

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

Katedra zoologie

Zdeněk Lerch

Fylogeografie rodu *Squalius* v Albánii



Diplomová práce

Praha 2012

Školitel: RNDr. Miroslav Švátora, CSc.

Konzultant: Mgr. Radek Šanda, Ph.D., Národní Muzeum v Praze

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat vedoucímu své diplomové práce panu RNDr. Miroslavu Švátorovi, CSc. a také svému konzultantovi Mgr. Radku Šandovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky při psaní bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Danielu Fryntovi za cenné rady a nápady a především pak své rodině za trpělivost a podporu v průběhu studia.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně s použitím citované literatury pod vedením RNDr. Miroslava Švátory, CSc. a souhlasím s jejím zveřejňováním.

V Praze dne 12.8.2012

Zdeněk Lerch

OBSAH

Souhrn.....	6
Summary.....	7
1. Úvod.....	8
2. Problematika.....	11
2.1 Fyzickogeografická charakteristika Albánie.....	11
2.2 Charakteristika rodu <i>Squalius</i>	13
2.2.1. <i>Squalius</i> ve středomoří.....	14
2.2.2. <i>Squalius</i> na Balkáně.....	15
3. Materiál a metodika.....	17
3.1 Materiál.....	17
3.2 Izolace DNA.....	17
3.3 PCR a sekvenace DNA.....	17
3.4 Alignment.....	18
3.5 Tvorba datasetu.....	19
3.6 Fylogenetické analýzy.....	26
3.6.1. Neighbor - joining (NJ).....	27
3.6.2. Maximum Parsimony (MP).....	27
3.6.3. Maximum likelihood (ML).....	28
3.6.4. Bayesovská analýza (BA).....	28
3.7 Tvorba haplotypových sítí.....	28
4. Výsledky.....	29
4.1. Fylogenetické stromy.....	29
4.2 Haplotypové sítě.....	32
5. Diskuse.....	37
5.1. Kolonizace.....	38
6. Závěr.....	40

7. Literatura.....	41
Přílohy.....	48

Souhrn

Diplomová práce na téma Fylogeografie rodu *Squalius* v Albánii

popisuje genetickou diverzitu tohoto rodu v Albánii a přilehlých oblastech a to na základě molekulární analýzy cytochromu b.

V této oblasti byly identifikovány celkem tři linie nejasného taxonomického postavení, které se vzájemně geneticky lišily v průměru o 1,6 % - 2,1 %. Jedna linie je rozšířena směrem na sever od Albánie, v celé perijadranské oblasti, další linie se vyskytuje hlavně v severní polovině Albánie a konečně třetí linie má centrum výskytu v oblasti starých tektonických jezer Prespa a Ochrid, odkud proniká zejména do jižní části Albánie. V povodí Ochrid -Drin-Skadar systému se obě linie vyskytují sympatricky.

Fylogenetická a taxonomická situace rodu *Squalius* se v této části Balkánu jeví jako zajímavé téma i pro budoucí detailnější studie.

Klíčová slova: *Squalius*, Albánie, cytochrom b, fylogeografie

Summary

The thesis is focused on the issue of the *Squalius* genus phylogeography in Albania in the Balkan region. Phylogenetic analyses of sequence variation at mitochondrial genes (cytochrome b) were used to examine these issues for the freshwater fish genus *Squalius* from various river systems in the Adriatic Sea region. There were identified 3 genetic lineages of vague taxonomic position where the genetic variation amount to 1.6–2.1 %. The first lineage is distributed in north of Albania and in the whole Periadriatic region, the second lineage is especially spread to northern part of Albania and the third lineage covers especially the zone of the European ancient lake systems on the Balkan Peninsula (Lake Ohrid and Prespa), from where expands to the southern part of Albania. There sympatrically coincide the both lineage in the hydrological river-lake system of Drin and Skadar. The phylogenetic and taxonomic position of the *Squalius* genus in the region seems to be interesting topic for subsequent and more detailed study.

Keywords: *Squalius*, Albania, cytochrome b, phylogeography

1. Úvod

Fylogeografie se zabývá principy a procesy, které řídí geografickou distribuci genealogických linií především uvnitř druhu, či u blízkce příbuzných druhů (Avice, 2000). Tato věda využívá molekulárně genetická data k testování paleogeografických hypotéz, které vysvětlují současnou distribuci rostlin a živočichů. Lze tedy říci, že se jedná o hraniční obor, jenž mimo jiné úzce souvisí také s evoluční biologii, taxonomií a dalšími obory.

Evoluce a speciace jsou procesy, které rozhodující měrou ovlivňují současné rozšíření organismů na planetě. Kolonizace, radiace, izolace a extinkce hrají hlavní roli v diverzifikaci organismů (Bernatchez et Wilson, 1998; Hewitt, 2001). Klimatické změny (např. střídání glaciálů a interglaciálů v pleistocénu) měly za následek stažení druhů do refugií během období s nepříznivými podmínkami a odtud jejich následnou rekolonizaci během období s příhodnějšími podmínkami (Bernatchez et Dodson, 1991; O'Reilly et al., 1993; Wilson et al., 1996). Geografická izolace, genetický drift a selekce lokálních adaptací přispívá k výrazné vnitrodruhové diferenciaci populací, zatímco genový tok brzdí jejich genetickou divergenci. Rozdíly mezi genetickou strukturou populací druhu reflektují kolonizační události během období rekolonizace a mohou tak sloužit k rekonstrukcím disperzních procesů (Avice et al., 1987). Obecně lze říci, že evoluce a disperze sladkovodních ryb úzce souvisí s paleogeografickými procesy a s historickým vývojem říčních toků v důsledku geologického vývoje krajiny (Bianco, 1990; Bermingham et Martin, 1998). Sladkovodní ryby mohou dosáhnout nového povodí zpravidla během tří různých geologických událostí (říční pirátství, soutok řek v důsledku snížení mořské hladiny a snížení mořské salinity v příbřežních oblastech). Tyto disperzní procesy mají různý vliv na druhovou skladbu biogeografických provincií (Bermingham et Martin, 1998), a mohou také vysvětlit genetické formování druhů (Waters et al., 1994). Popisování distribuce vnitrodruhové a mezidruhové genetické rozmanitosti poskytuje základní informace k biogeografii, systematice a ochranářskému úsilí (Avice, 2004; Crandall et al., 2000). Fylogeografie představuje současný koncepční a metodologický pokrok v rekonstrukci vývoje diverzity a zákonitostí speciace. Je také užitečná v systematických a evolučních studiích. Ve fylogeografických studiích se nejvíce využívá mitochondriální DNA. U většiny živočichů totiž předává při pohlavním rozmnožování samčí gameta do samičí pouze své haploidní jádro, a proto nedochází

k přenosu mimojaderných (mitochondriálních) genů. Mimojaderné geny se, narozdíl od genů jaderných, nepodílejí na následném meiotickém dělení a s tím souvisejícím crossing-overem. To v praxi znamená, že nejsou kombinovány s geny samčími, a tudíž mají všichni potomci mimojadernou genetickou výbavu totožnou s matkou. Tento jev se nazývá matroklinita. Díky matroklinitě jsou mitochondriální geny vhodným objektem molekulárních studií, jelikož se rychle vyvíjí a nepodléhají rekombinaci (Avisé, 2004). Proto analýza mtDNA umožňuje odvozovat historii populací a identifikovat míru diferenciací mezi populacemi. K tomuto účelu se nejčastěji používá analýza nukleotidových sekvencí mitochondriálního genu cytochromu b (např. Zardoya & Doadrio, 1998, 1999; Durand et al., 2002, 2003, 1999; Briolay et al., 1998; Doadrio & Carmona, 2004; Brito et al., 1997). Další mitochondriální gen, jenž je užitečný pro identifikaci rybích druhů je cytochromoxidáza 1 (CO x 1), který se začal využívat v pozdější době než gen pro cytochrom b (Hebert et al., 2003; Perea et al., 2010). Někdy se využívá také genů jaderných, např. první intron rekombinaci – aktivujícího genu (RAG – 1), nebo gen kódující ribozomální protein S7, popřípadě kombinace obou, a to zejména v novějších studiích (Perea et al., 2010). Aplikace těchto metod by měla ještě zpřesnit rozlišovací schopnosti molekulárních analýz používaných ve fylogeografii (Avisé, 2000). Nicméně jednotlivé lokusy nemusejí přesně reflektovat skutečné populační vztahy (Nichols, 2001; Crow et al., 2004; Weisrock et al., 2006). Fylogenetické stromy vytvořené na základě analýz mitochondriální a jaderné DNA mohou být rozdílné, a to kvůli horizontálnímu přenosu genů v důsledku hybridizace nebo introgrese (Machado et Hey, 2003; Rokas et al., 2003; Weisrock et al., 2006). Proto je výhodné použití vícenásobných lokusů (Weisrock et al., 2006). V současnosti se také stále častěji používá analýza mikrosatelitů (Razpet et al., 2007; Sušnik et al., 2007).

Sladkovodní ichtyofauna Středomoří je charakteristická výskytem řady endemických druhů. Naproti tomu v ostatních evropských říčních systémech je ichtyofauna výrazně ovlivněna dunajskými druhy s velkým areálem výskytu (Crivelli et Maitland, 1995; Kottelat et Freyhof, 2007). Evoluce a disperze sladkovodních ryb v mediteránu jsou intenzivně studované jevy, důležité pro pochopení biogeografického vývoje této oblasti. Až dosud byly fylogenetické a taxonomické studie sladkovodních ryb mediteránní oblasti prováděny především na Pyrenejském poloostrově (např. Zardoya et Doadrio, 1998; Machordom et al., 2000; Sanjur et al. 2003; Doadrio et Carmona, 2006; Doadrio et Elvira, 2007; Doadrio et al., 2007; Robalo et al., 2007), v Řecku (např. Apostolidis et

al., 1997; Doadrio et Carmona, 1998; Durand et al., 1999; Zardoya et al., 1999; Kottelat et Barbieri, 2004; Bohlen et al., 2006a; Kottelat et Economidis, 2006; Freyhof et Kottelat, 2007). Západobalkánské populace byly studovány především z taxonomického hlediska (např. Župančič et Bogutskaya, 2002; Bogutskaya et Župančič, 2003; Kovačić, 2005; Bianco et Kottelat, 2005; Economidis, 2005; Kovačić et Šanda, 2007; Miller et Šanda, 2008; Mustafić et al., 2008; Župančič et al., 2010, Marčić et al. 2011) a jen v menší míře byla pozornost věnována fylogenetickým vztahům (Tsigenopoulos et Berrebi, 2000; Tsigenopoulos et al., 2002; Ketmaier et al., 2004; Freyhof et al., 2005, 2006; Perdices et al., 2008, Marková et al. 2010). Dosud publikované fylogenetické a fylogeografické práce z oblasti západního Balkánu jsou však často ovlivněné nedostatečným pokrytím řady oblastí. Zásadní význam detailního přístupu z hlediska kvalitního pokrytí území vzorky studované taxonomické skupiny byl jasně ukázán v práci Markové et al. (2010). Díky kterému byla vyřešena otázka fylogenetických vztahů palem z oblasti Albánie, včetně detekce dosud vědecky nepopsané linie v jednom z říčních systémů.

Oblast západního Balkánu je tak evidentně stále jednou z nejméně prostudovaných evropských oblastí z hlediska objasnění evolučních vztahů a systematiky sladkovodních ryb. Mnoho taxonů z této oblasti bylo popsáno velmi recentně (viz výše). Na západním Balkáně přitom leží i nejstarší evropská jezera, Ochridské, Prespanské a Skadarské, které jsou považována za oblasti významné pro speciaci a podporu endemismu sladkovodních organismů (Albrecht et Wilke 2008). Hydrografická síť západního Balkánu je přitom velmi členitá. V blízkém okolí jezerních systémů jsou prameny několika říčních povodí, takže je možné, že řada druhů se vyskytuje nejen v jezerech, ale i v okolních povodích (viz Marková et al. 2010).

Tato diplomová práce je zaměřena na fylogenetické vztahy a distribuci jelců rodu *Squalius* v oblasti Albánie, a to na základě analýzy mitochondriálního genu cytochromu b. Takováto studie doposud na území Albánie nebyla provedena, a to přesto, že zástupci rodu *Squalius* zde žijí prakticky ve všech povodích a jsou zde jedním z nejhojnějších druhů sladkovodních ryb.

Cíle práce:

1) Na základě analýzy cytochromu b popsat fylogenetické vztahy mezi populacemi jelců rodu *Squalius* na území Albánie a v přilehlých oblastech.

2) Popsat distribuci těchto populací a pokusit se na základě získaných dat navrhnout možné kolonizační scénáře v oblasti západního Balkánu.

2. Problematika

2.1 Fyzickogeografická charakteristika Albánie

Albánie je přímořský stát v jihovýchodní Evropě. Leží na pobřeží Jaderského a Jónského moře. Na severu sousedí s Černou Horou, na severovýchodě s Kosovem, na východě s Makedonií a na jihu s Řeckem. Reliéf Albánie je velice členitý, na východě země se nachází albánsko-řecký horský masiv a ze severu pronikají do Albánie Dinárské hory, které se táhnou při západním pobřeží Balkánu až z území Chorvatska. Nejvyšším vrcholem Albánie je hora Korab, ležící na hranicích s Makedonií a tyčící se do výšky 2764 m n. m. Členitost albánského reliéfu a jeho historický vývoj měly také nemalý dopad na formování balkánské biodiverzity až do dnešní podoby. Právě území Albánie je významnou oblastí z hlediska četnosti výskytu endemických druhů. V průběhu pleistocénu, kdy docházelo ke značným klimatickým změnám vlivem střídání glaciálních a interglaciálních období, byly mediteránní poloostrovy (Balkán nevyjímaje) významnými refugii evropské fauny. To vedlo, společně s dalšími jevy, k nárůstu endemismu v celé mediteránní oblasti. V současné době je středomoří považováno za jedno z tzv. horkých míst světové biodiverzity, jelikož je zde vysoká koncentrace endemických druhů, zhruba 0,9 % endemických obratlovců a 4,3 % endemických rostlin (Myers et al., 2000).

Území Albánie vyniká nejen hypsometricky pestrým reliéfem, ale také značně hustou říční sítí. Většina řek pramení na východě v horách a odtéká západním směrem do jaderského úmoří. Jednou z výjimek je řeka Drin, která teče severním směrem k hranicím s Černou Horou a která je nejdelším albánským tokem (148 km).

Tato řeka vzniká soutokem Bílého a Černého Drinu a je významná i z hlediska biogeografie sladkovodních ryb, jelikož propojuje jezera Ochrid a Skadar, čímž vzniká tzv. Ochrid – Drin – Skadar systém. Dalšími významnými řekami 1. řádu (tekoucími do moře) jsou směrem od severu na jih – Buna, Mat, Ishëm, Erzen, Shkumbin, Seman a Vjosë a na jihu u hranic s Řeckem nevelká řeka Bystrica (viz obr.1).

