

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ZOOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Genetická variabilita a kontaktní zóna dvou druhů slepýšů
(*Anguis fragilis*, *A. colchica*) na území České a Slovenské republiky

Genetic variation and contact zone of two species of Slow Worm
(*Anguis fragilis*, *A. colchica*) in the Czech and Slovak Republics

Autor práce: Ing. Helena Šifrová

Vedoucí práce: RNDr. Václav Gvoždík, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Daniel Jablonski

Praha 2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele a odborné podpory konzultanta, řádně citovala všechny použité informační zdroje a literaturu, a tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne: 14.8.2017

.....

Ing. Helena Šifrová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovat alespoň zlomku důležitých lidí, díky kterým mohla vzniknout tato diplomová práce. Největší dík a uznání patří mému vedoucímu práce RNDr. Václavu Gvoždíkovi Ph.D. za mé zasvěcení do zajímavé a aktuální problematiky, uvedení do laboratorní praxe, trpělivému, velmi ochotnému a odbornému vedení. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Jiřímu Moravcovi, CSc., vedoucímu zoologickému oddělení Národního muzea, pod jehož záštitou mohly probíhat terénní a laboratorní práce a Mgr. Danielu Jablonskému, který byl vždy k dispozici pro nejednu odbornou konzultaci. Cením si úsilí velké řady jednotlivců, kteří vypomáhali se sběrem dat a v neposlední řadě děkuji mé obětavé a chápavé rodině, obzvláště pak mému partneru Luďkovi Müllerovi, za jejich neutuchající podporu, trpělivost a povzbuzení a také všem mým přátelům, kteří více či méně chápali smysl mého bádání.

Poděkování také patří Agentuře ochrany přírody a krajiny České republiky a Ministerstvu životného prostredia Slovenskej republiky za udělení potřebných výjimek pro odchyt a manipulaci se silně ohroženým druhem živočicha a Národnímu muzeu, v jehož laboratořích probíhaly všechny potřebné laboratorní práce. Tato práce vznikala s finanční podporou interního grantu Národního muzea č. 478.

ABSTRAKT

Slepýši (*Anguis* spp.) jsou na území České a Slovenské republiky široce rozšířeny, ale skrytě žijícími zástupci plazů. Vzhledem k tomu, že morfologické znaky odlišující jednotlivé druhy tohoto rodu nejsou zcela jasně definovány a vykazují znaky klinální variability, bylo až na základě nedávných genetických studií potvrzeno, že se na těchto územích vyskytují dva z celkem pěti známých druhů. Detailnější poznatky o jejich rozšíření, přesnějším průběhu kontaktní zóny, stejně tak i doklady případné hybridizace, nebyly doposud dostatečné. V předkládané diplomové práci bylo genotypováno celkem 407 jedinců z 281 lokalit. Ke genetickým analýzám se podařilo získat 407 sekvencí fragmentu mitochondriálního genu ND2, 170 sekvencí fragmentu jaderného genu PRLR a 156 sekvencí taktéž jaderného genu RAG1. Výsledky genetických analýz potvrdili, že svým rozšířením dominuje na území České republiky druh *Anguis fragilis* a naopak na území Slovenské republiky je to druh *Anguis colchica*. Podařilo se zpřesnit průběh kontaktní zóny obou druhů, která se táhne severojižním směrem od severní Moravy a Slezska, přes Horno- a Dolnomoravský úval směrem na Slovensko k Malým Karpatům a přechází dál na území Podunajské roviny. Velmi minimální byly doposud poznatky o hybridizaci těchto dvou druhů. Na základě porovnání výsledků analýzy jaderných genů se podařilo detekovat řadu jedinců s hybridním genotypem a blíže tak specifikovat šíři hybridní zóny na studovaných územích. Demografické analýzy ukázaly na podobnou populační historii obou dvou druhů a odhalily, že po poměrně nedávné populační expanzi došlo ke stabilizaci velikosti populací, která trvá dodnes.

Klíčová slova: *Anguis fragilis*, *Anguis colchica*, slepýš, střední Evropa, molekulární biogeografie, mitochondriální a jaderná DNA, genetická struktura.

ABSTRACT

The members of the genus *Anguis* are widely but hidden living reptile species in the Czech and Slovak Republic. Due to their slight morphological characters among species of the genus, presence of two out of five species in the study area has only recently been confirmed. However, a detailed knowledge about their distribution, contact zones or potential hybridization is still unknown or very insufficient. In this master thesis, 407 individuals of *Anguis fragilis* and *A. colchica* out of 281 locations were genotyped. 407 sequences of the mitochondrial marker ND2, 170 sequences of PRLR and 156 sequences RAG1 (both nuclear markers) were used for the genetic analyses. The results confirmed the dominant species *A. fragilis* for the Czech Republic and *A. colchica* for the Slovak Republic. The contact and potential hybrid zone has north-south direction from northern Moravia and Silesia, across the Morava River valleys to the Little Carpathians and the Danubian Lowland in Slovakia. The most important information of this thesis is about potential hybridization of these species. My analyses reveal that high number of individuals in the north-south direction zone has hybrid genotype. It allowed detecting the width of the hybrid zone and more accurate genetic structure among species and populations. In addition, demographic analyses show similar population history in both species with recent population expansion from glacial refugia with current stability in their population size.

Key words: *Anguis fragilis*, *Anguis colchica*, slow worm, Central Europe, molecular biogeography, mitochondrial and nuclear DNA, genetic structure.

Obsah

1 ÚVOD	8
1.1 Cíle	10
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1 Systematické zařazení a fylogenetické vztahy v rámci rodu <i>Anguis</i>	11
2.2 Vliv paleogeografického vývoje evropského kontinentu na genetickou strukturu populací	13
2.3 Celkové rozšíření jednotlivých druhů	15
2.3.1 Kontaktní zóny	17
2.4 Morfologie.....	19
2.4.1 Morfologické rozdíly slepýšů na území ČR.....	21
2.5 Volba molekulárních DNA lokusů	22
2.5.1 Mitochondriální gen ND2.....	24
2.5.2 Jaderný gen RAG1	25
2.5.3 Jaderný gen PRLR.....	26
3 MATERIÁL A METODIKA	27
3.1 Získání vzorků a jejich odběr	27
3.2 Laboratorní analýzy.....	29
3.2.1 Izolace DNA	30
3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	30
3.2.3 Elektroforéza	32
3.2.4 Přečištění (purifikace) PCR produktů	32
3.3 Zpracování dat.....	33
3.3.1 Datasetsy	33
3.3.2 Populační charakteristiky a demografické analýzy	33
3.3.2.1 Sumární statistika.....	33
3.3.2.2 Mismatch distribution (MD).....	34
3.3.2.3 Testy neutrality.....	34
3.3.2.4 Bayesian skyline plot (BSP).....	35
3.3.2.5 Haplotypové sítě.....	36
4 VÝSLEDKY	37
4.1 Analýzy mitochondriálního genu ND2	37
4.1.1 Molekulární analýzy a genetická variabilita genu ND2	37
4.1.2 Fylogeografická distribuce genu ND2.....	38

4.1.3	Demografické analýzy.....	41
4.1.3.1	Testy neutrality.....	41
4.1.3.2	Mismatch distribution (MD).....	41
4.1.3.3	Bayesian skyline plots (BSPs).....	42
4.1.4	Srovnání haplotypové distribuce na území Polské republiky.....	43
4.2	Analýza jaderného genu PRLR.....	45
4.3	Analýza jaderného genu RAG1.....	48
4.4	Hybridní genotypy.....	50
5	DISKUZE.....	52
6	ZÁVĚR.....	59
7	SEZNAM LITERATURY.....	61
8	PŘÍLOHY.....	73

1 ÚVOD

V počátcích taxonomické klasifikace v 18. století zařadil Carl von Linné (1758) slepýše (rod *Anguis*) mezi hady. Stejně tak tomu bylo v nejstarším přehledu fauny českých zemí (Schmidt, 1789). Jedná se však o beznohého ještěra, který je i v současné době laickou veřejností někdy mylně považován za nebezpečného hada. Při uchopení sice může v sebeobraně slepýš člověka kousnout, není to však příliš časté a drobné zoubky nezpůsobí výraznější poranění.

Široká ekologická valence a potravní generalismus umožňuje slepýšům obsazení značné škály habitatů (Brown et al., 2012). Vyznačují se proto velmi rozsáhlým areálem rozšíření zahrnujícím téměř celou Evropu, vyjma jižního Španělska, Irska a severní Skandinávie. Dále zasahují na Blízký východ a do Ruska až k západní Sibiři. V biotopech s ideálními podmínkami mohou populace slepýšů dosahovat poměrně vysokých hustot (až 1000 – 1700 ks/ha). Přesto se s nimi člověk, vzhledem k jejich skrytému až semifosoriálnímu způsobu života, dostane do kontaktu jen výjimečně (Ferreiro & Galán, 2004; Vences, 1993).

V posledních letech dostal rod *Anguis* řady taxonomických změn. Díky moderním metodám molekulárně genetické diagnostiky byly odhaleny hluboké divergence, které naznačují, že původně široce rozšířený druh *Anguis fragilis* nebude druhem jediným. Dřívější poddruhy tohoto druhu byly povýšeny na samostatnou druhovou úroveň a podařilo se odhalit i další doposud skryté evoluční linie, které byly povýšeny do dvou, pro faunu Evropy zcela nových druhů (Gvoždík et al., 2010, 2013).

Území České a Slovenské republiky je zajímavé kontaktem areálů rozšíření dvou druhů slepýšů. Převážně na západě se zde vyskytuje slepýš křehký (*Anguis fragilis*) a na východě slepýš východní (*Anguis colchica*). Na základě genetických dat se areály jejich rozšíření setkávají v nepříliš široké kontaktní zóně (Gvoždík et al., 2010), jejíž přibližná pozice reflektuje již dříve nastíněnou linii, vycházející z pozorování morfologických rozdílů. Vzhledem k výskytu přechodných forem je předpokládána i jistá míra hybridizace, která byla zachycena např. v nedalekém Maďarsku (Szabó & Vörös, 2014)

Biogeografická distribuce rodu *Anguis* v Evropě odpovídá všeobecně uznávanému paradigmatu o vlivu glaciálů na distribuci a evoluci druhů (Schmitt, 2007). S nárůstem kontinentálního ledovce se slepýši stahovali směrem na jih do mediteránních refugií, kde docházelo k alopatrické divergenci populací (Jablonski et al., 2016). Na studovaném území

vedla zpětná kolonizace Evropy k vytvoření lineární kontaktní zóny. Vlivem neúplně vyvinutých reprodukčně izolačních bariér se v oblasti soudobého kontaktu populací *A. fragilis* a *A. colchica* vytváří sekundární hybridní zóna. Vlastní míra přežívání hybridních jedinců a případná introgrese zatím nebyla blíže studována.

Tato diplomová práce se proto zabývá zpřesněním dosavadních poznatků o rozšíření obou druhů slepýšů na území České a Slovenské republiky přiblížením genetické variability populací a doložením jejich hybridizace. V průběhu studie bylo sesbíráno 407 vzorků, u kterých proběhla analýza jednoho mitochondriálního (mtDNA) a dvou jaderných (nDNA) genů. Jednalo se o mitochondriální úsek genu druhé podjednotky NADH dehydrogenázy (ND2) a části jaderného genu pro receptor prolaktinu (PRLR) a rekombinačně-aktivačního genu 1 (RAG 1).

Zpřesnění výskytu obou druhů, šíře kontaktní zóny a míra hybridizace jsou důležitými poznatky nejenom pro ochranářskou genetiku. Vzhledem k neznalosti fitness hybridních jedinců by umělé promísení populací mohlo v dlouhodobém horizontu vést i ke značnému oslabení populace (Platenberg & Griffiths, 1999). Mimo jiné nám nové informace poskytnou další důležitý díl skládky odhalující formování naší i celoevropské fauny.

1.1 Cíle

- 1) Na základě genetických dat zpřesnit poznatky o rozšíření slepýše křehkého (*Anguis fragilis*) a slepýše východního (*Anguis colchica*) na území České a Slovenské republiky.
- 2) Ověřit možnost využití genu RAG 1 pro identifikaci a hybridizaci obou druhů.
- 3) Na základě kombinace sekvencí mtDNA a nDNA zjistit míru mezidruhové hybridizace a blíže lokalizovat kontaktní/hybridní zónu.
- 4) Postulovat hypotézu o historii populační demografie dvou druhů slepýšů ve střední Evropě dle srovnání jejich vnitrodruhové genetické variability.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Systematické zařazení a fylogenetické vztahy v rámci rodu *Anguis*

V současné době se do čeledi Anguidae (slepýšoviti) řadí kolem 120 recentních druhů. Tradičně je dělena na 2 až 4 podčeledi. V Severní až Střední Americe žijí aligátorci podčeledi Gerrhonotinae, v Jižní Americe dvojjazyčníci podčeledi Diploglossinae a v oblasti Kalifornie až Mexika hadovci podčeledi Anniellinae. Podčeledi Anniellinae a Diploglossinae jsou však na základě některých molekulárních studií chápány jako samostatné čeledi Anniellidae a Diploglossidae (Conrad, 2008; Hedges & Vidal, 2009; Macey et al., 1999; Pyron et al., 2013; Vitt & Caldwell, 2014). Pod zbývající podčeleď Anguinae spadají blavoři a slepýši, kteří jsou rozšířeni v oblasti Starého světa (Evropa, Asie a severozápadní Afrika) a Severní a Střední Ameriky (Moravec, 2015).

V rámci podčeledi Anguinae rozlišujeme pět rodů. Čtyři z nich se řadí mezi blavory: rod *Dopasia* (Čína a jihovýchodní Asie), *Hyalosaurus* (Alžír a Maroko), *Ophisaurus* (jih a jihovýchod USA a jihovýchod Mexika) a rod *Pseudopus* (jihovýchodní Evropa, Střední Asie). Slepýši rodu *Anguis* osídlují Evropu a směrem na východ Turecko, Kavkaz, severozápadní Írán a přes Rusko zasahují až k západní Sibiři (de Pous et al., 2011; Gvoždík et al., 2010; Macey et al., 1999; Nguyen et al., 2011).

Jak poukázal Džukić (1987), u rodu *Anguis* následovalo mnoho autorů názor Wermutha (1950) a Mertense & Wermutha (1960), kteří ustanovili jediného zástupce rodu, slepýše křehkého (*Anguis fragilis*), za polytypický druh, který byl napříč svým rozsáhlým areálem rozšíření na základě klasických morfologických metod rozlišován na tři poddruhy: *A. f. fragilis* Linnaeus, 1758, *A. f. colchicus* (Nordmann, 1840) a *A. f. peloponnesiacus* Štěpánek, 1937 (např. Mertens & Wermuth, 1960; Petzold, 1971). Množství nových poznatků získaných používáním moderních molekulárně-genetických metod v zoologii vneslo do taxonomie a fylogenetiky celé řady skupin další rozměr. Stejně tak je tomu i v případě slepýšů rodu *Anguis*. Obě metody mají své výhody, nevýhody a limity. Rekonstrukce fylogeneze jednotlivých taxonů by měla v optimálním případě zohledňovat poznatky obou metod. Důležitou výhodou molekulárních dat je jejich nízké ovlivnění vlivy prostředí, ve kterém se organismus vyskytuje (Hillis, 1987). Metodika morfometrických studií naráží na několik úskalí. Při hodnocení kvantitativních a kvalitativních znaků je potřeba zohlednit věk jedince, sexuální dimorfismus a setkáváme se i s vysokým podílem

nekompletních jedinců s regeneráty ocasu (Gvoždík & Moravec, 2015). Dřívější odborné práce sice posuzovaly dokladový materiál získaný z celého rozsáhlého areálu rozšíření druhu, avšak nikdy nebylo zajištěno větší množství vzorků z jedné lokality pro zohlednění barevné variability v rámci menší populační jednotky. Značný barevný polymorfismus, sexuální dimorfismus a různé méně časté odchylky od základního zbarvení tak v minulosti vedly k popisu celé řady barevných aberací a variet (přehled viz Mertens & Wermuth, 1960; Sos, 2010).

První dva poddruhy, západní nominotypický poddruh *A. f. fragilis* a východní *A. f. colchicus* (alternativně označovány jako morfotypy „fragilis“ a „colchica“), byly od sebe odlišovány na základě souboru morfologických znaků, jako jsou počet šupin kolem středu těla, pozice prefrontálních štítků, zřetelnost ušního otvoru a doplňujícím znakem byl uváděn výskyt modře zbarvených šupin na hřbetě zvířat (blíže viz kapitola 2.4 - Morfologie) (Dely, 1974; Mertens & Wermuth, 1960; Štěpánek, 1937; Wermuth, 1950). Proměnlivost těchto morfologických znaků, které vykazující spíše klinální charakter, však vedla k diskusi nad taxonomickým postavením těchto poddruhů (Gvoždík & Moravec, 2015).

Posun v systematice slepýše přišel na začátku 90. let 20. století. Výraznější morfologické rozdíly, elektroforetická analýza proteinů (Mayer et al., 1991) a absence přechodných forem mezi *A. f. colchicus* a *A. f. peloponnesiacus* v oblasti jejich sympatrického výskytu na území Řecka, vedly k hlubší revizi jejich taxonomické pozice. Poddruh *A. f. peloponnesiacus* vyskytující se na Peloponésském poloostrově a přilehlých řeckých ostrovech Kefalonii, Zakynthosu a Ithace, synonymizovaný s *A. fragilis* var. *cephallonica* Werner, 1984, byl povýšen na druhovou úroveň jako slepýš peloponéský, *A. cephalonica* Werner, 1894 (Grillitsch & Cabela, 1990; Mayer et al., 1990).

Až na základě genetického výzkumu byly v posledních letech prokázány hlubší genetické rozdíly odhalující složitější taxonomickou strukturu v rámci celého druhového komplexu *Anguis fragilis* sensu lato. Byla potvrzena validita samostatného druhu slepýše peloponéského, *Anguis cephalonica*, ale dříve široce pojatý druh slepýš křehký, *Anguis fragilis* sensu lato, se ukázal být ve skutečnosti druhovým komplexem čtyř druhů: (1) slepýš křehký, *A. fragilis* Linnaeus, 1758 sensu stricto v západní až střední Evropě, Skandinávii, severozápadním Balkánu, severním Řecku a jihozápadním Bulharsku, (2) slepýš východní, *A. colchica* (Nordmann, 1840) ve střední až východní Evropě, Turecku, na Kavkazu a v severním Íránu, (3) slepýš řecký, *A. graeca* Bedriaga, 1881 z jižní části

Balkánského poloostrova až severního Peloponésu a (4) slepýš italský, *A. veronensis* Pollini, 1818 z Itálie a jihovýchodní Francie (Gvoždík et al., 2008, 2010, 2011, 2013; Gvoždík & Moravec, 2015; Strzała et al., 2017). Srovnání morfologických znaků mezi nově uznávanými druhy je v současné době předmětem dalšího výzkumu (Benkovský et al., 2011, 2012).

Za jediný polytypický druh se třemi geneticky vymezenými poddruhy je v současné době považován slepýš východní. Gvoždík et al. (2010) navrhl nomenklatorickou podobu jmen následovně: v oblasti Kavkazu nalezneme nominotypický poddruh *A. c. colchica* (Nordmann, 1840), kolem jižního pobřeží Kaspického moře (severní Írán a pravděpodobně jihovýchodní Ázerbájdžán) poddruh *A. c. orientalis* Anderson, 1872 a ve zbylé části areálu rozšíření, zahrnujícím většinu východní Evropy a oblasti severně od Kavkazu, včetně východní části České republiky, poddruh *A. c. incerta* Krynicki, 1837. Kromě těchto linií byla v oblasti severního Turecka a JV Bulharska detekována tzv. „pontická linie“, která je považována za zatím nový a nepopsaný poddruh slepýše východního (Jablonski et al. 2016).

Z nomenklatorického hlediska upozornil na důležitou skutečnost Gvoždík (2010), který vyzdvihl Linného (1758) prvotní ustanovení rodového jména *Anguis* v ženském gramatickém rodě. Stejně tak druhové a poddruhové názvy tak musí být používány jako feminina, tj. např. *A. colchica*, místo *A. colchicus* (viz Mezinárodní pravidla zoologické nomenklatury, ICZN 1999, článek 30.1.4.2).

2.2 Vliv paleogeografického vývoje evropského kontinentu na genetickou strukturu populací

Ve světle biogeografických a paleontologických nálezů má v Eurasii čeleď Anguidae (slepýšoviti) dlouhou a bohatou evoluční historii. Pravděpodobný původ celé skupiny je situován do oblastí původní Laurasie (Macey et al., 1999). Nadčeleď Anguimorpha je známa od svrchní jury a od svrchní křídy i vlastní čeleď Anguidae, u které se začínají objevovat tendence k redukci končetin a hadovitému typu těla. V kenozoiku pak četnost fosilních záznamů značně stoupá (Roček, 2002; Vitt & Caldwell, 2014). Bazální radiace stávajících druhů slepýšů, založená na mtDNA, se datuje do období pozdního miocénu (přibližně 5,7 mil. let) (Gvoždík et al., 2010). Bohaté fosilní záznamy ze západní Evropy (Francie a Německo) z období přelomu oligocénu a miocénu naznačují, že skupina nepatří mezi tak zvané asijské migranty, ale naopak za centrum jejího šíření se dá

považovat právě Evropa (Ivanov, 2015; Klembara, 1979).

Paleogeografický vývoj evropského kontinentu měl na formování evropské fauny plazů podstatný vliv. I speciace v rámci rodu *Anguis* a následné šíření jednotlivých druhů bylo podle obecně uznávaného paradigmatu ovlivněno zásadními geomorfologickými procesy a kvartérním střídáním klimatických cyklů. Nejen pro slepýše jsou hlavními migračními bariérami velké vodní toky a vysoká pohoří, která se začala formovat na přelomu druhohor a třetihor. Alpínská orogeneze dala za vznik Alpsko-himálajskému systému, ke kterému se řadí například Pyreneje, Apeniny, Alpy, Karpaty, Balkanidy, Dinaridy a Helenidy (Hewitt, 1999, 2004). Během Messinské salinitní krize v období pozdního miocénu (před 5,96 - 5,33 mil. let), kdy vzniklo terestrické spojení Apeninského a Balkánského poloostrova, docházelo v oblasti zřejmě k významným genovým tokům, na které je třeba brát zřetel při hodnocení fylogeografických výstupů (Gvoždík et al., 2013).

Pleistocenní oscilace klimatu značně ovlivňovaly distribuci a evoluci evropských druhů (Avice et al., 1987; Hewitt, 2004). Současné poznatky o genetické variabilitě populací slepýšů vykazují podle Schmitta (2007) a Jablonského et al. (2016) znaky typické pro druhy se středozezemním (mediteránním) vzorem refugií (tzv. refugia-within-refugia model, Goméz & Lunt, 2007). Avšak v případě některých populací *A. fragilis* a *A. colchica* se jedná i o vzácné případy, kdy se populace stáhly do tzv. extra-mediteránních refugií a kolonizovali mediteránní oblasti druhotně (Jablonski et al., 2016). Při ústupu ledovce řadí Böhme (1996) druh *Anguis fragilis* spolu s ještěrkou *Lacerta agilis* mezi brzké migranty. Tito zástupci herpetofauny osídlují uvolněné lokality během první části teplého cyklu a jako poikiloternní živočichové, jsou významnými indikátory vývoje paleoprostředí.

Například u *A. cephalonica*, endemického druhu Peloponéskeho poloostrova, poukazují nedávné výzkumy na vysokou vnitrodruhovou variabilitu mtDNA, což v oblasti naznačuje přítomnost mnohačetných glaciálních subrefugií. Naopak *A. graeca*, zasahující na sever Peloponéskeho poloostrova z Řecka, se díky nízké variabilitě jeví jako nedávný migrant obsazující nová území, pravděpodobně během konce pozdního pleistocénu nebo dokonce až během holocénu (Jablonski et al., 2016; Thanou et al., 2014).

První nálezy slepýšovitých ještěrů na území České republiky se datují do období spodního miocénu. Rody *Anguis*, *Ophisaurus* a *Pseudopus* jsou doloženy fosilním materiálem z geologických lokalit Merkur a Dolnice v severozápadních Čechách. Lze konstatovat, že podčeleď Anguinae byla v Evropě velmi úspěšnou a rozmanitou skupinou (Klembara, 2014; Roček, 1984). Formování druhového komplexu *Anguis fragilis* sensu

lato, tvořeného v současné době pěti druhy slepýšů, je datováno do období svrchního miocénu až časného pliocénu (Gvoždík et al., 2008, 2010, 2011, 2013). Od počátku pliocénu se již hojně objevují fosilní nálezy srovnatelné s recentními druhy rodu *Anguis*, jež se v Evropě prvně objevují ve svrchním miocénu na hranici zón MN 10/MN 11 (Klembara et al., 2010; Roček, 2002; Tempfer, 2005).

2.3 Celkové rozšíření jednotlivých druhů

Slepýše (*Anguis* spp.), s jejich rozsáhlým areálem rozšíření, nalezneme od severních oblastí Pyrenejského poloostrova, přes celou Evropu až po Blízký východ. Do Ruska zasahují až k západní Sibiři. Nevyskytují se v Irsku, na Krymu, na jihu Španělska, na některých středomořských ostrovech a chybí v severní Skandinávii a Laponsku.

V současné době zahrnuje rod *Anguis* pět druhů se třemi poddruhy. Areály jejich rozšíření se okrajově překrývají ve čtyřech kontaktních, potenciálně hybridních zónách (viz kapitola 2.3.1 - Kontaktní zóny), ve kterých se na různé úrovni vyskytují sympatricky (Gvoždík et al., 2010, 2013; Jablonski et al., 2016).

1) *Anguis fragilis* Linnaeus, 1758 – slepýš křehký.

Locus typicus restrictus (Mertens & Müller, 1928) – „Schweden“ (Švédsko)

Vyazuje západopalearktický typ rozšíření. Oblast výskytu zahrnuje západní Evropu od severní poloviny Pyrenejského poloostrova (Portugalsko, Španělsko), Francii s výjimkou jihovýchodu, Velkou Británii (v Irsku se nevyskytuje). Dále pak střední Evropu po západní Polsko, východní oblasti České republiky, jihozápad Slovenské republiky a Maďarsko na západ od Dunaje. Severní hranice výskytu se táhne přes Dánsko a jižní oblasti Skandinávie (jižní Norsko a Švédsko podél Botnického zálivu až po 65° s. š.). Na jihu zasahuje do Alp v oblastech severní Itálie, následně na severozápadní a centrální území Balkánského poloostrova (Slovinsko, Chorvatsko, Bosna a Hercegovina, západní a jižní Srbsko) a přes horské oblasti Černé Hory, severní Albánii, Kosovo, sever Makedonské republiky, jihozápadního Bulharska až do severovýchodního Řecka k Thráckému moři (Džukić, 1987; Galán, 2014; Gvoždík et al., 2010, 2013; Gvoždík & Moravec, 2015; Jablonski et al., 2012, 2013a, 2013b, 2015, 2016; Szabó & Vörös, 2014; Jablonski, nepublikovaná data).

2) *Anguis colchica* (Nordmann, 1840) – slepýš východní.

Typová lokalita – „en Abasie et en Mingrélie“ (Kubán v jižním Rusku a Mingrelie v západní Gruzii)

Západní hranice výskytu se táhne severojižním směrem od pobřeží Baltského moře, přes pobaltské republiky, východní Polsko, východ České republiky (severozápadní až jižní Morava) a jihozápadní Slovensko. V Maďarsku se populace vyskytují na východ od Dunaje, dále v Rumunsku, na východě Srbska a v severním a východním Bulharsku. V Turecku proniká slepýš východní podél pobřeží Černého moře přes Zakavkazsko až do severního Íránu. Ze střední Evropy je rozšířen přes Moldávii, Ukrajinu, Bělorusko, severně pak přes Baltské státy a východní Skandinávii dále do Ruska, kde zasahuje až do oblastí západní Sibiře k řece Tobol (Sindaco et al., 2000; Gvoždík et al., 2010, 2013, Jablonski et al., 2012, 2013a, 2013b, 2015, 2016; Szabó & Vörös, 2014; Moravec & Gvoždík, 2015a).

