

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA EKOLOGIE



**Genetická struktura a původ středoevropských populací listonoha jarního  
*Lepidurus apus* (Crustacea: Notostraca)**

Bc. Lucie Vopařilová

Školitelka: RNDr. Veronika Sacherová, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Veroniky Sacherové, Ph.D., a že jsem všechny použité literární zdroje řádně ocitovala.

V Praze dne 14.8. 2014

---

Bc. Lucie Vopařilová

## Abstrakt

Sladkovodní bezobratlí živočichové a zejména obývající dočasné vody jsou vhodnými modelovými organismy pro studium jejich šíření v jejich fragmentovaném prostředí. Listonoh *Lepidurus apus* (Notostraca) se vyskytuje pouze v tzv. jarních tůňích, které se vytvářejí v nivách velkých řek.

Tato diplomová práce se zaměřuje na zjištění genetické variability a struktury střeoevropských populací *L. apus*. Na základě analýzy mitochondriálního genu pro COI u celkem 45 jedinců převážně z populací na území České republiky bylo zjištěno, že všichni jedinci ze střeoevropských populací patří do poddruhu *L. apus apus* a že úroveň genetické variability a struktury těchto populací je poměrně nízká (v průměru 0,2 %). Zjištěné výsledky jsou porovnávány s jinými zástupci řádu Notostraca, ale také s českými populacemi dalšího druhu typického pro jarní tůň, tj. žábřonozkou sněžní (*Eubbranchipus grubii*, Anostraca) a také jsou diskutovány možné příčiny takto nízkých hodnot.

- klíčová slova: *Lepidurus apus*, COI, ITS, fylogram, disperze,

## Abstract

Freshwater invertebrates especially species from temporary ponds are suitable model organisms for studying of dispersal mechanisms in their discontinuous habitats. Tadpole shrimp *Lepidurus apus* (Notostraca) is restricted to vernal temporary waters in floodplain areas of big rivers.

This Master's thesis is concentrated on survey of genetic variability and structure of *L. apus* population from Central Europe. Mitochondrial COI analysis of 45 specimens mostly from the Czech Republic indicates that all Central European specimens falls into the subspecies *L. apus apus* and also indicates low level of genetic variability and structure (on average 0,2 %). These results are confronted with other notostracan species, additionally with czech populations of coldstenothermal brine shrimp *Eubbranchipus grubii* (Anostraca) and possible reasons of the low values are discussed.

- key-words: *Lepidurus apus*, COI, ITS, phylogram, dispersion

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své školitelce RNDr. Veronice Sacherové, Ph.D. nejen za celkové vedení a financování této práce, ale též za trpělivost a velmi cenné rady, které mi poskytla při sepisování práce.

Mé poděkování patří i všem členům katedry Ekologie PřF UK v Praze, kteří se podíleli na terénním sběru vzorků v letech 2006 - 2009. Za pomoc a rady při práci v laboratoři děkuji RNDr. Jasně Vukić a Mgr. Martinu Krajíčkovi.

V neposlední řadě chci poděkovat mé rodině za podporu v průběhu mého studia.

Vám všem, velmi děkuji.

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	5
1.1 Vývoj sladkovodních biotopů střední Evropy .....	5
1.1.1 Obecná charakteristika čtvrtohor .....	5
1.1.2 Vliv čtvrtohorních procesů na vývoj říčních toků .....	6
1.1.3 Dopad střídání dob ledových a meziledových na organismy .....	8
1.2. Modelový organismus – <i>Lepidurus apus</i> (listonoh jarní) .....	10
1.2.1. Poznámky k taxonomii druhu <i>Lepidurus apus</i> .....	11
1.2.2 Biologie a ekologie poddruhu <i>L. apus apus</i> (listonoh jarní) .....	12
1.2.3 Výskyt <i>L. apus apus</i> a popis jeho biotopu .....	13
1.2.4 Adaptace listonohů na prostředí jarních tůní .....	14
<b>2 Cíle práce</b> .....	15
<b>3. Metodika</b> .....	16
3.1 Lokality .....	16
3.2 Odběr jedinců a zpracování vzorků .....	16
<b>4. Výsledky</b> .....	19
4.1 Odebrané lokality .....	19
4.2 Výsledky analýzy pro gen COI .....	22
4.3 Výsledky analýzy pro ITS .....	26
<b>5. Diskuze</b> .....	29
5. 1 Rozšíření a taxonomické uspořádání druhu <i>Lepidurus apus</i> .....	30
5.2 Genetická struktura střeoevropských populací <i>L. apus</i> .....	32
<b>6. Závěr</b> .....	37
 Citovaná literatura .....	 38
Přílohy.....	46

## 1. Úvod

Sladkovodní bezobratlé organismy obývají rozmanité habitaty tekoucích i stojatých vod, které jsou od sebe odděleny pro tyto organismy neobyvatelným suchozemským prostředím. Zejména pro stojaté vody jako jsou jezera, rybníky či tůně je typická jejich izolovanost (fragmentovanost) v prostoru a také nestálost, způsobená především teplotními výkyvy (velká sucha či mráz) či samotnou sukcesí, jež mohou vést až k zániku vodní nádrže. Sladkovodní bezobratlí živočichové se na tyto podmínky prostředí dokázali adaptovat – jsou tak schopni přežít vyschnutí nádrže a také jsou schopni migrovat a šířit se na jiné lokality (Cáceres 1997). Jen u menšiny sladkovodních bezobratlých živočichů je možné aktivní šíření (např. vodní brouci, ploštice), zatímco většina z nich je odkázána na pasivní šíření pomocí různých vektorů (vítr, vodní tok, jiní živočichové, ale i lidská činnost) (Brendonck a Riddoch 1999, Cáceres a Soluk 2002; Figuerola a Green 2002, Green a Figuerola 2005). Specifickým druhem stojatých vod jsou periodické (efemerní) vody, mezi které řadíme i tzv. jarní tůně vyskytující se pouze během jarních měsíců v nivních oblastech velkých řek. Typičtí obyvatelé jarních tůní, jako je např. listonoh jarní (*Lepidurus apus*) a žábbronožka sněžní (*Eubranchipus grubii*), mohou být využiti jako vhodné modelové organismy pro studium možností, jak probíhá šíření sladkovodních bezobratlých živočichů a osidlování území po ústupu čtvrtohorního zalednění.

### 1.1 Vývoj sladkovodních biotopů střední Evropy

Hlavní geomorfologické procesy zahrnující i vytváření říčních sítí na kontinentech probíhaly již v období třetihor, avšak současná podoba zemského povrchu byla a nadále je ovlivňována geomorfologickými procesy a také klimatickými změnami ve čtvrtohorách. Jelikož modelový organismus listonoh jarní (*Lepidurus apus*) obývá v současnosti tzv. jarní tůně v nivních oblastech velkých řek, budu se v této kapitole věnovat vlivu čtvrtohor na utváření říčních systémů.

#### 1.1.1 Obecná charakteristika čtvrtohor

Čtvrtohory můžeme charakterizovat jako období, které začalo přibližně před 2 miliony let a které se dělí na dvě dílčí období: starší období neboli pleistocén (1,8 – 0,01 milionů let před současností) a mladší období neboli holocén, které trvá od konce pleistocénu až po současnost (Ložek 2001). V průběhu čtvrtohor docházelo k cyklickým změnám podnebí, kdy se střídala chladná období označovaná jako glaciály (doby ledové) a teplejší období označovaná jako interglaciály (doby meziledové). Ve stručnosti můžeme říci, že pokles teploty v glaciálech byl doprovázen zvýšeným množstvím srážek a následně vznikem ledovců, z nichž největší pevninský ledovcový štít pokrýval rozlehlé severské oblasti Severní Ameriky a Eurasie. Ledovce vázaly veliké množství vody, což mělo za následek snížení

hladiny světových moří o 120-140 metrů. Celkově se tak střídání glaciálů a interglaciálů projevovalo změnami rozsahu nezaledněné části kontinentů a také tvaru zemského povrchu (Ložek 2007).

V teplejších obdobích, tj. v meziledových dobách (interglaciálech) a v době poledové (tj. období holocénu), byla průměrná roční teplota kolem 10 až 12° stupňů, což je o 2 až 3° stupně více než je tomu v současnosti. Zároveň byla teplejší období vlhčí, roční srážkové úhrny byly o 75 – 100 % vyšší na rozdíl od současnosti. Kombinace teplejšího a vlhčího podnebí měla za následek úplné zalesnění území střední Evropy. Pro období teplotního optima holocénu byly na tomto území charakteristické listnaté lesy a v nížinatých oblastech (např. na území ČR v Polabí a na jižní Moravě) se utvořila lesostep (Ložek 1973).

V dobách ledových (glaciálech) dosahovaly průměrné roční teploty hodnot -3 až -4 °C, což je v porovnání se současnými průměrnými teplotami pokles asi o 11 až 13°C. Nízké teploty a nižší množství dostupných srážek nepříznivě působily na vegetaci, zejména na lesy, a většina území tak měla podobu tundry. Na horských hřebenech se vytvořila tzv. kamenitá tundra, zatímco pro nížiny byla charakteristická tzv. studená sprašová step (Ložek 1973).

### 1.1.2 Vliv čtvrtohorních procesů na vývoj říčních toků

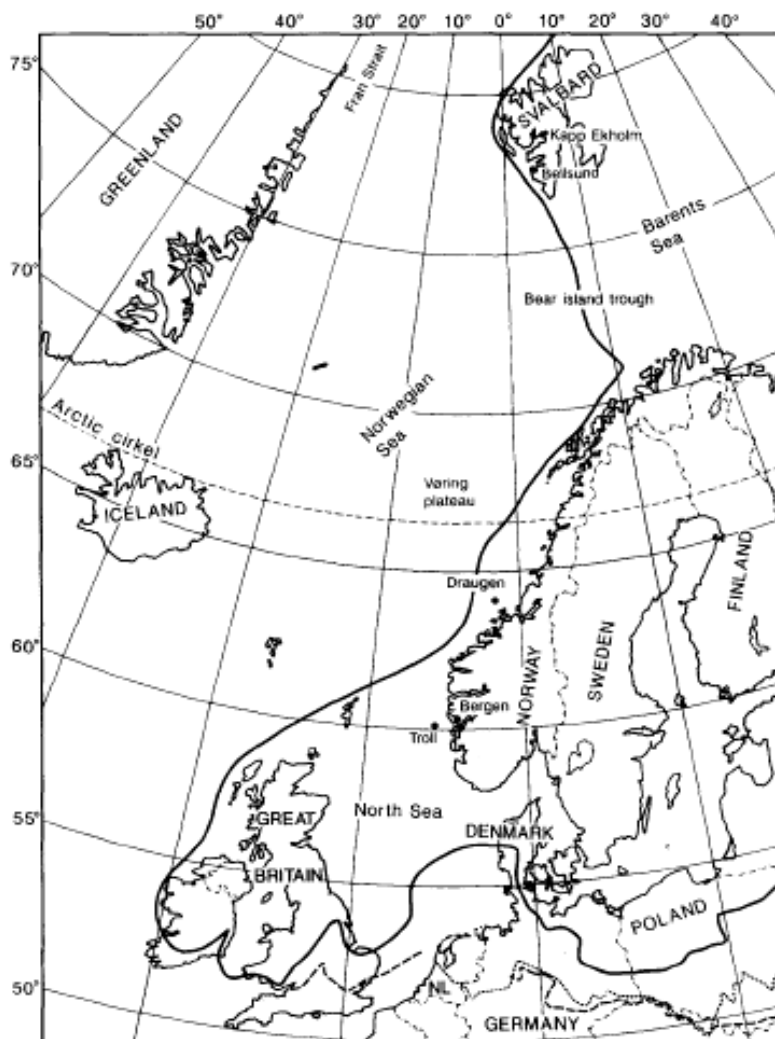
Střídání dob ledových a meziledových, ale i střídání teplejších a chladnějších kratších výkyvů v rámci ledových dob (tj. střídání stadiálů a interstadiálů) ovlivňovalo i podobu říčních systémů na území střední Evropy. Území České republiky a území dalších středoevropských států v odpovídající zeměpisné šířce se během glaciálů nacházelo v tzv. periglaciálním koridoru – tj. v oblasti, která sice nebyla zaledněná, ale byla ovlivněna blízkou přítomností skandinávského pevninského ledovce od severu a horského alpského ledovce od jihu (Ložek 2007), *Obr. 1.* Chronologický přehled glaciálů a interglaciálů, které ovlivňovaly

území Evropy, je uveden v Přílohách.



*Obr.1: Rozsah zalednění v Evropě a střední Evropa jako periglaciální koridor. Pevninský ledovcový štít a horské ledovce jsou znázorněny šrafováním, tečkovaná linie představuje hranici permafrostu (převzato z Hewitt 1999)*

Maximální rozsah skandinávského ledovcového štítu se v jednotlivých dobách ledových lišil. Nejjižněji pronikl ledovcový štít při sálském a elsterském (halštrovském) glaciálu, kdy pokrýval značnou část současného území Polska a severního Německa a zasahoval i do příhraničních oblastí současného území České republiky (Růžička 2004). V období viselského glaciálu (tj. nejmladší doby ledové) pevninský ledovec nedosáhl na území ČR, pouze pokrýval území dnešního Polska severovýchodního Německa přibližně k 53°s.š. (Mangerud a kol. 1995, *Obr. 2*)



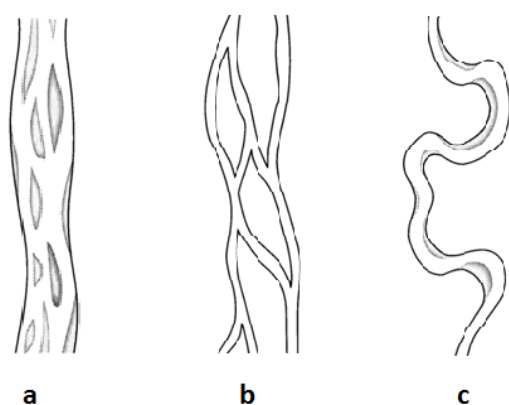
*Obr. 2: Rozsah skandinávského ledovcového štítu během viselského (plná linie), sálského (tečkovaná linie) a elsterského glaciálu (čárkovaná linie); (převzato z Mangerud a kol. 1995)*

Na vývoji a morfologii říčních toků se podílelo kromě geologického podloží a stavu podnebí i několik vzájemně se doplňujících faktorů, které jsou prvotně závislé na klimatických podmínkách: 1. hustota vegetačního pokryvu v okolí toků, 2. přítomnost nezamrzající, krátkodobě či trvale zmrzlé půdy a 3. zrnitost sedimentu / unášeného materiálu (Mol a kol. 2000). V interglaciálech, tedy v obdobích s teplejším klimatem, dobře vyvinutou vegetací a půdami, řeky vytvářely stabilní meandrující koryta, poměrně dost zahloubená do terénu. Naopak v glaciálech, kdy nízké teploty omezily růst vegetace a docházelo k promrzání



půdy, se vytvářely tzv. divočící toky, které měly podobu zesíťovaných mělkých koryt, která se neustále měnila (přesunovala) v štěrkopískových nánosech (Ložek 1973).

Toto tradiční rozdělení říčních typů spadajících buď do období interglaciálu či glaciálu doplnily novodobější studie o vývoji řek z oblastí periglaciálního koridoru (např. z Německa a Nizozemí, Mol a kol. 2000), které na základě datovaných sedimentů z nejmladší doby ledové prokázaly, že typy říčních koryt se měnily i v průběhu dob ledových a to v závislosti na teplotních výkyvech v jednotlivých obdobích. V teplejších obdobích ledových dob se vyskytovala meandrující koryta, v nejchladnějších obdobích se vytvářely divočící toky a jako přechodný typ v určitých obdobích vznikala dočasně pospojovaná říční koryta, tzv. anastomozující říční tok, viz *Obr. 3*. Výrazné změny v uspořádání říčního koryta jsou v sedimentárních nálezech patrné zejména v přechodech mezi jednotlivými obdobími (Vandenberghe a Woo 2002).



*Obr. 3: Typy říčních koryt periglaciálních řek*

*a – divočící tok*

*b – anastomozující tok*

*c – meandrující tok*

V nivách podél klidnějších meandrujících řek se vytvářely příbřežní valy oddělující slepá či stará říční ramena. Ta se postupně zazemňovala a byla v kontaktu s říčním korytem jen při povodních. V okolí řek tak mohly vznikat soustavy slepých ramen či tůní, které mohly být různou měrou zaplaveny vodou v závislosti na klimatických podmínkách (Ložek 1973).

Stejný charakter mají i tůně či periodické vodní nádrže vyskytující se v současnosti v nivách velkých středoevropských řek. V letním období, kdy převažuje suché klima, dochází k vysychání niv, zatímco v zimě nivy promrzají a jejich povrch je zasněžený. K naplnění tůní vodou (tj. k hydrofázi) dochází pouze při zvýšené vodní hladině řeky a to infiltrací nebo přelivem při povodni způsobené táním sněhu nebo dešti. Výše popsané jevy můžeme shrnout tak, že periodické tůně či vodní nádrže mají charakter tzv. povodňového jezera (Valoušek 1951).

### **1.1.3 Dopad střídání dob ledových a meziledových na organismy**

Kolísavé podnebí čtvrtohor je spojeno i s posunem klimatických pásem a z toho důvodu i vegetačních pásem od severu k jihu. Glaciální cykly tak zásadně ovlivňovaly rozšíření organismů. Na pokles teplot na začátku glaciálu reagovaly druhy ústupem do nižších

zeměpisných šířek, do oblastí označovaných jako refugia, a v interglaciálech se postupně přesunovaly zase zpět. Tyto migrace ztěžovaly organismům rozmanité bariéry pro šíření, zejména v podobě horských pásem (Alpy, Karpaty, Pyreneje) a moří (Středozevní, Černé, Kaspické moře). Různé druhy organismů dokázaly bariéry s různou úspěšností překonat a během těchto opakujících se migračních a kolonizačních cest docházelo i k vyhynutí některých populací nebo druhů (Hewitt 1996).