Obr. 1. Hydrologická síť Albánie

(převzato z <http://upload.wikimedia.org/>

wikipedia/commons/b/b8/Albanian_Rivers.png)



Albánské řeky mají vesměs charakter podhorských řek středomořského typu. Mají tudíž největší průtok v zimních měsících a brzy na jaře, naopak v létě často vysychají.

Samostatnou kapitolou jsou pak albánská jezera, konkrétně Skadarské, Ochridské a Prespanské. Jezera Ochrid a Prespa jsou tektonického původu a jejich stáří je odhadováno na 5 mil. let. Vznikla tedy zřejmě v období pliocénu (Albrecht & Wilke, 2008), což koresponduje také s výsledky analýz DNA, provedených na zástupcích jezerního planktonu (Wagner & Wilke, 2011). Obě jezera lze tedy považovat za nejstarší na evropském kontinentu. Tektonický původ jezer má také za následek jejich mimořádně velkou hloubku, zejména pak u jezera Ochrid, kde je uváděna maximální hloubka 289 m a průměrná hloubka 155 m. Jezero Prespa je pak o poznání mělké, s maximální hloubkou 58 m (Matzinger et al., 2006; Albrecht & Wilke, 2008). Třetí z místních velkých jezer – Skadarské - vzniklo jako kryptodeprese zaplavená řekou Morača, která dodnes přivádí do jezera zhruba 62 % jeho vody. Zbylou část získává jezero z podzemních pramenů (Talevski et al., 2001). Skadarské jezero je se svou maximální rozlohou 530 km² největším jezerem na Balkáně.

Všechna tři albánská jezera vykazují vysoký podíl endemických druhů, což je dobře patrné na příkladu ryb. V jezeře Prespa bylo z 11 původních druhů ryb zjištěno 9 endemických (82 %), v jezeře Ochrid z 21 původních druhů 7 endemických (33,3 %) a v jezeře Skadar 7 druhů ze 34 (20,6 %) (Talevski et al., 2001). Z toho vyplývá, že tato jezera mají pro balkánskou biodiverzitu a druhovou jedinečnost značný význam.

2.2 Charakteristika rodu *Squalius*

Říše: živočichové (Animalia)

Kmen: strunatci (Chordata)

Podkmen: obratlovci (Vertebrata)

Třída: paprskoploutví (Actinopterygii)

Řád: máloostní (Cypriniformes)

Čeleď: kaprovití (Cyprinidae)

Rod: jelec (*Squalius*)

Výše uvedená taxonomická klasifikace rodu *Squalius* je stále částí taxonomů přijímána, byť některé novější práce zpochybňují zařazení tohoto rodu do čeledi Cyprinidae (Chen & Mayden, 2009). Podle zastánců tohoto názoru by totiž podčeď Leuciscinae měla být povýšena na čeleď Leuciscidae, kam lze zařadit i jelce rodu *Squalius*. Ve své práci se prozatím budu držet starší vžití systematiky.

Rod *Squalius* je euroasijským zástupcem kaprovitých ryb. V místech svého výskytu často patří mezi hlavní zástupce sladkovodních ryb, což je dáno jednak jeho vysokou diverzitou, značnou přizpůsobivostí a u některých druhů (např. *S. cephalus*) také širokou ekologickou valencí. Díky svému rozšíření je tento rod také dobrým modelem pro testování biogeografických hypotéz. Zástupci tohoto rodu se navíc vyskytují jak ve stojatých vodách, tak v řekách, a to ve všech rybích pásmech, od cejnového až po spodní část pásma pstruhového.

Jelci jsou středně velké ryby, nejmenším zástupcem je španělský *Squalius malacitanus* (max. 90 mm), největším druhem pak jediný zástupce naší ichthyiofauny jelec tloušť - *S. cephalus* (600 mm, vzácně i více) (Kottelat & Freyhof, 2007).

2.2.1. *Squalius* ve středomoří

Největší druhová diverzita tohoto rodu je v mediteránní oblasti. Tím, jak se zlepšuje aplikace molekulárně-genetických metod v biologických disciplínách, zoologii nevyjímaje, tím roste i počet popsáných druhů nejen sladkovodních ryb, ale i dalších skupin organismů.

Rod *Squalius* je toho typickým příkladem. Ještě v 90. letech minulého století uváděli někteří autoři z území Evropy 15 popsáných druhů (z toho 13 z mediteránu), (Doadrio & Carmona, 1998). Na konci prvního desetiletí nového milénia pak uváděli systematičtí zoologové z území Evropy už 24 validních druhů (Kottelat & Freyhof, 2007). V současné době lze podle nejnovějších poznatků na internetovém serveru fishbase.org nalézt již 29 druhů pro území Evropy (viz tabulka 1), přičemž některé druhy stále čekají na své popsání. Na druhou stranu je možné, že některým taxonům bude zpětně odebráno označení druh, jelikož některé popisy by mohly být po důkladnější revizi považovány za neplatné. Z Balkánu a přilehlých ostrovů je momentálně uváděno 17 druhů.

Tab. 1 Současný výčet evropských zástupců rodu *Squalius*

Zdroj: <http://www.fishbase.org/search.php>

rodové a druhové jméno	autor popisu	výskyt
<i>Squalius ahipsi</i>	(Aleksandrov, 1927)	Rusko
<i>Squalius albus</i>	(Bonaparte, 1838)	jezero Trasimeno, Itálie
<i>Squalius aradensis</i>	(Coelho, Bogutskaya, Rodrigues & Collares-Pereira, 1998)	Portugalsko
<i>Squalius caroliterti</i>	(Doadrio, 1988)	Španělsko
<i>Squalius castellanus</i>	Doadrio, Perea & Alonso, 2007	Španělsko
<i>Squalius vardarensis</i>	Karaman, 1928	Řecko a Makedonie
<i>Squalius cephalus</i>	(Linnaeus, 1758)	Euroasie
<i>Squalius cii</i>	(Richardson, 1857)	Řecko, o. Lesbos
<i>Squalius ghigii</i>	(Gianferrari, 1927)	Řecko, o. Rhodos
<i>Squalius illyricus</i>	Heckel & Kner, 1858	Chorvatsko
<i>Squalius janae</i>	Bogutskaya & Zupancic, 2010	Slovinsko, Chorvatsko
<i>Squalius keadicus</i>	(Stephanidis, 1971)	Řecko
<i>Squalius laietanus</i>	Doadrio, Kottelat & de Sostoa, 2007	Španělsko
<i>Squalius lucumonis</i>	(Bianco, 1983)	Itálie
<i>Squalius malacitanus</i>	Doadrio & Carmona, 2006	Španělsko
<i>Squalius microlepis</i>	Heckel, 1843	Chorvatsko, B & H.
<i>Squalius moreoticus</i>	(Stephanidis, 1971)	Řecko
<i>Squalius orpheus</i>	Kottelat & Economidis, 2006	Bulharsko, Turecko, Řecko
<i>Squalius pamvoticus</i>	(Stephanidis, 1939)	Řecko, Albánie
<i>Squalius peloponensis</i>	(Valenciennes, 1844)	Řecko
<i>Squalius platyceps</i>	Zupancic, Maric, Naseka & Bogutskaya, 2010	Albánie, Černá Hora
<i>Squalius prespensis</i>	(Fowler, 1977)	Albánie, Makedonie
<i>Squalius pyrenaicus</i>	(Günther, 1868)	Španělsko
<i>Squalius squalus</i>	(Bonaparte, 1837)	perijadranská oblast
<i>Squalius svallize</i>	Heckel & Kner, 1858	Chorvatsko
<i>Squalius tenellus</i>	Heckel, 1843	Chorvatsko
<i>Squalius torgalensis</i>	(Coelho, Bogutskaya, Rodrigues & Collares-Pereira, 1998)	Portugalsko
<i>Squalius valentinus</i>	Doadrio & Carmona, 2006	Španělsko
<i>Squalius zmanjæ</i>	Karaman, 1928	Chorvatsko

2.2.2. *Squalius* na Balkáně

V současné době je tedy na Balkáně evidováno 17 platných druhů (viz výše), přičemž největší druhová diverzita je v oblasti západního Balkánu a Řecka. Současné poznatky naznačují, že v oblasti Balkánu se vyskytují dvě hlavní nepříbuzné fylogenetické linie (Perea et al. 2010).

A) Linie 1 - je tvořena druhy ze západní a jižní části Balkánu. Patří sem *Squalius squalus complex*, *S. prespensis*, *S. peloponensis*, *S. moreoticus* a *S. albus*, endemický pro jezero Trasimeno v centrální části Apeninského poloostrova a také *S. janae* z istrijského poloostrova a *S. platyceps* z jezera Skadar a jeho přítoků.

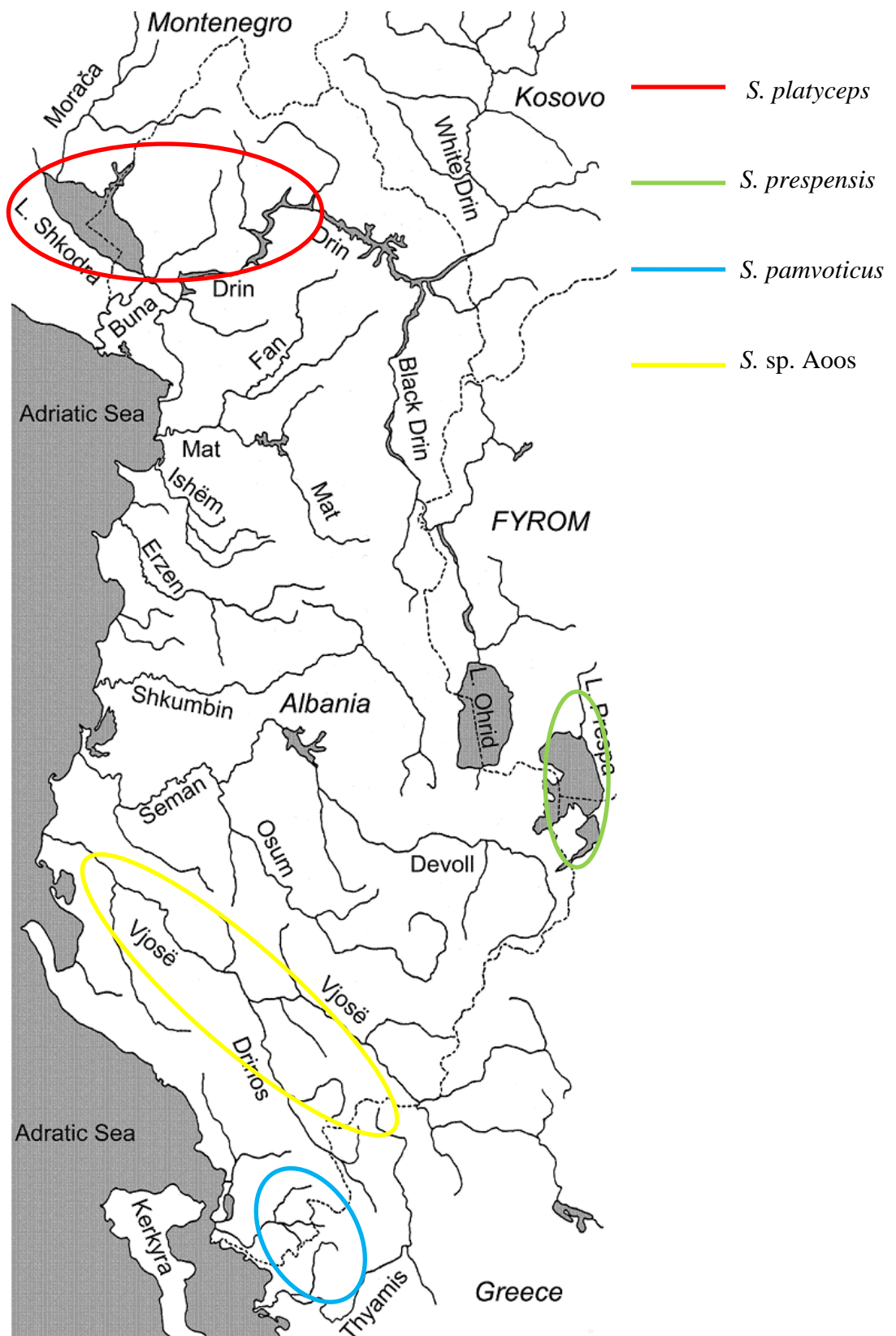
B) Linie 2 - zahrnuje druhy žijící na území dnešní Bosny a Hercegoviny a Chorvatska. Jsou to *S. zрманjae*, *S. microlepis*, *S. tenellus*, *S. svallize*, *S. illyricus*. Tyto druhy jsou blízce příbuzné s italským *S. lucumonis* z oblasti Tyrhénského moře.

Evoluční vztahy zejména u prvně jmenované linie jsou doposud značně nejasné. Je to dáno jednak komplikovanými fylogenetickými vztahy těchto druhů a také nedostatečným pokrytím některých zkoumaných oblastí. To, že je tato skupina doposud značně neprobádaná, naznačují i některé zajímavé, a poměrně recentní objevy a to zejména nedávný popis dvou nových druhů – *S. janae* (Bogutskaya & Župančič, 2010) a *S. platyceps* (Župančič et al., 2010).

Nejméně prozkoumanou oblastí z hlediska fylogenetických vztahů a taxonomie tohoto rodu je pak území Albánie. Až doposud panoval názor, že se v Albánii vyskytují tři popsané druhy a jeden druh doposud vědecky nepopsaný. Jsou to *S. prespensis* (endemit z jezera Prespa), *S. pamvoticus*, jenž okrajově zasahuje na jih Albánie z Řecka (Kottelat & Freyhof, 2007) a výše zmíněný *S. platyceps*. Dále se ještě v literatuře uvádí nepopsaný druh z povodí řeky Aoos (v Albánii pod názvem Vjosë) a to *S. sp. Aoos* (Kottelat & Freyhof, 2007). Avšak tyto druhy z dostupných údajů obývají spíše okrajové oblasti Albánie (obr. 2), přičemž rod *Squalius* je běžný v každém povodí.

Tato práce by měla vnést více světla do nejasných vztahů prvně jmenované fylogenetické linie, byť jednoznačné rozřešení celé problematiky je momentálně zřejmě nad rámec jedné diplomové práce.

Obr. 2. Mapa Albánie s výskytem popsáných druhů rodu *Squalius*



3. Materiál a metodika

3.1 Materiál

Materiál na mou diplomovou práci, jenž se nachází v depozitáři Národního muzea v Praze, byl sesbírán Dr. Radkem Šandou během několika cest na území Albánie v letech 2004 a 2009. Vzorky (celé ryby) byly sesbírány ze všech hlavních povodí Albánie a uloženy v 96 % etanolu.