V současné době jsou na základě hlubších rozdílů v jaderné a mitochondriální DNA mimo široce rozšířeného poddruhu *A. c. incerta* odlišovány dvě další, pravděpodobně geograficky izolované, evoluční linie. Nominotypický poddruhu *A. c. colchica* a *A. c. orientalis* (Gvoždík et al., 2010, 2013; Szabó & Vörös, 2014).

2a) *A. c. colchica* (Nordmann, 1840) – Typová lokalita (Macey et al., 1999) - “Babukal, Krasnodarsky Territory, Russia“ (Babukal, Krasnodarský kraj, Rusko) - Gruzie, Kavkazská část Ruska, severovýchodní Turecko.

2b) *A. c. incerta* Krynicki, 1837 – Typová lokalita (Mertens & Wermuth, 1960) – “Wilna, Litauen” (Vilnius, Litva) – Litva, severovýchodní Polsko, východ České republiky, Slovensko, Ukrajina, Rumunsko, severovýchodní Maďarsko.

2c) *A. c. orientalis* Anderson, 1872 – Typová lokalita – “Rehst, on the Caspian Sea” (Rašt, severní Írán) – severní Írán a pravděpodobně jihovýchodní Ázerbájdžán.

3) *Anguis graeca* Bedriaga, 1881 – slepýš řecký.

Typová lokalita (Gvoždík et al., 2010) – “Parnaß-Gebirge, Griechenland” (pohoří Parnas, Řecko).

Populace druhu nalezneme výhradně na území Balkánského poloostrova. Druh je doložen od nejjižnějších oblastí Černé Hory, přes Albánii a jihozápad Makedonské republiky dále směrem na jih do Řecka, kde se v oblasti severního Peloponésu vyskytuje částečně sympatricky se slepýšem peloponéským (*A. cephallonica*). Na severovýchodě Řecka zřejmě zasahuje do oblastí kolem řeky Vardar, kde se setkává s *A. fragilis*.

Z řeckých ostrovů je výskyt potvrzen na ostrovech Korfu a Evvoia (Gvoždík et al., 2010; Jablonski et al., 2012, 2016; Szabó & Vörös, 2014; Thanou et al., 2014).

4) *Anguis veronensis* Pollini, 1818 – slepýš italský.

Typová lokalita (Pollini, 1818) – “Caldiero e la Ruota” (provincie Verona, Itálie).

Rozšířený po celém Apeninském poloostrově až do jižních oblastí Alp a doložen z několika lokalit v jihovýchodní Francii (Gvoždík et al., 2011, 2013; Mezzasalma et al., 2013).

5) *Anguis cephalonica* Werner, 1894 – slepýš peloponéský.

Typová lokalita (Werner, 1894) – “Lagune Kotavos bei Argostoli, Berg Agios Georgios und Sami auf Kephallonia; Berg Skopos auf der Insel Zante“ (Laguna Kotavos u Argostoli, Agios Georgios a Sami na ostrově Kefalonia; hora Skopos na ostrově Zakynthos).

Na základě jasných morfologických rozdílů se jedná o nejdéle uznávaný samostatný druh, jehož validita byla posléze prokázána i na genetické úrovni. Rozšířený je na území jižního Řecka, konkrétně se jedná o endemický druh poloostrova Peloponés a přilehlých ostrovů Zakynthos, Kefalonia a Ithaka (Grillitsch & Cabela, 1990; Gvoždík et al., 2010, 2013; Jablonski et al., 2016; Mayer et al., 1991; Strzała et al., 2016; Thanou et al., 2014).

2.3.1 Kontaktní zóny

Jak již bylo zmíněno v úvodní kapitole o taxonomii rodu *Anguis*, teprve až nedávné genetické studie nám daly nahlédnout do složitějších fylogenetických vztahů mezi slepýši. Díky minimálním a mnohdy obtížně sledovatelným morfologickým rozdílům dlouhodobě unikalo konkrétní rozšíření jednotlivých druhů pozornosti. Dosavadní poznatky o rozšíření na základě genetických dat jsou stále velmi čerstvé a znalosti přesného průběhu kontaktních, potenciálně hybridních zón, nejsou prozatím dostatečné.

Kromě potvrzeného sympatrického výskytu *A. cephalonica* a *A. graeca* v oblasti severního Peloponésu (Grillitsch & Cabela, 1990 (toho času *A. f. peloponnesiacus* a *A. f. fragilis*); Jablonski et al., 2016; Thanou et al., 2014), se areály rozšíření jednotlivých druhů slepýšů příliš nepřekrývají. Kontaktní zóny odpovídají převážně lineárnímu charakteru a i v oblastech severního Balkánu, který se vyznačuje značnou rozmanitostí biotopů, se zdá, že výskyt druhů *A. fragilis*, *A. colchica* a *A. graeca* není mozaikovitý, ale areály zůstávají jasně rozlišené a korespondují s topografickými celky poloostrova (Džukić, 1987; Gvoždík

& Moravec, 2015; Jablonski et al., 2012, 2016)

Mezi stávajícími pěti druhy slepýšů byl předpoklad pěti možných kontaktních zón: *A. fragilis* | *A. colchica*, *A. fragilis* | *A. graeca*, *A. fragilis* | *A. veronensis*, *A. colchica* | *A. graeca*, *A. cephalonica* | *A. graeca* (Gvoždík et al., 2010, 2013). Avšak důkladnější prozkoumání situace na Balkánském poloostrově ukázalo, že populace *A. fragilis* doložené ze severozápadu poloostrova a území kolem Thráckého moře jsou propojeny a široce tak oddělují *A. colchica* od *A. graeca* (Jablonski et al., 2016).

V Maďarsku se problematice věnovali Szabó a Vörös (2014). Na podrobněji zkoumaném území o výměře přibližně 100 x 50 km v oblasti Budínských a Pilišských vrchů severně od Budapešti detekovali několik hybridních jedinců. U 7 z 19 vzorků řadících se fragmentem mitochondriálního genu ND2 k linii *A. fragilis*, obsahoval fragment jaderného genu RAG1 heterozygotní pozice a haplotypově se shodovaly se vzorky *A. colchica* z oblastí od kontaktní zóny vzdálených.

Situací na jihu Balkánského poloostrova, konkrétně oblastem na území Řecka, Peloponésckém poloostrově a přilehlých ostrovech, se zabývali Thanou et al. (2014). Potvrdili genetickou podobnost populací *A. cephalonica* z ostrova Kefalonie s populacemi Peloponésckého poloostrova. *A. graeca* z Balkánského poloostrova, zasahující svým rozšířením i na sever poloostrova Peloponésckého, se v oblasti vyskytuje s *A. cephalonica* sympatricky. I přes pozorování „přechodných“ forem z hlediska morfometrie, jsou po genetické stránce linie naprosto oddělené a nebyli odhaleni žádní potenciálně hybridní jedinci.

Nejdelší kontaktní zónu, táhnoucí se severojižním směrem od Baltského moře až na Balkánský poloostrov, můžeme vysledovat u druhů *A. fragilis* a *A. colchica*. Dřívější autoři, věnující se rozšíření morfotypů „*fragilis*“ a „*colchica*“, ustanovili jejich přibližnou kontaktní zónu od pobaltských republik přes východní Polsko, východní Česko, jihozápadní Slovensko a podél Dunaje přes Maďarsko až po východní Srbsko a západní Bulharsko do oblastí severního Řecka (Cabela & Grillitsch, 1989; Dely, 1972, 1974; Džukić, 1987; Stugren et al., 1962).

Vzhledem k tomu, že naši slepýši byli až donedávna považováni za příslušníky pouze jediného druhu, slepýše křehkého (*A. fragilis*), nebylo území České republiky nikdy podrobena bližšímu zkoumání. Někteří autoři pouze zmiňují pravděpodobné zasahování východního poddruhu slepýše křehkého, běžně se vyskytujícího na Slovensku, na území Moravy a Slezska (Kminiak, 1992; Lác, 1967).

Bližší zhodnocení situace na základě morfometrických dat přináší až Moravec (1997) a Rozínek et al. (2001). Hlavním sledovaným markantem bylo postavení prefrontálních štítků u živých exemplářů. Na základě získaných dat se průběh kontaktní zóny jevil v oblasti Moravy a východní části Čech přibližně na spojnici měst Jičín – Staré Město pod Landštejnem, kde se vyskytují jedinci odpovídající oběma formám.

2.4 Morfologie

Slepýši rodu *Anguis* jsou beznozí ještěři s hadovitým typem těla. S dalšími rody podčeledi Anguinae (*Dopasia*, *Hyalosaurus*, *Ophisaurus* a *Pseudopus*) sdílí několik morfologických podobností, jako párové čelní kosti (*ossa frontalia*), přítomnost pleurodontních zubů na křídlových kostech (*ossa pterygoidea*), oválné překrývající se osteodermu, malé široce oddělené frontoparietální štítky, velký interparietální štítek a silnou redukci končetin u všech zástupců, s rudimenty končetin patrnými pouze na kostře. Slepýši mají dlouhý ocas a v případě napadení predátorem uplatňují jeho autotomii. Oproti ještěrkám čeledi Lacertidae dosahuje následný regenerát pouze krátkých délek. Gvoždík & Moravec (2015) uvádí u exemplářů uložených ve sbírkách Národního muzea maximální naměřenou délku 14 mm. Stejně jako pro zbytek zástupců nadčeledi Anguimorpha je pro ně charakteristický rozeklaný jazyk zatažitelný do elastické pochvy (Moravec & Gvoždík, 2015b; Roček, 2002).

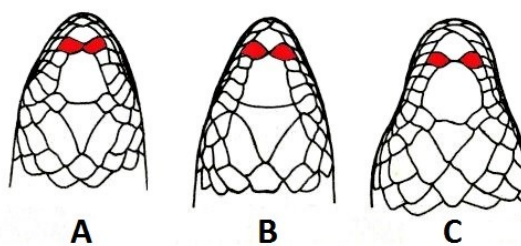
V České republice se dorůstají celkové délky těla kolem 500 mm. Samice zpravidla dosahují větších rozměrů, avšak rekordní délku 575 mm zaznamenal Böhme (2012) u samce slepýše křehkého (*Anguis fragilis* Linnaeus, 1758) nalezeného v Chorvatsku. Tvrdé, hladké a lehce se překrývající šupiny dávají povrchu jejich těla sklovitě lesklý vzhled. V dospělosti dochází ve škáře (dermis) trupu k rozvoji osteodermů, které svým uspořádáním do podélných řad a příčných pruhů kolem těla vytváří pevný ochranný osteodermový kryt a na hlavě srůstají s lebkou (Pančišin et al., 2002; Zylberberg & Castanet, 1985). Ventrální a dorzální štítky od sebe nejsou velikostně odlišeny.

I přes poměrně vysokou variabilitu zbarvení pozorujeme zřetelný sexuální dichromatismus. Juvenilní jedinci jsou výrazní svým kontrastním zbarvením. Čokoládově hnědé až tmavě černohnědé boky a břicho ostře hraničí se světle hnědou až bronzovou barvou hřbetu, uprostřed kterého se táhne úzká tmavá vertebrální linie (někdy se objevují dvě vedle sebe). U samic toto zbarvení přetrvává do dospělosti, zatímco u samců kolem třetího roku života mizí. Kontrastní zbarvení spolu s vertebrální linií u adultních samců

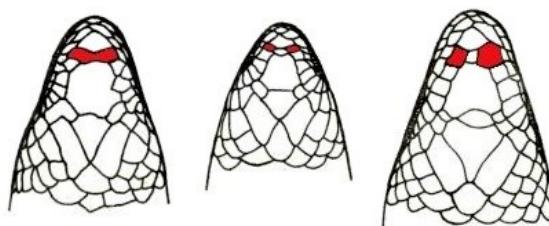
postupně slábnou, až zbarvení po celém těle přejde do světle hnědé až stříbřitě šedé. Tmavá barva se u samců v různé míře objevuje pouze na bílé až žlutobílé břišní straně, kde se v podobě pruhu táhne od hrdla po kloaku (Gvoždík & Moravec, 2015; Moravec & Gvoždík, 2015a).

K odlišení jednotlivých taxonů se u slepýšů tradičně využívala kombinace několika morfologických znaků, založených na charakteristickém ošupení. K nejpoužívanějším patří vzájemná pozice prefrontálních štítků (obrázek 1), viditelnost ušního otvoru ovlivněná mírou překrytí okolními šupinami a počet podélných řad šupin kolem středu těla (Džukić, 1987; Sos, 2010; Wermuth, 1950).

Ján Lác (1967) k odlišení ve smyslu dřívějších poddruhů *Anguis fragilis fragilis* Linnaeus, 1758 a *A. f. colchica* (Nordmann, 1840) popisuje tři typické pozice prefrontálních štítků (obrázek 1). Morfotyp „fragilis“ charakterizuje široký kontakt prefrontálních štítků (typ A), čímž jsou od sebe frontální a internasální štítky vzájemně odděleny. Při vmezeření frontálního štítku dojde k oddělení prefrontálií (typ C), což se objevuje u morfotypu „colchica“. Stav, kdy jsou štítky pouze v bodovém kontaktu (typ B) byl považován za znak přechodný, avšak vzhledem k jeho poměrně častému výskytu napříč celým areálem rozšíření komplexu, na něj tak nahlížet nelze (Gvoždík & Moravec, 2015). V uspořádání štítků pilea se objevují i různé anomálie. Některé z nich jsou znázorněny na obrázku 2.



Obr. 1: Obvyklé uspořádání prefrontálních štítků na hlavě slepýše. A - slepýš křehký (*Anguis fragilis*), B - přechodná forma, C - slepýš východní (*Anguis colchica*) (upraveno, zdroj Dely, 1972).



Obr. 2: Netypické uspořádání prefrontálních štítků na hlavě slepýše (upraveno, zdroj Dely, 1972).

Dalšími odlišnostmi jsou nezřetelnost ušního otvoru, který je u morfotypu „*fragilis*“ zcela překryt okolními šupinami a kolem středu těla napočítáme 24 – 26 šupin. Naopak u morfotypu „*colchica*“ je ušní otvor viditelný zřetelně a počet šupin kolem středu těla je vyšší, v rozmezí 26 – 30 (Sos, 2010; Wermuth, 1950).

Za doplňující determinační znak je považováno světle modré až tyrkysové zbarvení šupin. Lokalizovány jsou převážně na hřbetě až bocích zvířat a shlukují se do nepravidelných modrých skvrn až pruhů. Četnost jedinců s modrými skvrnami nevykazuje závislost na habitatu, zeměpisné šířce nebo nadmořské výšce, ale koreluje se zeměpisnou délkou, kdy se směrem na východ objevuje častěji. Proto bylo modré zbarvení přisuzováno východním populacím dnes řazeným k samostatnému druhu slepýš východní. Jelikož je ale toto zbarvení v malé míře doloženo i u *A. fragilis* (Dely, 1972), nemůže být považováno za výhradní morfologický znak. Výskyt modrých skvrn vykazuje mimo převahy u samců souvislost s velikostí a stářím jedince, kdy s rostoucí velikostí a věkem stoupá (Dely, 1972; Sos, 2010). Intenzita zbarvení modrých skvrn kolísá v závislosti na fyziologickém stavu zvířete a ročním obdobím. Nejjasnější jsou modré skvrny na jaře v době páření (Capula et al., 1997).

Doloženy jsou i různě extrémní barevné aberace. Filípek (2005) při kontrole chráněného území Včelíny v Súčanskej doline (střední část Bílých Karpat) z fotodokumentoval zvíře se souvislým modrým zbarvením hřbetu od záhlaví po konec těla. Jasně modré zbarvení po celé břišní straně těla bylo původně popsáno u slepýše křehkého z Německa jako *A. fragilis* var. *caeruleoventris* Geisenheyner, 1888 (viz Wermuth, 1950), u nás ji zaznamenali Jablonski & Meduna (2010) u dospělého samce z lokality v obci Oldřichovice u Třince (severovýchodní cíp České republiky) a nově je doložena i z Velké Británie (Hails, 2017).

2.4.1 Morfologické rozdíly slepýšů na území ČR

Na základě vyšetření 56 exemplářů uložených ve sbírkách Národního muzea Gvoždík a Moravec (2015) k významným morfologicky determinačním rozdílům dvou druhů slepýšů vyskytujících se na území České republiky u slepýše křehkého (*A. fragilis*) uvádí převahu širokého kontaktu prefrontálních štítků (cca 63 %), méně pak bodový kontakt (cca 27 %) a vzácně štítky oddělené (cca 10 %), na rozdíl od slepýše východního (*A. colchica*), u kterého převažují prefrontální štítky oddělené (cca 62 %).

U slepýše východního (*A. colchica*) nalezneme vyšší počet šupin kolem středu těla

v rozmezí 28 – 30 oproti 24 – 26 u slepýše křehkého (*A. fragilis*).

Míra překrytí ušního otvoru okolními šupinami je vyšší u slepýše křehkého (*A. fragilis*) a zcela nezřetelný jej mělo cca 85 % jedinců. Naopak u slepýše východního (*A. colchica*) převažuje ušní otvor viditelný u cca 79 % samců a cca 67 % samic.

2.5 Volba molekulárních DNA lokusů

Na poli systematické biologie probíhá neustálá debata nad kritérii, která by jednotlivé populace uspokojivě dělila do diskrétních fylogenetických jednotek. Z pohledu ochránářské biologie je pak přesná kategorizace důležitá pro zodpovězení otázek, jakou jednotku, zda a jakým způsobem chránit (Allendorf & Luikart, 2007).

K determinaci obtížně rozlišitelných, alopatrických a kryptických druhů využívají moderní kladistické přístupy řadu molekulárně-genetických metod. Právě na základě jedné z nich, elektroforetické analýzy proteinů (alozymů), vyčlenil Mayer et al. (1991) na samostatnou druhovou úroveň slepýše peloponéského (*Anguis cephallonica*), který byl na základě morfologických znaků prvotně popsán jako poddruh *A. fragilis peloponnesiacus* Štěpánek, 1937.

V posledních dekáдах se na různé systematické úrovni, nejenom u plazů, uplatňují informace získané analýzou sekvencí DNA, které dle svého umístění můžeme dělit na jaderné a mitochondriální (Albert et al., 2009; Haines et al., 2014; Tolley et al., 2013; Wiens et al., 2012). Vlastnosti DNA lokusů se liší v mnoha ohledech. Pro fylogenetickou analýzu je nutné zvolit ty, které budou mít u zkoumané skupiny optimální variabilitu a poskytnou tak adekvátní znaky vhodné pro rekonstrukci fylogeneze (Page & Holmes, 1998; Townsend et al., 2008).

Vzhledem k tomu, že se mitochondriální genom dědí jako celek, nemůžou být jednotlivé geny považovány za vzájemně nezávislé zdroje fylogenetické informace. I s ohledem na introgresi a neúplné třídění linií (incomplete lineage sorting) může být vyhodnocení pouze mitochondriálních dat, obzvláště na nižší taxonomické úrovni, potenciálně problematické a zavádějící. Nicméně i u jaderného genomu je třeba brát zřetel na případné překážky, jakými jsou na příklad výskyt velkého množství intronů a paralogních genů (Funk & Omland, 2003; Monsen & Blouin, 2003; Townsend et al., 2008). Pro komplexnost fylogenetické analýzy je proto vhodné zařadit do studie oba typy DNA lokusů.

K posouzení genetické variability populací slepýšů na území České a Slovenské

republiky byl vybrán jeden mitochondriální gen pro 2. podjednotku NADH dehydrogenázy (ND2) a dva protein kódující jaderné geny, gen pro receptor prolaktinu (PRLR) a rekombinačně-aktivační gen (RAG1).

Gen ND2 spolu s dalšími mitochondriálními geny použil k posouzení širších fylogenetických vztahů v rámci nadčeledi Anguimorpha Macey et al. (1999). Gvoždík et al. (2010, 2013) jako první vypracovali na základě genu ND2 a dalších genů jaderných (C-mos a PRLR) hlubší revizi samotného rodu *Anguis*. Szabó & Vörös (2014) následně publikovali s použitím genu ND2 a RAG1 dílčí studii z území Maďarska a u vzorků z oblasti Peloponésu a Kefalonie analyzovali kompletní gen ND2 spolu s fragmentem PRLR Thanou et al. (2014). Prozatím nejnovějším a zároveň nejrozsáhlejším výzkumem založeným výhradně na tomto mitochondriálním genu je práce Jablonski et al. (2016), která zahrnuje 231 vzorků ze 187 lokalit rozmístěných po celém Balkánském poloostrově. Autoři se mimo zpřesnění poznatků o rozšíření jednotlivých druhů věnují rekonstrukci biogeografické historie balkánských populací v období čtvrtohor a vlivu topografie Balkánského poloostrova na genetickou diverzitu slepýších populací. I u dalších skupin ještěřů odhalila analýza genu ND2 na mitochondriální úrovni významnější genetické rozdíly, jako například u madagaskarských chameleonů skupiny *Calumma nasutum* sl. (Gehring et al., 2012). Naproti tomu u slepýšům příbuzného blavora *Hyalosaurus koellikeri*, endemita severozápadní Afriky, je variabilita tohoto genu příliš nízká (de Pous et al., 2011).

Studie využívající jaderné geny se z počátku omezovaly především na gen pro faktor dozrávání oocytů (C-mos) (Han et al., 2004; Harris, 2003; Harris et al., 2001; Lawson et al., 2005; Slowinski & Lawson, 2002). U šupinatých plazů (Squamata) byla jeho analýza použita jak u ještěřů (Sauria) (Harris et al., 1999, 2001; Saint et al., 1998), tak i u hadů (Serpentes) (Lawson et al., 2005; Slowinski & Lawson, 2002) a dvouplazů (Amphisbaenia) (Kearney & Stuart, 2004; Measey & Tolley, 2013). Osvědčil se i na nižších taxonomických úrovních v rámci čeledí (Donnellan et al., 1999; Pellegrino et al., 2001) i rodů (Brehm et al., 2001; Pellegrino et al., 2011). U slepýšů však tento gen vykazuje velmi nízkou variabilitu, a nedá se proto dobře aplikovat pro fylogeografickou studii (Gvoždík et al., 2010).

Nástup jaderných genů byl z počátku pozvolnější. Vedle genu C-mos byly analýzy rozšířeny o rekombinačně-aktivační gen 1 (RAG1), kdy jej v roce 2004 u plazů jako první osekvenovali Vidal & Hedges. Spolu s genem C-mos se zaměřili na ověření hypotézy

terestrického původu hadů, fylogenetické postavení sedmnácti hadích čeledí a jejich pozici v rámci řádu šupinatých plazů (Squamata). RAG1 se spolu s C-mos a ND2 objevil i v další rozsáhlé fylogenetické studii z téhož roku, ve které je srovnávána pozice všech v té době uznávaných čeledí a většiny podčeledí šupinatých plazů (Townsend et al., 2004). Spolu s dalšími deseti geny se RAG1 a ND2 objevují i v prozatím nejrozsáhlejší studii porovnávající informace získané od 4 161 druhů, reprezentujících všechny současně známé čeledi a podčeledi šupinatých plazů (Pyron et al., 2013).

Škála využití jaderných genů se postupně navyšovala (Greenbaum et al., 2007; Leaché & McGuire, 2006; Vidal et al., 2007; Vidal & Hedges, 2005) a nejpodstatněji k jejímu rozšíření přispěli Townsend et al. v roce 2008, kteří navrhli nové DNA primery pro přibližně 25 jaderných, protein kódujících lokusů (nuclear protein-coding loci – NPCL). Jako jeden z nejvariabilnějších lokusů vyhodnotili gen pro receptor prolaktinu, dále jen PRLR, což vedlo i k jeho následnému prvotnímu využití ve fylogeografické studii v rámci rodu *Anguis* (Gvoždík et al., 2010). Za zmínku stojí, že i přes jeho obecně velmi vysokou variabilitu, nemusí být využitelný plošně u všech blízkých taxonů. Právě u slepýšů příbuzného blavora *H. koellikeri* se u vzorků napříč celým areálem rozšíření ukázala být variabilita tohoto genu nulová (de Pous et al., 2011).

2.5.1 Mitochondriální gen ND2

Mitochondriální DNA (mtDNA) je považována z několika důvodů za ideální model využívaný ke studiu evoluční biologie, fylogeneze a biodiverzity. Mitochondriální genom živočichů je vysoce kompaktní. Na rozdíl od jaderného genomu není zatížen introny nebo dlouhými nekódujícími úseky (Avise, 2009). V buňce se vyskytuje až v tisících kopiích, což napomáhá jeho efektivní izolaci. Je haploidní a vykazuje matroklinní dědičnost (Taanman, 1999). Obsahuje přiměřený počet genů a jejich uspořádání je konzervativní napříč živočišnými druhy (Wolstenholme, 1992). Vzhledem k tomu, že mitochondrie nemají tak dokonalé opravné mechanismy pro chybnou replikaci či poškozenou DNA, je evoluční rychlost v porovnání s jadernými geny 5 – 10 x vyšší (Brown et al., 1979). Při porovnání mezi různými skupinami je například rychlost substituce u hadů a ještěřů vyšší než u želv a ptáků (Eo & DeWoody, 2010). Macey et al. (1999) odhaduje, že mutační rychlost mtDNA u slepýšů by mohla být podobná jako u agam, ropuch a ryb, tedy přibližně 0,65 - 0,69 % změn za milion let. K výhodám se dlouhou dobu řadil i fakt, že u mtDNA nedochází v rámci živočišné říše k rekombinaci. Avšak platnost této charakteristiky je již u několika

živočišných druhů vyvrácena (Rokas et al., 2003; Tsaousis et al., 2005). Zvláště u hybridogenních druhů (např. u žab rodu *Pelophylax* a u ještěrů rodu *Heteronotia*) dochází u hybridních embryí k výskytu heteroplasmie, což poskytuje podmínky pro rekombinaci (Rokas et al., 2003).

U obratlovců se jedná o poměrně malou kruhovitou molekulu čítající průměrně 16 – 18 tisíc párů bází. Mitochondriální genom slepýše křehkého (*Anguis fragilis*) se skládá z 17 479 párů bází (Albert et al., 2009), slepýše východního (*A. colchica*) z 17 097 párů bází (Strzała et al., 2017b), slepýše italského (*A. veronensis*) z 17 322 párů bází (Strzała et al., 2017a) a 17 208 párů bází u slepýše peloponéského (*A. cephalonica*) (Strzała et al., 2016).

Mezidruhové rozdíly v délce mitochondriálního genomu nejčastěji způsobují tandemové repetice v kontrolní oblasti (Albert et al., 2009; Macey et al., 1997). Až na několik málo výjimek se mtDNA skládá z 37 genů: 13 protein kódujících genů, 2 ribosomálních genů (rRNA) a 22 transferových RNA (tRNA) nezbytných pro translaci proteinů, plus nekódující oblast kontrolního regionu D-loop (Boore, 1999). Z 13 protein kódujících úseků je 6 genů pro enzymy nebo komponenty enzymů zapojených do oxidativní fosforylace (Cyt b, COI-III, ATPase 6 a ATPase 8) a zbylých 7 pro podjednotky dýchacího řetězce NADH dehydrogenázy ND1 - 6 a ND4L (Chomyn et al., 1985, 1986).

