

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2007

MARTIN KRAJÍČEK

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

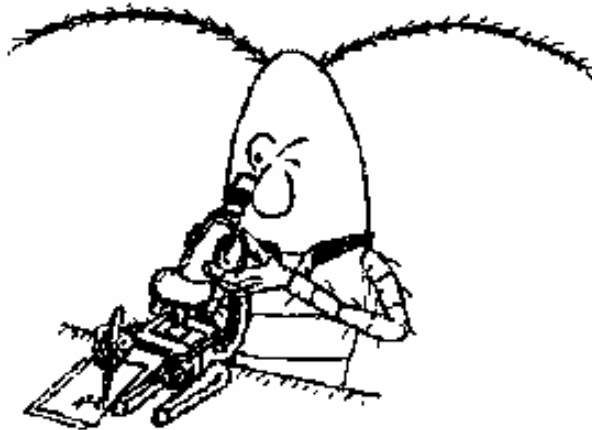
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA EKOLOGIE

MARTIN KRAJÍČEK

GENETICKÁ VARIABILITA

STŘEDOEVROPSKÝCH BUCHANEK R. *CYCLOPS*



DIPLOMOVÁ PRÁCE

ŠKOLITEL: RNDR. MARTIN ČERNÝ, PHD.

ŠKOLITEL SPECIALISTA: PROF. RNDR. ZDENĚK BRANDL, CSC.

PRAHA, ZÁŘÍ 2007

PROHLAŠUJI,

ŽE PRÁCE BYLA VYPRACOVÁNA SAMOSTATNĚ, POUZE S POUŽITÍM UVEDENÉ LITERATURY
A JINÝCH CITOVANÝCH PRAMENŮ. SVOLUJI K JEJÍMU ZAPŮJČENÍ S TÍM, ŽE VEŠKERÉ INFORMACE
BUDOU ŘÁDNĚ CITOVÁNY.

V PRAZE DNE 4. ZÁŘÍ 2007

MARTIN KRAJÍČEK

PODĚKOVÁNÍ

VŠEM, KTEŘÍ JAKKOLIV PŘISPĚLI KE VZNIKU TÉTO PRÁCE

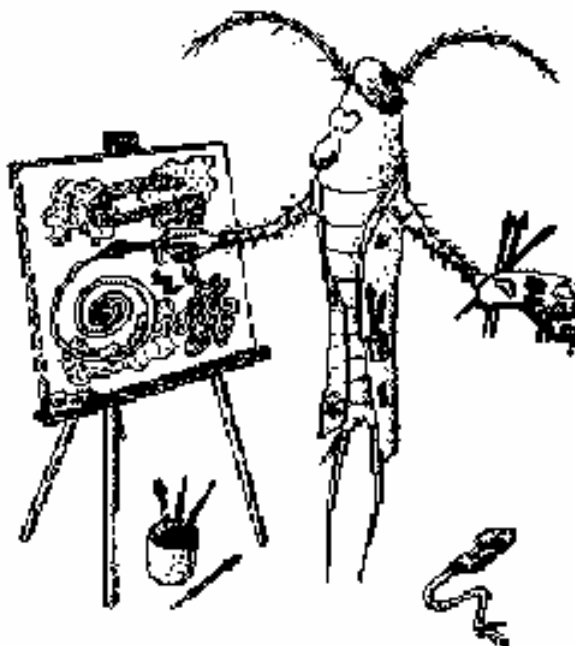
Rád bych velmi poděkoval RNDr. Janu Fottovi, CSc. za zasvěcení do tajů morfologie a ekologie buchanek, za cenné konzultace, poskytnuté vzorky a pomoc při jejich určování. Zvláště mu děkuji za jeho úžasné badatelské nadšení, které na mě vždy přenášel.

Chtěl bych také poděkovat svému školiteli, RNDr. Martinu Černému, PhD., za vedení mé diplomové práce a za podporu při odběrech vzorků. Profesoru RNDr. Zdeňku Brandlovi, CSc. bych chtěl poděkovat za milé konzultace v Budějovicích. RNDr. Veronice Sacherové, PhD. a RNDr. Adamu Petruskovi děkuji za cenné rady k analýze DNA.

Speciální poděkování si zaslouží Jana Slouková. S ní jsem nejčastěji probíral své výsledky, četné metodické problémy i úspěchy při badání a sepisování práce.

Za pomoc a příjemnou společnost při odběrech vzorků patří mé díky Martinu Lundákovi, doc. RNDr. Evženu Stuchlíkovi, CSc., Mgr. Jolaně Tátošové, RNDr. Jakubu Horeckému, PhD. a Mgr. Davidu Hardekopf. Za poskytnutí vzorků děkuji i Mgr. Silvii Markové, PhD. a Janě Bartovičové.

