

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: BIOLOGIE

Studijní obor: EKOLOGIE



Bc. Markéta Koprnická

Fylogeografie a invazní cesty druhu *Proasellus coxalis* s.l. (Crustacea: Isopoda)
Phylogeography and dispersal routes of the *Proasellus coxalis* s.l. (Crustacea: Isopoda)

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Veronika Sacherová, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 14. 8. 2013

Bc. Markéta Koprnická

ABSTRAKT

Schopnost disperze sladkovodních bezobratlých je ovlivněna mnoha faktory. V současné době v ní hraje podstatnou roli také člověk. Mimo jiné stavbou plavebních kanálů zničil přirozené hranice mezi povodími a umožnil tak šíření druhů na nová území.

Tato práce na základě genetických dat určuje možné invazní cesty nepůvodního druhu *P. coxalis* s.l. do České republiky a snaží se zhodnotit jeho fylogeografii v rámci České republiky. Byl osekvenován gen COI a 28S. Do analýz bylo zahrnuto 96 jedinců z 27 populací z České republiky. Z volně přístupné databáze GenBank bylo staženo 40 sekvencí genu pro COI a 7 sekvencí genu 28S.

Na území České republiky se nacházejí dvě odlišné genealogické linie *P. coxalis* s.l. (6% rozdíl mezi sekvencemi genu pro COI). Jedna pochází z recentní invaze z mediteránní oblasti (přes západní invazní koridor a další plavební kanály). Druhá linie je na našem území nejspíše původní a mohla by spadat do poddruhu *P. coxalis septentrionalis*. Výsledky jsou diskutovány.

Klíčová slova: *Proasellus coxalis* s.l., COI, invazní cesty, fylogeografie

ABSTRACT

Dispersal of freshwater invertebrates is affected by many factors. Recently, human activities played a very important role in their dispersal. Among others, constructions of new shipping canals damages natural boundaries and the species can spread into new areas.

This Master thesis deal with non-indigenous species *P. coxalis* s.l. On the genetic bases assess a possible dispersal routes into the Central Europe (and the Czech Republic), and phylogeography of this species in the Czech Republic. I amplified and sequenced DNA of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene and 28S nuclear rDNA gene. 96 individuals from 27 localities in the Czech Republic were analyzed. I also included 40 sequences of the COI gene and 7 of the 28S gene from the GenBank database.

In the Czech Republic, there are two different genealogic lineages of *P. coxalis* (with 6% genetic distance between sequences of the COI gene). The first lineage comes from recent invasion of this species from Mediterranean area (through Western invasion corridor and other shipping canals). The second lineage is probably indigenous in the area and it can probably be assigned to the subspecies *P. coxalis septentrionalis*. The results are discussed.

Keywords: *Proasellus coxalis* s.l., COI, dispersal routes, phylogeography

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi byli nápomocni při sepsání práce. Především patří tyto řádky mé milé školitelce RNDr. Veronice Sacherové, Ph.D. za její trpělivost a velmi přátelský přístup, celé vedení a financování práce. Dále pak děkuji RNDr. Jakubu Horeckému, Ph.D. za prvotní představení problematiky. Jemu a také Mgr. Janu Špačkovi, Ph.D. za poskytnutí mnoha užitečných informací, poznatků a literárních zdrojů.

Velmi děkuji za sbírání některých vzorků Mgr. Janu Špačkovi, Ph.D. a Mgr. Natálii Lapšanské, za pomoc a rady při práci v laboratoři pak především RNDr. Jasně Vukić, Mgr. Evě Balcarové, Ph.D. a Mgr. Martinu Krajíčkoví. Mgr. Antonínu Střížkovi děkuji za sdílení studijních poznatků a nepostradatelné praktické rady při zpracování výsledků.

V neposlední řadě patří veliké díky mé rodině, za toleranci a podporu po celou dobu mého studia.

Vám všem, děkuji!

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
1.1 Disperze sladkovodních bezobratlých	7
1.1.1 Aktivní disperze.	8
1.1.2 Pasivní disperze	8
1.1.3 Disperze zprostředkovaná člověkem (human-mediated dispersal)	11
1.2 Poznámky k taxonomii a biologii druhu <i>Proasellus coxalis</i>	18
1.2.1 Taxonomie <i>P. coxalis</i>	18
1.2.2 Biologie a ekologie <i>P. coxalis</i> , jeho srovnání s <i>A. aquaticus</i>	19
1.2.3 Morfologie <i>P. coxalis</i>	20
1.3 Datované výskyty <i>P. coxalis</i> v Evropě a v České republice.....	22
2. CÍLE PRÁCE.....	24
3. METODIKA	25
3.1 Sběr dat.....	25
3.2 Izolace DNA, purifikace a sekvenace	26
3.3 Fylogenetické zpracování sekvencí.....	27
3.4 Doplnující data	28
3.5 Migrační tůňka	28
4. VÝSLEDKY.....	30
4.1 Haplotypové sítě.....	30
4.2 Fylogenetický strom.....	36
4.3 Odhad středních genetických vzdáleností sekvencí genu COI	37
4.4 Vnitropopulační variabilita.....	39
4.5 Migrační tůňka.....	40
5. Diskuze	42
6. ZÁVĚR	52
SEZNAM LITERATURY.....	53
SEZNAM PŘÍLOH	62

1. ÚVOD

1.1 Disperze sladkovodních bezobratlých

Disperze obecně označuje proces, kterým se organismy (nebo jejich dormantní stádia) rozšiřují. Má význam nejen v měřítku prostorovém, ale též časovém (Townsend et al. 2008). Jelikož se jedná o velmi široký pojem, často se jeho definice liší podle oblasti výzkumu. V případě sladkovodních bezobratlých tak může být zúžen například pouze na záznamy o suchozemském přenosu (Bilton et al. 2001). Nebo naopak zahrnuje disperze také pohyb přímo ve vodě, jako je drift organismů či jejich propagulí po proudu, pohyb laterální a proti proudu (Malmqvist 2002).

Kontinentální sladkovodní ekosystémy představují habitaty charakteristické svou nespojitostí, obklopené z pohledu vodních organismů nehostinnou pevninou, jež je pro ně neobyvatelná. Ovšem i přes zdánlivou izolaci vodních habitatů vykazuje mnoho sladkovodních druhů široké geografické rozšíření (Bilton et al. 2001, Figuerola & Green 2002a). Některé organismy dosáhnou této široké distribuce aktivním letem (dospělců) přes otevřenou krajinu (Kovats et al. 1996). Mnoho vodních organismů ovšem postrádá mobilitu nutnou k přemísťování z jednoho povodí do druhého, ke kolonizování nových území či k disperzi do sousedních vodních ploch třeba i v rámci jednoho povodí (Figuerola & Green 2002a). K šíření pak využívají takových vektorů přenosu, jako jsou zvířata, vítr nebo vodní proud, které jim zajišťují pasivní transport mezi těmito nespojitými habitaty (Bilton et al. 2001). Schopnost disperze souvisí s průběhem rozmnožovacího cyklu, způsobem života organismu a jeho životní strategií. Nemusí být vnímána jen jako mechanismus pro kolonizaci vhodného prostředí (Malmqvist 2002; Palmer et al. 1996), ale může také silně ovlivnit a být ovlivněna množstvím vnitrodruhové i mezidruhové kompetice (Bowler & Benton 2005; Palmer et al. 1996). V konečném důsledku může působit i na to, jak si organismy poradí se změnami prostředí, tedy především: klimatickými změnami, fragmentací či ztrátou habitatu nebo invazí nepůvodních druhů (Bowler & Benton 2005).

V následujících řádcích budou popsány možné mechanismy disperze vodních bezobratlých organismů, s rozvinutím možností relevantních pro studovaný organismus *Proasellus coxalis*. Jak již bylo naznačeno v předchozím textu, mechanismy disperze se tedy všeobecně dělí na dva základní způsoby. Při aktivní disperzi je živočich schopen šířit se vlastním pohybem. V případě pasivní spoléhá na jiné vektory přenosu. V neposlední řadě pak nesmíme opominout ani lidskou aktivitou, jež velmi ovlivňuje disperzi mnoha organismů (Gherardi et al. 2009; Leppäkoski et al. 2002).

1.1.1 Aktivní disperze.

Aktivní disperze je velmi důležitá především v tekoucích vodách. Proud vody postupně unáší dolů po směru toku všechny částice, včetně organismů ve vodě se vyskytujících. Jelikož by tento jev vedl k postupné extinkci druhů v úsecích horních toků, musejí se tedy organismy nějakým způsobem pohybovat i proti proudu. A tak v případě druhů vodního hmyzu, jež mají okřídlená letuschopná imága, platí hypotéza tzv. kolonizačního cyklu (Müller 1982). Ta říká, že ztráty vzniklé driftem v horních tocích jsou nahrazeny díky okřídleným imágům, která létají proti proudu, kde posléze kladou vajíčka (Bilton et al. 2001; Müller 1982; Williams & Williams 1993).

Avšak v tocích žijí i další bentičtí bezobratlí, kteří nedisponují letuschopnými imágy. Ti se musejí s unášejším proudem vyrovnat jiným způsobem. Mnoho druhů je proto pozitivně rheotaktických, tzn., pohybují se proti proudu, aby snížily svůj drift. Ovšem i proudobytný vodní hmyz s okřídlenými imágy vykazuje v nymfálních instarech pozitivní rheotaxi. (Elliot 1971; Williams & Williams 1993). Pohyb proti proudu je kromě vodního hmyzu velmi známý například u blešivců (Elliott 1971; Hughes 1970; Minckley 1964; Rawer-Jost et al. 1999; Williams & Williams 1993). Blešivci putují proti proudu sezónně, přes zimu (v době reprodukce) nemigrují (Rawer-Jost 1999; Williams & Williams 1993). Ačkoli obývají i biotopy se silným prouděním, pro migraci preferují oblasti s pomalejším proudem (Hughes 1970; Rawer-Jost et al. 1999). Elliott (1971) ve své studii pozoroval blešivce, kteří migrovali za tmy na povrchu substrátu, a měřil vzdálenost, kterou překonají za 24 hodin. Proti proudu jsou schopni urazit až 14 m, po proudu pak do 10 m. Je tedy zřejmé, že migrace proti proudu může mít větší význam, než jen pouhou kompenzací driftu (Elliott 1971). To velmi zdatně dokazuje *Dikerogammarus villosus*, který je schopen invadovat proti proudu rychlostí 30-40 km za rok (Josens et al. 2005). Naproti tomu v další studii se jen jeden z 6 amerických blešivců (*Gammarus bousfieldi*) pohyboval proti proudu masově, ostatní druhy zdolávaly jen krátké vzdálenosti tak, aby kompenzovaly svou ztrátu způsobenou driftem (Minckley 1964).

Dalším korýšem, u kterého se vyskytuje (ač jen strohý) záznam o pozitivní rheotaxi je *Asellus aquaticus*. Ten, ve studii zabývající se makrobentosem překonávajícím rybí přechody, byl schopen pohybu proti proudu, avšak výlučně vyhledával místa s pomalým proudem (Rawer-Jost 1999).

1.1.2 Pasivní disperze

Jak již bylo napsáno výše, v tekoucích vodách mohou být organismy pasivně přemísťovány proudem. Ačkoli si některé druhy proti driftu vytvořily adaptace, je přesto určité procento organismů proudem pasivně odnášeno. Tito jedinci pak mohou propojovat prostorově oddělené populace (Bilton 2001) a zachovávat mezi nimi genový tok. Proudem se však organismy šíří jen v rámci daného toku. Na nové vodní plochy pak mohou být pasivně přeneseny pomocí různých živočichů (například ptáky, savci i hmyzem) nebo větru (Figuerola & Green 2002b; Maguire 1963; Peck 1975).

Důležitou roli při pasivní disperzi hraje schopnost vytvářet rezistentní dormantní stádia, která jsou velmi častá právě u sladkovodních bezobratlých, jejichž habitaty (na rozdíl od mořských) představují často nestálá prostředí. Tato strategie vznikla v průběhu evoluce nezávisle na sobě napříč různými taxony. Je nezbytná pro organismy, jež obývají přechodné habitaty, jako jsou například periodické tůně (Cáceres 1997). Větrm se tak mohou na krátké vzdálenosti šířit třeba vajíčka žábřonožky *Branchipodopsis wolffi* (Brendonck & Riddoch 1999), či obecně vzato jakákoli jiná malá rezistentní dormantní stádia (Bilton et al. 2001). Větrné proudy však mohou unášet také celé jedince létavého hmyzu, a ti jsou pak šířeny i na velké vzdálenosti (Kelly et al. 2001).

Živočichové, jakožto vektor přenosu, mají v pasivní disperzi významné postavení. Již Darwin (Darwin & Beer 2008) ve svém významném díle uvádí možnost přenosu semen, bezobratlých či jejich vajíček migrujícími ptáky. Předkládá pozorování, kdy sladkovodní měkkýši aktivně přilnuli na nohy vodního ptáka (konkrétně kachny), který jim pak může pomoci šířit se i na velmi velké vzdálenosti. Že za rozšířením některých druhů stojí migrující vodní ptactvo, dokládají i současné studie. Nejlépe dokumentovaným případem je šíření sladkovodních perlooček pomocí přenosu jejich trvalých vajíček (epipií) vodním ptactvem. Významnou roli v postglaciální disperzi tak potenciálně představují ptáci pro přenos mezi jednotlivými habitaty u *Daphnia pulex* na Sibiři (Weider & Hobaek 1997). Známa je dále i souvislost mezi genetickou distribucí severoamerických populací *Daphnia laevis* s hlavními tahy tamních vodních ptáků, kdy populace *Daphnia laevis* jsou si geneticky podobnější na severu a jihu, než západě a východě (Taylor et al. 1998).

Organismy, jež jsou šířeny pomocí živočichů, mají v zásadě dvě možnosti, jakými mohou být transportovány. A to buď uvnitř (enzoochorie) či na povrchu (epizoochorie) zvířete. Zde budou používány výrazy interní a externí transport, jež ve své studii používají Figuerola & Green (2002a). Při interním transportu musejí být zachovány dvě důležité podmínky: nejdříve musí živočich organismus či jeho rezistentní stadium požit, a posléze musí tento organismus či částice projít trávicím traktem bez poškození. Pro externí transport je předurčující, jak dobře přenášená částice či organismus k vektoru svého přenosu přilne a v případě, že nejsou přenášena rezistentní dormantní stádia snášející úplné vyschnutí, jak dlouhou dobu je daný organismus schopen přečkat mimo vodní prostředí (Figuerola & Green 2002a). V následujících případech budou popsány možnosti disperze jednotlivými skupinami živočichů se snahou podrobněji přiblížit varianty relevantní pro druh *Proasellus coxalis*, na kterého je tato práce zaměřena.

Hmyz

Různé druhy vážek, motýli, cikády či včely mohou na svém těle přenášet kromě řas také nálevníky nebo vířníky (Maguire 1963). Dále například draví brouci čeledi Dytiscidae, mohou interním transportem rozšiřovat vajíčka žábřonožky *Branchipus schaefferi* (Beladjal & Mertens 2009).

Vodní ptáci

Bylo dokázáno, že vodní ptáci společně se svou potravou konzumují i mnoho částic, které jen projdou jejich střevem. Kromě semen rostlin mají v potravě zastoupeny např. vajíčka různých druhů perlooček, lupenonožců, škeblůvek či mechůvek (Brochet et al. 2010; Figuerola et al. 2003). Většina částic zůstane po průchodu střevem životaschopná. Vzhledem k frekventovaným denním migracím vodních ptáků je tak potenciál k disperzi těchto druhů, především na lokální úrovni, velmi vysoký (Figuerola et al. 2003). Interní transport se ovšem nemusí týkat pouze druhů, které produkují rezistentní dormantní stádia. Jak prokázali Green & Sánchez (2006), způsob takovéto disperze je možný i u larev vodního hmyzu. Jedná se o druh pakomára *Chironomus salinarius*, jehož larvální stádium dokáže bez poškození přežít ve střevě břehouše černoocasého (*Limosa limosa*). Druh *Chironomus salinarius* získává díky této vlastnosti další významný potenciál disperze (Green & Sánchez 2006).

Externí transport pomocí ptáků je velmi rozšířený například u měkkýšů. Nejranější zmínku o něm publikoval Darwin (Darwin & Beer 2008), jak již bylo zmíněno výše. Měkkýši snadno přilnou na nohu vodního ptáka, kde se dokážou udržet velmi dlouho. Některé duhy, jako např. *Tryonia* navíc díky přítomnosti operkula snadno předejdou vysoušení. Právě u rodu *Tryonia* a také *Planorbarius* byla dokázána jasná spojitost jejich distribuční historie s vodními tažnými ptáky. Jsou ovšem schopny disperze nejen externím, ale v některých případech i interním transportem (Wesselingh et al. 1999). Schopnost přilnout na kachní peří byla dále zaznamenána u perloočky *Cercopagis pengoi* (Makarewicz et al. 2001). Taktéž Segerstråle (1954) ve svém pokusu pozoroval u blešivce *Gammarus lacustris* aktivní „nalézání“ na kachnu. Byl schopen se udržet na peří mimo vodu až dvě hodiny, což byla nejdelší doba v experimentu. Není tedy vyloučeno, že by přečkal i delší časový interval. Navíc na kachnu „nalézal“ velmi ochotně a rychle. Je ovšem zajímavé, že *Gammarus pulex* tuto schopnost (aktivně přilnout na peří) nemá. Zdá se tedy, že zatímco *Gammarus lacustris* může být šířen vodními ptáky, *Gammarus pulex* nikoli. Toto chování bylo jedním z faktorů podmiňujících historické rozšíření obou druhů v Dánsku a Fennoskandinávii během glaciálů. Díky pasivní disperzi se dnes *Gammarus lacustris* vyskytuje i na velmi izolovaných vodních plochách a mimo jiné téměř ve všech pohořích Norska (Segerstråle 1954).

Savci

O několik let později, po pokusu, jež uskutečnil Segerstråle (1954), byl *Gammarus lacustris*, společně s dalším blešivcem druhu *Hyaella azteca*, nalezen v srsti vodních savců - ondatry a bobra (Peck 1975). Další semiaquatický živočich - nutrie říční (*Myocastor coypus*) - představuje také významný potenciál disperze vodních bezobratlých. Její srst umožňuje přenášet kromě rezistentních stádií také živé organismy, mezi které patří různé druhy perlooček, vířníků, larev dvoukřídlých, chvostoskoků či kroužkovců čeledi Naididae (Waterkeyn et al. 2010). Vektorem přenosu ovšem nemusejí být pouze vodní obratlovci. Mnohdy stačí k přilnutí jen krátký kontakt živočicha s vodní plochou. Například cysty tří velkých korýšů třídy Branchiopoda (*Triops*

numidicus, *Branchipus* a *Tanymastigites*) se zachytily na nohách ovcí, které se pohybovaly v mělké části tůně (Thiéry 1997). Taktéž prase divoké (*Sus scrofa*) přenáší ve své srsti mnoho dormantních stádií různých druhů vodních bezobratlých. Vzhledem ke způsobu svého života často vyhledává mokřiny, ve kterých se „válí“ a může tedy představovat velmi významný vektor disperze na lokální úrovni (Vanschoenwinkel et al. 2008), i když někteří jedinci jsou schopni urazit i více jak 250 km (Andrzejewski & Jezierski 1978) a potenciálně tak mohou přenášet organismy i na delší vzdálenosti (Vanschoenwinkel et al. 2008).

Disperze organismů na velké a krátké vzdálenosti (long/short-distance dispersal)

Podle vzdálenosti, na kterou je daný organismus/jeho dormantní stádium schopen se rozšířit/být šířen, můžeme dále rozdělit disperzi také na krátké a dlouhé vzdálenosti. Green & Figuerola (2005) považují za disperzi na dlouhé vzdálenosti situaci, při které se sladkovodní organismy šíří mezi vodními plochami vzdálenými od sebe nejméně 10 km. Vzhledem k zachování životaschopnosti organismů (pokud se nejedná o velmi rezistentní stádium), je jejich transport časově omezen (Figuerola & Green 2002a). Pravděpodobnost přenosu na velké vzdálenosti je proto většinou nízká (nižší než u krátkých vzdáleností) a rozhodující pro úspěšnost takové disperze je především celkový počet přenesených propagulí/organismů (Trakhtenbrot et al. 2005). Jak vyplývá z přehledu mechanismů disperze sladkovodních bezobratlých, v přenosu na velké vzdálenosti hraje klíčovou roli migrující vodní ptactvo (např. Brochet et al. 2010; Green & Figuerola 2005; Taylor et al. 1998; Wesselingh et al. 1999), které je schopné za krátký časový interval urazit poměrně velkou vzdálenost (Clausen et al. 2002). Avšak dalekého transportu jsou, i když v menší míře, schopni také savci, jako nutrie říční (Waterkeyn et al. 2010) či prase divoké (Andrzejewski & Jezierski 1978). Také lidská aktivita velmi ovlivňuje disperzi mnoha organismů (Leppäkoski et al. 2002; Panov et al. 2004), této problematice bude věnována následující kapitola.

Na lokální úrovni se uplatňují všechny výše zmíněné mechanismy disperze. Vanschoenwinkel et al. (2008) navíc považuje za velmi pravděpodobné, že savci mají daleko větší význam při pasivním přenosu sladkovodních organismů na krátké vzdálenosti, než bylo zatím publikováno, jelikož takovýchto studií je stále velmi málo.

1.1.3 Disperze zprostředkovaná člověkem (human-mediated dispersal)

Člověkem zprostředkované disperze (lze použít výraz introdukce) mohou být rozlišeny do dvou hlavních kategorií. A sice jako introdukce záměrné a neúmyslné (Panov et al. 2004).

Záměrné introdukce

Lidské přetváření sladkovodních systémů introdukováním nepůvodních druhů má v Evropě dlouhou historii. Nejranější příkladem jsou již ve středověku prováděné introdukce kapra

obecného (*Cyprinus carpio*) na území Evropy (Copp et al. 2005). V druhé polovině 19. století se ve zvýšené míře začaly v Evropě vysazovat i další druhy ryb, zejména z důvodů zásobování, větší pestrosti potravní nabídky a pro sportovní účely (Gherardi et al. 2009). Zvýšení komerční rybí produkce bylo spjato i potřebou zajištění potravy pro tyto chovy a tedy s dovozem velkého množství korýšů, především různonožců jako *Gammarus pulex*, *G. tigrinus*, *Pontogammarus robustoides* (Jażdżewski 1980). Komerční využití se netýká jen ryb. Například rak bahenní (*Astacus leptodactylus*), do České republiky introdukovan roku 1892, se stal předmětem chovu po zdecimování populací našich původních druhů raků račím morem (viz níže). Ovšem jen do doby, než začal být chráněn zákonem, stejně jako rak říční a kamenáč (Horká 2006). Některé druhy jsou šířeny i pro svůj ozdobný význam prostřednictvím akvarijního a zahradnického obchodu, přičemž z těchto chovů mohou uniknout do volné přírody (Bilton et al. 2001; Gherardi et al. 2009). Například jeleček velkohlavý (*Pimephales promelas*), chovaný často jako okrasná ryba v zahradních nádržích, se nyní vyskytuje a rozmnožuje na území Velké Británie, kde je nepůvodní (Copp et al. 2007). Během 20. století celkový počet nepůvodních druhů v Evropě výrazně stoupl. A to hlavně po roce 1940, kdy byla disperze (všeobecně, tedy nejen záměrné introdukce) nepůvodních druhů podporována větší mobilitou a obchodem v průběhu 2. světové války (Gherardi et al. 2009).

Neúmyslné introdukce (disperze)

V některých případech mohou být ovšem společně s organismem, který je introdukován, neúmyslně šířeny i jiné druhy (Panov et al. 2004) a též parazité či původci nemocí vysazovaných organismů (Gherardi et al. 2009). Jako tomu bylo při introdukci okouna nilského z Viktoriina jezera do jednoho z jezer ve Spojených Státech Amerických, s nímž se do nové lokality rozšířila i perloočka *Daphnia lumholtzi* (Havel & Hebert 1993). Nebo například introdukce amerických raků - raka pruhovaného (*Orconectes limosus*) a raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) - do České republiky (a dalších států) měla za následek zavlečení oomycety *Aphanomyces astaci*, která je původcem račího moru, nemoci smrtelné pro neamerické druhy raků (Filipová et al. 2006a; Filipová et al. 2006b).

Neúmyslné disperze organismů způsobené lidskou aktivitou jsou ale především spjaty se stavbou plavebních kanálů, transportem v balastní vodě (zejména na dlouhé vzdálenosti) a s lodní dopravou všeobecně.