3.2 Izolace DNA

Ryby byly odloveny elektrickým agregátem (menší procento chyceno do sítí, popř. odkoupeno od rybářů). Z části odlovených ryb byly odebrány vzorky ještě v terénu. Zbylé ryby byly uloženy do etanolu a zpracovány v laboratoři. Nůžkami sterilizovanými plamenem po každém odběru, byla vždy odstřižena část pravé břišní ploutve, která byla uložena do 96 % etanolu.

Před izolací byl z každého vzorku ploutve odstřižen kousek tkáně, jenž byl omyt destilovanou vodou a na petriho misce poté skalpelem rozmělněn na drobné částičky. Následující postup sledoval protokol komerční izolační sady GenAid. Vzorky byly umístěny přes noc v topném bloku ProBiot, při teplotě 58°C. Elektroforézou jsem ověřil, zda došlo ke správné izolaci DNA. K tomu byl použit 1% agarozový gel. Gel byl připraven z 50ml TBE, 0,5 mg agarózy (Agarose Serva) a 1 µl ethidiumbromidu (EtBr, 10 mg/ml) a v elektroforéze ponechán 30 minut při 95 V. Poté byl gel prosvícen UV světlem. Vzorky, kde se zdařila izolace DNA byly označeny a následně uloženy v mrazáku do – 25°C.

3.3 PCR a sekvenace DNA

Amplifikace DNA byla za použití termocycleru provedena metodou PCR (Sambrook et al. 1989). Byly použity následující primery amplifikující část genu pro cytochrom *b* mitochondriální DNA (Perdices & Doadrio, 2001).

5' AACCACCGTTGTATTCAACTACAA3' – GluF – vnější primer

5'ACCTCCGATCTTCGGATTACAAGACCG3' - ThrR – vnější p.

CCTGAAAYATYGGYGTRGT – CB4-Glu – vnitřní p.

TTCGCATTYCAYTTCCTCCT – Phox-Thr – vnitřní p.

Reakční směs je uvedena v Tab. 2. Ke zjištění případné kontaminace byla prováděná negativní kontrola (tzn. směs bez přidání DNA).

Tab. 2: Složení směsi na PCR

Chemikálie	Množství (μl)
dd H ₂ O	Dle množství DNA
Taq pufr (+ (NH ₄) ₂ SO ₄) (10x)	5 μl
dNTP (10 mM)	1 μl (0,2 mM)
MgCl ₂ (25mM)	3 μl (1,5 mM)
Primery (100 mM)	Každý 1 μl (2 mM)
Taq DNA Polymerase 5u/μl	0,4 μl
DNA	Podle koncentrace
celkem	50 μl

Tab. 3: Program pro PCR (*Perdices & Doadrio, 2001*)

Krok	Teplota	Čas
Predenaturace	94°C	350s
5 cyklů	94°C	45s
	53°C	45s
	72°C	90s
29 cyklů	94°C	45s
	58°C	45s
	72°C	90s
	72°C	560s
chlazení	4°C	

Poté, co proběhla reakce, byly 2 μl PCR produktu opět naneseny na 1 % agarózový gel společně s délkovým standardem označujícím délku získaného fragmentu (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas). Vzorky, u kterých došlo u úspěšné amplifikaci cyt *b* byly následně přečištěny lihem. Produkt byl poté zaslán do korejské firmy Makro.Gen, kde byl osekvenován a sekvence byly zaslány zpět.

3.4 Alignment

Chromatogramy, které nám byly zaslány zpět, byly prohlíženy v programu Chromas Lite 2.01. Část mtDNA byla sekvenována jak pomocí vnějších, tak pomocí vnitřních

primerů, proto bylo zapotřebí sekvenci s jedním primerem spojit s reverzní komplementární sekvencí stejného jedince, který byl získán sekvenací s druhým primerem. To bylo prováděno v softwaru BioEdit 7.0.9.0. (Hall 1999). Ve stejném programu byl také po seřazení sekvencí pod sebe proveden aligment. Délka použitelných sekvencí se mírně lišila (cca 20- 50 bp), proto byly všechny sekvence zarovnány na nejmenší možnou použitelnou délku. Tím, že byl odstraněn první nukleotid, byla srovnána první pozice sekvencí s první pozicí čtecího rámce. Následně jsem ověřil v programu Mega5.0.5. nepřítomnost stop kodonu, což potvrdilo, že jde o protein kodující sekvenci.

3.5 Tvorba datasetu

Jako základ všech molekulárních analýz byly do datasetu použity vzorky nasbírané Radkem Šandou v Albánii v letech 2004 a 2007. Celkem bylo analýze cytochromu b podrobena 117 vzorků z vlastního sběru. K těm bylo přidáno dalších 117 vzorků z celé středomořské oblasti, které byly staženy z internetové databáze Genbank, genbankové kody a místa sběru jak vlastních, tak stažených vzorků jsou v tabulce 4. Všechny vzorky byly v programu BioEdit zarovnané pod sebe a byly odstraněny okrajové sekvence, tak aby celý dataset začínal stejnými nukleotidy. Tím pádem, se délka sekvencí cytochromu zkrátila na 1100 párů bazí.

V internetové databázi Genbank jsem poté dohledal několik dalších sekvencí, které byly z lokalit, jež spadaly do oblasti hlavního zájmu, avšak tyto sekvence byly výrazně kratší.

Jednalo se zejména o vzorky z Italských lokalit, které dle našich předpokladů měli patřit do některé z albánských linií. Jednalo se o 10 jedinců v 6 haplotypech. Vzorky byly přidány do datasetu a celý dataset byl poté zkrácen na 810 bazí, což byla délka nově přidávaných vzorků. Tím pádem jsem měl k dispozici 2 datasety. K těmto byl ještě posléze přidán další, opět ze vzorků z lokalit, které byly pro mou práci zajímavé a to z okolí jezera Prespa a dalších oblastí Itálie. Opět byly všechny vzorky přizpůsobené přidáním jedincům a celý dataset byl tak zkrácen na 570 bp. Takto upravené datasety byly poté použity pro tvorbu haplotypových sítí, původní nejdelší, pak pro konstrukci fylogenetického stromu. Poté bylo v programu DnaSP provedeno sjednocení vzorků do haplotypových skupin, čímž vznikl pro 1100 bp dataset 144 haplotypů.

Tabulka č. 4. Seznam lokalit sběru, včetně lokalit z Genbank (osmimístný kod)
(u albánských vzorků není uveden za lokalitou stát)

kodGenB	lokalita	počet bp
HM560205	Arno, Arezzo, Itálie	1100
HM560204	Vipava river, Isonzo basin, Slovenia	1100
HM560197	Prespa lake, Greece	1100
HM560213	Zrmanja river, Croatia	1100
HM560211	Cabriel river, Jucar basin, Spain	1100
HM560207	Zalomka river, B.and H.	1100
HM560203	Goksu Cayi, Euphrates basin, Turkey	1100
HM560201	Celemin river, Barbate basin, Spain	1100
HM560191	Guadares river, Guadiaro basin, Spain	1100
HM560189	Arno basin, Arezzo, Italy	1100
HM560187	Matarrana, Spain	1100
HM560185	Evrotas river, Sparta, Greece	1100
HM560183	Cetina river, Croatia	1100
HM560181	Limia river, Spain	1100
HM560179	Algibre river, Arade basin, Portugal	1100
HM560177	Aphips river, Russia	1100
HM560212	Magro river, Jucar basin	1100
HM560206	Rama lake, Neretva, B. and H.	1100
HM560204	Vipava river, Isonzo basin, Slovenia	1100
HM560202	Rama lake, Neretva, B. and H.	1100
HM560200	Celemin river, Barbate basin, Spain	1100
HM560198	Guadalete river, Spain	1100
HM560196	Uluchaj river, Dagestan, Russia	1100
HM560194	Trebizat river, Neretva, B. and H.	1100
HM560192	Guadiaro river, Spain	1100
HM560190	Arno basin, Arezzo, Italy	1100
HM560188	Matarrana, Spain	1100
HM560186	Miras river, Peloponnesus, Greece	1100
HM560184	Cetina river, Croatia	1100
HM560182S	Limia river, Spain	1100
HM560180	Algibre river, Arade basin, Portugal	1100
HM560178	Aphips river, Russia	1100
AY509827	?	1100
JQ652369	Pinios River, Greece	1100
JQ652368	Bacchiglione River, Italy	1100

JQ663536	Krka, Croatia	1100
JQ663535	Krka, Croatia	1100
HM560193	Krenica lake, Neretva, B. and H.	1100
AF090753	Lake Prespa	1100
AF090760	Evrotas, Greece	1100
AF090757	River Alphios, Greece	1100
AF090755	River Manikiotiko, Greece	1100
AF090752	River Nestos, Greece	1100
AF090758	Lake Stymphalia, Greece	1100
AY549463	Lake Busko, B. and H.	1100
AF090756	River Thiamis, Greece	1100
AF090754	River Sperchios, Greece	1100
AF421828	Ombrone, Italy	1100
AY549462	Imotzki, Croatia	1100
AJ252820	Evrotas, Greece	1100
AJ252788	Evinos, GRE	1100
AJ251092	Krka, Croatia	1100
JQ436544	Jarama River, Spain	1100
JQ436542	Jarama River, Spain	1100
JQ436540	Jarama River, Spain	1100
JQ436545	Jarama River, Spain	1100
JQ436543	Jarama River, Spain	1100
JQ652365	Buech River, France	1100
HM560210	Mira river, Odemina, Portugal	1100
AF095609	Rubas River	1100
AF090754	River Sperchios	1100
AF421827	Tajo, Spain	1100
AF421825	Arade: Arade, Portugal	1100
AF421823	Guadiana, Spain	1100
AF421821	Bogarra: Segura, Spain	1100
AF421819	Algar: Algar, Spain	1100
AF421817	Guadalmena: Guadalquivir, Spain	1100
AF421815	Serpis: Serpis, Spain	1100
AF421813	Estena: Guadiana, Spain	1100
AF421811	Pesquero: Tajo, Spain	1100
AF421809	Albufera de Valencia, Spain	1100
AF421807	Una: Jucar, Spain	1100
AF421805	Azuer: Guadiana, Spain	1100
AF421803	Cinca: Ebro, Spain	1100
AF421801	Matarrana: Ebro, Spain	1100

AF421799	Adaja: Duero, Spain	1100
AF421797	Boedo: Duero, Spain	1100
AF421795	Salas: Limia, Spain	1100
AF421793	Vivey: Mino, Spain	1100
AF421791	Almonte: Tajo, Spain	1100
AF045993	Tagus basin, Spain	1100
AF421828	Ombrone: Ombrone, Italy	1100
AF421826	Arrago: Tajo Spain	1100
AF421824	Arade: Arade, Portugal	1100
AF421822	Lagunas de Ruidera: Guadiana, Sp.	1100
AF421820	Bogarra: Segura, Spain	1100
AF421818	Algar: Algar, Spain	1100
AF421816	Guadalmena: Guadalquivir, Spain	1100
AF421814	Estena: Guadiana, Spain	1100
AF421812	Pesquero: Tajo, Spain	1100
AF421810	Serpis: Serpis, Spain	1100
AF421808	Albufera de Valencia, Spain	1100
AF421806	Una: Jucar, Spain	1100
AF421804	Azuer: Guadiana, Spain	1100
AF421802	Matarrana: Ebro, Spain	1100
AF421800	Adaja: Duero, Spain	1100
AF421798	Boedo: Duero, Spain	1100
AF421796	Salas: Limia, Spain	1100
AF421794	Vivey: Mino, Spain	1100
AF421792	Po: Po, Italy	1100
AF421790S	Montemayor: Guadalquivir, Spain	1100
AF045991	Guadiana basin, Sp.	1100
AY549462	Imotzki, Croatia	1100
AY549460	Lake Trasimeno, Italy	1100
AJ252819	Tibera, It.	1100
AJ252803	Po, Italy	1100
AJ252805	Euphrat, Turkey	1100
AJ252791	Ebro, Spain	1100
AJ252787	Kirinths, GRE	1100
AJ252818	Tibera, It.	1100
AJ252810	Tigris, Turkey	1100
AJ252808	Euphrat, Turkey	1100
AJ252806	Tigris, Turkey	1100
AJ252788	Evinos, GRE	1100
AJ252790	Kizilirmak, Turkey	1100

AJ251092	Krka, Croatia	1100
BiH6	Trebizat river, Neretva, B. and H.	1100
BiH17	Trebizat river, Neretva, B. and H.	1100
BiH18	Trebizat river, Neretva, B. and H.	1100
SmicrolepBiH2	Krenica lake, Neretva, B. and H.	1100
SmicrolepBiH3	Krenica lake, Neretva, B. and H.	1100
BiH62	Rama lake, Neretva, B. and H.	1100
BiH61	Rama lake, Neretva, B. and H.	1100
Bos401	Šuica r., Duvanjsko polje, B. and H.	1100
Bos956	Buško blato, reservoir, B. and H.	1100
Bos957	Buško blato, reservoir, B. and H.	1100
B95	Trebisnjica r., Popovo Polje, B. and H.	1100
A1865	Zalomka river, B.and H.	1100
A1861	Zalomka river, B.and H.	1100
A1867	Zalomka river, B.and H.	1100
Zet110	Zeta	1100
Zet111	Zeta	1100
Zet112	Zeta	1100
Zet113	Zeta	1100
>A405Vjose	Vjose	1100
>A562	Devolli	1100
>BiH7	Trebizat river, Neretva, B. and H.	1100
>Bos771	Mat, Milot	1100
>Bos946Pavlo	Pavlo	1100
>Bos980	Bregava r., Nerevtza, B. and H.	1100
>A300Squalus	Erzen, Pellumbas	1100
>Zet114	Zeta	1100
>Z47Devol	Devolli	1100
>Z44Devol	Devolli	1100
>Z46Devol	Devolli	1100
>A407Vjose	Vjose	1100
>D9SkadarL	Skadar lake	1100
>Bos772Mat	Mat	1100
>D3756	Ohrid lake	1100
>D630	Osumi, upstr. Uznove	1100
>A63	Shkumbini	1100
D3758ohrid	Ohrid	1100
>A363	Erzen	1100
>A408	Vjose	1100
>A510	Drinos - Vjose	1100