Pro tuto diplomovou práci byl vybrán úsek genu druhé podjednotky NADH dehydrogenázy (ND2). Jedná se o jednu ze sedmi podjednotek NADH dehydrogenázy, která je součástí největšího enzymatického komplexu (komplex I) dýchacího řetězce, kde dochází k přenosu elektronů a protonů z NADH + H⁺ na koenzym Q (Grigorieff, 1999).

2.5.2 Jaderný gen RAG1

Rekombinačně-aktivační gen 1 a 2 (dále jen RAG1 a RAG2) patří mezi protein kódující geny, které se podílí na tvorbě povrchových imunoreceptorů u B a T-lymfocytů a odvozených imunoglobulinů při procesu zvaném V(D)J rekombinace. Gen RAG1 aktivuje V(D)J rekombinaci samotnou, kóduje jednotlivé komponenty procesu a je zapojený v rozpoznání DNA substrátu. RAG2 ovlivňuje stabilitu vazeb, intenzitu exprese a účastní se posttranskripčních procesů (Schatz et al., 1989). V(D)J rekombinace je mechanismus důležitý pro fungování imunitního systému obratlovců. Defektní gen RAG1 způsobuje poruchy tvorby funkčních receptorů pro antigeny, což je příčinou řady imunodeficientních stavů.

2.5.3 Jaderný gen PRLR

Prostřednictvím receptoru pro prolaktin (dále jen PRLR) účinkuje na organismus luteotropní hormon prolaktin, který ovlivňuje stovky biologických procesů u celé řady živočišných druhů (Schennink et al., 2014). Hormon prolaktin produkuje přední lalok hypofýzy (adenohypofýza), centrální nervový systémem, imunitní systémem, vaječníky, vejcovody a u savců děloha a prsní žláza. Biologické účinky prolaktinu nejsou omezeny pouze na reprodukci, ale hormon ovlivňuje chování jedinců a hraje roli v udržování homeostázy organismu (Freeman et al., 2000).

Receptor prolaktinu je jednoduchý transmembránový glykoprotein, který spadá mezi cytokinové receptory I. třídy (rodina receptorů hematopoetinu) (Koolman & Röhm, 2012). Stejně jako jejich ligandy, má PRLR a další receptory růstových hormonů, několik společných strukturálních a funkčních rysů, navzdory jejich nízké sekvenční homologii (30%). Každý se skládá z extracelulární, transmembránové a intracelulární domény (Freeman et al., 2000). Extracelulární část, rozdělená na dvě domény D1 a D2, vykazuje u těchto receptorů typickou dvojici disulfidových vazeb (mezi Cys-Cys a Cys-Cys) v první doméně a poblíž membrány WSXWS motiv (Trp-Ser-X-Trp-Ser) v druhé doméně, kde X označuje jakýkoli nekonzervativní aminokyselinový zbytek (Walter, 1997). Tento motiv je nezbytný pro složení bílkoviny receptoru do funkční struktury po translaci, pro intracelulární transport a následné navázání receptoru na buněčný povrch. Není však odpovědný za samotné navázání ligandu (Dagil et al., 2012; Freeman et al., 2000).

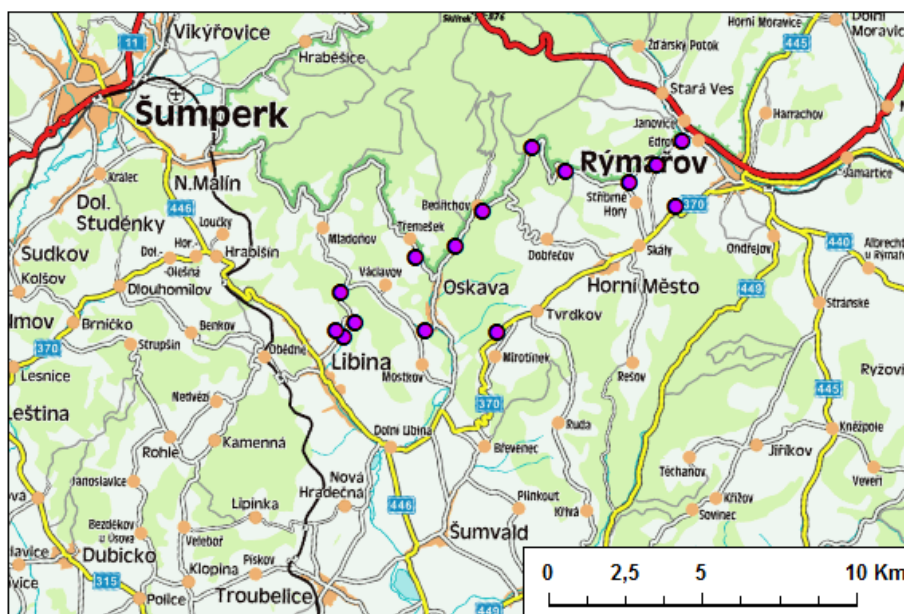
Exprese genu PRLR je tkáňově specifická. Iniciační transkripce probíhá přes tři rozdílné, tkáňově specifické promotory (Hu et al., 1998). Výsledkem alternativní transkripce, inicializované různými promotory a rozdílnou kombinací sestřihu kódujících a nekódujících úseků DNA, jsou sestavovány četné izoformy PRLR. Ačkoli se izoformy liší délkou a složením cytoplasmatické domény, jejich extracelulární domény jsou identické (Bachelot & Binart, 2007). Díky této rozmanitosti má prolaktin celou řadu endokrinních a autokrinních účinků (Ja & Di, 1989; Shao et al., 2008).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Získání vzorků a jejich odběr

V předkládané studii bylo analyzováno celkem 407 tkáňových vzorků z území České a Slovenské republiky. Analyzovaný materiál pochází ze sbírky tkáňových vzorků získaných v letech 2005 - 2010. Část vzorků z let 2005 – 2008 byla využita v práci Gvoždíka et al. (2010). Základ tvořilo 69 vzorků již vyizolované DNA, ze kterých byla amplifikována sekvence mitochondriálního genu pro 2. podjednotku NADH dehydrogenázy (ND2) a v 58 případech již publikována ve zmíněné práci. Na druhý, v tomto případě jaderný gen pro receptor prolaktinu (PRLR), bylo prozatím osekvenováno 7 jedinců a z nich publikováno 6. V celkovém přehledu použitých vzorků (příloha 1) jsou tyto skutečnosti přehledně zaznamenány.

Původní sbírka byla v letech 2008 – 2010 rozšířena o dalších 338 jedinců z území České a Slovenské republiky. V průběhu let bylo vyzkoušeno několik způsobů získávání vzorků. Vzhledem k celoplošnému rozšíření druhu, ale jeho kryptickému výskytu, byl pro začátek zvolen pěší terénní průzkum vhodných lokalit spojený s odkrýváním předmětů potenciálně sloužících jako úkryt slepýšů (padlé a trouchnivějící kmeny stromů, větší kameny či materiál zbylý po lidské činnosti – odhozené desky, plechy, pláty PVC apod.). Předměty, pod kterými se vytváří specifické mikrohabitaty pro celou řadu dalších organismů, byly posléze uvedeny do původní polohy. Pro svou časovou náročnost a nízký počet objevených jedinců se tato metoda příliš neosvědčila. Za další metodu bylo zvoleno nastražení „pastí“ s vytvořením podmínek vhodných pro úkryt slepýšů, na 15 lokalitách v zájmovém území mezi Šumperkem a Rýmařovem (obrázek 3). Jednalo se o tenké plastové desky o ploše v průměru 2 m², které byly pokládány z jara roku 2010 před rozbujením vegetace, a kontrolovány v průběhu jarní a letní sezóny.



● Poloha rozmístěných pastí

Obr. 3: Mapa znázorňující rozmístění nastražených pastí na Šumpersku.

Jako nejúspěšnější se osvědčilo pomalejší projíždění silnic nižší kategorie na kole a hledání kadáverů přejetých zvířat. Nejčastěji byli jedinci nacházeni ve vlhkých biotopech v blízkosti vodních toků a v úsecích cest zastíněných stromy. Na území s převahou velkých zemědělsky obdělávaných ploch, obzvláště v okolí Olomouce, se projevovala funkčnost i poměrně úzkých biokoridorů o šířce kolem 20 m, kde po mnoha kilometrech bez jakýchkoli rozpoznatelných kadáverů byli nalezeni usmrcení jedinci nejenom slepýšů.

V souvislosti s dostavbou dálnice D1 v úseku Lipník nad Bečvou až Ostrava se nám podařilo spolupracovat s firmou NaturaServis, s.r.o., která zajišťovala v okolí stavby instalaci přenosných migračních bariér pro obojživelníky a plazy. V úsecích s odchytnými nádobami byli slepýši na nezbytně nutnou dobu deponováni, aby mohla proběhnout jejich fotodokumentace a odběr tkáňových vzorků pro analýzu DNA.

Část vzorkového materiálu ze Slovenské republiky jsem získala ve spolupráci s Mgr. Davidem Jandžíkem, Ph.D. a Mgr. Norbertem Benkovským z Katedry zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě, kteří se v současnosti věnují morfologickému výzkumu slepýšů a část mitochondriálních sekvencí genu ND2 od Mgr. Daniela Jablonského z téže univerzity, který se věnuje výzkumu obzvláště balkánských populací slepýšů.

V roce 2010 byla prostřednictvím Agentury ochrany přírody a krajiny České republiky (AOPK ČR) rozeslána a na internetových stránkách a v tištěných periodikách

České herpetologické společnosti a Teraristické společnosti Praha uveřejněna výzva určená pro širší odbornou i laickou veřejnost s prosbou o spolupráci při sběru materiálu. Výzva se vztahovala pouze na mrtvé, přejeté jedince ze silnic, jejich torza či mumifikované části. Do spolupráce se také zapojilo několik pracovníků AOPK ČR a správy Chráněných krajinných oblastí České republiky.

Jak již bylo zmíněno, převážná většina tkáňových vzorků byla odebrána z mrtvých jedinců. U živých zvířat byl prováděn odběr nedestruktivní metodou stěrem z orální dutiny. Slepýši nebyli usmrcováni, ani jakkoliv handicapováni. V některých případech se exemplář v době odchyty svlékal a k získání DNA mohla být použita i jeho stará pokožka. U všech jedinců a nalezených kadáverů byla pořízena podrobná fotodokumentace hlavních morfologických znaků, místa nálezu a zaznamenány přírodní charakteristiky lokality. Živí jedinci byli bezprostředně po úkonech vypuštěni na místě nálezu. Tkáňové vzorky i zachovalejší kadávery byly následně fixovány v 96 % etanolu a uloženy ve sbírkách Národního muzea v Praze (NMP).

Vlastní odchyt a manipulace se silně ohroženým druhem živočicha probíhaly v souladu s patřičnými výjimkami AOPK ČR č. 0555/PO/2009/AOPK a Ministerstva životního prostředí Slovenskej republiky č. 1323/527/05-5.1. Při výzkumu nedocházelo k usmrcování jedinců. Vzorky tkání byly zpracovány v molekulárně-fylogenetické laboratoři zoologického oddělení Národního muzea, Praha 9 - Horní Počernice.

3.2 Laboratorní analýzy

Získaný materiál byl zpracován za využití následujících molekulárně-biologických metod:

- Izolace DNA
- Polymerázová řetězová reakce (= PCR)
- Elektroforéza na agarózovém gelu
- Purifikace PCR produktů
- Sekvenační reakce a metoda přímého sekvenování (formou servisu firmou Macrogen Inc., Soul, Korea; www.macrogen.com)

3.2.1 Izolace DNA

V ideálním případě byla DNA extrahována z kousku svaloviny nebo jater (z přejetých exemplářů) o velikosti přibližně 2 x 2 mm a zbaveného zbytků etanolu vysušením, který by inhiboval funkčnost proteinázy v průběhu izolace DNA. Poměrně dobrá výtěžnost DNA byla i při použití většího kousku mumifikovaného torza slepýše (kůže, uschlá svalovina), avšak kvalita DNA ze tkání, které podlely pokročilejším hnilobným procesům, byla natolik nízká, že už nebyla pro následující molekulární analýzy použitelná.

Genomická DNA byla izolována podle standardních protokolů komerčně dodávaných sad pro izolaci DNA – Qiagen (Venlo, Netherlands) a Geneaid (New Taipei City, Taiwan) a posléze uchovávána zamražená při teplotě – 20 °C.

3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z anglického Polymerase Chain Reaction) je jednoduchou metodou umožňující rychlé a účinné klonování konkrétního úseku DNA (Alberts et al., 2002).

K analýze variability byl použit fragment mitochondriálního genu 2. podjednotky NADH dehydrogenázy (ND2) o délce fragmentu 731 bp a dvou jaderných protein kódujících genů. Gen pro receptor prolaktinu (PRLR) o délce fragmentu 485 bp a rekombinačně-aktivační gen (RAG1) o délce 606 bp. Primery použité k amplifikaci jsou uvedeny v tabulce 1.

Gen	Název primeru	Sekvence primeru (5'→3')	Citace
PRLR	PRLR_f1	5'-GACARYGARGACCAGCAACTRATGCC-3'	Townsend et al. (2008)
PRLR	PRLR_r3	5'-GACYTTGTGRACCTCYACRTAATCCAT-3'	Townsend et al. (2008)
RAG1	R13	5'-TCTGAATGGAAATTCAGCTGTT-3'	Groth & Barrowclough (1999)
RAG1	R18	5'-GATGCTGCCTCGGTCGGCCACCTTT-3'	Groth & Barrowclough (1999)
RAG1	RAG1 F700	5'-GGAGACATGGACACAATCCATCCTAC-3'	Bauer et al. (2007)
RAG1	RAG1 R700	5'-TTTGTACTGAGATGGATCTTTTGCA-3'	Bauer et al. (2007)
ND2	H5934	5'-AGRGTGCCAATGTCTTTGTGRTT-3'	Macey et al. (1997)
ND2	L4437n	5'-AAGCTATTGGGCCCA TACC-3'	Gvoždík et al. (2010)
ND2	AND2inR2	5'-ATGAAGCCGATAGAGG-3'	Gvoždík et al. (2010)

Tab. 1: Seznam použitých primerů s uvedením jejich sekvencí.

Poměr jednotlivých složek reakční směsi pro jeden vzorek je uveden v tabulce 2. Při vyšetřování vzorků byla využita komerčně vyráběná směs PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o.,

Praha). Složení 2x koncentrovaného přípravku je 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq Purple DNA polymerázy, stabilizátory umožňující krátkodobé skladování při teplotě 4 °C a aditiva pro přímou elektroforézu amplifikovaného produktu bez nutnosti přidání vkladacího pufu. Směs obsahuje barviva, která usnadňují manipulaci a vizuální kontrolu.

Činidlo	Objem
PPP Master Mix	12,5 μl
PCR H ₂ O	8,5 μl
5' primer	1 μl
3' primer	1 μl
Templátová DNA	2 μl
Celkový objem	25 μl

Tab. 2: Objemy jednotlivých složek PCR reakce vztažené pro jeden vzorek

U problémových vzorků s příliš nízkou výslednou koncentrací PCR produktu se zvyšoval objem přidávané DNA ze standardních 2 μl až na 10 μl na úkor PCR H₂O (dvojitě destilovaná voda). Celkový objem PCR reakční směsi byl vždy 25 μl.

Vlastní PCR reakce probíhala v termocyklerech Mastercycler gradient (Eppendorf) a XP Cycler (Bioer Technology). První z nich byl vhodnější pro optimalizaci parametrů PCR reakce díky možnosti naprogramovat teplotní gradient v rozmezí až 20 °C napříč vyhřívaným blokem. Oba typy cyklerů byly vybaveny vyhřívaným víkem amplifikačních komor, při jehož použití nedochází ke kondenzaci reakční směsi na vnitřní stěně víčka zkumavky. Při jejich otvírání se tak snižuje riziko rozstříknutí aerosolu směsi a následně i kontaminace vybavení laboratoře a vzorků navzájem. Reakční směs v tomto případě nemusí být převrstvena minerálním olejem, který by zabraňoval jejímu vypařování.

Součástí každé PCR reakce byla negativní kontrola se vzorkem bez DNA pro ověření možné kontaminace vstupních činidel.

Amplifikace genů ND2 a PRLR probíhala za nastavení parametrů PCR reakce podle studie Gvoždík et al. (2010). Reakční hodnoty pro gen RAG1 byly převzaty z práce Groth & Barrowclough (1999) a optimální teplota zchlazení a nasedání primerů („annealing“) byla zjištěna pomocí teplotního gradientu a stanovena na 63 °C (tabulka 3)

Gen	Počáteční denaturace		Cyklus						Počet cyklů	Konečné prodlužování		Chlazení	
			Denaturace		Nasedání		Prodlužování						
	Teplota (°C)	Čas (s)	Teplota (°C)	Čas (s)	Teplota (°C)	Čas (s)	Teplota (°C)	Čas (s)		Teplota (°C)	Čas (s)	Teplota (°C)	Čas (s)
ND2	94	120	94	35	50	35	72	60	35	72	600	4	∞
PRLR	94	420	94	40	48	30	72	60	40	72	420	4	∞
RAG1	94	420	94	40	63	30	72	60	40	72	420	4	∞

Tab. 3: Nastavení programů PCR reakcí pro jednotlivé geny.

3.2.3 Elektroforéza

Úspěšnost izolace DNA a výsledná koncentrace PCR produktu byly ověřovány horizontální gelovou elektroforézou na 0,8% agarózovém gelu. Jako fluorescenční sonda pro nukleové kyseliny byla použita interkalační sloučenina ethidium bromid (EtBr). Pro detekci DNA bylo do agarózového gelu o objemu 90 ml přidáno 3,5 µl EtBr. Separací proces probíhal ve stejnosměrném elektrickém poli o napětí 100 V po dobu 35 minut. Vodicím médiem byl 1x koncentrovaný TAE pufr. Ke 2 µl izolátu DNA bylo před nanesením na gel přidáno 2 µl barvicího pufru. Stejně bylo postupováno při kontrole koncentrace purifikovaných PCR produktů. PCR produkt samotný už obsahoval díky PPP mixu potřebná aditiva pro přímou elektroforézu vzorku, proto stačilo na gel nanést pouze 2 µl směsi. Vzorky na gelu byly detekovány UV světlem pomocí UV-transiluminátoru a koncentrace amplifikovaného úseku se odečítala podle použitého DNA standardu (DNA ladder, tzv. „žebříček“).

3.2.4 Přečištění (purifikace) PCR produktů

Před vlastním sekvenováním amplifikovaného úseku je potřeba odstranit z produktu PCR reakce oba primery a neinkorporované nukleotidy (dNTP). Výsledek purifikace byl elektroforeticky ověřen a vzorky s koncentrací nad 20 ng/µl zaslány s příslušnými primery na sekvenování firmou Macrogen (Jižní Korea).

3.3 Zpracování dat

3.3.1 Datasetsy

Pro fylogenetické analýzy byl pro každý gen vytvořen dataset nukleotidových sekvencí dostatečné kvality a délky. Sekvence protein kódujících genů byly nejprve v programu přeloženy do sekvence aminokyselin a poté seřazeny. Vlastní zarovnání a kontrola sekvencí, stejně tak i jejich editace a analýza chromatogramů, probíhala v programu BioEdit v. 7.1.3.0 (Hall, 1999) pomocí algoritmu ClustalW (Thompson et al., 1994). Použité DNA lokusy byly sekvenovány vždy z obou konců. Kontrola jednotlivých SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) – substituce, delece, inserce – tak mohla probíhat dvojitě. Jednotlivé sekvence všech osekvenovaných jedinců byly ořezány dle kvality a nekvalitní sekvence byly z datasetů vyřazeny. Zbylé sekvence byly porovnány a rozřazeny podle již zveřejněných haplotypů dostupných v databázi GenBank. U jaderných genů byla přítomnost dvojitých vrcholů v chromatogramech identifikována jako heterozygotní pozice a tyto báze byly manuálně přepsány dle mezinárodního kódování nukleotidů a aminokyselin IUPAC. Následná haplotypová analýza sekvencí jaderných genů PRLR a RAG1 byla provedena v programu Phase v 2.1.1 (Stephens et al., 2001; Stephens & Scheet, 2005), kde byly sekvence rozřazovány do gametických haplotypů.

3.3.2 Populační charakteristiky a demografické analýzy

Každá populace prochází v průběhu času specifickými demografickými procesy. K jejich rekonstrukci ve zkoumané populaci slouží několik různých přístupů, které nám je pomáhají odhadnout. Následující charakteristiky sumární statistiky, testy neutrality a parametry analýzy *mismatch distribution* byly vypočteny v programu DnaSp v 5.10.01 (Rozas et al., 2005). Demografické analýzy byly zkušebně provedeny jak na datasetu zahrnujícím sekvence všech jedinců, tak na čistě haplotypovém datasetu. Vzhledem ke konzistentnějším výsledkům druhého přístupu jsou v této diplomové práci uvedeny tyto hodnoty.

3.3.2.1 Sumární statistika

Základní představu o genetické variabilitě sekvenčních dat získáme pomocí elementární sumární statistiky. Nejjednodušším odhadem genetické proměnlivosti sekvencí získaných ze zkoumaných populací je počet segregujících (polymorfních) míst (S), kterým vyjádříme počet míst s odlišnými sekvencemi nukleotidů. Dalším odhadem polymorfismu

DNA je průměrný počet rozdílných nukleotidů mezi dvěma sekvencemi neboli nukleotidová diverzita (π) a haplotypová diverzita (h), vyjadřující míru výskytu určitého haplotypu v dané populaci. Poměry mezi hodnotami haplotypové (h) a nukleotidové (π) diverzity nám mohou nastínit ledasco z demografických procesů, které v minulosti ve zkoumané populaci proběhly a zda tedy zkoumáme dlouhodobě velkou a stabilní nebo recentně expandující populaci.

3.3.2.2 Mismatch distribution (MD)

Touto metodou můžeme odhadnout změny populační velikosti v průběhu času (Schneider & Excoffier, 1999). Dochází při ní k porovnávání pozorované frekvence párových distancí s frekvencemi očekávanými podle demografického modelu. Model exponenciálního populačního růstu očekává křivku unimodálního (jednovrcholového) charakteru. Naopak u populace, která se blíží k rovnováze mezi driftem a mutacemi, se očekává křivka multimodální (vícevrcholová).

Model pracuje se třemi parametry. Prvním z nich je parametr tau (τ), který slouží k určení času expanze a je měřen v mutačních jednotkách. Je vyjádřený jako $\tau = 2ut$, kde t je čas v generacích a $u = \mu k$, kde μ je mutační rychlost a k je délka sekvence (Rogers & Harpending, 1992). Čím vyšší je hodnota τ , tím delší časový úsek uplynul od expanze populace. Dalšími dvěma parametry jsou výchozí (θ_0 – před populačním růstem či poklesem) a konečná (θ_1 – po populačním růstu či poklesu) *théta*. Zda populace prošla recentní expanzí pak můžeme odhadnout právě z rozdílů mezi θ_1 a θ_0 .

Analýza byla provedena na základě rapidně expanzního modelu vytvořeného v programu DnaSp v 5.10.01 (Rozas et al., 2005).

3.3.2.3 Testy neutrality

Oproti sumárním statistikám využívají testy neutrality rozsáhlejší spektrum informací o demografické minulosti dat a nejsou závislé na párovém srovnání. Jsou vhodné pro početnější datasety a testují shodu získaných dat s očekávanými hodnotami u dat neutrálních, které se vyvíjejí vlivem neutrálních evolučních procesů, tj. bez působení selekce, driftu, genetického hitchhikingu nebo následkem demografické expanze.

K testování, zda na některý ze studovaných lokusů působí selekce byly použity Tajima's D test a Fu's F_S statistika. Distribuce frekvencí alel je podrobena analýze na základě porovnání hodnot dvou empirických odhadů genetického polymorfismu, nukleotidové diverzity (π) a proporce polymorfních míst (θ). Výsledné hodnoty testů

blížící se nule u populace o konstantní velikosti naznačují absenci selekčních tlaků. Převaha segregujících míst v alelách s nízkou frekvencí vede k výsledným signifikantně záporným hodnotám a naznačuje vliv negativní selekce nebo populační expanze v minulosti. Naopak signifikantně kladné hodnoty vycházejí při nízké hladině polymorfismu, který může být následkem poklesu populační velikosti nebo pozitivní selekce (např. v populacích po bottlenecku) (Fu, 1997; Tajima, 1989). Zejména pak pro menší datasety přináší lepší výsledky v detekci populační expanze oproti ostatním testům neutrality Ramos-Onsins & Rozas (2002) R_2 statistika.

3.3.2.4 Bayesian skyline plot (BSP)

Mezi sofistikovanější přístupy hodnotící pravděpodobný průběh populační dynamiky v minulosti patří metoda Bayesianých skyline plotů. Výhodou je jejich vyšší citlivost k odhadům demografických trendů než u jednoduchých parametrických modelů. Na rozdíl od starších koalescenčních přístupů není závislá na předem definovaném „demografickém modelu“ a odhaduje dřívější populační dynamiku až na základě odhadu genealogické struktury. Je tak ideální metodou pro výpočet změn populační velikosti i u taxonů s komplikovanější populační historií a mělkou fylogenetickou strukturou (Drummond et al., 2005).

K odhadu posteriorní distribuce efektivní velikosti populace za použití daného substitučního modelu přímo ze sekvenčních dat je zde používána procedura Markov chain Monte Carlo (MCMC). Dochází tak k eliminaci závislosti na fylogenetické rekonstrukci, potažmo na případné chybě s ní spojené, ke které může docházet u méně variabilních datasetů. V každém bodě je stanoven konfidenční interval pro odhad efektivní velikosti populace a díky MCMC algoritmu je poskytnut hladší průběh než u klasických skyline plotů. Oproti nim také tato metoda Bayesianých skyline plotů umožňuje, díky své vyšší senzitivitě, detailněji odhalit probíhající demografické trendy v průběhu evoluce taxonu.

Finální analýza byla provedena v programu BEAST 2.1 (Bouckaert et al., 2004) s použitím HKY substitučního modelu a konceptu molekulárních hodin. MCMC simulace proběhly dvakrát pro každou linii s 100 000 000 generací (tak, aby bylo dosaženo efektivní velikosti populace [ESS] > 200). Parametry modelu a genealogie byly vzorkovány každých 10 000 generací. Konvergenční analýza, ESS a počet generací k vyřazení jakožto burn-in byly stanoveny programem TRACER 1.6 (Drummond & Rambaut, 2007), stejně jako výsledné BSP grafy, které jsou zobrazeny na obrázku 8 a 9.

3.3.2.5 Haplotypové sítě

Pro znázornění genetické struktury zkoumaných populací byly sestrojeny haplotypové sítě použitím algoritmu statistické parsimonie implementované v programu TCS 1.21 (Clement et al., 2000) s nastavením limitu parsimonie na 95 %. Jednotlivé substituce jsou v těchto retikulizujících sítích zobrazeny jako samostatné kroky a velikost kruhů odráží četnost shodných haplotypů. Oproti fylogenetickým stromům, které jsou konstruovány na základě pravděpodobnosti, jsou k sobě touto metodou haplotypy přiřazovány tak, aby byl minimalizován potřebný počet kroků (mutací) k jejich propojení. Výsledná haplotypová síť umožňuje identifikovat ancestrální a odvozené haplotypy. Nově identifikované haplotypy byly porovnány se všemi již publikovanými haplotypy dohledatelnými v databázi GenBank.

4 VÝSLEDKY

V rámci této diplomové práce byly analyzovány tkáňové vzorky od celkem 407 jedinců. K fylogenetickým analýzám se podařilo získat celkem 1 059 sekvencí. Z toho 407 sekvencí fragmentu mitochondriálního genu ND2, 340 sekvencí jaderného genu PRLR a 312 sekvencí jaderného genu RAG1. Přehled analyzovaných vzorků, lokalit jejich nálezu a genotypového zařazení jedinců *Anguis* spp. na základě fylogenetických analýz je uveden v příloze 1.