Plavební kanály

Jako výsledek průmyslových a ekonomických aktivit člověka vzniklo v Evropě, zejména v posledních dvou stoletích, četné množství plavebních kanálů (Bij de Vaate et al. 2002). Tyto stavby odstranily přirozené hranice mezi povodími jednotlivých řek, jež se v Evropě ustálily na konci pleistocénu (Herhaus 1977; Nehring 2002). Propojená povodí pak umožnila expanzi mnoha

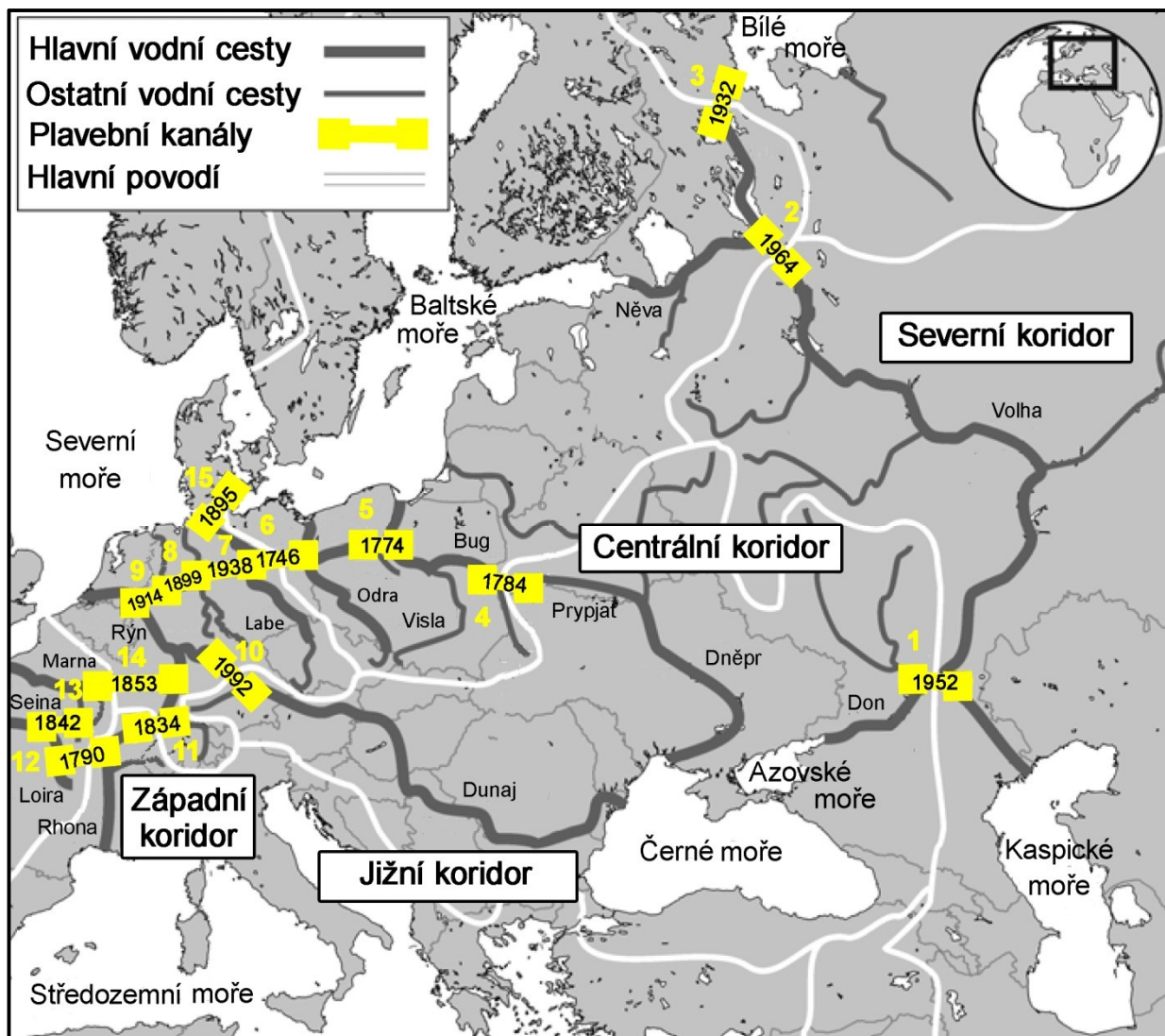
(do té doby biogeograficky odděleným) druhům, ať už díky jejich přirozené disperzi - aktivní pohyb proti proudu, unášení driftem (Jażdżewski 1980; Nehring 2002; Van der Velde et al. 2002), přenos pomocí jiných živočichů, např. ptáků (Nehring 2002) či transportu na lodích (Jażdżewski 1980; Nehring 2002; Reinhold & Tittizer 1997; Van der Velde et al. 2002). Z řek a kanálů vznikla síť více jak 28.000 km dlouhá, spojující 37 evropských zemí (Galil et al. 2007). Tato vodní síť nyní propojuje dříve přirozeně geograficky oddělená povodí moří jižní Evropy (Kaspické, Azovské, Černé, Středozevní) a severních evropských moří (Baltské, Severní a Bílé). Existují v ní čtyři hlavní invazní koridory: severní, centrální, jižní a západní (Panov et al. 2009).

Severní koridor spojuje Černé a Azovské moře s Kaspickým mořem díky Azovsko-Kaspické vodní cestě. Kanál mezi řekami Volha-Don propojuje tato jižní moře přes Volho-Baltský kanál s mořem Baltským a Bílým, zahrnující kanál Bílé-Baltské moře (Galil et al. 2007; Panov et al. 2009).

Centrální koridor zajišťuje spojení Černého moře s Baltským přes Dněpr a kanál Bug-Pripyať. Centrální koridor je pak spojen s Labem a Severním mořem díky kanálům Visla-Odra a Havel-Odra. Propojení Labe s Rýnem je zajištěno přes Středozevní kanál (Mittelland Canal) a kanály Dortmund-Ems a Rýn-Herne (Jażdżewski 1980; Galil et al. 2007).

Jižní koridor vznikl díky propojení Rýnu a Dunaje kanálem Mohan-Dunaj. Z řeky Mohan kvůli postavenému kanálu každoročně odteče velké množství vody. Deficit musí být kompenzován přesunem více jak 100 mil. m³ vody z Dunaje ročně kanálem zpátky do Mohanu. Mnoha organismům z dunajského ekosystému a Pontokaspické oblasti je tak díky tomuto jevu usnadněno šíření přímo do vod západní Evropy (Bij de Vaate et al. 2002; Nehring 2002).

Západní koridor spojuje kanálem Rhôna-Rýn Středozevní moře se Severním a řeky Rhônu a Rýn (Panov et al. 2009). Řada starších splavných kanálů, které sice dnes nemají pro komerční dopravu velký význam, spojují povodí řek a umožňují šíření druhům z mediteránní oblasti až do povodí Severního moře či Atlantského oceánu. Jsou to kanály Canal du Centre, Canal de Briar a kanál Rýn-Marna (Galil et al. 2007). Všechny hlavní kanály včetně dat zprovoznění jsou přehledně znázorněny na obrázku (obr. 1).



Obr. 1. Nejdůležitější evropské vodní cesty a invazní koridory vodních organismů. U každého plavebního kanálu je uvedeno datum zprovoznění. Jednotlivá čísla označují následující kanály:

1. kanál Volha-Don, 2 Volho-Baltský kanál
3. Kanál Bílé moře-Baltské moře
4. Kanál Bug-Prypjat
5. Kanál Visla-Odra
6. Kanál Havel-Odra
7. Středozemní kanál
8. Kanál Dortmund-Ems
9. Kanál Rýn-Herne
10. Kanál Mohan-Dunaj
11. Kanál Rhôna-Rýn
12. Canal du Centre
13. Canal de Briar
14. Kanál Rýn-Marna
15. Kanál Kiel

Podle Galil et al. (2007), upraveno.

Není známo přesné množství, ale odhaduje se, že až 65 druhů se může šířit napříč evropskými vodními cestami (Galil et al. 2007). Je zajímavé, že ačkoli jsou nepůvodní druhy zastoupeny téměř všemi taxonomickými skupinami, je nejvíce invazních druhů reprezentováno hlavně korýši a měkkýši (Devin et al. 2005; Leuven et al. 2009). Značná část invazních druhů má pontokaspický původ a v minulosti se rozšířily severním a centrálním koridorem (Bij de Vaate et al. 2002; Galil et al. 2007). Ovšem otevřením plavebního kanálu Mohan-Dunaj v roce 1992, díky němuž se vytvořil jižní invazní koridor, se pontokaspickým druhům naskytla nová cesta do západní Evropy, která je v současnosti velmi významným donorem těchto organismů (Galil et al. 2007; Tittizer 1997; Van der Velde et al. 2002).

Následující příklady uvádí druhy, které se šíří jednotlivými koridory:

Severní koridor

Velmi invazní druh, který se jako první z pontokaspických druhů rozšířil do Evropy, je slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*). Do vod západní Evropy invadovala právě severním koridorem (Bij de Vaate et al. 2002; Nehring 2002).

Centrální koridor

I tuto cestu využívá ke své expanzi *Dreissena polymorpha* (Bij de Vaate et al. 2002; Olenin & Leppäkoski 1999). Z dalších organismů Pontokaspické oblasti vyskytujících se nyní i v západní Evropě to jsou například vidlonožec *Limnomysis benedeni* či blešivec *Pontogammarus robustoides* (Olenin & Leppäkoski 1999).

Jižní koridor

Jak bylo popsáno výše, jižní koridor představuje v současnosti nejvýznamnější cestu šíření pro pontokaspické druhy (Galil et al. 2007; Tittizer 1997; Van der Velde et al. 2002). Invadují jím například různonožci *Dikerogammarus villosus* (Bernauer & Jansen 2006; Devin et al. 2001) a *Chelicorophium curvispinum* či stejnonožec *Jaera istri* (Bernauer & Jansen 2006).

Západní koridor

Druhy z mediteránní oblasti se šíří západním koridorem. Jsou jimi krevetka *Atyaephyra desmaresti*, různonožec *Echinogammarus berilloni* (Bernauer & Jansen 2006), stejnonožci *Proasellus meridianus* (Tittizer et al. 2000; Wolff 1973) a *Proasellus coxalis* (Tittizer et al. 2000), druh studovaný v této práci.

Balastní voda.

Balastní voda se používá ke stabilizaci nákladních lodí v případě, že nejsou plně naložené (Gollasch et al. 2002). Obvykle je umístěna ve speciálních balastních tancích nebo přímo v prázdném nákladním prostoru lodi (Galil et al. 2007). S touto vodou může být nabráno také

nesčetné množství živých planktonních i bentických organismů a diapausních vajíček bezobratlých živočichů (Duggan et al. 2005; Gray et al. 2007). Vzhledem k podstatě plavebního průmyslu je zřejmé, že lodě musejí nabrat vodu v jednom místě a vypustit ji poté na jiné, geograficky oddělené lokalitě. Balastní voda tak nabízí velký potenciál k transportu nepůvodních druhů na nová území (Gollasch et al. 2002), která mohou být i mnoho tisíc kilometrů vzdálená (Carlton & Geller 1993; Ricciardi & MacIsaac 2000). Dokladem významu balastní vody jakožto prostředku disperze na dlouhé (mezikontinentální) vzdálenosti je invaze druhů z Pontokaspické oblasti do severoamerických Velkých jezer (Ricciardi & MacIsaac 2000). V případě živých organismů k tomu, aby mohly být vypuštěny na nových lokalitách, musejí nejdříve přežít celou dobu transportu v tanku, někdy i týdny trvající (Carlton & Geller 1993). Organismům musejí dále vyhovovat také environmentální podmínky nové lokality jako teplota, salinita, živiny, dostupnost potravních zdrojů či přítomnost dalších konkurentů nebo predátorů (Nehring 2005). Pro eliminaci invazí nepůvodních druhů z balastní vody je tak například v severoamerických Velkých jezerech zavedena regulace, kdy lodě musejí ještě před vplutím na Velká jezera smíchat balastní vodu se slanou mořskou vodou. Toto opatření má zabránit proniknutí striktně sladkovodních organismů, ovšem neúčinkuje na organismy euryhalinní (Ricciardi & MacIsaac 2000).

Skutečností, že balastní voda je primárně právě brakického nebo mořského původu, vysvětluje Nehring (2002) malý význam zaoceánské lodní dopravy pro šíření sladkovodních nepůvodních druhů v rámci západní Evropy. Toto tvrzení v další studii dokumentuje údaji, že v Německu bylo z 98 nepůvodních sladkovodních bezobratlých balastní vodou zavléčeno pouze 15 (Nehring 2005). Balastní vodu používají rovněž i lodě ve vnitrozemské dopravě. Reinhold & Tittizer (1997) se zabývali disperzním potenciálem lodí v plavebním kanále Mohan-Dunaj a výsledek, byť v jiném kontextu, potvrzuje nedůležitost disperze balastní vodou pro sladkovodní organismy. Zatímco v chladících filtrech a na trupu lodi našli mnoho organismů různých taxonů, v balastní vodě byl objeven pouze jediný klanonožec.

Rozšíření *Proasellus coxalis* vlivem lidské aktivity

Vybudování plavebních kanálů mělo zřejmě pozitivní vliv i na disperzi druhu *P. coxalis*. Z původního areálu výskytu, který je v okolí východního pobřeží Středozemního moře, v jižní Itálii, Sicílii a Egejských ostrovech (Gruner 1965), se podle Tittizer et al. (2000) pravděpodobně rozšířil z jižní Francie přes řeku Rhônu, Saônu, Doubs, kanál Rhôna-Rýn - zprovozněn roku 1834 (Galil et al. 2007) - a Rýn do severního Německa a ostatních sousedních zemí. V Německu byl první nález zaznamenán roku 1931 na dolním Rýnu. V 50. letech byl poprvé nalezen u ústí řeky Ems, v 90. letech pak v Labi v okolí Hamburku a také u ústí řeky Wesser (Tittizer et al. 2000). Nyní se pravidelně nachází nejen ve vnitrozemských (Tittizer 2000), ale také v brakických vodách Severního moře (Nehring & Leuchs 2000). Jeho šíření Nehring & Leuchs (2000) připisují jak lodím (na jejich povrchu i v balastní vodě), tak i aktivnímu pohybu. Vždy je ale podle nich disperze tohoto druhu do západní Evropy možná jen díky vybudovaným plavebním kanálům. Dále uvádějí,

že *P. coxalis* je jediným druhem z mediteránní oblasti, který se vyskytuje v brakických vodách estuárů Severního moře.

Vliv nepůvodních druhů na ekosystém

Druhy, které jsou šířeny, ať už záměrně nebo neúmyslně, lidskou činností, mohou mít často minimálně pozorovatelný vliv na původní společenstva (Gherardi et al. 2009). Introdukce některých druhů jsou všeobecně vnímány dokonce jako prospěšné, shrnuto ve studii Ewel et al. (1999). I přesto, že je nepůvodních druhů, které jsou v novém areálu výskytu problematické pro tamní společenstva, poměrně málo, můžou mít katastrofický dopad na životní prostředí, potažmo i lidskou ekonomiku (Gherardi et al. 2009).

Zářným příkladem může být *Dikerogammarus villosus*. Tento blešivec má díky své agresivitě a velké dravosti velmi negativní dopad na původní společenstva makrozoobentosu. Živí se larvami vodního hmyzu, stejnonožci i jinými původními i nepůvodními blešivci (Dick et al. 2002; Tittizer et al. 2000). Ze svých obětí často pozře pouze hlavu či části končetin, aniž by je celé zkonsumoval (Dick et al. 2002). Navíc je schopen velmi rychlé disperze, za rok urazí až 30-40 km (Josens et al. 2005). Jeho migrace vodními cestami se neustále vyvíjí a rychle postupuje na nové lokality (Devin et al. 2001). Ze svého původního areálu výskytu (Pontokaspické oblasti) se po Evropě šíří díky plavebním kanálům, jak bylo popsáno výše. S balastní vodou došlo k zavlečení i do Severní Ameriky (Ricciardi & MacIsaac 2000). Jeho výskyt byl zaznamenán také v České republice (Petrusek 2006).

Dreissena polymorpha je dalším klasickým příkladem druhu, který může mít za jistých okolností velmi negativní dopad jak na původní společenstva, tak i na hospodářství. Stejně, jako *D. villosus*, se tento druh z Pontokaspické oblasti šířil do Evropy díky kanálům (viz výše) a do Severní Ameriky s balastní vodou (Ricciardi & MacIsaac 2000). Právě americké populace způsobují hospodářské problémy, jako například ucpávání potrubí (Nalepa 1994). *D. polymorpha* může redukcí abundance zooplanktonu ovlivňovat i strukturální změny ve společenstvu. Dále může být příčinou dramatického snižování početnosti ostatních mlžů, kterým filtrováním ubírá potravu (Karatayev et al. 1997). Již více než 100 let se tento druh vyskytuje i v České republice. U nás zatím nezpůsobuje žádné hospodářské problémy, pouze v případě vyšší hustoty lze předpokládat vliv na naše vodní měkkýše (Beran 2006).

V případě *P. coxalis* nebyl pozorován žádný negativní vliv na ekosystém. Naopak, v koexistenci s naším běžným druhem *Asellus aquaticus* se většinou vyskytuje v menších početnostech (Horecký et al. 2006; Horecký & Špaček 2007), ačkoli byl v laboratorní studii kompetičním vítězem nad *A. aquaticus* (Constantini & Rossi 1998), viz níže.

1.2 Poznámky k taxonomii a biologii druhu *Proasellus coxalis*

1.2.1 Taxonomie *P. coxalis*

Na území České republiky se z vodních bezobratlých řádu Isopoda nacházejí pouze dva druhy. Na rozdíl od berušky *Asellus aquaticus*, běžně se v našich vodách vyskytující, má druh *P. coxalis* z důvodu své velké variability poměrně složité taxonomické členění. Jeho zařazení do systému bezobratlých živočichů je podle Martin & Davis (2001) následující:

Podkmen: Crustacea

Třída: Malacostraca

Řád: Isopoda

Podřád: Asellota

Čeleď: Asellidae

Druh: *Proasellus coxalis* Dollfus, 1892

P. coxalis je považován za polytypický druh. Vyznačuje se velkou morfologickou variabilitou. Taxonomické studie, založené především na těchto morfologických odlišnostech, popsaly až 23 víceméně geograficky oddělených poddruhů (Herhaus 1977). Další revize různých autorů však odhalily nedůslednost při taxonomickém zařazení. Několik poddruhů se neprávem řadilo do skupiny *P. coxalis* a nyní jsou považovány jako samostatný druh, jiné představují naopak pouze ekotypy *P. coxalis*, některé byly nově popsány (Argano & Campanaro 2004; Stoch 1989; Stoch et al. 1996).

Ketmaier et al. (2001) se zabýval touto skupinou v Itálii, Sardinii a Jordánsku. Poukazuje na překvapivě vysokou genetickou rozdílnost jednotlivých populací a podporuje hypotézu, že pod jménem *P. coxalis* je ve skutečnosti ukryto několik geneticky rozdílných druhů. Ke stejnému závěru dospěl i ve své další studii (Ketmaier 2002). Ketmaier et al. (2001) dále vytýká současné taxonomii celého rodu *Proasellus*, že nereflektuje jeho fylogenezi a plánuje další genetická srovnání v širší geografické škále. Ta již částečně proběhla. Její první výsledky byly zatím jen prezentovány (data nebyla publikována) a naznačují dávnou divergenci některých populací z Itálie a Sardinie (Campanaro et al. 2004).

Je důležité také poznamenat, že Stoch (1989) zpochybňuje přítomnost *P. coxalis* v Evropě a tyto populace označuje jako *P. banyulensis*. Stejný autor v další publikaci pak se svými kolegy podotýká, že *P. banyulensis* je v Evropě široce rozšířen a pravděpodobně je zde autochonní, ikdyž je mnohými autory považován za nepůvodní ve střední Evropě (Gerecke et al. 2005). Navíc upozorňují, že ačkoli byl tento druh dlouho označován jako *P. coxalis*, byl již definován jako samostatný druh *P. banyulensis* (Gerecke et al. 2005; Stoch 1989). Názory ovšem nejsou

podloženy žádnou fylogeografickou studií. S ohledem na nedostatek spolehlivých určovacích znaků se nyní druh *P. coxalis* konzervativně uvádí jako komplex (morfologicky velmi podobných) druhů *P. coxalis* (*P. coxalis* – group, nebo též *P. coxalis* s.l.) a tradičně se vymezuje mimo jiné především tvarem endopoditů na 2. páru samčích pleopodů (Argano & Campanaro 2004; Stoch et al. 1996).

1.2.2 Biologie a ekologie *P. coxalis*, jeho srovnání s *A. aquaticus*

P. coxalis obývá vody stojaté i tekoucí, tam ale vyhledává habitaty s klidnějším proudem, vyskytuje se také ve vodách brakických. Živí se rostlinnou hmotou a detritem, potravní strategií je drtič, sběrač (Gruner 1965, Nehring 2006). Biologie a ekologie *P. coxalis* je velmi podobná našemu běžnému druhu *A. aquaticus*, jenž je podrobně popsán např. v Lellák et al. (1972). Bude tedy věnována pozornost především těm vlastnostem, kterými se oba druhy liší.

P. coxalis je, stejně jako *A. aquaticus*, bivoltinní, s hlavními populačními maximy na jaře a na podzim (Flössner 1987; Pešková 2008; Uvíra 1985). V jejich životní strategii však existují určité rozdíly. Sezónní reprodukční periody nejsou u *P. coxalis* striktně vymezeny, mohou se měnit v závislosti na průměrných teplotách daného roku, pravidelně se ale objevuje prodloužení podzimní periody do poloviny listopadu. (Na rozdíl od *A. aquaticus*, jehož reprodukce trvá striktně od března do října.) Vyskytuje se i malá tendence k reprodukci v průběhu zimy. Umístění, délka a intenzita reprodukce jsou plastičtější a daleko více ovlivněny teplotou než u *A. aquaticus*. *P. coxalis* se začíná pářit při menších velikostech, což zvyšuje plodnost zejména u jedinců, kteří se nacházejí na rozhraní jednotlivých velikostních tříd (Flössner 1987). Ještě před samotným pářením tvoří, stejně jako *A. aquaticus*, pre-kopulační páry, a k samotnému páření dochází v momentě svlékání samičky, kdy jsou odkryty její pohlavní otvory (Lellák et al. 1972). Na druhou stranu, páření *A. aquaticus* ve vyšších velikostních třídách je kompenzováno větší plodností, jelikož počet vajíček v marsupiu koreluje s délkou těla. Tyto uvedené rozdíly v životní strategii mohou být dány především odlišným geografickým původem obou druhů (Flössner 1987).

Při vzájemné koexistenci obou druhů dorůstá *A. aquaticus* menších rozměrů a celkově dosahuje menších početností. *P. coxalis* má ale především díky schopnosti lepšího využití potravních zdrojů různého původu a též schopnosti růst nezávisle na přítomnosti jiného druhu lepší kompetiční vlastnosti. Často tedy na konkrétních lokalitách vítězí a je také a lepším potenciálním kolonizátorem (Constantini & Rossi 1998). Ovšem nutno poznamenat, že studie (Constantini & Rossi 1998) byla prováděna za laboratorních podmínek. Ve vzorcích z České republiky představuje *P. coxalis* jen zřídka dominantní taxon a většinou se vyskytuje v menších početnostech (Flasarová 1975; Horecký & Špaček 2007; vlastní pozorování). Též zmiňovaná studie, kterou provedl Flössner (1987) a jež byla lokalizovaná do podnebných podmínek srovnatelných s Českou republikou, dokládá, že abundance obou druhů se mezi jednotlivými lety střídaly. Když byla průměrná roční teplota vyšší, byl početnější *P. coxalis*, zatímco v letech s nižšími teplotami se více dařilo druhu *A. aquaticus*.

1.2.3 Morfologie *P. coxalis*

Samci *P. coxalis* obecně dosahují délky těla do 10 mm, samice okolo 6,6 mm. Ve srovnání s naším běžným druhem *A. aquaticus* (jehož samci běžně měří 12 mm a samice 8 mm, ale mohou mít délku až 20 mm - samci a až 15 mm - samice), nabývá *P. coxalis* tedy menších délek těla (Gruner 1965). A to i v případě menších rozměrů *A. aquaticus* daných kompetičním stresem (Constantini & Rossi 1998). Kromě délky těla odlišují oba druhy morfologické rozdíly, které mají determinační funkci. Vzhledem k chybějícímu popisu *P. coxalis* v u nás běžně dostupných klíčích, jsou zde uvedeny následující determinační znaky, čerpáno z: Flasarová (1975), Horecký & Špaček (2007), Gruner (1965).

Kresba

Kresba na temeni hlavy je velmi rychlým a celkem spolehlivým určovacím znakem, je „slitá“ a trojúhelníkovitého tvaru (obr. 2). Zatímco *A. aquaticus* má dvě „brýlovitě“ oddělené skvrny (obr. 3).



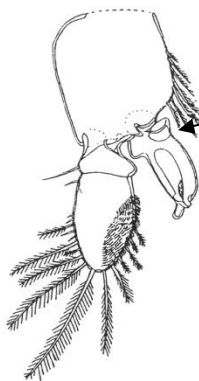
Obr. 2. *P. coxalis*, kresba na temeni hlavy. Foto: autorka práce.



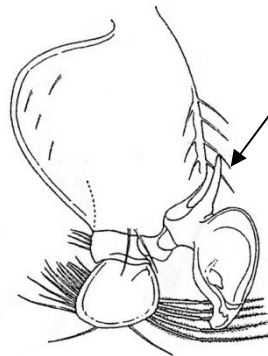
Obr. 3. *A. aquaticus*, kresba na temeni hlavy. Foto: autorka práce.

2. pleopod samců

Endopodit 2. páru pleopodů samců tvoří na vnitřní straně „bambulkovitý“ výstupek (obr. 4), *A. aquaticus* má tento výstupek šavlovitého tvaru (obr. 5).



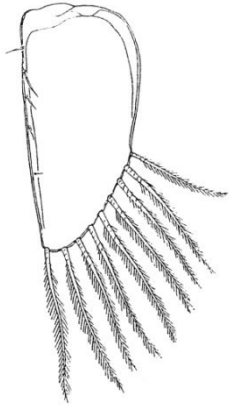
Obr. 4. *P. coxalis*, „bambulkovitý“ výstupek na vnitřní straně endopoditu 2. samčího pleopodu. Podle Gruner (1965), upraveno.



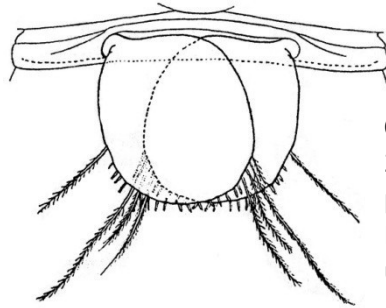
Obr. 5. *A. aquaticus*, šavlovitý výstupek na vnitřní straně endopoditu 2. samčího pleopodu. Podle Gruner (1965), upraveno.

2. pleopod samic

2. pár pleopodů samic je dvakrát delší než široký (obr. 6), zatímco u *A. aquaticus* má kruhovitý tvar (obr. 7)



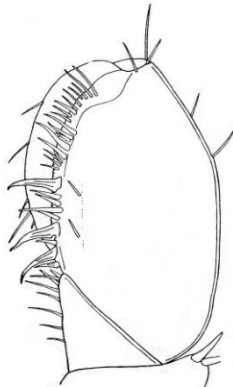
Obr. 6. *P. coxalis*,
2. samičí pleopod.
Podle Gruner (1965),
upraveno.