>A511	Drinos - Vjose	1100
>A512	Drinos - Vjose	1100
>A513	Drinos - Vjose	1100
>A514	Drinos - Vjose	1100
>Bos795	Fani i Vogel	1100
>Bos944	Pavlo	1100
>D117	Kiri	1100
>D116	Kiri	1100
>D529	Erzen	1100
>D590	Terkuza	1100
>D19	Skadar lake	1100
>D238	Shkumbini	1100
>D239	Shkumbini	1100
>D481	Shushica	1100
>D304Devol	Devolli	1100
>D628	Osumi	1100
>D10SkadarL	Skadar lake	1100
>D526	Erzen	1100
>D483	Shushica	1100
>D629	Osumi	1100
>D3789	Ohrid lake	1100
>D3757	Ohrid lake	1100
>D332	Osumi	1100
>D3792	Ohrid lake	1100
>Zet109	Zeta	1100
>Zet108	Zeta	1100
>A64	Shkumbini	1100
>A114_1Sc	Shkumbini	1100
>A114_2Sc	Shkumbini	1100
>A115Sc	Shkumbini	1100
A301	Erzen	1100
>A302	Erzen	1100
>A362	Erzen	1100
>A364	Erzen	1100
>A406	Vjose	1100
>A563	Devolli	1100
>A564	Devolli	1100
>A565	Devolli	1100
>Bos773	Mat	1100
>Bos774	Mat	1100

>Bos797	Fani i Vogel	1100
>Bos945	Pavlo	1100
>Bos947	Pavlo	1100
D18	Skadar Lake	1100
>D72	Gomsiqe	1100
>D73	Gomsiqe	1100
>D74	Gomsiqe	1100
>D75	Gomsiqe	1100
>D76	Gomsiqe	1100
>D118	Kiri	1100
>D183	Fani	1100
>D184	Fani	1100
>D185	Fani	1100
>D202	Shkumbini	1100
>D203	Shkumbini	1100
>D204	Shkumbini	1100
>D205	Shkumbini	1100
>D206	Shkumbini	1100
>D258	Prespa	1100
>D261	Prespa	1100
>D331	Osumi	1100
>D423	Bistrica	1100
>D424	Bistrica	1100
>D482	Shushica	1100
>D571	Zeze	1100
>D572	Zeze	1100
>D573	Zeze	1100
>D574	Zeze	1100
>D575	Zeze	1100
>D583	Terkuza	1100
>D584	Terkuza	1100
>D588	Terkuza	1100
>D589	Terkuza	1100
>D3759	Ohrid lake	1100
>D3790	Ohrid lake	1100
>D3791	Ohrid lake	1100
>Z45	Devolli	1100
AJ252798	Drinos, Albania	1100
AJ252785	Alento, Italy	1100
AJ251093	Zrmanje, Croatia	1140

EU791884	Merse River, Italy	810
Eu791883	Merse River, Italy	810
EU791881	Ticino River, Italy	810
EU791879	Ticino River, Italy	810
EU791882	Merse River, Italy	810
EU791880	Ticino River, Italy	810
AJ002326	Prespa	570
AJ002328	Prespa	570
AJ002324	Prespa-Skadar	570
AJ002325	Prespa	570
AJ002327	Prespa	570
AJ389551	Aoos	570
AJ002349	Pinios, GRE	570
AJ002352	Acheloos, GRE	570
AJ002331	Evinos, GRE	570
AJ002348	Pinios, GRE	570
AJ002330	Evinos, GRE	570
AJ002332	Alfios, GRE	570
AJ002329	Thyamis, GRE	570
AJ002345	Thyamis, Acheron, Louros, Arachthos, GRE	570

3.6 Fylogenetické analýzy

V programu jModelTest 0.1.1 (Posada 2008) byly pomocí Akaikeho informačního kritéria (AIC) a Bayesovského informačního kritéria (BIC) vypočítány modely pro všechny datové soubory (viz tabulka č. 5). Příslušná data byla poté vyhodnocena následujícími fylogenetickými metodami: Neighbor-joining (NJ), Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) a Bayesovská Analýza (BA). U metod BA a ML byl zvolen vybraný evoluční model. K prohlížení získaných stromů byl použit program TreeView 1.6.6 (Page, 1996) a Fig Tree., kde byly také upravovány.

Tab. 5 Přehled získaných evolučních modelů

1100bp BA	
AIC	BIC
Model = GTR+I+G	Model = TIM3+I+G
partition = 012345	partition = 012032
-lnL = 8976.7212	-lnL = 8981.6968
K = 302	K = 300
freqA = 0.2768	freqA = 0.2710
freqC = 0.2938	freqC = 0.2929
freqG = 0.1455	freqG = 0.1525
freqT = 0.2839	freqT = 0.2836
R(a) [AC] = 1.1659	R(a) [AC] = 2.0623
R(b) [AG] = 42.5702	R(b) [AG] = 56.0538
R(c) [AT] = 0.6219	R(c) [AT] = 1.0000
R(d) [CG] = 2.3079	R(d) [CG] = 2.0623
R(e) [CT] = 9.4740	R(e) [CT] = 12.7753
R(f) [GT] = 1.0000	R(f) [GT] = 1.0000
p-inv = 0.4600	p-inv = 0.4540
gamma shape = 1.0670	gamma shape = 1.0250
Likelihood = (GTR+I+G)	Likelihood = (TIM3+I+G)

3.6.1. Neighbor - joining (NJ)

Tato distanční metoda vyhledává strom na základě podobnosti mezi sekvencemi. Jako substituční model byl použit Kimura 2-parametrový model, který předpokládá shodné frekvence všech bazí ale rozdílné frekvence tranzicí a transverzí (Kimura 1980). K počítání byl použit software PaupUp 1.0 (Calendini & Martin 2005), jenž navazuje na program PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002). Pro odhad věrohodnosti získaného stromu byl proveden bootstrap s 1000 pseudoreplikacemi (Felsenstein 1985).

3.6.2. Maximum Parsimony (MP)

Metoda maximální parsimonie (úspornosti) vybírá ze všech možných stromů ty, které mají nejkratší délku, což znamená, že jsou tvořeny nejmenším počtem evolučních kroků. K počítání byl použit program PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002). Pomocí této metody byly vyhledány nejparsimoniálnější stromy za použití heuristického vyhledávání s počtem 1000 opakování náhodného přidání sekvencí a také prohledáváním okolních stromů pomocí náhodného přehazování větví (Tree bisection-reconnection - TBR). Celý příkaz: hsearch addseq=random nrep=1000 swap=TBR.

Podpora jednotlivých větví byla stejně jako v předchozím případě ověřena bootstrapem s 1000 opakování.

3.6.3. Maximum likelihood (ML)

Pomocí programu ModelTest, za použití heuristického vyhledávání, byl zvolen nejvodnější strom. Jelikož byla metoda značně časově náročná, byl zvolen postup za použití online verze programu PhyML 3.0 (Guindon & Gascuel 2003). Topologie získaných stromů byla opět ověřena bootstrapem s 1000 pseudoreplikacemi.

3.6.4. Bayesovská analýza (BA)

Pro metodu, která se zakládá na výpočtu posteriorních pravděpodobností hypotéz, které jsou přímo závislé na použitém modelu a vstupních datech, byl použit software MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001), který pracuje metodou Markov Chain Monte Carlo (MCMC, Larget & Simon 1999). Stejně jako v metodě ML byl model zvolený programem jModelTest. Počet generací byl nastaven na 5000000, z každé sté generace byl uložen strompřičemž z každé sté generace byl ukládán strom (příkaz: mcmc ngen=5000000 nchains=4 printfreq=100 savebrlens=yes). Tímto způsobem bylo odstraněno 10000 stromů (z 50000 uložených). Příkaz: sumt burnin=10000. U každé větve jsou zobrazeny hodnoty posteriorních pravděpodobností (pokud byly nad 75%).

3.7 Tvorba haplotypových sítí

Pro konstrukci haplotypových sítí musely být datasety řádně upraveny a to tím způsobem, že byli přidáni do datasetu všichni jedinci se stejnými haplotypy (kteří se naopak při tvorbě datasetu pro fylogenetické stromy museli odstranit). Navíc byli z datasetu odstaněni všichni jedinci, kteří, podle fylogenetických stromů nebyli součástí ani jedné z albánských linií. Datasety byly vytvořeny pro tři různě dlouhé sekvence DNA, pro 570 bp, 810 bp a 1100 bp.

Takto upravený dataset byl v programu Network 4.6.1.0. podroben analýze jehož výsledkem byly haplotypové sítě. Program vyhodnotí jednotlivé sekvence na základě jejich indelové a substituční rozmanitosti a posléze je sloučí do jednotlivých haplotypů.

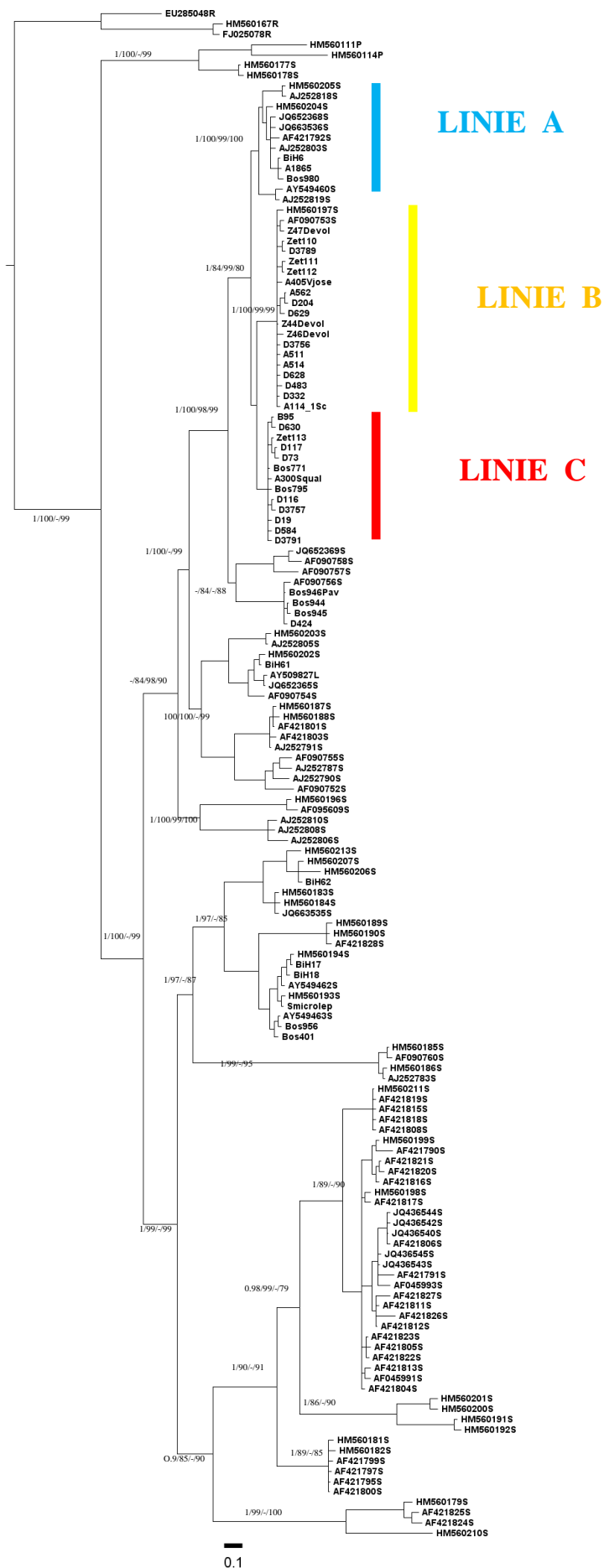
Jednotlivé haplotypy v síti pak svou velikostí odpovídají počtu jedinců. Haplotypy byly následně vybarveny podle říčního povodí, ve kterém byly nalezeny. Barva koresponduje s barvami v říčních povodích v mapách.

4. Výsledky

4.1. Fylogenetické stromy

Fylogenetické stromy zpracované na základě Bayesovské analýzy, Maximum Likelihood, Maximum parsimony a Neighbor-joining byly vytvořeny pro 1100 páru bazí dlouhý dataset. Projevily se většinou dobré podpory větví (viz obr. 3). Z fylogenetického stromu je patrné, že v oblasti Albánie a přilehlého okolí se vyskytují 3 hlavní linie. Linie A je tvořena druhovým komplexem *Squalius squalus* a zasahuje severně od Albánie okolo celého perijadranského prostoru až do Itálie. Součástí této linie je také vzorek z genbanku AY549460, což by měl být *S. albus* z jezera Trasimeno v Itálii, který je tedy úzce příbuzný s *S. squalus*. Další linií je linie B, která je zastoupena jedinci s centrem výskytu kolem starých tektonických jezer Ochrid a Prespa. Avšak v této linii jsou obsaženi také jedinci z řek Osum (povodí Semanu), Vjosë a dalších toků zejména z jižní části Albánie. Linie se vyskytuje také v povodí Ochrid-Drin-Skadar systému, kde je sympatrická s linií C. Tato třetí linie má těžiště výskytu v severní Albánii, a to v již zmíněném hydrologickém systému Ochrid-Drin-Skadar, dále v řekách Mat, Ishëm a Erzen. Situaci nejlépe dokumentuje obrázek č. 4.

Obr.3. Bayesovský konsenzuální strom sestrojen na základě sek. cyt.b. Č.větví představují hodnoty bayesovské posteriorní probability a Bootstrap podpory stat. Metod v pořadí BI/ML/MP/NJ. Zobrazeny jsou hodnoty nad 75%



Mezi jednotlivými albánskými větvemi a uvnitř větví byly také v programu MEGA 5. Vypočítány průměrné p-hodnoty udávající míru genetické divergence (viz tab. 6)

Tab. 6. Hodnoty vnitřeliniové a meziliniiové divergence

Linie		
A		0,0082
Linie		
B		0,003
Linie		
C		0,0022
Linie		
A	Linie B	0,021
Linie	Linie	
A	C	0,016
Linie	Linie	
B	C	0,016

Jak je z této tabulky patrné, tak jsou p - hodnoty poměrně nízké. Za předpokladu, že by platila u kostnatých ryb uváděná mutační rychlost 0,5 – 0,9 % za milion let (Avice, 2000), pak lze odhadovat, že vnitřeliniové rozdělení je pleistocénního stáří a došlo k němu tedy poměrně recentně. Meziliniiové p-distance poukazují na to, že k oddělení těchto linií mohlo dojít buď na konci pliocénu, nebo začátkem pleistocénu. Mutační rychlost je však třeba brát se značnou rezervou, jelikož se může lišit nejen mezi druhy, ale i mezi populacemi.

Dále byly porovnány p-hodnoty mezi těmito třemi populacemi, následně mezi jedinci druhů *S. peloponensis*, *S. moreoticus*, *S. pamvoticus*, *S. vardarensis* a pyrenejským *S. laietanus*.

Tyto druhy tvoří velkou fylogenetickou linií (Perea et al., 2010). Tyto p-hodnoty jsou seřazeny v tabulce 7. Z uvedených hodnot vyplývá, že došlo k oddělení těchto druhů podstatně dříve a to pravděpodobně během pliocénu, nejspíš více než před 10 mil. lety. Zároveň nelze s jistotou tvrdit, zda jsou albánské linie samostatnými druhy, či nikoliv. Zřejmé však je, že v porovnání s druhy validními jsou genetické rozdíly mezi nimi

podstatně menší. Genetické divergence se mezi těmito platnými druhy pohybovaly v rozmezí 4,6 % - 7,0 %, zatímco u albánských linií jen v rozmezí 1,7 % - 2,1 %.