### Refugia

Termínem refugium je označované území uvnitř areálu rozšíření určitého druhu, které umožňuje dlouhodobé přežití dostatečně početné subpopulace během klimatických změn, ať glaciálů či interglaciálů (Bennett a kol. 1991). Pro období glaciálů sloužila pro druhy mírného pásu (a tedy i pro středoevropské druhy) na evropském kontinentu tři hlavní glaciální refugia - Apeninský, Balkánský a Pyrenejský poloostrov. Povrch těchto tří poloostrovů je hornatý, proto se taxony mohly vyrovnávat s klimatickými změnami i díky posunům do různých nadmořských výšek (Hewitt 2004).

Některé druhy, které neměly tak vysoké teplotní nároky, mohly přežívat období glaciálů i v severnějších zeměpisných šířkách v tzv. severních kryptických refugiích – např. oblasti dnešního Maďarska či Belgie. V porovnání s třemi hlavními evropskými glaciálními refugii nezabírala tato refugia tak velká území (proto se pro ně používá i označení mikrorefugium) a nebyla ani tolik stabilní v čase a více reagovala na aktuální změny rozsahu zalednění (Stewart a Lister 2001).

### Genetická struktura populací v refugiích a při kolonizacích

Migrace organismů do refugií a následné kolonizování území po ústupu zalednění se projevilo také na genetické struktuře populací druhů.

Tři hlavní evropská glaciální refugia byla stabilními prostředím jak v prostoru, tak v čase, a tak zde docházelo k souvislému nahromadění mutací v subpopulacích. Subpopulace v refugiích se tak postupně staly centry genetické rozmanitosti pro daný druh a tato centra mohou zahrnovat větší množství jedinečných haplotypů. Naproti tomu subpopulace mimo (stabilní) refugia jsou více náchylné na lokální extinkce, a proto mají nižší genetickou rozmanitost (Hewitt 2004).

Na genetické struktuře populací se projeví také kolonizace neboli expanze z refugií. Byly popsány dva typy kolonizací, které se liší rozdílnou rychlostí a počtem kolonizujících jedinců. Pro kolonizaci označovanou jako „pionýr“ je charakteristické to, že kolonizace volných lokalit se účastní jen nízký počet jedinců z původní populace v refugiu a dochází k

jejich rychlému rozmnožení a obsazení území potomky „kolonizátorů“. Takto dojde k situaci, kdy se úspěšně rozšíří jen omezený počet linií a u dceřiných populací nacházíme vysokou míru homogenity a malé množství haplotypů ve srovnání s původní mateřskou populací. Druhým typem je kolonizace označovaná jako „falanga“, která má pomalý průběh. Nové území postupně kolonizují potomci velkého množství jedinců mateřské populace, což má za následek značnou podobnost genetické struktury mezi dceřinými populacemi a mateřskou populací (Hewitt 1996, 2004).

Může dojít i k situaci, že se druh šíří z více refugií, čímž dochází také k šíření odlišných genealogických linií na nová území. V oblasti, kde se setkají populace z odlišných refugií, vzniká tzv. hybridní zóna. V této zóně se uskutečňuje genový tok mezi jedinci z odlišných linií a nacházíme zde pak hybridní genotyp (Hewitt 2000). V hybridních zónách se tak objevuje celkem vysoká míra genetické rozmanitosti, v některých případech je dokonce vyšší, než genetická rozmanitost uvnitř původních refugií. Na rozdíl od hybridní zóny ale refugia obsahují zásadně vyšší množství jedinečných haplotypů a vykazují větší stáří jednotlivých genealogických linií uvnitř refugií (Petit a kol. 2003).

## **1. 2. Modelový organismus – *Lepidurus apus* (listonoh jarní)**

Modelovým organismem mé diplomové práce je listonoh jarní *Lepidurus apus* (Linnaeus, 1758), který je zástupcem řádu Notostraca (listonozi) patřící do třídy korýšů Branchiopoda:

kmen: Arthropoda (členovci)

podkmen: Crustacea (korýši)

třída: Branchiopoda (lupenonožci)

podtřída: Phyllopoda

řád: Notostraca (listonozi)

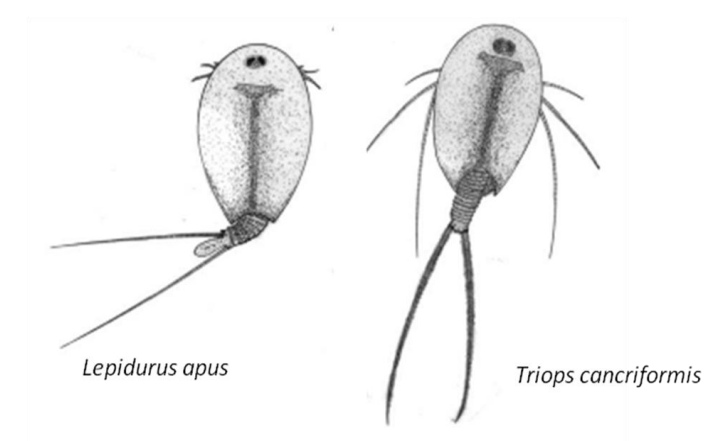
čeleď: Triopsidae

rod: *Lepidurus*

Nejen pro zástupce řádu Notostraca, ale i pro zástupce dalších dvou skupin patřících do třídy Branchiopoda (tj. Anostraca – žábřonky, Conchostraca – škeblivky) se ujal označení „velcí lupenonožci“. Většina velkých lupenonožců je vázána na tzv. dočasné (efemerní) vody, méně druhů velkých lupenonožců obývá trvalé vody (jezera). V obou případech se může jednat o sladkovodní, slané či alkalické vody (Dumont a Negrea 2002). Výskyt těchto korýšů je značně ovlivněn přítomností vodních predátorů, zejména ryb, a to z důvodu jejich malé pohyblivosti a velmi malé schopnosti se predaci bránit (Korhola a Rautio 2001).

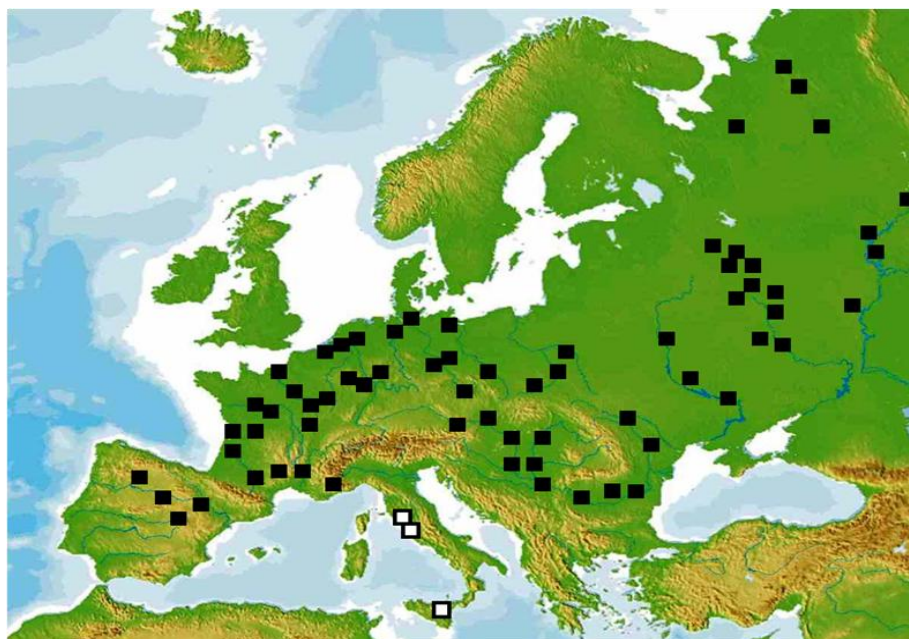
### 1.2.1. Poznámky k taxonomii druhu *Lepidurus apus*

Řád Notostraca zahrnuje pouze jedinou čeleď Triopsidae se dvěma rody – *Lepidurus* a *Triops*. Tyto dva rody prodělaly od své divergence před více než 250 miliony let jen minimální morfologické změny, a proto bývají listonohové označovány za „živoucí fosilie“ (Longhurst 1955a). Současné příslušníky těchto dvou rodů můžeme od sebe odlišit podle přítomnosti ploutvičky mezi štěty a délky štítu – u rodu *Lepidurus* je ploutvička přítomna a štít zasahuje přes více zadečkových článků, u rodu *Triops* ploutvička chybí, štít je vykrojenější a kryje méně zadečkových článků (Obr 4.)



Obr. 4: Základní morfologické odlišnosti dvou nejnámějších druhů listonohů *L. apus* a *T. cancriformis* (převzato z Brendonck a kol. 2008)

Podle současné platné nomenklatury zahrnuje druh *Lepidurus apus* Linnaeus, 1758 tři poddruhy. Nejvíce rozšířeným poddruhem na území Evropy je *L. apus apus* (listonoh jarní), zatímco poddruh *L. apus lubbocki* byl nalezen pouze na malém území Itálie, v severní Africe a v Izraeli. Třetí poddruh *L. apus viridis* se vyskytuje pouze v Austrálii a na Novém Zélandu (shrnuto podle Vanschenwinkel a kol. 2012, text S1). Areál výskytu poddruhů *L. apus apus* a *L. apus lubbocki* v Evropě znázorňuje Obr. 5 (vytvořeno podle Brtek a Thiéry 1995).



Obr. 5: Areál výskytu poddruhů *L. a. apus* (■) a *L. a. lubbocki* (□) v Evropě.

### 1.2.2 Biologie a ekologie poddruhu *L. apus apus* (listonoh jarní)

Tělo listonohů se skládá ze 3 částí: zploštělá hlava, thorax a abdomen a je zakončeno dvěma štěty (caudal rami). U všech současných zástupců rodu *Lepidurus* je na posledním zadečkovém článku přítomna mezi štěty ploutvička. Hlava, thorax a několik abdomenálních článků jsou kryté vejčitým karapaxem (štítem), který je v zadní části vykrojený. V přední části karapaxu se nachází oční políčko, na kterém je umístěno naupliové oko a pár přisedlých složených očí. Hrudní končetiny jsou lupenité, za posledním párem končetin se u samic nachází vajíčky s vajíčky. Listonozi dýchají pomocí epipoditového výběžku na hrudních končetinách. Dospělí jedinci mohou dorůstat velikosti až 70 - 90 mm (Šrámek-Hušek a kol. 1962).

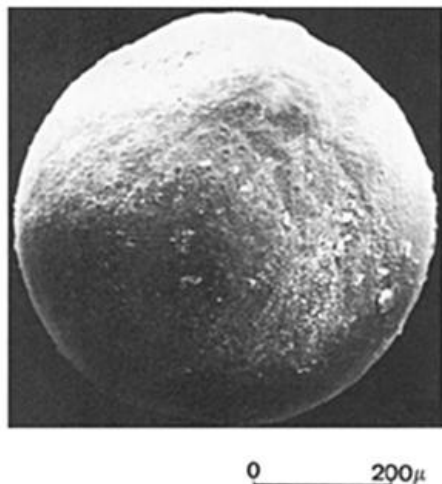
Listonohové jsou bentické organismy, pohybují se v sedimentu pomocí několika párů končetin s drápkou nebo se přichycují na ve vodě se nacházející rostlinný materiál (Kapler 1940). Potravou listonohů je detrit, řasy, měkké rostlinné tkáně, ale také živí či mrtví bezobratlí živočichové, u *L. apus* byl pozorován i aktivní lov (např. žábřonožek vyskytujících se ve stejné tůni (Kapler 1943 a vlastní pozorování).

#### Rozmnožování a životní cyklus

Mezi zástupci řádu Notostraca nalezneme druhy, které jsou gonochoristické (tj. mají oddělené pohlaví produkující 2 odlišné typy gamet), ale u některých druhů se nachází u některých populací kromě gonochorismu i zvláštní způsob rozmnožování – tzv. androdioécie, kdy se v jedné populaci vyskytují společně samci a hermafroditičtí jedinci schopní samooplodnění. Tento způsob rozmnožování byl zaznamenán u několika druhů listonohů v obou rodech (*Lepidurus*, *Triops*) a zdá se, že se vytvořil během evoluce opakovaně (Mathers a kol. 2013). Jako třetí způsob rozmnožování u zástupců řádu Notostraca byla popsána partenogeneze a to u italských populací *Triops cancriformis* vyskytujících se v rýžovištích (Trentini a Scanabissi 1978). U populací poddruhu *L. apus apus* byla popsána androdioécie (shrnuto v Mathers a kol. 2013), zatímco populace poddruhu *L. apus lubbocki* jsou považovány za gonochoristické (Mantovani a kol. 2009), ačkoliv v některých populacích byla na základě histologických rozborů zjištěna sterilita samců (Scanabissi a Mondini 2002).

Vývoj listonohů je nepřímý a probíhá přes stádium naupliové larvy (Dodson a Frey 1991), která se za vhodných podmínek vylíhne z tzv. trvalých vajíček. U řádu Notostraca (a u dalších velkých lupenonožců) se vytvářejí pouze tzv. klidová vajíčka (Brendonck 1996). Pojem klidová „vajíčka“ není zcela správný, protože ve skutečnosti se jedná o embrya, která mají vývoj pozastavený nejčastěji ve stádiu gastruly a která jsou obklopena odolnými obaly (Aleksev a Starobogatov 1996). Trvalá vajíčka listonohů jsou kulovitěho tvaru (Obr. 6), jsou velká asi 0,5 mm a mají lepkavý povrch (Thiéry a Gasc 1991, Brendonck et De Meester

2003). Prostřední (alveolární) vrstva obsahuje vzduch, a proto při zaplavení tůň vodou dochází k uvolnění vajíček ze sedimentu a jejich vznášení se ve vodním sloupci (Brendonck a kol. 1998, podle Brendonck a De Meester 2003). Vývoj je poměrně rychlý, jedinci jej musí stihnout během několika měsíců, kdy je jarní tůň naplněna vodou. Pokud teplota vody přesáhne 15°C, jedinci hynou (Kapler 1943).



Obr. 6: Trvalá vajíčka druhu *Lepidurus apus* (převzato z Thiéry a Gasc 1991)

### 1.2.3 Výskyt *L. apus apus* a popis jeho biotopu

*L. apus apus* se vyskytuje roztroušeně po celém území Evropy a to zejména v nivních oblastech velkých řek, kde se v jarních měsících vytvářejí tzv. jarní tůň. Za jarní tůň můžeme považovat mrtvá ramena říčních toků, zatopené terénní deprese a prolákliny, ale i umělé prohlubně - např. koleje od těžké zemědělské techniky (detailnější popis tohoto biotopu viz níže). Listonohové jarní se na takovýchto lokalitách vyskytují od poloviny března do konce května, především v závislosti na teplotních podmínkách (Kapler 1943).

Jarní tůň se v Evropě nacházejí zejména v nivách velkých řek, často v lužních lesích nebo v jejich pozůstatcích. Ve střední Evropě se jarní tůň vyskytují především v nížinných územích podél řek Labe, Odra, Morava, Dunaj a jejich přítoků (Machar 1998).

Biotop jarních tůní je určen souborem specifickým vlastností. Dno jarních tůní se nachází pod úrovní hladiny podzemní vody. Proto jsou tůň primárně plněny podzemní vodou při zvýšení její hladiny během tání sněhové pokrývky a dochází k postupné infiltraci podzemní vody v nejhlubší části dna, tak jak během inundace stoupá říční hladina a s ní i hladina podzemní vody. Při normálním stavu vody není samotný tok propojen s tůňmi ve svém okolí, pokud však dojde k velké oblevě (rychlé odtávání velkého množství sněhu v povodí spojené např. i se zvýšeným úhrnem srážek) může dojít k tomu, že tůň je shora přeplavena povodňovou vlnou. Vodní fáze jarních tůní je krátká a dosahuje maximálně délky 5 měsíců (většinou méně) a během této fáze dochází k celému vývojovému cyklu organismů,

po zbývající část roku jsou tůň vyschlé (Valoušek 1951, Machar 1998). Krátké trvání hydrofáze má za následek nepřítomnost ryb a vrcholovými predátory se tak stávají ptáci, obojživelníci, larvy vodního hmyzu či právě samotní listonozi (Kapler 1943).

#### **1.2.4 Adaptace listonohů na prostředí jarních tůní**

Organismy obývající jarní tůň jsou na nestálost a proměnlivost tohoto prostředí dobře adaptovány – zvládají překonat vysychání svého prostředí, výkyvy teplot a příp. i nízký obsah živin. V neposlední řadě mají schopnost v nějaké fázi svého životního cyklu aktivně či pasivně migrovat mezi lokalitami (Hairston 1996). U sladkovodních bezobratlých organismů převažuje pasivní disperze, tj. šíření jedinců samotných či jejich vývojových stádií za pomoci nějakého vektoru (Bilton a kol. 2001).

##### Dormantní stádia

Hlavní adaptace listonohů na proměnlivé životní prostředí spočívá v produkci odolných dormantních stádií. Jak už bylo zmíněno výše, těmito dormantními stádii jsou tzv. klidová vajíčka (Brendonck 1996). Líhnutí tohoto typu vajíček je řízeno exogenně (na rozdíl od diapauzních vajíček) a umožňuje tak listonohům rychlé zareagování na příznivé podmínky prostředí (Brendonck 1996).