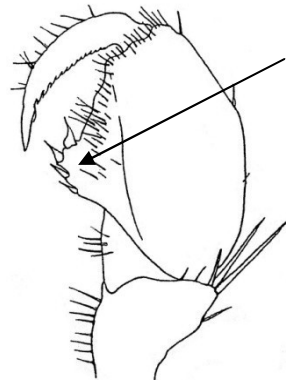
Obr. 7. *A. aquaticus*,
2. pár samičích
pleopodů.
Podle Gruner (1965),
upraveno.

1. pereopod samců

1. pereopod samců má distální konec oválný, jasně zahnutého tvaru (obr. 8), u *A. aquaticus* je přítomen trojhranný výběžek (obr. 9).



Obr. 8. *P. coxalis*,
1. samčí pereopod.
Podle Flasarové
(1975), upraveno.



Obr. 9. *A. aquaticus*,
trojhranný výběžek
1. samčího pereopodu.
Podle Gruner (1965),
upraveno.

1.3 Datované výskyty *P. coxalis* v Evropě a v České republice

P. coxalis je běžným a široce rozšířeným druhem oblasti Středozemního moře. V literatuře je často citováno rozšíření, jež uvádí Gruner (1965): vyskytuje se v jižní Itálii, Sicílii a Egejských ostrovech, odkud se rozšířil do severní Afriky, Sýrie, Palestiny, Řecka, Chorvatska, Slovinska, severní Itálie, jižní Francie, Španělska a Portugalska. Zatím však nebylo podloženo fylogeografickou studií.

V severní **Francii** byl zaznamenán roku 1930 (Devin et al. 2005).

V roce 1931 byly první výskyty evidovány také v **Německu** v dolním Porýní (Tittizer et al. 2000). Dále v roce 1956 z povodí řek Maas a Saale, kde se nejdříve rozlišovaly dva poddruhy: *P. coxalis peregrinus* Herbst, 1956 a *P. coxalis septentrionalis* Herbst, 1956. Později byly na základě podrobnější morfologické studie sloučeny tyto středoevropské formy do poddruhu *P. coxalis septentrionalis* (Herhaus 1977). V 80. letech přibýlo pak nálezů z povodí řek Rýn, Weser a Labe, v 90. letech poprvé spatřen v okolí Hamburku (Tittizer et al. 2000).

V 70. letech byl objeven také na jihu **Švédska**, další nálezy pocházejí z let 1999 a 2000 (Lundin 2003).

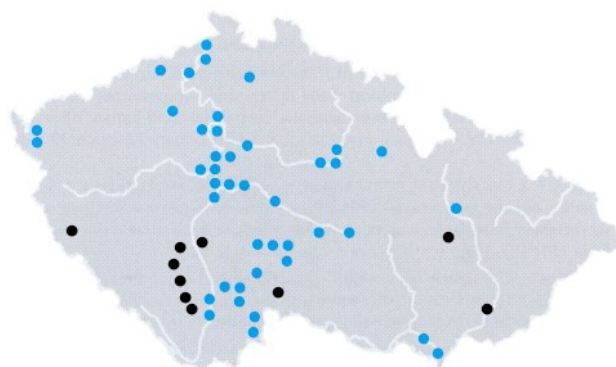
Ve **Švýcarsku** byl poprvé zaznamenán v roce 1974 na horním toku Rýna (Heuss 1976).

Výskyt *P. coxalis* v České republice

Na území České republiky byl *P. coxalis* poprvé zaznamenán již roku 1947 v jižních Čechách v Horusicích u Veselí nad Lužnicí, na Moravě roku 1956 v Podskalském potoce na okrese Olomouc. Ve středních Čechách jsou objevy datovány z roku 1951 z přehrady Slapy u Cholína. V severních Čechách byl pak nalezen roku 1974 v louži u řeky Ploučnice u Novin pod Ralskem. Všechny tyto nálezy jako poddruh *P. coxalis septentrionalis* determinovala a posléze publikovala Flasarová (1975).

V roce 1994 byl poprvé zjištěn i v Labi (Flasarová 1996). Další záznamy, tentokrát z Pálavy, dokládají Kubíček & Opravilová (1999).

Po roce 2000 jsou evidovány nálezy téměř z celého území České republiky, jejich lokalizaci publikovali Horecký et al. (2006). Aktuální data o výskytu jsou také shromážděna na portále ČHMÚ (ČHMÚ - Výběr profilů jakosti povrchových vod, taxon: *Proasellus coxalis*). Obrázek 10 přibližně ilustruje současný výskyt *P. coxalis* a vznikl začleněním těchto dat do výše zmíněné mapy. Horecký et al. (2006) ale poznamenávají, že rozšíření *P. coxalis* je pravděpodobně výrazně větší, než se uvádí, a vzhledem k malému povědomí o tomto druhu nejspíše docházelo k jeho záměně s běžným druhem *A. aquaticus*.



Obr. 10. Mapa znázorňující současný výskyt druhu *P. coxalis* na území České republiky. Černé body jsou nálezy evidované na portále ČHMÚ (viz text). Podle Horeckého et al. 2006, upraveno.

Ačkoli byly populace na území České republiky determinovány jako *P. coxalis septentrionalis*, vzhledem k výše popsaným taxonomickým nejasnostem, bude dále používáno pouze druhové zařazení *P. coxalis* s.l.

2. CÍLE PRÁCE

V úvodu byla probírána schopnost disperze sladkovodních bezobratlých organismů. Významná část této kapitoly byla věnována vlivu lidské činnosti, která v mnoha ohledech vede k šíření nepůvodních druhů organismů na nová území. V České republice se vyskytuje mnoho nepůvodních druhů sladkovodních živočichů. Patří mezi ně i *Proasellus coxalis* s.l., druh s původním areálem výskytu v mediteránní oblasti. Šíření do střední Evropy se přikládá lodní dopravě skrze plavební kanály (Tittizer et al. 2000). Jeho první nález v České republice je však datován v daleko dřívější době, než byl evidován na území Německa. Proto se Horecký & Špaček (2007) domnívají, že spíše než lodní dopravou mohl být do České republiky zavlečen společně s dovozem ryb či vodního ptactva z mediteránní oblasti, nebo se rozšířil přirozeně pomocí tažného vodního ptactva.

Na základě porovnání genetických dat populací z území České republiky a dalších zemí, především států jižní Evropy, jsou cíly této práce:

- určit, zdali se *P. coxalis* šíří z mediteránní oblasti díky lodní dopravě;
- nebo byl na naše území zavlečen jiným způsobem (například s dovozem vodního ptactva), či je přirozeně šířen pomocí tažného vodního ptactva;
- prozkoumat fylogeografické vztahy populací *P. coxalis* s.l. na území České republiky.

V práci vzniklé na Katedře ekologie zaměřené na fylogeografii *A. aquaticus*, bylo mimo jiné zjištěno, že při porovnání populací z lotických a lentických habitatů mezi nimi neexistuje genetická variabilita, která by byla vázána k typu habitatu. Tento výsledek vedl k závěru, že mezi populacemi z tůní a toků musí být propojení a berušky vodní tedy musejí být nějakým způsobem schopny překonat souš oddělující jednotlivé vodní plochy (Střížek 2012). Jelikož se *P. coxalis* vyskytuje ve stejných habitatech jako *A. aquaticus* a ekologií si jsou druhy velmi podobné, předpokládá se, že se budou šířit podobnými mechanismy. Z výše zmíněných důvodů je součástí této práce i pokus s migrační tůní, který je ovšem jen okrajový a má pouze informativní charakter. Jeho cílem je:

- zjistit, zdali jsou berušky v důsledku stresových faktorů (vysychání habitatu) schopny samy aktivním pohybem překonat (na krátkou vzdálenost) suchozemskou bariéru mezi vodními plochami.

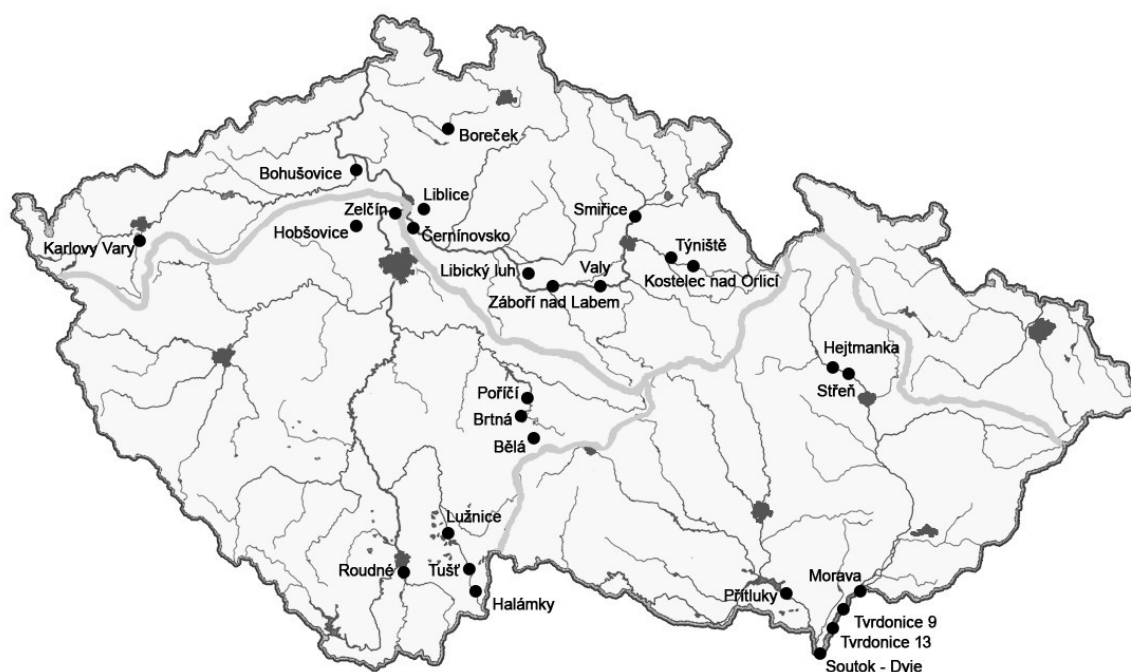
3. METODIKA

3.1 Sběr dat

Vzorky populací *P. coxalis* byly odebírány v průběhu let 2008 až 2013. Odebraní jedinci byli přímo v terénu umísťováni do čistého 96 % etanolu. V laboratoři pak následovala determinace a přebírání od *A. aquaticus*, jelikož se tyto druhy vyskytují často společně a u některých, především menších jedinců, není kresba na hlavě pouhým okem jasně rozpoznatelná. Vzorky byly odebírány autorkou této práce, dalšími studenty i pracovníky Katedry ekologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a také pracovníky státních podniků Povodí Labe a Povodí Vltavy, jejich jména jsou uvedena v tabulce umístěné v přílohách. Část vzorků ovšem vznikla pečlivou determinací dříve nasbíraných vzorků populací *A. aquaticus*, jež byly určeny pro práci obhájenou minulý rok (Střížek 2012) a mezi kterými byli nacházeni i jedinci *P. coxalis*.

Vzorky všech populací byly následně použity k dalším analýzám. Vzhledem ke vzácnějšímu výskytu *P. coxalis* se ne vždy podařilo (a to i přes značné lovné úsilí) odebrat více jak deset jedinců. Aby došlo k co největšímu pokrytí území České republiky, musely být do analýz zařazeny i populace, které čítaly třeba jen jediného jedince.

Lokality, z nichž pocházely vzorky populací, byly rozděleny do skupin podle povodí našich velkých řek. Mapa (obr. 11) znázorňuje umístění všech zkoumaných lokalit a vymezuje hranice povodí.



Obr. 11. Mapa znázorňující přibližné umístění lokalit. Světle šedé linie naznačují hranice povodí.

3.2 Izolace DNA, purifikace a sekvenace

Z nasbíraných vzorků byla izolována DNA. Izolace probíhala v laboratoři Katedry ekologie a byla prováděna pomocí komerčně prodávaného kitu DNeasy Blood & Tissue Kit od firmy QIAGEN®. DNA byla izolována minimálně z jednoho jedince každé populace, preferován byl větší počet (2 -3 jedinci). Počty izolací byly však primárně ovlivněny počtem nasbíraných jedinců. Napříč povodími byly zvoleny populace, kde byla provedena izolace DNA u 5 jedinců pro zjištění vnitropopulační genetické variability. Koncentrace DNA byla u každého izolátu měřena pomocí přístroje Nanodrop®. Podle naměřených hodnot byla posléze izolovaná DNA ředěna H₂O pro PCR (polymerace chain reaction) tak, aby její koncentrace, vstupující do reakce PCR, byla v rozmezí 20 – 40 µl. Izoláty byly uchovávány v lednici v označených mikrozkuvkách. Prostředí mrazničky o teplotě -18°C bylo využito k dlouhodobějšímu skladování.

U všech jedinců byl analyzován mitochondriální gen kódující cytochrom *c* oxidázu podjednotku I (COI). Rychlost akumulace mutací u tohoto genu je vhodná pro jeho široké využití, od taxonomických studií po fylogeografické práce (Morvan et al. 2013; Trontelj et al. 2005; Verovnik et al. 2005) Použití genu pro COI bylo voleno také z důvodu možného srovnání se studii našeho běžného druhu *A. aquaticus*. Jeho fylogeografie byla náplní práce Antonína Střížka (Katedra ekologie, 2012). Navíc tento gen použili své studii také Morvan et al. (2013), jejichž data jsou neopominutelnou součástí této práce (viz níže). Pro další srovnání byl u vybraných jedinců napříč povodími zvolen mitochondriální gen 28S, opět používaný v publikaci Morvan et al. (2013).

Amplifikace genů proběhla pomocí reakce PCR (polymerace chain reaction) (Mullis et al. 1986). V reakci byly použity 2µl izolované DNA a 23µl PCR mixu, který měl složení: 15µl H₂O, 1µl MgCl₂, 3µl PCR buffer bez MgCl₂, 3µl dNTPs, 0,8µl primer A, 0,8µl primer B, 1µl *Taq* DNA polymeráza 1U.

Sekvence primerů genu COI (Folmer et al. 1994) jsou následující:

5'- GGTCACAAATCATAAAGATATTGG

3'- TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA

Sekvence primerů genu 28S (Morvan et al. 2013; Verovnik et al. 2005):

5'- CAAGTACCGTGAGGGAAAGTT

3'- AGGGAAACTTCGGAGGGAACC

V PCR byly používány následující cykly:

Pro gen COI nejdříve: 1x (3 min – 94°C), 5x (1 min – 94°C, 1 min – 45°C, 1 min – 72°C) 35x (1 min – 94°C, 1 min – 50°C, 1 min – 72°C), 1x (6 min 72°C). Posléze byly pro geny COI a 28S používány cykly podle Morvan et al. (2013): 1x (2 min – 94°C), 40x (COI) nebo 35x (28S) (30s – 94°C, 30s – 48°C (COI) / 62°C (28S), 30s – 72°C), 1x (10 min – 72°C).

Několik μl každého PCR produktu bylo následně použito v gelové elektroforéze, pro vizualizaci výsledku PCR. U některých vzorků bohužel při amplifikaci genu pro COI opakovaně vycházelo více PCR produktů různé délky. U těchto vzorků byl produkt požadované délky vyříznut z elektroforézového gelu a extrahován kitem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®), výtěžek (naředěn v různých poměrech H_2O pro PCR) byl znovu amplifikován.

Purifikace dobrých PCR produktů byla prováděna nejdříve pomocí kitu MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN®), posléze byla kvůli větší výtěžnosti použita metoda etanolové precipitace, která je popsána v protokolu umístěném v přílohách.

U takto přečištěných PCR produktů byla posléze měřena koncentrace DNA na přístroji Nanodrop®. Podle výsledku byly pak produkty smíchány s určitým množstvím H_2O a primerem a předány k sekvenační analýze prováděné Laboratoří sekvenace DNA (servisní pracoviště Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze). Kvůli špatným začátkům bylo nutné některé sekvence osekvenovat i z druhé strany.

3.3 **Fylogenetické zpracování sekvencí**

Sekvence byly nejdříve prohlíženy v programu Chromas Lite 2.1 (Technelysium Pty Ltd 2012). Z analýz byly úplně vyřazeny nesmyslné a vadné sekvence. V některých případech bylo nutné sekvence ručně editovat, což probíhalo pomocí programu BioEdit Sequence Alignment Editor ver. 7.1.7 (Hall 1999). Následně byl vytvořen alignment a sekvence byly upravené na stejný počet nukleotidů. Sekvence byly dále přejmenovány podle lokalit a každé sekvenci byl přiřazen unikátní název, vše probíhalo ve výše zmíněném programu BioEdit.

Haplotypové sítě nabízejí přehlednou vizualizaci vnitrodruhových vztahů a výsledné zobrazení může být přesnější než u klasických fylogenetických stromů s dichotomickým větvením. Proto byly pro znázornění vztahů jednotlivých haplotypů genu pro COI zvoleny právě haplotypové sítě a k doplnění geografických poměrů přidány schematické mapy. Pro výpočet sítí byl použit program Network ver. 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd, UK). Sítě byly vypočítány metodou Median-joining MJ, parametr ϵ byl u všech výpočtů sítí roven 0 (Bandelt et al. 1999). Pro následné zobrazení a editaci pak sloužil program Network Publisher ver. 2.0.0.1 (Fluxus Technology Ltd, UK). Další úpravy a zpracování sítí a map probíhaly v programu Adobe® Photoshop® CS2 ver. 9.0.

Pro znázornění vztahů populací na základě genu 28S byl použit fylogenetický strom. Strom byl konstruován v programu Mega 5.2 (Tamura et al. 2011) metodou Neighbor-Joining. Jako outgroup byl zvolen druh *Proasellus meridianus* (získání dat viz níže). Následně byl strom graficky upraven v programu Adobe® Photoshop® CS2 ver. 9.0.

Střední genetické vzdálenosti uvnitř a mezi skupinami haplotypů a povodími byly vypočítány v programu Mega 5.2 (Tamura et al. 2011), pomocí Kimura dvouparametrového testu (Kimura 1980.)

Odhady stáří divergence byly stanoveny na základě rychlosti divergence genu pro COI, kterou Ketmaier et al. (2003) odvodil pro rod *Stenasellus* podle historických dat oddělování ostrovů Sardinie a Korsiky. Hodnota byla stanovena na 0,0125 substitucí jednoho nukleotidu za milión let. Tento odhad byl v předkládané práci použit hned z několika důvodů. Rod *Stenasellus* je příbuzný a relativně podobný studovanému druhu *P. coxalis*, patří do stejné nadčeledi (Aselloidea). Tento odhad stáří divergence byl použit i ve fylogeografických studiích druhu *A. aquaticus* (Střížek 2012, Verovnik et al. 2005). V neposlední řadě o vhodnosti využití této hodnoty svědčí i fakt, že je využívána v právě probíhající fylogenetické studii, zabývající se přímo rodem *Proasellus* (Campanaro et al. 2004).

3.4 Doplnující data

Pro dosažení cílů práce bylo nutné začlenit do analýz vzorky také z evropských populací, využity byly populace druhu *P. coxalis* z práce Morvan et al. (2013). Všechny sekvence z této publikace jsou volně dostupné z portálu: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Dále pak byly využity sekvence, které byly součástí fylogeografické studie prováděné na druhu *A. aquaticus*, kde *P. coxalis* sloužil jako outgroup (Verovnik et al. 2005). Všechny tyto sekvence genu pro COI i 28S byly staženy z Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Z publikace Morvan et al. (2013) byla použita i sekvence druhu *P. meridianus*, který sloužil jako outgroup při konstrukci fylogenetického stromu genu 28S. Součástí informací zveřejněných k sekvencím použitých ve studii Morvan et al (2013) byly též souřadnice GPS jednotlivých populací *P. coxalis*. Tyto souřadnice byly posléze využity k jejich vizualizaci na mapě Evropy. Všechny stažené sekvence jsou uvedeny v tabulce v přílohách.

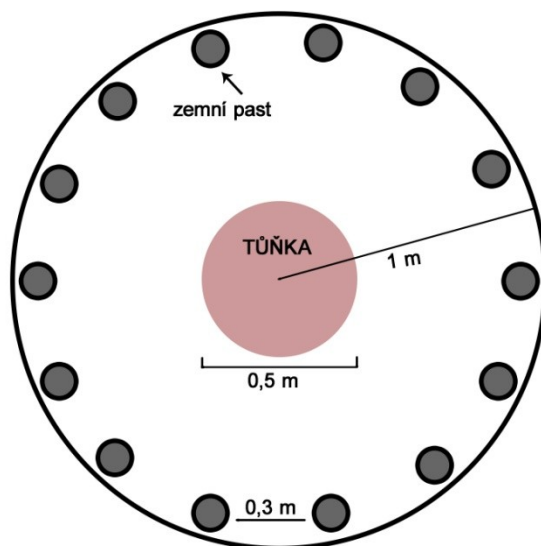
3.5 Migrační tůňka

Cílem pokusu s migrační tůňkou je zjistit, zdali jsou berušky schopny samy aktivním pohybem překonat (na krátkou vzdálenost) suchozemskou bariéru mezi vodními plochami v případě, že dochází k vysychání jejich habitatu. Z ryze praktických důvodů byl k experimentu použit druh *A. aquaticus*, který je velmi hojný a proto není obtížné nalovit i větší počet jedinců. Použití druhu *P. coxalis* by kvůli jeho menším početnostem a vzácnějšímu výskytu působilo značné komplikace.

Byl vytyčen kruh o poloměru 1 m. Po celém jeho obvodu byl umístěn pruh fólie, asi 15 cm široký, tak, že zasahoval 2-3 cm pod zem a zbytek tvořil nad zemí hranici, která měla zabránit případným migrujícím beruškám opuštění pokusného prostoru. Uprostřed takto ohraničeného kruhu byla vytvořena tůňka o průměru 0,5 m, hluboká přibližně 10 cm. Její dno sestávalo z pevné dvojité fólie (pro zajištění nepropustnosti) černé barvy (pro snazší vysychání tůňky). Profil tůně měl postupně se svažující břehové partie, aby co nejvíce simuloval přírodní podmínky. Po celém obvodu pokusného kruhu byly ve vzdálenosti 30 cm umístěny zemní pasti - plastové nádoby

(kelímky) o objemu 0,5 l, které byly naplněny malým množstvím vody a lihu, aby byly případné migrující berušky v zemní pasti fixované, bez možnosti úniku. Vzhled pokusného kruhu s tůňkou ilustruje schematický obrázek (obr. 12). Substrát dna tůňky tvořilo opadané listí, nasbírané podél vodního toku. K zajištění ustáleného chemického prostředí bylo 12 dnů před pokusem namočeno ve vodě z místního potoka, ze kterého byly posléze berušky odebírány.

Experiment probíhal po dobu 14 dní s jedním opakováním. Po celou dobu jeho trvání byla hladina v tůňce upravována tak, aby byla tůňka na jeho konci vyschlá. Na začátku pokusu bylo do tůňky vloženo 100 jedinců druhu *A aquaticus*. Dvakrát denně byl kontrolován obsah zemní pastí pro potenciální přítomnost berušky vodní, jednou denně pak sondou Hanna HI 98130 - pH/EC metr combo měřeny fyzikálně-chemické parametry vody v tůňce (pH, teplota, konduktivita) a pomocí pravítka byla odečítána výška hladiny. Všechny zjištěné parametry byly zaznamenány do tabulky. Na konci experimentu byla opatrně vyjmuta fólie tvořící dno tůňky. Jedinci, kteří v tůňce zůstali, byli pečlivě vybráni a spočítáni. Pro další opakování pokusu byly naloveny nové berušky vodní.



Obr. 12. Schéma umístění tůňky a zemních pastí.

Pokus s migrační tůňkou je pro tuto práci pouze okrajový a jeho výsledek má informativní charakter. Proto byla zjištěná data jen zapsána do tabulky a byl vytvořen jednoduchý graf znázorňující poměry jedinců, kteří v tůňce zůstali, kteří případně migrovali a byli zachyceni v zemních pastích a těch, kteří nebyli nalezeni ani v tůňce, ani v pastích.

4. VÝSLEDKY

Do fylogeografických analýz bylo celkem zahrnuto 96 sekvencí genu pro COI jedinců druhu *Proasellus coxalis* z 27 lokalit ležících na území České republiky (obr. 11). Bohužel, i přes veškerou snahu, některé sekvence měly opakovaně nečitelné začátky, u některých nepomohla ani zpáteční sekvenace. Jelikož takovýchto sekvencí nebylo zanedbatelné množství a nemohly být úplně vyřazeny, bylo nutné zkrátit všechny sekvence vstupující do analýz na 580 nukleotidů. Podstatnou součástí této práce jsou i sekvence ze studie Morvan et al. (2013), jak již bylo uvedeno v metodice. Některé z nich byly ještě kratší (v důsledku používání vnitřních primerů) a tak do analýz, kterých byly součástí, vstupovalo jen 484 nukleotidů. V sekvenci genu pro COI o celkové délce 484 nukleotidů bylo celkem 163 variabilních pozic, z toho 138 bylo parsimonně informativních. Průměrné zastoupení jednotlivých bazí bylo následující: T -34,4%, C - 23,5%, A - 24,5%, G - 17,6%.