Tab.7. Průměrné p-hodnoty naměřené mezi albánskými liniemi a zástupci vybraných druhů

Species 1	Species 2	Dist
LINIE A	LAIETANUS	0,062
LINIE A	MOREOTICUS	0,043
LAIETANUS	MOREOTICUS	0,070
LINIE A	VARDARENSIS	0,054
LAIETANUS	VARDARENSIS	0,050
MOREOTICUS	VARDARENSIS	0,059
LINIE A	LINIE B	0,021
LAIETANUS	LINIE B	0,059
MOREOTICUS	LINIE B	0,046
VARDARENSIS	LINIE B	0,054
LINIE A	PAMVOTICUS	0,042
LAIETANUS	PAMVOTICUS	0,059
MOREOTICUS	PAMVOTICUS	0,046
VARDARENSIS	PAMVOTICUS	0,056
LINIE B	PAMVOTICUS	0,041
LINIE A	LINIE C	0,017
LAIETANUS	LINIE C	0,061
MOREOTICUS	LINIE C	0,041
VARDARENSIS	LINIE C	0,050
LINIE B	LINIE C	0,016
PAMVOTICUS	LINIE C	0,040

4.2 Haplotypové síť

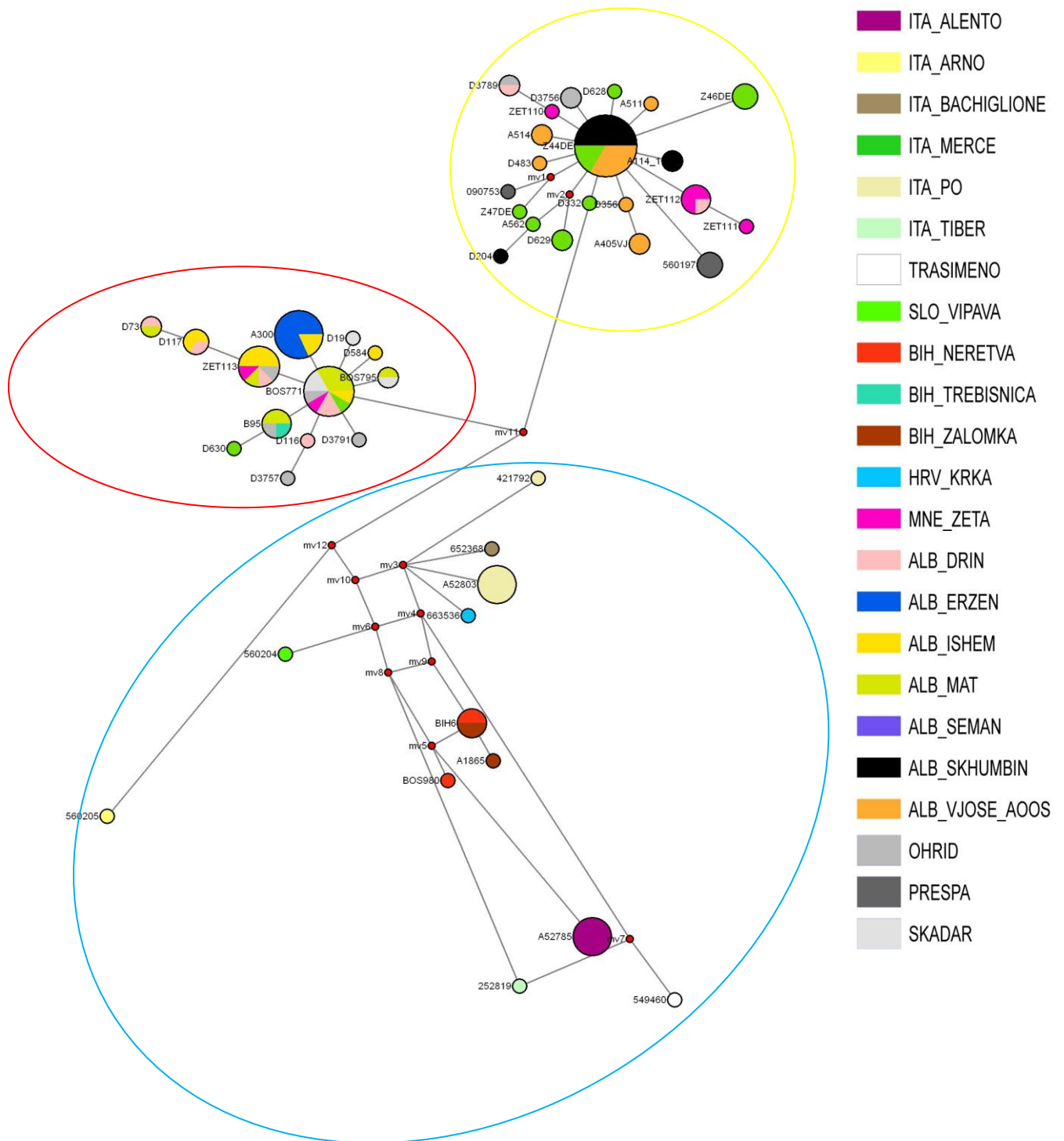
Nejvíce zastoupeným haplotypem (v nejvíce povodích) byl u 1100bp dlouhého cytochromu haplotyp BOS 771, který byl přítomen v 6 řekách. Tento haplotyp náleží do linie C. Z linie B byl nejvíce zastoupeným haplotypem haplotyp Z44 DE.

Na tyto haplotypy se také váže nejvíce dalších haplotypů a zřejmě se tedy jedná o centra diverzifikace.

U haplotypů linie A je situace poměrně nepřehledná. Tato perijadranská linie má poměrně komplikované vztahy. Podoba haplotypové sítě také zřejmě souvisí s velkým areálem výskytu jedinců, kteří byli zahrnuti do analýzy. Jediný haplotyp BiH 6 je zde zastoupen ve dvou povodích. Ostatní haplotypy jsou svým výskytem vázány na

jednotlivé toky, což je ovšem do jisté míry zapříčiněno právě velkým geografickým rozptylem zkoumaných vzorků.

Nejlépe vztahy mezi haplotypy a říčními sítěmi charakterizuje obr. č. 4.

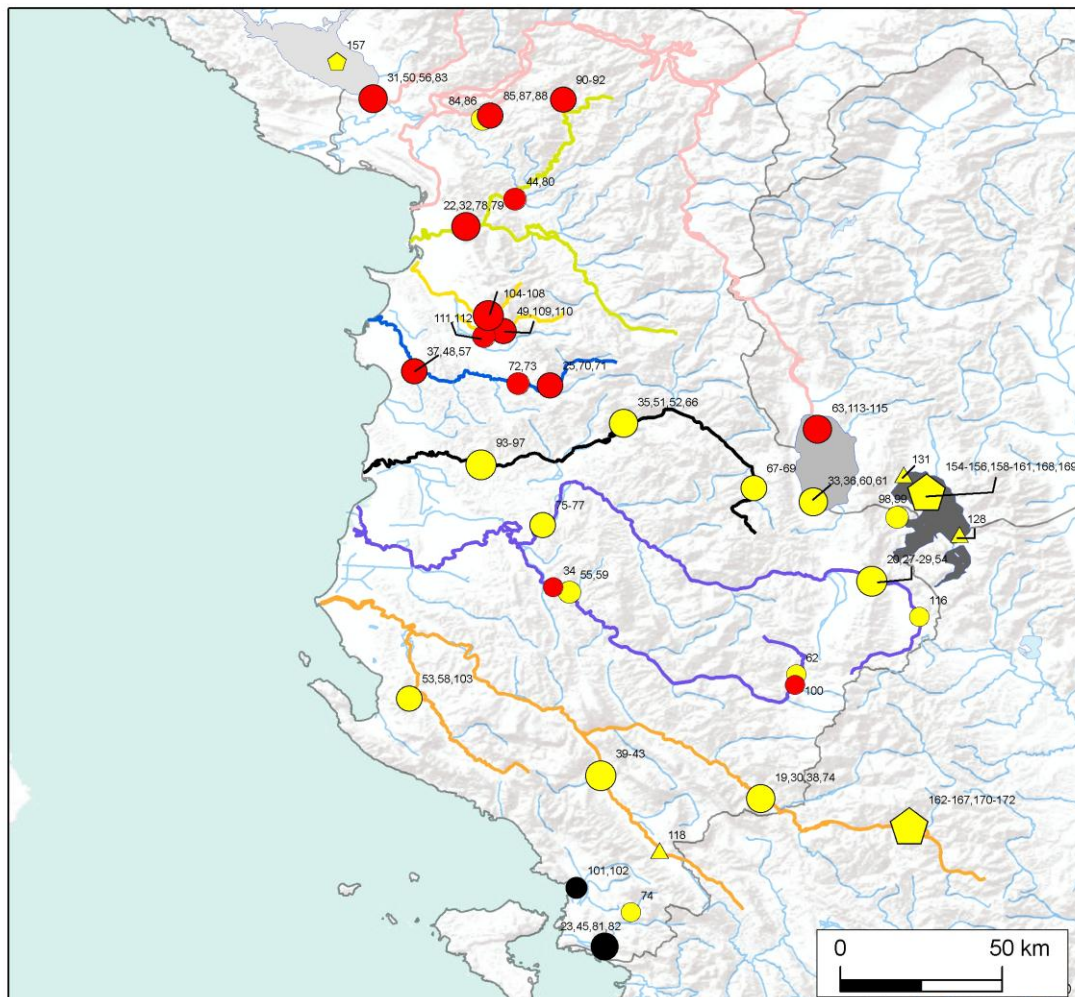


Obr.4. Haplotypová síť na základě 1100bp cytochromu b.

Barevnými elipsami jsou vyznačeny hlavní linie (viz také strom)

Geografická distribuce haplotypů a jednotlivých linií je dobře patrná z map na obrázcích 5.-7.

Obr.5. Rozložení haplotypů v Albánii



Kategorizace vzorků

- Kategorie 1
- Kategorie 2
- Kategorie 3
- ▲ Kategorie 4
- ▲ Kategorie 5
- Kategorie 6
- ⬠ Kategorie 7
- ⬠ Kategorie 8
- Kategorie 9

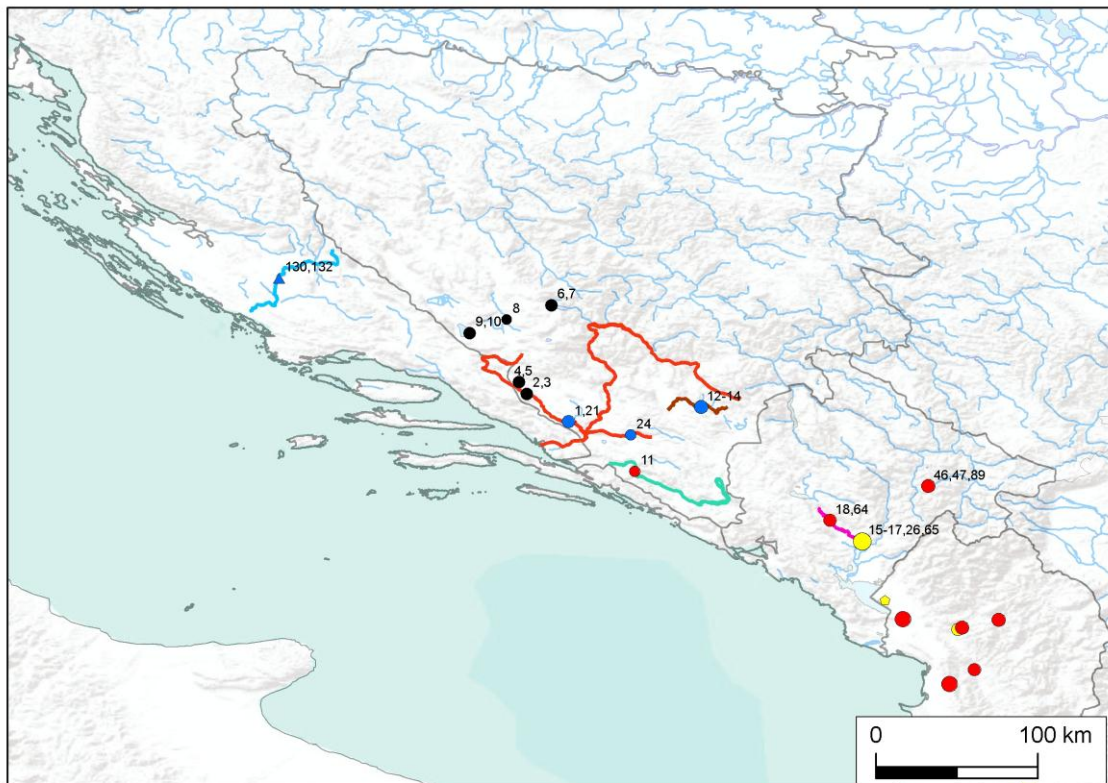
Počet odebraných vzorků

- ⬠ 1
- ⬠ 2
- ⬠ 3
- ⬠ 4
- ⬠ 5
- ⬠ 6
- ⬠ 7
- ⬠ 8 a více

Hydrologické jednotky

- Drin
- Erzen
- Ishem
- Osum
- Mat
- Seman
- Shkumbin
- Vjose
- Skadarské j.
- Ochridské j.
- Prespanské j.