4.1 Analýzy mitochondriálního genu ND2

4.1.1 Molekulární analýzy a genetická variabilita genu ND2

Doposud nejrozsáhlejší soubor osekvenovaných jedinců rodu *Anguis* spp. o délce 731 bp obsahuje sekvence od 407 jedinců z 281 lokalit včetně 11 již publikovaných vzorků (Gvoždík et al., 2010, 2013) (viz příloha 1). Z výsledného souboru se 288 sekvencí řadí k druhu *A. fragilis* a 119 k *A. colchica*. Z celkového počtu 82 variabilních pozic bylo 59 parsimonně informativních a celkově bylo identifikováno 41 haplotypů. Stop kodony nebyly detekovány a v linii korespondující s *A. fragilis* byla zjištěna delece jednoho kodonu. U *A. fragilis* byl oproti *A. colchica* zjištěn vyšší počet segregujících míst (S ; 26 oproti 17) a haplotypů (h ; 25 oproti 16), avšak nižší nukleotidová (π ; 0,03 % oproti 0,092 %) a haplotypová (H_d ; 0,185 oproti 0,521) diverzita.

Detailní přehled hodnot mtDNA variability je uveden v tabulce 4.

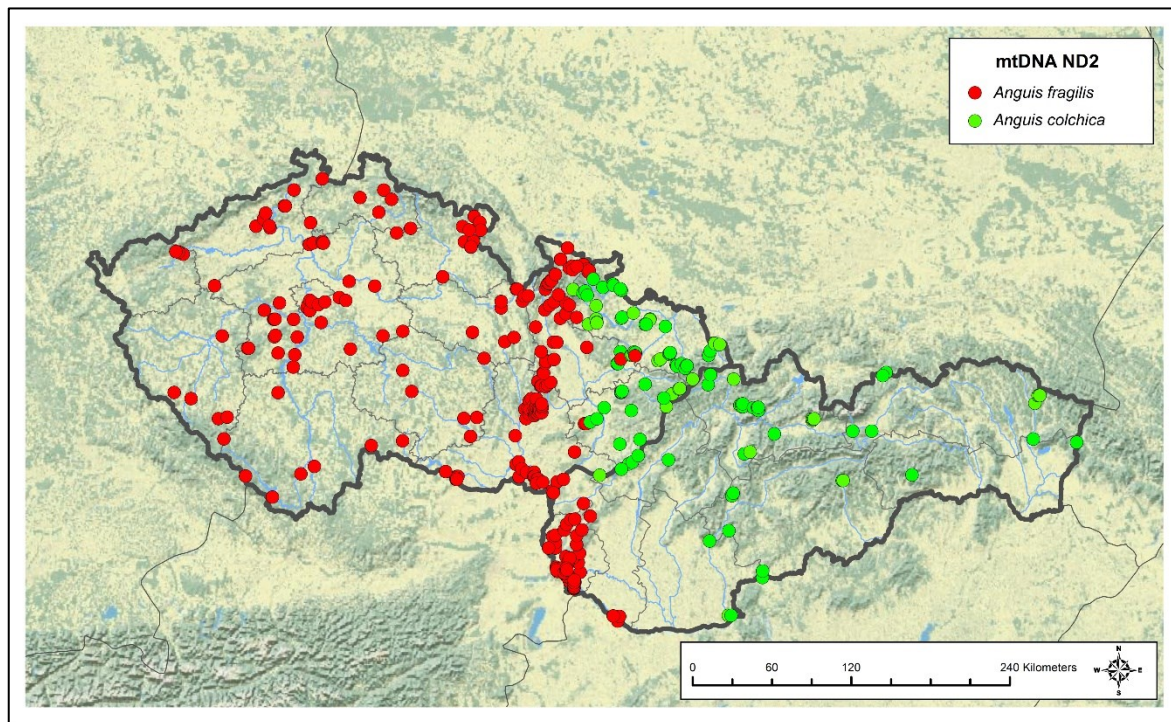
Lokus	L^1	Druh ²	n^3	S^4	η^5	$\% \pi^6 \pm \% SD^{11}$	θ_w^7	h^8	$H_d^9 \pm SD^{11}$	PI^{10}
ND2	731	AF	288	26	26	0,03±0,006	0,00572	25	0,185±0,031	4
ND2	731	AC	119	17	17	0,092±0,013	0,00435	16	0,521±0,056	10
ND2	731	AF+AC	407	81	82	2,888±0,130	0,0169	41	0,552±0,026	59

Tab. 4: Základní populačně genetická statistika pro fragment mitochondriálního genu ND2.

¹Délka sekvence v bp (L); ²*A. fragilis* (AF), *A. colchica* (AC); ³Počet sekvencí (n); ⁴Počet segregujících míst (S); ⁵Počet mutací (η); ⁶Nukleotidová diverzita (π); ⁷Proporce polymorfních míst (θ_w); ⁸Počet haplotypů (h); ⁹Haplotypová diverzita (H_d); ¹⁰Parsimonně informativní pozice (PI); ¹¹Směrodatná odchylka (SD).

4.1.2 Fylogeografická distribuce genu ND2

Z celkového počtu 407 osekvenovaných vzorků z území České a Slovenské republiky byl druh *A. fragilis* zastoupen 288 a druh *A. colchica* 119 jedinci. Lokalizace jednotlivých vzorků na mapě je znázorněna na obrázku 4.



Obr. 4: Mapa distribuce genotypů slepýšů dle mitochondriální DNA na území České a Slovenské republiky.

Dominantním druhem České republiky je *A. fragilis*, jehož populace byly nalezeny na celém území Čech, směrem na východ zasahují na území Moravy a ve Slezsku byly populace nalezeny pouze v severozápadním výběžku a ve střední části Slezska u obce Mankovice. *Anguis colchica* svým výskytem převažuje ve Slezsku a na Moravu zasahuje do oblastí Nízkého Jeseníku, prostupuje Moravskou bránou a na území Moravskoslezských Beskyd a pohoří Bílých Karpat. Slovenské republice naopak dominuje *A. colchica* a populace *A. fragilis* jsou omezeny pouze na nejzápadnější oblasti země. Na základě genetické analýzy sekvencí mitochondriální DNA byl sympatrický výskyt pozorován pouze na lokalitách na území Moravské brány a ve zbytku studovaného regionu se druhy vyskytují alopaticky. Kontaktní zóna obou druhů se táhne severojižním směrem přibližně přes Hrubý a Nízký Jeseník, Horno- a Dolnomoravský úval na Slovensko k Malým Karpatům a přechází dál na území Podunajské roviny.

Analýza sekvencí fragmentu mitochondriálního genu ND2 odhalila na zkoumaném území celkem 41 haplotypů. *A. fragilis* byl reprezentován 25 haplotypy (f1, Aba12, 3661, 3709, A015N, A071N, A101N, A152N, A157N, A166N, A174N, A182N, A191N, A201N, A202N, A217N, A271N, A306N, A327N, A329N, A336N, A337N, A416N, A457N, A464N) a *A. colchica* 16 haplotypy (c1, c3, c4, A002N, A037N, A130N, A131N, A133N, A136N, A142N, A204N, A208N, A234N, A255N, A360N, A376N). Nejpočetněji byly zastoupeny sekvence, které byly shodné s již dříve publikovaným haplotypem f1 pro *A. fragilis* a haplotypem c1 pro *A. colchica* (Gvoždík et al., 2010). Distribuce vzácných haplotypů oproti nejpočetnějším nevykazovala žádný specifický vzor a promísení haplotypů se zdá mozaikovitě rovnoměrné. Vzhledem k tomu, že byl amplifikován pouze fragment genu ND2, shodovaly se sekvence v tomto úseku s větším počtem již publikovaných haplotypů, ale pro větší přehlednost jsou v textu zastupovány právě prvně publikovanými haplotypy f1 a c1. Přehled absolutní a relativní četnosti a všech shodných haplotypů je uveden v tabulce 5.

<i>Anguis fragilis</i>								
Haplotyp				Absolutní četnost	Relativní četnost	Shodné haplotypy v délce 731 bp		
f1*				260	90,3	f2*	f3*	f12*
						f13*	AF01***	
A182N				3	1,0			
Aba12**	A157N			2	0,7			
3709****				1	0,3			
3661	A015N	A101N	A201N	1	0,3			
A202N	A071N	A152N	A174N					
A191N	A329N	A336N	A337N					
A457N	A217N	A306N	A327N					
A416N	A464N	A166N	A271N					

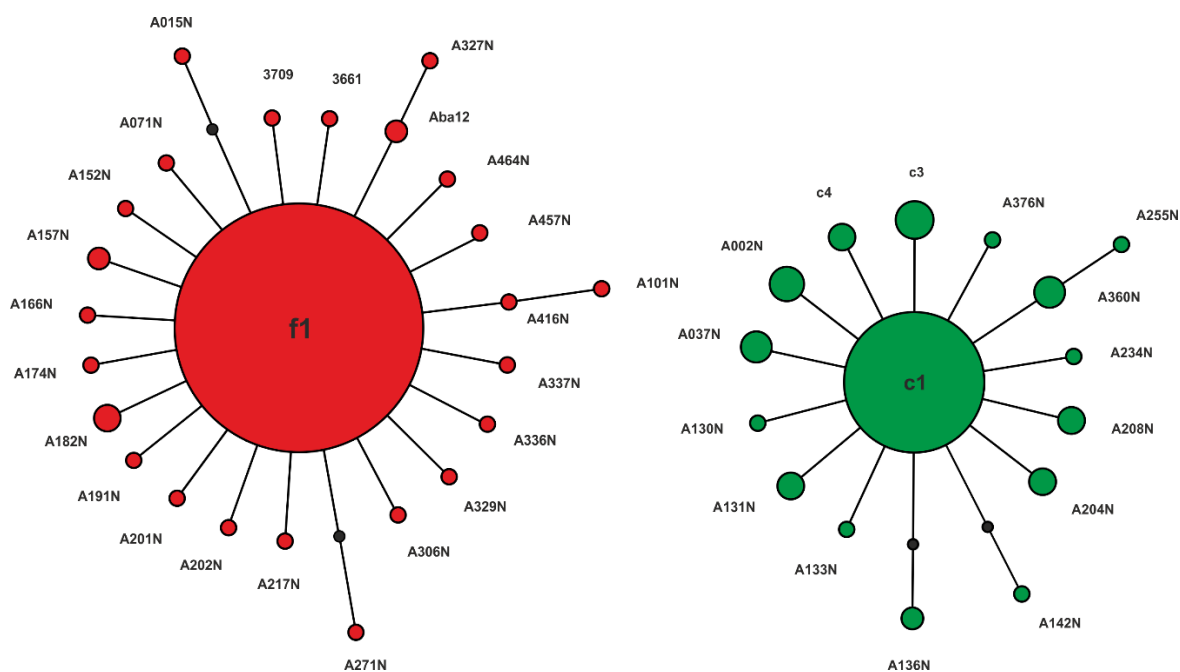
<i>Anguis colchica</i>								
Haplotyp				Absolutní četnost	Relativní četnost	Shodné haplotypy v délce 731 bp		
c1*				82	68,91	c2*	c5*	AC01****
c3*	A002N			5	4,20			
A037N	A360N			4	3,36			
A131N	A204N	A208N		3	2,52			
c4*	A136N			2	1,68			
A142N	A133N	A130N	A376N	1	0,80			
A234N	A255N							

Tab. 5: Tabulka absolutní a relativní četnosti haplotypů fragmentu mitochondriálního genu ND2 a přehled shodných, dříve publikovaných, haplotypů v délce 731 bp. * (Gvoždík et al., 2010); ** (Jablonski et al., 2016); *** (Szabó & Vörös, 2014); **** (Jablonski et al., v revizi).

Z celkového počtu 25 haplotypů *A. fragilis* byly tři haplotypy již publikovány (f1; Gvoždík et al., 2010; Aba12; Jablonski et al., 2016; 3709; Jablonski et al., v revizi). Zbylých 22 haplotypů bylo identifikováno nově. Ve 20 případech byl nově identifikovaný haplotyp zastoupen vždy pouze jedním vzorkem, v jednom případě vzorky dvěma (haplotyp A157N, vzorky 3338 a A157) a v jednom případě třemi vzorky (haplotyp A182N, vzorky A182, A183 a A320).

U *Anguis colchica* se mezi 16 zjištěnými opět potvrdil jeden dominantní haplotyp c1. Dva další haplotypy, c3 a c4, byly již dříve publikovány (Gvoždík et al., 2010) a zbylých 13 bylo sekvenováno prvně. Četnosti haplotypů byly oproti *A. fragilis* vyšší (viz tabulka 5).

Prezentovaná haplotypová síť (obrázek 5) je charakteristická tzv. star-like vzorem a v obou případech ukazuje, že méně četné haplotypy se od dominantních liší pouze minimálním počtem mutačních kroků.



Obr. 5: Haplotypová síť vytvořená na základě analýzy fragmentu mitochondriálního genu ND2 pro *A. fragilis* (červeně) a *A. colchica* (zeleně) na území České a Slovenské Republiky. Jednotlivé mutační kroky jsou znázorněny čárkou a chybějící haplotyp černou tečkou. Barevné kruhy reprezentují jednotlivé haplotypy a jejich velikost koresponduje s počtem jedinců s daným haplotypem.

4.1.3 Demografické analýzy

4.1.3.1 Testy neutrality

Výskyt historických populačních změn byl vyhodnocen pomocí testů neutrality. V rámci obou druhů, *A. fragilis* i *A. colchica*, vyšly u všech testů pozorované hodnoty v signifikantní shodě s očekávanými, dle statistického modelu. Výsledky nasvědčují o kompaktnosti zkoumaných populací a jejich poměrně nedávné demografické expanzi. Konkrétní hodnoty testů neutrality jsou uvedeny v následující tabulce 6.

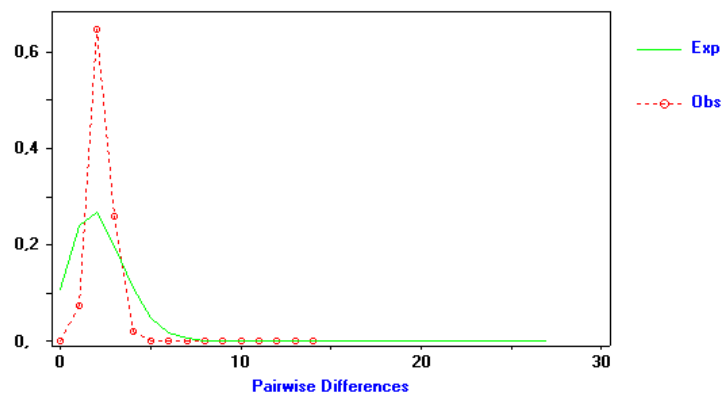
Lokus	L^1	Druh ²	h^3	F_S^4	D^5	R_2^6
ND2	731	AF	25	-41,881 ***	-2,50347 ***	0,0181 ***
ND2	731	AC	16	-21,203 ***	-2,23702 **	0,0302 ***

Tab. 6: Výsledky testů neutrality. ¹Délka sekvence v bp (L); ²*A. fragilis* (AF), *A. colchica* (AC); ³Počet haplotypů (h); ⁴Fu's F_S statistics (F_S); ⁵Tajima's D statistics (D); ⁶Ramos-Onsins and Rozas's (R_2); Statistická signifikance – * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns = nesignifikantní hodnota $p > 0,05$.

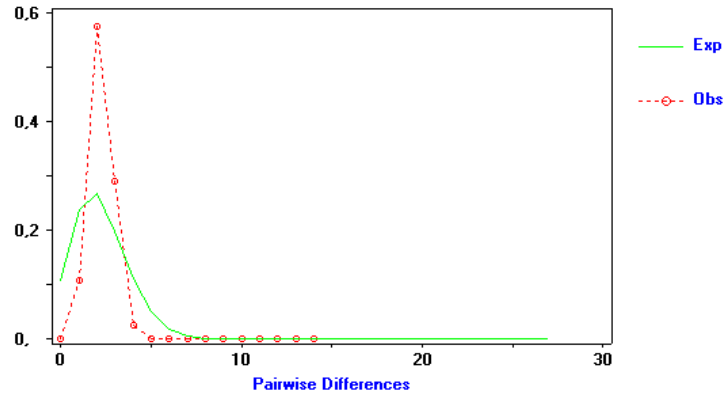
4.1.3.2 Mismatch distribution (MD)

Následující výstupy (obrázek 6 a 7) zobrazují rozdělení párových neshod metodou mismatch distribution pro populace *A. fragilis* a *A. colchica* na území České a Slovenské republiky. Grafy znázorňují distribuci pozorovaného (observed – tečkovaná linie) a očekávaného (expected – plná linie) rozdělení četností.

U obou druhů ukázala MD analýza korespondující křivky pozorovaného a předpokládaného růstu či naopak poklesu populací během jejich historie. Výsledné hodnoty odrážejí vzor pozorovaný na struktuře haplotypů v prezentovaných haplotypových sítích.



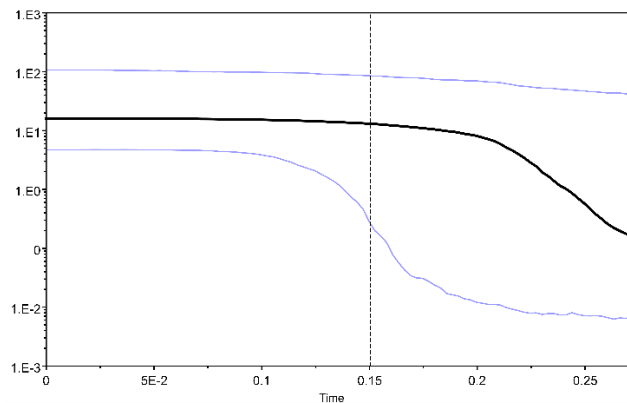
Obr. 6: Mismatch distribution pro *Anguis fragilis* na území České a Slovenské republiky.



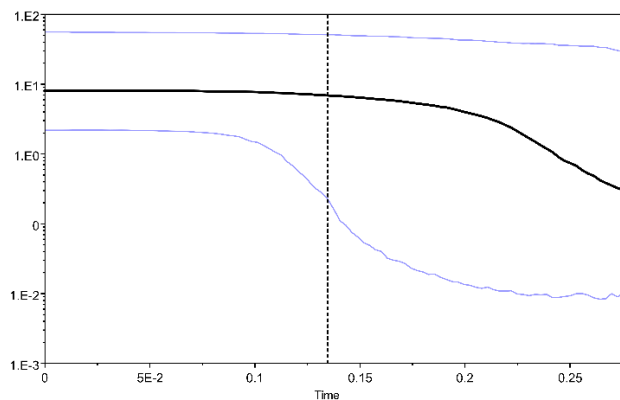
Obr. 7: Mismatch distribution pro *Anguis colchica* na území České a Slovenské republiky.

4.1.3.3 Bayesian skyline plots (BSPs)

Bayesiánské skyline ploty (obrázek 8 a 9) naznačují u obou druhů velmi podobný demografický vývoj velikosti populací. Po relativně rychlé expanzi, která proběhla přibližně před 250 tisíci lety, došlo asi před 150 tisíci lety ke stabilizaci populační velikosti, která se udržuje dodnes. Čas k nejbližšímu společnému předkovi (TMRCA) se v obou případech datuje do období přibližně před 300 tisíci lety.



Obr. 8: Bayesiánský skyline plot založený na haplotypovém datasetu ($n = 25$) vycházejícím z 288 osekvenovaných jedinců. Na ose x je čas měřený v jednotkách mutace na nukleotidovou pozici, na ose y korelát populační velikosti $N_e\mu$. Černá linie znázorňuje medián odhadu, hranice modré linie označuje 95% konfidenční interval.



Obr. 9: Bayesiánský skyline plot založený na haplotypovém datasetu ($n = 16$) vycházejícím ze 119 osekvenovaných jedinců. Na ose x je čas měřený v jednotkách mutace na nukleotidovou pozici, na ose y korelát populační velikosti $Ne\mu$. Černá linie znázorňuje medián odhadu, hranice modré linie označuje 95% konfidenční interval.

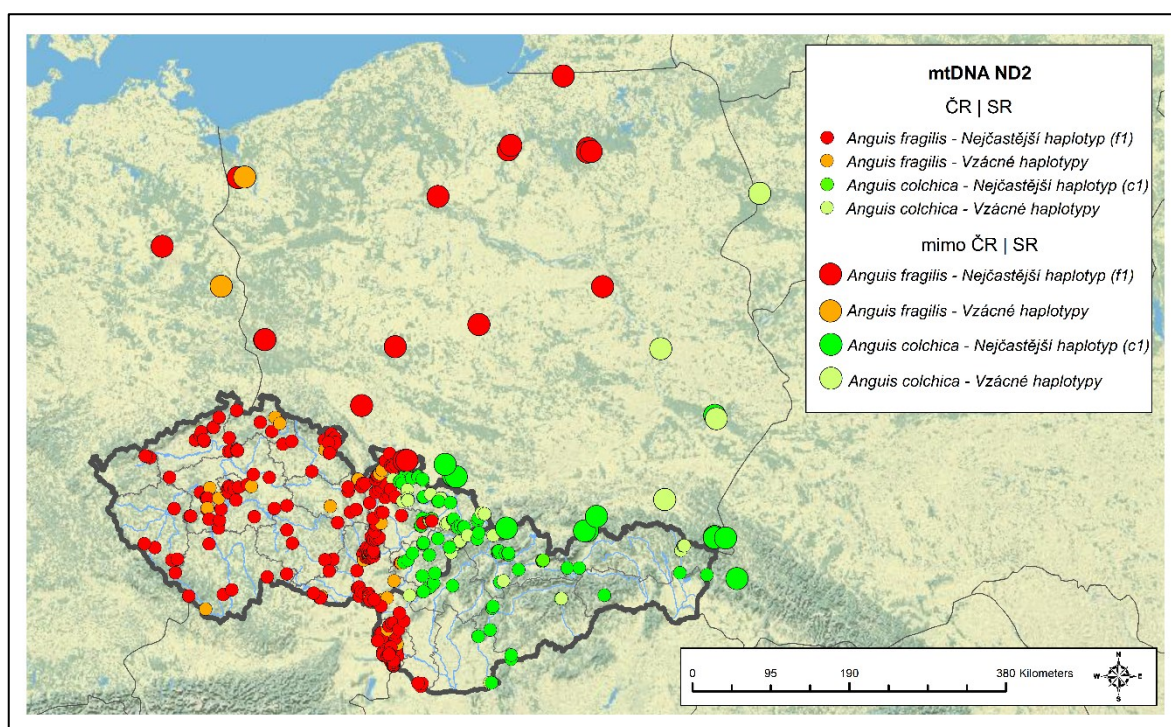
4.1.4 Srovnání haplotypové distribuce na území Polské republiky

Pro dokreslení biogeografického kontextu rozšíření slepýšů *Anguis* spp. ve střední Evropě, uvádím porovnání se zjištěnou genetickou diverzitou slepýšů na území sousedního Polska a několika přilehlých příhraničních lokalit na území Německa, Běloruska a Ukrajiny. Pro tyto účely byly zpracovány dosud nepublikované sekvence od Mgr. Daniela Jablonského, které v rámci připravovaného článku, toho času v revizi, rozšiřují poznatky o fylogeografii slepýšů a jejich postglaciální kolonizaci střední Evropy (Jablonski et al., v revizi).

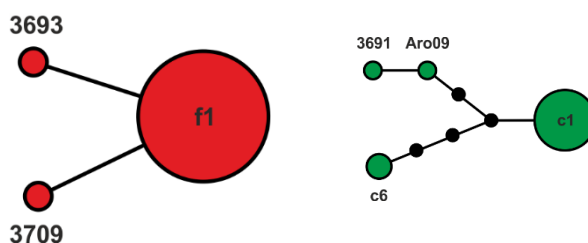
Z okolních zemí bylo analyzováno celkem 35 jedinců. Devatenáct z nich se řadí k druhu *A. fragilis* a zbylých 16 k *A. colchica*. Ve stejně dlouhém fragmentu mitochondriálního genu ND2, jako byly analyzované sekvence vzorků z České a Slovenské republiky, bylo detekováno 56 variabilních pozic, ze kterých bylo 53 parsimonně informativních a celkově bylo identifikováno 7 haplotypů. Největší zastoupení má pro *Anguis fragilis* opět haplotyp f1 a pro *A. colchica* haplotyp c1. Nukleotidová diverzita (π) je u *A. fragilis* v rámci porovnávaných území téměř totožná (0,03 % v ČR a SR, 0,029 % okolní země). U *A. colchica* je však podstatně vyšší u vzorků z okolních zemí (0,092 % v ČR a SR, 0,231 % okolní země) a méně časté haplotypy od dominantního haplotypu c1 dělí více mutačních kroků. Přehled hodnot mtDNA variability je uveden v tabulce 7 a mapa distribuce haplotypů a haplotypová síť na obrázku 10 a 11.

Lokus	L^1	Druh ²	n^3	S^4	η^5	$\% \pi^6 \pm \%SD^7$	θ_w^8	h^9	$H_d^{10} \pm SD^7$	PI^{11}
ND2	731	AF	19	2	2	0,029±0,017	0,00079	3	0,205±0,119	0
ND2	731	AC	16	7	7	0,231±0,079	0,00289	4	0,442±0,145	6
ND2	731	AF+AC	35	55	56	3,564±0,179	0,01868	7	0,659±0,057	53

Tab. 7: Základní populačně genetická statistika mitochondriálního fragmentu genu ND2 na území Polské republiky a přilehlých pohraničních lokalit Německé republiky, Běloruska a Ukrajiny. ¹Délka sekvence v bp (L); ²*A. fragilis* (AF), *A. colchica* (AC); ³Počet sekvencí (n); ⁴Počet segregujících míst (S); ⁵Počet mutací (η); ⁶Nukleotidová diverzita (π); ⁷Směrodatná odchylka (SD); ⁸Proporce polymorfních míst (θ_w); ⁹Počet haplotypů (h); ¹⁰Haplotypová diverzita (H_d); ¹¹Parsimonně informativní pozice (PI).



Obr. 10: Mapa distribuce nejhojnějšího haplotypu fragmentu mitochondriálního genu ND2 pro *Anguis fragilis* – haplotyp f1 (červeně) a pro *A. colchica* – haplotyp c1 (zeleně) na studovaném území České a Slovenské republiky ve srovnání s Polskou republikou a přilehlými pohraničními lokalitami Německé republiky, Běloruska a Ukrajiny (Jablonski et al., v revizi). Méně četné haplotypy jsou pro *A. fragilis* znázorněny oranžově a pro *A. colchica* světle zeleně.



Obr. 11: Haplotypová síť fragmentu mitochondriálního genu ND2 pro *A. fragilis* (červeně) a *A. colchica* (zeleně) na území Polské republiky a přihraničních lokalit na území Německé republiky, Běloruska a Ukrajiny. Jednotlivé mutační kroky jsou znázorněny čárkou a chybějící haplotyp černou tečkou. Barevné kruhy reprezentují jednotlivé haplotypy a jejich velikost koresponduje s počtem jedinců v daném haplotypu.