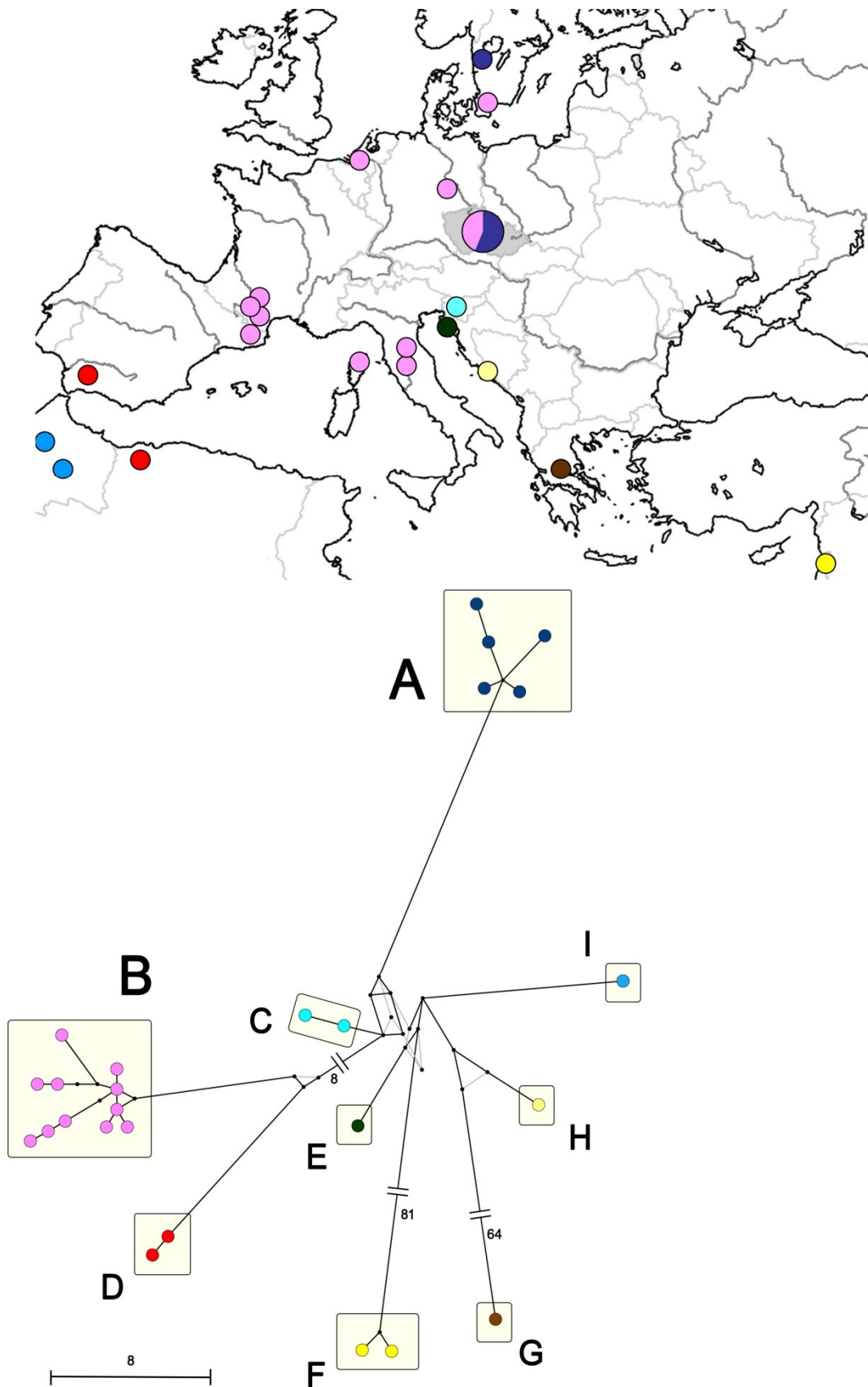
Dále bylo analyzováno 18 sekvencí genu 28S celkové délky 748 nukleotidů, které musely být zkráceny na 680 nukleotidů opět z důvodu použití kratších sekvencí z publikace Morvan et al. (2013). V sekvenci genu 28S, dlouhé 680 nukleotidů, nebylo celkem 11 variabilních pozic, 8 bylo parsimonně informativních. Zastoupení jednotlivých bazí bylo následující: T - 19,6 %, C - 28,3 %, A - 19,5 %, G - 32,6 %.

4.1 Haplotypové sítě

Haplotypové sítě, doplněné schematickými mapami, tvoří hlavní výstupy této práce. Jsou na nich přehledně zobrazeny fylogeografické a fylogenetické vztahy populací *Proasellus coxalis* nejen z území České republiky, ale také z mediteránní oblasti a střední a severní Evropy (získání těchto dat bylo uvedeno v metodice). Všechny sítě byly vypočítány v programu Network a Network Publishers (Fluxus Technology Ltd, UK) s parametrem $\epsilon = 0$ (Bandelt et al. 1999).

Na obrázku 13 ilustruje haplotypová síť, doplněná slepou mapou Evropy, vztahy evropských a severoafrických populací. Síť byla zkonstruována na základě všech 96 sekvencí genu pro COI z této práce, 37 sekvencí genu pro COI ze studie Morvan et al. (2013) a 2 sekvencí genu pro COI z publikace Verovnik et al. (2005). Všechny sekvence použité k výpočtu sítě byly zkráceny na celkovou délku 484 nukleotidů. Haplotypy mají stejnou velikost koleček, v síti tedy není zohledněn počet jedinců, sdílejících stejný haplotyp. Měřítko pod sítí odpovídá 8 mutacím.

Pozice haplotypů ze Slovinska (světle modrá barva, označení písmenem C) naznačuje, že by mohly být ze všech skupin haplotypů pravděpodobně nejbližší k dávnému společnému předkovi. Ve studii, ze které jsou tyto sekvence slovinských populací převzaty (Verovnik et al. 2005), sloužily pouze jako outgroup a nebylo přesně specifikováno místo jejich sběru (byl pouze uveden stát). Avšak vzhledem k intenzitě sběru vzorků v Dinárském krasu se dá předpokládat, že populace pochází právě z této oblasti, která je považovaná za evropské centrum biodiverzity

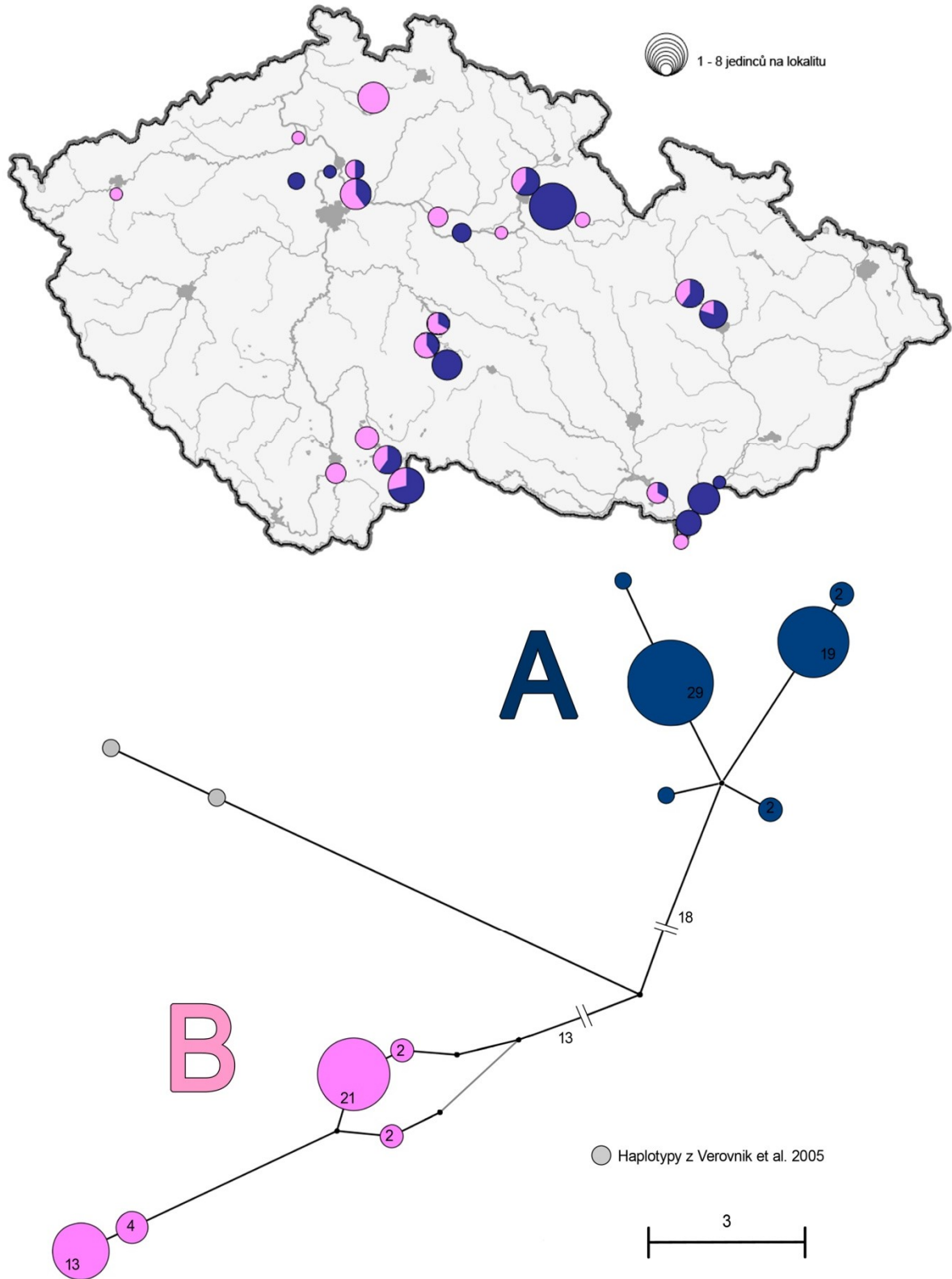


Obr. 13. Haplotypová síť genu pro COI, zobrazující haplotypy z Evropy a mediteránní oblasti a jejich lokalizace na mapě.

sladkovodních bezobratlých (např. Trontelj et al. 2005; Verovnik et al. 2005). Tomu by mohla odpovídat i pozice těchto slovinských populací v síti a též ve fylogenetickém stromu 28S (viz níže). Nejvíce se odlišují populace z Libanonu (žlutě, písmeno F), které od torsa sítě dělí 81 mutací, a populace z Řecka (hnědá barva, písmeno G), které dělí 64 mutací. Dvě chorvatské populace spadají do dvou odlišných haplotypových skupin, označených písmeny H a E, přičemž jedna sdílí společného předka s řeckou populací, druhá je v síti umístěna blíže k libanonské populaci. Haplotyp označený červenou barvou a písmenem D je pak společný pro populace z jihu Španělska a Alžírsko. Tento haplotyp je v sesterském vztahu s „růžovou“ skupinou haplotypů, označených písmenem B, sdílí s ní společného předka. Konečně se dostáváme k českým populacím, tato skupina je geograficky nejrozmanitější a spadají do ní populace z jižní, střední i severní Evropy a také z České republiky. Je tedy evidentní, že české (i ostatní stredo a severoevropské) populace jsou propojeny s těmi jihoevropskými a k disperzi z těchto regionů nějakým způsobem dochází. Překvapivé je zjištění, že na území České republiky se vyskytuje ještě další větev, „modrá“ skupina haplotypů, označená písmenem A. Haplotyp z této skupiny sdílí s českými populacemi pouze jedinec nalezený na jihu Švédska. Skupina je od ostatních jasně oddělena. Celá situace dokládá, že na území České republiky se nacházejí populace ze dvou odlišných větví.

Další síť na obrázku 14 podrobně znázorňuje haplotypy pouze z České republiky a jejich lokalizaci na mapě. Pro tvorbu sítě byly použity všechny sekvence genu pro COI (96) z českých populací o délce 580 nukleotidů. Pro dosažení věrohodnosti sítě byly začleněny také 2 sekvence genu pro COI z práce Verovnik et al. (2005), vybrané vzhledem k pozici této populace ve fylogenetickém stromu genu 28S (viz níže). Síť doplňuje mapa České republiky, která pomocí koláčových grafů dokumentuje výskyt skupin haplotypů na jednotlivých lokalitách. Nad mapou je uvedeno měřítko, každý graf zohledňuje počet analyzovaný jedinců z dané populace. Stejně tak je v síti zohledněn počet jedinců sdílejících společný haplotyp – velikostí kolečka a také číslem, pouze u haplotypů reprezentovaných jediným jedincem není číslo uvedeno. U sítě je opět nakresleno měřítko, odpovídající 3 mutacím. Pro značnou vzdálenost jednotlivých větví je naznačeno jejich přerušení.

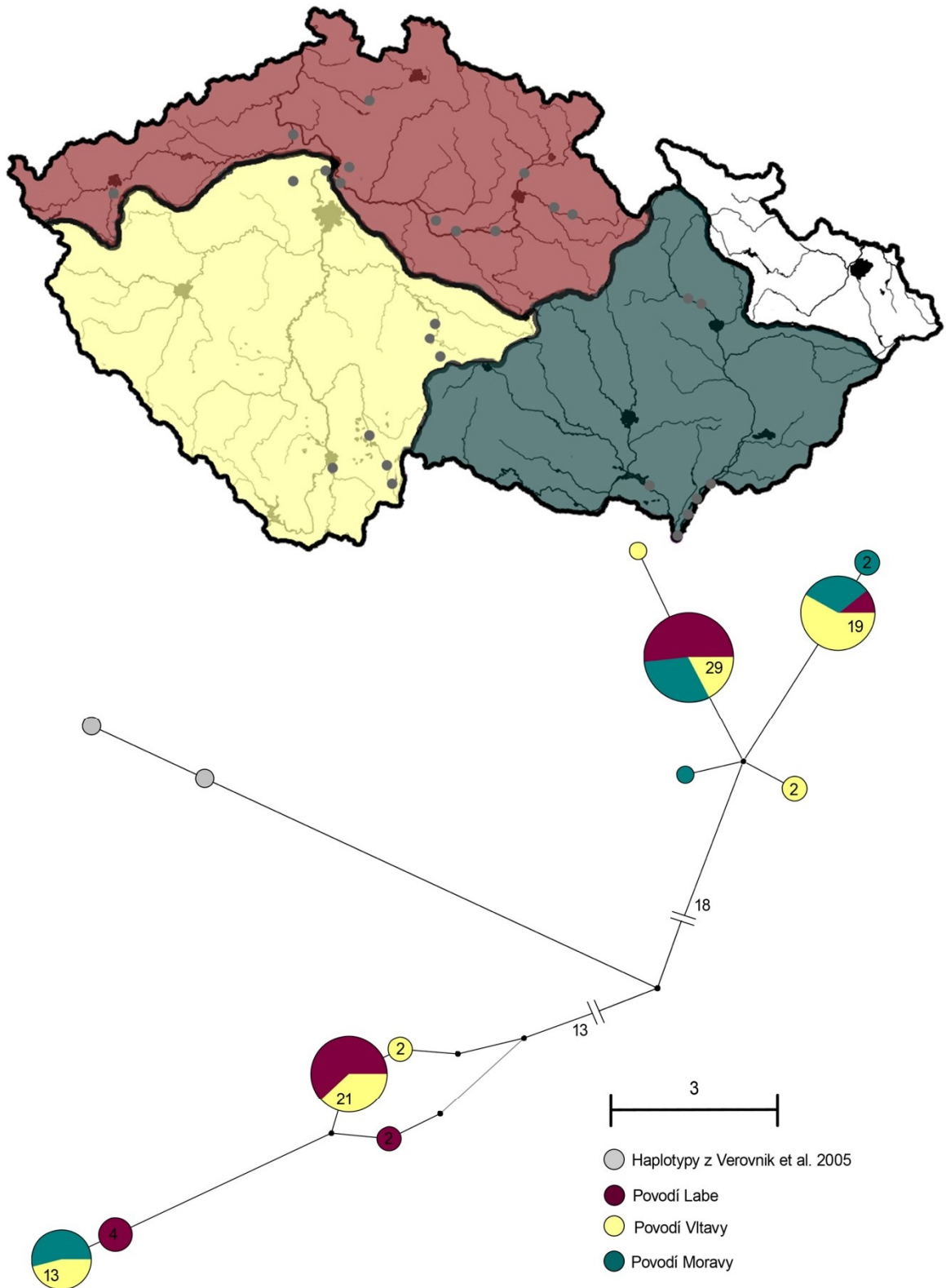
Na haplotypové síti je zřetelné, že haplotypy „modré“ skupiny A mezi sebou mají jasný vztah, vycházející z jediného společného předka. Dva nejpočetněji zastoupené haplotypy této skupiny jsou na sesterské úrovni. O něco málo složitější je situace v „růžové“ skupině B, kde je na začátku šedě naznačená alternativní spojnice (není v přesném měřítku) a nelze tedy říci, jaký haplotyp je mateřský, ze kterého vycházejí ostatní v této skupině. V našem případě je ale, než vztahy jednotlivých haplotypů, důležitější jejich výskyt v populacích. Oproti druhu *Asellus aquaticus*, u kterého bylo na našem území zjištěno mnoho velmi heterogenních haplotypů



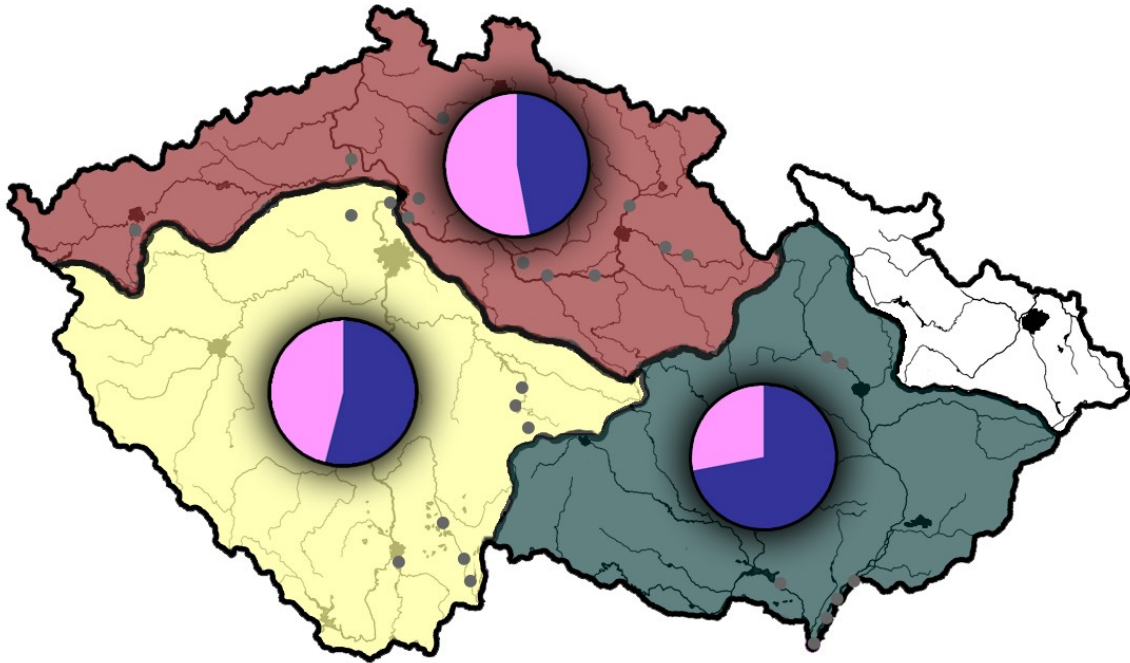
Obr. 14. Haplotypová síť genu pro COI zobrazující haplotypy z území České republiky a jejich lokalizace na mapě.

(Střížek 2012), má *Proasellus coxalis* zastoupení s 11 haplotypy ze dvou různých větví poměrně chudé. Připomeňme si, že „růžová“ B skupina haplotypů je společná pro jiho-, středo- i severoevropské populace. Z mapy je zřetelné zastoupení této skupiny především v povodí Labe a Vltavy. Mnohdy se v nich vyskytují populace zastoupené pouze tímto haplotypem. Například na severu na řece Ploučnici (lokalita Boreček), ve středních Čechách v Libickém luhu na Bačovce nebo na jihu Čech na řece Lužnici a Malši (lokalita Roudné). Naopak na Moravě je pouze jediná lokalita zastoupena jen haplotypy skupiny B a haplotypy z A skupiny jsou na tomto geografickém území častější. Ve shrnutí lze říci, že je mnoho lokalit, na kterých se vyskytují obě skupiny haplotypů, s různým poměrem zastoupení. Zároveň jsou lokality, kde byly zaznamenány pouze haplotypy skupiny A či B, haplotypy skupiny B jsou zastoupeny spíše na Moravě. V rozmístění obou skupin haplotypů není patrné striktně regionální rozmístění.

Obrázek 15 je obdobou obrázku 14, síť byla vytvořena stejným způsobem. Vychází ovšem z opačného principu. Jednotlivá povodí, barevně odlišená na mapě, jsou promítnuta do haplotypové sítě. Je zde patrná určitá disproporce. Zatímco jedna skupina haplotypů se víceméně rovnoměrně vyskytuje ve všech povodích, druhá (B skupina, obsahující i evropské populace) je v povodí Moravy zastoupena pouze jediným haplotypem a nejvíce frekventovaná je v povodí Labe. Situace z obrázků 14 a 15 je ještě doplněna mapou (obr. 16), na které jsou zobrazeny hranice povodí a zároveň shrnující koláčové grafy, uvádějící poměrné zastoupení obou skupin haplotypů v rámci povodí. Vystihuje výše uvedené a dokládá, že v povodí Labe a Vltavy jsou obě skupiny zastoupeny rovnoměrně, zatímco v povodí Moravy je častější „modrá“ A skupina haplotypů, v této práci zastoupená pouze českými populacemi (a jedním vzorkem ze Švédska).



Obr. 15. Haplotypová síť genu pro COI. Povodí promítnutá do sítě haplotypů z území České republiky.

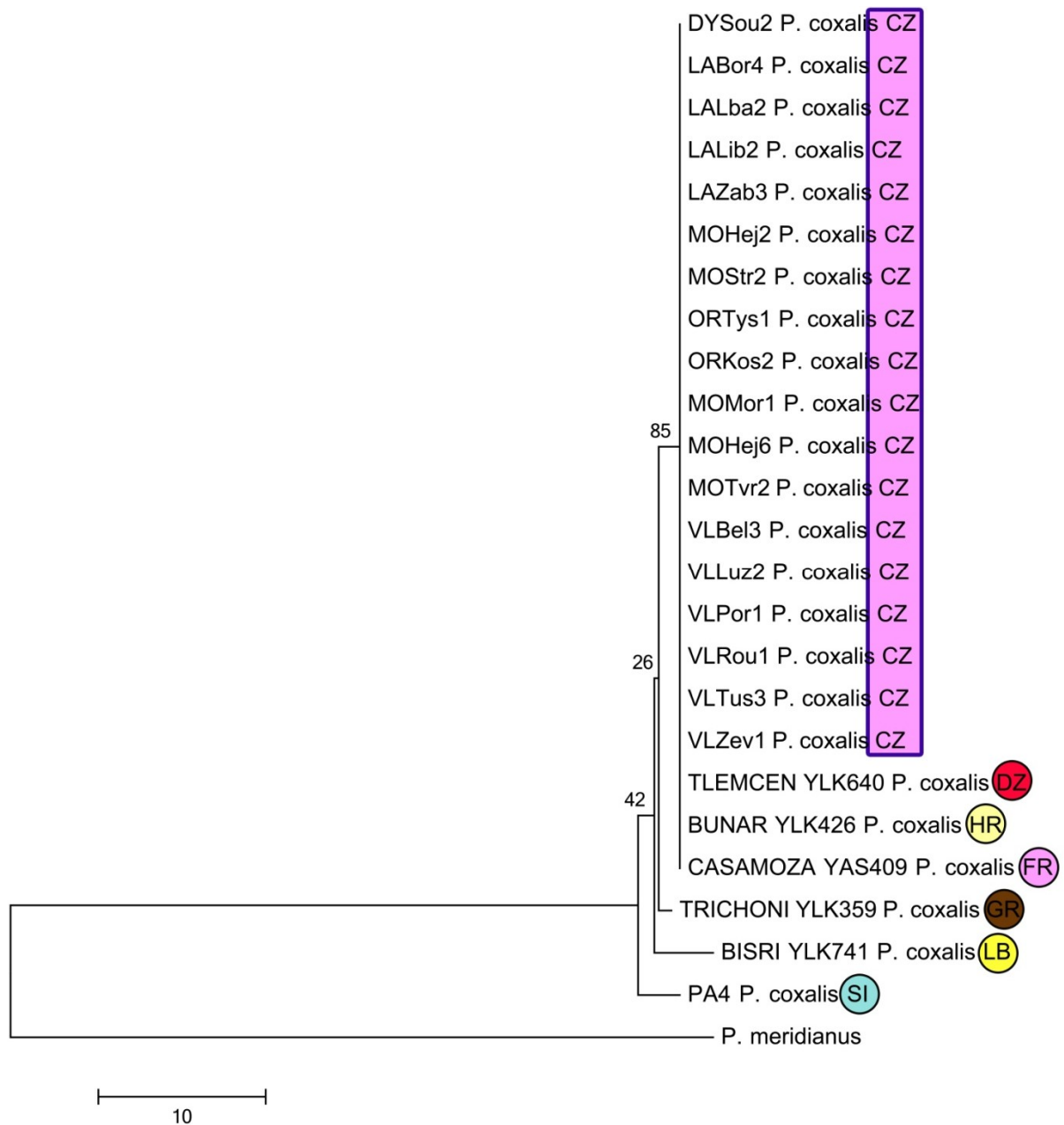


Obr. 16. Poměrné zastoupení dvou skupin haplotypů z České republiky v rámci povodí.

4.2 Fylogenetický strom

Ribozomální gen 28S se skládá z klíčových segmentů, které jsou velmi konzervativní napříč taxonomickými úrovněmi, a také z variabilních úseků. Seskupení těchto vlastností je vhodné pro jeho použití v odhadech fylogenetických vztahů na vyšších taxonomických úrovních (Bae et al. 2010). Proto byl pro doplnění použit i v této práci. Do analýzy bylo zahrnuto celkem 18 vybraných sekvencí tohoto genu napříč povodími a haplotypy z České republiky. Aby měl tento krok smysl, bylo použito také 6 sekvencí z již zmiňované studie Morvan et al. (2013). Jako outgroup byl použit druh *P. meridianus* ze stejného datového zdroje. Sekvence byly zkráceny na délku 689 nukleotidů.