Trvalá vajíčka dovolují listonohům překonat období nejen s nevhodnými fyzikálními podmínkami, mezi které patří např. sucho, nízké či vysoké teploty, nízká koncentrace kyslíku ve vodě (Kapler 1939) či změna salinity (Kapler 1940, Grey a kol. 2005), ale i s biologickými podmínkami jako je predace, zhoršená potravní nabídka a kompetice (Hairston 1996).

##### Možnosti disperze

Disperze neboli proces šíření, může být definována jako „pohyb jedinců či propagulí mezi prostorově či časově oddělenými lokalitami nebo populacemi“ (Bilton a kol. 2001). Disperze může pro určitý druh přinášet výhody i nevýhody. Za hlavní výhodu je považováno zamezení křížení příbuzných jedinců (tj. inbreeding), dále možnost obsadit nové prostředí, v kterém je pravděpodobně nižší populační hustota a také nižší kompetice o zdroje, a také případný únik z nevyhovujících podmínek ve stávající lokalitě (např. parazitě, predátoři). Za nevýhody disperze můžeme naopak považovat problémy s nalezením a osídlením nové vhodné lokality, je tu také možnost predace přímo při disperzi, problémy s nalezením partnera pro rozmnožování a snížení intenzity křížení nepříbuzných jedinců téhož druhu (tj. outbreeding) (Stenseth a Lidicker 1992). Disperze může mít vliv na evoluci a populační

genetiku daného druhu, avšak jen v tom případě, že kolonizace nového prostředí byla úspěšná a dochází ke křížení mezi následujícími generacemi a bude tedy docházet ke genovému toku. Disperze také může velkou měrou omezit genetickou diferenciaci mezi populacemi – v případě, že je genový tok malý, může dojít k evolučnímu osamostatnění populací a to může mít za následek reprodukční izolaci až speciaci (Spieth 1974).

Obecně vzato trvalá vajíčka zástupců z celé třídy Branchiopoda mohou být vhodnými prostředky pro pasivní disperzi (Bilton a kol. 2001). Především pro zástupce řádu Anostraca (žábronožky) a Cladocera (perloočky) byly popsány různé vektory pasivní disperze. Jedná se zejména o externí (na tělním pokryvu) i interní (v zažívacím traktu) přenos jinými živočichy, hlavně vodními ptáky (např. Figuerola a kol. 2003, Frish a kol. 2007), dále o povodňovou vlnu na vodním toku (Hulsmans a kol. 2007) či o lidské aktivity (lodní doprava, průchod či průjezd lokalitou; Graham a Wirth 2008), v menší míře by se mohl uplatňovat i jako vektor vítr (např. Cáceres a Soluk 2002).

Vajíčka listonohů jsou ale lepkavá (Kapler 1943, Brendonck a De Meester 2003) a mohou se tak přichytit k sedimentu nebo na ponořené části rostlin, což by naopak mohlo snižovat možnost jejich disperze a zanesení z původní lokality do nevhodných podmínek. Ve střeoevropských lokalitách by pravděpodobně mohla být trvalá vajíčka listonohů šířena povodňovou vlnou a živočichy (vodní ptáci či savci navštěvující lokality).

## 2. Cíle práce

Z úvodního literárního přehledu vyplývá, že současná podoba sladkovodních ekosystémů a rozšíření organismů bylo značně ovlivněno čtvrtohorními klimatickými cykly. V blízkosti periglaciálních řek se vytvářely biotopy dočasných vod, které měly stejný charakter jako současné jarní tůně. Tyto specifické biotopy dnes nacházíme především v nivních oblastech velkých řek – ve střední Evropě se přitom zároveň jedná o řeky patřící do tří různých povodí (povodí Labe, Odry a Dunaje) patřících k různým úmořím. Typickými obyvateli jarních tůní jsou dva druhy velkých lupenonožců (třída Branchiopoda) – a to žábronožka sněžní (*Eubbranchipus grubii*) a listonoh jarní (*Lepidurus apus*).

Studium příbuznosti populací žábronožek sněžních (*Eubbranchipus grubii*) na území České republiky bylo prováděno v letech 2006 - 2008 v rámci mezinárodního projektu Eurocores / EuroDiversity „Connectivity, dispersal and priority effects as drivers of biodiversity and ecosystem function in pond and pool communities“ (BIOPOOL) (GA ČR DIV/06/E007). Protože listonoh jarní obývá stejný biotop jako žábronožka sněžní, byl tento druh zvolen jako modelový organismus předkládané diplomové práce za účelem získání dalších poznatků o možnostech šíření sladkovodních bezobratlých živočichů a osidlování území po ústupu pleistocenního zalednění.



Ve střední Evropě nebyla dosud provedena žádná rozsáhlá studie genetické struktury populací listonohů jarních (*Lepidurus apus apus*), pouze několik vzorků z území Rakouska, Německa a Polska bylo použito pro fylogenetické studie řádu Notostraca (Mantovani a kol. 2009, Richter a kol. 2007, Korn a kol. 2013, Mathers a kol. 2013).

Cíle mé diplomové práce jsou:

- zjistit genetickou strukturu populací listonohů jarních na území České republiky a ve střední Evropě (s využitím dat z veřejných databází)
- porovnat, zda genetická struktura populací koreluje s geografickým umístěním jejich lokalit (tj. s povodím řek) a porovnat ji se strukturou populací druhu *E. grubii* (Anostraca)
- na základě výsledků genetické struktury populací posoudit, jak na populace listonohů jarních působily pleistocenní klimatické cykly

### **3. Metodika**

#### **3.1 Lokality**

Lokality pro odběr jedinců byly vybírány po celém území České republiky podle informací o výskytu listonohů uvedených v historických (i recentních publikacích (např. Mayer 1936, Kapler 1943, Šrámek-Hušek 1940, Rulík a Měkotová 1995, Rychtrmocová 2008). Souhrnně můžeme říci, že lokality se nachází v nivních oblastech řek či v pozůstatcích dřívějších lužních lesů a většina z těchto lokalit je součástí státem chráněných území (maloplošných i velkoplošných). Všechny použité vzorky byly odebrané na základě udělených výjimek ze zákona o ochraně živočichů.

Lokality, ze kterých pochází vzorky listonohů analyzované v této práci, můžeme rozdělit podle povodí příslušných řek. Na území České republiky se nachází celkem 3 hlavní povodí: povodí Labe - patřící k úmoří Severního moře; povodí Moravy patřící k úmoří Černého moře a povodí Odry patřící k úmoří Baltského moře. V odběrných letech byly navštíveny lokality ve všech třech povodích.

#### **3.2 Odběr jedinců a zpracování vzorků**

Odběr jedinců listonohů probíhal v jarních měsících v letech 2006 až 2010 v závislosti na hydrofázi tůní či rozlín v nivách řek a vývoji listonohů (viz tabulka P2 v Přílohách). Odběr jedinců z lokalit prováděla autorka práce a pracovníci Katedry ekologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

K odběru listonohů jsme používali cedníky (s oky 1 x 1 mm). Odebrané jedince jsme následně umístili do epruvet s 96% etanolem. Epruvety byly označeny názvem lokality a datem odběru. U každé lokality byla též zaznamenána její poloha pomocí GPS.

### Izolace DNA

K izolaci DNA jsem používala DNA MinElute kit (Quiagen). Sterilním skalpelem jsem oddělila z těla listonoha několik zadečkových článků a vložila je do plastové zkumavky o objemu 2,5 ml s napipetovanými 180 µl pufru ATL. Plastovou tyčinkou jsem tkáň rozmělnila. Poté jsem přidala 20 µl proteinázy K, důkladně vzorek protřepala za použití vortexu a následně jsme vzorek inkubovala v topném bloku nejméně 3 hodiny při teplotě 56 °C. Po inkubaci jsem vzorek vortexovala po dobu 15 vteřin, poté přidala 200 µl pufru AL, znovu důkladně promíchala a přidala 200 µl etanolu (96 %) a znovu důkladně promíchala. Celý objem jsem přepipetovala do kolonky s membránou (která je součástí kitu) umístěné v sběrací zkumavce a centrifugovala 1 min při 8000 ot/ min. Obsah sběrací zkumavky jsem vylila a kolonku s membránou do ní zpět umístila. Přidala jsem 500 µl pufru AW1 a centrifugovala 1 min při 8000 ot/min. Opět jsem vylila obsah sběrací zkumavky a kolonku s membránou jsem do ní zpět umístila. Poté jsem přidala 500 µl pufru AW2 a centrifugovala 3 minuty při 14 000 ot/mit (v tomto kroku došlo k vysušení membrány). Sběrací zkumavku jsem vyhodila a kolonku s membránou umístila do čisté centrifugační zkumavky o objem 1,5 ml. Napipetovala jsem 200 µl pufru AE přímo na membránu a nechala vzorek inkubovat při pokojové teplotě 1 minutu. Poté jsem centrifugovala 1 minutu při 8000 ot/min a tím jsem získala izolát DNA. Izoláty DNA jsem uchovávala v označených mikrozkušavkách (1,5 ml) v chladničce při teplotě 4°C. Koncentraci DNA v získaných izolátech jsem proměřovala na přístroji NANODROP®.

Pro tuto práci byly zvoleny dva molekulární markery. Hlavním markerem byl úsek mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu podjednotku I (COI), což je velmi běžně používaný genetický marker nabízející možnost srovnání dat a výsledků pocházejících z jiných studií (Hebert a kol. 2003, Costa a kol. 2007). Jako doplňující marker byla vybrána sekvence kódována na jaderné ribozomální DNA označovaná jako „internal transcribed spacer“ neboli ITS-1, která se nachází mezi 18S a 5,8S (Chu a kol. 2001).

Pro amplifikaci části genu pro COI i pro ITS-1 jsem použila metodu polymerázové řetězové reakce neboli PCR (Mullis a kol. 1986) a používala jsem pro ni 35µl celkového PCR mixu (z toho objem izolované DNA byl 2µl).

Pro amplifikaci genu COI byly použity primery (Folmer a kol. 1994) se sekvencí:

CO I A (forward) : 5'- GGTC AACA AATCATAAAGATATTG  
CO I B (reverse): 3'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

a byl získán fragment o délce přibližně 600 bp.

Cyklus PCR pro amplifikaci genu COI měl toto schéma:

- I. 94 °C – 2:30 min (1x)
- II. 94 °C – 0:45 min  
45 °C - 1 min  
72°C – 1 min; (celkem 43x)
- III. 72°C – 10 min, (3x)

Pro amplifikaci úseků ITS-1 byly použity primery se sekvencí (Chu a kol. 2001):

SP-1-5' (H primer): 5'-CACACCGCCCGTCGCTACTA-3', umístěný na 18S rDNA  
SP-1-3' (L primer): 5'-ATTAGCTGCGGTCTTCATC-3', umístěný na 5,8S rDNA  
a požadovaný fragment DNA měl mít délku cca 300 bp.

Cyklus PCR pro amplifikaci úseků ITS-1 měl toto schéma (vycházející ze schématu navrženého Chu a kol. 2001, ale se zvýšením teploty pro nasednutí DNA v druhém cyklu z 56,8°C na 60°C):

- I. 94 °C – 1: 30 min (1x)
- II. 94 °C – 0: 20 min  
60 °C - 0:30 min  
72°C – 0:30 min; (celkem 33x)
- III. 72°C – 5 min (1x)

Získané amplifikované úseky DNA obou genetických markerů jsem kontrolovala vizuálně pomocí gelové elektroforézy (1,5% gel). PCR produkty s kladným výsledkem byly následně přečištěny. Nejprve jsem používala MinElute PCR Purification Kit, ale kvůli větší výtěžnosti jsem přešla na přečištění pomocí etanolové purifikace (protokol je uveden v Přílohách, P3). U několika PCR produktů pro ITS se opakované při gelové elektroforéze ukazovalo více proužků o různých délkách (od 300 po 1000 bp), a proto jsem v tomto případě musela produkty o požadované délce extrahovat z gelu a následně přečistit podle protokolu uvedeného v MinElute Gel Extraction Kit (2006).

U přečištěných PCR produktů jsem změřila koncentraci DNA na přístroji NANODROP<sup>®</sup> a po naředění na koncentraci požadovanou sekvenační laboratoří byly produkty odeslány na sekvenaci. První sada vzorků byla sekvenována laboratoří MacroGen Inc. (v Jižní Korey), ostatní vzorky byly sekvenovány v Laboratoři sekvenace DNA (jedná se o servisní pracoviště PřF UK v Praze).

## Fylogenetické zpracování sekvencí

Získané sekvence jsem ručně zkontrolovala a editovala v programu Geneious 7.1.6. Špatně přečtené sekvence byly ze souboru dat vyřazeny. Sekvencím jsem přiřadila označení, které se skládá ze zkratky hlavního povodí, zkratky lokality (první tři písmena z názvu a číselné označení) a odběrového roku (poslední dvojčíslí), za lomítkem následuje číselné označení jedinců z dané lokality. K českým sekvencím genu COI jsem přidala i zahraniční sekvence zástupců poddruhů *Lepidurus apus*, které jsem stáhla z databáze GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), přehled použitých sekvencí je v tabulce P4 v Přílohách. Všechny sekvence jsem následně upravila na stejnou délku a zadala jsem vytvoření alignmentu pomocí algoritmu ClustalW.

Další analýzy sekvencí jsem provedla v programu MEGA 5.05. Pro vyjádření genetické struktury populací na základě sekvencí COI jsem použila metodu Neighbor-Joining pomocí Kimura 2-parametrového modelu. Jako outgroup pro analýzu sekvencí COI jsem použila druh *Triops cancriformis*, jehož sekvenci jsem stáhla z databáze GenBank. Pro vyjádření genetické struktury populací na základě sekvencí ITS jsem použila metodu Neighbor-Joining pomocí p-distance modelu. Pro analýzu sekvencí ITS nebyl použit žádný outgroup.

Pro výpočet p-distancí pro oba geny jsem použila stejné nastavení, jaké bylo použito pro vytvoření fylogenetických stromů.

## **4. Výsledky**

### **4.1 Odebrané lokality**

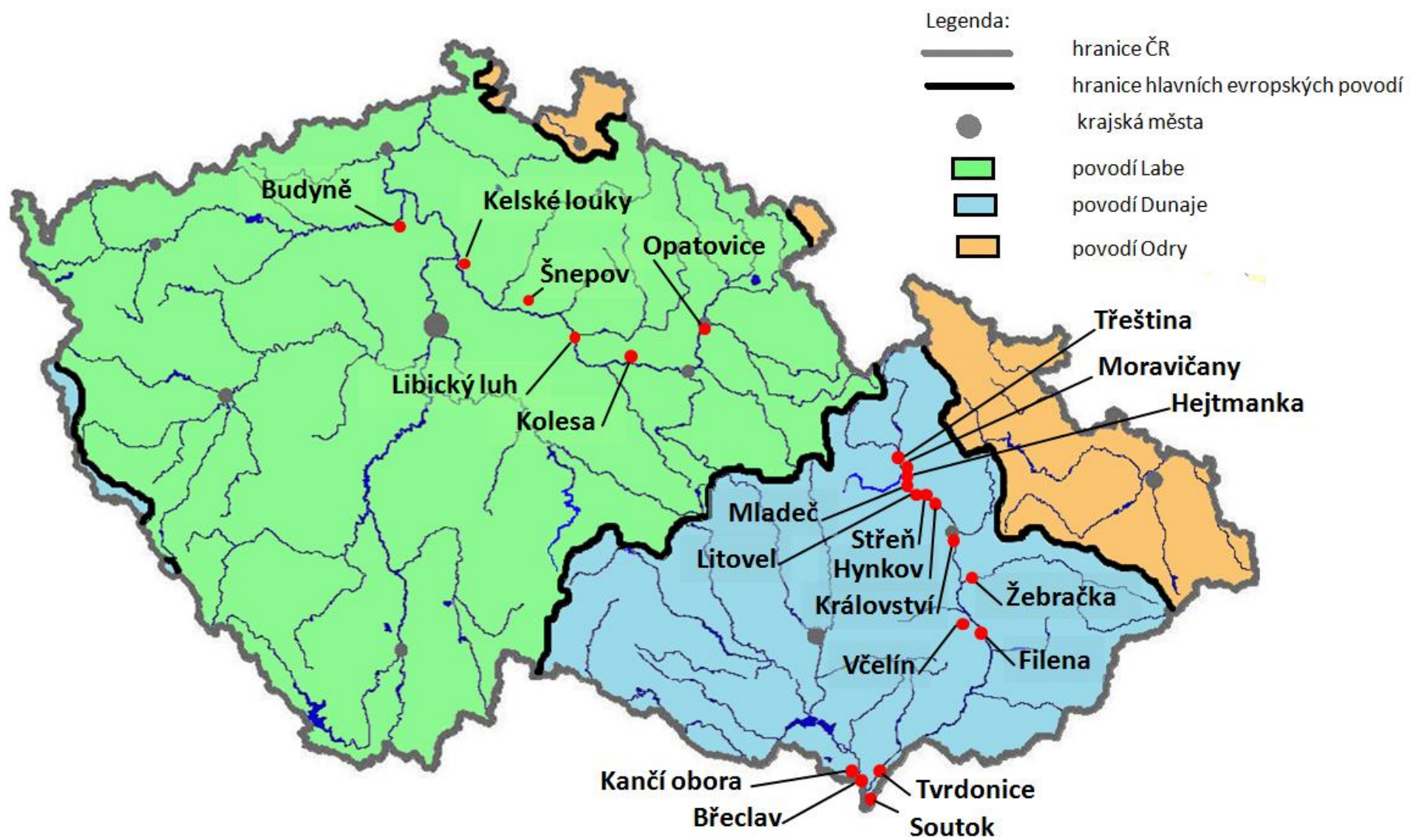
V odběrných letech byly navštíveny lokality ve všech třech hlavních povodích na území ČR, avšak populace listonohů jarních byly nalezeny pouze ve dvou těchto hlavních povodích – v povodí Labe a Moravy. Listonohové jarní byli nalezeni ve 39 lokalitách (7 lokalit v povodí Labe, 32 lokalit v povodí Moravy) a celkově se podařilo odebrat vzorky ze 44 populací – jelikož na 4 lokalitách byly úspěšně odebrány vzorky ve dvou různých letech.