Na závěr bych chtěl poděkovat svým rodičům, kteří mě podporovali během celého studia a měli pro mě vždy pochopení.



OBSAH

1. LITERÁRNÍ ÚVOD	1
1.1. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA	1
1.2. STRUČNÁ HISTORIE	3
1.3. MORFOLOGIE	5
1.4. GENETICKÉ METODY	13
1.5. EKOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA	15
2. CÍLE PRÁCE	18
3. METODY	19
3.1. ODBĚR A UCHOVÁNÍ VZORKŮ	19
3.2. MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA	19
3.3. ANALÝZA DNA	20
4. VÝSLEDKY	22
4.1. ODEBRANÉ VZORKY	22
4.2. MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA	22
4.3. ANALÝZA DNA	22
5. DISKUZE	28
5.1. STUDOVANÉ LOKALITY A DRUHY	28
5.2. MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA	28
5.3. ANALÝZA DNA	28
6. ZÁVĚR	34
7. POUŽITÁ LITERATURA	35
PŘÍLOHY	40

ABSTRACT

I studied the genetic diversity of central European *Cyclops* (Crustacea, Copepoda) species. The present thesis deals with all species of the genus *Cyclops* known from the Czech Republic (*C. strenuus*, *C. vicinus*, *C. abyssorum*, *C. insignis*, *C. singularis* and *C. furcifer*); the occurrence of *C. singularis* and *C. heberti* there is recorded herein for the first time. Other two species under study are *C. ochridanus*, an endemic species from the Ohrid lake, and an apparently new species of the genus *Cyclops* from the Retezat Mts. in Romania. Populations of *Cyclops abyssorum* from Romania, Slovakia and Switzerland were studied as well.

The amplification of a part of the COI mitochondrial gene, using the universal arthropod primer (Folmer et al. 1994) or primers derived from it, was successful only in less than half of the populations under study. In contrast, amplification of a part of the 12S srRNA gene, using the primer of Machida et al. (2002), worked very well in all the populations.

Cyclops abyssorum, a morphologically and ecologically variable species, showed very low between-population sequence polymorphism. The ecotypes “praealpinus“, “divulsus“ and “tatricus“ seem to lack a species or subspecies status. They are likely to be, as Einsle (1980) supposed, morphological variations only. Populations of *C. strenuus*, another widespread species, were also genetically uniform.

The ecological valence of *C. singularis*, described from temporary ponds in southern Germany, is broader than expected; the species may occur in permanent water bodies (e.g., the hypolimnion of the deep Slapy reservoir and shallow permanent ponds).

Due to its low evolutionary rate, the 12S srRNA gene seems to be unsuitable for phylogeographic studies.

1. LITERÁRNÍ ÚVOD

Buchanky rodu *Cyclops* patří mezi sladkovodní korýše. Vyskytují se běžně v různých typech vod – od malých kaluží a tůní, přes rybníky a jezera, až po údolní nádrže. V určitých částech roku se stávají hlavní složkou zooplanktonu (Šrámek 1940; Fryer 1998). Tvoří tak důležitý článek potravního řetězce. Živí se jak řasovou potravou, tak i menším zooplanktonem (Brandl 1998) a samy se stávají kořistí ryb (Mayer 1998).

První druh buchanky z rodu *Cyclops* byl popsán na začátku druhé poloviny 19. století. Hlavním a jediným kritériem byl zpočátku popis morfologie. Později byly další druhy charakterizovány na základě pokusů s křížením a pomocí detailních morfometrických analýz. Byly používány metody cytologické (popis diminuace chromatinu) a molekulárněbiologické (elektroforéza alozymů). Tím se počet „druhů“ postupně rozrůstal a narůstaly i spory mezi jednotlivými autory. Výsledkem je v současné době ne zcela vyjasněná taxonomie rodu *Cyclops*.