Obrázek 17 znázorňuje výsledný fylogenetický strom. Barevně jsou odlišeny populace z České republiky (růžová, modré ohraničení) a další evropské a severoafrické, jejich barva odpovídá značením použitým v mapě Evropy na obrázku 13. Jasně se oddělila slovinská populace, které je ze všech populací nejpodobnější dávnému společnému předkovi. Zdá se, že populace z tohoto území mohly hrát ve fylogenezi *P. coxalis* významnou roli. Dále jsou odděleny řecké a libanonské populace, které i v síti (obr. 13) vykazovaly značné odlišnosti od ostatních skupin haplotypů. Naopak společnou skupinu tvoří populace z Francie, Chorvatska, Alžírsko a také České republiky, které v haplotypové síti (obr. 13) sice tvořily samostatné haplotypové skupiny, jejich rozdílnost však nebyla tak značná, jako u předešlých populací.



Obr. 17. Fylogenetický strom genu 28S. CZ – Česká republika, DZ – Alžírsko, HR – Chorvatsko, FR – Francie, GR – Řecko, LB – Libanon, SI – Slovinsko.

4.3 Odhad středních genetických vzdáleností sekvencí genu COI

Odhady středních vzdáleností, vypočítané pomocí testu: Kimura dvouparametrový model (uvedeno v metodice), budou přehledně znázorněny v tabulkách s uvedením směrodatné odchylky, která bude vždy umístěna v šedých polích tabulky, případně v pravém rohu nad diagonálou.

Z tabulek 1. a 2. vyplývá, že všechna povodí – Labe, Vltavy i Moravy - mají velmi podobnou míru vnitřní heterogenity, nejmenší vykazuje povodí Moravy, kde se, jak bylo prezentováno výše, ze skupiny B vyskytuje pouze jediný haplotyp. Největší heterogenitu má povodí Vltavy. Nejvíce se od sebe liší povodí Labe a Morava, avšak rozdíly jsou minimální.

Tab. 1. Odhad střední vzdálenosti uvnitř povodí ČR.

	LABE	MORAVA	VLTAVA
LABE		0,005	0,005
MORAVA	0,034		0,005
VLTAVA	0,033	0,033	

Tab. 2. Odhad střední vzdálenosti mezi povodími ČR.

	LABE	MORAVA	VLTAVA
	0,032	0,031	0,034
S.E.	0,005	0,005	0,005

Tab. 3. Odhad střední vzdálenosti mezi oběma haplotypovými skupinami v rámci ČR.

	A	B
Haplotypy skupiny A		0,010
Haplotypy skupiny B	0,060	

Tab. 4. Odhad střední vzdálenosti uvnitř haplotypových skupin v rámci ČR s uvedením celkových počtů jedinců ve skupině a počtu nalezených haplotypů.

Haplotypy skupiny:	A	B	celkem
Počet jedinců	54	42	96
Počet haplotypů ve	6	5	11
Vzdálenost uvnitř skupiny	0,007	0,006	0,006
S.E.	0,002	0,002	0,002

Z tabulek 3 a 4 lze vyčíst, že obě skupiny haplotypů jsou od sebe vzdáleny 6%, což značí relativně podstatný rozdíl, který byl patrný již z haplotypových sítí. Pomocí odhadu časové divergence (uvedeno v metodice) bylo odhadnuto, že se obě skupiny od sebe oddělily již před 2 – 2,8 milióny let. Zároveň ale obě skupiny haplotypů vykazují podobnou míru vnitřní heterogenity. Haplotypy skupiny A byly v analyzovaných vzorcích početnější a skupina obsahovala celkem 6 haplotypů, což je o jeden více než skupina B, která měla i o něco menší heterogenitu, rozdíl je však minimální.

V tabulce 5 jsou uvedeny odhady středních vzdáleností mezi evropskými skupinami haplotypů, které byly stanoveny na základě haplotypové sítě z obrázku 13. Jsou v nich samozřejmě pod písmenem A a B zahrnuty i populace z České republiky. Nejvíce se od všech ostatních skupin odlišují G a F (Řecko a Libanon). Skupina G se od ostatních liší od 15,9 % do 26 %, skupina F od 20,5 % do 26 %. Stáří divergence obou skupin od ostatních je odhadováno na dobu před 7,32 až 11,76 (pro skupinu G) a 7,08 až 11,76 milióny lety (pro skupinu F). Od slovinské skupiny haplotypů C, která má podle zjištěných výsledků nejspíše velmi blízko k centru divergence druhu *P. coxalis*, se ze skupin haplotypů vyskytujících se na území České republiky zhruba před 1,8 – 2,76 miliónů let oddělila skupina A, posléze asi před 1,12 – 2,08 miliónů let skupina B.

Tab. 5. Odhad střední vzdálenosti mezi evropskými haplotypovými skupinami.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Skupina haplotypů A		0,012	0,012	0,014	0,012	0,029	0,030	0,013	0,013
Skupina haplotypů B	0,060		0,010	0,010	0,011	0,028	0,026	0,010	0,011
Skupina haplotypů C	0,057	0,040		0,011	0,007	0,030	0,026	0,009	0,009
Skupina haplotypů D	0,071	0,039	0,045		0,011	0,029	0,027	0,012	0,013
Skupina haplotypů E	0,059	0,050	0,022	0,049		0,029	0,025	0,009	0,009
Skupina haplotypů F	0,213	0,205	0,219	0,220	0,216		0,034	0,030	0,030
Skupina haplotypů G	0,214	0,178	0,179	0,181	0,165	0,260		0,024	0,025
Skupina haplotypů H	0,065	0,041	0,034	0,049	0,032	0,224	0,159		0,010
Skupina haplotypů I	0,062	0,050	0,036	0,060	0,034	0,216	0,170	0,039	

4.4 Vnitropopulační variabilita

Na 5 z celkem 27 lokalit byl nalezen a následně do analýz zahrnut pouze jediný exemplář druhu *P. coxalis*. Na ostatních lokalitách bylo odebráno více jedinců. Nejvíce (8) jedinců bylo do genetických analýz zahrnuto z lokality Týniště. Všichni jedinci měli stejný haplotyp Aa. Pouze tento haplotyp byl společný také pro všechny jedince z populací Tvrdonice 9 (5 jedinců) a Tvrdonice 13 (4 jedinci). Naopak z B skupiny měli jediný haplotyp Ba společný všichni jedinci ze severu Čech z řeky Ploučnice (lokality Boreček). Haplotyp Bb byl společný všem 3 analyzovaným jedincům z lokality Roudné na Malši. V tabulce 6 je uveden celkový soupis jedinců zahrnutých do analýz s uvedeným typem a četností jednotlivých haplotypů. Názvy všech haplotypů z území České republiky byly stanoveny na základě haplotypové sítě, která je součástí příloh. Jednotlivé haplotypy jsou uvedeny u všech analyzovaných vzorků v celkové tabulce v přílohách.

Tab. 6. Tabulka shrnující počet jedinců a počet a typ všech haplotypů na jednotlivých lokalitách, rozdělených podle povodí.

kód lokality	lokality	počet jedinců	počet haplotypů	haplotypy
Povodí LABE				
LABor	Boreček	5	1	Ba
LACer	Černínovsko	5	3	Aa(2), Ba(2), Bd
LALba	Libický luh	3	1	Bc
LALib	Liblice	2	2	Aa, Ba
LASmi	Smiřice	5	3	Aa(3), Bc, Bd
LAVal	Valy	1	1	Ba
LAZab	Záboří nad Labem 3	3	2	Aa, Ab(2)
ORTys	Týniště	8	1	Aa
ORKos	Kostelec nad Orlicí	2	1	Ba
OHBoh	Bohušovice	1	1	Ba
OHKav	Karlovy Vary	1	1	Ba
Povodí MORAVY				
MOHej	Hejtmanka	5	2	Ab(3), Bb(2)
MOMor	Morava	1	1	Aa
MOSTr	Střeň	5	3	Ab(2), Ad(2), Bb
MOTvd	Tvrdonice 9	5	1	Aa
MOTvr	Tvrdonice 13	4	2	Aa(3), Ae
DYPri	Přítluky 04 - Dyje	3	2	Ab, Bb(2)
DYSou	Soutok Dyje	2	1	Bb
Povodí VLTAVY				
VLBak	Hobšovice	2	1	Ac
VLBel	Bělá	5	2	Aa(4), Af
VLHal	Halámky	7	2	Ab(5), Ba(2)
VLLuz	Lužnice	4	2	Ba(3), Bb
VLPor	Poříčí	3	2	Ab, Be(2)
VLrou	Roudné	3	1	Bb(3)
VLtus	Tušť	5	2	Ab(3), Ba(2)
VLzel	Zelčín	1	1	Aa
VLZev	Brtná - Želiv, Trnava	5	3	Ab(2), Ba, Bb(2)

4.5 Migrační tůňka

Pokus s migrační tůňkou zastává v této práci pouze doplňující informaci. Jeho cílem bylo zjistit, zdali jsou berušky vodní (*Asellus aquaticus*) schopny vlivem stresových podmínek (vysychání biotopu) aktivní migrace za účelem osídlit novou vodní plochu. Během 12, v opakování během 14 dní, byla sledována migrační tůňka (popsáno v metodice), až do doby, než došlo k jejímu vyschnutí. Časové intervaly jsou jiné z důvodu odlišného vývoje počasí, kdy tůňka vysychala s rozdílnou rychlostí. A to i přesto, že byla její hladina upravována, aby vysychání bylo co nejplynulejší. V průběhu pokusu byl zaznamenáván vývoj chemicko-fyzikální parametrů vody, které jsou shrnuty v tabulce 7.

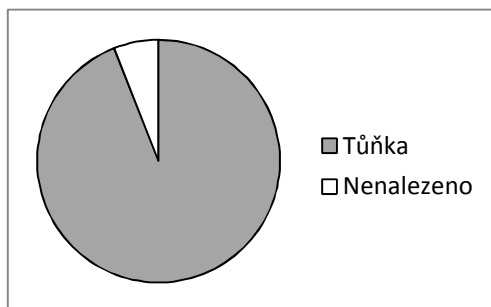
Poslední dny pokusu již nebylo možné kvůli velmi malému objemu vody parametry změřit. V průběhu pokusu nebyl nalezen žádný jedinec *A. aquaticus* v zemní pasti (kontrola 2x denně), umístěné po obvodu sledovaného území. Po skončení celého pokusu bylo v tůňce z původního počtu 100 nalezeno nejdříve 94, v opakování pak 96 jedinců. Někteří byli úplně vyschlí. Ovšem asi třetina jedinců, kteří vykazovali alespoň malé známky života, se po vložení do vody začala aktivně pohybovat, bez náznaků poškození. Nebylo tedy prokázáno, že by jedinci *A. aquaticus* byli schopni aktivní disperze přes souš za účelem osídlování nových vodních ploch. Rozdíl v počtu nenalezených berušek vodních je výsledkem spíše lidské chyby (mohlo snadno dojít k přehlédnutí vyschlého jedince), než důsledkem jejich vycestování z tůňky. Poměrné zastoupení nalezených a nenalezených berušek vodních je znázorněno na obrázcích 18 a 19.

Tab. 7. Vývoj fyzikálně-chemických parametrů vody v migrační tůňce v průběhu pokusu.

1. pozorování					2. pozorování				
Den	pH	teplota °C	konduktivita μS	Hladina vody / cm	Den	pH	teplota °C	konduktivita μS	Hladina vody / cm
1	7,6	21,4	660	12,0	1	7,6	15,1	890	11,0
2	7,7	20,2	690	12,0	2	7,8	15,2	868	12,0
3	7,9	21,8	713	10,0	3	7,6	16,0	853	10,0
4	7,8	19,3	805	9,0	4	8,0	16,8	600	8,0
5	7,6	21,4	660	7,5	5	7,9	16,5	730	7,5
6	8,4	21,0	653	6,0	6	8,1	17,6	659	7,5
7	7,9	20,7	892	4,0	7	8,1	17,0	697	6,0
8	8,8	18,4	967	4,0	8	7,9	15,5	630	5,0
9	8,4	19,2	867	3,5	9	8,5	15,8	1279	3,0
10	9,8	19,6	1243	2,0	10	9,0	16,8	1543	3,5
11	N	N	N	0	11	9,5	17,0	984	2,0
12	N	N	N	0	12	10,2	17,2	1196	1,5
					13	N	N	N	0
					14	N	N	N	0

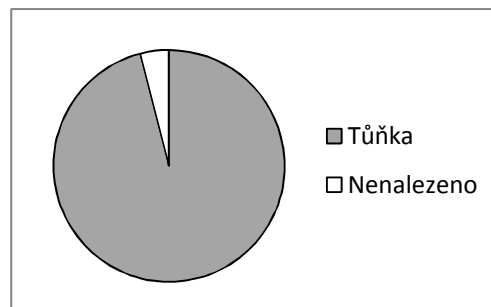
Obr. 18. Graf počtu nalezených a nenalezených berušek vodních, 1. pozorování.

1. pozorování	
Tůňka	94
Zemní pasti	0
Nenalezeno	6



Obr. 19. Graf počtu nalezených a nenalezených berušek vodních, 2. pozorování.

2. pozorování	
Tůňka	96
Zemní pasti	0
Nenalezeno	4



5. Diskuze

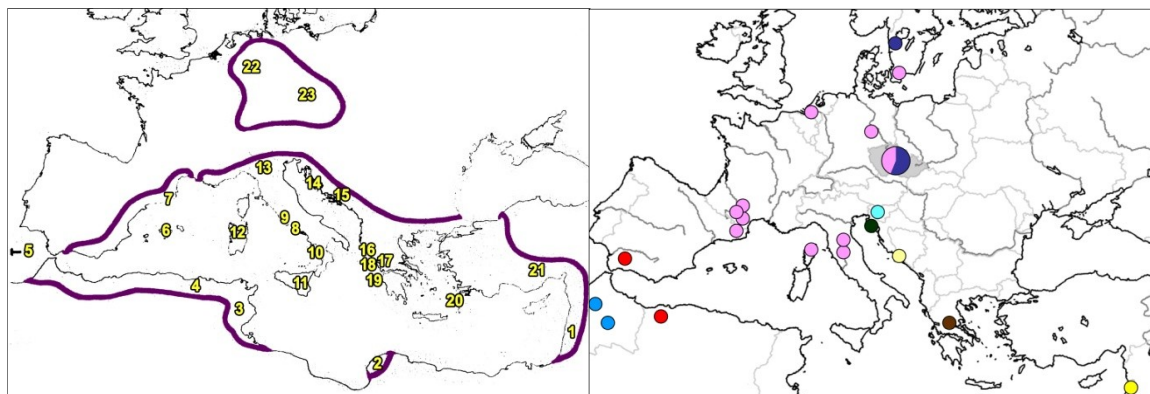
Tato práce představuje prvotní pokus o přiblížení fylogeografie druhu *Proasellus coxalis*, na základě molekulárních dat získaných z genu pro COI a 28S. V kombinaci s využitím přístupných dat, jež byly součástí dvou vědeckých studií (Morvan et al. 2013; Verovnik et al. 2005), se snaží přiblížit vztahy populací *P. coxalis* z území České republiky s populacemi z evropské a mediteránní oblasti. Podrobně se pak věnuje situaci na území České republiky. Jelikož se *P. coxalis* považuje za druh nepůvodní, předkládaná práce se pomocí fylogeografie pokusí dokumentovat jeho možné invazní cesty.

Již v úvodu byla probírána schopnost disperze vodních organismů, která má významný vliv na jejich distribuci (Bilton et al. 2001; Malmqvist 2002; Panov et al. 2004). Především ve 20. a 21. století hraje významnou roli v disperzi vodních organismů také činnost člověka. Mimo jiné, zejména propojení dříve přirozeně oddělených povodí plavebními kanály a transport v balastní vodě (nejen) zaoceánských lodí umožňující disperzi nepůvodních organismů na nová území (Gherardi et al. 2009; Leppäkoski et al. 2002). Avšak, kromě schopnosti disperze ovlivnily současnou distribuci organismů na evropském kontinentě také čtvrtohorní glaciální cykly (Hewitt 1996). Současný výskyt *P. coxalis* v České republice může být tedy ovlivněn hned několika faktory.

***P. coxalis* v rámci Evropy a mediteránní oblasti**

Druh *P. coxalis* bývá často členěn do mnoha geograficky ohraničených poddruhů, jak bylo popsáno v úvodu (Herhaus 1977; Stoch 1996). Molekulární data promítnutá do haplotypové sítě spolu s mapou Evropy na obrázku 13 tuto skutečnost naznačují. Síť sestává z jasně oddělených dlouhých větví, na jejichž koncích se nacházejí jeden či více nedávno oddělených haplotypů. Ty jsou zřetelně lokalizované do různých míst Evropy a mediteránní oblasti (opomineme-li haplotypy skupiny A a B, které budou dále diskutovány). Dlouhé větve v síti značí, že haplotypy se na dané lokalitě nacházejí již delší dobu a jejich rozdílnost, spolu s jasným geografickým vymezením a v kombinaci s morfologickými odlišnostmi pak potvrzují členění na jednotlivé poddruhy (Walker & Avise 1998).

Na obrázku 20 znázorňují mapy geografické rozmístění jednotlivých poddruhů *P. coxalis*, které publikoval Herhaus (1977) a lokalizaci haplotypových skupin na mapě Evropy, která byla prezentována v kapitole Výsledky. Z obrázku je zřejmé, že výskyt jednotlivých skupin haplotypů v odlišných geografických areálech by mohl reflektovat rozšíření poddruhů. Ačkoli nemáme k dispozici materiál k morfologickému porovnání, mohli bychom se podle těchto map pokusit určit některé poddruhy.



Obr. 20. Mapa geografického rozmístění poddruhů *P. coxalis* a mapa výskytu haplotypů *P. coxalis*. Čísla na mapě označují následující poddruhy:

- | | |
|---|---------------------------------------|
| 1. <i>P. coxalis coxalis</i> | 13. <i>P. gardinii</i> |
| 2. <i>P. coxalis cyrenaicus</i> | 14. <i>P. coxalis lucifugus</i> |
| 3. <i>P. coxalis africanus</i> | 15. <i>P. karamani</i> |
| 4. <i>P. coxalis peyerimhoffi</i> | 16. <i>P. coxalis corcyracus</i> |
| 5. (Madeira): <i>P. coxalis perarmatus</i> (Remy, 1936) | 17. <i>P. coxalis epiroticus</i> |
| 6. <i>P. coxalis gabriellae</i> | 18. <i>P. coxalis leucadius</i> |
| 7. <i>P. coxalis banyulensis</i> | 19. <i>P. coxalis cephalenus</i> |
| 8. <i>P. coxalis italicus</i> | 20. <i>P. coxalis rhodiensis</i> |
| 9. <i>P. coxalis polychaetus</i> | 21. <i>P. coxalis ciliciensis</i> |
| 10. <i>P. coxalis dudichi</i> | 22. <i>P. coxalis peregrinus</i> |
| 11. <i>P. coxalis wolffi</i> | 23. <i>P. coxalis septentrionalis</i> |
| 12. <i>P. coxalis sardous</i> | |

Mapa na levé straně byla upravena podle Herhaus (1977), mapa na pravé straně je součástí výsledků této práce.

Uvedené názvy poddruhů pocházejí ze starší publikace a některé poddruhy byly od té doby vyčleněny, jako např. *P. banyulensis* (viz níže), jiné naopak nově popsány. Ovšem v této diskuzi si vystačíme i s nepřesnými daty.

Nejvíce odlišný haplotyp F (žlutá barva), který byl sebrán v Libanonu, by mohl vlastnit poddruh pod číslem 1: *P. coxalis coxalis*. Tento poddruh Stoch (1989) vyčlenil jako typického zástupce druhu a používal ho při sporných momentech determinace. Například na základě porovnávání s ním vyčlenil *P. coxalis banyulensis* do samotného druhu *P. banyulensis*. Další, nejvíce se odlišující haplotyp, pochází z Řecka. Na tomto území se však vyskytují hned 4 poddruhy. Na severu Afriky se z analyzovaných haplotypů vyčlenily 2 skupiny, na tomto území jsou taktéž zaznamenány 2 poddruhy: *P. coxalis peyerimhoffi* (č. 4) a *P. coxalis africanus* (č. 3). Chorvatské populace, které pocházely z opačných konců země a každá měla jiný haplotyp, by mohly odpovídat poddruhům *P. coxalis lucifugus* (14) a *P. karamani* (15).

Rozpor však nastává na území Itálie, Francie a Španělska. Ačkoli z těchto lokalit máme k dispozici větší množství dat, vyskytovala se zde jediná skupina haplotypů. Ovšem na mapě je vyznačeno více poddruhů. To by odpovídalo tvrzení, které uvádí Gerecke et al. (2005): v Evropě (zahrnuje i Itálii) se druh *P. coxalis* vůbec nevyskytuje a tyto populace řadí pouze do druhu *P. banyulensis* (Stoch 1989). Ve střední Evropě jsou na mapce zakresleny dva poddruhy, Herhaus

(1977) je ale v publikaci, z níž mapa pochází, řadí do jednoho poddruhu (*P. coxalis septentrionalis*). Při pohledu na mapy se zdá být pravděpodobné, že „růžová linie“ by tedy mohla představovat *P. (c.) banyulensis*, „modrá linie“ (zde zastoupená populacemi jen z České republiky a jedincem ze Švédska) pak *P. c. septentrionalis*. Na fylogenetické rozhodnutí, zdali se skutečně jedná o druh *P. banyulensis* či obě linie tvoří poddruhy *P. coxalis*, není k dispozici mnoho dat, předešlé determinační práce byly založené pouze na morfologii. Ve chvíli, kdy budou publikovány kompletní výsledky fylogenetické studie rodu *Proasellus*, kterou v současné době provádějí Campanaro et al (2004), bude možné taxonomické rozhodnutí učinit.

Haplotypy z území Libanonu a Řecka jsou podle odhadu stáří divergence (jenž byl stanoven na základě hodnoty rychlosti divergence genu pro COI, k níž dospěl Ketmaier et al. (2003), viz kapitola Metodika) od ostatních vzdáleny přibližně 8,2–10,4 a 6,36–10,4 miliónů let. Pro vytvoření silné reprodukční izolace mezi dvěma vzdálenými populacemi uvádějí Knowlton et al. (1993) minimální požadovanou dobu 3–3,5 milióny let. Na základě těchto údajů lze předpokládat velmi dávnou kolonizaci území druhem *P. coxalis* a značnou izolovanost daných populací. Také fylogenetický strom genu 28S (obr. 17), ve kterém se oddělily právě populace z Libanonu a Řecka, potvrzuje, že tyto populace nejsou již dlouhou dobu v kontaktu s ostatními z mediteránní oblasti.

Ve fylogenetickém stromě genu 28S (obr. 17) můžeme pozorovat oddělení i slovinské populace. K vyčlenění populací z Dinárského krasu na základě analýz genu 28S dospěli také Verovnik et al. (2005) ve fylogeografické studii druhu *Asellus aquaticus*. Situace je zapříčiněna chybějícím genovým tokem mezi populacemi, tudíž jejich izolovaností. Území Dinárského krasu se vyznačuje rozsáhlým výskytem krasových útvarů, které svým vznikem způsobily právě genetickou izolaci populací žijících na tomto území (Verovnik et al. 2005). Hypotézu Dinárského krasu, jakožto důležitého refugia vodních organismů, podporuje i značný výskyt endemických druhů na daném území (Sket 1999). Populace *A. aquaticus* z jižní a střední Evropy byly v rámci genu 28S naopak uniformní, díky nedávnému genovému toku, který vyžaduje alespoň minimální kontakt mezi populacemi (Verovnik et al. 2005). Podobná situace mohla nastat u *P. coxalis*. Analýza genu 28S vyčlenila populace z Libanonu a Řecka, které se již na základě analýz genu pro COI značně odlišovaly od ostatních haplotypů, jak bylo popsáno výše. Také se oddělila právě skupina haplotypů z území Slovinska, zatímco ostatní populace z Chorvatska, Alžírsko, Francie a České republiky byly uniformní, nejspíše díky relativně nedávnému genovému toku, který mezi těmito populacemi probíhal. Vzhledem ke svému umístění ve fylogenetickém stromě genu 28S a díky své pozici v haplotypové síti by bylo možné se domnívat, že populace z území Slovinska v minulosti hrály významnou roli jako centrum radiace druhu *P. coxalis*. Tuto skutečnost by potvrzoval fakt, že i pro jiné druhy je území Slovinska důležitým centrem jejich evoluční historie, například pro dva druhy raků rodu *Austropotamobius* (Trontelj et al. 2005) či pro již zmiňovaný druh *A. aquaticus* (Verovnik et al. 2005). Ačkoli, ve zmíněných studiích (Trontelj et al. 2005; Verovnik et al. 2005) bylo v dané oblasti nalezeno velké množství haplotypů. Tato práce má k dispozici omezené množství

dat, na jejichž základě nelze významnou roli populací *P. coxalis* z této oblasti ve fylogenezi druhu jednoznačně potvrdit.

Zjištěné střední genetické vzdálenosti mezi jednotlivými skupinami haplotypů se pohybovaly od 2,2% až do 26%. Průměrná genetická distance například mezi poddruhy mouchy *Glossina palpalis* dosahuje (gen pro COI) hodnoty 6,6%, zatímco pro poddruhy *Glossina fuscipes* má hodnotu jen 2% (Dyer et al. 2008). U koryšů se hodnota genetické distance (v rámci genu pro COI) určující hranici mezi druhy nejčastěji pohybuje mezi 16-32% (Hebert et al. 2003). Hranice k rozlišení druhů mezi kryptickými podzemními druhy blešivců byla definována na 16% genetické distance (Lefébure et al. 2006). O něco vyšší hodnota - 22,1-23,6% byla zjištěna u poddruhů *Lepidurus apus*, které byly posléze rozděleny do samotných druhů (Vanschoenwinkel et al. 2012). Další kryptická linie, například u perloočky patřící do komplexu *Daphnia longispina*, neměla hodnotu genetické distance menší než 12,4% (Petrusek et al. 2012). U bezkrunýřky rodu *Vejdovskybathynella* jsou sekvence genu pro COI vzdáleny 14-17% (Camacho et al. 2011). Genetické distance velkých haplotypových skupin u *A. aquaticus*, který je také členěn do několika poddruhů, jsou relativně podobné hodnotám zjištěným v této práci, pohybují se od 10,8% mezi Dinárským krasem a centrální Evropskou skupinou do 21,6% mezi ukrajinskou skupinou a evropskými haplotypy (Verovnik et al. 2005). Na základě poměrně velkých genetických rozdílů zjištěných u *P. coxalis* (2,2 – 26 %) se zdá být tedy pravděpodobné, že některým haplotypovým skupinám minimálně statut poddruhů přísluší.

