2009) a fylogenetická síť kalkulována nastavením Median-Joining network algoritmu, separátně vytvořená pro gen *cyt b* a *S7*. Tento přístup zohledňuje všechny sledované mutace v sekvencích daných haplotypů a dobře znázorňuje všechna možná potenciaální spojení mezi haplotypy. Program dále umožnil vizualizovat proporční zastoupení jednotlivých haplotypů v datasetu.

3.3.4 Metoda Neighbour-Joining (NJ)

Ke konstrukci fylogenetických stromů distanční metodou Neighbour-Joining (Saitou et Nei 1987) byl použit program PAUP v. 4.0b10. Neighbour-Joining je vzestupná klastrovací metoda, kde algoritmus počítá s distancemi mezi každým párem taxonů ve stromu. Věrohodnost všech větví byla počítána bootstrapovou podporou s 500 opakováními. Ve výsledném kladogramu byly vykresleny pouze větve s podporou větší než 50 %.

3.3.5 Metoda Maximum parsimony (MP)

Metoda MP generuje fylogenetické stromy na základě nejnižšího počtu evolučních změn vysvětlujících předložená data (Sullivan et Swofford 2001). K vyhledávání stromů pomocí metody MP a jejich statistickému hodnocení metodou bootstrapování byl použit program PAUP* 4.0b10. Nejparsimoniálnější fylogenetický strom byl vyhledán metodou heuristického hledání s náhodným přidáváním sekvencí, pomocí tzv. TBR algoritmu (Tree Bisection/Reconnection). Algoritmus zaměňoval jednotlivé větve stromů a zachovával předchozí dva stromy před každou další záměnou (příkaz: „Hsearch addseq=random hold=2 swap=TBR nrep=100“). Spolehlivost správné topologie byla odhadnuta na základě bootstrapingu s 500 opakováními. Algoritmus záměny větví byl stejný jako základní analýza TBR algoritmu, jen s tím rozdílem, že před každou další záměnou zachovával

pouze jeden strom, a věrohodnost všech větví byla počítána bootstrapovou podporou s 10 opakováními. Ve výsledném kladogramu byly vykresleny pouze větve s podporou větší než 50 % (příkaz: bootstrap search=heuristic nrep=500 conLevel=50).

3.3.6 Analýza Isolation with Migration

Velikost a směr historického genového toku byly odhadnuty s dvou-populačním isolation-with-migration (IM) modelem (Nielsen et Wakeley 2001, Hey et Nielsen 2004). Byla použita Bayesiánská koalescenční metoda, která aproximuje integraci přes možné genealogie, využitím Markov Chain Monte Carlo (MCMC) simulace. Metoda odhaduje posteriorní pravděpodobnostní distribuce pro demografické parametry zahrnující dvou-směrné migrační míry, čas divergence a efektivní populační velikosti dvou současných populací a jedné ancestrální populace (Hey et Nielsen 2004). Pro test migrace a kolonizace Dunaje druhem *C. strumicae* z Egejské oblasti dvěma možnými cestami (viz kapitola Cíle práce) jsme vytvořili separátní dataset pro mitochondriální cyt *b* a jaderný S7 gen. Analyzována byla následná kombinace párů populací: a) všichni jedinci povodí Maritza (Evros) a Lissos ku všem jedincům Černého moře a dunajské Jantry (Egejské moře x Černé moře) a všichni jedinci povodí Strumy versus sekvence všech jedinců povodí Dunaje (povodí Strumy x povodí Dunaje). Podle AIC kritéria byl vybrán Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) mutační model. Pro každou analýzu nejprve běžely startující priors pro odhad rozsahu posteriorních densit parametrů a na základě těchto běhů byly definovány užší hranice, aby posteriorní distribuce kompletně padaly do distribuce prioru (Won et al. 2005). V případě plochých konců probabilit byla definována horní hranice podle předchozích běhů: za předpokladu, že ancestrální populace nebyla větší než kombinace dvou dceřinných populací po zohlednění horní 95% nejvyšší posteriorní distribuce (HDP) pro daný parametr (Peters et al. 2007). Byly spuštěny tři nezávislé běhy s osmi řetězci s Metroplis coupling ke zvýšení mixingů (Slatkin 2005), každý s burn-in periodou 100,000 aktualizací a celkovou délkou slespoň 30 milionů aktualizací. Analýza konvergovala na stacionární distribuci, když nezávislé běhy generovaly podobné posteriorní distribuce (Hey 2005), současně byla kontrolována autokorelace a efektivní velikost vzorku (ESS) pro každý parametr (Hey et Nielsen 2004), dokud hodnota ESS pro každý parametr nedosáhla hodnotu přinejmenším 150. K testu, zda se odhadnuté migrační míry signifikantně liší od nuly, byl použit likelihood ratio test pro srovnání rozdílů mezi

pravděpodobností nulové migrace a nejlepšího odhadu migračních měr (Nielsen et Wakeley 2001).

3.3.7 Modeltest

Pro metodu Maximum Likelihood (ML) a Bayesiánskou analýzu (BA) byl pro každý datový soubor programem jModel test v. 3.06 (Posada et Crandall 1998) vygenerován vhodný evoluční model. Program hledá nejvhodnější model předložené datasety a následně modely testuje pravděpodobnostně-hierarchickým koeficientem (Hierarchical Likelihood Ratio Test - hLRT), zda nejsložitější vygenerovaný model nějak výrazně zvyšuje hodnotu pravděpodobnosti vzniku fylogenetického stromu při zvyšování stupňů volnosti (Posada et Crandall 1998). Pro Maximum Likelihood fylogenetické analýzy byl model vybrán pomocí Akaike Information Criterion pro korekci malých vzorků (AICc), pro Bayesiánské fylogenetické analýzy byl zvolen Bayesian Information Criterion (BIC). Pro Bayesiánské analýzy byly vytvořeny datasety separátně pro první, druhou a třetí pozici tripletu kodónu každého genu v programu MEGA v. 3.1 a každý dataset byl spuštěn v programu JModelTest pro výběr vhodného modelu separátně.

3.3.8 Metoda Maximum Likelihood (ML)

Metoda ML vyhledává vhodný fylogenetický strom pomocí vybraných parametrů daného evolučního modelu a délky větví fylogenetického stromu, který by byl maximálně shodný s pozorovanými daty (Von Haeseler et. Strimmer 2003). Vhodný model pro ML analýzu každého genu vygeneroval jModel test v. 3.06, analýza probíhala v programu Paup v. 4.0b10. Pro ML analýzu bylo nastaveno pro vyhledání vhodného stromu 100 opakování s bootstrapovou podporou 500 opakování. Pro gen *cyt b* byl podle AICc kritéria jModel testu vybrán model „TIM2+I+G“ s parametry Lset base=(0.2741 0.2318 0.1489 0.3452) nst=6 rmat=(3.1252 13.8127 3.1252 1.0000 30.5084 1.0000) rates=gamma shape=0.5930 ncat=4 pinvar=0.1510. Pro gen *S7* byl podle AICc kritéria jModel testu vybrán model „TrN+G“ s parametry Lset base= 0.3272 0.2117 0.1381 0.3231) nst=6 rmat=(1.0000 1.4602 1.0000 1.0000 2.7115 1.0000) rates=gamma shape=0.3810 ncat=4 pinvar=0.

3.3.9 Bayesiánská analýza (BA)

K tvorbě fylogenetických stromů na základě Bayesiánského přístupu byl použit program MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist et Huelsenbeck 2003). Tento program pracuje metodou Markov chain Monte Carlo - MCMC (Yang et Rannala 1997) a s „následnými“ pravděpodobnostmi (Altekar et al. 2004). Následné pravděpodobnosti vyjadřují pravděpodobnost vzniku jednotlivých linií u posledních analyzovaných stromů, které byly použity pro konstrukci konsenzuálního stromu. Datasetsy genů *cyt b* a *S7* byly analyzovány specifickým nukleotidovým modelem „Codon“, který počítal kodóny jako znaky. Sekvence genů *cyt b* a *S7* byly rozděleny na tři části – první, druhé a třetí kodónové (tripletové) pozice. Parametry modelu byly odhadnuty z datasetu s gamma nebo equal distribucí (příkaz: `lset applyto=(1) nst=6 rates=gamma; lset applyto=(2) nst=1, rates=equal; lset applyto=(3), nst=6 rates=equal`). Následné pravděpodobnosti fylogenetických stromů byly počítány u 1,000,000 generací Metropoliscoupled Markov chain Monte Carlo (four chains, chain temperature parameter = 0.2), jak je přednastaveno v programu. Stromy byly testovány každých 1000 generací, prvních 1000 vygenerovaných stromů bylo vyřazeno a z konečných 9000 vygenerovaných stromů byl vybrán konsenzuální strom. Standardní odchylka po každých vygenerovaných 3500 stromech byla nižší než 0,01.

3.3.10 TreeView

Ke grafické vizualizaci stromů a zakořenění stromů byl použit program TreeView v. 1.6.6 (Page 1996). Jako outgroup sloužila sekvence příslušného úseku genu *cyt b* z kompletní sekvence mitochondriálního genomu druhu *Cobitis melanoleuca* (Nichols, 1925; GenBank Accession no. EF508500.1), u genu *S7* byla využita vlastní sekvence jedince získaného z řeky Kubaň (Kavkaz, západní Rusko). Grafická úprava stromů pak byla provedena v programech CorelDraw 9 a Adobe Photoshop 7.0.

4 VÝSLEDKY

Hlavním cílem práce bylo identifikovat populační strukturu a geografickou distribuci jednotlivých genetických linií druhu *C. strumicae*, verifikovat jejich taxonomickou pozici, přispět k detailní biogeografické rekonstrukci studovaného území a odvodit kolonizační scénář Dunaje a západního areálu rozšíření, potvrzením jedné z alternativních hypotéz.

4.1 Molekulární analýzy a genetická variabilita

Molekulárními metodami bylo zanalyzováno celkem 248 vzorků DNA druhu *C. strumicae* ze 44 evropských lokalit. Osekvenované úseky genomu byly upraveny na výslednou délku 1103 bazí v případě mitochondriálního genu a 670 bazí u jaderného genu. Významná genetická variabilita byla nalezena v obou genech.

Cyt *b*: Gen *cyt b* obsahoval celkem 214 (19,4%) polymorfních segregujících míst s celkovým počtem 230 mutací (Příloha 8), přičemž 94 pozic bylo parsimony informativních. Nukleotidová diverzita (*Pi*) byla 0,01108, haplotypová diverzita (*Hd*) 0,767. Gen *cyt b* zahrnoval celkem 51 unikátních haplotypů (viz Příloha 5).

S7: Gen S7 obsahoval celkem 83 (12,4%) polymorfních segregujících míst s celkovým počtem 84 mutací (Příloha 9), přičemž 34 pozic bylo parsimony informativních. Nukleotidová diverzita (*Pi*) byla 0,01177, haplotypová diverzita (*Hd*) 0,746. Gen S7 zahrnoval celkem 23 unikátních haplotypů (viz Příloha 5).

4.2 Fylogenetické analýzy

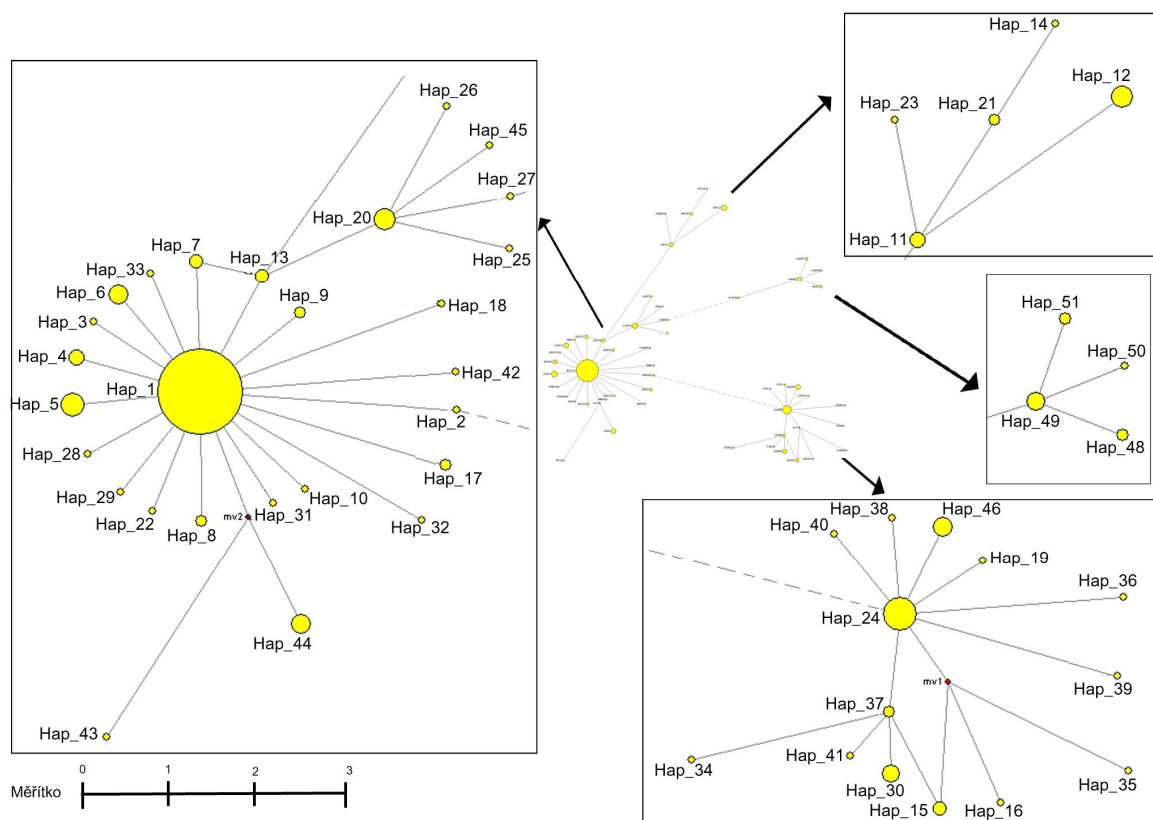
Fylogenetický vzor pro vizualizaci celkové haplotypové diverzity byl zkoumán jak rekonstrukcí nezakořeněných haplotypových sítí (networků), tak rekonstrukcí zakořeněných fylogenetických stromů.

4.2.1 Network

Analýza 248 sekvencí genu *cyt b* o délce 1103bp rozdělila jedince do několika základních skupin haplotypů, které částečně odpovídají i geografickému rozšíření jednotlivých jedinců. Obdobný výsledek rovněž přinesla i analýza 94 sekvencí genu *S7* o délce 670bp.