Obr.6 Vzorke haplotypů ze západního Balkánu



Kategorizace vzorků

- Kategorie 1
- Kategorie 2
- Kategorie 3
- ▲ Kategorie 4
- ▲ Kategorie 5
- Kategorie 6
- ◆ Kategorie 7
- ◆ Kategorie 8
- Kategorie 9

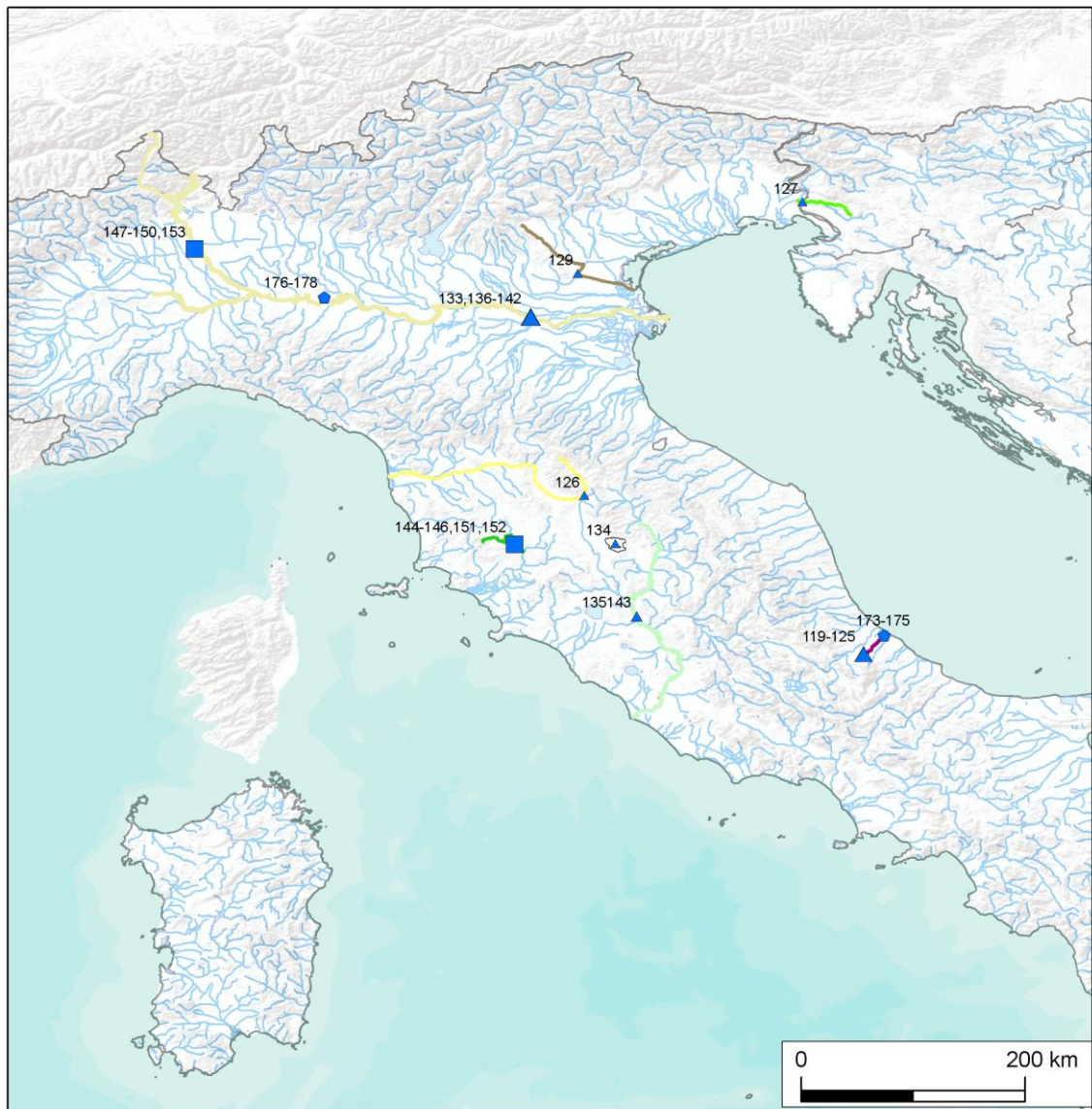
Počet odebraných vzorků

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8 a více







Hydrologické jednotky

- Neretva
- Trebišnica
- Zalomka
- Krka
- Zeta







Obr. 7 Haplotypy linie A v severní Itálii



Kategorizace vzorků

-  Kategorie 4
-  Kategorie 5
-  Kategorie 6
-  Kategorie 7
-  Kategorie 8
-  Kategorie 9

Počet odebraných vzorků

-  1
-  2
-  3
-  4
-  5
-  5 a více

Hydrologické jednotky

-  Arno
-  Alerio
-  Bachiglione
-  Merce
-  Pád
-  Tiber
-  Vipava
-  j. Trasimeno

K mapkám je ještě zapotřebí přiřadit pro orientaci vysvětlivky pro kategorizaci vzorků.

KAT 1 - LINIE A – 1100 bp – vlastní sběr

KAT 2 – LB – 1100 bp – vs

KAT 3 – LC – 1100 bp - vs

KAT 4 – LA – 1100 bp - Genbank

KAT 5 – LB – 1100 bp - GB

KAT 6 – LA – 810 bp - GB

KAT 7- LA – 570 bp - GB

KAT 8 – LB – 570 bp - GB

KAT 9 – VLASTNÍ SBĚR MIMO LINIE

Je zde dobře vidět přítomnost linií B a C v Povodí Semanu a Ohrid-Drin-Skadar systému. U řeky Seman, je možné vysvětlení v dávném propojení jezera Prespa s tímto tokem, a nebo je příčina v malém počtu vzorků z řeky Devoll, kde nebyla linie C zjištěná, což lze přikládat také náhodě. Nelze vyloučit ani zavlečení člověkem, byť se to zdá méně pravděpodobné vzhledem k tomu, že vzorky byly odebrány jak z horní, tak ze spodní části toku a na obou lokalitách byli zástupci této linie přítomni.

5. Diskuse

Tato práce do značné míry potvrdila dřívější studie (Sanjur et al., 2002; Perea et al., 2010). Tyto práce dělí mediteránní linie jelců na 3 velké skupiny. První tvoří rod *Petroleuciscus* (Boguskaya, 2002). Další velkou linií tvoří druhy *Squalius squalus complex*, *S. prespensis*, *S. peloponensis*, *S. moreoticus* a *S. albus*, endemický pro jezero Trasimeno v centrální části Apeninského poloostrova a také *S. janae* z istrijského poloostrova a *S. platyceps* z jezera Skadar a jeho přítoků. Druhová platnost je však u některých taxonů nejasná.

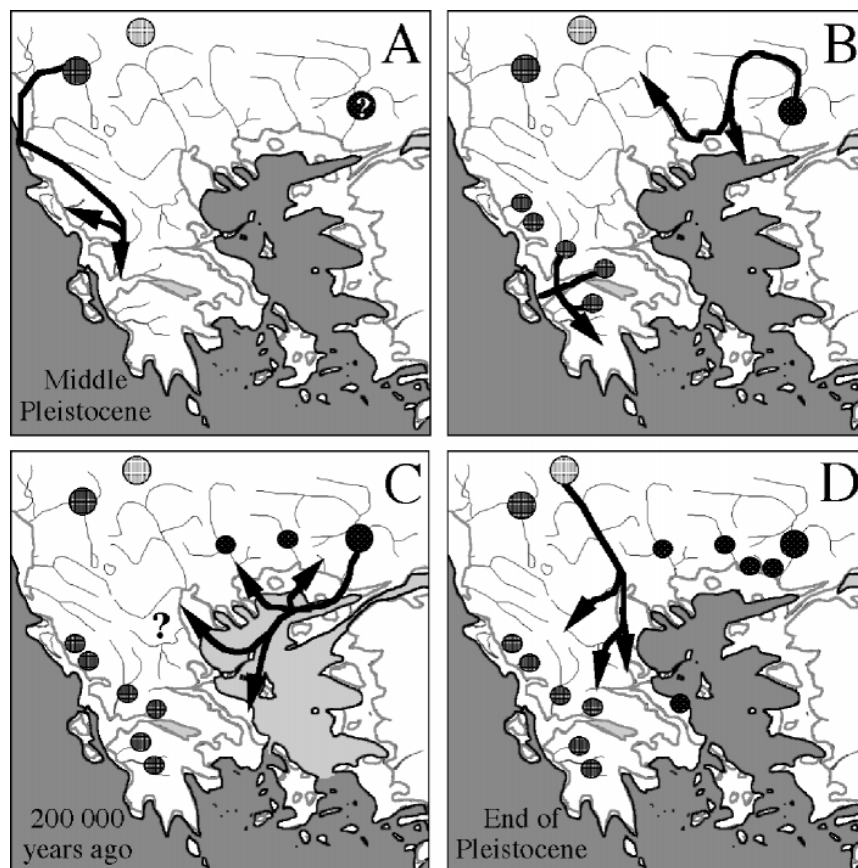
Další velkou linií jsou pak druhy *S. zrmanjae*, *S. microlepis*, *S. tenellus*, *S. svallize* a *S. illyricus* (Perea et al., 2012), což bylo v rámci této studie rovněž potvrzeno. Linie, která

zahrnuje také *Squalius squalus* complex (linie A), je sesterská pro dvě další příbuznější linie (B a C). Pokud by se linie B označila jako samostatný druh (což by však vyžadovalo další analýzy), pak by bylo vyvráceno tvrzení o endemismu toho druhu pro jezero Prespa a jeho přítoky (Kottelat & Freyhof, 2007), jelikož se zástupci této linie vyskytují i v dalších tocích (Shkumbin, Seman, Vjosë, Ochrid-Drin-Skadar). Navíc se výskyt zástupců této linie silně překrývá s areálem nepopsaného druhu *S. sp. Aaos* (Kottelat & Freyhof, 2007) a není vyloučeno, že *S. prespensis* a *S. sp. Aaos* jsou jeden a tentýž druh. Tyto teorie by mohla potvrdit nebo vyvrátit důkladnější studie založená na dalších markerech a také na morfometrii.

5.1. Kolonizace

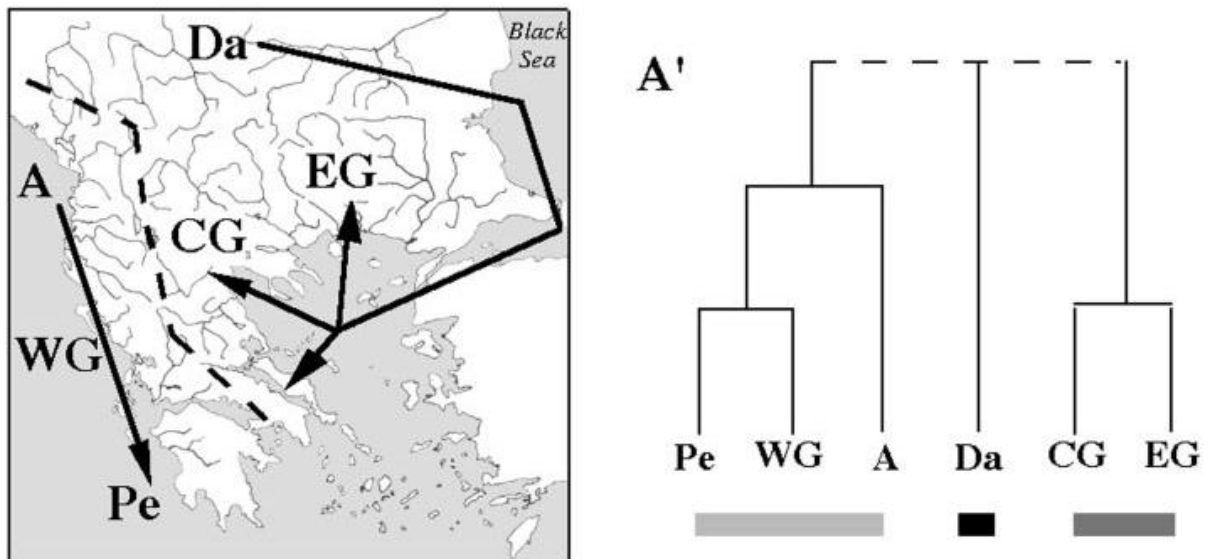
Kolonizaci sladkovodních ryb na Balkáně v minulosti ovlivňovala celá řada faktorů. Mezi 3 nejvýznamější faktory patří říční pirátství, pokles hladiny moře v průběhu glaciálů a snížení salinity Egejského moře, taktéž v pleistocénu (Durand et al., 1999) (viz obr.8).

Obr.8. Kolonizační schéma Balkánu, dle Duranda et. al, 1999.



Dle těchto teorií byl kolonizován jih Balkánu (Řecko) v průběhu pleistocénu z refugií ležících na severu (Albánie), a to jak říčním piráctvím, tak poklesem hladiny moří v průběhu pleistocénních glaciálů. V tomto období totiž docházelo k velkým výkyvům mořské hladiny, a to až o 200 m (Bianco, 1990). Období glaciálů se střídalo s obdobími interglaciálů. Během glaciálů v sobě obrovské množství ledu akumulovalo nezanedbatelné procento mořské vody, což vedlo k razantnímu snížení hladiny oceánů. Poté následovala období výrazně teplejší (interglaciály), při kterých docházelo opět ke zvyšování teplot i hladin moří. Při snižování mořské hladiny docházelo k prodloužení říčních toků, jelikož se jejich ústí posouvalo o mnoho kilometrů dál s tím, jak moře ustupovalo. Díky tomu docházelo k soutokům řek, ke kterým by při běžné úrovni mořské hladiny dojít nemohlo, což samozřejmě zvyšovalo předpoklady pro disperzi ichtyofauny. Na území Balkánu byl tento jev velmi důležitým faktorem při formování současné distribuce sladkovodních ryb. Dle této teorie (Durand, et al., 1999) byl západní Balkán kolonizován právě v důsledku poklesu mořské hladiny, a to ze severu, tedy z území dnešní Albánie. Podobně se vyjadřují i další autoři (např. Bianco, 1990), kteří se také přiklánějí k možnosti kolonizace Řecka ze severu v období pleistocénu (viz obr. 9).

Obr. 9 Kolonizační teorie podle Bianca, 1990, a vymezení tří hlavních linií jeliců



Tyto teorie jsou však v rozporu s našimi poznatky, které vycházejí z topologie stromu a odhadu divergencí na základě průměrných p-hodnot. Z těchto údajů spíše vyplývá, že ke kolonizaci jihozápadního Balkánu nedocházelo směrem ze severu na jih, ale spíše

opačně, z řeckých refugií směrem na sever, a to zřejmě ještě v pliocénu, kdy také značně kolísala hladina moří.

Jako další potencionálně možný kolonizační scénář ve sledované oblasti lze tedy navrhnout ten, že se jelci šířili v předpleistocéním období z oblasti Řecka směrem na sever, a to zřejmě jak říčním pirátstvím, tak i v důsledku kolísání mořské hladiny. Odtud se zřejmě jako první odštěpila linie A, která zřejmě nedlouho poté (možná ale až ve spodním pleistocénu) kolonizovala Apeninský poloostrov, a to právě díky výraznému poklesu mořské hladiny. Vezmeme-li v úvahu hloubku Jaderského moře (zejména v severní části je hloubka jen kolem 100m) a předpokládaný pokles jeho hladiny během výše zmíněných kulminací (až 200 m), dojdeme k závěru, že ústup mořské hladiny byl tak velkých rozměrů, že nebránil migraci fauny z Balkánu na Apeninský poloostrov a naopak.

Podle získaných výsledků se jako pravděpodobné jeví to, že zástupci linie A z Apeninského poloostrova v pozdější době (pleistocén) rekolonizovali opět západní část Balkánu. Tomu na základě stromů nasvědčují odvozenější haplotypy balkánských jedinců z této linie (viz strom a mapy). Tato teorie by také korespondovala s perijadranským rozšířením *S. squalus*. Na potvrzení této teorie by však bylo zapotřebí více dat ze severozápadu Balkánu.