Nejnovější studie, zaměřená na dynamiku diversifikace nadčeledi Aselloidea (Morvan et al. 2013) dokládá, že celá nadčeleď představuje velmi starou linii, její diversifikace začala již v pozdním devonu, asi před 374 milióny let. Studie potvrdila členění rodu *Proasellus* na odlišné morfologické linie. Na základě těchto výsledků může být dřívějších 8 morfologických linií nyní členěno do 4 hlavních fylogenetických linií: slavus, coxalis, alpínská linie a ibersko-aquitaniánská linie (oblast Pyrenejského poloostrova). *Proasellus coxalis* představuje jednu celou fylogenetickou linii a potvrdila se správnost dřívějšího zavedení skupiny druhů *P. coxalis*. Rod *Proasellus* začal diversifikovat ve svrchní juře (před 145 - 167 milióny let), tyto 4 linie se objevily velmi brzy po oddělení rodu a jejich vztah k ostatním rodům čeledi Asellidae se dá podle Morvan et al. (2013) jen velmi těžko vysvětlit, přičemž linie coxalis začala diverzifikovat nejdříve ze všech. V celé čeledi byly objeveny jen 2 případy parafyletických rodů. Jedním z nich je *Chthonasellus bodoni*, představuje pravděpodobně morfologicky odvozený druh, který patří právě do rodu *Proasellus*. U rodu *Proasellus* s v ibersko-aquitaniánské linii také objevilo 7 z celkově 8 parapatrických distribucí mezi nadzemními a podzemními sesterskými druhy (další byla jen u rodu *Bragasellus*).

Invazní cesty *P. coxalis* do České republiky

Ačkoli se v oblasti Středozevního moře vyskytuje množství geograficky jasně vymezených haplotypů, situace v jižní, střední a severní Evropě je značně rozdílná. Na obrázku 13 je patrné, že je toto rozsáhlé území geneticky daleko jednotnější. Vyskytují se zde pouze 2 skupiny haplotypů,

přičemž jedna byla nalezena jen na území České republiky a Švédska. Jak již bylo popsáno v úvodu, druh *P. coxalis* má původní areál rozšíření v mediteránní oblasti (Gruner 1965), což bylo ostatně již dokumentováno výše. Ve střední a severní Evropě se považuje za druh nepůvodní (např. Tittizer et al. 2000) a jeho rozšíření do těchto geografických celků se předpokládá díky rozšířené vnitrozemské lodní dopravě skrze člověkem vybudované plavební kanály, jež propojují velké evropské řeky (Galil et al. 2007; Tittizer et al. 2000). Tyto invazní cesty se dají logicky odvodit podle datování a umístění prvních nálezů a i podle dalšího výskytu *P. coxalis* v Evropě. Na základě analýzy genu pro COI, jež je prezentovaná na obrázku 13, jasně vyplývá, že populace z jihu Evropy sdílí stejné haplotypy s populacemi z Německa, Nizozemí, České republiky i Švédska. Vzhledem k lokalizaci těchto shodných haplotypů na jihu Francie, severu Španělska, Korsice a v Itálii lze potvrdit, že *P. coxalis* využil západního koridoru vzniklého propojením řek Rhôna a Rýn a dále plavebních kanálů propojujících Rýn s Labem ke své invazi do střední a severní Evropy. Tedy cestu, kterou popsali např. Tittizer et al. (2000). Na základě výsledků této práce tak lze dokázat, že část populací *P. coxalis* se v České republice vyskytuje díky recentní invazi, jež byla umožněná lidskou činností.

Invazní cesta byla pomocí molekulárních dat potvrzena také například u pontokaspického druhu *Limnomysis benedeni*. Ten, podobně jako *P. coxalis*, v populacích na nepůvodním území sdílel větší množství shodných haplotypů s populacemi z původního areálu výskytu (Audzijonyte et al. 2009). Naopak u dalšího pontokaspického druhu, různonožce *Echinogammarus ischnus*, se v populacích v nepůvodním areálu vyskytovaly pouze dva haplotypy (Cristescu et al. 2004). Rozdílná genetická diverzita populací nepůvodních druhů souvisí zaprvé s charakterem invaze (jestli se daný organismus na nové lokality rozšířil díky jednorázovému zavlčení, nebo díky opakujícím se či kontinuálním invazím) za druhé s genetickou strukturou populací v areálech původního rozšíření (Audzijonyte et al. 2009). A tak zatímco v případě *L. benedeni* se v nepůvodních areálech vyskytují jedinci s různými haplotypy, které navíc náleží k různým haplotypovým skupinám, v případě *P. coxalis* bylo v populacích z Francie, Itálie a Španělska zjištěno sice více haplotypů, ale všechny tvoří jedinou skupinu (B). V českých populacích se pak z této skupiny (B) vyskytuje ne jediný, ale více haplotypů. Což může značit víceméně kontinuální genový tok, který ovšem může být do jisté míry trochu omezený. Srovnáme-li haplotypové mapy z obrázku 13 a 14, je patrné, že pokud byly do sítě začleněny evropské populace (obr. 13), čítala skupina B více haplotypů, než v případě sestrojení haplotypové sítě pouze z českých populací (obr. 14).

Horecký & Špaček (2007) se domnívají, že by se *P. coxalis* mohl v České republice vyskytovat, spíše než v důsledku propojení vodních cest, buď zavlčením spolu s dovozem vodního ptactva z oblasti Středozemního moře či západní Evropy, nebo díky přirozené pasivní disperzi na tažném vodním ptactvu. Tyto hypotézy dokládají skutečností, že první nálezy z území České republiky se uskutečnily asi o 30 let dříve, než kdy byl *P. coxalis* zaznamenán v Německu v povodí Labe. Dále, že první nálezy na našem území pocházejí z horní části povodí Vltavy a Moravy (datování uvedeno v kapitole Úvod). V neposlední řadě zmiňují polohu České republiky, která leží

na migračních cestách tažného vodního ptactva, mezi původním (mediteránní oblast) a sekundárním (úmoří Severního moře) areálem výskytu.

Zavlečení s dovezeným vodním ptactvem zajisté nemůžeme vyloučit, zároveň ho na základě zjištěných dat nelze ani potvrdit. Ačkoli se teoreticky takovéto zavlečení mohlo udát, zajisté by to ale nemohla být jediná cesta, kterou se k nám *P. coxalis* dostal. V tom případě by totiž musely být populace v České republice spíše uniformní, s menším počtem haplotypů, jak tomu bylo u výše zmiňovaného různonožce *E. ischnus* (Cristescu et al. 2004) a nejspíše by nešlo k pokrytí víceméně celého území České republiky.

V úvodu byl zmiňován experiment, dokazující možnost pasivní disperze blešivce na kachním peří (Segerstråle 1954). V případě *P. coxalis* či velmi podobného druhu *A. aquaticus* takovýto přenos pozorován nebyl, ani nebyl uskutečněn experiment k prokázání či vyloučení přenosu na vodním ptactvu. Avšak vzhledem k relativně podobné konstituci i velikosti těla druhů *P. coxalis* a *Gammarus lacustris* se takovýto přenos i v případě *P. coxalis* nezdá být nemožný. Ovšem na druhou stranu, již v samotném experimentu, který prováděl Segerstråle (1954), druhý zkoumaný blešivec, *G. pulex*, takovéhoho přenosu schopen nebyl. Další otázkou je, zdali by *P. coxalis* byl schopen překonat úskalí disperze na dlouhé vzdálenosti (Figuerola & Green 2002a). Jak uvádí Horecký & Špaček (2007), poloha České republiky opravdu leží na migračních trasách tažného vodního ptactva (vyplývá to např. ze studie Wesselingh et al. 1999). Za předpokladu, že by *P. coxalis* byl schopen disperze díky vodnímu ptactvu i na dlouhé vzdálenosti, měla by být genetická struktura populace na takto propojených lokalitách velmi podobná. Jako tomu je např. u druhu *Daphnia laevis*, jehož populace si jsou geneticky podobnější právě na lokalitách, kterými vedou migrační trasy vodních ptáků (Taylor et al. 1998). Data z této práce ovšem takovouto disperzi nenaznačují. Na území České republiky se vyskytují dvě poměrně odlišné haplotypové skupiny (obr. 13 a 14), zde rozlišovány jako A a B (toto zjištění bude dále diskutováno níže), z nichž se pouze jedna vyskytuje v jižní Evropě (B). Pokud by se *P. coxalis* na naše území šířil přirozeně výše zmíněným způsobem, v populacích jižní Evropy by se měly vyskytovat i haplotypy skupiny A, ovšem tomu tak není. Je sice možné, že by tyto haplotypy mohly uniknout vzorkování, které prováděli Morvan et al. (2013), z jejichž studie dané sekvence z Evropy pocházejí, ovšem tato situace je při relativně dostatečném množství sekvencí z dané oblasti velmi nepravděpodobná. Další možností, kdy by disperze pomocí vodních ptáků mohla probíhat a daná genetická data by tomu nenasvědčovala, je, že jedinci s haplotypy skupiny A, by se v populacích v jižní Evropě nemohli realizovat v důsledku již zaplněné ekologické niky silnějšími populacemi z jižních oblastí. Takovéto úvahy se ovšem pohybují na velmi vratké rovině a nejsou podloženy žádnými důkazy. Zůstaňme proto u sdělení, že přirozená pasivní disperze tažným vodním ptactvem je na základě zjištěných dat, jež tato práce předkládá, velmi nepravděpodobná.

Dalším druhem, který pochází z oblasti Středozemního moře, je sladkovodní krevetka Desmarestova (*Atyaephyra desmarestii*). V České republice byl výskyt poprvé zaznamenán až v roce 2007 (Straka & Špaček 2009). Podobně jako *P. coxalis* se do západní Evropy šíří cestami lodní dopravy (Tittizer et al. 2000). Nejbližší místo výskytu je od lokality nálezu v České republice

vzdáleno 500 km po proudu. Je proto pravděpodobné, že se k nám nedostala aktivní migrací, ale spíše pouze zavlečením lidskou činností, například s balastní vodou (Straka & Špaček 2009). Dalším stejnonožcem rodu *Proasellus*, který se šíří do střední Evropy (byl zavlečen také na Britské ostrovy), je *P. meridianus*. Původní rozšíření má v západní Evropě (Gruner 1965, Tittizer et al. 2000). Do ostatních částí Francie se pravděpodobně dostal díky kanálům spojujícím řeky Rhônu, Saônu a Seinu a do střední Evropy přes kanál Rhôna-Rýn, podobně jako *P. coxalis* (Leuven et al. 2009; Tittizer et al. 2000). Oproti němu však *P. meridianus* na území České republiky zaznamenán nebyl. V Německu byl zatím pozorován jen v řekách Saare a Rýn a to v malých početnostech (Tittizer et al. 2000). Z Nizozemska pocházejí záznamy, že ačkoli se běžně vyskytuje společně s druhem *A. aquaticus*, *P. meridianus* mu nekonkuruje, ale přizpůsobuje se mu. Na rozdíl od *A. aquaticus* neobývá znečištěné vody (Wolff 1973). Je otázkou, zdali k nám opravdu ještě nedorazil (to by potvrdzovaly jen řídké nálezy v Německu), nebo díky své podobnosti s *A. aquaticus* zatím pouze uniká pozornosti, podobně jako *P. coxalis* (viz úvod a také níže v textu).

Fylogeografie *P. coxalis* v České republice

Jak již bylo řečeno, na území České republiky se vyskytují dvě skupiny haplotypů – A a B. Jejich vztah, společně s frekvencí výskytu obou skupin haplotypů je znázorněn na obrázku 14. Zatímco haplotypy skupiny B se vyskytují i v jižní, střední a severní Evropě (popsáno výše, obrázek 13), haplotypy skupiny A byly zaznamenány pouze u populací na území České republiky, s výjimkou jednoho jedince z jižního Švédska. Ten sdílel haplotyp skupiny A společně s dalším jedincem z území České republiky. Výskyt dvou jasně oddělených větví, které se od sebe oddělily přibližně před 2,0 - 2,8 milióny lety a z nichž se jedna vůbec nevyskytuje v jižním areálu, okolo Středozemního moře, je sice překvapivý, nicméně, na základě domněnek některých autorů, ne zcela nečekaný.

Herhaus (1977) ve své studii kromě antropogenního zavlečení *P. coxalis* do střední Evropy plavebními kanály či například s vodními rostlinami (což je podobný případ jako zavlečení s importovaným vodním ptactvem, jež bylo diskutováno výše) uvádí ještě druhou hypotézu, kterou je přirozené aktivní „přicestování v historické době“. Domnívá se, že tento druh mohl do střední Evropy přirozeně expandovat na konci pliocénu či brzkým začátkem pleistocénu, což je období přibližně před 1,8 – 3,6 milióny lety. V této době byl jih a sever Evropy propojen říčním systémem Rhôna-Rýn-Dunaj. Později bylo spojení přerušeno vytvořením přirozeným geografických hranic. (Které jsou dnes vlivem lidské činnosti zničeny.) Tato domněnka byla o několik let později podpořena také kolektivem italských vědců Ketmaier et al. (2001), kteří datovali oddělení populací ze Sardinie a centrální Itálie od pravděpodobného jordánského předka (z rodu *Proasellus*) do konce miocénu (přibližně před 5,3 – 7,2 milióny let; datování historických epoch čerpáno z portálu Mezinárodní komise pro stratigrafii, ICS). Souhlasí tak s hypotézou, jež předložil Herhaus (1977), tedy s šířením rodu *Proasellus* do Evropy během terciéru. Datování divergence obou skupin haplotypů, jež se vyskytují na území České republiky, je odhadováno

přibližně do doby před 2,0 – 2,8 milióny let a oddělení skupiny haplotypů A (potencionálně původní ve střední Evropě) od skupiny C (haplotypy z území Slovinska) se událo zhruba před 1,8 – 2,76 milióny let, což odpovídá hranici konce pliocénu a začátku pleistocénu. Také Gerecke et al. (2005) považují rod *Proasellus* ve střední Evropě za původní a předpokládají jeho široké rozšíření, ovšem tyto jedince řadí do druhu *P. banyulensis*, jak bylo uvedeno výše.

Již bylo podotknuto, že Horecký & Špaček (2007) vzhledem k celkem časným nálezům *P. coxalis* na území České republiky zpochybňovali jeho šíření především skrze plavební kanály. Úplné propojení mediteránní oblasti s Labem je dokončeno až v roce 1938, kdy byl otevřen Středozezemní kanál (č. 7 na obrázku 1). Ten, díky dalším dvěma kanálům, spojuje Rýn s Labem. První datovaný nález u nás pochází již z roku 1947 (tedy 9 let po otevření Středozezemního kanálu), a to z horního toku Vltavy u Veselí nad Lužnicí. Při pohledu na obrázek 14 je zřejmé, že obě skupiny haplotypů na řece Lužnici (horní tok Vltavy) jsou zastoupeny zhruba v podobném poměru. Nepřevládají haplotypy skupiny B, jež se vyskytují v jižní Evropě a je tedy možné, že právě první nálezy by mohly spadat do haplotypové skupiny A. Tato větev by potenciálně mohla zastupovat jedince *P. coxalis*, kteří se na našem území nevyskytují díky recentní invazi z oblasti Středozezemního moře, nýbrž mohou být díky expanzi v dávné době historickou součástí fauny České republiky. Horecký et al. (2006) uvádí, že v minulosti zřejmě mohlo docházet k častým záměnám *P. coxalis* za druh velmi podobný a u nás hojný – *A. aquaticus*, a proto mohl zůstat dlouho nepovšimnut. To je velmi pravděpodobné, navíc vzhledem k širokému výskytu *A. aquaticus*, jehož populace bývají i značně početné, se může tento druh zdát být „nezajímavý“. *P. coxalis*, který koexistuje s *A. aquaticus* a v našich podmínkách tvoří jen velmi výjimečně dominantní taxon (Flössner 1987; Horecký & Špaček 2007; vlastní pozorování), tak může snadno unikat pozornosti.

Rozmístění obou skupin haplotypů A a B v rámci České republiky by mohlo naznačovat jejich odlišný původ. Při pohledu na obrázek 14 si můžeme všimnout, že ačkoli jsou frekvence výskytu obou skupiny haplotypů víceméně vyrovnané, přeci jen haplotypy skupiny A převládají. V povodí Labe je sice skupina B početnější, to se ale dá vysvětlit jeho těsnějším propojením s mediteránní oblastí. V povodí Vltavy již převažují haplotypy skupiny A. Zcela jiná je situace v povodí Moravy, kde se ze skupiny B vyskytuje pouze jediný haplotyp a celkově převažují haplotypy skupiny A (obr. 15 a 16). Z obrázku 16 dále vyplývá, že haplotypy skupiny A jsou v jednotlivých povodích zastoupeny rovnoměrněji. Tyto údaje by tak mohly potvrzovat, že haplotypy skupiny B pocházejí z recentní invaze, zatímco příchod jedinců vlastních haplotypů skupiny A na území České republiky sahá do daleko dávnější historie.

Ketmaier et al. (2001) při studii *P. coxalis* v Itálii, Sardínii a Jordánsku vyjádřil pochybnosti nad přítomností *P. coxalis* v Evropě a raději italské populace řadí, stejně jako Stoch et al. (1996), do druhu *P. banyulensis*. S čímž nesouhlasí Argano & Campanaro (2004) a navrhuje raději minimálně italské populace a populace ze Sardinie (předmět jejich studie), řadit do komplexu druhů *P. coxalis* (*P. coxalis* - group). Na základě alozymových dat Ketmaier (2002) uvádí značnou genetickou rozdílnost italských populací, které v této studii řadí již do zmíněného komplexu druhů

P. coxalis. Značné genetické rozdíly mezi populacemi vysvětluje několika po sobě jdoucími kolonizačními vlnami italského území. V současné době probíhá rozsáhlá fylogenetická studie celého rodu *Proasellus*, jejíž prvotní výsledky naznačují, že přes značné genetické rozdíly si jsou populace rodu *Proasellus* morfologicky velmi podobné a pro nedostatek diagnostických znaků se řadí právě do komplexu druhů *P. coxalis* (Campanaro et al. 2004). Tyto údaje byly již uvedeny v úvodu, ale vzhledem ke složitosti vztahů bylo vhodné je připomenout. Ačkoli se tedy uvádí, že italské populace *P. coxalis* jsou geneticky značně rozdílné (Ketmaier 2002), data z této oblasti (Itálie, Korsika), které máme k dispozici ze studie Morvan et al. (2013), tomu nenasvědčují. Všechny populace se zařadily do haplotypové skupiny B. Nabízí se otázka, zdali se haplotypy skupiny A nevyskytují právě na tomto geneticky heterogenním území? Do České republiky by byly zavlečeny také díky recentní invazi přes plavební kanály a pouze náhodou by se mezi jedinci, kteří byli do genetických analýz zařazeni, nevyskytli ti s haplotypem A? Na druhou stranu, dat z jižní Francie a severního Španělska bylo celkem velké množství a proto se tato hypotéza zdá být nepravděpodobná. Že se haplotypy skupiny A neobjevily ani na území Německa, může být naopak způsobeno právě nedostatečným „provzorkováním“ daných populací, jelikož dat z území Německa a Nizozemí bylo ve studii Morvan et al. (2013) velmi málo. Složitě je i vysvětlení přítomnosti haplotypu skupiny A v jižním Švédsku. Zde je *P. coxalis* považován také za nepůvodní (Lundin 2003). Buď mohl být přehlížen a nepovšimnut, ze stejných důvodů, jako tomu mohlo být v našich podmínkách. Nebo mohl být zavlečen s balastní vodou a to v obou případech – ať už je skupina A ve střední Evropě díky recentní invazi z mediteránní oblasti či se do ní dostala již v historických dobách (také z mediteránní oblasti).

Z výše zmíněného plyne, že je složité na základě zjištěných skutečností dospět k jednoznačnému závěru o původu haplotypové skupiny A. Budeme-li ovšem předpokládat, že jedinci *P. coxalis* s haplotypy skupiny A jsou ve střední Evropě již dlouhou dobu, ačkoli nevíme, kdy přesně na toto území expandovali, podle malého počtu zjištěných haplotypů můžeme odhadovat, že případná kolonizace území České republiky probíhala nejspíše v nedávné době, typem Pionýr. To znamená, že dané území kolonizoval jen malý počet jedinců, kteří byli geneticky homonomní (Hewitt 1996). U druhu *A. aquaticus* je situace zcela opačná. Na území České republiky se vyskytuje značné množství haplotypů z více haplotypových skupin. Populace střední a severní Evropy přitom sdílí stejné skupiny haplotypů (Střížek, 2012). Předpokládá se tedy, že kolonizace našeho území druhem *A. aquaticus* probíhala typem zvaným Falanga, kdy velká genetická heterogenita nevznikla až v kolonizované oblasti, ale byla předávána z mateřské populace na dceřinou. Celá kolonizovaná oblast (severní a střední Evropy) sdílí množství starých linií, které pocházejí z refugia (Hewitt 1996, Střížek, 2012).

Původ haplotypové skupiny A nemůže být na základě výsledků této práce jednoznačně vysvětlen. Proto by bylo vhodné získat více vzorků především z území střední Evropy, případně i Itálie a v další studii se pokusit ještě více přiblížit historii druhu *P. coxalis* na našem území.

Okrajovou součástí předkládané práce představuje pokus s migrační tůňkou, který se snažil alespoň z části objasnit možné cesty disperse druhu *A. aquaticus* a *P. coxalis*. Oba stejnonožci

obývají stojaté i tekoucí vody. V případě *A. aquaticus* bylo zjištěno, že se jedinci obývající tyto odlišné habitaty geneticky nijak zásadně neliší a mezi těmito populacemi musí být nějakým způsobem zachován genový tok (Střížek 2012). Experiment s migrační tůňkou neprokázal, že by se *A. aquaticus* za stresových podmínek (vysychání habitatu) aktivní migrací snažil osídlit nové vodní plochy. Naopak, většina jedinců byla po skončení pokusu ukryta pod substrátem, což není nijak překvapivé zjištění, jelikož zimu přečkávají právě zahrabáni v sedimentu (Murphy & Learner 1982). I při minimální vlhkosti zůstalo mnoho jedinců životaschopných (po opětovném umístění do vody). Na základě osobního pozorování se zdá být pravděpodobnější případné šíření spíše vlhkým substrátem (např. mezi mokrým listím), které by náhodně mohlo vést i k osídlení nové vodní plochy. Ovšem jen na velmi krátkou vzdálenost. V případných dalších experimentech na toto téma by bylo vhodné zaměřit se spíše na aktivní pohyb proti proudu či mnohokrát zmiňovanou možnost disperze pomocí vodního ptactva, například s podobným designem experimentu, který použil Segestråle (1954).

6. ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na nepůvodního sladkovodního stejnonožce *Proasellus coxalis* s.l. Jejím hlavním cílem bylo pomocí genetických dat určit případné invazní cesty tohoto druhu a zhodnotit fylogeografické vztahy populací vyskytujících se na území České republiky.

Z celkem 27 populací bylo analyzováno 96 jedinců genem pro cytochrom oxidázu podjednotky I (COI). Pro doplnění vztahů mezi liniemi byl použit také ribozomální gen 28S, této analýze bylo podstoupeno 18 jedinců z 18 populací napříč povodími.

Pro interpretaci výsledků byly do analýz začleněny i vzorky zahraničních populací. K tomu byla využita volně přístupná data z GenBank, jež byla součástí studií Morvan et al. (2013) a Verovnik et al. (2005).

Na území České republiky bylo zjištěno celkem 11 unikátních haplotypů patřících do dvou různých genealogických linií, jež od sebe diversifikovaly před 2 -2,8 milióny let (6% rozdíl mezi sekvencemi genu pro COI). Jedna z těchto linií se vyskytuje v jižní, střední i severní Evropě, a jelikož s ní jedinci z území České republiky sdílejí totožné haplotypy, bylo potvrzeno, že část populací druhu *P. coxalis* se vyskytuje na území České republiky díky stavbě plavebních kanálů a lodní dopravě s nimi spjaté (Nehring & Luchs 2002; Tittizer et al. 2000). Zároveň se na základě zjištěných výsledků zdá být nepravděpodobný přenos vodním ptactvem na dlouhé vzdálenosti.

Překvapivě byla na našem území zjištěna ještě druhá skupina haplotypů, která se, až na jednoho jedince ze Švédska, vyskytovala pouze v populacích z České republiky. Při porovnání literárních údajů (Herhaus 1977; Gerecke et al. 2005), společně s časným datováním prvních nálezů tohoto druhu na našem území (Flasarová 1975), a snadnou záměnou za hojnější druh *A. aquaticus* (Horecký & Špaček 2007), se může zdát pravděpodobné, že tato genealogická linie mohla expandovat na území České republiky již v (dávnné) minulosti, a část populací druhu *P. coxalis* se zde nevyskytuje díky recentní invazi plavebními kanály. Díky velkému rozdílu mezi skupinami haplotypů A a B lze říci, že podle údajů z literatury by mohly haplotypy skupiny B odpovídat (pod)druhu *P. c. banyulensis* a skupiny A (pod)druhu *P. c. septentrionalis*, ale přesné taxonomické postavení linií nelze bez dalších genetických dat určit.

Okrajovou součástí této práce tvořil i migrační experiment, prováděný na druhu *Asellus aquaticus*. Nebylo prokázáno, že by beruška vodní vlivem stresových podmínek (vysychání biotopu) byla schopná osidlovat nové vodní plochy díky své aktivní migraci.