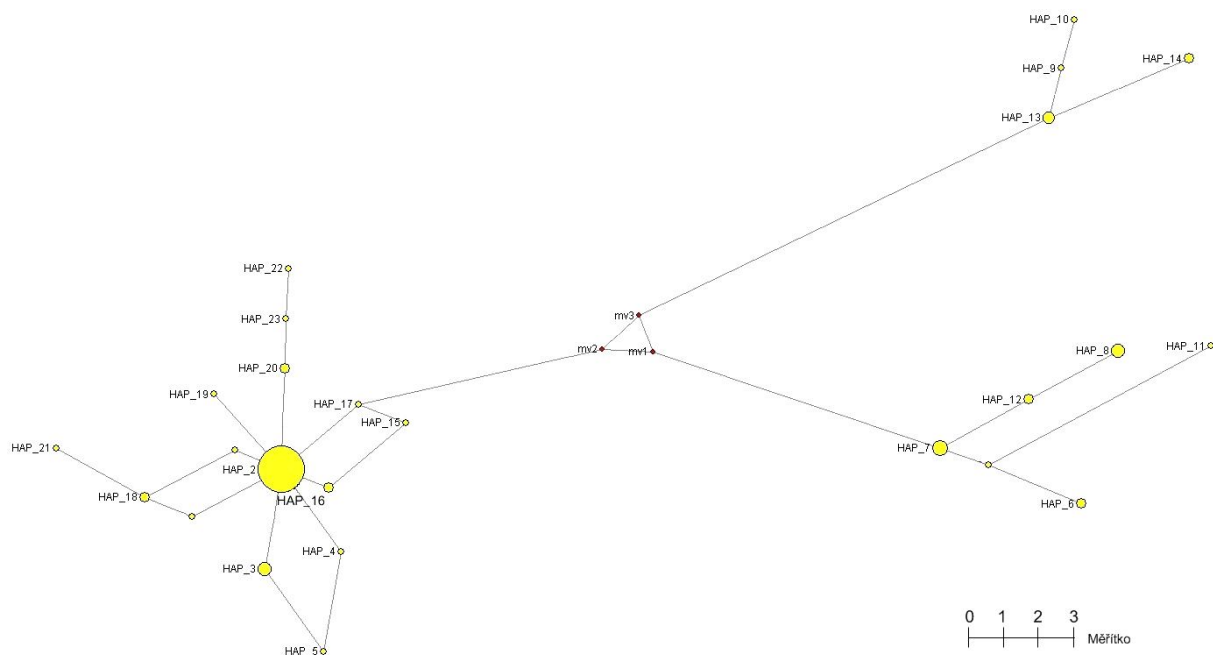
Cyt *b*: U mitochondriálního genu bylo 248 nových sekvencí rozděleno v 51 haplotypů (viz Příloha 5). Většina z haplotypů se tedy jevila jako unikátní. Společný haplotyp rozšířený na všech lokalitách nebyl zaznamenán. Mezi haplotypy vytvořenými ze sekvencí genu *cyt b* dominovaly dva: Hap_1 (47,58%) a Hap_24 (7,66%), z nichž vystupovalo několik haplotypů s mnohem menší frekvencí zastoupení (0,4 - 3,6%), lišící se jedním až dvěma mutačními kroky od haplotypů centrálních. Haplotypy Hapl_1 a Hapl_24 byly propojeny prostřednictvím haplotypu Hapl_2 18 mutacemi. Nejpočetnější z haplotypů byl Hapl_1 s hvězdčovitou strukturou, který zahrnoval 118 jedinců z 33 lokalit; 101 jedinců z Bulharska, 10 jedinců z Řecka a 7 jedinců z Turecka, geograficky rozmístěných napříč celým vzorkovaným územím s výjimkou jihozápadní části. Druhý nejčetnější haplotyp Hapl_24 zahrnoval 19 jedinců s rozšířením převážně v jihozápadní části zkoumaného území; 11 z Řecka a 8 z Bulharska z povodí řek Nestos, Struma, Diavolorema, Lolapasha a jezera Volvi. Nejvíce diferenciovaným haplotypem byl Hapl_49, který byl spojen s haplotypem Hapl_1 51 mutacemi. Tento haplotyp zahrnoval 5 jedinců druhu *C. punctilineata* pocházejících z řeky Aggitis v Řecku. Na několika místech haplotypové mapy lze sledovat náznak *star-like pattern* především právě mezi vzorky z oblastí jihu, severozápadu a izolované populace *C. punctilineata*. Takovýto vzor odpovídá recentní expanzi.

Obr. 7: Fylogenetický network haplotypů 1103 bp dlouhého fragmentu mitochondriálního genu *cyt b*, konstruovaný v programu Network metodou Median-Joining, dvou taxonů sekavců linie Bicanestrinia III: a) haplotypy Hapl_48, Hapl_49, Hapl_50, Hapl_51 označují monofyletický klád sdužující druh *C. punctilineata*, b) ostatní haplotypy označují monofyletický klád sdužující *C. strumicae*. Názvy haplotypů korespondují s Přílohou 2 a 5 a textem. Velikost haplotypů je proporční k počtu jedinců sdílející stejný haplotyp. Přerušovaná čára v naznačuje rozdělení haplotypové mapy mezi Hap_2 a Hap_24 (51 mutačních kroků). Měřítko znázorňuje vzdálenosti mezi jednotlivými mutačními kroky.



S7: U jaderného genu bylo 95 sekvencí rozděleno do 23 haplotypů, u nich byly rovněž patrné dva dominantní haplotypy. Nerozšířenější haplotyp Hap_2 zahrnoval 47 jedinců (49,5%) ze 24 lokalit: 39 jedinců z Bulharska, 6 jedinců z Řecka a 2 z Turecka a geograficky odpovídal dominantnímu haplotypu popisovanému výše u *cyt b*. Druhý nejčetnější haplotyp Hapl_7 zahrnoval 5 jedinců (5,3%); 3 z Řecka a 2 z Bulharska, s rozšířením převážně v jihozápadní části zkoumaného území. Třetím, zřetelně odděleným haplotypem byl Hap_14, zahrnující 4 jedince (4,2%) druhu *C. punctilineata* pocházejících z řeky Aggitis v Řecku.

Obr. 8: Fylogenetický network haplotypů 581 bp dlouhého fragmentu mitochondriálního genu S7 konstruovaný v programu Network metodou Median-Joining dvou taxonů sekavců linie Bicanestrinia III: a) haplotypy Hapl_9, Hapl_10, Hapl_13, Hapl_14 označují monofyletický klád sdužující *C. punctilineata*, b) ostatní haplotypy označují monofyletický klád sdužující *C. strumicae*. Názvy haplotypů korespondují s Přílohou 3 a 5 a textem. Velikost haplotypů je proporční k počtu jedinců sdílející stejný haplotyp. Měřítko znázorňuje vzdálenosti mezi jednotlivými mutačními kroky.



4.2.2 Rekonstrukce fylogenetických stromů

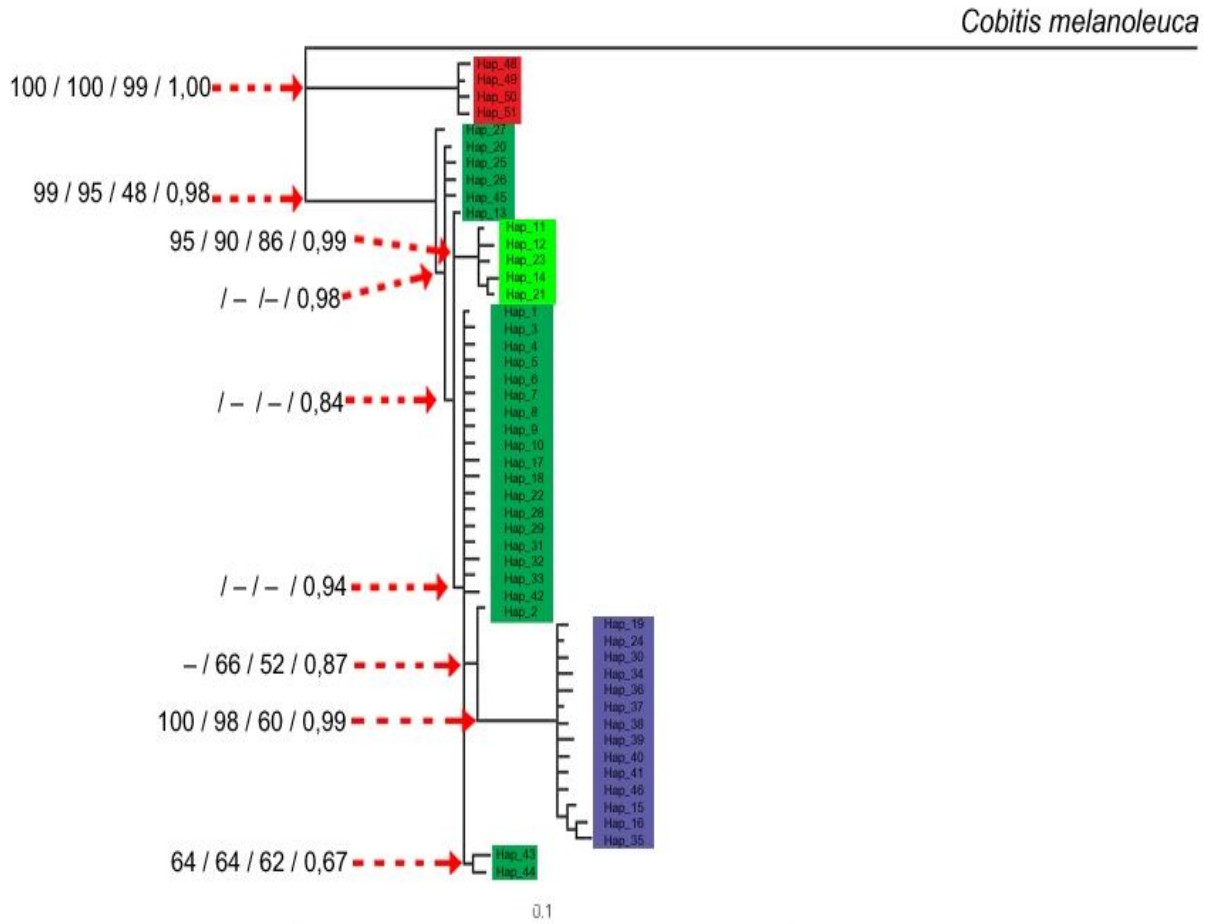
Fylogenetické stromy byly rekonstruovány metodou i) Neighbour-Joining (NJ), ii) Maximální Parsimonie (MP), iii) Maximum Likelihood (ML) a Bayesiánskými analýzami (BA) v programu PAUP v. 4.0b10 (Swofford 2002).

Cyt b: Vstupním souborem analýz cyt *b* genu bylo 51 unikátních sekvencí, zastupující všechny haplotypy. Nekorigovanou „*p*“ distancí byl vytvořen NJ strom s podporou 50% majority-rule. MP analýza produkovala 323 nejparsimoniálnějších stromů s identickou topologií vzhledem k hlavním kládům. ML analýza s TIM2+I+G modelem vytvořila nejpravděpodobnější strom. Všechny nezávislé BA běhy produkovaly identické topologie. Jako outgroup k zakořenění výsledného stromu byla použita výše zmíněná sekvence cyt *b* druhu *C. melanoleuca* (GenBank Accession no. EF508500.1). Poté proběhla vizualizace v programu TreeView v. 1.6.6 (Page 1996). Všechny čtyři analýzy

potvrdily s vysokou statistickou podporou přítomnost dvou dominantních haplotypových skupin, které zahrnovaly dva vymezené taxony: i) druh *C. punctilineata* a ii) druh *C. strumicae*. Vnitřní členění kládů se mezi analýzami lišilo a některé členění bylo nerozřešeno.

První haplotypová skupina, reprezentovaná druhem *C. punctilineata* (posterior probability 1,00), zahrnovala deset jedinců ze čtyř haplotypů: Hap_48, Hap_49, Hap_50 a Hap_51. Tito jedinci pocházejí z řeky Aggitis v Řecku (lok. č. 28, Příloha 1). Na fylogenetickém stromě je tato linie znázorněna červenou barvou a dále v textu bude označovaná jako subklád „Č“. Druhou diferencovanou skupinou se silnou podporou ve všech analýzách (posterior probability 0,99) zahrnuje taxon *C. strumicae*. V rámci této skupiny je zřetelně vymezeno několik subkládů. Silnou podporu má monofyletický jihovýchodní podklád, který tvoří 14 oddělených haplotypů a zahrnuje 44 jedinců ze 13 lokalit z řek Struma, Mesta, Diavolorema, Aggitis, Kanlı Dere, Lolapasha a Pjasacnik. Dominantní je zde soubor 30ti nerozlišených haplotypů, který geograficky pokrývá všechny vzorkované přítoky Dunaje a řeky tekoucí do Černého moře. Hlubší příbuzenské vztahy mezi jednotlivými skupinami nejsou až na jeden případ jednoznačné. V rámci těchto nerozlišených haplotypů má silnou podporu subklád odpovídající hydrogeografickému systému řeky Nestos v Řecku a Bulharsku. Tato skupina je tvořena pěti haplotypy a z celkového počtu zahrnuje 15 jedinců. Dalším subkládem, který je vymezen všemi čtyřmi analýzami, ale má nízkou podporu větví je skupina dvou haplotypů (Hapl_43 a Hapl_44) z oblasti řeky Evros v Turecku. Tento subklád zahrnuje celkem 7 jedinců.

Obr. 9: Bayesiánský (BA) strom odvozen z 1103 bp dlouhého fragmentu mitochondriálního genu *cyt b*. Strom byl kalkulován pro 1 000 000 generací, posledních 9 000 stromů bylo použito. Čísla v nodech vyznačují statistickou bootstrapovou podporu nodů ostatními analýzami v procentech (<50%) s 500 pseudoreplikáty a Bayesiánskou Posteriorní Pravděpodobnost (BPP<0.50 není znázorněna) v pořadí Neighbour Joining/Maximum Parsimony/Maximum Likelihood/BA. Červenou barvou je znárodněn subklád „Č“, tmavě zelenou barvou subklád „Z1“, světle zelenou barvou subklád „Z2“ a tmavě modrou barvou subklád „M“. Šipky ukazují příslušnost podpory k nodu. Názvy haplotypů korespondují s Přílohou 3 a 4 a textem.