Samotná diverzifikace těchto linií na území dnešní Albánie již probíhala během pleistocénu, a to převážně díky říčnímu pirátství. Značnou roli hrál zejména fakt, že celá tato oblast je krasového původu (tvořená vápenci), což jsou ideální podmínky pro říční erozi a navíc je pro Albánii charakteristická hustá říční síť díky místním geografickým podmínkám.

6. Závěr

Tato práce je doposud první takto důkladnou analýzou fylogenetických vztahů albánských jelců na základě molekulárních dat. Práce podkryla fylogenetické vztahy této skupiny ryb v oblasti, která je jednou z posledních málo probádaných částí Evropy. Na základě molekulární analýzy cytochromu b se podařilo odhalit 3 vzájemně nepříliš diverzifikované linie a popsat jejich rozšíření. Zároveň byly vysloveny pochybnosti o validitě platných taxonů v rámci těchto skupin. Je zřejmé, že současné znalosti o rozšíření druhů náležících do těchto linií jsou do značné míry nepřesné. Je to dáno

jednak výše zmíněným nedokonalým „zmapováním“ dané problematiky a jednak používáním spíše morfologických metod, které díky vysoké morfologické plasticitě ryb nemusejí být vždy průkazné. Celá situace je však komplikovanější a zasluhovala by si detailnější studii, což by měl být i jeden z cílů pro potencionální dizertační práci v budoucnu.

7. Literatura

Albrecht, C., Wilke, T. (2008). Ancient Lake Ohrid: biodiversity and evolution. *Hydrobiologia* 615: 103–140.

Apostodilis, A. P., Triantaphyllidis, C., Kouvatsi, A., and Economidis, P. S. (1997). Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brown trout) populations. *Molecular Ecology* 6: 531-542.

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. and Saunders, N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 489-522.

Avise, J.C.,(2000). Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge.

Avise, J.C. (2004). Molecular markers, natural history, and evolution. Second Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

Bermingham, E., and Martin, A. P. (1998). Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: Testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology* 7: 499-517.

Bernatchez, L., and Dodson, J.J. (1991). Phylogeographic structure in mitochondrial DNA of the lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and its relation to Pleistocene glaciations. *Evolution* 45: 1016-1035.

Bernatchez, L., and Wilson, C.C. (1998). Comparative phylogeography of nearctic and palearctic fishes. *Molecular Ecology* 7: 431-452.

Bianco, P. G. (1990). Potential role of the paleohistory of the Mediterranean and Paratethys basins on the early dispersal of Mediterranean freshwater fishes. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 1: 167-184.

Bogutskaya NG. (2002). *Petroleuciscus*, a new genus for the *Leuciscus borysthenicus* species group (Teleostei: Cyprinidae). *Zoosyst Ross* 11: 235-237

Bogutskaya, N.G., and Zupančič P. (2003). *Phoxinellus pseudalepidotus* (Teleostei: Cyprinidae), a new species from the Neretva basin with an overview of the morphology of *Phoxinellus* species of Croatia and Bosnia-Herzegovina. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 14: 369–383.

Bogutskaya N.G., Zupančič P. (2010). *Squalius janae*, a new species of fish from the Adriatic Sea basin in Slovenia (Actinopterygii: Cyprinidae). *Zootaxa* 2536: 53-68

Bohlen, J., Perdices, A., Doadrio, I., and Economidis, P. S. (2006). Vicariance, colonisation, and fast local speciation in Asia Minor and the Balkans as revealed from the phylogeny of spined loaches (Osteichthyes; Cobitidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 552-561.

Crandall, K.A., Bininda-Emonds, O.R.P., Mace, G.M., and Wyane, R.K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*. 15, 290-295.

Doadrio, I., and Carmona, J. A. (1998). Genetic divergence in Greek populations of the genus *Leuciscus* and its evolutionary and biogeographical implications. *Journal of Fish Biology* 53: 591-613.

Doadrio, I., and Carmona, J. A. (2006). Phylogenetic overview of the genus *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae) in the Iberian Peninsula, with description of two new species. *Cybium* 30 (3):199-214.

Doadrio, I., and Elvira, B. (2007). A new species of the genus *Achondrostoma* Robalo, Almada, Levy & Doadrio, 2007 (Actinopterygii, Cyprinidae) from western Spain. *Graellsia* 63(2): 295-304.

Doadrio, I., Kottelat, M. and de Sostoa, A. (2007). *Squalius laietanus*, a new species of cyprinid fish from north-eastern Spain and southern France (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 18(3): 247-256.

Durand, J. D, Templeton, A. R., Guinand, B., Imsiridou, A., and Bouvet, Y. (1999). Nested Clade and Phylogeographic Analyses of the Chub, *Leuciscus cephalus* (Teleostei, Cyprinidae), in Greece: Implications for Balkan Peninsula Biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 566-580.

Economidis, P. S. (2005). *Barbatula pindus*, a new species of stone loach from Greece (Teleostei: Balitoridae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 16 (1): 67-74.

Felsenstein, J., (1985): Confidence limits on phylogeny: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-789.

Freyhof, J., Lieckfeldt, D., Pitra, C., and Ludwig, A. (2005). Molecules and morphology: Evidence for introgression of mitochondrial DNA in Dalmatian cyprinids. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 347-354.

Freyhof, J., Lieckfeldt, D., Bogutskaya, N. G., Pitra, C., and Ludwig, A. (2006). Phylogenetic position of the Dalmatian genus *Phoxinellus* and description of the newly proposed genus *Delminichthys* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 416-425.

Freyhof, J., and Kottelat, M. (2007). *Alburnus vistonicus*, a new species of shemaya from eastern Greece, with remarks on *Chalcalburnus chalcoides macedonicus* from Lake Volvi (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 18(3): 205-212.

Hall A.T.,(1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Hewitt, G.M. (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10: 537-549.

Hillis, D. M. & Huelsenbeck, J. P. (1992): Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetics analyses. *Heredity* 83: 189-195.

Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. R., (2001): MR BAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755.

Chen WJ, Mayden RL (2009)Molecular systematics of the Cyprinoidea (Teleostei: Cypriniformes), the world's largest clade of freshwater fishes: Further evidence from six nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52:544-549

Ketmaier, V., Bianco, P. G., Cobolli, M., Krivokapic, M., Caniglia, R., and De Matthaeis, E. (2004). Molecular phylogeny of two lineages of Leuciscinae cyprinids (Telestes and Scardinius) from the peri-Mediterranean area based on cytochrome b data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 1061-1071.

Kimura, M., (1980). A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.

Kottelat, M., and Barbieri, R. (2004). Pseudophoxinus laconicus, a new species of minnow from Peloponnese, Greece, with comments on the West Balkan Pseudophoxinus species (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 15(2): 147-160.

Kottelat, M., and Economidis, P.S. (2006). Squalius orpheus, a new species of cyprinid fish from Evros drainage, Greece (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 17(2): 181-186.

Kottelat, M., and Freyhof, J. (2007). Handbook of European freshwater fishes. 646 pp.

Kovačić, M. (2005). A new species of Knipowitschia (Gobiidae) from Dalmatia, Croatia. *Cybium* 29(3):275–280.

Kovačić, M., and Šanda, R. (2007). A new species of Knipowitschia (Perciformes: Gobiidae) from southern Montenegro. *Journal of the National Museum (Prague), Natural History Series* 176 (5): 81-89.

Larget, B. & Simon, D. L., (1999): Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 16: 750-759.

Marčić, Z., Buj, I., Duplić, A., Čaleta, M., Mustafić, P., Zanella, D., Zupančić, P. & Mrakovčić, M., (2011): A new endemic cyprinid species from the Danube drainage. *Journal of Fish Biology* 79 (2): 418-430.

Marková S, Šanda R, Crivelli A, Shumka S, Wilson IF, Vukić J, Berrebi P, Kotlík P (2010) Nuclear and mitochondrial DNA sequence data reveal the evolutionary history of *Barbus* (Cyprinidae) in the ancient lake systems of the Balkans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 488-500.

Miller, P.J., and Šanda, R. (2008). A new West Balkanian sand-goby (Teleostei: Gobiidae). *Journal of Fish Biology* 72: 259-270.

Mustafić P., Marčić Z., Duplić A., Mrakovčić M., Čaleta M., Zanella D., Buj I., Podnar M., and Dolenc Z. (2008). A new loach species of the genus *Cobitis* in Croatia. *Folia zoologica* 57 (1-2): 4-9.

Nichols, R. (2001). Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 358-364.

O'Reilly, P.O., Reimchen, T.E., and Strobeck, C. (1993). Mitochondrial DNA in *Gasterosteus* and Pleistocene glacial refugium on the Queen Charlotte Island, British Columbia. *Evolution* 47: 678-684.

Perdices, A., Bohlen, J., and Doadrio, I. (2008). The molecular systematic and biogeography of the European Cobitids based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 382–390

Perea S, Böhme M, Zupančič P, Freyhof J, Šanda R, Özulug M, Abdoli A, Doadrio I. (2010). Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in circummediterranean subfamily leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data. *BMC Evolutionary Biology* 10: 265

Robalo, J.I., Almada, V.C., Levy, A., and Doadrio, I. (2007). Re-examination and phylogeny of the genus *Chondrostoma* based on mitochondrial and nuclear data and the definition of 5 new genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 362-372.

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

Tsigenopoulos, C. S., and 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.

Tsigenopoulos, C. S., Kotlík, P., and Berrebi, P. (2002). Biogeography and pattern of gene flow among *Barbus* species (Teleostei: Cyprinidae) inhabiting the Italian Peninsula and neighbouring Adriatic drainages as revealed by allozyme and mitochondrial sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society* 75: 83-99.

Waters, J. M., Lintermans, M., and White, R. W. G. (1994). Mitochondrial DNA variation suggests river capture as source of vicariance in *Gadopsis bispinosus* (Pisces, Gadopsidae). *Journal of Fish Biology* 44: 549-551.

Wilson, C.C., Hebert, P.D.N., Reist, J.D. and Dempson, J.B. (1996). Phylogeography and postglacial dispersal of arctic charr *Salvelinus alpinus* in North America. *Molecular Ecology* 187-197.

Zardoya, R., and Doadrio, I. (1998). Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: systematic and biogeographical implications. *Proceedings of the Royal Society of London B* 265: 1365-1372

Zardoya, R., Economidis, P.S., and Doadrio, I. (1999). Phylogenetic relationships of Greek Cyprinidae: molecular evidence for at least two origins of the Greek cyprinid fauna. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 122-131.

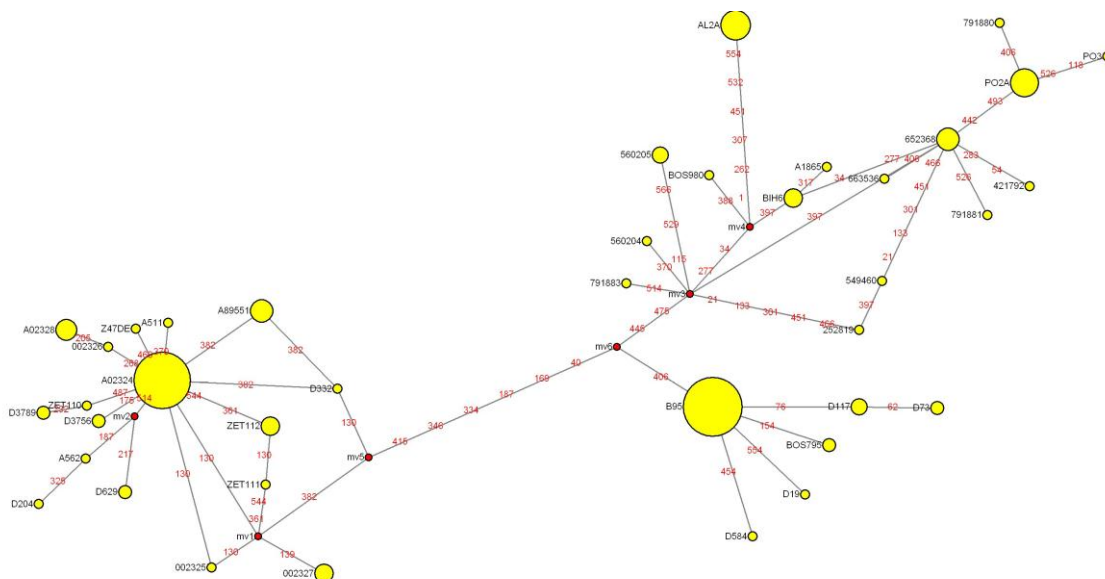
Zupančič, P., and Bogutskaya N.G. (2002). Description of two new species, *Phoxinellus krbavensis* and *Phoxinellus jadovensis*, re-description of *P. fontinalis* Karaman, 1972, and discussion of the distribution of *Phoxinellus* species (Teleostei: Cyprinidae) in Croatia and in Bosnia and Herzegovina. *Natura Croatica* 11: 411–437.