Přehled lokalit, z kterých byli odebráni jedinci, je zaznamenán v *Tabulce 1*. Z lokalit (a zároveň z populací) označených \* nebyl použit žádný jedinec pro analýzu genu COI, ani ITS. Přehled odebíraných lokalit a jejich příslušnost k hlavním evropským povodím znázorňuje mapa na *Obr. 7*.

Tab. 1: Přehled lokalit, z kterých byly odebráni jedinci *L. apus* letech 2006-2010

Povodí	Lokalita	Odběrový rok
Dyje	Břeclav 03	2009
Dyje	Kančí obora 02	2006, 2007
Dyje	Soutok 20	2009
Dyje	Soutok 21	2009
Dyje	Soutok 23	2009
Dyje	Soutok 24	2009
Dyje	Soutok 25	2009
Dyje	Soutok 26	2009
Dyje	Soutok 27	2009
Dyje	Soutok 30	2009
Labe	Kelské louky 01 *	2009
Labe	Kolesa 01	2007
Labe	Libický luh 05	2009
Labe	Libický luh 06	2009
Labe	Opatovice 01	2007
Labe	Šnepov 01	2007
Labe (Ohře)	Budyně nad Ohří	2010
Morava	Filena 03	2010
Morava	Hejtmanka 02 *	2006
Morava	Hynkov 02	2010
Morava	Království *	2010
Morava	Litovel 02	2010
Morava	Mladeč 01	2010
Morava	Moravičany 01	2006
Morava	Soutok 02	2006, 2009
Morava	Soutok 03	2008, 2009
Morava	Soutok 05	2009
Morava	Soutok 06	2006
Morava	Střeň 01	2006, 2010
Morava	Střeň 02	2010
Morava	Třeština 01 *	2010
Morava	Tvrdonice 02	2009
Morava	Tvrdonice 05	2009
Morava	Tvrdonice 06	2009
Morava	Tvrdonice 08	2009
Morava	Tvrdonice 10	2009
Morava	Tvrdonice 12	2009
Morava	Včelín 02	2006
Morava	Včelín 06	2010
Morava (Bečva)	Žebračka *	2010

Obr 7. : Mapa lokalit, ze kterých byly v letech 2006 – 2010 odebírány vzorky *L. apus*



## 4.2 Výsledky analýzy pro gen COI

Pro analýzu byla vybrána část genu pro cytochrom c oxidázu podjednotka 1 o délce 627 bp. Jako outgroup jsem vybrala sekvenci jedince *Triops cancriformis* (pocházejícího z Itálie), který byl použit též jako outgroup ve fylogenetické studii italských listonohů rodu *Lepidurus* (Mantovani a kol. 2009).

Průměrné zastoupení dvojic bází ve všech 58 sekvencích DNA bylo následující: dvojice AT – 60,8 %, dvojice GC – 39,2%. (v sekvencích pocházejících ze středoevropských jedinců *L. apus apus* bylo zastoupení takovéto: dvojice AT – 60,4 %, dvojice GC – 39,6%).

Počet variabilních míst pro analyzované středoevropské populace (celkem 45 jedinců) byl 18 z 627 (tj. 2,87 %), z toho počet míst informativních pro parsimonii byl 11 (tj. 1,75 %).

Počet variabilních míst pro všechny analyzované populace zahrnující různé poddruhy *L. apus* (celkem 56 jedinců) byl 195 z 627 (tj. 31,1 %), z toho počet míst informativních pro parsimonii byl 135 (tj. 21,5 %).

Pro amplifikaci genu COI (a také ITS-1) jsem izolovala DNA z 1 až 3 jedinců ze všech odebraných 44 populací, ale kvalitní sekvence se nepodařilo získat ze všech populací. Pro vytvoření fylogenetického stromu pro COI bylo použito celkem 58 sekvencí, z toho 39 sekvencí od jedinců pocházejících z populací na území České republiky (z toho 5 populací bylo zastoupeno dvěma jedinci - lokality Kolesa 01, Litovel 02, Opatovice 01, Tvrdonice 01 a Včelín 06) a 19 sekvencí zahraničních vzorků zahrnujících různé populace poddruhů *L. apus*:

*L. apus apus* (6 jedinců ze střední Evropy z území Rakouska, Polska a Německa)

*L. apus lubbocki* (9 jedinců z Itálie a 1 jedinec z Izraele)

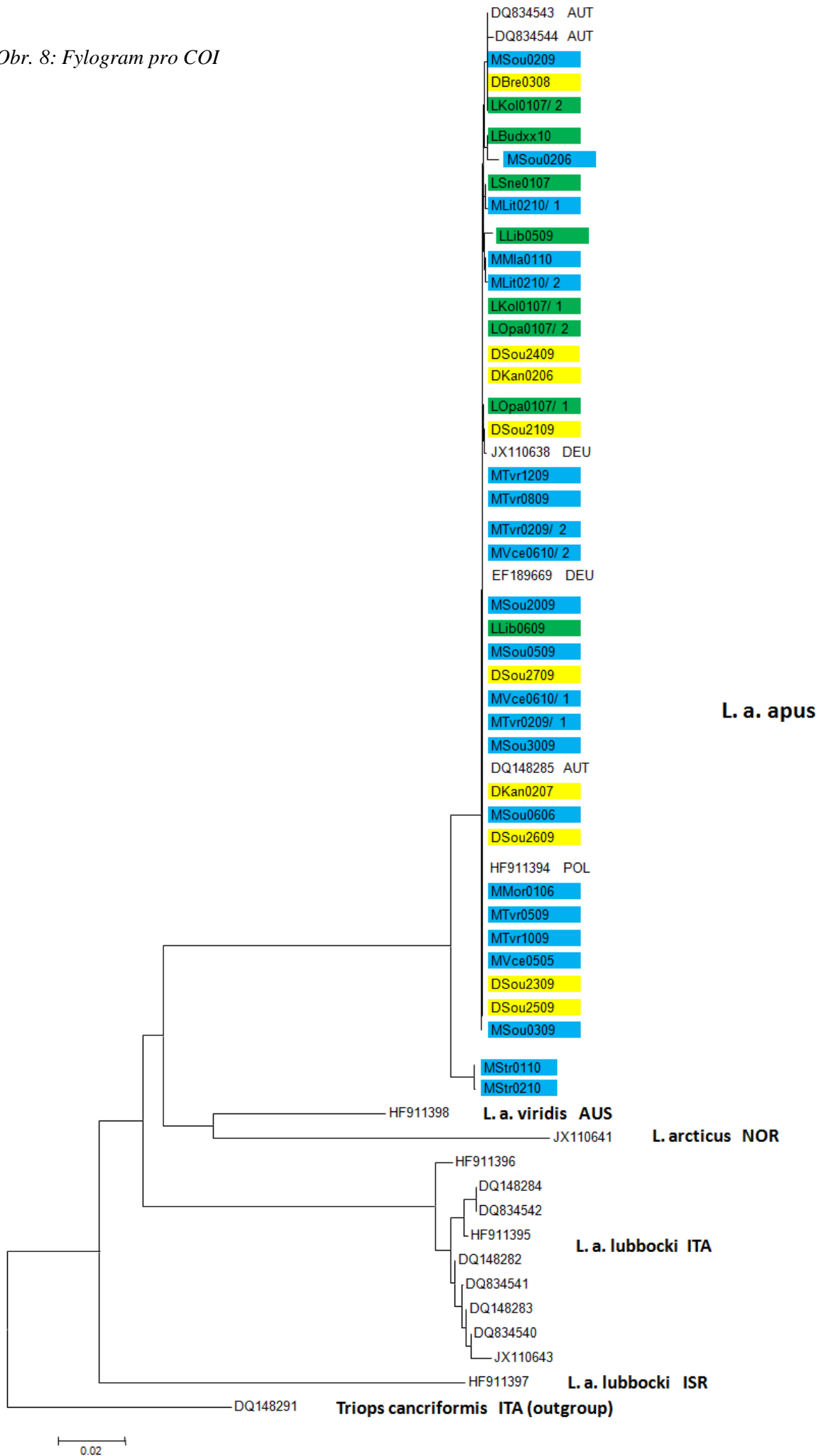
*L. apus viridis* (1 jedinec z Austrálie)

a také 1 zástupce dalšího v Evropě se vyskytujícího druhu *L. arcticus*.

Přehled zahraničních vzorků, včetně názvu příslušné sekvence stažené z databáze GenBank, místa odběru a referenční publikace, je uveden v Přílohách v tabulce P4.

Výsledný soubor 58 sekvencí, které měly délku 627 bp, jsem použila k vytvoření fylogenetického stromu metodou Neighbor-Joining na základě Kimura 2-parametrového modelu (Obr. 8). Topologie byla testována pomocí bootstrap testu (na 500 opakováních), získané hodnoty jsou zapsány v uzlech stromu (uvedeno jako P5 v Přílohách).

Obr. 8: Fylogram pro COI





Všichni jedinci z populací na území celé České republiky, Německa, Polska a Rakouska (tj. střeoevropské populace) se zařadili do jedné hlavní větve. Je tak potvrzena příslušnost těchto jedinců do poddruhu *L. apus apus*.

Z fylogramu je patrné, že více příbuzný střeoevropskému *L. apus apus* je *Lepidurus apus viridis* z Austrálie a *L. arcticus*, kteří se zařadili do sesterské větve, zatímco jedinci určení jako *L. a. lubbocki* pocházející z Itálie se nachází až ve vzdálenější větvi a *L. a. lubbocki* z Izraele je od všech ostatních skupin poddruhů vzdálen nejvíce.

Analyzovaní jedinci se tak uspořádali do 6 hlavních skupin (číslování odpovídá uspořádání pro výpočty párových rozdílů):

1. skupina: *L. a. apus* – jedinci z území ČR, Německa, Polska a Rakouska
2. skupina: *L. a. lubbocki* – jedinci z Itálie (9)
3. skupina: *L. a. lubbocki* – jedinec z Izraele
4. skupina: *L. a. viridis* – jedinec z Austrálie
5. skupina: *L. arcticus* – jedinec z Norska (Špicberky)
6. skupina: *Triops cancriformis* – jedinec z Itálie

Ve fylogramu jsou pro větší přehlednost barevně znázorněny populace patřící do různých povodí – zelenou barvou jsou to populace z povodí Labe (včetně Ohře), modrou barvou populace z povodí Moravy, žlutou barvou populace z povodí Dyje.

U sekvencí pocházejících ze zahraničí jsou uvedeny mezinárodní zkratky daného státu (AUT – Rakousko, DEU – Německo, POL – Polsko, ITA – Itálie, AUS – Austrálie, NOR – Norsko).

Pro výpočet párových distancí jsem použila stejné nastavení, jako při konstrukci fylogramu pro COI. Na základě seskupení jedinců do 6 hlavních skupin, jsem spočítala:

a) párové rozdíly mezi průměrnými hodnotami všech skupin (včetně *T. cancriformis* jako outgroupu):

skupina	1	2	3	4	5	6
1 <i>L. a. apus</i>						
2 <i>L. a. lubbocki</i> ITA	0,172					
3 <i>L. a. lubbocki</i> ISR	0,191	0,180				
4 <i>L. a. viridis</i>	0,144	0,159	0,167			
5 <i>L. arcticus</i>	0,181	0,160	0,193	0,134		
6 <i>Triops cancriformis</i>	0,181	0,181	0,177	0,188	0,197	

b) párové rozdíly uvnitř jednotlivých skupin, které zahrnovaly více než jednoho jedince

skupina	d	průměr
1 L. a. apus	0,000 – 0,023	0,002
podskupina 1 (43 jedinců)	0,000 – 0,007	0,001
podskupina 2 (2 jedinci)	0,000	0,000
2 L. a. lubbocki ITA	0,000 – 0,016	0,008

Celkem 45 jedinců ze středoevropských populací mělo párové rozdíly v rozmezí hodnot 0 – 2,3 %, průměrný párový rozdíl byl 0,2 %. Jedinci ze středoevropských populací se rozdělili do dvou podskupin: v podskupině 1 je 43 jedinců ze všech třech povodí, v podskupině 2 jsou pouze 2 jedinci z povodí Moravy. Přehlednější uspořádání všech jedinců ze středoevropských lokalit je zobrazeno na obrázku P6 v Přílohách.

Jedinci v podskupině 1 měli párové rozdíly v rozmezí 0 – 0,7 %. Nejvíce odlišný byl v této skupině jedinec z lokality Libický luh 05 (LLib0509), který se lišil o 0,7% od jedince z lokality Soutok 02 MSou0206 a od rakouského jedince DQ834544.

Jedinci z podskupiny 2 z lokalit Střeň 1 a Střeň 2 (označení MStr0110 a MStr0210) měli nulové hodnoty párových rozdílů. Od ostatních jedinců z podskupiny 1 se tyto dva jedinci lišili v rozmezí hodnot 1,6 – 2,3 %, tj. odlišnost 10 až 14 nukleotidů. Nejvyšší párový rozdíl 2,3 % byl od jedince MSou0206 z lokality Soutok 02.

### Vnitropopulační variabilita

Do analýzy sekvencí pro COI byli zařazeni i 2 jedinci z opakovaně navštívené lokality na území ČR - Kančí obora 02 (odběrové roky 2007, 2006), jejich sekvence pro COI však ukázaly nulové hodnoty párových rozdílů, haplotypy se mezi roky nelišily.

Pro zjištění vnitropopulační variability byli do analýzy zahrnuti 2 jedinci z 5 populací na území České republiky, u nichž byly spočítány párové rozdíly:

Označení jedinců v populaci	párový rozdíl
Lopa0107/1 Lopa0107/2	0,000
Lkol0107/1 Lkol0107/2	0,002
MLit0210/1 MLit0210/2	0,003
MTvr0209/1 MTvr0209/2	0,000

MVce0610/1	0,000
MVce0610/2	

U jedinců ze 3 populací byl zjištěn párový rozdíl 0 %. Nenulové hodnoty párových rozdílů byly zjištěny u jedinců ze dvou populací. Jedinci z populace Kolesa 01 (odběrový rok 2007) se lišily o 0,2 %, což představuje 1 rozdílný nukleotid. Jedinci z populace Litovel 02 (odběrový rok 2010) se lišily o 0,3 %, což představuje 2 rozdílné nukleotidy.

#### 4.3 Výsledky analýzy pro ITS

Pro analýzu sekvencí ITS-1 bylo použito celkem 28 sekvencí z 18 populací na území ČR. Sekvence měly délku 259 bp. Vzniklý fylogenetický strom je nezakořeněný, protože nebylo možné použít žádnou sekvenci z jiného druhu listonohů.

Zastoupení jednotlivých bází v sekvenci DNA bylo následující: dvojice AT – 67,3 %, dvojice GC – 32,7 %.

Počet variabilních míst v úseku pro ITS-1 byl 9 z 259 (tj. 3,47 %), z toho počet míst informativních pro parsimonii byl 4 z 259 (tj. 1,54 %).

Výsledný soubor 28 sekvencí, které měly délku 259 bp, jsem použila k vytvoření fylogenetického stromu metodou Neighbor-Joining za pomoci modelu p-distance (*Obr. 9*). Topologie byla testována pomocí bootstrap testu (500 opakování), získané hodnoty jsou zapsány v uzlech stromu (*obrázek P7 v Příloze*).

Jedinci se rozdělili do dvou skupin, z nichž skupina 1 obsahuje 26 jedinců ze všech povodí a skupina 2 obsahuje pouze 2 jedince z povodí Moravy a Dyje.

Ve fylogramu jsou pro větší přehlednost barevně znázorněny populace patřící do různých povodí – zelenou barvou jsou to populace z povodí Labe, modrou barvou populace z povodí Moravy, žlutou barvou populace z povodí Dyje.