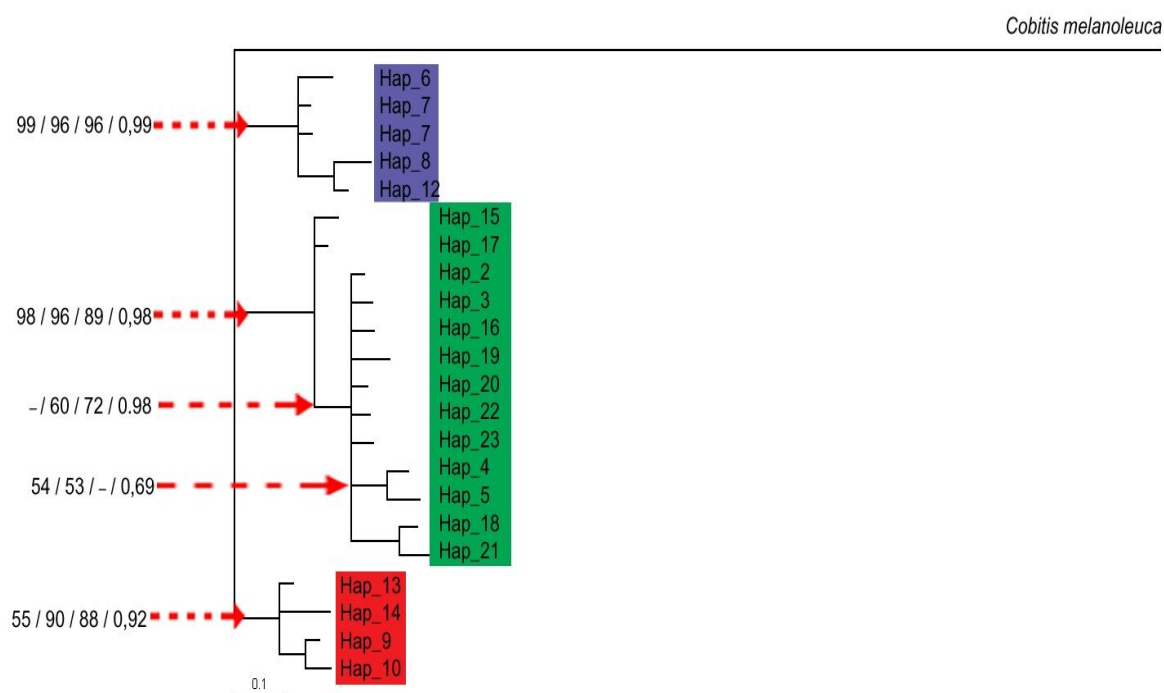


S7: Analýzy genu S7 vycházely z 23 unikátních sekvencí, zastupujících jednotlivé haplotypy. Podobně jako při rekonstrukci *cyt b* stromů, nekorigovanou „*p*“ distancí byl vytvořen NJ strom s podporou 50% majority-rule. MP analýza produkovala 100 nejparsimoniálnějších stromů s identickou topologií vzhledem k hlavním kládům. ML analýza s HKY+I modelem vytvořila nejpravděpodobnější strom s. Všechny nezávislé BA běhy produkovaly identické. Fylogenetické stromy byly zakořeněny vlastní sekvencí jedince získaného z řeky Kubaň (Kavkaz, západní Rusko).

Výsledné topologie stromů získaných výše zmíněnými analýzami se v hlavních rysech neodlišují od topologií stromů z analýzy *cyt b*. Také zde rozdělily fylogenetické

stromy haplotypy do dvou základních monofyletických kládů, které reprezentovaly dva oddělené druhy *C. strumicae* a *C. punctilineata* (posterior probability 0,55). V rámci linie *C. strumicae* byly podpořeny výsledky získané analýzou cyt *b*, vyskytovala se zde jasně vymezena skupina dominantního haplotypů a jihovýchodního kládu „M“. Jihovýchodní klád byl zastoupen pěti haplotypy, které zahrnovaly 16 jedinců z řek Aggitis, Struma, Nestos a jezera Volvi (posterior probability 0,99). Dominantní skupina „Z“ byla ve fylogenetickém stromu zastoupena 13ti haplotypy tvořenými 69 jedinci z 24 lokalit, vyskytujících se napříč vzorkovaným územím, zahrnujícím například všechny vzorkované přítoky Dunaje a Černého moře (posterior probability 0,98).

Obr. 10: Bayesiánský (BA) strom odvozen z 670 bp dlouhého fragmentu jaderného genu *S7*. Strom byl kalkulován pro 1 000 000 generací, posledních 9 000 stromů bylo použito. Čísla v nodech vyznačují statistickou bootstrapovou podporu nodů ostatními analýzami v procentech (<50%) s 500 pseudoreplikáty a Bayesiánskou Posteriorní Pravděpodobnost (BPP<0.50 není znázorněna) v pořadí Neighbour Joining/Maximum Parsimony/Maximum Likelihood/BA. Červenou barvou je znázorněn subklád „Č“, tmavě zelenou barvou subklád „Z“ a tmavě modrou barvou subklád „M“. Šipky ukazují příslušnost podpory k nodu. Názvy haplotypů korespondují s Přílohou 3 a 5 a textem.



Divergence mezi *C. punctilineata* a sesterským druhem *C. strumicae* byla odhadnuta na: průměrná genetická vzdálenost v genu *cyt b* mezi oběma skupinami 5,23%, net genetická vzdálenost byla 4,65%. U druhu *C. strumicae* vycházela divergence mezi

základní Z1 skupinou (tmavě zelená, Obr. 9.) a monofyletickou Z2 skupinou (světle zelená, Obr. 9) následovně: průměrná vzdálenost 0,62%, net vzdálenost 0,44%. Úroveň sekvenční divergence mezi „Z“ skupinou („Z1“ a „Z2“ dohromady) a monofyletickou „M“ (modrá, Obr. 9) skupinou vyšla: průměrná vzdálenost 1,76%, net vzdálenost 1,51%.

4.2.3 Výsledky analýzy Isolation with Migration

Analýzy poskytly konvergentní posteriorní distribuce odhadnutých parametrů tří populačních velikostí (θ), dvou migračních měr (m) a času divergence (t) (Příloha 6, Příloha 7) napříč nezávislými IM běhy. Největší populační velikost byla odhadnuta v Egejském moři a Strumě, malé populační velikosti byly odhadnuty v Černém moři a Dunaji. Jako spíše nespolehlivé se jevily odhady posteriorních densit parametrů pro ancestrální thety. Odhady divergencečních časů měly nenulové dolní denzity s dolní distribucí začínající napravo od nuly dosahující píku, následovanou křivkou připomínající klesající “plateau” kde horní konce nedosáhly nuly přes širokou škálu priors. Odhady časových parametrů nemohly být spolehlivě odhadnuty a data pravděpodobně neobsahují dostatek informace. Studie byla zaměřena primárně na odhad velikosti a směru migrace při kolonizaci jižních povodí dolního Dunaje druhem *C. strumicae* z jihu. Odhad posteriorních densit migračních parametrů potvrdil nenulový pík migrace z oblasti Egejské do Černomořské v genu pro cyt *b*, ačkoli nenulová migrační míra nebyla signifikantně odlišná od nuly podle likelihood ratio testu. V jaderném genu byla míra migrace rovna nule. Z černomořské oblasti do oblasti Egejské poskytl IM analýza výrazný nenulový pík a migrační mírou signifikantně odlišnou od nuly ($P < 0.05$) danou likelihood ratio testem a to v obou studovaných markerech. Kolonizace alternativní migrační trasou mezi Dunajem a Egejskou oblastí řekou Strumou vykazuje shodně v obou markerech v IM analýzách pouze jednosměrnou migraci, jmenovitě. z povodí Dunaje do povodí horní Strumy. Migrace v opačném směru byla v obou studovaných markerech nulová.

5 DISKUZE

Tato práce přináší první výsledky detailního molekulárního srovnání ryb rodu *Cobitis*, náležící do linie Bicanestrinia (Bicanestrinia Lineage III) *sensu* Bohlen et al. (2006a). Prvním druhem je endemický *C. punctilineata* obývající řeku Aggitis v Řecku, což je přítok řeky Struma ústící do Egejského moře. Druhým druhem je *C. strumicae* obývající téměř celý východní Balkánský poloostrov (od řeky Struma včetně na východ a od řeky Dunaj na jih s výjimkou Dunajské delty). Důkladné a podrobné vzorkování napříč areálem rozšíření druhů umožňuje kromě analýzy fylogenetické historie odhalit charakter endemismu (zejména druhu prvního), druhové expanze a kolonizace (zejména pak druhého druhu) v historicky dlouhodobě stabilním území, za které je Balkánský poloostrov považován (Hewitt 2004). Práce současně přináší novou hypotézu o hluboké fylogenetické strukturaci linií v rámci druhu *C. strumicae* a zejména pak o možných kolonizačních cestách druhu napříč východním Balkánem. Fylogenetické analýzy mitochondriální DNA potvrzují monofylii a druhový statut pro oba druhy. Druh *C. strumicae* navíc vykazuje hluboké vnitřní členění na minimálně dvě kryptické linie, naznačující proces lokální speciace. Jednoznačný statistický důkaz potvrzuje předchozí teoretickou hypotézu faunálních výměn mezi východním Mediteránem a dunajským povodím (Bohlen et al. 2006a) a ukazuje na recentní kolonizaci jižních přítoků Dunaje Bulharska z Egejské oblasti podél pobřežních řek Černého moře v Bulharsku.

5.1 Fylogenetické vztahy

Primárním cílem byla druhová revize skupiny sekavců nazývaných Bicanestrinia Lineage III (Bohlen et al. 2006a). Vedle fylogenetické analýzy bylo cílem sledovat geografickou distribuci haplotypů obou druhů.

5.1.1 *Cobitis punctilineata*

Všichni jedinci pocházející z horní části řecké řeky *Aggitis* (lokality 28, Příloha 1), reprezentovaní čtyřmi haplotypy pro jaderný gen S7, patřili do statisticky dobře podpořeného monofyletického kládu („Č“, Příloha 3). Podobný vzor poskytla

fylogenetická analýza genu *cyt b* („Č“, Příloha 2). Analýza networku metodou median-joining (Obr. 7) dále ukázala, že tyto jedinci se liší od skupiny druhu *C. strumicae* minimálně 51 mutačními kroky a poukazuje tak na hlubokou divergenci obou druhů. Tato data demonstrují, že se skutečně jedná o dobře vymezený samostatný druh *C. punctilineata*, jež byl již dříve popsán na základě morfologie. Analýza dále naznačuje, že zástupci tohoto taxonu, obývající horní tok řeky Aggitis, byli po dlouhou dobu izolováni od ostatních druhů sekavců skupiny Bicanestrinia. Dlouhotrvající izolace rovněž podporují vzory výskytu dalších endemických ryb v řece Aggitis, mihule *Eudontomyzon hellenicus* (Vladykov, Renaud, Kott et Economidis 1982), či mřenky *Oxynoemacheilus* (Šedivá et al. 2010b). Prameny a pánevní oblast obklopená horami horního Aggitisu jsou dobře rozvinutou a komplexní krasovou sítí s existencí přinejmenším od Pliocénu (Novel et al. 2007). Zdá se, že biogeografické podmínky, které byly v této oblasti dlouhodobě neměnné, umožnily populacím ryb izolaci a dostatek času k divergenci od ostatních populací.

Z vynesené grafické distribuce genetické variability fylogenetického stromu pro *cyt b* (Obr. 9) a mapové distribuce haplotypů stejného genu (Obr. 7) vyplývá, že populace druhu *C. punctilineata* sdílí v jednom případě haplotyp, typický pro druh *C. strumicae*, rozšířený především v dolním úseku řeky Aggitis a v řece Struma. Vzhledem k tomu, že daný jedinec náleží dle jaderného stromu genu *S7* jednoznačně do monofyletického kládu *C. punctilineata*, jedná se zřejmě o doložený případ hybridizace s následnou sekundární introgresí. Současný tok řeky Aggitis postrádá větší migrační bariéry jak proti, tak po proudu. Fylogenetické analýzy této práce však ukázaly, že druh *C. punctilineata* je dobře specificky adaptován a vyskytuje se výhradně v krasové pánevní oblasti horního Aggitisu. Naopak, dolní Aggitis a další okolní řeky již obývá výhradně *C. strumicae* (Příloha 2, Příloha 3, Příloha 4). Marker *cyt b* genu potvrdil, že populace *C. punctilineata* přišla do recentního sekundárního kontaktu a hybridizovala s druhem *C. strumicae*. Tento druh, široce rozšířený napříč východním Balkánem, zřejmě přimigroval z dolního povodí Strumy přirozeně, díky široké druhové ekologické valenci.

Nesoulad ve vzoru mitochondriální a jaderné DNA byl nalezen také u druhu *Oxynoemacheilus* (Šedivá et al. 2010b), kde však konfliktní vzor pocházel z jaderného lokusu. Autoři zde nepředpokládají recentní kontakt z důvodu absence druhu v dolní Strumě a spíše se přiklánějí, v rozporu se závěrem pro rod *Cobitis*, ke scénáři nekompletního lineage sortingu v jaderném markeru. Oproti mitochondriálnímu genu má

totiž gen jaderný čtyřikrát větší efektivní populační velikost. Zatímco se mitochondriální geny stačily plně separovat, nese si jádro stále některé alely od společného předka obou populací, protože předpokládaný čas pro sorting linií k reciproké monofylii dvou izolovaných populací je čtyřikrát delší pro jádro než pro mitochondrii (Avice 2000, Palumbi et al. 2001). Scénář a konfliktní vzor v markerech je nicméně u sekavců naprosto opačný a terénní data potvrzují blízký výskyt populací obou druhů (Příloha 1, Příloha 4). Nahrazení původního haplotypu novým po sekundárním kontaktu je více pravděpodobnější pro mtDNA než pro jaderné lokusy, právě kvůli rozdílům v efektivních populačních velikostech (Burrige et al. 2006). IUCN red list řadí druh *C. punctilineata* do kategorie „vulnerable D2“ s geografickým omezením na oblasti menší než 100 km². Masivnější introgrese jiného druhu tedy může narušit genetickou integritu adaptovaného endemita a teoreticky jej tak ohrozit. Na druhou stranu je nutno pohlížet na mezidruhový genový tok jako na poměrně přirozený proces, probíhající i bez antropogenních aktivit, který je běžnější, než se dříve nejen u obratlovců předpokládalo (např. Mallet 2005, 2008). Ke zhodnocení míry introgrese a recentního genového toku mezi oběma druhy je potřeba podrobnější analýzy a sběru vzorků z více lokalit podél systému Aggitis, což je aktivita, kam směřuje navazující studium vycházející z výsledků této práce.