4.2 Analýza jaderného genu PRLR

Celkově se podařilo získat sekvence fragmentu jaderného genu PRLR od 170 jedinců ze 134 lokalit. K analýzám bylo použito i pět dříve publikovaných sekvencí (Gvoždík et. al, 2010). Nebyly pozorovány žádné rekombinace, stop kodony, ani delece kodonů. Vzhledem ke zjištění heterozygotních pozic, byla provedena haplotypová analýza v programu Phase v 2.1.1 (Stephens et al. 2001, Stephens & Scheet 2005), během které byly sekvence rozfázovány do gametických haplotypů. Analyzovaná délka výsledného fragmentu po ořezání dle kvality sekvencí byla 485 bp. Úsek obsahoval pět variabilních pozic, z toho všechny byly parsimonně informativní. Mezi sekvencemi bylo identifikováno pět haplotypů (Pf1, Pf3, Pf4n, Pc1, Pv1) (obrázek 12). V porovnání obou druhů vykazuje nižší nukleotidovou i haplotypovou diverzitu *Anguis colchica* ($\pi = 0,014 \pm 0,005$ %; $H_d = 0,070 \pm 0,023$). Výsledky základní statistické analýzy genetického polymorfismu uvádí tabulka 8.

Lokus	Délka ¹	Druh ²	n ³	S ⁴	η ⁵	% π ⁶ \pm %SD ¹²	θ_w ⁷	h ⁸	H _d ⁹ \pm SD ¹²	PI ¹⁰	R _m ¹¹
PRLR	485	AF	118	3	3	0,186 \pm 0,019	0,00116	3	0,574 \pm 0,033	3	0
PRLR	485	AC	222	1	1	0,014 \pm 0,005	0,00034	2	0,070 \pm 0,023	1	0
PRLR	485	AF+AC	340	5	5	0,179 \pm 0,012	0,00161	5	0,553 \pm 0,026	5	0

Tab. 8: Základní populačně genetická statistika fragmentu jaderného genu PRLR.

¹Délka sekvence v bp (L); ²*A. fragilis* (AF), *A. colchica* (AC); ³Počet sekvencí (n); ⁴Počet segregujících míst (S); ⁵Počet mutací (η); ⁶Nukleotidová diverzita (π); ⁷Proporce polymorfních míst (θ_w); ⁸Počet haplotypů (h); ⁹Haplotypová diverzita (H_d); ¹⁰Parsimonně informativní pozice (PI); ¹¹Minimální počet rekombinantních událostí (R_m); ¹²Směrodatná odchylka (SD).

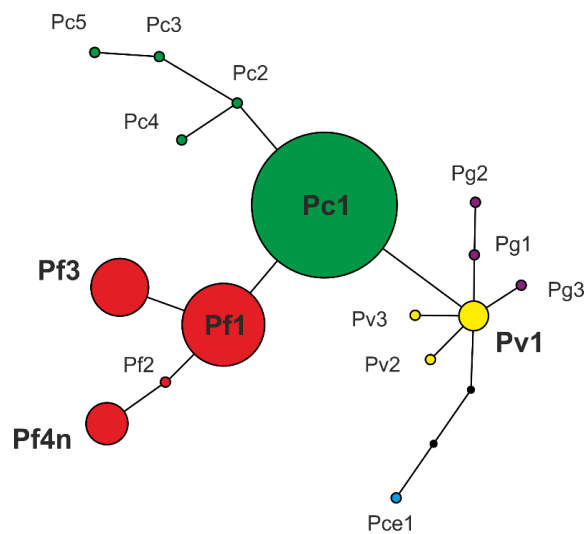
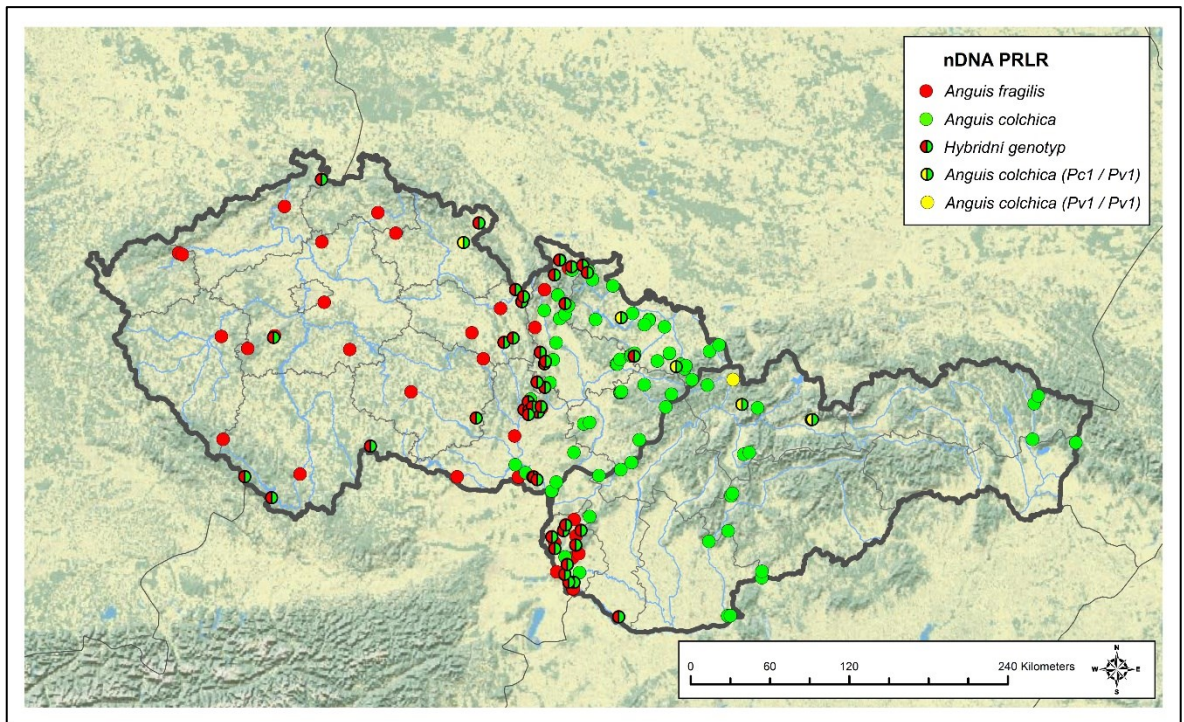
Po rozfázování obsahoval výsledný dataset 340 sekvencí. Podpora rozřešení heterozygotních pozic dosáhla ve všech případech 100%. U 35 jedinců odpovídala výsledná kombinace haplotypů druhu *A. fragilis*. V 16 případech se jednalo o homozygotní jedince s kombinací nejhojnějšího haplotypu Pf1. Ve čtyřech případech o homozygota s druhým nejhojnějším haplotypem Pf3 (A060, A123, A219, A236) a v jednom případě o homozygota s haplotypem Pf4n (A010). U heterozygotních jedinců se nejčastěji objevovala kombinace haplotypů Pf1 / Pf3, a to v sedmi případech (A071, A100, A163, A166, A176, A209, A309). Následovala kombinace Pf1 / Pf4n ve čtyřech případech (A068, A096, A102, A457) a kombinace Pf3 / Pf4n se objevila celkem třikrát (A008, A014, A046).

K druhu *A. colchica* bylo přiřazeno celkem 87 jedinců. U 80 z nich se jednalo o

homozygota s nejčastějším haplotypem Pc1. U zbylých sedmi vzorků byl identifikován haplotyp, který je v této délce shodný s dříve publikovaným haplotypem Pv1, který byl detekován u jihoevropského druhu *A. veronensis*. V jednom případě (A033) se jednalo o čistého homozygota u zbylých šesti vzorků o kombinaci Pc1 / Pv1 (A037, A038, A125, A301, A387, A416).

Hybridní genotyp kombinace haplotypů typických jak pro *A. fragilis*, tak pro *A. colchica* byl zaznamenán u 48 jedinců. Ve 25 případech se jednalo o kombinaci nejčastějších haplotypů Pf1 / Pc1. Následovalo 15 případů s kombinací Pc1 / Pf3 (A047, A175, A193, A203, A245, A273, A283, A305, A310, A321, A340, A342, A373, A382, A413) a 8 s kombinací Pc1 / Pf4n (A197, A217, A231, A325, A334, A377, A392, A411).

Přehled vzorků s kombinacemi gametických haplotypů je uveden v příloze 1 a mapa distribuce haplotypů a haplotypová síť na obrázku 12.



Obr. 12: Distribuce haplotypů a haplotypová síť *Anguis fragilis* (červeně) a *A. colchica* (zeleně) na území České a Slovenské republiky na základě analýzy jaderného genu PRLR a jejich pozice v rámci všech doposud známých evropských haplotypů dle Gvoždík et al. (2013). Haplotypy identifikované na území České a Slovenské republiky jsou zobrazeny tučně větším písmem. Půlená červenozelená kolečka představují hybridní jedince s kombinací nejhojnějšího haplotypu pro *A. colchica* (Pc1) a haplotypů *A. fragilis* (Pf1, Pf3, Pf4n). Žlutozelená půlená kolečka představují kombinaci haplotypu *A. colchica* (Pc1) a haplotypu *A. veronensis* (Pv1). Žluté kolečko je jediný homozygotní jedinec s genotypem *A. veronensis* (Pv1). Jednotlivé mutační kroky jsou znázorněny čárkou, černá kolečka představují chybějící haplotypy a velikost barevných koleček se proporčně shoduje s počtem vzorků sdílejících daný haplotyp. Označení haplotypů koresponduje s tabulkou v příloze 1.

4.3 Analýza jaderného genu RAG1

Sekvence fragmentu jaderného genu RAG1 se podařilo amplifikovat celkem u 156 jedinců ze 124 lokalit. Haplotypová analýza byla také provedena v programu Phase v 2.1.1 (Stephens et al. 2001, Stephens & Scheet 2005), kde byly sekvence rozfázovány do gametických haplotypů. Výsledný alignment obsahoval 606 bp, pouze 7 pozic bylo variabilních a z toho 5 parsimonně informativních s dohromady šesti haplotypy (A010Ra, A215Rb, A382Rb, A002Ra, A037Rb, A009Rb) (obrázek 13). Pro nízký počet detekovaných haplotypů byla provedena pouze základní statistická analýza genetického polymorfismu. Stop kodony, rekombinace, ani delece kodonů zjištěny nebyly. V porovnání obou druhů, nižší nukleotidová i haplotypová diverzita byla zjištěna u *A. fragilis* ($\pi = 0,004 \pm 0,003$ %; $H_d = 0,023 \pm 0,016$). Výsledné hodnoty RAG1 variability jsou uvedeny v tabulce 9.

Lokus	Délka ¹	Druh ²	n^3	S^4	η^5	$\% \pi^6 \pm \%SD^{12}$	θ_w^7	h^8	$H_d^9 \pm SD^{12}$	PI^{10}	R_m^{11}
RAG1	606	AF	177	2	2	0,004±0,003	0,00057	3	0,023±0,016	0	0
RAG1	606	AC	135	2	2	0,049±0,008	0,00060	3	0,289±0,045	2	0
RAG1	606	AF+AC	312	7	7	0,269±0,007	0,00183	6	0,554±0,017	5	0

Tab. 9: Základní populačně genetická statistika fragmentu jaderného genu RAG1.

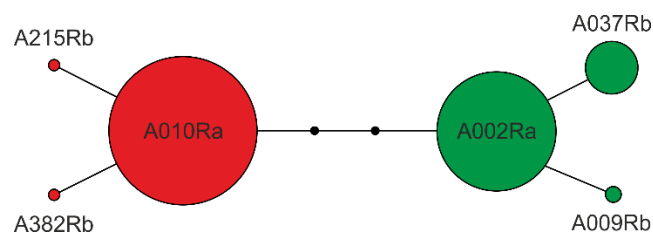
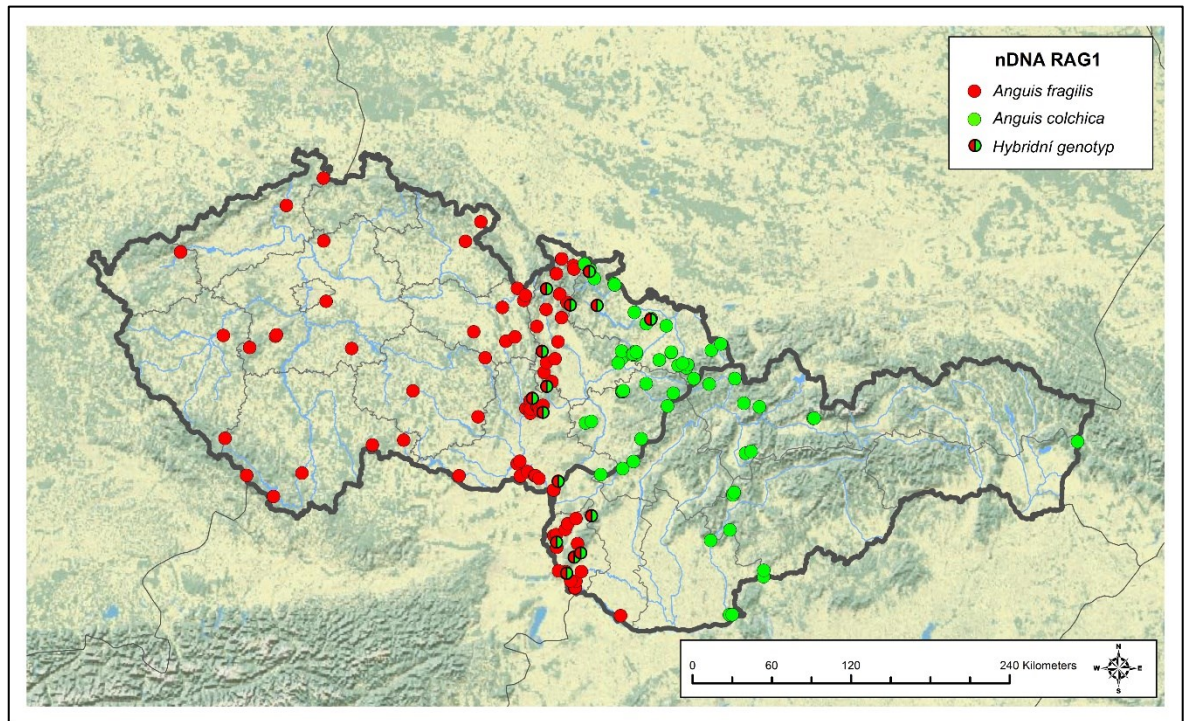
¹Délka sekvence v bp (L); ²*A. fragilis* (AF), *A. colchica* (AC); ³Počet sekvencí (n); ⁴Počet segregujících míst (S); ⁵Počet mutací (η); ⁶Nukleotidová diverzita (π); ⁷Proporce polymorfních míst (θ_w); ⁸Počet haplotypů (h); ⁹Haplotypová diverzita (H_d); ¹⁰Parsimonně informativní pozice (PI); ¹¹Minimální počet rekombinantních událostí (R_m); ¹²Směrodatná odchylka (SD).

Rozfázování do gametických haplotypů nám vytvořilo výsledný dataset o 312 sekvencích. Podpora rozřešení heterozygotních pozic dosáhla ve všech případech 100%. U 81 jedinců odpovídala výsledná kombinace haplotypů druhu *A. fragilis*. V 79 případech se jednalo o homozygotní jedince s kombinací nejhojnějšího haplotypu A010Ra. Zbylí dva heterozygotní jedinci představovali kombinaci nejhojnějšího haplotypu A010Ra a v jednom případě A215Rb a ve druhém A382Rb.

U druhu *A. colchica* bylo zastoupení heterozygotů vyšší. Homozygotních jedinců s kombinací nejhojnějšího haplotypu A002Ra bylo identifikováno 37. Jedinců, u kterých byly detekovány heterozygotní pozice, bylo 23. Výsledný genotyp byl vždy kombinací nejhojnějšího haplotypu A002Ra a haplotypu A009Rb, ve dvou případech (A009, A016), a haplotypu A037Rb ve zbylých 21 případech (A037, A038, A099, A124, A130, A199, A208, A228, A291, A292, A315, A343, A371, A376, A381, A384, A385, A408, A213, A224, A351).

U 15 jedinců (A083, A157, A188, A202, A204, A269, A287, A342, A360, A374, A461,

A489, A297, A313, A379) byl identifikován hybridní genotyp, který se vždy skládal z nejhojnějších haplotypů pro jednotlivé druhy, tedy kombinace A002Ra a A010Ra. Přehled vzorků s kombinacemi gametických haplotypů je uveden v příloze 1.



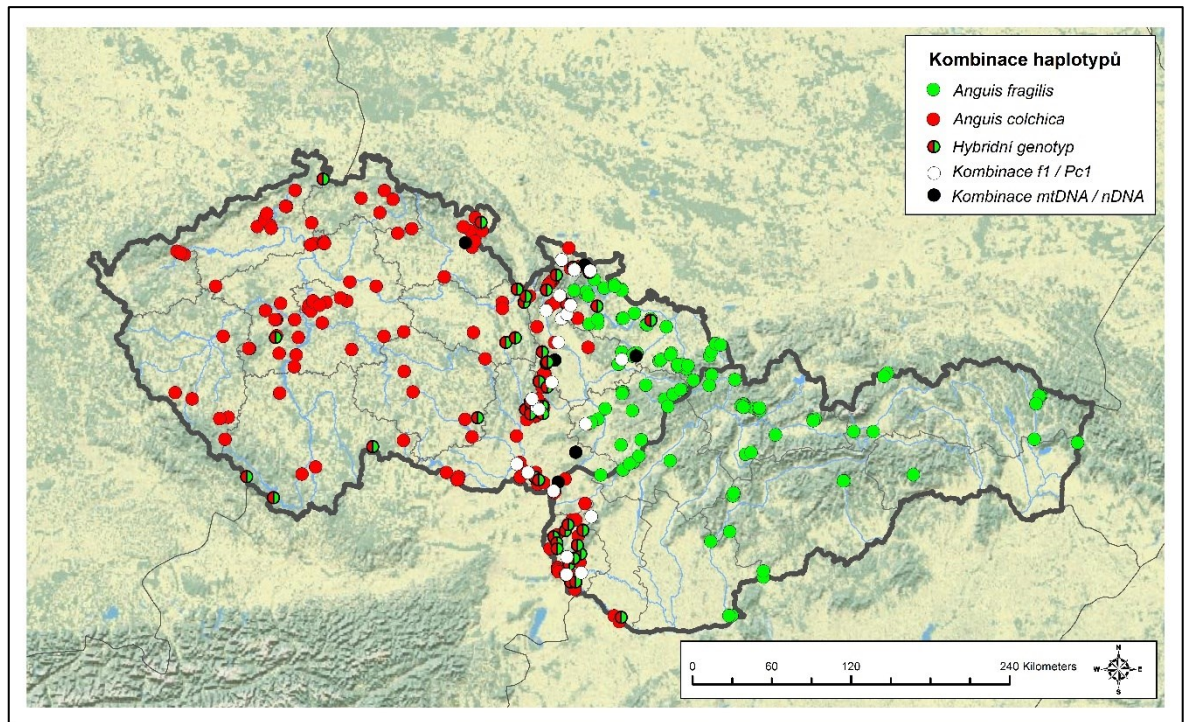
Obr. 13: Distribuce haplotypů a haplotypová síť *Anguis fragilis* (červeně) a *A. colchica* (zeleně) na území České a Slovenské republiky na základě analýzy jaderného genu RAG 1. Půlná kolečka představují hybridní jedince s kombinací nejhojnějšího haplotypu typického pro *A. fragilis* (A010Ra) a nejhojnějšího haplotypu typického pro *A. colchica* (A002Ra). Jednotlivé mutační kroky jsou znázorněny čárkou, černá kolečka představují chybějící haplotypy a velikost barevných koleček se proporčně shoduje s počtem vzorků sdílejících daný haplotyp. Označení haplotypů koresponduje s tabulkou v příloze 1.

4.4 Hybridní genotypy

Z celkového počtu 407 jedinců byla u všech získána sekvence mitochondriální DNA. Sekvence alespoň jednoho z jaderných lokusů byla získána u 36 jedinců a u 145 jedinců sekvence všech tří lokusů. Ve 181 případech jsou tak jedinci hodnoceni jak na základě mitochondriální, tak i jaderné DNA. U 88 jedinců je zjištěn hybridní genotyp, kdy je u jedince detekována kombinace alel, obsahující alespoň jednu alelu jiného druhu (obrázek 14). Hybridní genotyp je podstatně častěji detekován u jedinců řazených po mitochondriální linii k *A. fragilis*. Pouze v 8 z 88 případů se jedná o jedince mitochondriálně řazené k *A. colchica*, u kterých se na hybridním genotypu podílela pouze jedna cizí alela. Úplně nejčastějším případem je jedinec mitochondriálně řazený k *A. fragilis*, u kterého byla v jaderném lokusu PRLR zjištěna alela Pc1.

U sedmi jedinců je zjištěn dříve publikovaný haplotyp Pv1 (Gvoždík et al., 2013), který byl detekován u jihoevropského druhu *A. veronensis*. V jednom případě (A416) se jedinec mitochondriálně a i v jednom jaderném lokusu řadí k *A. fragilis* a druhý jaderný lokus je kombinací alel typických pro *A. colchica* a Pv1 typické pro *A. veronensis*. Ve zbylých šesti případech je jedinec řazen mitochondriálně k *A. colchica* a v jaderném genu PRLR je detekován haplotyp Pv1. Z toho v jednom případě v homozygotním stavu a v pěti případech v kombinaci s nejčastějším haplotypem Pc1 pro *A. colchica*. Přehled vzorků s kombinacemi všech haplotypů je uveden v příloze 1.

Detekované hybridní zóny se táhnou severojižním směrem a jejich centra jsou lokalizována přibližně od severní Moravy a Slezska, směrem na jih přes nížiny v okolí řeky Moravy a přilehlých pahorkatin a směřují na území Slovenské republiky k Malým Karpatům a přecházejí do Podunajské roviny. Šířka transektu, ve kterém byly zjištěny hybridní genotypy v jaderném lokusu PRLR, je přibližně 320 kilometrů. Naopak u druhého jaderného lokusu RAG1 je oblast podstatně užší a je vymezena pouze v šíři 100 kilometrů.



Obr. 14: Mapa porovnání výsledků variability mitochondriální (ND2) a jaderné (PRLR, RAG1) DNA slepýšů rodu *Anguis* na území České a Slovenské republiky. Kolečka, představující jedince, u kterých není zjištěn kombinovaný genotyp, jsou pro *A. fragilis* zbarvena červeně, pro *A. colchica* zeleně. Zbývající barevné kombinace zobrazují různou úroveň hybridizace. Půlená červeno-zelená kolečka znázorňují jedince, kteří jsou mitochondriálně řazeni k jednomu druhu a v jednom nebo obou jaderných lokusech vykazují pouze kombinaci haplotypů obou druhů. Nikdy se tedy v jaderných lokusech nejedná o haplotypy čistě druhého druhu. Černá a bílá kolečka jsou jedinci mitochondriálně řazeni k *A. fragilis* a nejméně v jednom ze dvou jaderných lokusů k *A. colchica*. Bílá kolečka pak představují kombinaci nejčastějšího mitochondriálního haplotypu f1 pro *A. fragilis* a homozygoty v jaderném lokusu PRLR s nejčastějším haplotypem Pc1 pro *A. colchica*.

5 DISKUZE

Česká a Slovenská republika patří díky své poloze k velmi zajímavým oblastem, kde byly v minulosti zachyceny kontaktní či hybridní zóny mnoha druhů obratlovců, či jejich fylogenetických linií (Babik et al., 2004; Kindler et al., 2013; Macholán et al., 2007; Ursenbacher et al., 2006). Z biogeografického hlediska se studované lokality nacházejí po obou stranách hranice hlavního evropského rozvodí, tzv. středu Evropy, a území České republiky je dále členěno na tři úmoří (Severního, Baltského a Černého moře). Spolu s geomorfologickým členěním této oblasti, kde se ze západu střetává Hercynský a z východu Alpsko-himalájský systém, tak vznikají pro biotu specifické podmínky, které ovlivňují disperzi jednotlivých druhů. V průběhu postglaciální rekolonizace střední Evropy z pleistocenních refugií se toto území stalo křižovatkou hlavních kolonizačních cest mnoha živočišných druhů. Při kontaktu linií, alopatricky oddělených během glaciálů, zde tak dochází ke vzniku sekundárních, potenciálně hybridních zón (Hewitt, 1999, 2011; Schmitt, 2007; Schmitt & Varga, 2012).

Během posledních dvaceti let dosáhly poznatky o fylogeografii mnoha evropských druhů plazů a obojživelníků značného pokroku (Arntzen et al., 2017; Dufresnes et al., 2015; Joger et al., 2007). S rozvojem molekulárně-genetických metod mohly být podpořeny, či naopak přehodnoceny až vyvráceny poznatky založené na morfologických datech. Mnohdy pak došlo k odhalení složitější fylogenetické struktury populací a k detekci kryptických druhů, jejichž taxonomie byla následně přehodnocena (Arntzen et al., 2013; Böhme et al., 2006; Gvoždík et al., 2010, 2013; Ljubisavljević et al., 2007). Stejně tak je tomu u slepýšů rodu *Anguis*, kteří jsou v České a Slovenské republice široce rozšířenými druhy plazů, obývajícími škálu biotopů od nížin po nejvyšší horské oblasti.

Na základě genetické analýzy fragmentu mitochondriálního genu ND2 a dvou jaderných protein-kódujících genů C-mos a PRLR jsem potvrdila, že na území České a Slovenské republiky dochází ke kontaktu dvou blízce příbuzných druhů slepýšů (Gvoždík et al., 2010). Na tomto území se stýká východní okraj areálu rozšíření slepýše křehkého (*Anguis fragilis*) a západní okraj areálu rozšíření slepýše východního (*A. colchica*). Na styku obou areálů byla, i na základě morfologických dat, předpokládána potenciální hybridní zóna, jejíž přesný průběh ani šíře nebyly doposud dostatečně prozkoumány.

V předkládané diplomové práci jsou v úvodní literární rešerši shrnuty původní morfologické přístupy, založené na charakteristickém folidózy, spolu s kvantifikací těchto

morfologických rozdílů. Dále jsou zde shrnuty poznatky vycházející ze současných genetických analýz a nastíněn vliv glaciálů na vývoj biogeografické distribuce rodu *Anguis* v rámci Evropy, kdy zpětná rekolonizace území, po ustoupení kontinentálního ledovce, vedla k vytvoření lineární kontaktní zóny. Zpřesnění průběhu a míra hybridizace v této zóně byly hlavními cíli této diplomové práce.

Výsledky rozsáhlého vzorkování (407 jedinců) poskytly konzistentnější biogeografický obraz o distribuci a biogeografii slepýšů na území střední Evropy. Genetickým analýzám bylo podrobena 407 sekvencí fragmentu mitochondriálního genu ND2 o délce 731 bp (oproti 1428 bp v práci Gvoždík et al. 2010), 170 sekvencí fragmentu jaderného protein-kódujícího genu PRLR o délce 485 bp (oproti 544 bp v práci Gvoždík et al. 2010) a 156 sekvencí fragmentu taktéž jaderného protein-kódujícího genu RAG1 o délce 606 bp (oproti 1043 bp v práci Szabó & Vörös, 2014). Jedná se o dosud největší počty analyzovaných sekvencí jednotlivých fragmentů genů v rámci publikovaných studií o slepýších (*Anguis* spp.). Takto rozsáhlý soubor pomohl dotvořit obraz o kontaktní zóně mezi *A. fragilis* a *A. colchica*, která je vedena od západního okraje Balkanid, povodím řeky Velika Morava a Dunaj a která je jasně odlišitelná až po severní Maďarsko (Jablonski et al. 2016; Szabó & Vörös, 2014).