Zupančič P., Maric D., Naseka A.M., Bogutskaya N.G. (2010). *Squalius platyceps*, a new species of fish (Actinopterygii: Cyprinidae) from the Skadar Lake basin. *Zoosystematica Rossica* 19: 154-167

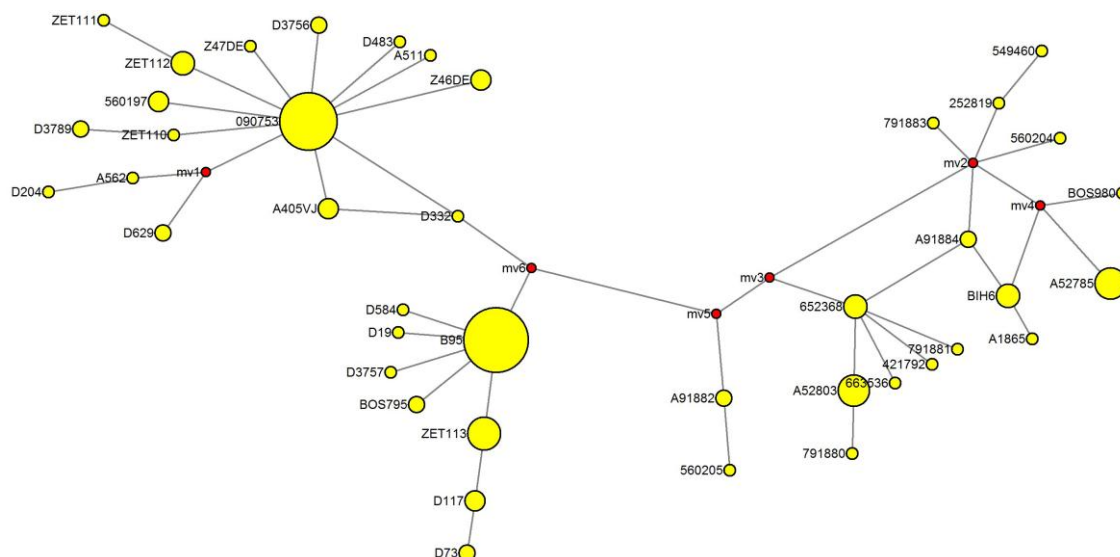
Přílohy

Příloha 1. Nezakořeněná haplotypová síť (570bp)

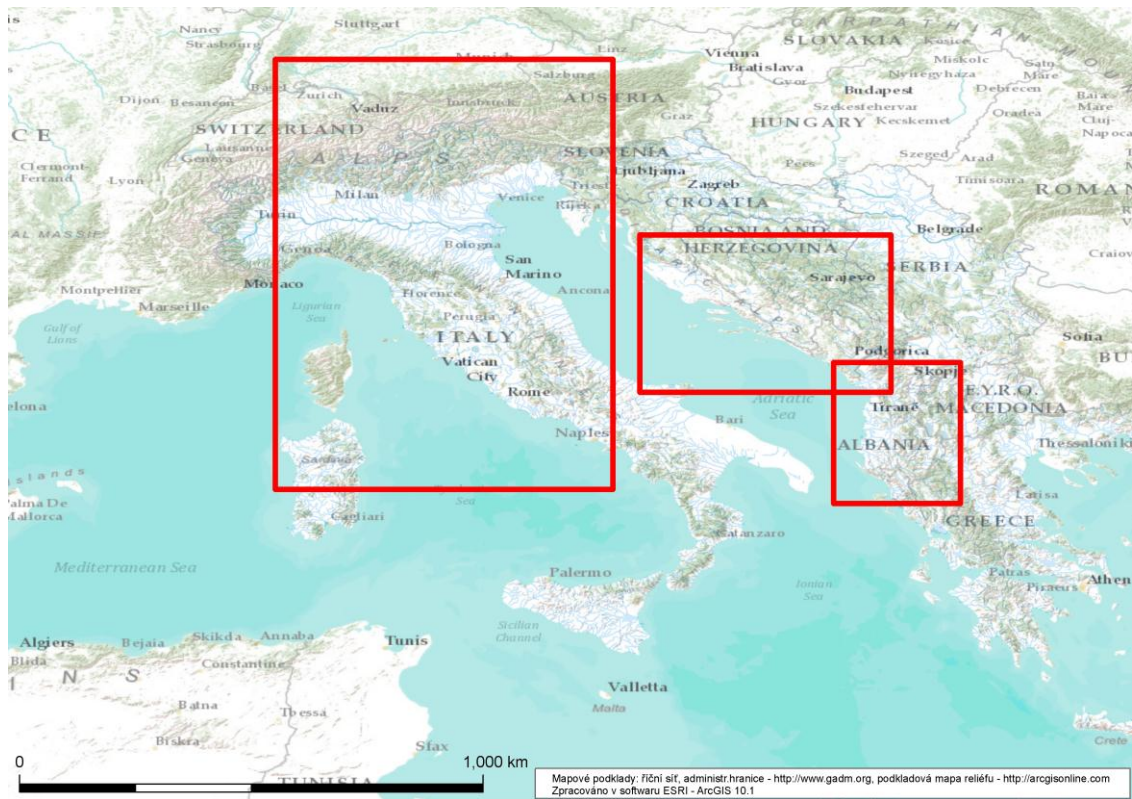
Červená čísla na větvích označují mutace



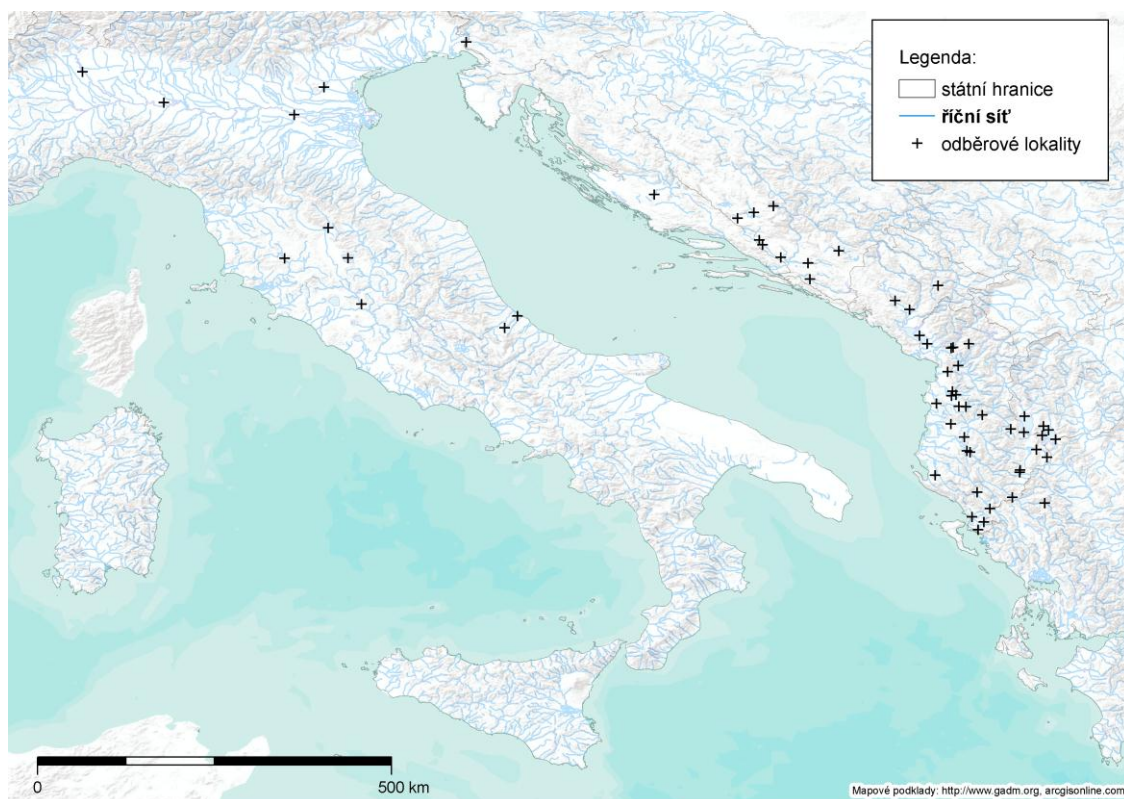
Příloha 2. Nezakořeněná hapl. síť (810bp)



Příloha 3. Mapa oblastí, ze kterých pocházely zkoumané vzorky



Příloha 4. Orientační mapa lokalit odkud byly zkoumané vzorky (vl. sběr i GB)



Příloha 5. Seznam lokalit znázorněných v mapách

kod ve stromu	č. v mapě	lokality	délka cyt.
BiH6	1	Trebizat river, Neretva, B. and H., Kravica	1100
BiH17	2	Trebizat river, Neretva, B. and H.	1100
BiH18	3	Trebizat river, Neretva, B. and H.	1100
SmicrolepBiH2	4	Krenica lake, Neretva, B. and H., Sovici	1100
SmicrolepBiH3	5	Krenica lake, Neretva, B. and H.	1100
BiH62	6	Rama lake, Neretva, B. and H.	1100
BiH61	7	Rama lake, Neretva, B. and H.	1100
Bos401	8	Šuica r., Duvanjsko polje, B. and H.	1100
Bos956	9	Buško blato, reservoir, B. and H.	1100
Bos957	10	Buško blato, reservoir, B. and H.	1100
B95	11	Trebisnjica r., Popovo Polje, B. and H.	1100
A1865	12	Zalomka river, B.and H.	1100
A1861	13	Zalomka river, B.and H.	1100
A1867	14	Zalomka river, B.and H.	1100

Zet110	15 Zeta, Montenegro	1100
Zet111	16 Zeta, Montenegro	1100
Zet112	17 Zeta, Montenegro	1100
Zet113	18 Zeta, Montenegro	1100
>A405Vjose	19 Vjose	1100
>A562	20 Devolli	1100
>BiH7	21 Trebizat river, Neretva, B. and H.	1100
>Bos771	22 Mat, Milot	1100
>Bos946Pavlo	23 Pavllo, Skhalle	1100
>Bos980	24 Bregava r., B. and H., Stolac	1100
>A300Squalus	25 Erzen, Pellumbas	1100
>Zet114	26 Zeta, Montenegro	1100
>Z47Devol	27 Devolli	1100
>Z44Devol	28 Devolli	1100
>Z46Devol	29 Devolli	1100
>A407Vjose	30 Vjose	1100
>D9SkadarL	31 Skadar lake	1100
>Bos772Mat	32 Mat	1100
>D3756	33 Ohrid lake,Albania	1100
>D630	34 Osumi, upstr. Uznove	1100
>A63	35 Shkumbini	1100
D3758ohrid	36 Ohrid Lake, Albania	1100
>A363	37 Erzen, Romanat	1100
>A408	38 Vjose	1100
>A510	39 Drinos, Andon-Poci	1100
>A511	40 Drinos, Andon-Poci	1100
>A512	41 Drinos, Andon-Poci	1100
>A513	42 Drinos, Andon-Poci	1100
>A514	43 Drinos, Andon-Poci	1100
>Bos795	44 Fani i Vogel, Rreshen	1100
>Bos944	45 Pavllo	1100
>D117	46 Kiri	1100
>D116	47 Kiri	1100
>D529	48 Erzen	1100
>D590	49 Terkuza	1100
>D19	50 Skadar lake	1100
>D238	51 Shkumbini	1100
>D239	52 Shkumbini	1100
>D481	53 Shushica	1100
>D304Devol	54 Devolli	1100

>D628	55 Osumi	1100
>D10SkadarL	56 Skadar lake	1100
>D526	57 Erzen	1100
>D483	58 Shushica	1100
>D629	59 Osumi	1100
>D3789	60 Ohrid lake	1100
>D3757	61 Ohrid lake	1100
>D332	62 Osumi	1100
>D3792	63 Ohrid lake	1100
>Zet109	64 Zeta, Montenegro	1100
>Zet108	65 Zeta, Montenegro	1100
>A64	66 Shkumbini	1100
>A114_1Sc	67 Shkumbini,Veri - Slabinje	1100
>A114_2Sc	68 Shkumbini,Veri - Slabinje	1100
>A115Sc	69 Shkumbini,Veri - Slabinje	1100
A301	70 Erzen,Pellumbas	1100
>A302	71 Erzen,Pellumbas	1100
>A362	72 Erzen, Mullet	1100
>A364	73 Erzen, Mullet	1100
>A406	74 Vjose,Qesarat	1100
>A563	75 Devolli, Zdrava	1100
>A564	76 Devolli, Zdrava	1100
>A565	77 Devolli, Zdrava	1100
>Bos773	78 Mat, Milot	1100
>Bos774	79 Mat, Milot	1100
>Bos797	80 Fani i Vogel,Rreshen	1100
>Bos945	81 Pavllo, Skhalle	1100
>Bos947	82 Pavllo, Skhalle	1100
D18	83 Skadar Lake	1100
>D72	84 Gomsiqe	1100
>D73	85 Gomsiqe	1100
>D74	86 Gomsiqe	1100
>D75	87 Gomsiqe	1100
>D76	88 Gomsiqe	1100
>D118	89 Kiri	1100
>D183	90 Fani	1100
>D184	91 Fani	1100
>D185	92 Fani	1100
>D202	93 Shkumbini	1100
>D203	94 Shkumbini	1100

>D204	95 Shkumbini	1100
>D205	96 Shkumbini	1100
>D206	97 Shkumbini	1100
>D258	98 Prespa	1100
>D261	99 Prespa	1100
>D331	100 Osumi	1100
>D423	101 Bistrica	1100
>D424	102 Bistrica	1100
>D482	103 Shushica	1100
>D571	104 Zeze, Virion	1100
>D572	105 Zeze, Virion	1100
>D573	106 Zeze, Virion	1100
>D574	107 Zeze, Virion	1100
>D575	108 Zeze, Virion	1100
>D583	109 Terkuza	1100
>D584	110 Terkuza	1100
>D588	111 Terkuza	1100
>D589	112 Terkuza	1100
>D3759	113 Ohrid lake	1100
>D3790	114 Ohrid lake	1100
>D3791	115 Ohrid lake	1100
>Z45	116 Devolli, Golo Brdo	1100
D356	117 Vjosa	1100
AJ252798	118 Drinos, Albania	1100
AJ252785	119 Alento, Italy	1100
AJ252785	120 Alento, Italy	1100
AJ252785	121 Alento, Italy	1100
AJ252785	122 Alento, Italy	1100
AJ252785	123 Alento, Italy	1100
AJ252785	124 Alento, Italy	1100
AJ252785	125 Alento, Italy	1100
HM560205	126 Arno, Arezzo, Itálie	1100
HM560204	127 Vipava river, Isonzo basin, Slovenia	1100
HM560197	128 Prespa lake, Greece	1100
JQ652368	129 Bacchiglione River, Italy	1100
JQ663536	130 Krka, Croatia	1100
AF090753	131 Lake Prespa	1100
AJ251092	132 Krka, Croatia	1100
AF421792	133 Po: Po, Italy	1100
AY549460	134 Lake Trasimeno, Italy	1100

AJ252819	135	Tibera, Italy	1100
AJ252803	136	Po, Italy	1100
AJ252803	137	Po, Italy	1100
AJ252803	138	Po, Italy	1100
AJ252803	139	Po, Italy	1100
AJ252803	140	Po, Italy	1100
AJ252803	141	Po, Italy	1100
AJ252803	142	Po, Italy	1100
AJ252818	143	Tibera, Italy	1100
EU791884	144	Merse River, Italy(Ombrone)	810
EU791884	145	Merse River, Italy(Ombrone)	810
Eu791883	146	Merse River, Italy(Ombrone)	810
EU791881	147	Ticino River, Italy(Po)	810
EU791879	148	Ticino River, Italy(Po)	810
EU791879	149	Ticino River, Italy(Po)	810
EU791879	150	Ticino River, Italy(Po)	810
EU791882	151	Merse River, Italy(Ombrone)	810
EU791882	152	Merse River, Italy(Ombrone)	810
EU791880	153	Ticino River, Italy(Po)	810
AJ002326	154	Prespa	570
AJ002328	155	Prespa	570
AJ002328	156	Prespa	570
AJ002324	157	Skadar	570
AJ002324	158	Prespa	570
AJ002324	159	Prespa	570
AJ002324	160	Prespa	570
AJ002324	161	Prespa	570
AJ002324	162	Aoos	570
AJ002324	163	Aoos	570
AJ002324	164	Aoos	570
AJ002324	165	Aoos	570
AJ002324	166	Aoos	570
AJ002324	167	Aoos	570
AJ002325	168	Prespa	570
AJ002327	169	Prespa	570
AJ389551	170	Aoos	570
AJ389551	171	Aoos	570
AJ389551	172	Aoos	570

AJ006895	173	Alento, It.	570
AJ006895	174	Alento, It.	570
AJ006895	175	Alento, It.	570
AJ006892	176	Po, It.	570
AJ006892	177	Po, It.	570
AJ006894	178	Po, It.	570