5.1.2 *Cobitis strumicae*

Jedinci ze všech 44 vzorkovaných lokalit, považováni morfologicky a dle preliminárních analýz tří alozymových lokusů (metodika a popis alel viz Choleva et al. 2008) za druh *C. strumicae*, vytváří v genu pro cyt *b* silně diferencovaný monofyletický klád, podpořený všemi čtyřmi fylogenetickými analýzami (NJ, MP, ML a BA), viz Obr. 9. Bazální skupinu zde tvoří 27 haplotypů dominujících v Dunajských přítocích, podél Černého moře a dále rozšířených také v egejské oblasti povodí řeky Maritza (Evros) a Lissos, méně pak v systému Mesta (Nestos) a horní Strumě (Obr. 9, subklád „Z1“). Žádný z těchto haplotypů se však nevyskytoval v dolní Strumě, přítoku Aggitis a jezeru Volvi v Řecku. Zde naopak dominoval odvozený a silně statisticky podpořený vnitřní monofyletický klád, tvořený 14 haplotypy (Obr. 9, subklád „M“), v menší míře přítomen dále v systému Maritza (Evros) a Mesta (Nestos). Systém Mesty (Nestos) je dále osídlen dobře podpořeným monofyletickým subkládem při bázi skupiny *C. strumicae*, jež je reprezentován pěti haplotypy (Obr. 9, subklád „Z2“). Zjevnou příbuznost haplotypových

skupin „Z1“ a „Z2“ dobře vizualizuje analýza cyt *b* v Networku s rozdílem pouhých šesti mutačních kroků mezi skupinami (Obr. 7). Naopak subklád „M“ se liší minimálně 18 mutačními kroky od nejbližšího haplotypu „Z“ skupiny. Fylogenetické analýzy genu *S7* nepodpořily monofylii *C. strumicae*, avšak vymezipily dva samostatné monofyletické klády se silnou podporou (Obr. 10): první sdružuje bazální skupinu cyt *b* genu (subklád „Z1“) a monofyletický subklád z povodí řeky Mesta (Nestos) (subklád „Z2“) a druhý klád odpovídá jedincům odvozeného cyt *b* subkládu („M“) dolní Strumy a přilehlého území. Tento vzor potvrzuje i studie Networku genu *S7*. Program Network navíc odhadl chybějící centrální haplotypy, které můžeme považovat za ancestrálního, dnes snad chybějícího předka, od kterého se divergovaly oba klády nezávisle na sobě. Chybějící centrální haplotypy se od ancestrálního předka liší šesti až sedmi mutačními kroky (Obr. 8).

Základní vzor fylogenetické příbuznosti haplotypů či skupin haplotypů *C. strumicae* odpovídá například studii ryb rodu *Rhodeus* (Bohlen et al. 2006b): haplotypy východního Dunaje, černomořského pobřeží Bulharska, evropské části Turecka a severovýchodního egejského pobřeží náležely do stejné linie, včetně haplotypu v dolní Strumě. Druhá linie se nacházela také v řece Struma a dále na sever a západ Evropy. Zatímco dolní Dunaj hostil obě linie rodu *Rhodeus*, v případě sekavců sdílí dvě linie Struma, nikoli však již Dunaj. Je tedy otázkou, zda populace sekavců Dunaje a Strumy spolu historicky komunikovaly, či nikoli, viz dále. Čistě z distribuce haplotypů se jeví parsimoniálnější vysvětlení sekundární kontakt mezi systémem Strumy a Mesty (avšak také Maritzy), neboť oba říční systémy dnes hostí obě vzájemně divergované linie. Struma a Mesta (a z geografického pohledu také Maritza) jsou geograficky blízké systémy a sdílejí ichtyofaunu také dalších druhů (Šedivá et al. 2010a), a proto není společný výskyt obou linií sekavců překvapivý. Pravděpodobným vysvětlením recentních migračních událostí je mechanismus river capture.

5.2 *Cobitis punctilineata* separátně odvozená samostatná linie skupiny Bicanestrinia, avšak *Cobitis strumicae* – více než jeden druh?

Doklad poskytnutý touto prací podporuje druhový statut *C. punctilineata*. Reciproká monotypie, dokázána v genech *S7* a *cyt b*, uspokojuje požadavek druhového konceptu založeného na linii (lineage-based concepts; Kottelat 1997, Wiley et al. 2001, Kottelat et al. 2007), společně se signifikantní úrovní sekvenční divergence mezi tímto druhem a sesterským druhem *C. strumicae* (průměrná genetická vzdálenost v genu *cyt b* mezi oběma skupinami 5,23%, net genetická vzdálenost byla 4,65%). U druhu *C. strumicae* je však fylogenetický vzor komplikovanější. Zatímco je monofyletická linie jedinců z Mesty (Nestos) v *cyt b* („Z2“, Obr. 9) vymezená od základní skupiny („Z1“, Obr. 9), liší pouze nízkou vzájemnou genetickou vzdáleností (průměrná vzdálenost 0,62%, net vzdálenost 0,44%), jaderný marker subklády „Z1“ a „Z2“ nepodpořil, avšak sloučil je do jednoho monofyletického subkládu („Z“). Jiný vzor je pozorovatelný i mezi skupinami „Z1“ a „M“ (Obr. 9, Obr. 10). Teoreticky vzato, prací potvrzená reciproká monofylie subkládů „Z1“ a „M“ jak v jaderném, tak mitochondriálním markeru, splňuje požadavek na linii založeného druhového konceptu (Kottelat 1997, Wiley et al. 2001, Kottelat et al. 2007). Úroveň sekvenční divergence mezi oběma subklády v *cyt b* není vysoká, avšak ne nevýznamná (průměrná vzdálenost 1,76%, net vzdálenost 1,51%), což by mohlo skutečně otevřít otázku validity dvou separátních druhů. Při zohlednění molekulárních hodin genu *cyt b* odhadnutý pro rod *Cobitis* na 0,68% za 1 milion let na pár bazí (Doadrio et al. 2005) byly obě linie separovány minimálně po dva miliony let. Navíc je nutno zopakovat, že jaderný gen nepodporuje monofylii druhu *C. strumicae* (Obr. 10), nýbrž signifikantně jej dělí na tyto dvě skupiny. Jedinci přírodních populací se liší také morfologicky a morfometricky (Choleva, pers. comm.).

Zahrnutí jaderných dat je vhodným přístupem testu validity identifikovaných mtDNA kládů jako separátních druhů (Marková et al. 2010). Vzorek jaderného markeru u druhu *C. strumicae* je zjevně shodný se vzorem mitochondriálního markeru. Přitom řada jiných dnes uznávaných a validních druhů postrádá monofylii a exkluzivitu v jádru, jako ne nezbytný předpoklad k uznání validity druhu. Relativně recentně divergované populace (druhy) si totiž stále mohou nést genetickou stopu od společného předka. Způsobuje to

zejména již zmíněný, obecně potřebný, čtyřikrát delší čas pro jádro oproti mitochondrii, díky kterému může dojít ke kompletnímu vysortování dvou recipročně monofyletických linií od doby izolace dvou populací. Řada studií ukazuje, že u řady recentně divergovaných druhů k tomuto vysortování dosud nedošlo (např. Carstens et Knowles 2007). Geografické vymezení dvou druhů v rámci *C. strumicae* se jeví jako poměrně komplikované. Z úvodu kapitoly vyplývá, že obě linie mají zřejmě sekundárně způsobený překryv geografické distribuce (Příloha 2). Je tedy alespoň prozatím nezbytné zdůraznit existenci poměrně divergovaných linií druhu *C. strumicae*, z nichž jedna obývá exklusivně přítoky Dunaje a Černého moře v Bulharsku, druhá se vyskytuje v dolních tocích řeky Struma (Strymon) a jezera Volvi v Řecku, které nepřišly do recentního sekundárního kontaktu. Vzhledem k možné adaptaci linií na lokální podmínky je toto zjištění nutné zohlednit při případných zamýšlených translokacích rybích osádek a jiných rybářských či obecně antropogenních aktivitách, aby se zabránilo umělému znečištění separovaných linií novými „exotickými“ geny s možným negativním dopadem na lokální populace (např. Pagano et al. 2003).

5.3 Biogeografie *C. strumicae* a historické migrační cesty východním Balkánem

5.3.1 Biogeografie předka *C. strumicae*

Dnešní Bicanestrinia linie I-IV *sensu* Bohlen et al. (2006a) jsou geograficky rozšířené od Mezopotámie po jihozápadní Jadran (Bohlen et al. 2006a). Od sesterské skupiny *Cobitis sensu stricto* se odštěpily zhruba 12-17 milionů let před naším letopočtem. V tomto období došlo k přerušení pevninského mostu mezi Malou Asií a Evropou (Weisrock et al. 2001). Během Miocénu došlo k formaci pohoří východního Balkánu a oddělení Bicanestrinia linií I-IV od sebe navzájem (Weisrock et al. 2001, Bohlen et al. 2006). Vzhledem k tomu, že všechny Bicanestrinia linie mají centra rozšíření v Mediteránu, je možné se domnívat, že centrum primární speciace linie Bicanestrinia III, resp. druhů *C. punctilineata* a *C. strumicae*, probíhala v oblasti Egejského moře, Balkánu a také Anatólie. Hypotézu podporuje distribuce haplotypů obou druhů, kdy v případě *C. punctilineata* se haplotypy vyskytují výhradně v přítoku ústího do Egejského moře,

v případě *C. strumicae* se rovněž obě základní linie společně vyskytují v řekách Egejské oblasti, zatímco v Černomořské oblasti či Dunaji nikoli.

5.3.2 Migrace *C. strumicae* podél egejského pobřeží

Povodí Strumy, Mesty (Nestos) a Maritzy (Evros) sdílí obě základní linie *C. strumicae* (Příloha 2, Příloha 3). Sdílení haplotypů horní Strumy s Mestou podporuje river capture hypotézu sekundárního kontaktu mezi systémem Strumy a Mesty, díky jejich geografické blízkosti a sdílení ichtyofauny jiných druhů (Šedivá et al. 2010a), viz výše. Data však již neumožňují potvrdit či vyloučit, zda se linie dolní Strumy („M“) dostala na jihovýchod Balkánu přirozeně systémem Maritzy (Evros), či podél pobřeží Egejského moře. Proti první hypotéze hovoří fakt, že centrální Maritza tuto linii recentně neobsahuje, proti druhé pak skutečnost, že linie není příliš rozšířená v řekách podél Egejského moře (chybí v řece Lissos či Kesa - dolní Evros). Linie je však přítomna v systému Nestos, kam zjevně musela migrovat z oblasti dolní Strumy. Ještě podivuhodnější je sdílený cyt b haplotyp subkládu „M“ mezi Strumou a dolním Evrosem. Opakované poklesy Egejského moře během Pleistocenních glaciací spojovaly říční systémy a homogenizovaly řadu druhů sladkovodních živočichů okolo Egejského moře (Economidis et Nalbant 1996) a je tedy možné, že na dnešním vzoru mají podíl oba historické fenomény.

5.3.3 Migrace *C. strumicae* mezi úmořími Egejského a Černého moře, testování hypotéz kolonizace dunajských přítoků

Za nejrecentnější faunální výměnu východního Balkánu je považována druhová migrace mezi Egejskou oblastí a řekami západního pobřeží Černého moře a povodí Dunaje. Absence *C. strumicae* na území dnešního Rumunska a dále v Evropě a blízkost haplotypů mezi jednotlivými oblastmi vedlo autory Bohlena et al. (2006a) ke stanovení hypotézy postglaciální expanze druhu směrem na sever. Hypotéza však dosud nebyla testována statisticky. Vedle této hypotézy existuje i hypotéza alternativní: expanze probíhala řekou Struma a dále mechanismem „river-capture“ do Dunajského povodí (Šedivá et al. 2010b). V této diplomové práci jsou tyto hypotézy statisticky testovány programem IM s cílem odhadnout role historických populačních izolací a následných opětovných spojení a odhadnout směr a významnost expanzních kolonizačních cest. Tato

analýza dat využívající model koalescence zahrnuje migrační parametry k odhadu historie populační divergence (Nielsen et Wakeley 2001, Hey et Nielsen 2004) Odpověď na tyto otázky může přispět k pochopení evoluční historie východního Balkánu a sladkovodní bioty a jejich reakci na klimatické změny.

Provedená IM analýza dvou genových datasetů potvrzuje migraci v obou hypotetických kolonizačních cestách, pouze východní trasa však sloužila k expanzi na sever. Odhad posteroirních densit migračních parametrů potvrdil nenulový pík migrace z oblasti Egejské do Černomořské v genu pro cyt *b*, ačkoli podle likelihood ratio testu nebyla migrační míra signifikantně odlišná od nuly. V jaderném genu byla míra migrace nicméně nulová. Shodný vzor v obou markerech poskytl odhad míry migrací v opačném směru, tzn. z černomořské oblasti do oblasti Egejské s výrazným nenulovým píkem a migrační mírou signifikantně odlišnou od nuly ($P < 0.05$) danou likelihood ratio testem.

Na konci Pleistocénu se na místě dnešního Černého moře nacházelo mohutné sladkovodní jezero existující po tisíce let, které se v časném Holocénu stalo slaným mořem (Degens et Ross 1972, Ryan et al. 1997). Bylo však menší než je tomu dnes a umožňovalo existenci pobřežního šelfu a propojení řek západního břehu Černého moře. Jak ukazuje například rozšíření východní linie hořavek rodu *Rhodeus* (Bohlen et al. 2006b), šíření sladkovodních druhů tímto šelfem bylo možné. Výsledky této práce statisticky potvrzují migrační koridor podél šelfu Černého moře IM analýzou (Příloha 6). Hvězdicovitá struktura Networku pro gen cyt *b* u druhu *C. strumicae*, naznačující jasnou expanzi dominantního „Z“ kládu (Obr. 7), tuto teorii silně podporuje. Z distribuce nejdominantnějšího haplotypu tohoto kládu (Příloha 5) dále vyplývá, že tentýž haplotyp je sdílen napříč celou migrační trasou, tj. mezi povodím Lissos a Maritza (Evros), podél černomořského pobřeží na sever do řeky Jantra a dále na západ dunajskými přítoky až po řeku Arčar a Lom. Střední a západní egejská oblast však tyto haplotypy postrádá, s výjimkou horní Strumy, kde však byla migrace evidentně sekundární imigrační událostí z Dunaje, viz dále.