Z výsledků analýzy sekvencí mitochondriální DNA je na první pohled patrný vysoký počet identifikovaných haplotypů. U 407 jedinců bylo zjištěno celkem 41 haplotypů. Z toho se 26 haplotypů řadí k *A. fragilis* a 16 k *A. colchica*. V obou dvou případech je zde markantně zastoupen jeden dominantní haplotyp. Relativní četnost dominantního haplotypu f1 typického pro *A. fragilis* dosahuje až 90 % a haplotypu c1 typického pro *A. colchica* 69 %. Shodně u obou druhů byly z celkového počtu detekovaných haplotypů pouze tři již dříve publikovány. U *A. fragilis* se jednalo o haplotyp f1 (Gvoždík et al., 2010), Aba12 (Jablonski et al., 2016) a 3709 (Jablonski et al., v revizi). U *A. colchica* o haplotypy c1, c3, c4 (Gvoždík et al., 2010). I přes vyšší absolutní četnost haplotypů řazených k *A. fragilis*, která je ovlivněna vyšším zastoupením jedinců tohoto druhu ve zkoumaném vzorku, vykazuje vyšší nukleotidovou (0,092 % oproti 0,03 %) i haplotypovou (0,521 % oproti 0,185 %) diverzitu *A. colchica*. U obou druhů vytváří haplotypová síť výrazný star-like vzor, kde se méně četné haplotypy od dominantního liší pouze minimálním počtem mutačních kroků. Tyto zjištěné údaje o mitochondriální diverzitě DNA podporují již dřívější data (Jablonski et al. 2016).

V České republice dominuje svým rozšířením druh *A. fragilis*, který byl

zaznamenán na celém území Čech, směrem ze západu zasahuje i na značnou část Moravy a okrajově na severozápad Slezska. Na severozápadním výběžku Slezska byly populace nalezeny v oblasti Rychlebských hor a směrem na východ až k městům Jeseník a Zlaté Hory. Přes západní část Hrubého Jeseníku a Hanušovickou vrchovinu sestupují populace směrem na jih k Hornomoravskému úvalu. Z této oblasti nebylo získáno potřebné množství vzorků pro podrobnější odhad rozšíření, ale zdá se, že přes jižní okraj Nízkého Jeseníku a Oderských vrchů prostupuje *A. fragilis* Moravskou bránou na nejvýchodnější lokality svého rozšíření v rámci České Republiky a zároveň i v rámci celého studovaného území. Současně se jedná o jedinou zjištěnou oblast sympatrického výskytu s *A. colchica* z území České i Slovenské republiky. *Anguis fragilis* byl hojně zastoupen vzorky z Drahanské vrchoviny a dále na jih byl zjištěn v západní části Chřib, Dýjsko-svrateckém úvalu a přes jihozápadní část Dolnomoravského úvalu směřují populace na jih do Slovenské republiky do pohoří Malých Karpat, Záhorské nížiny a Podunajské roviny. Nejjižnější lokalita výskytu druhu *A. fragilis* byla zaznamenána v obci Gabčíkovo.

Na Slovensku dominuje svým zastoupením druh *A. colchica*. Řadí se k němu všechny vzorky získané z Karpatské oblasti. Nedostatečně ovzorkovaná oblast Podunajské nížiny nám neumožňuje odhadnout průběh kontaktní zóny s *A. fragilis* na území Slovenska, ale na západních nížinatých územích kolem Bratislavy a pohoří Malých Karpat žádné populace *A. colchica* nalezeny nebyly. Do České republiky zasahují populace od východu na Moravu, a to především do horských oblastí Bílých Karpat a Hostýnsko-vsetínské hornatiny a do Slezska přes Moravskoslezské Beskydy k Ostravě a dále severozápadním směrem až k městu Vrbno pod Pradědem. Populace se také vyskytují až ve východních částech Hrubého a Nízkého Jeseníku a Oderských vrchů.

Při porovnání rozšíření obou druhů se jeví, že *A. fragilis* obsazuje spíše nížinaté oblasti obou států a pahorkatinu, kdežto *A. colchica* je karpatským druhem, což by mohlo souviset se vzory jeho postglaciálního šíření a divergencí populací, jež probíhala nejspíše v rumunských Karpatech (Jablonski et al., 2016). Pro dokreslení biogeografického kontextu rozšíření slepýšů rodu *Anguis* spp. ve střední Evropě, byly analýzy mitochondriálního genu ND2 rozšířeny o dosud nepublikované sekvence od Mgr. Daniela Jablonského z území sousedního Polska a několika přilehlých příhraničních lokalit na území Německa, Běloruska a Ukrajiny. Při porovnání genetické diverzity vyšlo najevo, že zatímco nukleotidová diverzita (π) je u *A. fragilis* téměř totožná (0,03 % v ČR a SR, 0,029 % okolní země), u *A. colchica* je podstatně vyšší u vzorků z okolních zemí (0,092 % v ČR a

SR, 0,231 % okolní země) a haplotypová síť je oproti československým populacím diverzifikovanější. Zdá se, že průběh kontaktní zóny na území Polska značně vybočuje ze své severojižní orientace pozorované na území České a Slovenské republiky. Areál rozšíření *A. colchica* ustupuje směrem na východ a kontaktní zóna se tak k severu stáčí tímto směrem. Ve světle těchto zjištění se jako nejzápadnější lokalita výskytu *A. colchica* po mitochondriální linii jeví centrum Hrubého Jeseníku, a to nejenom v rámci studovaného území, ale i v celoevropském kontextu (Jablonski et al. 2016, v revizi). Konkrétně se jedná o vzorek A477 nalezený na nejvyšší hoře Jeseníků, na Pradědu.

Demografická historie populací byla testována na základě mitochondriální DNA, a to několika přístupy. Výsledné hodnoty všech testů vyšly signifikantně a jsou u obou druhů v nápadné shodě. Pozorované hodnoty pro R_2 (0,0181 u *A. fragilis* a 0,0302 u *A. colchica*) vyšly signifikantně menší, než by očekával model dle konstantní velikosti populace ($P < 0,001$). Stejně tak, jako signifikantně záporné hodnoty Tajimova D testu (-2,50347 u *A. fragilis* a -2,23702 u *A. colchica*) a Fuovy F_S statistiky (-41,881 u *A. fragilis* a -21,203 u *A. colchica*). Tyto výsledky poskytují důkaz o tom, že populace pravděpodobně prošly náhlou a rychlou expanzí.

Analýza párových neshod (mismatch distribution, MD) vykazuje v obou případech unimodální křivku, která taktéž koresponduje s předpokládaným scénářem rychlé postglaciální expanze. Grafy populační dynamiky, zobrazené pomocí metody BSP (Bayesian skyline plots), datují nejbližší ancestrální populaci (TMRCA) do období přibližně před 300 tisíci lety. Následné období populační expanze kulminovalo zhruba před 200 tisíci lety a plynule přešlo v populace o stabilní velikosti, které bez zjevných výkyvů trvají dodnes.

V neposlední řadě tuto hypotézu podporuje i výrazný star-like vzor haplotypových sítí, ve kterých se méně četné haplotypy liší od dominantních pouze minimálním počtem mutačních kroků a vytvářejí tak právě typickou hvězdicovitou strukturu. Ta je způsobena rychlým rozšířením jednoho haplotypu a postupným hromaděním většího počtu drobných mutací. V populaci tak převládá „mladý“ polymorfismus, kdy se vytvoří řada nových haplotypů, ale nukleotidová diverzita je stále nízká (Felsenstein, 1985).

Stejně jako v případě mitochondriálního lokusu ND2, byly již evropské populace slepýšů podrobeny základní analýze jaderných lokusů. Gvoždík et al. (2010) neshledali variabilitu prvního ze dvou zkoumaných jaderných lokusů C-mos dostačující natolik, aby

byl tento lokus vhodný pro detailnější fylogeografické studie. Pro účely této diplomové práce byl tedy analyzován druhý jaderný lokus, a to protein-kódující PRLR.

Ukázalo se, že jeho variabilita je na zkoumaném území velmi nízká. Mezi 170 získanými sekvencemi bylo zjištěno pouze 5 haplotypů. Všechny se v délce 485 bp shodovali s již publikovanými haplotypy (Gvoždík et al., 2010, 2013). Jednalo se o Pf1, Pf3 a Pf4n pro *A. fragilis*, Pc1 pro *A. colchica* a Pv1, který byl detekován u jihoevropského druhu *A. veronensis*. Nebyl zjištěn žádný nový haplotyp a výsledky jsou tak doplněním celoevropského kontextu.

Diskutabilním se stává zjištění haplotypu Pv1, který se řadí k jihoevropskému druhu *A. veronensis*. Je však třeba brát na zřetel, že oproti publikovanému haplotypu Pv1 jsou analyzované sekvence v této diplomové práci o 59 bp kratší a v tomto úseku se nacházejí další dvě variabilní pozice, které haplotyp od Pc1 odlišují. Je tedy možné, že při porovnání stejně dlouhých sekvencí, by byl u těchto diskutabilních vzorků (A033, A037, A038, A125, A387, A301, A416) zjištěn haplotyp, který by se lišil menším počtem mutací a tvořil by tak nový přechodný haplotyp mezi těmito liniemi.

Na základě výsledné distribuce haplotypů jaderného genu PRLR, se ze všech provedených analýz jeví kontaktní zóna obou druhů slepýšů nejvíce posunuta západním směrem. Jedinci s hybridním genotypem byli zaznamenáni v transektu o šířce přibližně 320 kilometrů, a to převážně od kontaktní zóny, ustanovené na základě mitochondriální DNA, na západ. Co se týká kombinace výsledného genotypu, vždy se u hybridů jednalo o jedince po mitochondriální linii řazené k *A. fragilis*. Ani v jednom případě nebyla alela jaderného genu PRLR typická pro *A. fragilis* detekována u jedince po mitochondriální linii řazeného k *A. colchica*. Z celkového počtu 170 jedinců bylo zjištěno více jak 40 % hybridů. Vždy se tedy jednalo o jedince mitochondriálně řazené k *A. fragilis*. Ve 26 případech byl lokus PRLR kombinací haplotypu Pc1 a některého z haplotypů, řazených k *A. fragilis* (Pf1, Pf3, Pf4n). Ve 48 případech byl jedinec v jaderném lokusu homozygotem Pc1 a tito jedinci se nacházeli v podstatně užším transektu o šířce přibližně 80 kilometrů, který je situován do oblasti hlavní kontaktní zóny.

Fylogenetická pozice haplotypu Pc1 se ve světle soudobých poznatků jeví stále jako diskutabilní. Už Gvoždík et al. (2010) upozorňovali, že v případě tohoto haplotypu by se mohlo jednat o potenciálně ancestrální haplotyp. Vzhledem k tomu, že autosomální lokusy vykazují až čtyřnásobně pomalejší rychlost třídění linií, může se jednat o důsledek jevu známého jako nekompletní třídění linií (incomplete lineage sorting) (Avise, 2000).

Tento jev nastává, pokud se ancestrální populace začala štěpit ještě předtím, než se v ní ustálil původní polymorfismus. Evoluční linie vzešlé z tohoto štěpení zdědí všechny alely obsažené v genofondu původní populace, které se poté zafixují zcela náhodně.

Co se týká analýzy fragmentu druhého jaderného genu RAG1 na území České a Slovenské republiky. Rozšíření se jeví velmi podobné distribuci haplotypů na základě mitochondriální DNA. Počet analyzovaných sekvencí byl oproti druhému jadernému lokusu PRLR pouze o 14 sekvencí menší (tj. 156), avšak v tomto případě bylo detekováno o jeden haplotyp více. Hodnoty celkové haplotypové diverzity jsou však pro oba lokusy téměř totožné (0,553 % pro PRLR a 0,554 % pro RAG1). Celkem z šesti haplotypů se vždy tři řadí k jednomu druhu. Stejně jako u mitochondriálního lokusu ND2 má podstatně vyšší nukleotidovou (0,049 % oproti 0,004 %) i haplotypovou (0,289 % oproti 0,023 %) diverzitu *A. colchica*. U struktury haplotypové sítě se sice ještě nedá mluvit o star-like vzoru, ale opět dominuje jeden haplotyp, od kterého se vzácné haplotypy liší pouze jedním mutačním krokem.

I v rámci tohoto jaderného lokusu byli zjištěni jedinci s hybridním genotypem a opět se zde ukazuje tendence toku genů *A. colchica* směrem na západ do populací *A. fragilis*. Šíře transektu, ve kterém se vyskytují hybridní jedinci, byla v tomto případě podstatně užší, a to přibližně pouze 100 kilometrů. Ze 156 jedinců byl kombinovaný genotyp odhalen ve 20 případech. Z toho pouze 5 jedinců (A003, A159, A213, A224, A351) bylo mitochondriálně řazeno k *A. fragilis* a v jaderném lokusu čistě k *A. colchica*. U zbylých 15 případů byla v jaderném lokusu identifikována pouze jedna alela druhého druhu. Častějším případem opět bylo, že hybridní jedinec byl mitochondriálně řazen k *A. fragilis*, a to v 13 případech (A083, A157, A188, A202, A269, A287, A297, A313, A342, A374, A379, A461, A489) a pouze u dvou jedinců tomu bylo naopak (A204, A360).

Doposud jedinou studií, analyzující u slepýšů jaderný gen RAG1, je práce Szabó & Vörös (2014) z Maďarska. Analyzovaný fragment o délce 1 043 bp obsahoval 8 variabilních pozic, ze kterých bylo 5 heterozygotních, a které definovaly vzorky do deseti genotypů. Heterozygotní pozice však v této práci nebyly rozřešeny do gametických haplotypů. V délce 606 bp se sekvence analyzované v této diplomové práci s již publikovanými vzorky (Szabó & Vörös, 2014) shodovaly následovně: A002Ra = AcR03 (KF736840); (A002Ra / A037Rb) = AcR02 (KF736839); A010Ra = AfR01 (KF736841).

Na základě získaných dat lze usuzovat, že tok genů převažuje ve směru z populací

A. colchica do populací *A. fragilis* a může k němu docházet v souvislosti s eto-ekologickými specifiky obou druhů. Jednou z možných hypotéz, vysvětlujících tento fenomén, může být přednostní křížení samců *A. colchica* se samicemi *A. fragilis*. Docházet k němu může vlivem relativně větší velikost těla i hlavy samců *A. colchica*, díky které můžou získávat značnou reprodukční výhodu při získávání partnerky. Specifikace míry toku genů a mechanismů ovlivňujících proporce frekvencí alel v hybridních populacích, je třeba podrobit hlubším analýzám. Stejně tak jako vlastní fitness hybridních jedinců, která nebyla doposud blíže studována. Asymetrie v mezidruhové hybridizaci může být spojena například s asymetrií v postzygotické reprodukční izolaci, což znamená, že sníženou fitness mají jen hybridní jedinci v jednom směru křížení, přičemž tento typ asymetrie bývá u blízce příbuzných druhů poměrně častý (Turelli & Moyle, 2007).

Získanými výsledky se podařilo dosáhnout podstatného zpřesnění poznatků o rozšíření obou druhů slepýšů na území České a Slovenské republiky. Pro budoucí analýzy je vhodné se v České republice zaměřit na vzorkování v oblasti Horno- a Dolnomoravského úvalu a na Slovensku především v Podunajské nížině. Vzhledem k výskytu mezidruhové hybridní zóny je třeba poznatky rozšířit o detailnější analýzu toku genů, který vlivem nedostatečně vyvinutých reprodukčně izolačních bariér stále trvá. V této souvislosti také doposud nebyla zkoumána vitalita a fertilita mezidruhových hybridů, která by ve spojitosti s eto-ekologickými odlišnostmi obou druhů, mohla výrazně ovlivňovat potenciál šíření slepýšů a v neposlední řadě by byla důležitým poznatkem pro současnou ochranářskou biologii.

6 ZÁVĚR

1) Analýzou významného souboru mitochondriálních a jaderných sekvencí DNA, získaných od 407 jedinců z 281 lokalit, byly zpřesněny poznatky o rozšíření dvou druhů slepýšů rodu *Anguis* ve střední Evropě. Genotypizací jedinců bylo zjištěno, že na území České republiky dominuje svým rozšířením *Anguis fragilis* a výskyt *A. colchica* se omezuje především na horské oblasti (Karpaty) východní části republiky. Naopak na Slovensku je dominantním druhem *A. colchica* a výskyt *A. fragilis* je omezen na východní oblasti kolem Malých Karpat a území Podunajské roviny. Největší variabilitou se vyznačuje mitochondriální lokus ND2 se 41 zjištěnými haplotypy. Oba jaderné lokusy jsou podstatně méně variabilní a bylo identifikováno pouze 6 haplotypů lokusu RAG1 a 5 haplotypů lokusu PRLR. Vyšší haplotypovou i nukleotidovou diverzitu vykazuje u *A. fragilis* pouze jaderný lokus PRLR. Pro mitochondriální lokus ND2 a jaderný lokus RAG1 jsou tyto hodnoty podstatně vyšší u *A. colchica*.

2) Rekombinačně-aktivační gen 1 (RAG1) není v populačně genetických studiích, zabývajících se hybridizací, běžně používaným lokusem. Avšak i přes jeho poměrně velmi nízkou variabilitu, byly jeho analýzou od sebe druhy jednoznačně odlišeny. U obou druhů byl zjištěn jeden dominantní a dva vzácné haplotypy. Jedinci s hybridním genotypem byli lokalizováni v oblasti kontaktní zóny obou druhů a jejich distribuce navazuje na doloženou oblast výskytu hybridních jedinců publikovaných z území Maďarska. Oproti výsledkům analýzy mitochondriální DNA, je kontaktní zóna vychýlena západním směrem a hybridní jedinci byli zjištěni v zóně o přibližné šířce 100 kilometrů.

3) Na základě srovnání distribuce sekvencí mtDNA a nDNA byla v oblasti kontaktu obou druhů zjištěna vysoká míra mezidruhové hybridizace. Výskyt jedinců s hybridním genotypem je situován do přibližně 100 kilometrů široké zóny, která se táhne severojižním směrem od severního Slezska, přes nížiny v okolí řeky Moravy, směrem na Slovensko k pohoří Malých Karpat a do Podunajské roviny, přes kterou navazuje na hybridní zónu detekovanou na území Maďarska (Szabó & Vörös, 2014), kde ji tvoří povodí řeky Dunaj. Je zajímavé, že na základě mitochondriální analýzy byl zjištěn sympatrický výskyt pouze na lokalitách přibližně ve středu Moravské brány, a to v šířce pouhých 20 kilometrů. V ostatních oblastech zkoumaného regionu jsou od sebe mitochondriální linie striktně geograficky odděleny.

4) Porovnáním vnitrodruhové genetické variability dvou druhů slepýšů, vyskytujících se ve střední Evropě, bylo zjištěno, že sdílejí velmi podobnou mitochondriální genetickou strukturu a populační historii. Po oddělení od nejbližší ancestrální populace (TMRCA), které je datováno do období přibližně před 300 tisíci lety, došlo u obou druhů k populační expanzi, jež kulminovala zhruba před 200 tisíci lety. Po populační expanzi následovala stabilizace velikosti populací, která bez zjevných výkyvů trvá dodnes. Tuto hypotézu podporuje i vzor zjištěný v haplotypových sítích obou druhů.

7 SEZNAM LITERATURY

- Albert, E. M., San Mauro, D., García-París, M., Rüber, L., Zardoya, R. (2009). Effect of taxon sampling on recovering the phylogeny of squamate reptiles based on complete mitochondrial genome and nuclear gene sequence data. *Gene*, 441: 12–21.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, M., Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. 4 th ed. New York: Garland Science, 1616 pp.
- Allendorf, F. W., Luikart, G. H. (2007). Introduction. In *Conservation and the Genetics of Populations*. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 642 pp.
- Arntzen, J. W., Mcatear, J., Recuero, E., Ziermann, J. M., Ohler, A., Alphen, J. Van. (2013). Morphological and genetic differentiation of *Bufo* toads: two cryptic species in Western Europe (Anura, Bufonidae). *Contributions to Zoology*, 82(4): 147–169.
- Arntzen, J. W., Vries, W. de, Canestrelli, D., Martínez-Solano, I. (2017). Hybrid zone formation and contrasting outcomes of secondary contact over transects in common toads. in press.
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge: Harvard University Press.
- Avise, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3–15.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., Saunders, N. C. (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489–522.
- Babik, W., Branicki, W., Šandera, M., Litvinchuk, S., Borkin, L. J., Irwin, J. T., Rafiński, J. (2004). Mitochondrial phylogeography of the moor frog, *Rana arvalis*. *Molecular Ecology*, 13(6): 1469–1480.
- Bachelot, A., Binart, N. (2007). Reproductive role of prolactin. *Reproduction*, 133: 361–369.
- Benkovský, N., Gvoždík, V., Moravec, J., Jandžík, D. (2012). Morfológia „novoobjaveného“ druhu slepúcha z Apeninského polostrova. 28-29 pp. In J. Bryja, J. Albrechtová, & E. Tkadlec (Ed.), *Zoologické dny Olomouc 2012, Sborník abstraktů z konference 9.-10. února 2012*. Brno: Ústav biologie obratlovců AV ČR, 242 pp.
- Benkovský, N., Gvoždík, V., Šifrová, H., Moravec, J., Jandžík, D. (2011). Morfológia slepúchov *Anguis fragilis* a *A. colchica* na území ČR a SR. In J. Bryja, Z. Řehák, & J. Zúkal (Ed.), *Zoologické dny Brno 2011, Sborník abstraktů z konference 17. - 18. února 2011*. Brno: Ústav biologie obratlovců AV ČR, 282 pp.

- Böhme, G. (1996). The historical development of Central Europe herpetofauna during the ice age. In Günther (Ed.), *The Amphibians and Reptilians of Germany*. Stuttgart: Gustav Fischer, 30–39 pp.
- Böhme, M. ., Fritz, U., Kotenko, T., Dzukid, G., Ljubisavljevid, K., Tzankov, N., Berendonk, T. U. (2006). Phylogeography and cryptic variation within the *Lacerta viridis* complex (Lacertidae , Reptilia). *Zoologica Scripta*, 36(2): 119–131.
- Böhme, W. (2012). A record-sized specimen of the western slow worm (*Anguis fragilis*). *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 19: 117–118.
- Boore, J. L. (1999). *Animal mitochondrial genomes*. Oxford University Press, 27(8): 1767–1780.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühner, D., Vaughan, T., Wu, C., Xie, D., Suchard, M. A., Rambaut, A., Drummond, A. J. (2004). BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, 10: e1003537.
- Brehm, A., Jesus, J., Pinheiro, M., Harris, D. J. (2001). Relationships of Scincid Lizards (*Mabuya* spp; Reptilia: Scincidae) from the Cape Verde Islands Based on Mitochondrial and Nuclear DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(2): 311–316.
- Brown, D. S., Jarman, S. N., Symondson, W. O. (2012). Pyrosequencing of prey DNA in reptile faeces: Analysis of earthworm consumption by slow worms. *Molecular Ecology Resources*, 12: 259–266.
- Brown, W. M., George, M., Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(4): 1967–1971.
- Cabela, A., Grillitsch, B. (1989). Zum systematischen Status der Blindschleiche (*Anguis fragilis* LINNAEUS, 1758) von Nordgriechenland und Albanien (Squamata: Anguidae). *Herpetozoa*, 2(1/2): 51–69.
- Capula, M., Luiselli, L., Capanna, E. (1997). The blue-spotted morph of the slow worm, *Anguis fragilis*: Colour polymorphism and predation risks. *Italian Journal of Zoology*, 64(2): 147–153.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–1659.
- Conrad, J. L. (2008). Phylogeny and systematics of Squamata (Reptilia) based on morphology. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 310: 1–182.
- Dagil, R., Knudsen, M. J., Olsen, J. G., O’Shea, C., Franzmann, M., Goffin, V., Teilum, K., Breinholt, J., Kragelund, B. B. (2012). The WSXWS motif in cytokine receptors is a molecular switch involved in receptor activation: Insight from structures of the prolactin receptor. *Structure*, 20: 270–282.

- DAISIE European Invasive Alien Species Gateway, 2008. 100 of The Worst. Dostupné z <http://www.europe-aliens.org/speciesTheWorst.do> [28.1.2016]
- de Pous, P., Mora, E., Metallinou, M., Escoriza, D., Comas, M., Donaire, D., Pleguezuelos, J. M., Carranza, S. (2011). Elusive but widespread? The potential distribution and genetic variation of *Hyalosaurus koellikeri* (Günther, 1873) in the Maghreb. *Amphibia-Reptilia*, 32: 385–397.
- Dely, O. G. (1972). Adatok a kárpát-medencei törékeny gyík (*Anguis fragilis* Linnaeus) rendszertanához és elterjedéséhez [Beiträge zur Verbreitung und Systematik der Blindschleiche (*Anguis fragilis* Linnaeus) in Karpatenbecken.]. *Vertebrata Hungarica*, 13: 39–79.
- Dely, O. G. (1974). Über die Unterarten der Blindschleiche, *Anguis fragilis* L. *Vertebrata Hungarica*, 15: 11–37.
- Donnellan, S. C., Hutchinson, M., Saint, K. M. (1999). Molecular evidence for the phylogeny of Australian gekkonid lizards. *Biological Journal of the Linnean Society*, 67: 97–118.
- Drummond, A. J., Rambaut, A. (2007). Software: BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(217): 8pp.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O. G. (2005). Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 5: 1185–1192.
- Dufresnes, C., Brelsford, A., Crnobrnja-Isailović, J., Tzankov, N., Lymberakis, P., Perrin, N. (2015). Timeframe of speciation inferred from secondary contact zones in the European tree frog radiation (*Hyla arborea* group). *BMC evolutionary biology*, 15(155): 1–8.
- Džukić, G. (1987). Taxonomic and biogeographic characteristics of the slow-worm (*Anguis fragilis* LINNAEUS 1758) in Yugoslavia and on the Balcan Peninsula. *Scopolia*, (12): 1–47.
- Eo, S. H., DeWoody, J. A. (2010). Evolutionary rates of mitochondrial genomes correspond to diversification rates and to contemporary species richness in birds and reptiles. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences*, 277: 3587–3592.
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist*, 125(1): 1–15.
- Ferreiro, R., Galán, P. (2004). Reproductive ecology of the slow worm (*Anguis fragilis*) in the northwest Iberian Peninsula. *Animal Biology*, 54(4): 353–371.
- Filípek, M. (2005). Neobvykle sfarbený slepúch lámavý. *Živa*, 1: 36.
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological reviews*, 80(4): 1523–1631.

- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2): 915–925.
- Funk, D. J., Omland, K. E. (2003). Species-level paraphyly and polypfyly: Frequency, causes and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34: 397–423.
- Gehring, P. S., Tolley, K. A., Eckhardt, F. S., Townsend, T. M., Ziegler, T., Ratsavina, F., Glaw, F., Vences, M. (2012). Hiding deep in the trees: Discovery of divergent mitochondrial lineages in Malagasy chameleons of the *Calumma nasutum* group. *Ecology and Evolution*, 2: 1468–1479.
- Gomez, A., Lunt, D.H., (2007). Refugia within refugia: the patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In: Weiss, S., Ferrand, N. (Eds.), *Phylogeography of Southern European Refugia*. Springer, pp. 155–188.
- Greenbaum, E., Bauer, A. M., Jackman, T. R., Vences, M., Glaw, F. (2007). A phylogeny of the enigmatic Madagascan geckos of the genus *Uroplatus* (Squamata: Gekkonidae). *Zootaxa*, 1493: 41–51.
- Grigorieff, N. (1999). Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Current Opinion in Structural Biology*, 9: 476–483.
- Grillitsch, H., Cabela, A. (1990). Zum systematischen Status der Blindschleichen (Squamata: Anguidae) des Peloponnes und der südlichen Ionischen Inseln (Griechenland). *Herpetozoa*, 2(3/4): 131–153.
- Groth, J. G., Barrowclough, G. F. (1999). Basal divergences in birds and the phylogenetic utility of the nuclear RAG-1 gene. *Molecular phylogenetics and evolution*, 12(2): 115–123.
- Gvoždík, V., Benkovský, N., Crottini, A., Bellati, A., Moravec, J., Romano, A., Sacchi, R., Jandzík, D. (2013). An ancient lineage of slow worms, genus *Anguis* (Squamata: Anguidae), survived in the Italian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3): 1077–1092.
- Gvoždík, V., Crottini, A., Moravec, J., Romano, A., Sacchi, R., Jandzík, D. (2011). Another Slow-worm species (*Anguis*, Anguidae) revealed south of the Alps. 40 - 41 pp. In SEH European Congress of Herpetology & DGHT Deutscher Herpetologentag. 25th to 29th September 2011, SEH & DGHT, Luxembourg and Trier, 132 pp.
- Gvoždík, V., Jandzík, D., Lymberakis, P., Jablonski, D., Moravec, J. (2008). Slow Worm (*Anguis fragilis*) as a species complex. *Herpetologické informace*, 7(1): 6–7.
- Gvoždík, V., Jandzík, D., Lymberakis, P., Jablonski, D., Moravec, J. (2010). Slow worm, *Anguis fragilis* (Reptilia: Anguidae) as a species complex: Genetic structure reveals deep divergences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(2): 460–472.
- Gvoždík, V., Moravec, J. (2015). *Anguis fragilis* Linnaeus, 1758 - slepýš křehký. 237 - 261 pp. In J. Moravec (Ed.), *Fauna ČR, Plazi – Reptilia*. Praha: Academia, 531 pp.