SEZNAM LITERATURY

- Andrzejewski R., Jezierski W.** 1978. Management of a wild board population and its effects oon commercial land. *Acta Theriologica* 23: 309-339.
- Argano R., Campanaro A.** 2004. Two new *Proasellus* (Crustacea, Isopoda, Asellidae) species from Sardinia: evidences of an old colonization wave of the island. *Studi Trentini di Scienze Naturali, Acta Biologica* 81: 49-52.
- Audzijonyte A., Wittmann K.J., Ovcarenko I., Väinölä R.** 2009. Invasion phylogeography of the Ponto-Caspian crustacean *Limnomysis benedeni* dispersing across Europe. *Diversity and Distributions* 15: 346-355.
- Bae C.H., Robbins R.T., Szalanski A.L.** 2010. Secondary stuctures models of D2-D3 expansion segments of 28S rRNA for Hoplolaiminae species. *Journal of Nematology* 42(3): 218-229.
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A.** 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Beladjal L., Mertens J.** 2009. Diaspore dispersal of Anostraca by flying insects. *Journal of Crustacean Biology* 29(2): 266-268.
- Beran L.** 2006. *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) – slávička mnohotvárná. pp. 217-218. In: Mlíkovský J., Stýblo P. (eds.) *Nepůvodní druhy fauny a flory České republiky*. Praha: ČSOP ISBN 978-80-903329-7-3, pp. 456.
- Bernauer D., Jansen W.** 2006. Recent invasions of alien macroinvertebrates and loss of native species in the upper Rhine River, Germany. *Aquatic Invasions* 1(2): 55-71.
- Bij de Vaate A., Jazdzewski K., Ketelaars H.A.M., Gollasch S., Van der Velde G.** 2002. Geographical patterns in range extension of Ponto-Caspian macroinvertebrate species in Europe. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 1159- 1174.
- Bilton D.T., Freeland J.R., Okamura B.** 2001. Dispersal in freshwater invertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 32: 159-81.
- Brendonck L., Riddoch B.J.** 1999. Wind-borne short-range egg dispersal in anostracans (Crustacea: Branchipoda). *Biological Journal of the Linnean Society* 67: 87-95.
- Brochet A.L., Gauthier-Clerc M., Guillemain M., Fritz H., Watrekeyn A., Baltanás Á., Green A.J.** 2010. Field evidence of dispersal of branchiopods, ostracods and bryozoan by teal (*Anas crecca*) in the Camargue (southern France). *Hydrobiologia* 637: 255-261.
- Browler D.E., Benton T.G.** 2005. Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics. *Biological Reviews* 80: 205-225.
- Cáceres C.E.** 1997. Dormancy in invertebrates. *Invertebrate Biology* 116(4): 371-383.

- Camacho A.I., Dorda B.A., Rey I.** 2011. Identifying cryptic speciation across groundwater populations: first COI sequences of Bathynellidae (Crustacea, Syncarida). *Graellsia* 67(1): 7-12.
- Campanaro A., Ketmaier V., Argano R.** 2004. COI data indicate a complex evolutionary history for Italian Subterranean and surface populations of *Proasellus* (Crustacea, Isopoda). pp. 131. In: Gibert J. (ed.) SWSB Symposium on World Subterranean Biodiversity, Book of abstracts. *Villeurbanne: University Claude Bernard of Lyon*. pp. 182.
- Carlton J.T., Geller J.B.** 1993. Ecological Roulette: the global transport of nonindigenous marine organisms. *Science* 261: 78-82.
- Clausen P., Nolet B.A., Fox A.D., Klaassen M.** 2002. Long-distance endozoochorous dispersal of submerged macrophyte seeds by migratory waterbirds in northern Europe – a critical review of possibilities and limitations. *Acta Oecologica* 23: 191-203.
- Constantini L.M. & Rossi L.** 1998. Competition between two aquatic detritivorous isopods – a laboratory study. *Hydrobiologia* 368: 17-27.
- Copp G.H., Bianco P.G., Bogutskaya N.G., Erös T., Falka I., Ferreira M.T., Fox M.G., Freyhof J., Gozlan R.E., Grabowska J., Kováč V., Moreno-Amich R., Naseka A.M., Peñáz M., Povž M., Przybylski M., Robillard M., Russell I.C., Stakėnas S., Šumer S., Vila-Gispert A., Wiesner C.** 2005. To be, or not to be, a non-native freshwater fish? *Journal of Applied Ichthyology* 21: 242-262.
- Coop G.H., Templeton M., Gozlan R.E.** 2007. Propagule pressure and the invasion risks of non-native freshwater fishes: a case study in England. *Journal of Fish Biology* 71 (Supplement D): 148-159.
- Cristescu M.E.A., Witt J.D.S., Grigorovich I.A., Hebert P.D.N., MacIsaac H.J.** 2004. Dispersal of the Ponto-Caspian amphipod *Echinogammarus ischnus*: invasion waves from the Pleistocene to the present. *Heredity* 92: 197-203.
- Darwin Ch., Beer G.** 2008. On the origin of species. *New York: Oxford University Press*, Rev. ed. ISBN 9780199219223 pp. 394.
- Devin S., Beisel J.N., Bachmann V., Moreteau J.C.** 2001. *Dikerogammarus villosus* (Amphipoda: Gammaridae): another invasive species newly established in the Moselle river and French hydrosystems. *Annales de Limnologie* 37(1): 21-27.
- Devin S., Bollache L., Noël P.Y., Beisel J.N.** 2005. Patterns of biological invasions in French freshwater systems by non-indigenous macroinvertebrates. *Hydrobiologia* 551: 137-146.
- Dick J.T.A., Platvoet D., Kelly D.W.** 2002. Predatory impact of the freshwater invader *Dikerogammarus villosus* (Crustacea: Amphipoda). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 1078-1084.
- Duggan I.C., van Overdijk C.D.A., Bailey S.A., Jenkins P.T., Limén H., MacIsaac H.J.** 2005. Invertebrates associated with residual ballast water and sediments of cargo-carrying ships entering the Great Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62: 2463-2474.

- Dyer N.A., Lawton S.P., Ravel S., Choi K.S., Lehane M.J., Robinson A.S., Okedi L.M., Hall M.J.R., Solano P., Donnelly M.J.** 2008. Molecular phylogenetics of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) based on mitochondrial (COI, 16S, ND2) nad nuclear ribosomal DNA sequences, with an emphasis on the *palpalis* group. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 227-239.
- Elliott J.M.** 1971. Upstream movements of benthic invertebrates in a lake district stream. *Journal of Animal Ecology* 40(1): 235-252.
- Ewel J.J., O'Dowd D.J., Bergelson J., Daehler C.C., D'Antonio C.M., Gómez L.D., Gordon D.R., Hobbs R.J., Holt A., Hopper K.R., Hughes C.E., LaHart M., Leakey R.R.B., Lee W.G., Loope L.L., Lorence D.H., Louda S.M., Lugo A.E., McEvoy P.B., Richardson D.M., Vitousek P.M.** 1999. Deliberate introductions of species: Research needs – Benefits can be reaped, but risks are high. *BioScience* 49(8): 619-630.
- Figuerola J., Green A.J.** 2002a. Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshwater Biology* 47: 483-494.
- Figuerola J., Green A.J.** 2002b. How frequent is external transport of seeds and invertebrate eggs by waterbirds? A study in Doñana, SW Spain. *Archiv für Hydrobiologie* 155(4): 557-565.
- Figuerola J., Green A.J., Santamaría L.** 2003. Passive internal transport of aquatic organisms by waterfowl in Doñana, south-west Spain. *Global Ecology & Biogeography* 12: 427-436.
- Filipová L., Kozubíková E., Petrušek A.** 2006a. *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817) – rak pruhovaný. pp. 237-239. In: Mlíkovský J., Stýblo P. (eds.) Nepůvodní druhy fauny a flóry České republiky. *Praha: ČSOP* ISBN 978-80-903329-7-3, pp. 456.
- Filipová L., Petrušek A., Kozák P., Polícar T.** 2006b. *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) – rak signální. pp. 239-240. In: Mlíkovský J., Stýblo P. (eds.) Nepůvodní druhy fauny a flóry České republiky. *Praha: ČSOP* ISBN 978-80-903329-7-3, pp. 456.
- Flasarová M.** 1975. *Proasellus coxalis septentrionalis* (Herbst) (Isopoda: Asellota) in Böhmen und Mähren. *Věstník Československé společnosti zoologické* 39: 254-264.
- Flasarová M.** 1996. Poznámky o Isopodech (Crustacea: Isopoda: Asellota and Oniscidea) v severozápadních Čechách. I. *Sborník Okresního muzea v Mostě, řada přírodovědná* 18: 18-20.
- Flössner D.** 1987. Populationsdynamik and Produktion von *Asellus aquaticus* (L.) und *Proasellus coxalis* (Dollfus) in der mittleren Saale. *Limnologica* 18: 279-295.
- Galil B.S., Nehring S., Panov V.** 2007. Waterways as invasion highways – impact of climate change and globalization. pp. 64-74. In: Nentwing W. (ed.) Biological invasions. Ecological studies, vol. 193. *Berlin: Springer – Verlag* ISBN-10 3-540-36919-8, pp. 443.
- Gerecke R., Stoch F., Meisch C., Schrankel I.** 2005. Die Fauna der Quellen und des hyporheischen Interstitials in Luxemburg. Unter besonderer Berücksichtigung der Acari, Ostracoda und Copepoda. - Ferrantia. *Travaux scientifiques du Musée national d'histoire naturelle* 41: 1- 134.
- Gherardi F., Gollasch S., Minchin D., Olenin S., Panov V.E.** 2009. Alien invertebrates and fish in European inland waters. pp. 81-92. In: DAISIE (Delivering Alien Invasive Species

Inventories for Europe). Handbook of alien species in Europe. Invading Nature - Springer Series in Invasion Ecology. *New York: Springer* ISBN 978-1-4020-8279-5, pp. 399.

Gollasch S., MacDonald E., Belson S., Botnen H., Christensen J.T., Hamer J.P., Houvenaghel G., Jelmert A., Lucas I., Masson D., McCollin, Olenin S., Persson A., Wallentinus I., Wetsteyn L.P.M.J., Wittling T 2002. Life in ballast tanks. pp. 217-231. In: Leppäkoski E., Gollasch S., Olenin S. (eds.) *Invasive aquatic species of Europe: distribution, impacts and management*. Dordrecht: *Kluwer Academic Publisher* ISBN 1-4020-0837-6, pp. 583.

Gray D.K., Johengen T.H., Reid D.F., MacIsaac H.J. 2007. Efficacy of open-ocean ballast water exchange as a means of preventing invertebrate invasions between freshwater ports.

Green A.J., Figuerola J. 2005. Recent advances in the study of long-distance dispersal of aquatic invertebrates via birds. *Diversity and Distributions* 11: 149-156.

Green A.J., Sánchez M.I. 2006. Passive internal dispersal of insect larvae by migratory birds. *Biology Letters* 2: 55-57.

Gruner H.E. 1965. Krebstiere oder Crustacea. In: Dahl R. (ed.): *Die Tierwelt Deutschlands* 51 (1). Jena, *Gustav Fischer*, pp. 149.

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

Havel J.E., Hebert P.D.N. 1993. *Daphnia lumholtzi* in North America: Another exotic zooplankter. *Limnology and oceanography* 38(8): 1823-1827.

Hebert P.D., Ratnasingham S., deWaard J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B* (Suppl.) 270: S96-S99.

Herhaus K.F. 1977. Die Verarbeitung von *Proasellus coxalis* (Dollfus, 1892) (Crustacea, Isopoda, Asellidae) in Mitteleuropa. *Zoologischer Anzeiger Jena* 199: 314-324.

Heuss K. 1976. Neufunde von *Proasellus coxalis* (Dollfus, 1892) (Crustacea, Isopoda, Asellidae) in Deutschland und der Schweiz. *Gewässer und Abwässer* 60/61: 70.

Hewitt G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247–276.

Horecký J., Špaček J., Petrusek A. 2006. *Proasellus coxalis* (Dollfus, 1892). pp. 240-242. In: Mlíkovský J., Stýblo P. (eds.) *Nepůvodní druhy fauny a flóry České republiky*. Praha: ČSOP ISBN 978-80-903329-7-3, pp. 456.

Horecký J., Špaček J. 2007. *Proasellus coxalis* s.l. (Malacostraca: Isopoda) – invadér nebo přehlížený turista? pp. 38. In: Bryja J., Zukal J., Řehák Z. (eds.) *Zoologické dny Brno 2007*, Sborník abstraktů z konference 8. -9. února 2007. Brno: *Ústav biologie obratlovců AV ČR* ISBN 978-80-903329-7-3, pp. 224.

Horká I. 2006. *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) – rak bahenní. pp.229-231. In: Mlíkovský J., Stýblo P. (eds.) *Nepůvodní druhy fauny a flóry České republiky*. Praha: ČSOP ISBN 978-80-903329-7-3, pp. 456.

- Hughes D.A.** 1970. Some factors affecting drift and upstream movements of *Gammarus pulex*. *Ecology* 51(2): 301-305.
- Jażdżewski K.** 1980. Range extensions of some gammaridean species in European inland waters caused by human activity. *Crustaceana Supplement* 6: 84-106.
- Josens G., Bij de Vaate A., Usseglio-Polatera P., Cammaerts R., Chérot F., Grisez F., Verboonen P., Vanden Bossche J.P.** 2005. Native and exotic Amphipoda and other Peracarida in the River Meuse: new assemblages emerge from a fast changing fauna. *Hydrobiologia* 542: 203-220.
- Karatayev A.Y., Burlakova L.E., Padilla D.K.** 1997. The effects of *Dreissena polymorpha* (Pallas) invasion on aquatic communities in eastern Europe. *Journal of Shellfish Research* 16(1): 187-203.
- Kelly L.C., Bilton D.T., Rundle S.D.** 2001. Population structure and dispersal in the Canary Island caddisfly *Mesophylax aspersus* (Trichoptera, Limnephilidae). *Heredity* 86: 370-377.
- Ketmaier V., Argano R., Cobolli M., De Matthaeis E., Messina G.** 2001. A systematic and biogeographical study of epi- and hypogean populations of the *Proasellus* species group from Sardinia, central Italy and Jordan: allozyme insights. *Journal of zoological systematics and evolutionary research* 39: 53-61.
- Ketmaier V.** 2002. Isolation by distance, gene flow and phylogeography in the *Proasellus coxalis*-group (Crustacea, Isopoda) in Central Italy: allozyme data. *Aquatic sciences* 64: 66-75.
- Ketmaier V., Argano R., Cacccone A.** 2003. Phylogeography and molecular rates of subterranean aquatic Stenassellid Isopods with a peri- Tyrrhenian distribution. *Molecular Ecology* 12: 547-555.
- Kimura M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Knowlton N., Weight L.A., Solorzano L.A., Mills De E.K., Bermingham E.** 1993. Divergence in proteins, motichondrial DNA, and reproductive compatibility across the isthmus of Panama. *Science* 260: 1629-1632.
- Kovats Z.E., Ciborowski J.J.H., Corkum L.D.** 1996. Inland dispersal of adult aquatic insects. *Freshwater Biology* 36: 265-276.
- Kubíček F. & Opravilová V.** 1999. Isopoda. *Folia Facultatis Sientarium Naturalium Universitatis Masarykianae Brunensis, Biologia* 101: 155-157.
- Lefébure T., Douady J., Gouy M., Trontelj P., Briolay J., Gibert J.** 2006. Phylogeography of subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology* 15: 1797-1806.
- Lellák J., Kořínek V., Fott J., Kořínková J., Punčochář P.** 1972. Biologie vodních živočichů. *Univerzita Karlova – Praha*, pp. 220.
- Leppäkoski E., Gollasch S., Olenin S.** 2002. Introduction: Alien species in European waters. pp. 1-6. In: Leppäkoski E., Gollasch S., Olenin S. (eds.) *Invasive aquatic species of Europe:*

distribution, impacts and management. *Dordrecht: Kluwer Academic Publisher* ISBN 1-4020-0837-6, pp. 583.

Leuven R.S.E.W., Van der Velde G., Baijens I., Snijders J., Van der Zwart Ch., Lenders H.J.R., Bij de Vaate A. 2009. The river Rhine: a global highway for dispersal of aquatic invasive species. *Biological invasions* 11: 1989-2008.

Maguire B. 1963. The passive dispersal of small aquatic organisms and their colonization of isolated bodies of water. *Ecological Monographs* 33(2): 161-185.

Makarewicz J.C., Grigorovich I.A., Mills E., Dmaske E., Cristescu M.E., Pearsal W., LaVoie M.J., Keats R., Rudstam L., Hebert P., Halbritter H., Kelly T., Matkovich C., MacIsaac H.J. 2001. Distribution, fecundity, and genetics of *Cercopagis pengoi* (Ostroumov) (Crustacea, Cladocera) in lake Ontario. *Journal of Great Lakes Research* 27(1): 19-32.

Malmqvist B. 2002. Aquatic invertebrates in riverine landscapes. *Freshwater Biology* 47: 679-694.

Martin J.W. & Davis G. E. 2001. An Updated Classification of the Recent Crustacea. *Los Angeles: Natural History Museum of Los Angeles County* ISSN: 1-891276-27-1, pp. 132.

Minckley W.L. 1964. Upstream movements of *Gammarus* (Amphipoda) in Doe Run, Meade County, Kentucky. *Ecology* 45(1): 195-197.

Morvan, C., Malard, F., Paradis, E., Lefébure, T., Konecny-Dupré, L., Douady, C.J. 2013. Timetree of Aselloidea Reveals Species Diversification Dynamics in Groundwater. *Systematic Biology* 62(4): 512–522.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263–273.

Müller K. 1982. The Colonization Cycle of Freshwater Insects. *Oecologia* 52: 202-207.

Murphy P.M., Learner M.A. 1982. The life history and production of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) in the River Ely, South Wales. *Freshwater Biology* 12: 435–444

Nalepa T.F. 1994. Decline of native unionid bivalves in Lake St. Clair after infestation by the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51: 2227-2233.

Nehring S. 2002. Biological invasions into German waters: an evaluation of the importance of different human-mediated vectors for nonindigenous macrozoobenthic species. pp. 373-383. In: Leppäkoski E., Gollasch S., Olenin S. (eds.) Invasive aquatic species of Europe: distribution, impacts and management. *Dordrecht: Kluwer Academic Publisher* ISBN 1-4020-0837-6, pp. 583.

Nehring S. 2005. International shipping – A risk for aquatic biodiversity in Germany. In: Nentwig W., Bacher S., Cock M.J.W., Dietz H., Gigon A., Wittenberg R. (eds.) Biological Invasions: From Ecology to Control. *Neobiota* 6: 125-143.

Nehring S., Leuchs H. 2000. Neozoen im Macrozoobenthos der Brackwässer an der deutschen Nordseeküste. *Lauterbornia* 39: 73-116.

- Olenin S., Leppäkoski E.** 1999. Non-native animals in the Baltic Sea: alteration of benthic habitats in coastal inlets and lagoons. *Hydrobiologia* 393: 233-243.
- Palmer M.A., Allan J.D., Butman CH.A.** 1996. Dispersal as a regional process affecting the local dynamics of marine and stream benthic invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution* 11(8): 322-326.
- Panov V.E., Krylov P.I., Riccardi N.** 2004. Role of diapause in dispersal and invasion success by aquatic invertebrates. *Journal of Limnology* 63(1): 56-69.
- Panov V.E., Alexandrov B., Arbačiauskas K., Binimelis R., Copp G.H., Grabowski M., Lucy F., Leuven R.S.E.W., Nehring S., Paunović M., Semenchenko V., Son M.O.** 2009. Assessing the risks of aquatic species invasions via European inland waterways: from concepts to environmental indicators. *Integrated Environmental Assessment and Management* 5(1): 110-126.
- Peck S.B.** 1975. Amphipod dispersal in the fur of aquatic mammals. *The Canadian Field-Naturalist* 89: 181-182.
- Pešková M.** 2008. Sezónní změny v populacích berušky vodní *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) ve Středočeském kraji – Bakalářská práce. *Přírodovědecká fakulta Ostravská Univerzita v Ostravě*, pp. 45.
- Petrusek A.** 2006. *Dikerogammarus villosus* (Sovinsky, 1984) – blešivec velkohrbý. pp. 233-234. In: Mlíkovský J., Stýblo P. (eds.) *Nepůvodní druhy fauny a flory České republiky*. Praha: ČSOP ISBN 978-80-903329-7-3, pp. 456.
- Petrusek A., Thielsch A., Schwenk K.** 2012. Mitochondrial sequence variation suggests extensive cryptic diversity within the Western Palearctic *Daphnia longispina* complex. *Limnology and Oceanography* 57(6): 1838-1845.
- Rawer-Jost C., Kappus B., Böhmer J., Jansen W., Rahmann H.** 1999. Upstream movements of benthic macroinvertebrates in two different types of fishways in southwestern Germany. *Hydrobiologia* 391: 47-61.
- Reinhold von M., Tittizer T.** 1997. Zur Rolle von Schiffen als Vektoren beim Faunenaustausch Rhein/Main/Main-Donau-Kanal/Donau. *Deutsche Gewässerkundliche Mitteilungen* 41: 199-205.
- Riccardi A., MacIsaac H.J.** 2000. Recent mass invasion of the North American Great Lakes by Ponto Caspian species. *Trends in Ecology & Evolution* 15(2): 62-65.
- Segerstråle S.G.** 1954. The freshwater amphipods, *Gammarus pulex* (L.) and *Gammarus lacustris* G. O. Sars, in Denmark and Fennoscandia – A contribution to the late- and post-glacial immigration history of the aquatic fauna of northern Europe. *Societas Scientiarum Fennica Commentationes Biologicae* 15: 1-91.
- Sket B.** 1999. The nature of biodiversity in hypogean waters and how it is endangered. *Biodiversity and Conservation* 8: 1319–1338.
- Stoch F.** 1989. Critical remarks on the southern Italian asellids described by E. Dudich (1925) with redescriptions of some taxa (Crustacea, Isopoda, Asellota). *Miscellanea Zoologica Hungarica* 5: 61-69.

- Stoch F., Valentino F., Volpi E.** 1996. Taxonomic and biogeographic analysis of the *Proasellus coxalis*-group (Crustacea, Isopoda, Asellidae) in Sicily, with description of *Proasellus mantalentii* n. sp. *Hydrobiologia* 317: 247-258.
- Straka M., Špaček J.** 2009. First record of alien crustaceans *Atyaephyra desmarestii* (Millet, 1831) and *Jaera istri* Veuille, 1979 from the Czech Republic. *Aquatic Invasions* 4(2): 397-399.
- Střížek A.** 2012. Kolonizace Střední Evropy bentickým sladkovodním korýšem *Asellus aquaticus* (Isopoda, Crustacea) – Diplomová práce. *Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova v Praze*, pp. 86.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.** 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Taylor D.J., Finston T.L., Hebert P.D.N.** 1998. Biogeography of a widespread freshwater Crustacean: pseudocongruence and cryptic endemism in the North American *Daphnia laevis* complex. *Evolution* 52(6): 1648-1670.
- Thiéry A.** 1997. Horizontal distribution and abundance of cysts of several large branchiopods in temporary pool and ditch sediments. *Hydrobiologia* 359: 177-189.
- Tittizer T.** 1997. Ausbreitung aquatischer Neozoen (Makrozoobenthos) in den europäischen Wasserstrassen, erläutert am Beispiel des Main-Donau-Kanals. In: Kavka G. (ed.) Güteentwicklung der Donau: Rückblick und Perspektiven. *Schriftenreihe des Bundesamtes für Wasserwirtschaft* 4: 113-134.
- Tittizer T., Schöll F., Banning M., Haybach A., Schleuter M.** 2000. Aquatische Neozoen im Makrozoobenthos der Binnenwasserstraßen Deutschlands. *Lauterbornia* 39: 1-72.
- Tittizer T., Schöll F., Banning M., Haybach A., Schleuter M.** 2000. Aquatische Neozoen im Makrozoobenthos der Binnenwasserstraßen Deutschlands. *Lauterbornia* 39: 1-72.
- Townsend C.R., Begon M., Harper J.L.** 2008. Essentials of ecology. ISBN: 978-1-4051-5658-5, pp. 510.
- Trakhtenbrot A., Nathan R., Perry G., Richardson D.M.** 2005. The importance of long-distance dispersal in biodiversity conservation. *Diversity and Distribution* 11: 173-181.
- Trontelj P., Machino Y., Sket B.** 2005. Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 212–226.
- Uvára V.** 1985. Příspěvek k poznání biologie *Asellus aquaticus* L. (Crustacea, Isopoda). *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, facultas rerum naturalium, Biologica* 26: 155-164.
- Van der Velde G., Nagelkerken I., Rajagopal S., Bij de Vaate A.** 2002. Invasions by alien species in inland freshwater bodies in western Europe: the Rhine delta. pp. 360-372. In: Leppäkoski E., Gollasch S., Olenin S. (eds.) Invasive aquatic species of Europe: distribution, impacts and management. *Dordrecht: Kluwer Academic Publisher* ISBN 1-4020-0837-6, pp. 583.

- Vanschoenwinkel B., Waterkeyn A., Vandecaetsbeek T., Pineau O., Grillas P., Brendonck L.** 2008. Dispersal of freshwater invertebrates by large terrestrial mammals: a case study with wild boar (*Sus scrofa*) in Mediterranean wetlands. *Freshwater Biology* 53: 2264-2273.
- Vanschoenwinkel B., Pinceel T., Vanhove M.P.M., Denis C., Jocque M., Timms B.V., Brendonck L.** 2012. Toward a global phylogeny of the „living fossil“ Crustacean order of the Notostraca. *Plos One* 7(4): 1-9.
- Verovnik R., Sket B., Trontelj P.** 2005. The colonization of Europe by the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) proceeded from ancient refugia and was directed by habitat connectivity. *Molecular Ecology* 14: 4355 – 4369.
- Walker D. and Avise J.C.** 1998. Principles of phylogeography as illustrated by freshwater and terrestrial turtles in the southeastern United States. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 23–58.
- Waterkeyn A., Pineau O., Grillas P., Brendonck L.** 2010. Invertebrate dispersal by aquatic mammals: a case study with nutria *Myocastor coypus* (Rodentia, Mammalia) in Southern France. *Hydrobiologia* 654: 267-271.
- Weider L.J., Hobaek A.** 1997. Postglacial dispersal, glacial refugia, and clonal structure in Russian/Siberian populations of the arctic *Daphnia pulex* complex. *Heredity* 78: 363-372.
- Wesselingh F.P., Cadée G.C., Renema W.** 1999. Flying high: on the airborne dispersal of aquatic organisms as illustrated by the distribution histories of the gastropod genera *Tryonia* and *Planorbarius*. *Geologie en Mijnbouw* 78: 165-174.
- Williams D.D., Williams N.E.** 1993. The upstream/downstream movement paradox of lotic invertebrates: quantitative evidence from a Welsh mountain stream. *Freshwater Biology* 30: 199-218.
- Wolff W.J.** 1973. The distribution of *Asellus aquaticus* (L.) and *Prosellus meridianus* (Rac.) in the southwestern part of Netherlands. *Hydrobiologia* 42(4): 381-392.