Silnější migrace z Černého moře jižním směrem, než směrem opačným může být ovlivněna lokálními demografickými a ekologickými podmínkami, jež panovaly během dramatické historie území, či zpětnými vlnami migrace úspěšných linií na jih. Je známa opakovaná výměna jedinců mezi Dunajem, pobřežními řekami Černého moře až egejskou oblastí západního Turecka (Economidis et Nalbant 1996). Mezi populacemi skupiny

Cobitis sensu stricto a Bicanestrinia v této oblasti je také vysoce pravděpodobná vzájemná výměna jedinců a přepis map geografických distribucí haplotypů a linií (Bohlen et al. 2006a). Absence migrace z jihu na sever v genu S7 není dosud plně vysvětlena a svou roli zde rovněž mohly sehrát lokální demografické podmínky. Kolonizace alternativní migrační trasou mezi Dunajem a Egejskou oblastí řekou Strumou vykazuje shodně v obou markerech v IM analýzách pouze jednosměrnou migraci, tj. z Dunaje do horní Strumy. To že řeka Struma nebyla kolonizační cestou *C. strumicae* na sever, ukazuje vedle IM analýzy také distribuce „M“ kládu, který je přítomen v řece Mesta (Egejská oblast). Naznačuje tím jistou míru expanzních schopností, avšak nikdy neproniknul do Dunaje (Příloha 2, Příloha 3). Přírozenou migrační trasu na sever řekou Struma nepodporují ani jiné práce (např. Šedivá et al. 2010b). Ačkoli dosud nemáme k dispozici datování událostí, směr šíření z Dunaje do Strumy podpořený IM je evidentně sekundární migrací do této řeky, událostí, která následovala až po kolonizaci Dunaje podél Černého moře. Dominantní *C. strumicae* „Z“ haplotyp Dunaje se totiž nachází výhradně v horní Strumě, což plně odpovídá distribuci expanzivních gynogenetických asexuálních linií rodu *Cobitis* dunajského původu (Choleva et al. 2008).

6 ZÁVĚR

- Podařilo se získat 248 sekvencí genu *cyt b* a 95 sekvencí genu *S7* z jedinců sekavcovitých ryb, náležících k mitochondriální linii Bicanestrinia III. Jedinci pocházeli z 44 lokalit Bulharska, Řecka a Turecka.
- Mitochondriální DNA potvrzuje monofylii a druhový statut dvou druhů: *C. strumicae* a *C. punctilineata*. Analýza metodou median-joining poukazuje na hlubokou divergenci obou druhů. Druh *C. strumicae* navíc vykazuje hluboké vnitřní členění na minimálně dvě kryptické linie, naznačující proces lokální speciace. První dominantní linie obývá téměř celý studovaný areál, druhá divergovaná monofyletická linie obývá jihozápad areálu rozšíření. . Fylogenetické analýzy genu *S7* sice nepodpořily monofylii a druhový statut *C. strumicae*, avšak vymezily dva samostatné monofyletické klády v rámci druhu *C. strumicae*, odpovídající členění v *cyt b*.
- Analýzy mitochondriálního genu *cyt b* potvrdily, že populace *C. punctilineata* přišla do recentního sekundárního kontaktu a hybridizovala s druhem *C. strumicae*.
- Provedená IM analýza dvou genových datasetů potvrzuje obousměrnou migrační kolonizační cestu mezi Egejskou oblastí a dolním Dunajem podél pobřežních řek (dříve historického šelfu) Černého moře v Bulharsku. Kolonizace alternativní západní migrační trasou do Dunaje z Egejské oblasti řekou Struma nebyla potvrzena, avšak v obou markerech v IM analýzách byla shodně nalezena jednosměrná migrace v opačném směru, tj. z Dunaje do horní Strumy. Jedná se zřejmě o sekundární migraci zpět z úmoří moře Černého do úmoří moře Egejského.

7 SEZNAM LITERATURY

- Arbogast, BS., et Kenagy, GJ. (2001). Comparative phylogeography as an integrative approach in biogeography. *Journal of Biogeography*. 28:819–825.
- Altekar G., Dwarkadas S., Huelsenbeck JP., Ronquist F. (2004). Motivation: Bayesian estimation of phylogeny is based on the posterior probability. *Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference*. *Bioinformatics*. 20:407–415.
- Aspöck, H. (2008). Postglacial formation and fluctuations of the biodiversity of Central Europe in the light of climate change. *Vector–Borne Diseases: Impact of Climate Change on Vectors and Rodent Reservoirs*, Berlin, 27 et 28 September 2007.
- Avise JC., Arnold, J., Ball, R., Bermingham, E., Lamb, Niegel, JE., Reeb, CA., Saunders, NC. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18:489–522.
- Avise, JC. (1994). *Molecular markers, Natural history and Evolution*. Chapman et Hall. New York
- Avise JC. (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press. Cambridge. MA. 447 pp.
- Avise, JC. (2009). Phylogeography: retrospect and prospekt. *Journal of Biogeography*. 36:3–15
- Banarescu, P. (1990) *Zoogeography of fresh waters. Volume 1. General distribution and dispersal of freshwater animals*. AULA –Verlag. Wiesbaden.
- Bernatchez L., Glemet H, Wilson CC., Danzmann RG. (1995). Introgression and fixation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial genome in an allopatric population of Brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 52:179–185.
- Bernardi, G., Lape, J. (2005). Tempo and mode of speciation in the Baja California disjunct fish species *Anisotremus davidsonii*. *Molecular Ecology* 14: 4085–4096.
- Bianco, PG. (1995). Mediterranean endemic freshwater fishes of Italy. *Biological Conservation*. 72:159–170.
- Bohlen, J., Ráb, P. (2001). Species and hybrid richness in spined loaches of the genus *Cobitis* L. (Teleostei: Cobitidae.), with a checklist of European forms and suggestions for their conservation. *Journal of Fish Biology*. 59:75–89.
- Bohlen, J., Perdices, A., Doadrio, I. et Economidis, PS. (2006a). Vicariance, colonisation and fast local speciation in Asia Minor and the Balcans as revealed from the phylogeny of spined loaches (Osteichthyes; Cobitidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 39:552–561.
- Bohlen, J., Šlechtová, V., Bogutskaya, N. et J. Freyhof (2006b): Across Siberia and over Europe: Phylogenetic relationships of the freshwater fish genus *Rhodeus* in Europe and the

- phylogenetic position of *R. sericeus* from the River Amur. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40:856–865.
- Boore, J.L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*. 27: 1767–1780.
- Brands, S.J. (comp.). (1989–2005). *Systema Naturae 2000. The Taxonomicon*. Universal Taxonomic Services, Amsterdam, The Netherlands. <http://sn2000.taxonomy.nl/>.
- Brown, W.M., George, M., Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 76:1967–1971.
- Buj, I., Podnar, M., Markov, M., Choleva, L., Šlechtová, V., Tvrtković, N., Čaleta, M., Mustafić, P., Marčić, Z., Zanella, Brigić, A. (2008). Genetic diversity and phylogenetic relationships of spined loaches (genus *Cobitis*) in Croatia based on mtDNA and allozyme analyses. *Folia Zoologica*. 57:71–82.
- Burrige, C.P., Craw, D., Waters, J.M., (2006). River capture, range expansion, and cladogenesis: the genetic signature of freshwater vicariance. *Evolution* 60:1038–1049.
- Burrige, C.P., Craw, D. and Waters, J.M. (2007). An empirical test of freshwater vicariance via river capture. *Molecular Ecology*, 16:1883–1895.
- Butler, J.M. (2005). *Forensic DNA typing – biology, technology and genetics of STR markers*, 2nd edition. Elsevier Academic Press, 241–299.
- Carstens, B.C., Knowles, L.L. (2007). Shifting distributions and speciation: species divergence during rapid climate change. *Molecular Ecology*. 16:619–627.
- Cavalli-Sforza, L.L. et Edwards A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19:233–257.
- Clark, D. (2005) *Molecular Biology – Understanding the Genetic revolution*: Elsevier Academic Press, 816 pp.
- Conner, J.V., et Suttkus, R.D. (1986). Zoogeography of freshwater fishes of the western Gulf slope of North America pp. 412–456, in *The Zoogeography of North American Freshwater Fishes*. John Wiley, New York, 866pp.
- Culling, M.A., Janko, K., Boron, A., Vasil'Ev, V.P., Cote, I.M., Hewitt, G.M. (2006). European colonization by the spined loach (*Cobitis taenia*) from Ponto–Caspian refugia based on mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*. 15, 173–190.
- De Gelas K., Janko K., Volcaert F.A.M., De Charleroy D., Van Houdt J.K.J. (2008). Development of nine polymorphic microsatellite loci in the spined loach, *Cobitis taenia*, and cross–species amplification in the related species *C. elongatoides*, *C. taurica* and *C. tanaitica*. *Molecular Ecology*. 8:1001–1003.
- Degens, E.T., et Ross, D.A. (1972). Chronology of the Black Sea over the last 25,000 years. *Chemical Geology* 10:1–16.

- Doadrio, J.A., Carmona et Machordom, A. (2002). Haplotype Diversity and Phylogenetic Relationships Among the Iberian Barbels (*Barbus*, Cyprinidae) Reveal Two Evolutionary Lineages. *The Journal of Heredity*. 93:140–147.
- Doadrio I. et Perdices A. (2005): Phylogenetic relationships among the Ibero–African cobitids (*Cobitis*, Cobitidae) based on cytochrome *b* sequence data. *Mol. Phylo. Evol.* 37(2):484–493.
- Choleva, L., Apostolou, A., Ráb, P., Janko, K. (2008). Making it on their own: sperm–dependent hybrid fishes (Cobitids) switch the sexual hosts and expand beyond the ranges of their original sperm donors. *The Royal Society*. 363:2911–2919.
- Guo, X., Liu, S., et Liu, Y. (2006). Evidence for recombination of mitochondrial DNA in triploid crucian carp. *Genetics* 172:1745–1749.
- Chow, S. et Hazama, K. (1998). Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular Ecology* 7:1247–1263.
- Economidis, PS., Bănărescu, P., 1991. The distribution and origins of freshwater Fishes in the Balkan Peninsula, especially in Greece. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*. 76:257–283.
- Economidis, PS., Nalbant, TT. (1996). A study of the loaches of the genera *Cobitis* and *Sabanejewia* (Pisces, Cobitidae) of Greece, with description of six new taxa. *Travaux Du Museum d'Histoire Naturelle “Grigore Antipa”*.26:295–347.
- Erk’akan F., Atalay–Ekmekçi FG. et Nalbant TT. (1998): Four new species and one new subspecies of the genus *Cobitis* (Pisces: Ostariophysi: Cobitidae) from Turkey. *Turkish Journal of Zoology*. 22: 9–15.
- Erk’akan F., Atalay–Ekmekçi, FG., Nalbant, TT. (1999).2 A review of the genus *Cobitis* in Turkey (Pisces: Ostariophysi: Cobitidae). *Hydrobiologia*. 403: 13–26
- Freyhof, J., Stelbrink, B., Özulug, M., Economidis, P. (2008). First record of *Cobitis puncticulata* from Europe with comments on its conservation status (Teleostei: Cobitidae). *Folia Zoologica* 57: 16–19.
- Griffiths HL., Kryštufek B., Reed, JM. (2004). *Balkan Biodiversity: Pattern and Process in the European Hotspot*. Kluwer Academic. Printed in the Netherlands. 203–217. ISBN: 978–1–4020–2853–3.
- Hänfling, B., Hellemans, B., Volckaert, FAM., Carvalho, GR. (2002). Late glacial history of the cold–adapted freshwater fish *Cottus gobio*, revealed by microsatellites. *Molecular Ecology*. 11:1717–1739.
- Hays, JD., Inbrie, J., Shackleton, NJ. (1976). Variations in the Earth’s orbit: pacemaker of the ice ages. *Science*. 194:1121–1132.

- Hewitt, GM. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*. 58:247–276.
- Hewitt, GM. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol J Linn Soc* 68:87–112.
- Hewitt, GM. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.
- Hewitt, GM. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *The Royal Society* 359:183–195.
- Hey J., Nielsen R. (2004). Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics*. 167:747–760.
- Hey J. (2005). On the number of New World founders: a population genetic portrait of the peopling of the Americas. *Public Library of Science Biology*. 3:965–975.
- Hey J, Nielsen R. (2007). Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Science*. 104:2785–2790
- Janko, K., Culling, MA., Ráb, P., Kotlik, P. (2005). Ice age cloning – comparison of the Quaternary evolutionary histories of sexual and clonal forms of spiny loaches (*Cobitis*: Teleostei) using the analysis of mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*. 14:2991–3004.
- Hillis, DM., et Dixon, MT. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66: 411–453.
- Huson D.H., Bryant D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*. 23:254–267.
- IUCN (2010). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. <http://www.iucn.redlist.org> Downloaded on 29 June 2010.
- Janko K., Flajšhans M., Choleva L., Bohlen J., Šlechtová V., Rábová M., Lajbner Z., Šlechta V., Ivanova P., Dobrovolov I., Culling M., Persat H., Kotusz J. et Ráb P. (2007): Diversity of European spined loaches (genus *Cobitis* L.): an update of the geographic distribution of the *Cobitis taenia* hybrid complex with a description of new molecular tools for species determination. *Journal of Fish Biology*. 71:387–408.
- Koskinen, MT., Ranta, E, Piironen, J, Veselov, A, Titov, S, Haugen, T.O. *et al* (2000). Genetic lineages and postglacial colonization of grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) in Europe, as revealed by mitochondrial DNA analyses. *Molecular Ecology*. 9:1609–1624.
- Kottelat, M., (1997). European freshwater fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation. *Biologia* 52, S1–S271.

- Kottelat, M., Freyhof, J., (2007). Handbook of European Freshwater Fishes. Publications Kottelat, Cornol, Switzerland.
- Kotlík P, Marková S, Choleva L, Bogutskaya NG., Ekmekci FG., Ivanova PP. (2008) Divergence with gene flow between Ponto–Caspian refugia in an anadromous cyprinid *Rutilus frisii* revealed by multiple gene phylogeography. *Molecular Ecology*. 17:1076–1088.
- Ladoukakis, ED., Zouros E. (2001). Recombination in Animal Mitochondrial DNA: Evidence from Published Sequences. *Molecular Biology and Evolution*. 18:2127–2131.
- Lockhart, PJ., Penny, D. et Meyer, A. (1995). Testing the phylogeny of swordtail fishes using split decomposition and spectral analysis. *Journal of Molecular Evolution*. 41(5): 666–674.
- Mallet, J. (2005): Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*. 20:229–237.
- Mallet, J. (2007): Hybrid speciation. *Nature*. 446:279–283.
- Markova S., Sanda R., Crivelli A., Shumka S., Wilson IF., Vukic J., Berrebi P., Kotlik P. (2010). Nuclear and mitochondrial DNA sequence data reveal the evolutionary history of *Barbus* (Cyprinidae) in the ancient lake systems of the balkane. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 55 (2), pp. 488–500.
- McDonald JHM., Kreitman M. (1991). Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature*. 351:652–654.
- Page RDM. (1996). Tree View: An application Nalbant TT., Ráb P., Böhlen J. et Saitoh K. 2001: Evolutionary success of the loaches of the genus *Cobitis* (Pisces: Ostariophysii: Cobitidae). *Travaux du Muséum National d’Histoire Naturelle*. 43: 277–289.
- Nesbo, CL., Fosseheim, T., Vollestad, A., Jakobsen, KS. (1999). Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. *Molecular Ecology*. 8:1387–1404.
- Nielsen, R., et Wakeley, J.(2001) Distinguishing migration from isolation: a Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics*. 158: 885–896.
- Novel, JP., Dimadi, A., Zervopoulou, A. et Bakalowicz, M. (2007). The Aggitis karst system, Eastern Macedonia, Greece: Hydrologic functioning and development of the karst structure. *Journal of Hydrology*. 334:477–492.
- Orrell, TM. (2000). A molecular phylogeny of the *Sparidae* (*Perciformes: Percoidei*). Dissertation. The College of William and Mary in Virginia, 291s.
- Pagano, A., Dubois, A., D. Lesbarrères, et T. Lodé. 2003. Frog alien species: A way for genetic invasion? *Comptes Rendus Biologies*. 236:85–S92.
- Page RDM. (1996). Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Bioinformatics*. 12(4):357–358.