- Hails, E. (2017). The first record of a Slow-worm (*Anguis fragilis*) from the UK with blue ventral scales. *The Herpetological Bulletin* 140, 37.
- Haines, M. L., Moussalli, A., Stuart-fox, D., Clemann, N., Melville, J. (2014). Phylogenetic evidence of historic mitochondrial introgression and cryptic diversity in the genus *Pseudemoia* (Squamata: Scincidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 81: 86–95.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95–98.
- Han, D., Zhou, K., Bauer, A. M. (2004). Phylogenetic relationships among gekkotan lizards inferred from C-mos nuclear DNA sequences and a new classification of the Gekkota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 83(3): 353–368.
- Harris, D. J. (2003). Codon bias variation in C-mos between squamate families might distort phylogenetic inferences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27: 540–544.
- Harris, D. J., Marshall, J. C., Crandall, K. A. (2001). Squamate relationships based on C-mos nuclear DNA sequences: increased taxon sampling improves bootstrap support. *Amphibia-Reptilia*, 22: 235–242.
- Harris, D. J., Sinclair, E. A., Mercader, N. L., Marshall, J. C., Crandall, K. A. (1999). Squamate relationship based on C-mos nuclear DNA sequences. *Herpetological Journal*, 9: 147–151.
- Hedges, S. B., Vidal, N. (2009). Lizards, snakes, and amphisbaenians (Squamata). In S. B. Hedges & N. Vidal (Ed.), *The Time tree of life*. New York: Oxford University Press, 551 pp.
- Hewitt, G. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68(1–2): 87–112.
- 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. (2011). Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica*, 139(5): 617–638.
- Hillis, D. M. (1987). Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 1, 18: 23–42.
- Hu, Z. Z., Zhuang, L., Meng, J., Dufau, M. L. (1998). Transcriptional regulation of the generic promoter III of the rat prolactin receptor gene by C/EBP β and Sp1*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40): 26225–26235.

- Chomyn, A., Cleeter, M. W. J., Ragan, C. I., Riley, M., Doolittle, R. F., Attardi, G. (1986). URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science*, 614–618.
- Chomyn, A., Mariottini, P., Cleeter, M. W. J., Ragan, C. I., Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y., Doolittle, R. F., Attardi, G. (1985). Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature*, 314: 592–597.
- ICZN [International Commission on Zoological Nomenclature] (1999). International Code of Zoological Nomenclature. 4th edition. International Trust for Zoological Nomenclature, London, i-ixix + 306 pp.
- Ivanov, M. (2015). Vývoj společenstev plazů ve střední Evropě v průběhu kenozoika se zvláštním zřetelem k šupinatým (Squamata). 15 - 46 pp. In J. Moravec (Ed.), *Fauna ČR, Plazi – Reptilia*. Praha: Academia, 531 pp.
- Ja, D., Di, L. (1989). Expression of multiple forms of the prolactin receptor in mouse liver. *Molecular Endocrinology*, 3: 674–680.
- Jablonski, D., Džukić, G., Jandžik, D., Jelić, D., Ljubisavljević, K., Mikuliček, P., Moravec, J., Tzankov, N., Gvoždík, V. (2012). Diversity and distribution of Slow Worms (*Anguis* spp.) in the Balkans as inferred from mitochondrial DNA. *Herpetologické informace*, 11(1): 8–9.
- Jablonski, D., Jandžik, D., Mikuliček, P., Džukić, G., Ljubisavljević, K., Tzankov, N., Jelić, D., Thanou, E., Moravec, J., Gvoždík, V. (2016). Contrasting evolutionary histories of the legless lizards slow worms (*Anguis*) shaped by the topography of the Balkan Peninsula. *BMC Evolutionary Biology*, 16(99): 1–18.
- Jablonski, D., Meduna, P. (2010). Blue colour of the ventral body part of Eastern Slow Worm *Anguis colchica* (Nordmann, 1840). *Herpetology Notes*, 3: 295–296.
- Jablonski, D., Najbar, B., Grochowalska, R., Gvoždík, V., Strzała, T., Phylogeography and postglacial colonization of Central Europe by *Anguis fragilis* and *Anguis colchica*, *Amphibia-Reptilia*: v revizi.
- Joger, U., Fritz, U., Guicking, D., Kalyabina-hauf, S., Nagy, Z. T., Wink, M. (2007). Phylogeography of western Palaearctic reptiles – Spatial and temporal speciation patterns. *Zoologischer Anzeiger*, 246: 293–313.
- Kearney, M., Stuart, B. L. (2004). Repeated evolution of limblessness and digging heads in worm lizards revealed by DNA from old bones. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences*, 271: 1677–1683.
- Kindler, C., Böhme, W., Corti, C., Gvoždík, V., Jablonski, D., Jandžik, D., Metallinou, M., Široký, P., Fritz, U. (2013). Mitochondrial phylogeography, contact zones and taxonomy of grass snakes (*Natrix natrix*, *N. megaloccephala*). *Zoologica Scripta*, 42(5): 458–472.

- Klembara, J. (1979). Neue Funde der Gattungen *Ophisaurus* und *Anguis* (Squamata, Reptilia) aus dem Untermiozän Westböhmen (ČSSR). *Věstník Ústředního ústavu geologického* (Praha), 52(3): 163–169.
- Klembara, J. (2014). New finds of anguines (Squamata, Anguinae) from the Early Miocene of Northwest Bohemia (Czech Republic). *Palaontologische Zeitschrift*, (2005): 1–25.
- Klembara, J., Böhme, M., Rummel, M. (2010). Revision of the Anguine Lizard *Pseudopus laurillardi* (Squamata, Anguinae) from the Miocene of Europe, with Comments on Paleoecology. *Journal of Paleontology*, 84(2): 159–196.
- Kminiak, M. (1992). 1. druh *Anguis fragilis* LINNAEUS, 1758. pp. 101 - 106. In V. Baruš & O. Oliva (Ed.), *Plazi - Reptilia, Fauna ČSFR*. Praha: Academia, svazek 26., 222 pp.
- Koolman, J., Röhm, K. (2012). *Barevný atlas biochemie - Překlad 4. vydání*. Praha: Grada Publishing a.s., 498 pp.
- Lác, J. (1967). K systematike slepúcha lámavého (*Anguis fragilis* L.) a jeho rozšírenie na Slovensku. *Biológia*, 22: 908–922.
- Lawson, R., Slowinski, J. B., Crother, B. I., Burbrink, F. T. (2005). Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): New evidence from mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 581–601.
- Leaché, A. D., McGuire, J. A. (2006). Phylogenetic relationships of horned lizards (Phrynosoma) based on nuclear and mitochondrial data: Evidence for a misleading mitochondrial gene tree. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 628–644.
- Linnaeus, C. (1758). *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Vol. 1, 10th ed. Laurenti Salvii, Holmiae, 824 pp.
- Ljubisavljević, K., Arribas, O., Džukić, G., Carranza, S. (2007). Genetic and morphological differentiation of Mosor rock lizards, *Dinarolacerta mosorensis* (Kolombatović, 1886), with the description of a new species from the Prokletije Mountain Massif (Montenegro) (Squamata: Lacertidae). *Zootoca*, 1613: 1–22.
- Macey, J. R., Larson, A., Ananjeva, N. B., Fang, Z., Papenfuss, T. J. (1997). Two Novel Gene Orders and the Role of Light-Strand Replication in Rearrangement of the Vertebrate Mitochondrial Genome. *Molecular Biology and Evolution*, 14(1): 91–104.
- Macey, J. R., Schulte, J. A., Larson, A., Tuniyev, B. S., Orlov, N., Papenfuss, T. J. (1999). Molecular phylogenetics, tRNA evolution, and historical biogeography in anguine lizards and related taxonomic families. *Molecular phylogenetics and evolution*, 12(3): 250–272.
- Macholán, M., Munclinger, P., Sugerková, M., Dufková, P., Bímová, B., Božíková, E., Zima, J., Piálek, J. (2007). Genetic analysis of autosomal and X-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution*, 4: 746–771.

- Mayer, W., Grillitsch, H., Cabela, A. (1991). Proteinelektrophoretische Untersuchungen zur Systematik der südgriechischen Blindschleichen (Squamata: Anguinae: Anguis). *Herpetozoa*, 4(3/4): 157–165.
- Mayer, W., Richter, K., Kammel, W. (1990). Kartierung der Herpetofauna des Beckens von Feneos (Griechenland: Nord-Peloponnes). *Herpetozoa*, 2(3/4): 87–106.
- Measey, G. J., Tolley, K. A. (2013). A molecular phylogeny for sub-Saharan amphisbaenians. *African Journal of Herpetology*, 62(2): 100–108.
- Mertens, R., Müller, L. (1928). Liste der Amphibien und Reptilien Europas. Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft. Frankfurt am Main 41. 62 pp.
- Mertens, R., Wermuth, H. (1960). Die Amphibien und Reptilien Europas. Frankfurt am Main: W. Kramer, 264 pp.
- Mezzasalma, M., Guarino, F. M., Aprea, G., Petraccioli, A., Crottini, A., Odierna, G. (2013). Karyological evidence for diversification of Italian slow worm populations (Squamata, Anguinae). *Comparative Cytogenetics*, 7(3): 217–227.
- Monsen, K. J., Blouin, M. S. (2003). Genetic structure in a montane ranid frog: restricted gene flow and nuclear – mitochondrial discordance. *Molecular Ecology*, (12): 3275–3286.
- Moravec, J. (1997). *Anguis fragilis* LINNAEUS, 1758. pp 78 - 79. In P. Nečas, D. Modrý, & V. Zavadil (Ed.), *Czech recent and fossil amphibians and reptiles. An atlas and field guide*. Frankfurt am Main: Edition Chimaira, 94 pp.
- Moravec, J. (2015). Čeleď Anguinae - slepýšovité. 235 pp. In J. Moravec (Ed.), *Fauna ČR, Plazi – Reptilia*. Praha: Academia, 531 pp.
- Moravec, J., Gvoždík, V. (2015a). *Anguis colchica* (Nordmann, 1840) - slepýš východní. 262 - 275 pp. In J. Moravec (Ed.), *Fauna ČR, Plazi – Reptilia*. Praha: Academia, 531 pp.
- Moravec, J., Gvoždík, V. (2015b). Rod *Anguis* LINNAEUS, 1758 - slepýš. 263 pp. In J. Moravec (Ed.), *Fauna ČR, Plazi – Reptilia*. Praha: Academia, 531 pp.
- Nguyen, T. Q., Böhme, W., Nguyen, T. T., Le, Q. K., Pahl, K. R., Haus, T., Ziegler, T. (2011). Review of the genus *Dopasia* Gray, 1853 (Squamata: Anguinae) in the Indochina subregion. *Zootaxa*, (2894): 58–68.
- Page, R. D. M., Holmes, E. C. (1998). *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd., 352 pp.
- Pančičin, L., Jandžík, D., Klembara, J. (2002). Usporiadanie a morfológia osteodermálnych štítkov slepúcha lámavého (*Anguis fragilis*). 88-89 pp. In J. Bryja & J. Zúkal (Ed.), *Zoologické dny Brno, Abstrakta referátů z konference 14.-15. února 2002*. Brno: Ústav biologie obratlovců AV ČR, 191 pp.

- Pellegrino, K. C. M., Rodrigues, M. T., Harris, D. J., Yonenaga-Yassuda, Y., Sites, J. W. (2011). Molecular phylogeny, biogeography and insights into the origin of parthenogenesis in the Neotropical genus *Leposoma* (Squamata: Gymnophthalmidae): Ancient links between the Atlantic Forest and Amazonia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61: 446–459.
- Pellegrino, K. C. M., Rodrigues, M. T., Yonenaga-Yassuda, Y., Sites, J. W. J. (2001). A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family. *Biological Journal of the Linnean Society*, 74: 315–338.
- Petzold, H.-G. (1971). *Blindschleiche und Scheltopusik. Die Familie Anguidae*. Wittenberg Lutherstadt: Die Neue Brehm-Bücherei, Vol. 448. A.Ziensen Verlag, 102 pp.
- Platenberg, R. J., Griffiths, R. A. (1999). Translocation of slow-worms (*Anguis fragilis*) as a mitigation strategy: a case study from south-east England. *Biological Conservation*, 90(2): 125–132.
- Pyron, R. A., Burbrink, F. T., Wiens, J. J. (2013). A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology*, 13: 1–53.
- Ramos-Onsins, S. E., Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2092–2100.
- Roček, Z. (1984). Lizards (Reptilia: Sauria) from the Lower Miocene locality Dolnice (Bohemia, Czechoslovakia). *Rozpravy Československé akademie věd, řada matematických a přírodních věd*, 94(1): 1–69.
- Roček, Z. (2002). *Historie obratlovců: Evoluce, fylogeneze, systém*. Praha: Academia, 512 pp.
- Rogers, A. R., Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569.
- Rokas, A., Ladoukakis, E., Zouros, E. (2003). Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(8): 411–417.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J., Messeguer, X., Rozas, R. (2005). DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496–2497.
- Rozínek, K. Jr., Zavadil, V., Mikátová, B. (2001). Slepýš křehký - *Anguis fragilis* LINNAEUS, 1758. 82 - 101 pp. In B. Mikátová, M. Vlašín, & V. Zavadil (Ed.), *Atlas rozšíření plazů v České republice*. Brno, Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky, 257 pp.
- Saint, K. M., Austin, C. C., Donnellan, S., Hutchinson, M. N. (1998). C-mos, A Nuclear Marker Useful for Squamate Phylogenetic Analysis. *Molecular phylogenetics and evolution*, 10(2): 259–263.

- Shao, R., Nutu, M., Weijdegård, B., Egecioglu, E., Fernandez-Rodriguez, J., Tallet, E., Goffin, V., Ling, C., Billig, H. (2008). Differences in prolactin receptor (PRLR) in mouse and human fallopian tubes: Evidence for multiple regulatory mechanisms controlling PRLR isoform expression in mice. *Biology of reproduction*, 79: 748–757.
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A., Baltimore, D. (1989). The V(D)J Recombination Activating Gene, RAG-1. *Cell*, 59: 1035–1048.
- Schennink, A., Trott, J. F., Manjarin, R., Lemay, D. G., Freking, B. A., Hovey, R. C. (2014). Comparative genomics reveals tissue-specific regulation of prolactin receptor gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology*, 54(1): 1–15.
- Schmidt, F. W. (1789). Ueber die Böhmischen Schlangenarten. In *Abhandlungen der Böhmischen Gesellschaft der Wissenschaften in Prag*. Prag und Dresden, 81–106 pp.
- Schmitt, T. (2007). Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology*, 4(11): 1–13.
- Schmitt, T., Varga, Z. (2012). Extra-Mediterranean refugia: the rule and not the exception? *Frontiers in Zoology*, 9,: 22.
- Schneider, S., Excoffier, L. (1999). Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 3: 1079–1089.
- Slowinski, J. B., Lawson, R. (2002). Snake phylogeny: Evidence from nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24: 194–202.
- Sos, T. (2010). Evaluating the accuracy of morphological traits used in *Anguis* (sub)species differentiation. *Herpetologica Romanica*, 4: 29–44.
- Stephens, M., Scheet, P. (2005). Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. *American Journal of Human Genetics*, 76: 449–462.
- Stephens, M., Smith, N. J., Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, 68: 978–989.
- Strzała, T., Grochowalska, R., Najbar, B., Crottini, A., Kosowska, B., Jablonski, D. (2017a). Complete mitochondrial genome of the Italian slow-worm *Anguis veronensis* Pollini, 1818, and its comparison with mitogenomes of other *Anguis* species. *Mitochondrial DNA Part B*, 2(1): 71–72.
- Strzała, T., Grochowalska, R., Najbar, B., Mikulíček, P., Jandzík, D., Lymberakis, P., Jablonski, D. (2016). Complete mitochondrial genome of the endemic legless lizard *Anguis cephalonica* Werner, 1894 and its comparison with mitogenome of *Anguis fragilis* Linnaeus, 1758. *Mitochondrial DNA: Resources, Part B*, 1: 1–3.

- Strzała, T., Grochowalska, R., Najbar, B., Najbar, A., Jablonski, D. (2017b). Complete mitochondrial genome of the Eastern slow worm, *Anguis colchica* (Nordmann, 1840). *Mitochondrial DNA Part B*, 2(1): 67–68.
- Stugren, B., Fuhn, I. E., Popovici, N. (1962). Untersuchungen über die Systematik der Blindschleiche (*Anguis fragilis* L.) in Rumänien. *Zoologische Anzeiger*, 169(11–12): 460–463.
- Szabó, K., Vörös, J. (2014). Distribution and hybridization of *Anguis fragilis* and *A. colchica* in Hungary. *Amphibia-Reptilia*, 35: 135–140.
- Štěpánek, O. (1937). *Anguis fragilis peloponnesiacus* n. ssp. *Zoologischer Anzeiger*, 118: 107–110.
- Taanman, J. W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1410: 103–123.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3): 585–595.
- Tempfer, P. M. (2005). The Herpetofauna (Amphibia: Caudata, Anura; Reptilia: Scleroglossa) of the Upper Miocene Locality Kohfidisch (Burgenland, Austria). *Beiträge zur Paläontologie*, 29: 145–253.
- Thanou, E., Giokas, S., Kornilios, P. (2014). Phylogeography and genetic structure of the slow worms *Anguis cephalonica* and *Anguis graeca* (Squamata: Anguidae) from the southern Balkan Peninsula. *Amphibia-Reptilia*, 35: 263–269.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position - specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 4673–4680.
- Tolley, K. a, Townsend, T. M., Vences, M. (2013). Large-scale phylogeny of chameleons suggests African origins and Eocene diversification. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 280: 1–8.
- Townsend, T. M., Alegre, R. E., Kelley, S. T., Wiens, J. J., Reeder, T. W. (2008). Rapid development of multiple nuclear loci for phylogenetic analysis using genomic resources: An example from squamate reptiles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47: 129–142.
- Townsend, T. M., Larson, A., Louis, E., Macey, J. R. (2004). Molecular Phylogenetics of Squamata: The Position of Snakes, Amphisbaenians, and Dibamids, and the Root of the Squamate Tree. *Systematic Biology*, 53(5): 735–757.
- Tsaousis, A. D., Martin, D. P., Ladoukakis, E. D., Posada, D., Zouros, E. (2005). Widespread recombination in published animal mtDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22(4): 925–933.

- Turelli, M., Moyle, L. G. (2007). Asymmetric postmating isolation: Darwin's corollary to Haldane's Rule. *Genetics*, 176: 1059–1088.
- Ursenbacher, S., Carlsson, M., Helfer, V., Tegelström, H., Fumagalli, L. (2006). Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular ecology*, 15(11): 3425–37.
- Vences, M. (1993). Beobachtungen an einer isolierten Population der Blindschleiche *Anguis fragilis* (Reptilia: Anguidae) in Nordwestspanien. *Salamandra*, 29(3/4): 265–268.
- Vidal, N., Delmas, A. S., David, P., Cruaud, C., Couloux, A., Hedges, S. B. (2007). The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from seven nuclear protein-coding genes. *Comptes Rendus Biologies*, 330(2): 182–187.
- Vidal, N., Hedges, S. B. (2004). Molecular evidence for a terrestrial origin of snakes. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences*, (271): 226–229.
- Vidal, N., Hedges, S. B. (2005). The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *Comptes Rendus Biologies*, 328: 1000–1008.
- Vitt, L. J., Caldwell, J. P. (2014). *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles* (4th ed.). Academic Press, Elsevier, Amsterdam - Tokyo, i - xiv + 757 pp.
- Walter, M. (1997). Structural biology of cytokines, their receptors, and signaling complexes: implications for the immune and neuroendocrine circuit. *Chemical immunology*, 69: 76–98.
- Wermuth, H. (1950). Variationsstatistische Untersuchung der Rassen- und Geschlechtsmerkmale bei der Blindschleiche (*Anguis fragilis* Linné). *Deutsche Zoologische Zeitschrift*, 1: 81–121.
- Wiens, J. J., Hutter, C. R., Mulcahy, D. G., Noonan, B. P., Townsend, T. M., Sites, J. W., Reeder, T. W. (2012). Resolving the phylogeny of lizards and snakes (Squamata) with extensive sampling of genes and species. *Biology Letters Phylogeny*, 8: 1043–1046.
- Wolstenholme, D. R. (1992). Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Mitochondrial Genomes. International Review of Cytology*, 141: 173–216.
- Zylberberg, L., Castanet, J. (1985). New data on the structure and the growth of the osteoderms in the reptile *Anguis fragilis* L. (Anguidae, Squamata). *Journal of Morphology*, 186(3): 327–342.

8 PŘÍLOHY

Příloha 1. Genotypové zařazení jedinců *Anguis* spp. na základě analýzy fragmentů mitochondriálního genu ND2 a jaderných genů PRLR a RAG1, spolu s přehledem lokalit nálezů jednotlivých vzorků.

ČR – Česká republika, SR – Slovenská republika, * jedinci analyzováni v práci Gvoždík et al. (2010) na mitochondriální gen ND2, ** jedinci analyzováni v práci Gvoždík et al. (2010) na jaderný gen PRLR, haplotypy typické pro *A. fragilis* – červená, haplotypy typické pro *A. colchica* – zelená, kombinovaný genotyp – šedá.

ID Vzorku	Taxon	Stát	Lokalita	Koordináty		Haplotyp		
				N	E	ND2	RAG1	PRLR
A010	<i>Anguis fragilis</i>	ČR	Povrly	50,67	14,18	fl	A010Ra	Pf4n
A014		ČR	Stráž nad Ohří	50,34	13,06	fl	A010Ra	Pf3 / Pf4n
A034		SR	Rusovce	48,05	17,15	fl	A010Ra	Pfl
A046		ČR	Zhůří	49,08	13,57	fl	A010Ra	Pf3 / Pf4n
A060		ČR	Kokořínský Důl	50,43	14,58	fl	A010Ra	Pf3
A068		ČR	Mikulov	48,82	16,62	fl	A010Ra	Pfl / Pf4n
A071		ČR	Rosovice	49,79	14,09	A071N	A010Ra	Pfl / Pf3
A080*/**		ČR	Rantířov	49,41	15,52	fl	A010Ra	Pfl
A096		ČR	Strašice	49,70	13,81	fl	A010Ra	Pfl / Pf4n
A102		ČR	Vlašim	49,70	14,88	fl	A010Ra	Pfl / Pf4n
A123*/**		SR	Bratislava	48,15	17,07	fl	A010Ra	Pf3
A163		ČR	Uhřetěves	50,02	14,61	fl	A010Ra	Pfl / Pf3
A166		ČR	Popice	48,83	15,99	A166N	A010Ra	Pfl / Pf3
A176		ČR	Zlatá Koruna	48,85	14,37	fl	A010Ra	Pfl / Pf3
A189		ČR	Nedvězí	49,63	16,28	fl	A010Ra	Pfl
A196		SR	Devín	48,17	16,99	fl	A010Ra	Pfl
A215		ČR	Dolní Houžovec	49,97	16,47	fl	A010Ra / A215Rb	Pfl
A233		ČR	Božeňov	49,84	16,83	fl	A010Ra	Pfl
A304		ČR	Babice nad Svitavou	49,28	16,73	fl	A010Ra	Pfl
A308		ČR	Bukovina	49,29	16,81	fl	A010Ra	Pfl
A378	SR	Borský Mikuláš	48,52	17,18	fl	A010Ra	Pfl	
A403	ČR	Bušovice	49,78	13,53	fl	A010Ra	Pfl	
A457	ČR	Budislav	49,81	16,16	A457N	A010Ra	Pfl / Pf4n	
A488	SR	Rusovce	48,05	17,15	fl	A010Ra	Pfl	
A282	ČR	Seč	49,52	16,89	fl	A010Ra	-	
A326	ČR	Dačice - Touřín	49,08	15,42	fl	A010Ra	-	
A338	SR	Bratislava	48,16	17,06	fl	A010Ra	-	
A506	SR	Jakubovské rybníky	48,42	16,98	fl	A010Ra	-	
A508	ČR	Pouzďfany	48,92	16,62	fl	A010Ra	-	
A509	ČR	Pasohlávky	48,91	16,59	fl	A010Ra	-	
A008*/**	ČR	Stráž nad Ohří	50,33	13,10	fl	-	Pf3 / Pf4n	
A100*	ČR	Malá Skála	50,63	15,18	fl	-	Pfl / Pf3	
A190	ČR	Jeseník	50,23	17,20	fl	-	Pfl	
A209	ČR	PP Bobrava	49,10	16,59	fl	-	Pfl / Pf3	
A219	ČR	Železnice	50,49	15,37	fl	-	Pf3	
A236	SR	Male Karpaty	48,41	17,20	fl	-	Pf3	
A309	ČR	Racice-Pistovice	49,29	16,88	fl	-	Pfl / Pf3	
435	SR	Důbravka	48,19	17,02	fl	-	-	
436	SR	Devínská Kobyla	48,19	17,00	fl	-	-	
450	SR	Devínská Kobyla	48,19	17,00	fl	-	-	
547	SR	Lamač	48,19	17,06	fl	-	-	
728	SR	Devínská Kobyla	48,20	16,98	fl	-	-	
914	ČR	Dražovice	49,23	13,60	fl	-	-	
1054	ČR	Studenec	49,22	16,06	fl	-	-	
1107	ČR	Kdyně	49,39	13,04	fl	-	-	
1319	SR	Železná Studnička	48,19	17,08	fl	-	-	
1320	SR	Železná Studnička	48,19	17,08	fl	-	-	
1321	SR	Železná Studnička	48,19	17,08	fl	-	-	
1322	SR	Železná Studnička	48,19	17,08	fl	-	-	
1324	SR	Železná Studnička	48,19	17,08	fl	-	-	
1328	SR	Železná Studnička	48,21	17,09	fl	-	-	
1397	SR	Bratislava, Pečňovský Les	48,14	17,08	fl	-	-	
1420	SR	Bratislava, Pečňovský Les	48,14	17,08	fl	-	-	
1423	SR	Bratislava, Pečňovský Les	48,14	17,08	fl	-	-	
1710	ČR	Stráž nad Ohří	50,34	13,05	fl	-	-	
1718	ČR	Sušice	49,22	13,51	fl	-	-	