INTERNETOVÉ ZDROJE:

- Lundin K.** 2003. *Proasellus coxalis*.
http://www.artfakta.se/Artfaktablad/Proasellus_Coxalis_101632.pdf, navštíveno 16. 6. 2013.
- ČHMÚ:** Výběr profilů jakosti povrchových vod, taxon: *Proasellus coxalis*.
<http://hydro.chmi.cz/isarrow/mfilter.php?agenda=POV>, navštíveno: 7. 8. 2013.
- Portál mezinárodní komise pro stratigrafii**, International Commission on Stratigraphy – ICS.
<http://www.stratigraphy.org>, navštíveno 7. 8. 2013.

SEZNAM PŘÍLOH

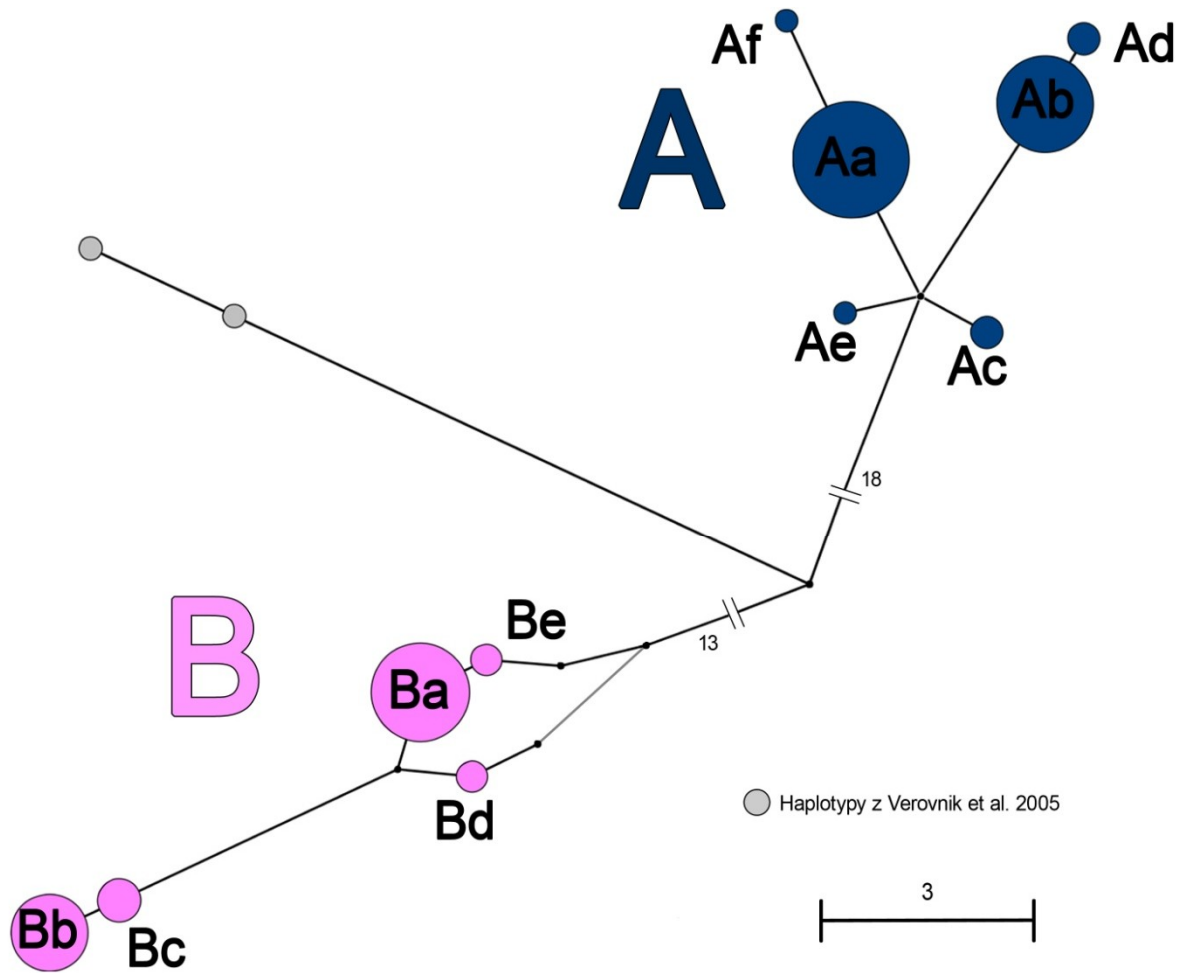
1. PROTOKOL PURIFIKACE PCR PRODUKTŮ
2. HAPLOTYPOVÁ SÍŤ - OZNAČENÍ HAPLOTYPŮ Z ÚZEMÍ ČESKÉ REPUBLIKY
3. TABULKA VŠECH ANALYZOVANÝCH VZORKŮ
4. TABULKA SEKVENCÍ STAŽENÝCH Z DATABÁZE GENBANK

Příloha č. 1. Protokol purifikace PCR produktů.

Protokol purifikace PCR produktů metodou ethanolové precipitace.

1. Dodáme k PCR produktu H₂O (pro PCR), tak aby bylo v každém stripu 100 µl.
2. Přepitujeme do 1,5 ml zkumavek, popíšeme.
3. Přidáme octan sodný (1/10 objemu), tj. 10 µl.
4. Přidáme 2násobek objemu vymraženého ethanolu (99,9 %) = 200 µl.
5. Protřepeme.
6. Centrifugace 10 min., 14 000 RPM.
7. Odsajeme pipetou tekutinu, lze též opatrně vylít, PCR produkt je vysrážený na dně.
8. Odsávanou tekutinu pipetujeme do kádinky.
9. Přidáme 100 µl vymraženého 75% ethanolu.
10. Promícháme.
11. Centrifugace 10 min., 14 000 RPM, opět odpipetujeme / vylijeme tekutinu nad PCR produktem.
12. Dáme vysušit do heat-blocku, vysušíme úplně do sucha (cca 2 hod.) při teplotě 40 °C (vzorky necháme otevřené, heat-block ohradíme alobalem).
13. Po vysušení dolijeme 20-25 µl H₂O (pro PCR), podle množství PCR produktu (síla proužku při elektroforéze).
14. Kontrola – nanesením na gel (proužek může svítit i v jamce, většinou jsou proužky slabší).

Příloha č. 2. Haplotypová síť zobrazující označení jednotlivých názvů haplotypů vyskytujících se na území České republiky.



Příloha č. 3. Souhrnná tabulka analyzovaných vzorků.

Kód vzorku	Název lokality	Povodí	Habitat tok /tůň	GPS	Datum	Odebral	Kód izo-látu	Haplo- typ COI	28S A/-
DYPri1	Přítluky 04 – Dyje	Dyje	Dyje	N48 50.626 E16 44.016	23.04.09	Markéta Koprnická	9	Bb	-
DYPri2	Přítluky 04 – Dyje	Dyje	Dyje	N48 50.626 E16 44.016	23.04.09	Markéta Koprnická	10	Ab	-
DYPri5	Přítluky 04 – Dyje	Dyje	Dyje	N48 50.626 E16 44.016	23.04.09	Markéta Koprnická	106	Bb	-
DYSou1	Soutok Dyje	Dyje	Dyje	N48 37.446 E16 55.219	24.04.09	Markéta Koprnická	31	Bb	-
DYSou2	Soutok Dyje	Dyje	Dyje	N48 37.446 E16 55.219	24.04.09	Markéta Koprnická	32	Bb	A
LABor1	Boreček, Ploučnice	Labe	Ploučnice	N50 37.860 E14 43.123	16.04.13	Markéta Koprnická	147	Ba	-
LABor2	Boreček, Ploučnice	Labe	Ploučnice	N50 37.860 E14 43.123	16.04.13	Markéta Koprnická	148	Ba	-
LABor3	Boreček, Ploučnice	Labe	Ploučnice	N50 37.860 E14 43.123	16.04.13	Markéta Koprnická	149	Ba	-
LABor4	Boreček, Ploučnice	Labe	Ploučnice	N50 37.860 E14 43.123	16.04.13	Markéta Koprnická	150	Ba	A
LABor5	Boreček, Ploučnice	Labe	Ploučnice	N50 37.860 E14 43.123	16.04.13	Markéta Koprnická	151	Ba	-
LACer1	Černínovsko 1	Labe	tůň	N50 17 13.2 E14 30 21.5	23.03.07	Veronika Sacharová	44	Aa	-
LACer2	Černínovsko 1	Labe	tůň	N50 17 13.2 E14 30 21.5	23.03.07	Veronika Sacharová	7	Ba	-
LACer3	Černínovsko 1	Labe	tůň	N50 17 13.2 E14 30 21.5	23.03.07	Veronika Sacharová	8	Aa	-
LACer5	Černínovsko 1	Labe	tůň	N50 17 13.2 E14 30 21.5	23.03.07	Veronika Sacharová	39	Bd	-
LACer6	Černínovsko 1	Labe	tůň	N50 17 13.2 E14 30 21.5	23.03.07	Veronika Sacharová	142	Ba	-
LALba1	Libický luh	Labe	Bačovka	N50 06.108 E15 11.018	02.05.13	Jan Špaček	155	Bc	-
LALba2	Libický luh	Labe	Bačovka	N50 06.108 E15 11.018	02.05.13	Jan Špaček	156	Bc	A
LALba3	Libický luh	Labe	Bačovka	N50 06.108 E15 11.018	02.05.13	Jan Špaček	157	Bc	-
LALib1	Liblice 2	Vltava	tůň	N50 18.566 E14 35.289	15.04.09	Antonín Střížek	49	Aa	-
LALib2	Liblice 2	Vltava	tůň	N50 18.566 E14 35.289	15.04.09	Antonín Střížek	127	Ba	A
LASmi2	Smiřice	Labe	tůň	N50 17.447 E15 51.856	12.04.07	Veronika Sacharová	23	Bd	-
LASmi5	Smiřice	Labe	tůň	N50 17.447 E15 51.856	12.04.07	Veronika Sacharová	42	Aa	-
LASmi6	Smiřice	Labe	tůň	N50 17.447 E15 51.856	12.04.07	Veronika Sacharová	21	Aa	-
LASmi7	Smiřice	Labe	tůň	N50 17.447 E15 51.856	12.04.07	Veronika Sacharová	91	Bc	-
LASmi8	Smiřice	Labe	tůň	N50 17.447 E15 51.856	12.04.07	Veronika Sacharová	110	Aa	-
LAVa1	Valy, Labe	Labe	Labe	N50 01.983 E15 37.002	02.05.13	Jan Špaček	158	Ba	-
LAZab1	Záboří n. Labem 3	Labe	tůň	N50 01.395 E15 20.142	21.03.07	Veronika Sacharová	36	Aa	-
LAZab2	Záboří n. Labem 3	Labe	tůň	N50 01.395 E15 20.142	21.03.07	Veronika Sacharová	37	Ab	-
LAZab3	Záboří n. Labem 3	Labe	tůň	N50 01.395 E15 20.142	21.03.07	Veronika Sacharová	101	Ab	A
MOHej1	Hejtmanka, most	Morava	Morava	N49 42.961 E17 01.536	25.04.10	Antonín Střížek	55	Ab	-
MOHej2	Hejtmanka, most	Morava	Morava	N49 42.961 E17 01.536	25.04.10	Antonín Střížek	56	Ab	A
MOHej3	Hejtmanka, most	Morava	Morava	N49 42.961 E17 01.536	25.04.10	Antonín Střížek	94	Bb	-
MOHej5	Hejtmanka, most	Morava	Morava	N49 42.961 E17 01.536	25.04.10	Antonín Střížek	119	Ab	-
MOHej6	Hejtmanka, most	Morava	Morava	N49 42.961 E17 01.536	25.04.10	Antonín Střížek	121	Bb	A
MOMor1	Morava1	Morava	Morava	N48 47.147 E17 05.292	25.04.09	Markéta Koprnická	67	Aa	A
MOSTr1	Střeň 9	Morava	Morava	N49 41.029 E17 08.951	24.04.10	Antonín Střížek	57	Ad	-
MOSTr2	Střeň 9	Morava	Morava	N49 41.029 E17 08.951	24.04.10	Antonín Střížek	58	Bb	A
MOSTr3	Střeň 9	Morava	Morava	N49 41.029 E17 08.951	24.04.10	Antonín Střížek	95	Ab	-
MOSTr5	Střeň 9	Morava	Morava	N49 41.029 E17 08.951	24.04.10	Antonín Střížek	113	Ab	-
MOSTr6	Střeň 9	Morava	Morava	N49 41.029 E17 08.951	24.04.10	Antonín Střížek	115	Ad	-
MOTvd1	Tvrdonice 9	Morava	tůň	N48 46.141 E17 03.066	25.04.09	Markéta Koprnická	4	Aa	-
MOTvd2	Tvrdonice 9	Morava	tůň	N48 46.141 E17 03.066	25.04.09	Markéta Koprnická	5	Aa	-
MOTvd3	Tvrdonice 9	Morava	tůň	N48 46.141 E17 03.066	25.04.09	Markéta Koprnická	6	Aa	-
MOTvd4	Tvrdonice 9	Morava	tůň	N48 46.141 E17 03.066	25.04.09	Markéta Koprnická	136	Aa	-
MOTvd5	Tvrdonice 9	Morava	tůň	N48 46.141 E17 03.066	25.04.09	Markéta Koprnická	137	Aa	-
MOTvr1	Tvrdonice 13	Morava	tůň	N48 42.126 E16 59.559	25.04.09	Markéta Koprnická	1	Ae	-
MOTvr2	Tvrdonice 13	Morava	tůň	N48 42.126 E16 59.559	25.04.09	Markéta Koprnická	2	Aa	A
MOTvr3	Tvrdonice 13	Morava	tůň	N48 42.126 E16 59.559	25.04.09	Markéta Koprnická	3	Aa	-
MOTvr5	Tvrdonice 13	Morava	tůň	N48 42.126 E16 59.559	25.04.09	Markéta Koprnická	140	Aa	-
OHBoh1	Bohušovice	Ohře	Ohře	N50 29.531 E14 09.436	03.05.10	Markéta Koprnická	53	Ba	-
OHKav1	Karlovy Vary 1	Ohře	Ohře	N50 12.900 E12 49.664	15.04.09	Antonín Střížek	249	Ba	-
ORKos1	Kostelec n. Orlicí	Labe	Štědrý p.	N50 07.749 E16 13.082	25.04.13	Jan Špaček	159	Ba	-
ORKos2	Kostelec n. Orlicí	Labe	Štědrý p.	N50 07.749 E16 13.082	25.04.13	Jan Špaček	160	Ba	A
ORTys1	Týniště	Labe	tůň	N50 09.171 E16 03.844	26.04.10	Antonín Střížek	79	Aa	A
ORTys2	Týniště	Labe	tůň	N50 09.171 E16 03.844	25.04.10	Antonín Střížek	90	Aa	-

ORTys3	Týniště	Labe	tůň	N50 09.171 E16 03.844	26.04.10	Antonín Střížek	30	Aa	-
ORTys4	Týniště	Labe	tůň	N50 09.171 E16 03.844	25.04.10	Antonín Střížek	122	Aa	-
ORTys5	Týniště	Labe	tůň	N50 09.171 E16 03.844	25.04.10	Antonín Střížek	123	Aa	-
ORTys6	Týniště	Labe	tůň	N50 09.171 E16 03.844	25.04.10	Antonín Střížek	80	Aa	-
ORTys7	Týniště	Labe	tůň	N50 09.171 E16 03.844	26.04.10	Antonín Střížek	33	Aa	-
ORTys8	Týniště	Labe	tůň	N50 09.171 E16 03.844	26.04.10	Antonín Střížek	41	Aa	-
VLBak1	Hobšovice	Vltava	Bakovský p.	N50 16.177 E14 09.513	26.04.13	Natálie Lapšanská	172	Ac	-
VLBak2	Hobšovice	Vltava	Bakovský p.	N50 16.177 E14 09.513	26.04.13	Natálie Lapšanská	173	Ac	-
VLBel1	Bělá	Vltava	Bělá	N49 27.467 E15 14.115	02.05.13	Natálie Lapšanská	166	Aa	-
VLBel2	Bělá	Vltava	Bělá	N49 27.467 E15 14.115	02.05.13	Natálie Lapšanská	167	Af	-
VLBel3	Bělá	Vltava	Bělá	N49 27.467 E15 14.115	02.05.13	Natálie Lapšanská	168	Aa	A
VLBel4	Bělá	Vltava	Bělá	N49 27.467 E15 14.115	02.05.13	Natálie Lapšanská	169	Aa	-
VLBel5	Bělá	Vltava	Bělá	N49 27.467 E15 14.115	02.05.13	Natálie Lapšanská	170	Aa	-
VLHal1	Halámky	Vltava	Lužnice	N48 51.139 E14 54.637	01.06.09	Markéta Koprnická	45	Ba	-
VLHal2	Halámky	Vltava	Lužnice	N48 51.139 E14 54.637	01.06.09	Markéta Koprnická	46	Ab	-
VLHal3	Halámky	Vltava	Lužnice	N48 51.139 E14 54.637	01.06.09	Markéta Koprnická	47	Ab	-
VLHal4	Halámky	Vltava	Lužnice	N48 51.139 E14 54.637	01.06.09	Markéta Koprnická	105	Ba	-
VLHal5	Halámky	Vltava	Lužnice	N48 51.139 E14 54.637	01.06.09	Markéta Koprnická	128	Ab	-
VLHal6	Halámky	Vltava	Lužnice	N48 51.139 E14 54.637	01.06.09	Markéta Koprnická	132	Ab	-
VLHal7	Halámky	Vltava	Lužnice	N48 51.139 E14 54.637	01.06.09	Markéta Koprnická	133	Ab	-
VLluz1	Lužnice	Vltava	Lužnice	N49 04.841 E14 45.469	30.05.09	Markéta Koprnická	24	Bb	-
VLluz2	Lužnice	Vltava	Lužnice	N49 04.841 E14 45.469	30.05.09	Markéta Koprnická	25	Ba	A
VLluz3	Lužnice	Vltava	Lužnice	N49 04.841 E14 45.469	30.05.09	Markéta Koprnická	26	Ba	-
VLluz5	Lužnice	Vltava	Lužnice	N49 04.841 E14 45.469	30.05.09	Markéta Koprnická	103	Ba	-
VLPor1	Poříčí, Želivka	Vltava	Želivka	N49 32.083 E15 12.010	21.05.13	Natálie Lapšanská	176	Be	A
VLPor2	Poříčí, Želivka	Vltava	Želivka	N49 32.083 E15 12.010	21.05.13	Natálie Lapšanská	177	Be	-
VLPor3	Poříčí, Želivka	Vltava	Želivka	N49 32.083 E15 12.010	21.05.13	Natálie Lapšanská	178	Ab	-
VLrou1	Roudné	Vltava	Malše	N48 56.076 E14 29.390	01.06.09	Markéta Koprnická	48	Bb	A
VLrou2	Roudné	Vltava	Malše	N48 56.076 E14 29.390	01.06.09	Markéta Koprnická	130	Bb	-
VLrou3	Roudné	Vltava	Malše	N48 56.076 E14 29.390	01.06.09	Markéta Koprnická	131	Bb	-
VLtus1	Tušť	Vltava	Lužnice	N48 53.529 E14 53.156	01.06.09	Markéta Koprnická	27	Ab	-
VLtus2	Tušť	Vltava	Lužnice	N48 53.529 E14 53.156	01.06.09	Markéta Koprnická	28	Ba	-
VLtus3	Tušť	Vltava	Lužnice	N48 53.529 E14 53.156	01.06.09	Markéta Koprnická	29	Ab	A
VLtus4	Tušť	Vltava	Lužnice	N48 53.529 E14 53.156	01.06.09	Markéta Koprnická	92	Ab	-
VLtus6	Tušť	Vltava	Lužnice	N48 53.529 E14 53.156	01.06.09	Markéta Koprnická	104	Ba	-
VLzel1	Zelčín	Vltava	Vltava	N50 19.172 E14 26.990	03.10.08	Markéta Koprnická	40	Aa	-
VLzev1	Brtná - Želiv,	Vltava	Trnava	N49 31.381 E15 12.508	09.05.13	Natálie Lapšanská	161	Ab	A
VLzev2	Brtná - Želiv,	Vltava	Trnava	N49 31.381 E15 12.508	09.05.13	Natálie Lapšanská	162	Bb	-
VLzev3	Brtná - Želiv,	Vltava	Trnava	N49 31.381 E15 12.508	09.05.13	Natálie Lapšanská	163	Ba	-
VLzev4	Brtná - Želiv,	Vltava	Trnava	N49 31.381 E15 12.508	09.05.13	Natálie Lapšanská	164	Bb	-
VLzev5	Brtná - Želiv,	Vltava	Trnava	N49 31.381 E15 12.508	09.05.13	Natálie Lapšanská	165	Ab	-

Příloha č. 4. Tabulka sekvencí stažených z databáze GenBank.

Gen	Accession number	Populace	Kód	GPS	Stát	Druh
COI	JQ921162.1	TLEMCEN	YAS861	N34.7734 W1.25053	Algeria	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921163.1	TLEMCEN	YLK100	N34.7734 W1.25053	Algeria	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921164.1	TLEMCEN	YLK582	N34.7734 W1.25053	Algeria	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921151.1	BUNAR	YLK400	N42.72361 E17.87611	Croatia	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921152.1	BUNAR	YLK581	N42.72361 E17.87611	Croatia	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921153.1	BUNAR	YAB013	N42.72361 E17.87611	Croatia	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921154.1	LOPAR	YLK449	N44.83083 E14.73194	Croatia	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921155.1	LOPAR	YLK595	N44.83083 E14.73194	Croatia	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921173.1	AMUNT	YAS229	N42.46861 E3.09222	France	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921174.1	AMUNT	YCD316	N42.46861 E3.09222	France	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921148.1	CASAMOZA	YAS469	N42.51861 E9.44222	France	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921149.1	CASAMOZA	YAS406	N42.51861 E9.44222	France	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921150.1	CASAMOZA	YAS470	N42.51861 E9.44222	France	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921171.1	GAJA	YLK575	N43.19722 E2.42028	France	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921156.1	MILLAS	YAS468	N42.68056 E2.70583	France	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921169.1	LAUCHA1	YLK812	N51.39622 E11.98671	Germany	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921170.1	LAUCHA2	YCD91	N51.38177 E11.95397	Germany	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921160.1	TRICHONI	YLK450	N38.60278 E21.55639	Greece	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921161.1	TRICHONI	YLK577	N38.60278 E21.55639	Greece	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921146.1	CALPONT	YAS738	N43.82683 E11.30172	Italy	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921147.1	CALPONT	YAS798	N43.82683 E11.30172	Italy	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921165.1	QUERCIOLO	YAS755	N43.84525 E11.32144	Italy	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921141.1	BEITED	YLK352	N33.70255 E35.47058	Lebanon	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921142.1	BEITED	YLK348	N33.70255 E35.47058	Lebanon	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921145.1	BISRI	YLK590	N33.5802 E35.53548	Lebanon	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921137.1	DADES	YCD10	N31.3668 W5.97527	Morocco	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921138.1	NZALA	YCD71	N32.6269 W8.41032	Morocco	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921139.1	NZALA	YCD76	N32.6269 W8.41032	Morocco	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921140.1	NZALA	YCD77	N32.6269 W8.41032	Morocco	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921157.1	NAUERNAA	YLK319	N52.46431 E4.76365	Netherlands	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	DQ144752.1	-	PA5	-	Slovenia	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	DQ144751.1	-	PA4	-	Slovenia	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921143.1	BENAJO1	YCD238	N36.75376 W5.20183	Spain	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921144.1	BENAJO1	YCD231	N36.75376 W5.20183	Spain	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921158.1	ORFES	YAS877	N42.17053 E2.86924	Spain	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921159.1	ORFES	YLK163	N42.17053 E2.86924	Spain	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921166.1	RAAN	YAS498	N55.999 E12.766	Sweden	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921167.1	RAAN	YLK745	N55.999 E12.766	Sweden	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921168.1	RAAN	YLK817	N55.999 E12.766	Sweden	<i>Proasellus coxalis</i>
COI	JQ921172.1	STENSAN	YAS471	N56.428 E12.873	Sweden	<i>Proasellus coxalis</i>
28S	JQ921924.1	TLEMCEN	YLK640	N34.7734 W1.25053	Algeria	<i>Proasellus coxalis</i>
28S	JQ921922.1	BUNAR	YLK426	N42.72361 E17.87611	Croatia	<i>Proasellus coxalis</i>
28S	JQ921921.1	CASAMOZA	YAS409	N42.51861 E9.44222	France	<i>Proasellus coxalis</i>
28S	JQ921923.1	TRICHONI	YLK359	N38.60278 E21.55639	Greece	<i>Proasellus coxalis</i>
28S	JQ921920.1	BISRI	YLK741	N33.5802 E35.53548	Lebanon	<i>Proasellus coxalis</i>
28S	DQ144777.1	-	PA4	-	Slovenia	<i>Proasellus coxalis</i>
28S	JQ922028.1	LAFINOU	YCD936	44.87955 N 1.61442 E	France	<i>Proasellus meridianus</i>