- Palumbi, SR., Cipriano, F., Hare, MP. (2001). Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution*. 55:859–868.
- Pearson, RG., Dawson, TP. (2003). Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? *Global Ecology et Biogeography*. 12:361–371.
- Perdices, A., Doadrio, I. (2001). The molecular systematics and biogeography of the European Cobitids based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 19:468–478.
- Perdices, A., Bohlen, J., Doadrio, I. (2008) The molecular diversity of adriatic spined loaches (Teleostei, Cobitidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 46(1):382–390.
- Peters JL, Zhuravlev Y, Fefelov I, Logie A, Omland KE. (2007). Nuclear loci and coalescent methods support ancient hybridization as cause of mitochondrial paraphyly between gadwall and falcated duck (*Anas* spp.). *Evolution*. 61:1992–2006.
- Posada D., Crandall KA. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14:817–818.
- Ráb, P., Rábová, M., Bohlen, J. et Lusk, S. (2000). Genetic differentiation of the two hybrid diploid–polyploid complexes of loaches, genus *Cobitis* (Cobitidae) involving *C. taenia*, *C. elongatoides* and *C. spp.* in the Czech Republic: karyotypes and cytogenetic diversity. *Folia Zoologica*. 49:55–66.
- Reinig, W. (1950): Chorologische Voraussetzungen für die Analyse von Formenkreisen. *Syllegomena Biologica*, Festschrift für O. Kleinschmidt. 1950:364–378.
- Reyjol, Y., Hugueny, B., Pont, D., Bianco, PG., Beier, U., Caiola, N., Casals, F., Cowx, I., Economou, A., Ferreira, T., Haidvogel, G., Noble, R., De Sostoa, A., Vigneron, T., et Virbickas, T. (2007). Patterns in species richness and endemism of European freshwater fish. *Global Ecology and Biogeography*. 16:65–75.
- Rögl, F., (1998). Palaeogeographic considerations for Mediterranean and Paratethys Seaways (Oligocene to Miocene). *Ann. Naturhist. Mus. Wien*. 99:279–310.
- Rögl, F. (1999). Mediterranean and paratethys. Facts and hypotheses of an Oligocene to Miocene paleogeography (short overview). *Geologica Carpathica*, 50:339–349. The European Environment Agency <http://www.eea.europa.eu/>.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, JC., Messeguer, X., Rozas, R. (2003). DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 19:2496–2497.
- Roy, K., Valentine, JW., Jablonski, D., Kidwell, SM. (1996) Scales of climatic variability and time answering in Pleistocene biotas: implications for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*. 11:458–453.

- Ryan WBF., Pitman WC. III, Major CO. et al. (1997) An abrupt drowning of the Black Sea shelf. *Marine Geology*, 138:119–126.
- Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406–425.
- Schmidt, TR., Bielawski, J. P., et Gold, JR. (1998). Molecular phylogenetics and evolution of the cytochrome *b* gene in the cyprinid genus *Lythrurus* (Actinopterygii: Cypriniformes). *Copeia*. 1:14–22.
- Schmitt, T. (2006). Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology*. 4:11.
- Slatkin M. (2005). Seeing ghosts: the effect of unsampled populations on migration rates estimated between sampled populations. *Molecular Ecology*. 14:67–73.
- Sullivan J., Swofford DL. (2001). Should we use model-based methods for phylogenetic inference when we know assumptions about among-site rate variation and nucleotide substitution pattern are violated? *Systematic Biology*. 50:723–729.
- Susnik, S., Snoj, A., et Dovec, P. (2001). Evolutionary distinctness of grayling (*Thymallus thymallus*) inhabiting the Adriatic river system, as based on mtDNA variation. *Biological Journal of the Linnean Society*. 74: 375–385.
- Swofford DL. (2002). PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). 4.0 beta 10 ed. Sunderland, MA: Sinauer.
- Šedivá, A., Apostoulou, A., Kohout, J., Bohlen, J. (2010a). Molecular phylogeographic analyses of the loach *Oxynoemacheilus bureschi* reveal post-glacial range extensions across the Balkans. *Journal of Fish Biology*. 76:357–368.
- Šedivá, A., Apostoulou, A., Janko, K., Kohout, J., Kostov, V., Šanda, R. (2010b). Genetic structure and distribution of *Oxynoemacheilus bureschi* (Balitoridae, Teleostei), and its phylogenetic relationships with other European stone loaches. *Folia Zoologica*. 57:111–119.
- Šlechtová, V., Bohlen, J., Freyhof, J., Persat, H. et Del Mastro, G. (2004) The alps as barrier to dispersal of cold-adapted freshwater fishes? Phylogeographic history and taxonomic status of the bullhead in the Adriatic freshwater drainage. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 33:225–239.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy AG., Cosson JF. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*. 7:453–464.
- Takács, P., Csoma, E., Erós, T., Sándor Nagy, A. (2008). Distribution patterns and genetic variability of three stream-dwelling species. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 54(3): 289–303.

- Thompson, JD., Higgins, DG., Gibson, TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22:4673-4680.
- Tsigenopoulos, CS., Berrebi, P. (2000). Molecular phylogeny of north Mediterranean freshwater barbs (genus *Barbus*: Cyprinidae) inferred from cytochrome *b* sequences: biogeographic and systematic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 14:165–179.
- Vasil'eva ED, Vasil'ev VP. (2006). *Cobitis pontica* sp. nova—a new spined loach species (Cobitidae) from the Bulgarian waters. *J Ichthyol*. 46:15–20.
- Von Haeseler A., Strimmer K. (2003). Phylogenetic inference based on maximum likelihood methods with TREE-PUZZLE. In M. Salemi, A.M. Vandamme (eds.). *The Phylogenetic Handbook*, 137–159, Cambridge University Press, Cambridge.
- Vladykov, VD., Renaud CB., Kott, E., et ECONOMIDIS, PS. (1982): A new nonparasitic species of Holarctic lamprey, genus *Eudontomyzon* Regan, 1911 (Petromyzontidae), from Greece. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 60: 2897–2915.
- Webb, T., Bartlein, P.J. (1992) Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic response. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 23:141–173.
- Weisrock, DW., Macey, JR., Ugurtas, IH., Larson, A., Papenfuss, T.J., (2001). Molecular phylogenetics and historical biogeography among salamandrids of the “true” salamander clade: rapid branching of numerous highly divergent lineages in *Mertensiella luschani* associated with the rise of Anatolia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 18:434–448.
- Wiley, EO., Mayden, RL., (2000). The evolutionary species concept. In: Wheeler, QD., Meier, R. (Eds.), *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate*. Columbia University Press, New York, pp. 70–89.
- Ronquist F., Huelsenbeck JP. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19:1572–1574.
- Won YJ, Hey J. 2005. Divergence population genetics of chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 22:297–307.
- Yang Z., Rannala B. (1997). Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, 14:717–724.

8 PŘÍLOHY

Seznam příloh:

Příloha 1: Mapa východního Balkánského poloostrova (území dnešního Bulharska, Řecka a evropské části Turecka znázorňující 44 lokalit s odchycenými a analyzovanými jedinci.

Příloha 2: Mapa východního Balkánského poloostrova (území dnešního Bulharska, Řecka a evropské části Turecka) znázorňující 44 lokalit s odchycenými a analyzovanými jedinci a jejich haplotypové složení genu *cyt b*.

Příloha 3: Mapa východního Balkánského poloostrova (území dnešního Bulharska, Řecka a evropské části Turecka znázorňující 23 lokalit s odchycenými a analyzovanými jedinci a jejich haplotypové složení genu *S7*.

Příloha 4: Seznam lokalit odchycených jedinců linie Bicanestrinia III.

Příloha 5: Počet sekvenovaných jedinců genu *cyt b* a *S7* na jednotlivých lokalitách a jejich haplotypové složení.

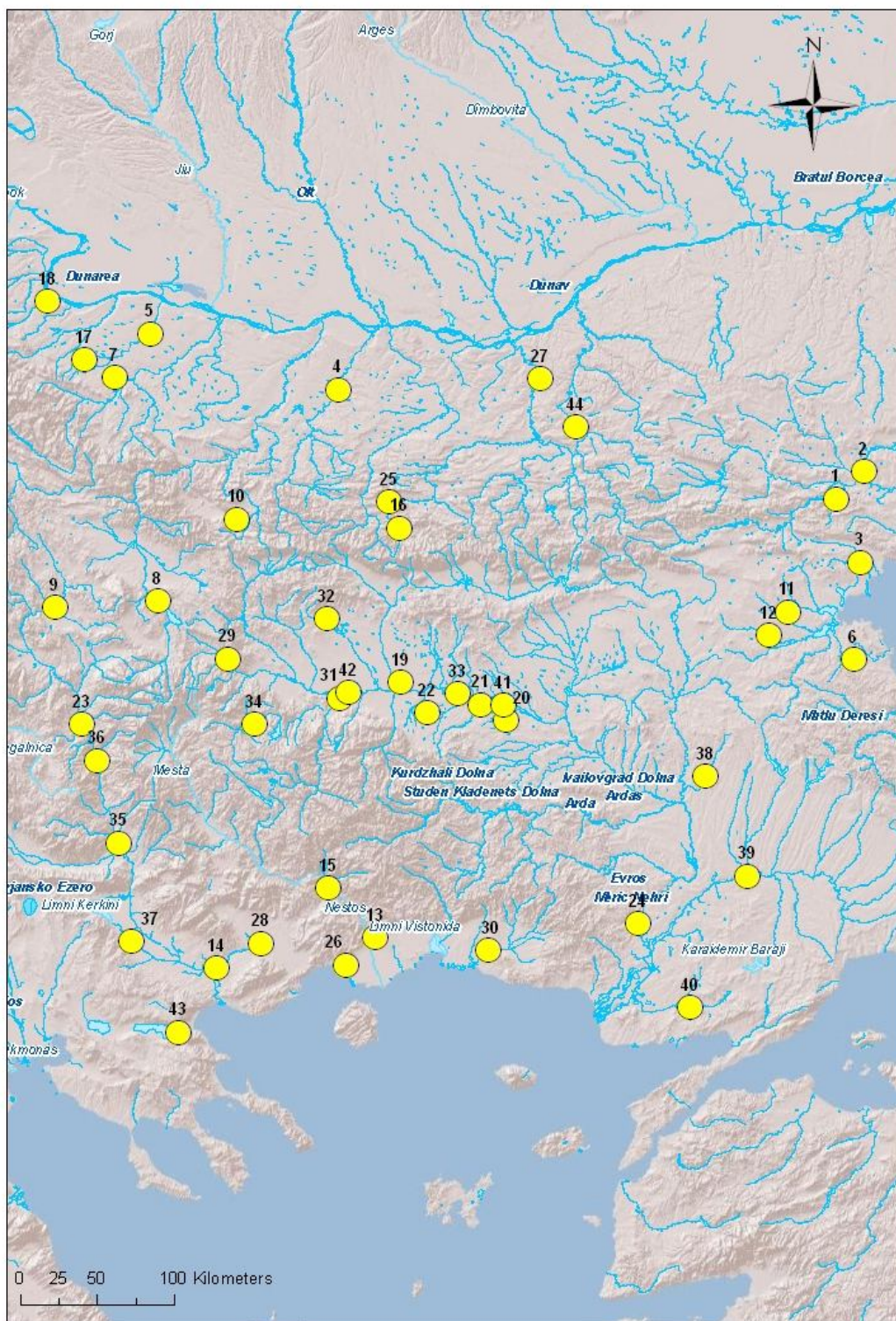
Příloha 6: Posteriorní distribuce pravděpodobnosti (vážená mutační mírou) odhadnuta pro migrační míry programem IM pro mitochondriální gen *cyt b* a separátně jaderný gen *S7*.