1722	SR	Kamzík	48,18	17,09	fl	-	-
2004	SR	Veľký Háj	47,86	17,54	fl	-	-
2576	SR	Vysoká pri Morave	48,33	16,91	fl	-	-
2584	SR	Devín	48,19	16,98	fl	-	-
2585	SR	Devín	48,18	16,98	fl	-	-
2586	SR	Devín	48,18	16,99	fl	-	-
2587	SR	Bratislava, Dúbravka	48,18	17,02	fl	-	-
2592	ČR	Na Plachtě, Hradec Králové	50,19	15,86	fl	-	-
2599	ČR	Semická hůra	50,16	14,86	fl	-	-
2604	SR	Vysoká pri Morave	48,33	16,91	fl	-	-
2858	SR	Bratislava, Karlova Ves	48,15	17,06	fl	-	-
2859	SR	Bratislava, Mlynská dolina	48,16	17,07	fl	-	-
2860	SR	Bratislava, Dúbravský les	48,18	17,03	fl	-	-
2861	SR	Bratislava, Mlynská dolina	48,16	17,07	fl	-	-
2862	SR	Šajdikove Humence	48,63	17,28	fl	-	-
2880	ČR	Devět Mlýnů	48,82	15,97	fl	-	-
2884	ČR	Rokytník	50,50	16,15	fl	-	-
2885	ČR	Sokolí vrch	50,78	14,27	fl	-	-
2888	ČR	Lovoš	50,54	14,01	fl	-	-
3026	SR	Bratislava, Dúbravka	48,19	17,04	fl	-	-
3072	ČR	Staré Město nad Metují	50,39	16,16	fl	-	-
3074	ČR	Staré Město nad Metují	50,39	16,16	fl	-	-
3076	ČR	Staré Město nad Metují	50,39	16,16	fl	-	-
3077	ČR	Staré Město nad Metují	50,39	16,16	fl	-	-
3198	SR	Bratislava, Dúbravka	48,17	17,05	fl	-	-
3338	ČR	Mikulčice	48,80	17,08	A157N	-	-
3339	ČR	Lanzhot	48,71	16,97	fl	-	-
3591	ČR	Lednice	48,77	16,80	fl	-	-
3592	ČR	Charvátská Nová Ves	48,78	16,86	fl	-	-
3593	ČR	Dukovany	49,10	16,13	fl	-	-
3594	ČR	Hnanice	48,81	15,98	fl	-	-
3595	ČR	Čížov	48,86	15,86	fl	-	-
3596	ČR	Rejvíz	50,24	17,28	fl	-	-
3628	SR	Bratislava, Petržalka	48,12	17,12	fl	-	-
3658	SR	Bratislava, Ž. Studienka	48,19	17,08	fl	-	-
3659	SR	Bratislava, Ž. Studienka	48,19	17,08	fl	-	-
3660	SR	Bratislava, Ž. Studienka	48,19	17,08	fl	-	-
3661	SR	Bratislava, Ž. Studienka	48,19	17,08	3661	-	-
3692	ČR	Horní Hrad	50,35	13,02	fl	-	-
3725	SR	Bratislava, Ž. Studienka	48,18	17,08	fl	-	-
3916	ČR	Doudleby	48,90	14,51	fl	-	-
3917	ČR	Valdštejn	50,01	16,47	fl	-	-
3922	SR	Rusovce	48,06	17,15	fl	-	-
3923	SR	Rusovce	48,06	17,15	fl	-	-
3926	SR	Bratislava, Karlova Ves	48,17	17,05	fl	-	-
4105	SR	Rusovce	48,06	17,15	fl	-	-
4125	SR	Bratislava , Karlova Ves	48,16	17,06	fl	-	-
4126	SR	Devín	48,18	16,98	fl	-	-
4127	SR	Devín	48,18	16,98	fl	-	-
4416	SR	Bratislava , Karlova Ves	48,15	17,06	fl	-	-
4482	SR	Bratislava, Karlova Ves	48,16	17,06	fl	-	-
4483	SR	Bratislava, Karlova Ves	48,16	17,06	fl	-	-
4486	ČR	Vráž u Písku	49,40	14,13	fl	-	-
4515	SR	Kopáč	48,07	17,15	fl	-	-
4543	SR	Bratislava, Ž. Studienka	48,18	17,07	fl	-	-
4544	SR	Bratislava, Ž. Studienka	48,19	17,08	fl	-	-
4546	SR	Kopáč	48,10	17,16	fl	-	-
4547	SR	Kopáč	48,09	17,16	fl	-	-
4549	SR	Kopáč	48,09	17,15	fl	-	-
4550	SR	Kopáč	48,11	17,16	fl	-	-
4551	SR	Kamzík	48,18	17,09	fl	-	-
4559	SR	Borinka	48,26	17,12	fl	-	-
4561	SR	Borinka	48,24	17,10	fl	-	-
4562	SR	Borinka	48,24	17,10	fl	-	-
4563	SR	Borinka	48,24	17,10	fl	-	-
A006	ČR	Koněprusy	49,90	14,09	fl	-	-
A007	ČR	Koněprusy	49,90	14,08	fl	-	-
A011	ČR	Povrly	50,67	14,17	fl	-	-
A013	ČR	Štěpánov	50,53	13,87	fl	-	-
A015	ČR	Komořany	49,98	14,42	A015N	-	-
A021	ČR	Tmaň	49,90	14,07	fl	-	-
A055	ČR	Lednice	48,80	16,80	Aba12	-	-
A058	ČR	Želízy	50,42	14,48	fl	-	-
A061	ČR	Harasov	50,42	14,58	fl	-	-
A062	ČR	Harasov	50,42	14,59	fl	-	-
A069	ČR	Divoká Šárka	49,78	14,32	fl	-	-
A081	ČR	Modřany	50,00	14,43	fl	-	-
A082	ČR	Podleřín	50,52	15,52	fl	-	-
A097	ČR	Strašice	49,70	13,80	fl	-	-
A101	ČR	Tuchoraz	50,03	14,83	A101N	-	-
A104	ČR	Placy	49,67	14,12	fl	-	-
A112	ČR	Janovice nad Úhlavou	49,35	13,22	fl	-	-
A113	ČR	Bořislav	50,58	13,95	fl	-	-
A114	ČR	Stadice	50,62	13,97	fl	-	-

A115		ČR	Čakovice	49,88	14,57	fl	-	-
A144		ČR	Podmokly	49,82	15,43	fl	-	-
A145		ČR	Hudlice	49,96	13,97	fl	-	-
A148		ČR	Dolní Břežany	49,96	14,45	fl	-	-
A152		ČR	Chříby	49,17	17,33	A152N	-	-
A161		ČR	Ještěd	50,73	14,98	fl	-	-
A162		ČR	Praha, Kunratický les	50,02	14,47	fl	-	-
A164		ČR	Praha, Michelský les	50,03	14,47	fl	-	-
A165		ČR	Praha, Újezd	50,00	14,54	fl	-	-
A167		ČR	Popice	48,83	15,98	fl	-	-
A168		ČR	Liběchov	50,41	14,44	fl	-	-
A169		ČR	Děvět mlýnů	48,81	15,97	fl	-	-
A170		ČR	Šlechtín u Zbraslavic	49,79	15,22	fl	-	-
A174		ČR	Malé Přílepy	50,01	14,13	A174N	-	-
A177		ČR	Bílinka	50,52	14,02	fl	-	-
A182		ČR	Branná	50,15	17,01	A182N	-	-
A183		ČR	Branná	50,15	17,00	A182N	-	-
A184		ČR	Vikantice	50,13	16,98	fl	-	-
A185		ČR	Vikantice	50,13	16,97	fl	-	-
A186		ČR	Vikantice	50,12	16,96	fl	-	-
A187		ČR	Vikantice	50,12	16,96	fl	-	-
A191		ČR	Řitka	49,90	14,28	A191N	-	-
A195		SR	Studienka	48,52	17,14	fl	-	-
A207		ČR	Zlaté Hory	50,22	17,39	fl	-	-
A214		ČR	Šumperk	49,98	16,98	fl	-	-
A218		ČR	Petrohrad	50,12	13,44	fl	-	-
A267		ČR	Pálava - Děvín	48,87	16,65	fl	-	-
A274		ČR	Nové Mlýny	49,73	17,01	fl	-	-
A277		ČR	Bělkovice	49,69	17,36	fl	-	-
A281		ČR	Seč	49,52	16,90	fl	-	-
A285		ČR	Niva	49,44	16,87	fl	-	-
A286		ČR	Niva	49,43	16,87	fl	-	-
A288		ČR	VÚ Březina	49,44	16,94	fl	-	-
A295		ČR	Petrov nad Desnou	50,00	17,03	fl	-	-
A299		ČR	Ondřejov	49,89	17,26	fl	-	-
A311		ČR	Racice-Pistovice	49,31	16,87	fl	-	-
A312		ČR	Podomí	49,35	16,82	fl	-	-
A317		ČR	Olšany	49,27	16,85	fl	-	-
A319		ČR	Šanov	50,05	16,76	fl	-	-
A320		ČR	Lichkov	50,10	16,64	A182N	-	-
A322		ČR	Ochoz	49,27	16,78	fl	-	-
A323		ČR	Olšany	49,25	16,82	fl	-	-
A324		ČR	Hostěnice	49,23	16,79	fl	-	-
A328		ČR	Bukovinka	49,28	16,80	Aba12	-	-
A329		ČR	Račice	49,28	16,84	A329N	-	-
A330		ČR	Olšany	49,25	16,82	fl	-	-
A331		ČR	Olšany	49,25	16,82	fl	-	-
A332		ČR	Olšany	49,25	16,82	fl	-	-
A333		ČR	Hoštěnice	49,24	16,81	fl	-	-
A336		ČR	Jozefův Důl	50,78	15,23	A336N	-	-
A337		ČR	Velké Hamry	50,72	15,32	A337N	-	-
A352		ČR	Hrachov	49,66	14,30	fl	-	-
A356		ČR	Mokřice	49,58	14,28	fl	-	-
A361		ČR	Přišimasy	50,05	14,76	fl	-	-
A366		ČR	Skála u Havlíčkova Brodu	49,55	15,43	fl	-	-
A393		SR	Gabčíkovský park	47,82	17,59	fl	-	-
A402		ČR	Obrok	50,56	14,45	fl	-	-
A412		ČR	Machov	50,50	16,27	fl	-	-
A414		ČR	Strážkovice	50,53	16,07	fl	-	-
A415		ČR	Běloves - Kašparák	50,43	16,19	fl	-	-
A417		ČR	Hlavňov	50,55	16,25	fl	-	-
A418		ČR	Bohdašín	50,59	16,20	fl	-	-
A429		ČR	Vidnava	50,37	17,19	fl	-	-
A431		ČR	Libický luh	50,13	15,14	fl	-	-
A459		ČR	Ochoz	49,60	16,92	fl	-	-
A464		ČR	Líšeň	49,21	16,70	A464N	-	-
A465		ČR	Přítluky	48,85	16,78	fl	-	-
A494		SR	Jurský Šúr	48,23	17,21	fl	-	-
A002	<i>Anguis colchica</i>	ČR	Karolinka	49,35	18,23	A002N	A002Ra	Pc1
A009		ČR	Štramberk	49,58	18,10	c3	A002Ra / A009Rb	Pc1
A016*/**		ČR	Štramberk	49,58	18,10	c3	A002Ra / A009Rb	Pc1
A019		ČR	Hukvaldy	49,63	18,23	c1	A002Ra	Pc1
A032*		ČR	Hostětín	49,05	17,88	c1	A002Ra	Pc1
A042		SR	Inovce	48,83	22,37	c1	A002Ra	Pc1
A099		ČR	Ostravice	49,52	18,38	c1	A002Ra / A037Rb	Pc1
A122		SR	pod Rozsutcom	49,23	19,12	c1	A002Ra	Pc1
A124*/**		SR	Rovné	48,92	18,95	c1	A002Ra / A037Rb	Pc1
A130		SR	Blatnická dolina	48,93	19,01	A130N	A002Ra / A037Rb	Pc1
A135		ČR	Oldřichovice	49,63	18,65	c1	A002Ra	Pc1
A138		ČR	Spálené	50,15	17,45	c1	A002Ra	Pc1
A151		ČR	Komínky	49,18	17,37	c1	A002Ra	Pc1
A181		ČR	Hrabůvka	49,57	17,67	c1	A002Ra	Pc1
A199		SR	Kosorín	48,64	18,80	c1	A002Ra / A037Rb	Pc1
A200		SR	Hronský Beňadik	48,34	18,55	c1	A002Ra	Pc1

A208	ČR	Otice	49,91	17,86	A208N	A002Ra / A037Rb	Pe1
A210	ČR	Ostrava	49,81	18,19	c1	A002Ra	Pe1
A211	ČR	Hlubočec	49,83	17,98	c1	A002Ra	Pe1
A226	ČR	Emauzy	49,62	17,82	c1	A002Ra	Pe1
A229	ČR	Mankovice	49,64	17,87	c1	A002Ra	Pe1
A234	SR	Vrbovec	48,82	17,45	A234N	A002Ra	Pe1
A235	SR	Štiavnické Vrchy	48,40	18,75	c1	A002Ra	Pe1
A257	ČR	Hynčice	49,63	17,83	A204N	A002Ra	Pe1
A263	ČR	Štramberk	49,58	18,10	c3	A002Ra	Pe1
A291	SR	Kamenica nad Hronom	47,83	18,73	c1	A002Ra / A037Rb	Pe1
A292	SR	Ipeľské Predmostie	48,08	19,07	c1	A002Ra / A037Rb	Pe1
A293	SR	Kleňany	48,12	19,07	c1	A002Ra	Pe1
A315	ČR	Budišovice	49,87	18,03	c1	A002Ra / A037Rb	Pe1
A341	SR	Kosorin	48,66	18,81	c1	A002Ra	Pe1
A343	SR	Turzovka	49,40	18,61	c1	A002Ra / A037Rb	Pe1
A367	ČR	Hostýnské vrchy	49,38	17,71	c1	A002Ra	Pe1
A368	ČR	Hostýnské vrchy	49,38	17,70	c1	A002Ra	Pe1
A369	ČR	Hostýnské vrchy	49,38	17,70	c1	A002Ra	Pe1
A370	ČR	Hostýnské vrchy	49,37	17,70	c1	A002Ra	Pe1
A371	ČR	Hostýnské vrchy	49,37	17,70	c1	A002Ra / A037Rb	Pe1
A376	SR	Kamenica nad Hronom	47,83	18,70	A376N	A002Ra / A037Rb	Pe1
A381	SR	Stará Turá	48,85	17,68	c1	A002Ra / A037Rb	Pe1
A384	ČR	Bílá	49,44	18,45	A002N	A002Ra / A037Rb	Pe1
A385	ČR	Ostravice	49,54	18,40	c1	A002Ra / A037Rb	Pe1
A386	ČR	Čeladná	49,55	18,34	c1	A002Ra	Pe1
A396	ČR	Hukvaldy	49,63	18,23	c1	A002Ra	Pe1
A405	ČR	Bystřička	49,42	17,95	c1	A002Ra	Pe1
A408	ČR	Makýta	49,27	18,17	A002N	A002Ra / A037Rb	Pe1
A409	ČR	Vendryně	49,67	18,75	A136N	A002Ra	Pe1
A419	ČR	Grůň pod Velkou Javořinou	48,90	17,79	c1	A002Ra	Pe1
A482	ČR	Chomýž	50,10	17,66	c1	A002Ra	Pe1
A225	ČR	Partutovice	49,65	17,71	c1	A002Ra	-
A228	ČR	Mankovice	49,64	17,85	c1	A002Ra / A037Rb	-
A479	ČR	Chomýž	50,11	17,66	c1	A002Ra	-
A041*/**	SR	Chlmecká skalka	48,88	21,93	c1	-	Pe1
A132	SR	Svetlice	49,17	22,03	A131N	-	Pe1
A134	SR	Rokytov pri Humennom	49,12	21,98	A131N	-	Pe1
A180	ČR	Hrabůvka	49,57	17,68	c1	-	Pe1
A256	ČR	Volárna	49,88	17,47	A360N	-	Pe1
A266	ČR	Štramberk	49,58	18,10	c3	-	Pe1
444	SR	NP Pieniny	49,41	20,47	c1	-	-
445	SR	NP Pieniny	49,39	20,43	c1	-	-
553	SR	Kvetnica	49,02	20,28	c1	-	-
1980	SR	Trenčianské Teplice	48,90	18,17	c1	-	-
2059	ČR	Halenkov	49,32	18,14	c1	-	-
3113	SR	Úhorná	48,71	20,66	c1	-	-
3670	SR	Maslovenka	49,47	18,64	c1	-	-
4104	SR	Vlkolínec	49,04	19,27	c1	-	-
A036*	SR	Šuňava	49,03	20,08	c1	-	-
A039	SR	Žiar	49,13	19,69	A037N	-	-
A040	SR	Žiar	49,12	19,67	A037N	-	-
A098	ČR	Javorový vrch	49,60	18,63	c1	-	-
A119	SR	Štefanová	49,23	19,07	c1	-	-
A120	SR	dolína Bystrička	49,21	19,12	c1	-	-
A121	SR	pod Rozsutcom	49,23	19,11	c1	-	-
A126	SR	Lutiše	49,26	18,95	c1	-	-
A127	SR	Lysica	49,25	18,93	c1	-	-
A128	SR	Belá	49,24	18,96	c1	-	-
A129	SR	Belá	49,24	18,95	c4	-	-
A131	SR	Svetlice	49,17	22,04	A131N	-	-
A133	SR	Svetlice	49,17	22,02	A133N	-	-
A136	ČR	Trinec	49,68	18,70	A136N	-	-
A142	SR	Tisovec	48,70	19,95	A142N	-	-
A143	SR	Tisovec	48,70	19,94	c1	-	-
A150	ČR	Žlutava	49,20	17,44	c1	-	-
A212	ČR	Hlubočec	49,83	17,99	c1	-	-
A227	ČR	Mankovice	49,64	17,87	A204N	-	-
A250	ČR	Karlova Studánka	50,06	17,34	c1	-	-
A251	ČR	Karlova Studánka	50,07	17,36	c1	-	-
A252	ČR	Světlá Hora	50,04	17,38	c1	-	-
A253	ČR	Nové Valteřice	49,86	17,47	A360N	-	-
A254	ČR	Nové Valteřice	49,85	17,47	A360N	-	-
A255	ČR	Dědřichov nad Bystřicí	49,85	17,38	A255N	-	-
A264	ČR	Štramberk	49,58	18,10	c1	-	-
A265	ČR	Štramberk	49,58	18,10	c1	-	-
A300	ČR	Litultovice	49,88	17,73	A208N	-	-
A345	ČR	Štramberk	49,59	18,12	c1	-	-
A347	ČR	Štramberk	49,59	18,12	c3	-	-
A395	ČR	Hukvaldy	49,62	18,22	c1	-	-
A397	ČR	Hukvaldy	49,62	18,22	c1	-	-
A398	ČR	Kunčice pod Ondřejníkem	49,55	18,29	c1	-	-
A406	ČR	Velké Karlovice	49,38	18,32	A002N	-	-
A407	ČR	Velké Karlovice	49,38	18,31	A002N	-	-
A420	ČR	Vyškovec	48,94	17,85	c1	-	-

A421		ČR	Grůň pod Velkou Javořinou	48,89	17,75	c1	-	-
A422		ČR	Kurovice	49,27	17,52	c1	-	-
A423		ČR	Uherský brod	49,02	17,67	c1	-	-
A424		ČR	Slušovice	49,25	17,80	c1	-	-
A471		ČR	Ostravice	49,54	18,40	c1	-	-
A472		ČR	Ostravice	49,54	18,40	c1	-	-
A473		ČR	Ostravice	49,54	18,40	c1	-	-
A476		ČR	Krasov	50,09	17,55	c1	-	-
A477		ČR	Praděd	50,08	17,23	A208N	-	-
A478		ČR	Cvilín	50,08	17,73	c1	-	-
A481		ČR	Krnov	50,07	17,74	c1	-	-
A416	Hybrid <i>fragilis - colchica - veronensis</i>	ČR	Studnice u Jívky	50,42	16,09	A416N	A010Ra	Pc1 / Pv1
A033	Hybrid	SR	Ošadnica	49,43	18,88	c4	A002Ra	Pv1
A037	<i>colchica - veronensis</i>	SR	Žiar	49,13	19,68	A037N	A002Ra / A037Rb	Pc1 / Pv1
A038		SR	Žiar	49,13	19,67	A037N	A002Ra / A037Rb	Pc1 / Pv1
A125		SR	Lutiše	49,26	18,96	c1	A002Ra	Pc1 / Pv1
A387		ČR	Kunčice pod Ondřejníkem	49,54	18,29	c1	A002Ra	Pc1 / Pv1
A301		ČR	Litultovice	49,88	17,74	c1	-	Pc1 / Pv1
A047*	Hybrid	ČR	Nové Údolí	48,83	13,80	fl	A010Ra	Pc1 / Pf3
A056	<i>fragilis - colchica</i>	ČR	Nejdek	48,82	16,78	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A057*		ČR	Nejdek	48,82	16,77	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A072		ČR	Rosovice	49,78	14,08	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A175		ČR	Petřikov	50,19	17,05	3709	A010Ra	Pc1 / Pf3
A179		ČR	Svitavy	49,74	16,50	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A193		SR	Veľký Draždiak	48,10	17,11	fl	A010Ra	Pc1 / Pf3
A201		SR	Malacky	48,45	17,07	A201N	A010Ra	Pc1 / Pf1
A203		SR	Jakubovské rybníky	48,41	16,95	fl	A010Ra	Pc1 / Pf3
A217		ČR	Dolní Vltavice	48,69	14,08	A217N	A010Ra	Pc1 / Pf4n
A231		ČR	Vápená	50,29	17,11	fl	A010Ra	Pc1 / Pf4n
A232		ČR	Čenkovice	50,01	16,70	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A245		ČR	Červená voda	50,05	16,72	fl	A010Ra	Pc1 / Pf3
A272		ČR	Budětsko	49,59	16,92	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A278		ČR	Jeseník	50,24	17,23	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A279		ČR	Hřebeč	49,77	16,60	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A296		ČR	Skřítek	49,99	17,15	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A302		ČR	Březina	49,28	16,74	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A303		ČR	Babice nad Svitavou	49,28	16,69	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A306		ČR	Bukovinka	49,29	16,81	A306N	A010Ra	Pc1 / Pf1
A310		ČR	Racice-Pistovice	49,30	16,87	fl	A010Ra	Pc1 / Pf3
A314		ČR	Jedovnice	49,33	16,74	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A316		ČR	Olšany	49,26	16,84	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A321		ČR	Mladkov	50,10	16,63	fl	A010Ra	Pc1 / Pf3
A325		ČR	Lednice	48,80	16,81	fl	A010Ra	Pc1 / Pf4n
A334		ČR	Ochoz	49,25	16,74	fl	A010Ra	Pc1 / Pf4n
A373		SR	Malacky	48,49	17,10	fl	A010Ra	Pc1 / Pf3
A377		SR	Zohor	48,33	16,98	fl	A010Ra	Pc1 / Pf4n
A382		SR	Pezinská Baba	48,35	17,19	fl	A010Ra / A382Rb	Pc1 / Pf3
A392		SR	Gabčíkovský park	47,85	17,61	fl	A010Ra	Pc1 / Pf4n
A411		ČR	Jinošov	49,23	16,19	fl	A010Ra	Pc1 / Pf4n
A413		ČR	Hlavňov	50,56	16,26	fl	A010Ra	Pc1 / Pf3
A444		ČR	Jičtín pod Jedlovou	50,86	14,57	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A475		ČR	Potočná	49,04	15,10	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A501		SR	Kopáč	48,10	17,16	fl	A010Ra	Pc1 / Pf1
A271		ČR	Olbramice	49,61	17,01	A271N	A010Ra	Pc1
A188		ČR	Hanušovice	50,09	16,94	fl	A002Ra / A010Ra	Pf1
A202		SR	Limbach	48,29	17,22	A202N	A002Ra / A010Ra	Pf1
A374		SR	Láb	48,37	16,98	fl	A002Ra / A010Ra	Pf1
A489		SR	Svätý Jur	48,26	17,15	fl	A002Ra / A010Ra	Pf1
A157		ČR	Týnec	48,78	17,01	A157N	A002Ra / A010Ra	Pc1
A083		ČR	Heřmanovice	50,20	17,40	fl	A002Ra / A010Ra	Pc1 / Pf1
A269		ČR	Kadeřín - Bouzov	49,67	16,88	fl	A002Ra / A010Ra	Pc1 / Pf1
A287		ČR	VÚ Březina	49,43	16,92	fl	A002Ra / A010Ra	Pc1 / Pf1
A342		SR	Bratislava	48,15	17,07	fl	A002Ra / A010Ra	Pc1 / Pf3
A461		ČR	Olšany	49,25	16,87	fl	A002Ra / A010Ra	-
A213		ČR	Vražné	49,62	17,86	fl	A002Ra / A037Rb	Pc1 / Pf1
A003		ČR	Ondřejovice	50,25	17,35	fl	A002Ra	Pc1 / Pf1
A327		ČR	Vracov	48,98	17,20	A327N	-	Pc1
A197		SR	Železná Studienka	48,22	17,10	fl	-	Pc1 / Pf4n
A273		ČR	Ochoz	49,60	16,93	fl	-	Pc1 / Pf3
A283		ČR	Protivanov	49,47	16,84	fl	-	Pc1 / Pf3
A305		ČR	Bukovina	49,30	16,78	fl	-	Pc1 / Pf3
A340		SR	Pezinská Baba	48,35	17,19	fl	-	Pc1 / Pf3
A372		ČR	Bukovinka	49,29	16,82	fl	-	Pc1 / Pf1
A375		SR	Sološnica	48,45	17,25	fl	-	Pc1 / Pf1
A204		ČR	Budišovice	49,86	18,03	A204N	A002Ra / A010Ra	Pc1
A360		ČR	Bruntál	49,97	17,47	A360N	A002Ra / A010Ra	-
A012	Hybrid	ČR	Bludov	49,95	16,93	fl	A010Ra	Pc1
A172	<i>fragilis - colchica</i>	ČR	Lanžhot	48,72	16,96	fl	A010Ra	Pc1
A221	fl - Pc1	ČR	Libina	49,89	17,09	fl	A010Ra	Pc1
A230		ČR	Vápená	50,29	17,11	fl	A010Ra	Pc1
A275		ČR	Nový Dvůr	49,73	17,05	fl	A010Ra	Pc1

A276	ČR	Jeseník	50,22	17,24	fl	A010Ra	Pc1
A289	ČR	VÚ Březina	49,46	16,97	fl	A010Ra	Pc1
A294	ČR	Loučná nad Desnou	50,05	17,08	fl	A010Ra	Pc1
A307	ČR	Bukovinka	49,29	16,81	fl	A010Ra	Pc1
A318	ČR	Bukovinka	49,28	16,83	fl	A010Ra	Pc1
A350	ČR	Milovice	48,85	16,70	fl	A010Ra	Pc1
A492	SR	Vrakuňa	48,16	17,22	fl	A010Ra	Pc1
A493	SR	Karlova Ves	48,15	17,07	fl	A010Ra	Pc1
A510	ČR	Pasohlávky	48,91	16,59	fl	A010Ra	Pc1
A159	ČR	Brdo	49,17	17,31	fl	A002Ra	Pc1
A224	ČR	Olšovec	49,60	17,71	fl	A002Ra / A037Rb	Pc1
A351	ČR	Heřmanovice	50,21	17,41	fl	A002Ra / A037Rb	Pc1
A297	ČR	Skřítek	49,98	17,19	fl	A002Ra / A010Ra	Pc1
A313	ČR	Jedovnice	49,35	16,76	fl	A002Ra / A010Ra	Pc1
A379	SR	Plavecký Peter	48,54	17,34	fl	A002Ra / A010Ra	Pc1
A035	SR	Borinka	48,27	17,08	fl	-	Pc1
A198	SR	Vrakuňa	48,16	17,22	fl	-	Pc1
A222	ČR	Bedřichov	49,92	17,15	fl	-	Pc1