Pro výpočet párových distancí jsem použila stejné nastavení, jako při konstrukci fylogramu pro ITS. Na základě seskupení jedinců do 2 hlavních skupin jsem spočítala:

a) průměrné párové rozdíly mezi všemi 28 sekvencemi v analýze:

$$d = 0,004$$

b) párové rozdíly uvnitř jednotlivých skupin

	d (rozmezí hodnot)	průměr
sk. 1 (26 jedinců)	0,000 – 0,004	0,000
sk. 2 (2 jedinci)	0,015	-

c) průměrné párové rozdíly mezi skupinami:

	1	2
sk 1 (26 jedinců)		
sk 2 (2 jedinci)	0,023	

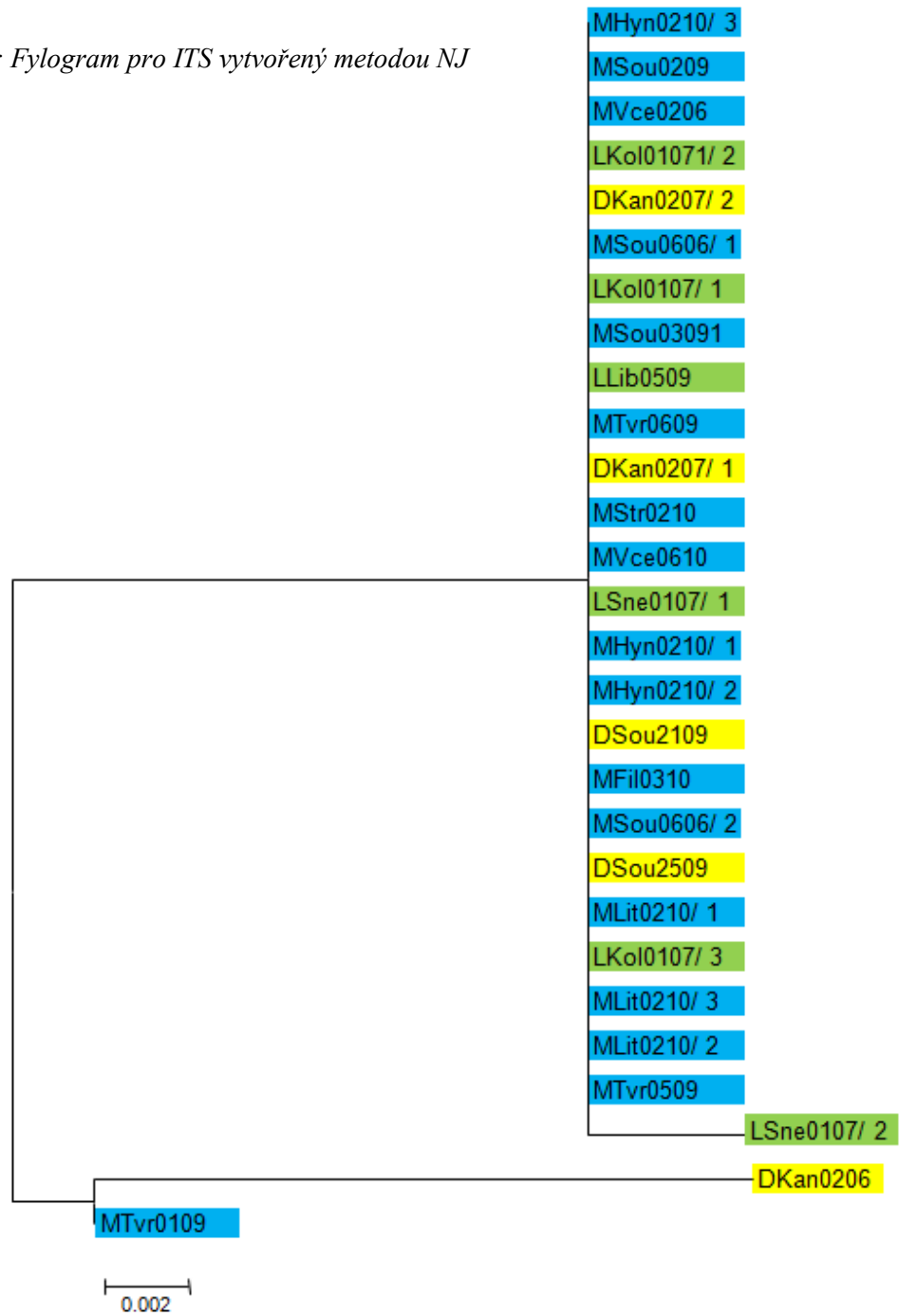
Průměrná hodnota párových rozdílů mezi všemi analyzovanými jedinci byla 0,4 %. Ve skupině 1, která obsahuje 26 jedinců, byl párový rozdíl mezi jedinci v rozsahu 0 až 0,4 % (pouze jediný jedinec vykazoval tuto odlišnost od všech ostatních). Odlišnost 0,4% představuje genetickou odlišnost o 1 nukleotid. Ve skupině 2, která obsahuje 2 jedince, se tito jedinci od sebe lišili o 1,5 %, tj. odlišnost o 4 nukleotidy. Průměrný párový rozdíl mezi skupinou 1 a 2 byl 2,3 %.

### **Vnitropopulační variabilita**

Z pěti populací (Kolesa 01 2007, Šnepov 01 2007, Soutok 06 2006, Hynkov 02 2010, Litovel 02 2010) bylo do analýzy zahrnuto více jedinců z téže populace (2 až 3 jedinci). Všichni tito jedinci se nacházeli ve fylogramu ve skupině 1. Jedinou odlišnost (nenulový párový rozdíl) jsem zaznamenala pouze u jedince s označením LSne0107/ 2 , který vykazoval párový rozdíl 0,4 % od druhého jedince ze stejné populace (LSne0107/ 1) a zároveň od všech ostatních jedinců ve skupině 1 (jednalo se o jediné variabilní místo).

Do analýzy byli také zahrnuti dva jedinci ze stejné lokality (Kančí obora 02 ), ale odebráni v odlišných odběrových rocích (2006, 2007), avšak sekvence těchto jedinců byly identické.

Obr. 9: Fylogram pro ITS vytvořený metodou NJ



## 5. Diskuze

Předkládaná práce obsahuje první rozsáhlou studii genetické struktury střeoevropských populací druhu *Lepidurus apus* založenou na analýze genu pro COI a ITS. Převážná část analyzovaných populací pochází z území České republiky, kde byly odebrány vzorky *L. apus* z 39 lokalit a celkem ze 44 populací v letech 2006 až 2010. Jako doplňující data pro analýzu COI byly použity veřejně dostupné sekvence části genu pro COI (databáze GenBank) jedinců z populací v Německu, Polsku a Rakousku.

Získaná molekulární data a informace o historickém vývoji biotopů *L. apus* by měla přispět k doplnění poznatků o možnostech šíření sladkovodních bezobratlých organismů mezi fragmentovanými lokalitami, jako je tomu v případě jarních tůní.

### 5. 1 Rozšíření a taxonomické uspořádání druhu *Lepidurus apus*

Jak již bylo popsáno v úvodu, na evropském kontinentu můžeme rozlišit podle současné platné nomenklatury dva poddruhy druhu *L. apus*: *L. apus apus*, který má roztroušený výskyt napříč celým evropským kontinentem, a *L. apus lubbocki*, který je znám pouze z několika lokalit v Itálii, dále pak z Izraele a severní Afriky (viz Obr. 5 v kapitole 1.2.1). Třetí poddruh *L. apus viridis* se na evropském kontinentu nevyskytuje, ale je popsán z Austrálie a Nového Zélandu (Vanschoenwinkel a kol 2012, text S1).

Za zmínku stojí historické problémy s taxonomií a s údaji o rozšíření zástupců řádu Notostraca, včetně druhu *Lepidurus apus*. Při taxonomických revizích v 50. letech 20. století bylo na základě morfologických znaků, geografického rozšíření či ekologických nároků popisovaných populací zařazeno pod druh *L. apus* 18 původně popsaných samostatných druhů a díky tomu získal druh *L. apus* celosvětové rozšíření (Longhurst 1955b, v King a Hanner 1998). Řada pojmenování pro jednotlivé původní poddruhy zůstala jako synonyma, od kterých se později odvodila pojmenování pro nově ustanovené druhy, zejména na základě molekulárních dat, např. některé severoamerické populace byly dříve určeny jako poddruh *L. apus packardi* a podle současné nomenklatury mají status samostatného druhu *L. packardi* (Rogers 2001).

Na základě morfologických znaků lze jednoznačně odlišit pouze rody *Lepidurus* a *Triops*, ale pro rozlišení druhů či poddruhů v rámci těchto dvou rodů jsou morfologické znaky nedostačující. Fylogenetické studie zástupců řádu Notostraca, založené nejčastěji na mitochondriálních markerech (12S, 16S, COI) potvrdily monofyletický původ těchto dvou rodů a zároveň odkrývají fylogenetické vztahy v rámci těchto dvou rodů, včetně objevení kryptických linií a druhů zejména v Evropě a v Severní Americe (King a Hanner 1998,

Richter a kol. 2007, Mantovani a kol. 2004, Mantovani a kol. 2009, Vanschoenwinkel a kol. 2012, Korn a kol. 2013, Mathers a kol. 2013).

Pro rozlišení taxonomických jednotek je velmi často používán gen pro COI, jehož genetická divergence určující hranici mezi druhy se u skupiny korýšů (Crustacea) pohybuje nejčastěji v rozmezí 16 – 32 % (Hebert a kol. 2003). Do tohoto rozmezí spadají genetické rozdíly mezi poddruhy druhu *L. apus* zjištěné v této předkládané práci (16,3 - 23,4 %) (viz kapitola 4.2) i ve studii Vanschoenwinkel a kol. (2012; rozdíly 14,7 – 23,6 %). Tyto značné genetické odlišnosti v genu pro COI, které jsou navíc podpořeny i podobnými odlišnostmi v 12S a 16S (Mantovani a kol. 2004), více odpovídají skutečnosti, že dosud uznávané poddruhy *L. apus* jsou samostatnými liniemi (navíc netvořícími monofyletickou skupinu) a měly by v brzké době získat status samostatných druhů *L. apus*, *L. lubbocki* a *L. viridis*, (Vanschoenwinkel a kol. 2012, Mathers a kol. 2013).

## 6.2 Genetická struktura středoevropských populací *L. apus*

*L. apus* je svým výskytem vázán na tzv. jarní tůň, které se nacházejí v nivních oblastech větších řek nebo v pozůstatcích lužních lesů. V rámci střední Evropy se tyto biotopy vyskytují v nížinných oblastech řek Labe, Odry a Dunaje (včetně některých jejich přítoků) a nachází se tak ve všech třech hlavních evropských povodích, jež ústí do odlišných moří (Severní moře, Baltské moře, Černé moře). Území České republiky má z hydrologického hlediska jedinečnou polohu, protože zde pramení tři velké řeky (Labe, Odra, Morava) patřící k odlišným evropským úmořím a tudíž se na našem území nachází hlavní evropské rozvodí.

Ačkoliv se biotopy jarních tůní vyskytují na území České republiky ve všech třech výše zmíněných povodích, byly populace *L. apus* v odběrných letech 2006 až 2010 nalezeny pouze v povodích Labe a Moravy (včetně některých jejich přítoků, viz mapa na Obr. 7 v kapitole 4.1). Nálezy listonohů v těchto dvou povodích jsou dokládány již z konce 19. století a z 1. poloviny 20. století (např. Mayer 1936, Kapler 1943, Šrámek-Hušek 1940) a také v novějších studiích (např. Rulík a Měkkotová 1995, Beran 2004, Rychtrmocová 2008), zatímco z povodí Odry na území České republiky neexistují žádné pozitivní záznamy o jejich výskytu.

Z ostatních středoevropských států je výskyt *L. apus* doložen ve všech třech hlavních evropských povodích. V Rakousku jsou lokality zaznamenány v povodí řeky Moravy a Dyje, ale také v povodí Drávy (Eder a Hödl 1997). Na území Polska se *L. apus* vyskytuje v povodí řeky Warty, která spadá do povodí Odry (oblast Velkopolska; Goldyn a kol. 2012) a také v povodí řeky Visly v oblasti Bialystok (Biggs a kol. 2004 v Goldyn a kol. 2012). V Německu jsou lokality výskytu hlášeny z povodí Labe včetně přítoku Spree/ Havel, z povodí Odry (příhraniční oblast) a Dunaje (Engelmann a Hahn 2004). Na Slovensku se *L. apus* vyskytuje

v nívních oblastech v Podunajské rovině (inundace řeky Moravy) a Východoslovenské rovině (Lukáš 2000)..

Pro zjištění genetické struktury středoevropských populací byla jako hlavní genetický marker vybrána část genu pro cytochrom c oxidázu podjednotky 1 (COI), což je běžně používaný mitochondriální gen pro fylogenetické či fylogeografické studie korýšů, včetně řádu Notostraca (Zierold a kol. 2007, Mantovani a kol. 2008, Mantovani a kol. 2009, Wanschenwinkel a kol. 2012, Mathers a kol. 2013). Tento marker byl vybrán také z toho důvodu, aby mohly být do analýzy zařazeny i další středoevropské populace *L. apus* z Německa, Polska a Rakouska, jejichž sekvence jsou volně dostupné v databázi GenBank. Použití COI umožňuje také porovnat výsledky s jinými studii zástupců řádu Notostraca, ale také s výsledky studie genetické struktury populací žábřonožky *Eubbranchipus grubii* (řád Anostraca) z území České republiky. Druhým markerem použitým v této práci byla sekvence na jaderné ribozomální DNA označovaná jako ITS-1 (Chu a kol. 2001), která slouží jako doplňující marker pouze pro analýzu českých populací.

#### Porovnání genetické variability na základě mitochondriálních markerů

Fylogenetický strom (*Obr. 8* v kapitole 4.2.) vytvořený metodou Neighbor-Joining na základě Kimura 2-parametrového modelu z 58 sekvencí pro COI o délce 627 bp zřetelně prokázal, že všechny středoevropské populace náleží do poddruhu *L. apus apus*. Všechny 45 jedinců ze středoevropských populací z různých povodí se zařadilo do jedné hlavní větve, v níž se rozdělili do dvou podskupin. V podskupině 1 se nacházelo 37 jedinců ze všech třech českých povodí (Labe, Morava, Dyje) a také 6 zahraničních jedinců, včetně jedince s označením JX110638 z povodí Odry. Průměrná hodnota párových rozdílů činila v podskupině 1 pouze 0,1 %. V podskupině 2 se objevili pouze dva jedinci z lokality Střeň 01 a Střeň 02 spadající do povodí Moravy a tyto jedinci byli identičtí. Od ostatních jedinců z podskupiny 1 se tyto dva jedinci lišili v rozmezí hodnot 1,6 – 2,3 %. Vnitropopulační variabilitu bylo možné sledovat u 5 českých populací, z nichž pouze jedinci ze 2 populací vykazovaly nenulové hodnoty párových rozdílů, ale tyto hodnoty byly velmi nízké – 0,2 % v populaci z lokality Litovel 02 (povodí Moravy, odběrový rok 2010) a 0,3 % v populaci z lokality Kolesa 01 (povodí Labe, odběrový rok 2007). Genetická variabilita i genetická struktura středoevropských populací je tak poměrně nízká a neprojevuje se na ní příslušnost jedinců k různým povodím.

Nízké hodnoty genetické variability středoevropských populací *L. apus apus* jsou v souladu s výsledky studií dalších zástupců řádu Notostraca (s hermafroditickými populacemi či s populacemi, kde se vyskytuje androdioécie) založenými na mitochondriálních markerech (12S, 16S, COI). Jedinci druhu *Triops cancriformis* ze 7 evropských populací (4



populace z Itálie, po 1 z Rakouska, Maďarska a Ruska) se na základě 12S rozdělili do 3 haplotypů lišících se od sebe o 0,3 – 1,8 % a na základě 16S do 9 haplotypů lišících se od sebe pouze o 0 - 0,8 % (Mantovani a kol. 2004). Nízkou genetickou variabilitu dalších evropských populací *T. cancriformis* (5 z Itálie, 1 z Rakouska, 1 ze Španělska) potvrdil kromě již dříve použitých markerů 12S a 16S i právě gen pro COI, ale překvapivě i mitochondriální kontrolní oblast, která je jinak vhodným průkazným markerem pro populační analýzy (Mantovani a kol. 2008). Ještě nižší úroveň genetické variability na základě analýzy 12S byla zjištěna u cirkumpolárně rozšířeného druhu *Lepidurus arcticus*, kdy se jedinci ze 48 populací rozdělili do dvou haplotypových skupin (A - 3 haplotypy, B - 2 haplotypy), které se od sebe lišily jen o 0,6 % (Hessen a kol. 2004). Rozsáhlejší fylogeografická studie 29 populací *T. cancriformis* z území Evropy (včetně 1 populace z Maroka) založená na kombinaci mitochondriálních genů pro COI a genů pro ATPázu taktéž potvrdila nízkou genetickou variabilitu u poddruhů *T. cancriformis cancriformis* a *T. cancriformis simplex* (nukleotidová diverzita  $\pi = 0,00920$ ), zatímco u poddruhu *T. cancriformis mauritanicus* (jež se vyskytuje v Evropě pouze na Iberském poloostrově a má gonochoristické populace) byla genetická variabilita vyšší (nukleotidová diverzita  $\pi = 0,05905$ ) (Zierold a kol. 2007). Naopak poměrně vysoká genetická variabilita byla zjištěna ve 4 italských gonochoristických populacích *L. apus lubbocki*, kde se 9 jedinců (z toho 3 samci) rozdělilo do 6 mitotypů, tj. haplotypů získaných z kombinační analýzy 12S, 16S a COI (Mantovani a kol. 2009)

Vzhledem k tomu, že středoevropské populace *L. apus apus* analyzované v této práci ukázaly nízkou genetickou variabilitu i strukturu a nebyl zaznamenán výskyt samců ve vzorkovaných populacích, je pravděpodobné, že se jedná o populace, v nichž se jako způsob rozmnožování uplatňuje hermafroditismus nebo androdioécie. Pro ověření této domněnky by bylo nutné odebrat větší množství jedinců z jednotlivých populací a provést i histologický rozbor gonád, aby mohlo být jednoznačně určeno pohlaví jedinců a také zda produkují fertilní gamety.

#### Porovnání genetické variability na základě jaderných markerů

Fylogram (*Obr. 9* v kapitole 4.3), který jsem sestrojila z 28 sekvencí pro fragment ITS-1, prokázal rozdělení jedinců do dvou hlavních skupin, které se liší o 2,3 %. Ve skupině 1 je zařazeno 26 jedinců ze všech třech povodí, z nichž pouze 1 jedinec se od ostatních identických jedinců liší o 0,4 % (1 nukleotid). Ve skupině 2 se nachází pouze 2 jedinci z povodí Moravy (MTvr0109) a Dyje (DKan0206), kteří se od sebe liší o 1,5 % (4 nukleotidy). Průměrná hodnota párových rozdílů mezi všemi sekvencemi byla pouze 0,4 %.