Příloha 7: Výsledky analýzy IM

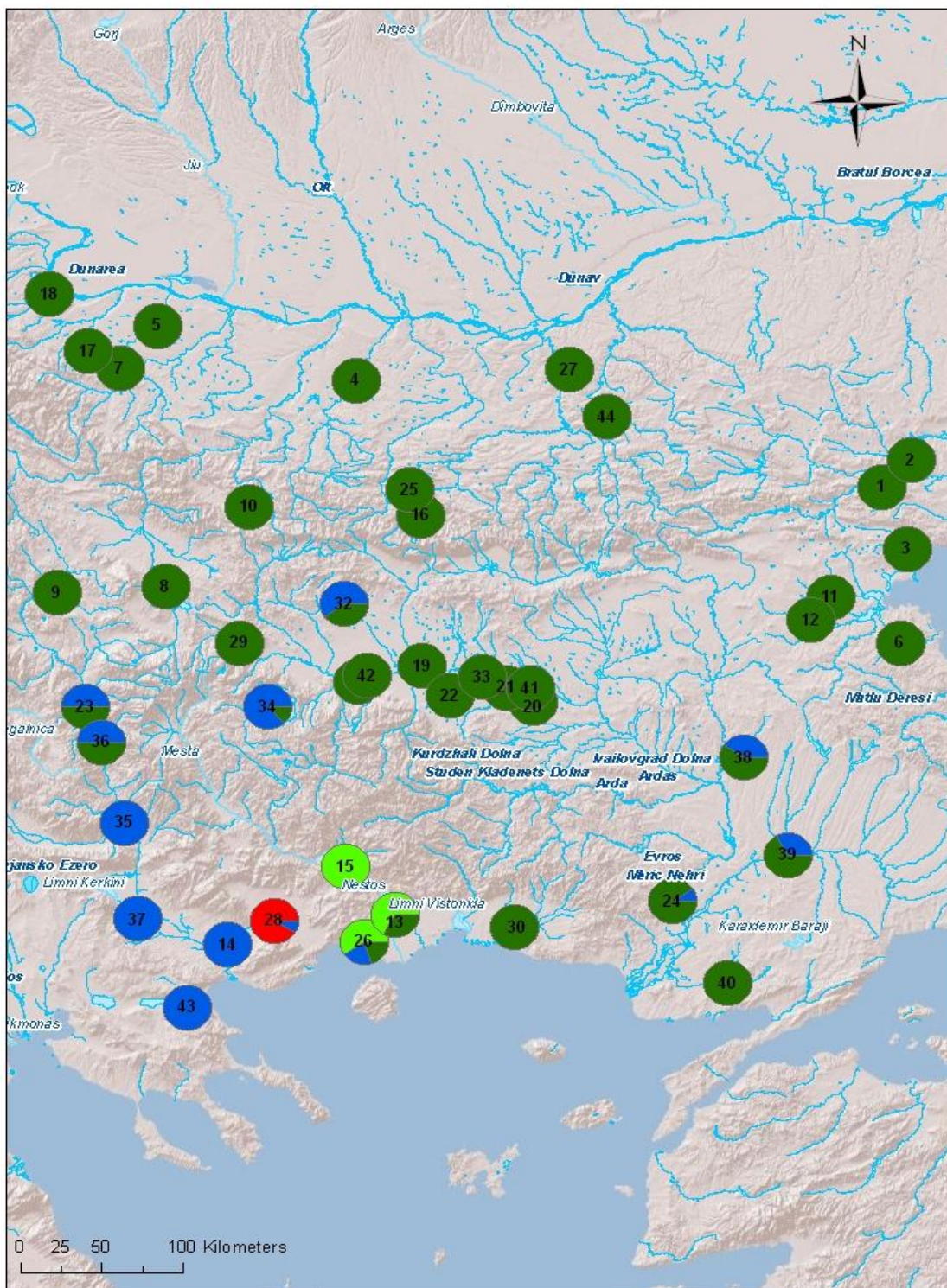
Příloha 8: Variabilní pozice a jejich nukleotidové složení v mitochondriálním genu *cyt b*, definující 51 různých haplotypů (Hap) 248 jedinců patřících do taxonů *C. strumicae* a *C. puntilineata*.

Příloha 9: Variabilní pozice a jejich nukleotidové složení v mitochondriálním genu *S7*, definující 22 různých haplotypů (Hap) 94 jedinců patřících do taxonů *C. strumicae* a *C. puntilineata*.

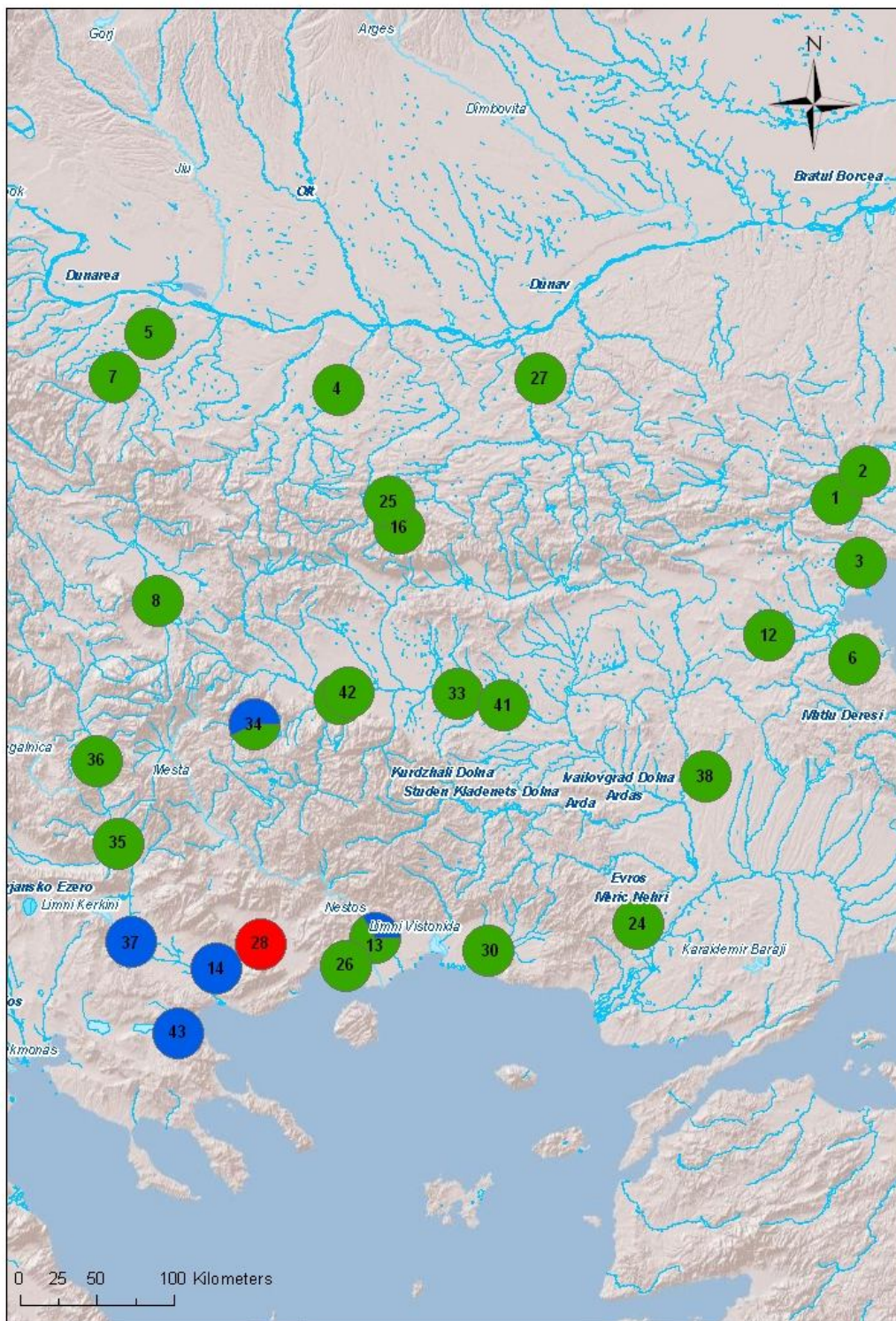
Příloha 1: Mapa východního Balkánského poloostrova (území dnešního Bulharska, Řecka a evropské části Turecka znázorňující 44 lokalit s odchycenými a analyzovanými jedinci. Koordináty jednotlivých lokalit jsou zaznamenány v Příloze 4.



Příloha 2: Mapa východního Balkánského poloostrova (území dnešního Bulharska, Řecka a evropské části Turecka) znázorňující 44 lokalit s odchycenými a analyzovanými jedinci a jejich haplotypové složení genu *cyt b*. Tmavě zelenou barvou je znázorněna bazální skupina (Z1), světle zelená barva označuje monofyletický subklád jedinců z řeky Mesta (Nestos; Z2), tmavě modrou barvou je znázorněn jihovýchodní subklád (M) a červenou barvou jsou znázorněny haplotypy, jež nesou jedinci druhu *C. punctilineata* (Č). Názvy haplotypů korespondují s Přílohou 4 a Y a textem. Velikost výšece u jednotlivých haplotypů je proporční k počtu jedinců sdílející stejný haplotyp na dané lokalitě.



Příloha 3: Mapa východního Balkánského poloostrova (území dnešního Bulharska, Řecka a evropské části Turecka znázorňující 23 lokalit s odchycenými a analyzovanými jedinci a jejich haplotypové složení genu S7. Tmavě zelenou barvou je znázorněna bazální skupina (Z), tmavě modrou barvou je znázorněn jihovýchodní subklád (M) a červenou barvou jsou znázorněny haplotypy, jež nesou jedinci druhu *C. punctilineata* (Č). Názvy haplotypů korespondují s Přílohou 4 a Y a textem. Velikost výšece u jednotlivých haplotypů je proporční k počtu jedinců sdílející stejný haplotyp na dané lokalitě.



Příloha 4: Seznam lokalit odchycených jedinců linie Bicanestrinia III

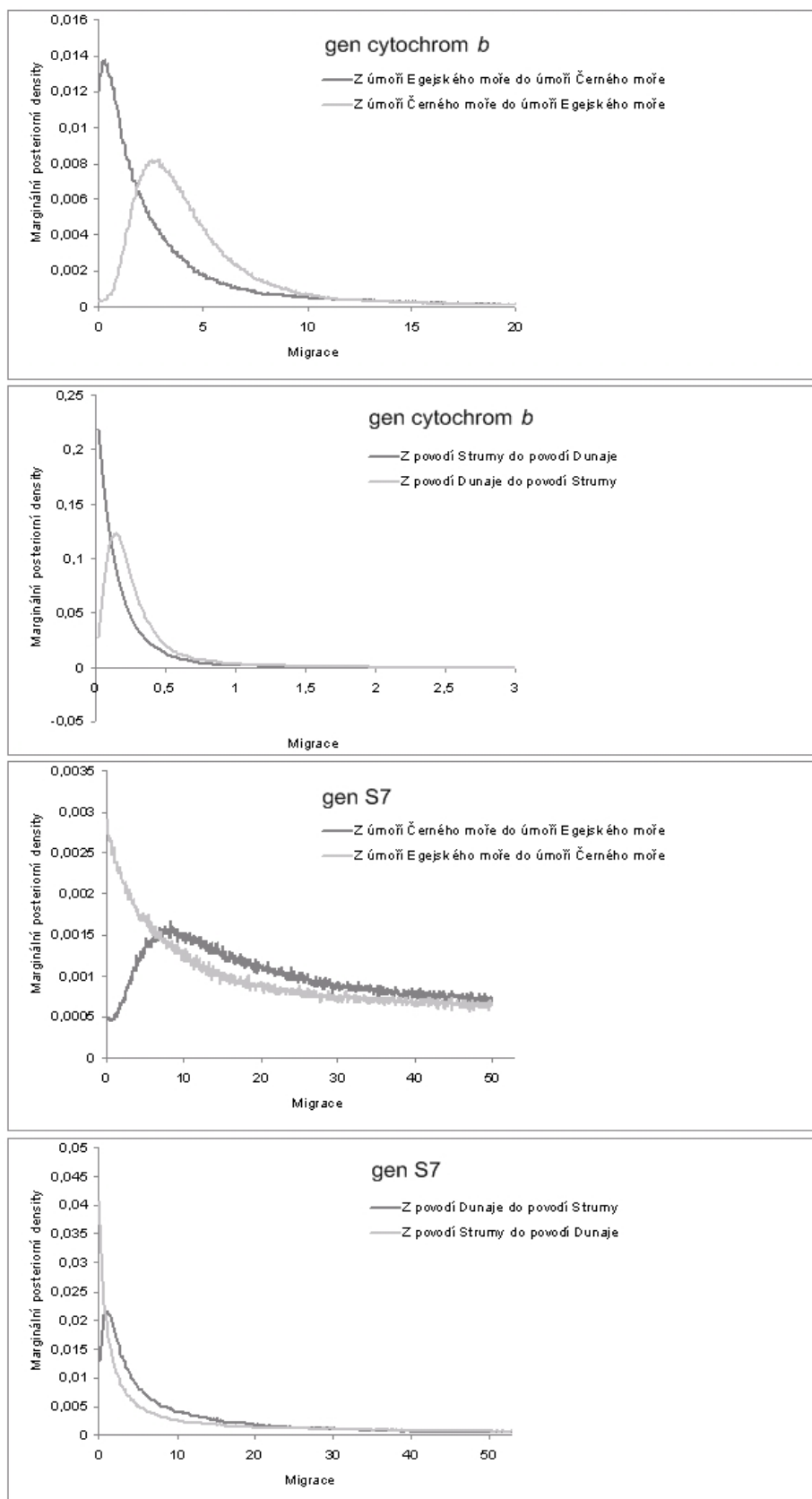
	Název lok.	Lokalita	Oblast	GPS souřadnice	
				N	E
1.	09BG11	ř. Elesniza	Bulharsko	42,974	27,443
2.	09BG13	ř. Provadijska	Bulharsko	43,09	27,608
3.	09BG15	ř. Aheloy	Bulharsko	42,702	27,59
4.	09BG16	ř. Vit	Bulharsko	43,438	24,542
5.	09BG18	ř. Cibrica	Bulharsko	43,672	23,451
6.	09BG2	ř. Ropotamo	Bulharsko	42,285	27,553
7.	09BG20	ř. Lom	Bulharsko	43,487	23,24
8.	09BG21	ř. Iskar	Bulharsko	42,536	23,493
9.	09BG22	ř. Nestos	Bulharsko	42,507	22,892
10.	09BG3	ř. Dyavolska	Bulharsko	42,887	23,955
11.	09BG5	ř. Rusokastrenska	Bulharsko	42,488	27,164
12.	09BG8	ř. Sredecka	Bulharsko	42,387	27,053
13.	09GR1	ř. Nestos	Řecko	41,073	24,757
14.	AGGR	ř. Aggitis	Řecko	40,938	23,836
15.	ARKO	ř. Nestos, Arkoudorema	Bulharsko	41,291	24,487
16.	ATJ	ř. Vidima, Aprilci	Bulharsko	43	24,903
17.	B10	ř. Cibrica	Bulharsko	43,562	23,067
18.	B4	ř. Arcar	Bulharsko	43,81	22,85
19.	CALB 5	ř. Stryama	Bulharsko	42,185	24,908
20.	CALB 6	ř. Banska	Bulharsko	42,021	25,522
21.	CALB 7	ř. Kayalijka	Bulharsko	42,089	25,371
22.	CALB 8	ř. Maritza, Dimitrovgrad	Bulharsko	42,054	25,065
23.	CSTR 1	ř. Struma	Bulharsko	42,004	23,052
24.	DAGR	ř. Diavolorema	Řecko	41,134	26,293
25.	DEJA	ř. Vidima, Debnevo	Bulharsko	42,958	24,843
26.	CHAN	ř. Nestos	Bulharsko	40,954	24,588
27.	JAN	ř. Jantra	Bulharsko	43,482	25,72
28.	KAGR	ř. Aggitis, Kalambaki	Řecko	41,048	24,095
29.	KOST	ř. Maritza, Kostenets	Bulharsko	42,287	23,903
30.	LIGR	ř. Lissos	Řecko	41,017	25,42
31.	MA 1	ř. Vaca	Bulharsko	42,117	24,553
32.	MA 2	ř. Pjasacnik	Řecko	42,458	24,475
33.	PARV	ř. Maritza, Parvomay	Bulharsko	42,136	25,243
34.	ST 2	ř. Struma	Bulharsko	42,004	24,052
35.	STBU 1	ř. Struma	Bulharsko	41,488	23,262
36.	STBU 2	ř. Struma	Bulharsko	41,848	23,141
37.	STGR	ř. Strymon	Řecko	41,055	23,34
38.	T 1	ř. Lolapasha	Turecko	41,777	26,682
39.	T 2	ř. Kanli Dere	Turecko	41,343	26,925
40.	T 6	ř. Kesa, Ebro drainage	Turecko	40,766	26,592
41.	TUND	ř. Tundja	Bulharsko	42,086	25,508
42.	VACA	ř. Vaca	Bulharsko	42,14	24,604
43.	VOGR	j. Volvi	Řecko	40,655	23,613
44.	C4	ř. Jantra	Bulharsko	43,277	25,9316