Stejně jako mitochondriální marker COI i tento jaderný marker vykazuje nízkou genetickou variabilitu a strukturu českých populací. Přestože bylo možné provést i analýzu

vnitropopulační variability na základě porovnání sekvencí 2 až 3 jedinců z 5 populací a také porovnat dvě populace ze shodné lokality, ale z odlišných odběrových roků, byla jediná vnitropopulační variabilita zjištěna v populaci Šnepov 01 (odběrový rok. 2010), kde se jedinec LSne0110/ 2 lišil od druhého jedince o 0,4 %, což představuje odlišnost o 1 nukleotid.

Na tomto místě je ale nutné upozornit, že amplifikace fragmentů ITS-1 u *L. apus apus* byla problematická a poměrně málo úspěšná jelikož z celkového počtu 44 českých populací bylo získáno jen 28 použitelných sekvencí odpovídající délky fragmentu. Získané výsledky tak nejspíše neodpovídají skutečnému stavu genetické variability a struktury českých populací.

Fragmenty ITS-1 prokazují v rámci podkmenu Crustacea vysokou variabilitu na mezidruhové úrovni (např. Daniels a kol. 2004 je průkazně použil k rozlišení severoamerických druhů žábřonožek rodu *Streptocephalus*) a pro některé druhy je pravděpodobně možné využít ITS-1 i jako nástroj pro zjištění populační variability (Chu a kol. 2001).

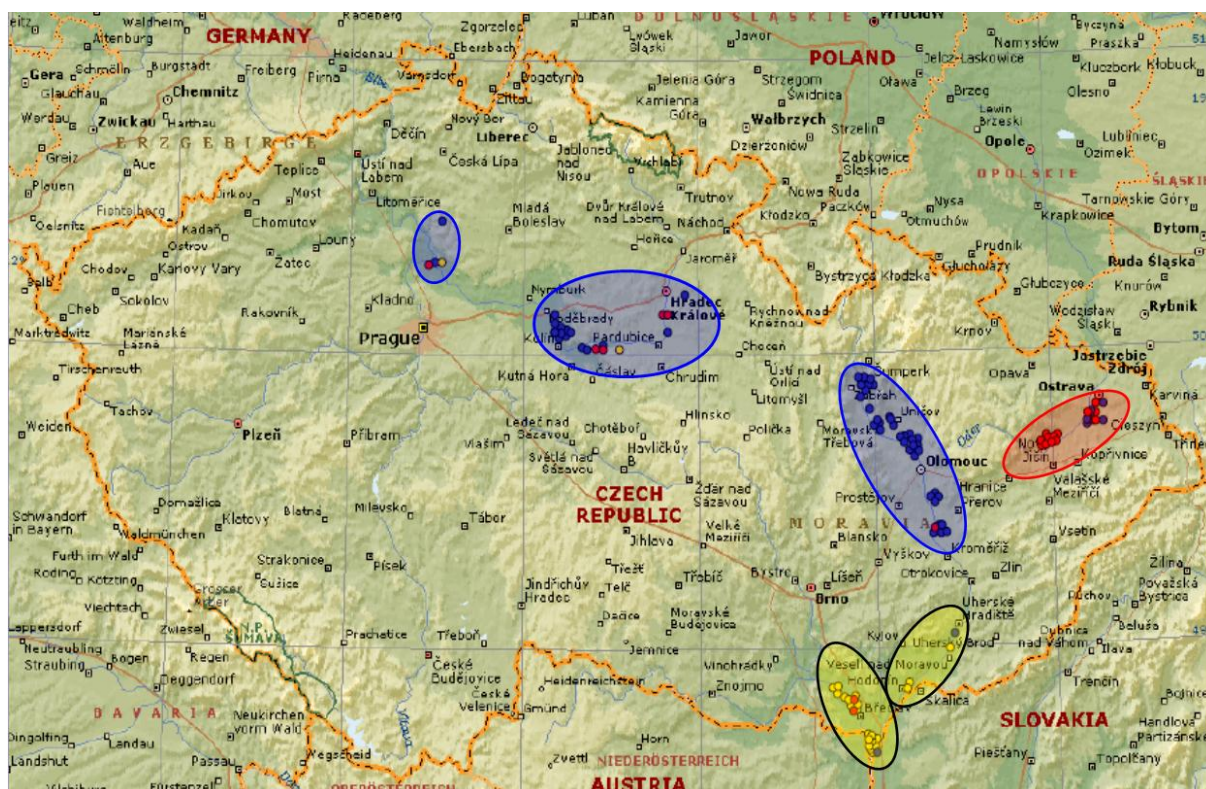
Bohužel není možné porovnat výsledky z mé práce s jinými studii pro druhy z řádu Notostraca, nabízí se pouze možnost srovnání z řádu Anostraca (taktéž patřící do třídy Branchiopoda). Studie partenogenetických populací žábřonožek *Artemia franciscana*, jež byly zavlečeny na indický subkontinent v 2. pol. 20. století, prokázala příslušnost 29 odebraných jedinců k 22 haplotypům. Tyto haplotypy pocházely z velkých geografických vzdáleností, což svědčí o jejich společném původu a následném vývoji jednotlivých linií (Vikas a kol. 2012).

Jaderné markery jsou ve fylogenetických studiích řádu Notostraca používány v menší míře než markery mitochondriální, ačkoliv právě ony by mohly lépe objasnit souvislosti mezi úrovní genetické variability a reprodukčním systémem dané populace, protože zde nedochází k dědění znaků pouze po mateřské linii (Mantovani a kol. 2009). Velona a kol. (2009) použil pro studium stejných populací *Triops cancriformis* jaké byly použity ve studii Mantovani a kol. 2008 (tj. 1 Španělsko, 1 Rakousko a 5 Itálie) 12 mikrosatelitových lokusů, které prokázaly větší populační variabilitu (než předešlé studie založené na mitochondriálních markerech). Zároveň mikrosatelity prokázaly lepší korelaci rozsahu genetické variability se způsobem reprodukce jedinců v dané populaci: nejvyšší variabilita byla zaznamenána u gonochoristických populací, nejnižší variabilita u partenogenetické (italské) populace. Populace, ve kterých byla zaznamenána androdioécie, měly nižší hodnoty genetické variability, ale tyto hodnoty byly blíže hodnotám z partenogenetických populací. Dále byla potvrzena velká korelace mezi genetickými a geografickými vzdálenostmi, což ukazuje na to, že genetická izolace populací je důsledkem geografické vzdálenosti (Velona a kol. 2009).

## Porovnání genetické struktury populací *L. apus apus* a žábronožky *Eubbranchipus grubii* na území České republiky

Listonoh jarní (*L. apus apus*) a žábronožka sněžní (*Eubbranchipus grubii*) jsou typické druhy biotopů jarních tůní a často se vyskytují společně na shodných stanovištích (vyjma lučních a polních rozlitan, kde je přítomen pouze listonoh jarní (Kapler 1943, též vlastní pozorování). Populace *E. grubii* se na území České republiky vyskytují na rozdíl od *L. apus apus* nejen v povodí Labe a Moravy, ale i v povodí Odry. Analýza části genu pro COI ukázala, že české populace *E. grubii* (celkem 95 populací) se rozdělily do dvou hlavních skupin (Rychtrmocová 2008). Jednalo se o skupinu sdružující populace z povodí Moravy a Labe, druhou skupinu tvořily populace z povodí Odry. Rozdíl mezi těmito dvěma hlavními skupinami byl 5,3 %. V rámci skupiny Morava-Labe se ještě vyčlenila skupina Dyje (povodí řeky Dyje a dolní Moravy), která se od ní lišila o 1,7 %, zatímco od skupiny Odra se lišila o 5,7 %. Celkově bylo v populacích *E. grubii* nalezeno 9 odlišných haplotypů. U populací *E. grubii* byla též zaznamenána vyšší vnitropopulační variabilita než u *L. apus apus*.

Rozdělení do dvou hlavních skupin (Morava-Labe a Odra) nereflektuje přímo příslušnost k povodím hlavních českých řek (Obr. 10), ale spíše odráží geografii a historický vývoj území a jeho osidlování. (Rychtrmocová 2008).



Obr. 10: Znárodnění populací *E. grubii* a jejich příbuznosti na území ČR. Modrou barvou jsou označeny populace patřící do skupina Morava-Labe, červenou barvou populace patřící do skupiny Odra a žlutou barvou populace patřící do skupiny Dyje (převzato z Rychtrmocová 2008)

## L. apus a možnosti disperze

Z výsledků různých fylogenetických studií (např. Zierold 2007, Mantovani a kol. 2009, Mathers a kol 2013) vyplývá, že rod *Lepidurus* má původ na evropském kontinentu, přičemž dosud uznávaný poddruh *L. a. lubbocki* tvoří bazální větev pro rod *Lepidurus* a poddruh *L. a. apus* je sesterskou větví ke všem ostatním „moderním“ druhům rodu *Lepidurus*, které se od ní oddělily přibližně před 69,5 miliony let (Korn a kol. 2013), tj. na konci křídy. Z evropského kontinentu došlo postupně k rozšíření různých druhů r. *Lepidurus* na další kontinenty (Korn a kol. 2013).

Možnosti disperze u zástupců řádu Notostraca nebyly zatím pečlivě studovány. Trvalá vajíčka listonohů, která jsou u jiných velkých lupenonožců považována za vhodný způsob pasivní disperze různými vektory, jsou poměrně velká a navíc lepkavá (Kapler 1943, Brendonck a De Meester 2003). Díky lepkavému povrchu se mohou přichytit k sedimentu nebo na ponořené části rostlin v tůni, což by mohl být obranný mechanismus proti jejich zanesení z původní lokality do nevhodných podmínek a možnost disperze by to snižovalo. Na druhou stranu by se lepkavá vajíčka mohla přichytit na tělní pokryv živočichů (ptáků, savců), kteří tyto lokality navštěvují. U druhu *Lepidurus arcticus* se Hessen a kol. (2004) domnívá, že k šíření trvalých vajíček by mohlo docházet externě i interně vodními ptáky (především rybáky), kteří lokality navštěvují a dokonce se listonohy živí. Tato možnost nemůže být vyloučena ani u středoevropských populací, stejně jako možnost disperze povodňovou vlnou. Schopnost disperze není asi velká, protože dosud nebyl prokázán výskyt populací *L. apus apus* v oblasti horního toku Odry na území České republiky (viz níže), ačkoliv tyto lokality poskytují vhodný biotop (obývaný již zmiňovaným jarním druhem žábronožky *E. grubii*) a jsou od lokalit v povodí Moravy vzdáleny (vzdušnou čarou) přibližně jen 60 km.

## Vývoj osídlení současných biotopů druhem *L. apus*

Jak již bylo zmíněno v Úvodu, současná podoba biotopů *L. apus apus* se začala utvářet v průběhu čtvrtohor, tj. v období začínajícím před přibližně 2 miliony let (Ložek 2001). Střídání glaciálních cyklů se projevovalo výkyvy teplot a rozsahu pevninských či horských ledovců. Teplotní výkyvy (i v rámci dob ledových) způsobovaly i změny podoby vodních toků, které měly v chladných obdobích podobu divočících toků, zatímco v teplejších obdobích se vytvářela meandrující koryta (Mol a kol. 2000, Vandenberghe a Woo 2002). V jejich nivách díky akumulaci naplavenin vznikaly soustavy slepých či starých ramen a tůní (Ložek 1973), tedy biotopy vhodné pro *L. apus*.

Území České republiky a přilehlých středoevropských států se nacházelo v tzv. periglaciálním koridoru, tj. oblasti mezi dvěma ledovci – Skandinávským ledovcovým štítem a horským Alpským ledovcem. Maximálního rozšíření dosahoval Skandinávský ledovcový

štít při elsterském a sálském glaciálu, kdy pokrýval severní část dnešního Německa, téměř celé území dnešního Polska a zasahoval až do příhraničních oblastí České republiky (viz Obr. 2 v kapitole 1.1.2), přičemž největší území pokryl na Ostravsku a Opavsku (Růžička 2004). Zalednění tohoto území pravděpodobně způsobilo zánik populací listonohů na horním toku řeky Odry.

Organismy (zejména druhy z vyšších zeměpisných šířek) reagovaly na nepříznivé podmínky glaciálních cyklů migracemi do refugií a následnou rekolonizací území, což se projevilo na genetické variabilitě a struktuře populací. Převážně pro terestrické organismy jsou tradičně popisována tři jihoevropská refugia (Iberský, Apeninský a Balkánský poloostrov), některé druhy s nižšími teplotními nároky ale mohly přežívat v tzv. severních kryptických refugiích v periglaciální oblasti (Stewart a Lister 2001). Rozmístění refugií pro sladkovodní živočichy neodpovídá přesně hlavním třem refugiím pro terestrické organismy a to z toho důvodu, že sladkovodní organismy měly (a mají) omezenější možnosti migrace a to především kvůli geografickému uspořádání vodních systémů - izolaci či naopak propojení říčních sítí (Verovnik a kol. 2005). Jako významné refugium pro sladkovodní ryby zřejmě sloužilo Černé moře, které bylo na konci pleistocénu rozsáhlým jezerem se sladkou vodou (Kotlík 2004). Sladkovodní druhy více adaptované na chladné podmínky přežívaly dokonce blízko okraje zalednění, jako např. vranka *Cottus gobio* v říčních systémech řek Labe a Main na území Německa (Hanfling a kol. 2002). Mezi zástupci sladkovodních bezobratlých živočichů bylo např. pro listonoha *Triops cancriformis* zjištěno refugium na Iberském poloostrově (Zierold a kol. 2007), zatímco pro berušku vodní *Asellus aquaticus* to byla oblast Dinárského krasu a řeka Dráva na Slovinsku (Verovnik a kol. 2005).

Zierold a kol. (2007) se domnívá, že současné středoevropské populace *Triops cancriformis* toto území kolonizovaly z refugia na Iberském poloostrovu po odeznění posledního glaciálu - a to na základě dvou předpokladů: 1) středoevropské populace mají poměrně nízkou genetickou variabilitu (nukleotidová diverzita  $\pi = 0.00920$ ), ale jsou si blíže příbuzné, zároveň se v těchto populacích vyskytuje androdioécie jako způsob rozmnožování; 2) populace z Iberského poloostrova vykazují vyšší genetickou variabilitu (nukleotidová diverzita  $\pi = 0.05905$ ) a zároveň se jedná o gonochoristické populace. Nízká genetická variabilita v populacích na kolonizovaných územích je pravděpodobně způsobená silným efektem hrdla lahve a zároveň následným omezeným genovým tokem mezi zdrojovou a novou lokalitou (Zierold a kol. 2007), také se zde mohl uplatnit efekt zakladatele a tzv. monopolizační hypotéza (De Meester a kol. 2002).

Z analýzy genu pro COI provedeném na souboru středoevropských populací *L. apus apus* vyplývá, že populace si jsou blíže příbuzné a pravděpodobně osídlily dnešní lokality z jednoho refugia, ale z dosavadních dat není možné určit, v jaké oblasti se toto refugium nacházelo. Jelikož je tento druh vázán na biotop jarních tůní, ve kterých jeho vývoj probíhá

poměrně za nízkých teplot, je možné, že populace mohly glaciály přežívat v kryptických refugiích v periglaciální oblasti Evropy. Ačkoliv se *L. apus apus* vyskytuje i v ostatních středoevropských státech (Německo, Rakousko, Polsko, Slovensko, Maďarsko), byla prozatím detailní studie genetické struktury provedena pouze na území České republiky. Pro to, abychom zjistili původ středoevropských populací, bylo by potřeba provést rozsáhlejší genetické studie populací z dalších států.

## 7. Závěr

Listonoh jarní (*Lepidurus apus*) je typickým obyvatelem biotopu jarních tůní, což jsou dočasné vodní plochy (tůně či rozlitiny na polích a loukách) objevující se v jarních měsících v nivních oblastech velkých řek. Na území střední Evropy se tyto biotopy vyskytují v povodí tří velkých evropských řek (Labe, Dunaj, Odra), jež patří k odlišným úmořím.

Předkládaná práce je prvotní rozsáhlou studií zaměřenou na genetickou variabilitu a strukturu populací *L. apus* na území střední Evropy. V letech 2006 až 2010 proběhly terénní odběry listonohů na území České republiky, z nichž bylo celkem získáno 44 populací z 39 lokalit v povodí Labe, Moravy a Dyje. Analýza celkem 58 sekvencí části mitochondriálního genu COI prokázala, že všech 45 jedinců ze středoevropských populací (39 jedinců z území České republiky, 6 jedinců ze sousedních států - Německa, Rakouska a Polska) náleží do poddruhu *Lepidurus apus apus* a že genetická variabilita a struktura těchto populací je poměrně nízká s průměrnými hodnotami párových rozdílů 0,2 %.

Na rozdíl od listonohů *L. apus apus* byla u jiného druhu charakteristického pro jarní tůně, tj. žabronožku sněžní (*Eubbranchipus grubii*; Anostraca), zjištěna taktéž na základě mitochondriálního genu COI vyšší genetická variabilita a struktura českých populací (Rychtrmocová 2008). Populace *E. grubii* se rozdělily do dvou hlavních skupin (Morava-Labe, Odra) lišících se od sebe o 5,7 %, z čehož lze usuzovat na osidlování lokalit z různých refugií (Rychtrmocová 2008).

Nízká genetická variabilita a struktura středoevropských populací *L. apus apus* je zřejmě způsobena zvláštním způsobem rozmnožování (tzv. androdioécíí) a kolonizováním středoevropských lokalit malým počtem jedinců z jediného refugia a následné izolace zdrojové populace. Polohu refugia není na základě současného souboru dat možné odhadnout, protože dosud nebyly provedeny detailní genetické studie populací listonohů v ostatních středoevropských státech.

## Seznam citované literatury

- Alekseev V.R. a Starobogatov Y.I. (1996):** Types of diapause in Crustacea: Definitions, distribution, evolution. *Hydrobiologia* 320: 15–26.
- Bennett K.D., Tzedakis P.C a Willis K.J. (1991):** Quarternary refugia of north European trees. *Journal of Biogeography* 18: 103-115.
- Biggs J., Bilton D., Williams P., Nicolet P., Briggs L., Eeles B. a Whitfield M. (2004):** Temporary ponds of eastern Poland: an initial assessment of their importance for nature conservation. *Archives des Sciences*. 57(2-3): 73-83.
- Biggs, J., Bilton, D., Williams, P., Nicolet, P., Briggs, L., Eeles, B., & Whitfield, M. (2004).** Temporary ponds of eastern Poland: an initial assessment of their importance for nature conservation. *Archives des Sciences*, 57(2-3), 73-83.
- Bilton D.T., Freeland J.R. a Okamura B. (2001):** Dispersal in freshwater invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 159–181.
- Brendock L. a De Meester L. (2003):** Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia* 491: 65–83.
- Brendonck L. (1996):** Diapause, quiescence, hatching requirements: What we can learn from large freshwater branchiopods (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca, Notostraca, Conchostraca). *Hydrobiologia* 320: 85–97.
- Brendonck L. a Riddoch B.J. (1999):** Wind-borne short-range egg dispersal in anostracans (Crustacea: Branchiopoda). *Biological Journal of the Linnean Society* 67: 87–95.
- Brendonck L., Rogers D.C., Olesen J., Weeks S. a Hoeh W.R. (2008):** Global diversity of large branchiopods (Crustacea: Branchiopoda) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 167–176.
- \* **Brendonck L., Riddoch B.J., van de Weghe V. a van Dooren T. (1998):** The maintenance of egg banks in very short-lived pools – a case study with anostracans (Branchiopoda). In: Brendonck, L., De Meester, L. a Hairston, N.G.Jr. (eds): Evolutionary and Ecological Aspects of Crustacean Diapause. *Archive für Hydrobiologie*. 52: 141–161.



- Brtek J. a Thiéry A. (1995):** The geographic distribution of the European Branchiopods (Anostraca, Notostraca, Spinicaudata, Laevicaudata). *Hydrobiologia* 298: 263–280.
- Cáceres C.E. (1997):** Dormancy in invertebrates. *Invertebrate Biology* 116(4): 371-383.
- Cáceres C.E. a Soluk D.A. (2002):** Blowing in the wind: a field test of overland dispersal and colonization by aquatic invertebrates. *Oecologia* 131: 402–408.
- Chu K.H., Li C.P. a Ho H.Y. (2001):** The first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in Crustacea. *Marine Biotechnology* 3: 355–361.
- Costa F.O., deWaard J.R., Boutillier J., Ratnasingham S., Dooh R.T., Hajibabaei M. a Hebert P.D.N (2007):** Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64: 272-295.
- Daniels S. R., Hamer M. a Rogers Ch. (2004):** Molecular evidence suggests an ancient radiation for the fairy shrimp genus *Streptocephalus* (Branchiopoda: Anostraca). *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 313–327.
- De Meester L., Gómez A., Okamura B. a Schwenk K. (2002):** The Monopolization Hypothesis and the dispersal–gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta oecologica* 23 (3): 121-135.
- Dodson S.I. a Frey D.G. (1991):** Cladocera and Other Branchiopoda. In: Thorp, J.H. a Covich, A.P. (eds.): Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. *Academic Press* 273-787.
- Dumont H.J. a Negrea S. (2002):** Introduction to the Class Branchiopoda. *Backhuys Publishers, Leiden*. 398 s.
- Eder E., Hödl W. a Gottwald R. (1997):** Distribution and phenology of large branchiopods in Austria. *Journal of crustacean biology*. 20 (4): 657-662.
- Engelmann M., Hahn T. a Hoheisel G. (1997):** Ultrastructural characterization of the gonads of *Triops cancriformis* (Crustacea, Notostraca) from populations containing both females and males: no evidence for hermaphroditic reproduction. *Zoomorphology*, 117(3) : 175-180.



- Figuerola J. a Green A.J. (2002):** 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. a Santamaría L. (2003):** Passive internal transport of aquatic organisms by waterfowl in Donana, south-west Spain. *Global Ecology and Biogeography* 12: 427–436.
- Folmer O., Blaf M., Hoeh W., Lutz R. a Vrijenhoek R. (1994):** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- Frisch D., Green A.J. a Figuerola J. (2007):** High dispersal capacity of a broad spectrum of aquatic invertebrates via waterbirds. *Aquatic Sciences* 69 (4): 568–574.
- Goldyn B., Bernard R., Czyż M. J. a Jankowiak A. (2012):** Diversity and conservation status of large branchiopods (Crustacea) in ponds of western Poland. *Limnological-Ecology and Management of Inland Waters*. 42(4): 264-270.
- Graham T.B. a Wirth D. (2008):** Dispersal of large branchiopod cysts: potential movement by wind from potholes on the Colorado Plateau. *Hydrobiologia* 600: 17–27.
- Green A. J. a Figuerola J. (2005):** Recent advances in the study of long-distance dispersal of aquatic invertebrates via birds. *Diversity and Distributions* 11: 149-156.
- Grey D.K., Bailey S.A., Duggan I.C. a MacIsaac H.J. (2005):** Viability of invertebrate diapausing eggs exposed to saltwater: implications for Great Lakes' ship ballast management. *Biological Invasions* 7: 531–539.
- Hairston N.G.,jr. (1996):** Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnology and Oceanography* 41 (5): 1087–1092.
- Hänfling B., Hellemans B., Volckaert F. A. M. a Carvalho G. R. (2002):** Late glacial history of the cold-adapted freshwater fish *Cottus gobio*, revealed by microsatellites. *Molecular Ecology* 11 (9): 1717-1729.
- Heber P. D., Cywinska A. a Ball S. L. (2003):** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Science* 270 (1512): 313-321.

- Hebert, P. D. N.,** Accelerated Molecular Evolution in Halophilic Crustaceans. *Evolution*, 56 (5): 909–926.
- Hessen D. O., Rueness E. K. a Stabell M. (2004):** Circumpolar analysis of morphological and genetic diversity in the Notostracan *Lepidurus arcticus*. *Hydrobiologia* 519 (1-3): 73-84.
- Hewitt G. M. (2004):** Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359 (1442): 183-195.
- Hewitt G. M. (1999):.** Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87-112.
- Hewitt G. M. (2000):** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- 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.
- Hulsmans A., Moreau K., De Meester L., Riddoch B.J. a Brendonck L. (2007):** Direct and indirect measures of dispersal in the fairy shrimp *Branchipodopsis wolfi* indicate a small-scale isolation-by-distance pattern. *Limnology and Oceanography* 52 (2): 676–684.
- Kapler O. (1939):** Ze života lupenonožců (Euphyllopoda). *Příroda* roč. 32 (2): 1–7.
- Kapler O. (1940):** Ze života lupenonožců, druhý příspěvek. *Příroda* roč. 33 (2): 34–38.
- Kapler O. (1943):** Ze života lupenonožců známých z území Moravy. *Příroda* roč. 35 (6): 167–178.
- King J. L. a Hanner R. (1998):.** Cryptic Species in a “Living Fossil” Lineage: Taxonomic and Phylogenetic Relationships within the Genus „*Lepidurus*“ (Crustacea: Notostraca) in North America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10 (1): 23-36.
- Korhola A. a Rautio M. (2001):** Cladocera and other branchiopod crustaceans. In: Smol J.P., Birks H.J.B. a Last W.M. (eds.): Tracking environmental change using lake

sediments. Volume 4: Zoological indicators. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*, 5–41.

**Korn M., Rabet N., Ghate H. V. Marrone F. a Hundsdoerfer A. K. (2013):** Molecular phylogeny of the Notostraca. *Molecular phylogenetics and evolution* 69 (3): 1159-1171.

**Kotlík P., Bogutskaya N.G. a Ekmekci F.G. (2004):** Circum Black Sea phylogeography of *Barbus* freshwater fishes: divergence in the Pontic glacial refugium. *Molecular Ecology* 13: 87–95.

**Longhurst A.R. (1955) a:** Evolution in Notostraca. *Evolution* 9: 84–86.

\* **Longhurst A. R. (1955) b** A Review of the Notostraca, by Alan R. Longhurst,... *British Museum (Natural History)*.

**Ložek V. (1973):** Příroda ve čtvrtohorách. *Academia Praha*, s. 372.

**Ložek V. (2001):** Přirozené změny podnebí. Život se přizpůsoboval i drastickým výkyvům teploty. *Vesmír* 80: 146-152.

**Ložek V. (2007):** Zrcadlo minulosti. Česká a slovenská krajina v kvartéru. *Dokořán*. Praha. 198s.

**Lukáš J. (2000):** Occurrence of selected species of the class Branchiopoda in the territory of western Slovakia. *Folia faunistica Slovaca* 5: 87-90.

**Machar I. (1998):** Ochrana lužních lesů a olšin. Ochrana biologické rozmanitosti. *Agentura ochrany přírody a krajiny ČR*. Praha. 31 s.

**Mangerud J., Jansen E. a Landvik J. Y. (1996):** Late Cenozoic history of the Scandinavian and Barents Sea ice sheets. *Global and Planetary Change* 12 (1):11-26.

**Mantovani B., Cesari M. a Scanabissi F. (2004):** Molecular taxonomy and phylogeny of the ‘living fossil’ lineages *Triops* and *Lepidurus* (Branchiopoda: Notostraca). *Zoologica Scripta* 33(4): 367-374.

- Mantovani B., Cesari M. a Scanabissi F. (2009):** Molecular taxonomy and phylogeny of Italian *Lepidurus* taxa (Branchiopoda: Notostraca). *Italian Journal of Zoology* 76 (4): 358-365.
- Mantovani B., Cesari M., Luchetti A. a Scanabissi F. (2008):** Mitochondrial and nuclear DNA variability in the living fossil *Triops cancriformis* (Bosc, 1801) (Crustacea, Branchiopoda, Notostraca). *Heredity* 100 (5): 496-505.
- Mathers T. C., Hammond R. L., Jenner R. A., Zierold T., Hänfling, B. a Gómez A. (2013):** High lability of sexual system over 250 million years of evolution in morphologically conservative tadpole shrimps. *BMC evolutionary biology* 13 (1): 30.
- Mayer K. (1936):** K rozšíření lupenonožců (Triopsidae) v ČSR. Čs. rybář, 6: 1-4
- Mol J., Vandenberghe J.a Kasse C. (2000):** River response to variations of periglacial climate in mid-latitude Europe. *Geomorphology*. 33 (3): 131-148.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. and Erlich H. (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273
- Petit RJ., Aguinagalde I., Beualieu Jacques-L., Bittkau C., Brewer S., Cheddadi R., Ennos R., Fineshi S., Grivet D., Lascoux M., Mohanty A., Müller-Strack G., Demesure-Musch B., Palmé A., Martín J.P., Rendell S. a Vendramin G.G. (2003):** Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300 (5625): 1563-1565.
- Richter S., Olesen J. a Wheeler W.C. (2007):** Phylogeny of Branchiopoda (Crustacea) based on a combined analysis of morphological data and six molecular loci. *Cladistics* 23: 301–336.
- Rogers D. C. (2001):** Revision of the nearctic *Lepidurus* (Notostraca). *Journal of Crustacean Biology*. 21(4): 991-1006.
- Rulík M. a Měkotová J. (1995):** Program sledování jarních periodických tůní v CHKO Litovelské Pomoraví. *Ochrana přírody* 50, 3: 67-70.

- Růžička M. (2004):** The Pleistocene glaciation of Czechia. In: Ehlers J. a Gibbard P.L. (eds.): Development in Quaternary Sciences, Volume 2, Part 1: 27-34.
- Rychtrmocová H. (2008):** Vliv možnosti šíření žábřonožek (Crustacea: Anostraca) na genetickou strukturu populací - Diplomová práce. *Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova v Praze*, 90 s..
- Scanabissi F. a Mondini C (2002):** A survey of the reproductive biology in Italian branchiopods. *Hydrobiologia* 486(1): 263-272.
- Spieth P.T. (1974):** Gene flow and genetic differentiation. *Genetics* 78: 961–965.
- Šrámek-Hušek R. (1940):** K rozšíření a biologii žábřonožky *Chirocephalopsis grubei* a listonoha *Lepidurus apus* ve východním Polabí. *Věda přírodní* 20.
- Šrámek-Hušek R., Straškraba M. a Brtek J. (1962):** Lupenonožci – Branchiopoda. Fauna ČSSR (16). *Nakl. ČSAV, Praha*. 467 s.
- Stenseth N.Ch. a Lidicker W.Z. (eds.) (1992):** Animal dispersal: small mammals as a model. *Springer*, 365 s.
- Stewart J.R. a Lister A.D. (2001):** Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology and Evolution* 16 (11): 608–613.
- Thiéry A. a Gasc C. (1991):** Resting eggs of Anostraca, Notostraca and Spinicaudata (Crustacea, Branchiopoda) occurring in France: identification and taxonomical value. *Hydrobiologia* 212: 245 -259.
- Trentini M. a Scanabissi F.S. (1978):** Ultrastructural observations on the oogenesis of *Triops cancriformis* (Crustacea, Notostraca). *Cell and tissue research* 194 (1): 71-77.
- Valoušek B. (1951):** Periodická sněžní tůň jako biotop. *Práce moravskoslezské akademie věd přírodních* sv. 23, spis 20: 411–435.
- Vandenberghe J.a Woo M.K. (2002):** Modern and ancient periglacial river types. *Progress in Physical Geography* 26 (4): 479-506.

- Vanschoenwinkel B., Pinceel T., Vanhove M.P.M., Denis C., Jocque M., Timms B.V. a Brendonck L. (2012):** Toward a global phylogeny of the „living fossil“ Crustacean order of the Notostraca. *Plos One* 7(4): 1-9.
- Velonà A., Luchetti A., Scanabissi F. a Mantovani B. (2009):** Genetic variability and reproductive modalities in European populations of *Triops cancriformis* (Crustacea, Branchiopoda, Notostraca). *Italian Journal of Zoology* 76 (4): 366-375.
- Verovnik R., Sket B. aTrontelj 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.
- Vikas P. A., Sajeshkumar N. K., Thomas P. C., Chakraborty K. a Vijayan K. K. (2012):** Aquaculture related invasion of the exotic *Artemia franciscana* and displacement of the autochthonous *Artemia* populations from the hypersaline habitats of India. *Hydrobiologia* 684 (1): 129-142.
- Zierold T., Hanfling B. a Gómez A. (2007):** Recent evolution of alternative reproductive modes in the “living fossil” *Triops cancriformis*. *BMC Evolutionary Biology* 7: 161–172.

## **Přílohy**

Seznam příloh:

- P1: Stratigrafické členění čtvrtohor s přehledem glaciálů na evropském kontinentu
- P2: Přehled populací a osekvenovaných jedinců z území ČR, kteří byli použiti pro analýzu COI a ITS
- P3: Protokol pro etanolovou purifikaci
- P4: Přehled zahraničních vzorků, jejichž sekvence byly použity v této práci
- P5: Fylogram pro COI – bootstrap test
- P6: Topologie fylogramu pro COI, která zahrnuje pouze středoevropské populace *L. apus*
- P7: Fylogram pro ITS – bootstrap test

**P1: Stratigrafické členění čtvrtohor s přehledem glaciálů na evropském kontinentu** (včetně rozdělení názvů pro horské zalednění Alp a pevninské zalednění)

roky BP	kvartér		horské zalednění Alp		pevninské zalednění (Skandinávský ledovec)	
	oddělení	pododdělení	glaciály	interglaciály	glaciály	interglaciály
10 300	holocén					
130 000	pleistocén	svrchní	würm		weichsel	
			riss / würm			eem
střední		riss		saal		
		mindel / riss			holstein	
		mindel		elster (halštrovský)		
		günz / mindel		cromer (několik glaciálů a interglaciálů)		
788 000	spodní	günz		bavel (několik glaciálů a interglaciálů)		
		donau / günz			menap	
		donau			waal	
1 650 000				eburon		

BP = before present

Zdroj: Petránek 1993, Chlupáč 2002



**P2 : Přehled populací a osekvenovaných jedinců z území ČR, kteří byli použiti pro analýzu COI a ITS**

Povodí	Název lokality	Habitat	GPS	Datum	Odebral	Označení sekvence a č. izolátu pro COI		Označení sekvence č. izolátu pro ITS	
Dyje	Břeclav 03	tůň	N48 44.303 E16 53.012	15.4.2008	Sacherová	DBre0308	87	N	N
Dyje	Kančí obora 02	tůň	N48 46.075 E16 52.140	28.4.2006	Sacherová	DKan0206	7	DKan0206	7
Dyje	Kančí obora 02	tůň	N48 46.075 E16 52.140	29.3.2007	Sacherová	DKan0207	30	DKan0207/1 DKan0207/2	28 30
Dyje	Soutok 21	tůň	N48 37.475 E16 55.690	24.4.2009	Sacherová	DSou2109	52	DSou2109	52
Dyje	Soutok 23	tůň	N48 37.694 E16 55.886	24.4.2009	Sacherová	DSou2309	55	N	N
Dyje	Soutok 24	luční rozliténa	N48 38.539 E16 55.863	24.4.2009	Sacherová	DSou2409	60	N	N
Dyje	Soutok 25	lesní rozliténa	N48 39.466 E16 55.537	24.4.2009	Sacherová	DSou2509	61	DSou2509	61
Dyje	Soutok 26	tůň	N48 40.975 E16 55.453	24.4.2009	Sacherová	DSou2609	64	N	N
Dyje	Soutok 27	luční rozliténa	N48 42.580 E16 54.708	24.4.2009	Sacherová	DSou2709	67	N	N
Dyje	Soutok 30	tůň	N48 42.440 E16 56.219	24.4.2009	Sacherová	SSou3009	71	N	N
Labe	Kolesa 01	tůň	N50 04.942 E15 28.868	21.3.2007	Sacherová	LKol0107/1 LKol0107/2	40 41	LKol0107/1 LKol0107/2 LKol0107/3	40 41 42
Labe	Libický luh 05	tůň	N50 06.776 E15 10.786	18.4.2009	Sacherová	LLib0509	37	LLib0509	39
Labe	Libický luh 06	mírně průtočné rameno	N50 06.925 E15 10.393	18.4.2009	Sacherová	LLib0609	35	N	N
Labe	Opatovice 01	rozliténa	N50 07.260 E15 47.903	12.4.2007	Sacherová	LOpa0107/1 LOpa0107/2	2 6	N	N
Labe	Šnepov 01	údaj chybí	N50 10.707 E14 55.532	24.3.2007	Sacherová	LSne0107	125	LSne0107/1 LSne0107/2	124 125
Labe (Ohře)	Budyně n. Ohří	údaj chybí	N50 24.150 E14 07.352	3.5.2010	Sacherová	LBudxx10	121	N	N
Morava	Filena 03	údaj chybí	N49 15.902 E17 28.967	19.4.2010	Vopařilová	N	N	MFil0310	92