Příloha 5: Počet sekvenovaných jedinců genu *cyt b* a S7 na jednotlivých lokalitách a jejich haplotypové složení

	Název lok.	N <i>cyt b</i>	Haplotyp <i>cyt b</i>	N S7	Haplotyp S7
1.	09BG11	10		H1(10) 2	H2(2)
2.	09BG13	1		H1(1) 1	H2(1)
3.	09BG15	6		H1(4), H2(1), H3(1) 4	H2(4)
4.	09BG16	17		1H1(3), H44(1), H17(2), H4(1) 5	H2(5)
5.	09BG18	11		H1(1), H5(4), H6(6) 7	H2(6), H16(1)
6.	09BG2	4		H1(3), H8(1) 1	H(1)
7.	09BG20	9		H1(5), H5(1), H7(3) 7	H2(5), H18(2)
8.	09BG21	5		H1(5) 4	H2(2), H19(1), H20(1)
9.	09BG22	1		H1(1) 0	-
10.	09BG3	1		H8(1) 0	-
11.	09BG5	1		H9(1) 0	-
12.	09BG8	12		H1(11), H10(1) 1	H2(1)
13.	09GR1	12		H20(1), H45(1), H11(4), H12(3), H13(2), H14(1) 6	H2(1), H3(1), H5(1), H7(1), H12(1), H15(1)
14.	AGGR	3		H15(2), H16(1) 2	H7(1), H8(1)
15.	ARKO	4		H12(3), H21(1) -	-
16.	ATJ	5		H1(4), H22(1) 1	H2(1)
17.	B10	6		H1(1), H4(1), H5(4) -	-
18.	B4	3		H1(3) -	-
19.	CALB 5	1		H1(1) -	-
20.	CALB 6	1		H4(1) -	-
21.	CALB 7	1		H1(1) -	-
22.	CALB 8	4		H1(3), H18(1) -	-
23.	CSTR 1	2		H19(1), H20(1) -	-
24.	DAGR	10		H1(7), H4(1), H24(1), H29(1) 5	H2(5)
25.	DEJA	2		H1(2) 2	H2(1), H21(1)
26.	CHAN	5		H12(1), H13(1), H21(1), H23(1), H24(1) 2	H2(1), H4(1)
27.	JAN	6		H1(6) 4	H2(3), H18(1)
28.	KAGR	11		H30(1), H48(2), H49(5), H50(1), H51(2) 8	H9(1), H10(1), H13(4), H14(2)
29.	KOST	4		H1(4) -	-
30.	LIGR	9		H20(6), H25(1), H26(1), H27(1) 2	H16(1), H17(1)
31.	MA 1	5		H1(3), H31(1), H32(1) 3	H2(2), H18(1)
32.	MA 2	10		H1(3), H24(6), H33(1) 1	M3(1)
33.	PARV	2		H1(1), H28(1) 2	H22(1), H23(1)
34.	ST 2	8		H1(1), H24(4), H38(1), H39(1), H40(1) 7	H2(1), H3(2), H7(2), H8(2)
35.	STBU 1	3		H30(3) 1	H2(1)
36.	STBU 2	2		H1(1), H24(1) 1	H3(1)
37.	STGR	5		H15(1), H34(1), H35(1), H36(1), H37(1) 4	H7(1), H8(1), H11(2)
38.	T 1	10		H1(5), H24(2), H30(1), H37(1), H41(1) 4	H2(2), H3(1), H20(1)
39.	T 2	3		H1(1), H42(1), H43(1) -	-
40.	T 6	6		H1(1), H44(5) -	-
41.	TUND	5		H1(4), H9(1) 1	H2(1)
42.	VACA	5		H1(5) 2	H2(1), H20(1)
43.	VOGR	10		H24(4), H46(6) 4	H6(2), H12(1), H16(1)
44.	C4	7		H1(7) -	-
celkem		248		94	

Pozn.: n *cyt b* – počet sekvenovaných jedinců genu *cyt b*; n S7 – počet sekvenovaných jedinců genu S7; Haplotyp *cyt b* – haplotypové složení genu *cyt b* na jednotlivých lokalitách; Haplotyp S7 - haplotypové složení genu S7 na jednotlivých lokalitách; H1 – H51 označuje číslo haplotypu, údaj v závorce vyjadřuje počet jedinců s daným haplotypem

Příloha 6: Posterioční distribuce pravděpodobnosti (vážená mutační mírou) odhadnuta pro migrační míry programem IM pro mitochondriální gen *cyt b* a separátně jaderný gen *S7*



Příloha 7: Výsledky analýzy IM

cyt b	$\theta_{\check{C}}$	θ_E	$\theta_{\check{C}E}$	t	$m_{z E do \check{C}}$	$m_{z \check{C} do E}$
Mean	7.9332	45.3208	138.2133	132.1500	1.9000	3.9000
HPD90Lo	0.5216	31.5955	8.0979†	1.3500†	0.0200†	0.4200
HPD90Hi	18.3644	54.8736	274.3678†	262.0500†	10.4200†	10.5800
cyt b	θ_D	θ_S	θ_{DS}	t	$m_{z S do D}$	$m_{z D do S}$
Mean	9,1238	35,5549	125,1666	154,35	0,1	0,22
HPD90Lo	3,5835	23,6101	0,1271†	18,7500†	0,02	0,02
HPD90Hi	15,5791	50,8037	254,0183†	299,8500†	0,54	0,66
S7	θ_E	$\theta_{\check{C}}$	$\theta_{\check{C}E}$	t	$m_{z E do \check{C}}$	$m_{z \check{C} do E}$
Mean	5.5699	0.4304	32.1538	150.7500	20.5250	16.4250
HPD90Lo	0.2762†	0.0064	0.0321†	3.7500†	2.3750†	0.0250†
HPD90Hi	12.8422†	3.5912	64.2112†	299.8500†	46.0750†	46.0750†
S7	θ_S	θ_D	θ_{SD}	t	$m_{z D do S}$	$m_{z S do D}$
Mean	1,8325	0,6396	35,8241	151,35	8,9	16,9
HPD90Lo	0,0072†	0,0072	0,0359†	4,6500†	0,1000†	0,1000†
HPD90Hi	9,1052†	4,0891	71,8279†	299,8500†	199,9000†	199,9000†

Pozn.: θ - čas od rozdělení ancestrální populace, m - migrační míra, † indikuje že HDP interval se nezdá být přilehlým a odhady nejsou spolehlivé, HPD90Lo – dolní hranice odhadu hranice 90% intervalu, HPD90Hi – horní hranice odhadu hranice 90% intervalu, Č – úmoří Černého moře, E – úmoří Egejského moře D – povodí Dunaje, S – povodí Strumy

Příloha 8: Variabilní pozice a jejich nukleotidové složení v mitochondriálním genu *cyt b*, definující 51 různých haplotypů (Hap) 248 jedinců patřících do taxonů *C. strumicae* a *C. puntilineata*

Pozice	[111	1122222223	3333344445	5556666666	7777788888	889999]
	[1345679347	8901467892	3678936890	1380145789	0245790345	670134]
#Hap_1	TCTCAGTTTC	TGTATTCTCA	TTATTCTATT	CGACCTAAAT	ACCTTGTTAA	CGTCAC	
#Hap_2
#Hap_3C.....
#Hap_4T..
#Hap_5
#Hap_6
#Hap_7
#Hap_8
#Hap_9T.....
#Hap_10G.....
#Hap_11G.....
#Hap_12	.T.....T...G.....
#Hap_13
#Hap_14	T.....G..
#Hap_15C...TC....	G....C.G.
#Hap_16C...TC....C.G.
#Hap_17	...G.C...
#Hap_18
#Hap_19TC....C.G.
#Hap_20C
#Hap_21	T.....G..
#Hap_22C.....
#Hap_23G..	.T.....
#Hap_24TC....C.G.
#Hap_25A.....C
#Hap_26CT
#Hap_27C
#Hap_28A.....
#Hap_29C...
#Hap_30TC....C	G....C.G.
#Hap_31	C.....
#Hap_32	...T.....
#Hap_33T.....
#Hap_34TC....	G....C.G.
#Hap_35	..C..C...TC....G..C.G.
#Hap_36	..C.....TC....C.G.
#Hap_37TC....	G....C.G.
#Hap_38TC....	...C.....C.G.
#Hap_39TC.A..C.G.
#Hap_40T	C...C....C.G.
#Hap_41TC....	G....C.G.
#Hap_42C
#Hap_43C..C.....C..
#Hap_44T....C..
#Hap_45C
#Hap_46TC....C.G.
#Hap_47C..	..C.CCT.T.	C.G...CGCC	..CTTCG...	G..CCA...G.
#Hap_48C..	..C.CCT.T.	C.G...CGCC	..CTTCG...	G..CCA...GG.
#Hap_49C..	..C.CCT.T.	C.G...CGCC	..CTTCG...	G..CCA...GG.
#Hap_50C..	..C.CCT.T.	C.G...CGCC	..CTTCG...	GT.CCA...GG.
#Hap_51C..	..C.CCT.TG	C.G...CGCC	..CTTCG...	G..CCA...GG.

Příloha 8. Pokračování

Pozice						
[111111111	111111111	111111111	111111111	111111111	222222]
[9000001111	1122222333	3344444555	6666677777	8888889999	000011]
[5014890125	8901278025	7801469135	0236901346	0156785679	145712]
#Nap_1	TTTATCTTAA	ATACTCCAAA	ACTTATGCAC	ACCGCGAGAT	ATACTCCAAG	TACCAT
#Nap_2C....A..
#Nap_3
#Nap_4
#Nap_5T.
#Nap_6C
#Nap_7	.C.....
#Nap_8	...C....
#Nap_9
#Nap_10
#Nap_11	.A.....C.T....	.C.....
#Nap_12	.A.....C.T....	.C.....
#Nap_13	.A.....
#Nap_14	.A.....C.T....	.C.T....
#Nap_15C..	...TC..G..	.T..GC.T.TA.A..T... .T...
#Nap_16C.G	...TC..G..	.T..GC.T.TA.A..T... .T...
#Nap_17
#Nap_18TT.....
#Nap_19C..	.C.TC..G..	.T..GC.T.TA.A..T... .T...
#Nap_20	.A.....
#Nap_21	.A.....C.T....	.C.....
#Nap_22
#Nap_23	.A.....C.T....	.C.....
#Nap_24C..	...TC..G..	.T..GC.T.TA.A..T... .T...
#Nap_25	.A.....
#Nap_26	.A.....
#Nap_27	.A.....G
#Nap_28
#Nap_29
#Nap_30C..	...TC..G..	.T..GC.T.TA.A..T... .T...
#Nap_31
#Nap_32T...
#Nap_33
#Nap_34CC.	...TC..GC.	.T..GC.T.TA.A..T... .T...
#Nap_35C..	...TC..G..	.T..GC.T.TA.A..T... .T...
#Nap_36CC..	...TC..G..	.T..GC.T.TA.A..T... .T...
#Nap_37C..	...TC..G..	.T..GC.T.TA.A..T... .T...
#Nap_38C..	...TC..G..	.T..GC.T.TA.A..T... .T...
#Nap_39C..	...TC..G..	.T..GC.T.TA.A..T... .T.T.
#Nap_40C..	...TC..G..	.T..GC.T.TA.A..T... .T...
#Nap_41C..	...TC..G..	.T..GC.T.T	.T..A.A..T... .T...
#Nap_42G.
#Nap_43
#Nap_44
#Nap_45	.A.G.....
#Nap_46C..	...TCT.G..	.T..GC.T.TA.A..T... .T...
#Nap_47	CAC.CT...G	G.G.....G	G.CC..A...	G..AT.C.T.	G.G.CTTTGT	.GTT.A
#Nap_48	CAC.CT...G	G.G.....G	G.CC..A...	G..AT.C.T.	G.G.CTTTGT	GGTT.A
#Nap_49	CAC.CT...G	G.G.....G	G.CC..A...	G..AT.C.T.	G.G.CTTTGT	.GTT.A
#Nap_50	CAC.CT...G	G.G.....G	G.CC..A...	G..AT.C.T.	G.G.CTTTGT	.GTT.A
#Nap_51	CAC.CT...G	G.G.....G	G.CC..A...	G..AT.C.T.	G.G.CTTTGT	.GTT.A

Příloha 9: Variabilní pozice a jejich nukleotidové složení v mitochondriálním genu S7, definující 22 různých haplotypů (Hap) 94 jedinců patřících do taxonů *C. strumicae* a *C. puntilineata*

Pozice				
[111122222	2333333334	4444455555	6666666]
[7056624577	7124556780	0035803688	012455]
[7471577526	8361560584	6753795315	897907]
Hap_2	TCCAGTGCAA	CTTCTCACTA	CAGGCTAATT	CCATAC
Hap_3TC....
Hap_4	.T.....C
Hap_5	.T.....TC...C
Hap_6	..T..C..T-	..GTGA....	TT.A...C..	A.C..T
Hap_7	..T..C..T-	..GTGA....	T..A...C..	A.C...
Hap_8	..T.TCT.T-	..GTGA....	TT.AA..C..	A.C...
Hap_9	..?T.C.TT-	T..TGA....	..?.....C.	A.C...
Hap_10	..?T.C.TT-	T..TGA..C.	..?.....C.	A.C...
Hap_11	..T..C..T-	..GTGA....	T..A...C..	A.C...
Hap_12	..T.TCT.T-	..GTGA....	T..A...C..	A.C...
Hap_13	..?..C.TT-	T..TGA....C.	A.C...
Hap_14	..?..C.TT-	T..TGAT...C.	A.CCC.
Hap_15A.....	A.C...
Hap_16A.....
Hap_17	A.C...
Hap_18GT..G...
Hap_19C.	..A.....
Hap_20	C.....C.....
Hap_21	C.....GT..CG...
Hap_22C.....	.T.....
Hap_23	C.....C.....	.T.....