Morava	Hynkov 02	luční rozlitina	N49 40.346 E17 11.590	25.4.2010	Vopařilová	N	N	MHyn0210/1 MHyn0210/2 MHyn0210/3	103 ,104, 105
Morava	Litovel 02	staré rameno	N49 42.230 E17 06.625	24.4.2010	Vopařilová	MLit0210/1 MLit0210/2	101 102	MLit0210/1 MLit0210/2 MLit0210/3	100 101 102
Morava	Mladeč 01	staré rameno	N49 42.973 E17 00.529	25.4.2010	Vopařilová	MMla0110	118	N	N
Morava	Moravičany 01	údaj chybí	N49 45.338 E16 58.695	24.4.2006	Sacherová	MMor0106	12	N	N
Morava	Soutok 02	tůň	N48 41.052 E16 58.445	27.4.2006	Sacherová	MSou0206	9	N	N
Morava	Soutok 02	luční rozlitina	N48 41.052 E16 58.445	24.4.2009	Sacherová	MSou0209	44	MSou0209	44
Morava	Soutok 03	tůň	N48 39.982 E16 57.677	24.4.2009	Sacherová	SSou0309	126	SSou0309	126
Morava	Soutok 05	tůň	N48 38.557 E16 57.518	24.4.2009	Sacherová	MSou0509	46	N	N
Morava	Soutok 06	tůň	N48 37.890 E16 57.228	27.4.2006	Sacherová	MSou0606	23	MSou0606/1 MSou0606/2	24 26
Morava	Soutok 20	tůň	N48 38.024 E16 57.531	24.4.2009	Sacherová	MSou2009	50	N	N
Morava	Střeň 01	luční rozlitina	N49 42.492 E17 09.502	24.4.2010	Vopařilová	MStr0110	115	N	N
Morava	Střeň 02	lesní rozlitina	N49 42.118 E17 08.828	22.4.2010	Vopařilová	MStr0210	99	MStr0210	97
Morava	Tvrdonice 02	tůň	N48 44.882 E17 01.362	25.4.2009	Sacherová	MTvr0209/1 MTvr0209/2	73 75	MTvr0209	73
Morava	Tvrdonice 05	luční rozlitina	N48 43.517 E16 59.513	25.4.2009	Sacherová	MTvr0509	77	MTvr0509	77
Morava	Tvrdonice 06	rozlitina v lese	N48 43.713 E16 59.714	25.4.2009	Sacherová	N	N	MTvr0609	88
Morava	Tvrdonice 08	tůň	N48 47.914 E17 04.909	25.4.2009	Sacherová	MTvr0809	76	N	N
Morava	Tvrdonice 10	luční rozlitina	N48 45.620 E17 02.430	25.4.2009	Sacherová	MTvr1009	82	N	N
Morava	Tvrdonice 12	luční rozlitina	N48 43.213 E17 00.728	25.4.2009	Sacherová	MTvr1209	80	N	N
Morava	Včelín 02	tůň	N49 21.067 E17 21.280	26.4.2006	Sacherová	N	N	MVce0206	19
Morava	Včelín 05	tůň	N49 20.980 E17 20.598	17.4.2005	Sacherová	MVce0505	81	N	N
Morava	Včelín 06	tůň	údaj chybí	20.4.2010	Vopařilová	MVce0610/1 MVce0610/2	94 95	MVce0610	94

N – nepoužitá sekvence / izolát pro analýzu

Osmimístné označení sekvencí je vytvořeno podle následujícího klíče:

1. místo: zkratka povodí, ve kterém se lokalita nacházela (D - Dyje, M - Morava, L - Labe)
  2. – 6. místo: první tři písmena z názvu lokality a její číselné označení (dvojčíslí), pokud lokalita neměla číselné označení, je uvedeno xx
  7. – 8. místo: poslední dvojčíslí z odběrového roku (např. 2009 bude mít 09)
- Pozn. odlišní jedinci z téže populace jsou označeni číslicí za lomítkem

### **P3: Protokol pro etanolovou purifikaci**

1. K PCR produktu přidáme vodu tak, aby výsledný objem byl 100  $\mu$ l
2. Objem přepipetujeme do zkumavek o objemu 1,5 ml, které jsou určeny k odeslání na sekvenaci; zkumavky označíme popiskem
3. Přidáme octan sodný (1/10 objemu) – tj. 10  $\mu$ l
4. Přidáme dvojnásobek objemu vymraženého lihu (99,9 %) – tj. 200  $\mu$ l
5. Protřepeme na vortexu
6. Centrifugace 10 min při 14000 rpm (tj. max. otáčky); zkumavky umístíme do centrifugy tak, aby byly stejně orientované, zobáčkem na víčku směrem dovnitř
7. Po opatrném vyndání z centrifugy odsajeme pipetou tekutinu, PCR produkt zůstává vysrážený u dna zkumavky
8. Odsátou tekutinu pipetujeme do kádinky
9. K PCR produktu přidáme 100  $\mu$ l vymraženého 75% lihu
10. Protřepeme na vortexu
11. Centrifugace 10 min při 14000 rpm (tj. max. otáčky), poté odsajeme pipetou tekutinu nad PCR produktem
12. Zkumavky umístíme do heat-blocku a vysušíme úplně do sucha po dobu 2 hod a při teplotě 40 °C (zkumavky necháme otevřené, heat-block ohradíme alobalem)
13. Po dosušení dolijeme 20-25  $\mu$ l vody
14. Provedeme kontrolní vizualizaci pomocí gelové elektroforézy (1% gel)

**P4: Přehled zahraničních sekvencí použitých v analýze COI**

kód izolátu z GenBank	taxon	lokality (u střeoevropských populací uvedeno i povodí, pokud je známo)	reference
DQ148285 (LAA-Ba1)	Lepidurus apus apus	Rakousko, Marchegg (povodí Moravy)	Mantovani a kol. 2009
DQ834543 (LAA- Aa1)	Lepidurus apus apus	Rakousko, Marchegg (povodí Moravy)	Mantovani a kol. 2009
DQ834544 (LAA-Ba2)	Lepidurus apus apus	Rakousko, Marchegg (povodí Moravy)	Mantovani a kol. 2009
EF189669	Lepidurus apus apus	Spandauer Forst, (Z okraj Berlína), Německo (povodí Labe)	Richter a kol. 2007
HF911394	Lepidurus apus apus	Polsko	Korn a kol. 2013
JX110638	Lepidurus apus apus	Frankfurt-Oder, Německo (povodí Odry)	Mathers a kol. 2013
DQ148282 (LAL-Aa3)	Lepidurus apus lubbocki	Casel Porziano Itálie (Z pobřeží střední Itálie)	Mantovani a kol. 2009
DQ148283 (LAL-Ab1)	Lepidurus apus lubbocki	Casel Porziano Itálie (Z pobřeží střední Itálie)	Mantovani a kol. 2009
DQ148284 (LAL-Ad1)	Lepidurus apus lubbocki	Casel Porziano Itálie (Z pobřeží střední Itálie)	Mantovani a kol. 2009
DQ834540 (LAL-Aa1)	Lepidurus apus lubbocki	Casel Porziano Itálie (Z pobřeží střední Itálie)	Mantovani a kol. 2009
DQ834541 (LAL-Ac2)	Lepidurus apus lubbocki	Casel Porziano Itálie (Z pobřeží střední Itálie)	Mantovani a kol. 2009
DQ834542 (LAL- Ad1)	Lepidurus apus lubbocki	Casel Porziano Itálie (Z pobřeží střední Itálie)	Mantovani a kol. 2009
JX110643	Lepidurus apus lubbocki	Castel Porziano, Itálie (Z pobřeží střední Itálie)	Mathers a kol. 2013
HF911395	Lepidurus apus lubbocki	Itálie	Korn a kol. 2013
HF911396	Lepidurus apus lubbocki	Itálie	Korn a kol. 2013
HF911397	Lepidurus apus lubbocki	Izrael	Korn a kol. 2013
HF911398	Lepidurus apus viridis	Australie	Korn a kol. 2013
JX110641	Lepidurus arcticus	Strandvoll dammane, Špicberky, Norsko	Mathers a kol. 2013
DQ148291	Triops cancriformis	Grosseto, Itálie	Mantovani a kol. 2009

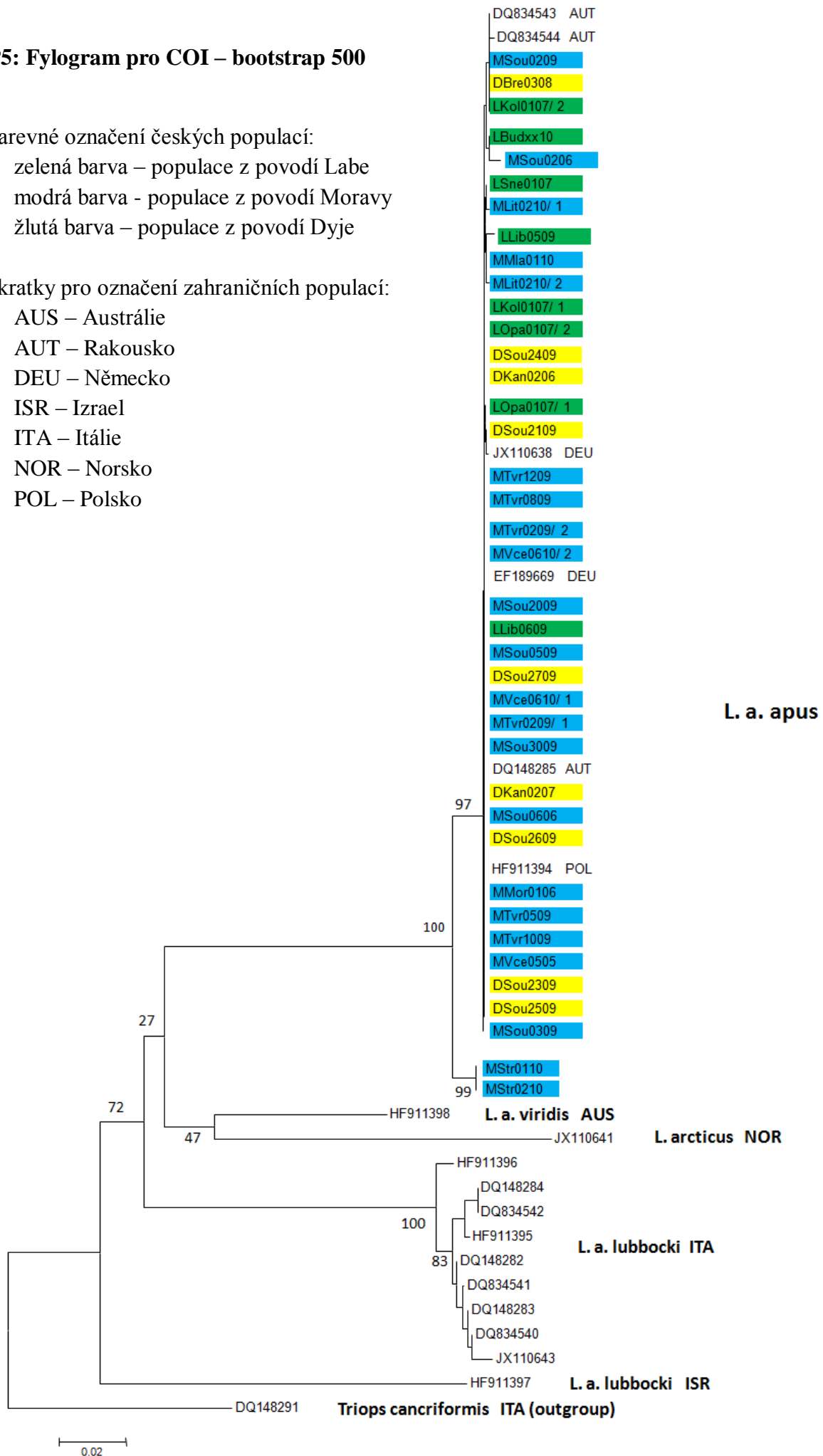
## P5: Fylogram pro COI – bootstrap 500

barevné označení českých populací:

- zelená barva – populace z povodí Labe
- modrá barva - populace z povodí Moravy
- žlutá barva – populace z povodí Dyje

zkratky pro označení zahraničních populací:

- AUS – Austrálie
- AUT – Rakousko
- DEU – Německo
- ISR – Izrael
- ITA – Itálie
- NOR – Norsko
- POL – Polsko



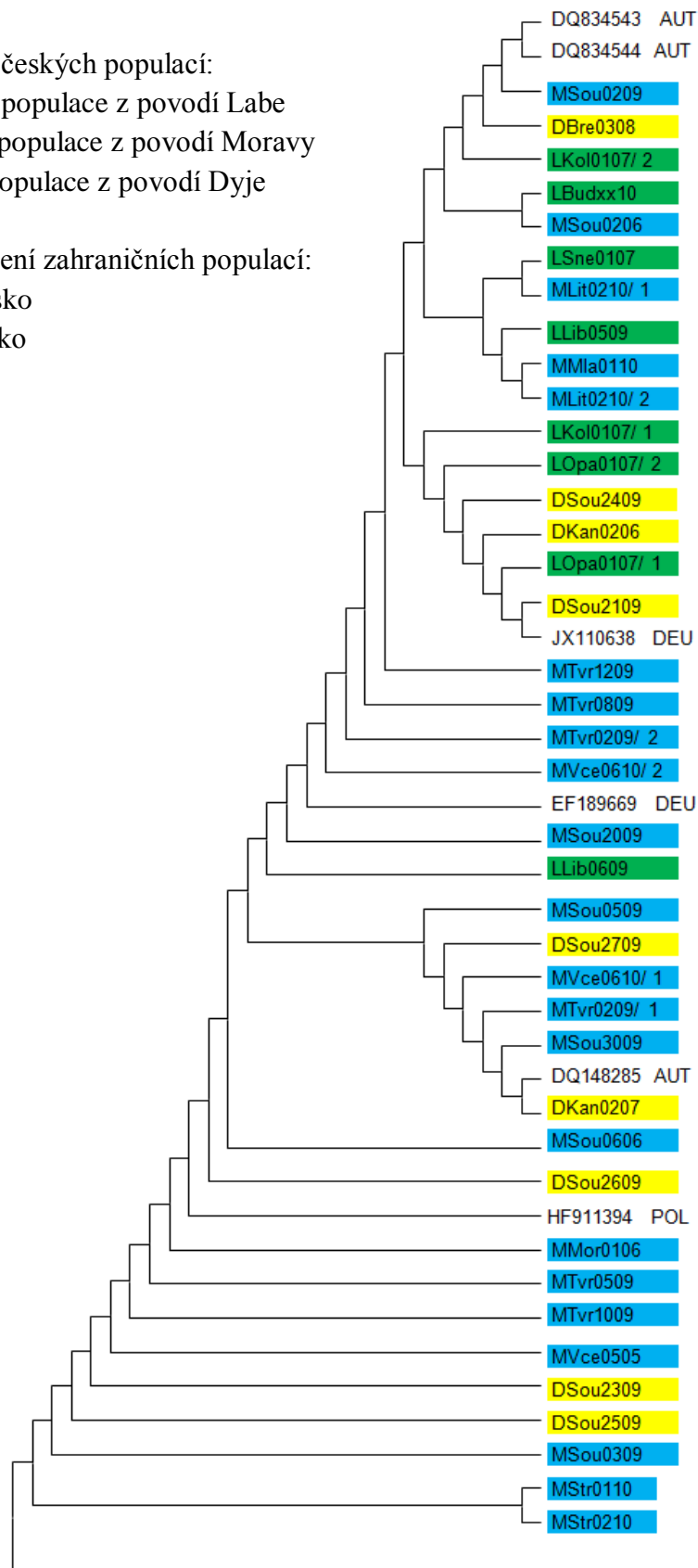
**P6: Topologie fylogramu pro COI, která zahrnuje pouze středoevropské populace *Lepidurus apus* (není dodrženo měřítko pro vzdálenosti jednotlivých větví)**

barevné označení českých populací:

- zelená barva – populace z povodí Labe
- modrá barva - populace z povodí Moravy
- žlutá barva – populace z povodí Dyje

zkratky pro označení zahraničních populací:

- AUT – Rakousko
- DEU – Německo
- POL – Polsko



## P7: Fylogram pro ITS – bootstrap 500

barevné označení českých populací:

zelená barva – populace z povodí Labe

modrá barva - populace z povodí Moravy

žlutá barva – populace z povodí Dyje