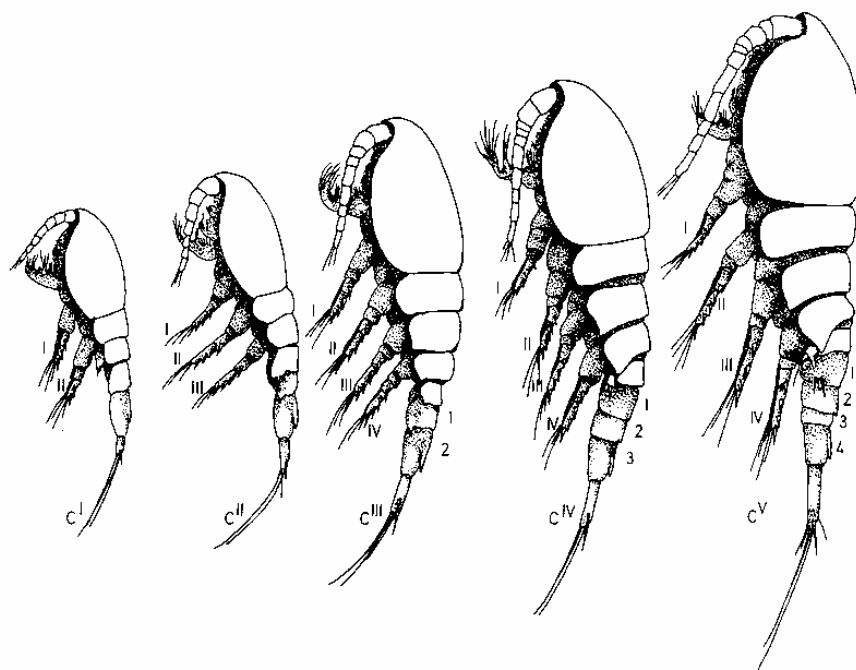
Ve této kapitole bych chtěl podat souhrn dosavadního vývoje taxonomie středoevropských druhů z rodu *Cyclops*. Nejvíce prostoru věnuji znakům morfologickým, protože tvoří základ popisu jednotlivých druhů a jejich zjištění je pravděpodobně nejrychlejší. Dále zmíním výsledky morfometrických analýz, ekologických pozorování a cytologických studií. Na závěr nastíním možnost taxonomického využití sekvencí DNA. Tato metoda byla zatím úspěšně použita u mořských vznášivek (Bucklin a kol. 1999), ale u buchaneč rodu *Cyclops* zatím nebyly žádné takovéto výzkumy publikovány.

1.1. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA

Buchanky rodu *Cyclops* můžeme systematicky zařadit do podtřídy klanonožci (Copepoda), řádu buchanky (Cyclopoida) a čeledi Cyclopidae.

Vývoj buchaneč je nepřímý a probíhá přes dva typy larev. Z oplozeného vajíčka se líhne první naupliové stádium. Je nečlánkované, oválného tvaru a má pouze tři páry končetin (antenuy, anteny a mandibuly). Následuje dalších pět naupliových stádií. Při každém svlékání se nauplius protahuje do délky a přibývají pupeny dalších párů končetin, které nakonec u dospělých jedinců tvoří příústní končetiny (maxilluly, maxilly, a maxillipedy).

Po šesti naupliových stádiích přichází pět stádií kopepoditových. Ta jsou již tvarem těla podobná dospělciům, jen nemají vyvinuty všechny tělní články a plovací končetiny. Jednotlivá stádia se dají rozeznat podle počtu plovacích nožek a počtu zadečkových článků (viz obr. I.1).



Obr. I.1: Pět kopepoditových stádií (C^I až C^V) u rodu *Cyclops* (převzato z Einsle 1989)

Poslední kopepodit se mění v dospělé (již s plným počtem všech článků). Díky sexuálnímu dimorfismu se mírně liší stavba těla dospělé samice a samce.

Při kopulaci si sameček antenulami přidržuje samičku za čtvrtý pár plovacích nožek (Šrámek 1953) a nalepuje svá chárová pouzdra (spermatofory) na její pohlavní otvor. Sperma se přelévá do chárové schránky (receptaculum seminis), odkud ho může samička čerpat na oplození svých vajíček i po delší dobu. Oplozená vajíčka jsou shromažďována ve dvou vaječných váčcích (ovisacích) po stranách zadečku.

Ve vodě se buchanky pohybují pomocí čtyř párů plovacích nožek, které fungují jako vesla (každá z nožek je navíc dvojklaná a vyzbrojena řadou brv a trnů). Pohyb je charakteristický velmi rychlými skoky způsobenými intenzivním a krátkým úderem plovacích nožek. Naopak rychlým sklopením zadečku směrem pod tělo může buchanka bleskově uskočit dozadu. Tato extrémní adaptace buchanky na rychlý pohyb by mohla být důvodem velmi podobného vzhledu nejen jednotlivých druhů, ale i vyšších taxonomických kategorií (Kerfoot a kol. 1980).

Jako potravu buchanky využívají řasy, prvoky a ostatní zooplankton. Velké druhy mohou při hojném výskytu neustálým okusováním způsobit i úhyn larev ryb. Řasová složka potravy je důležitá nejen pro larvální stádia buchanky, ale i pro dospělé jedince (Brandl 1998). Ze zooplanktonu dávají přednost menší a měkčí kořisti. U buchanky *Cyclops abyssorum* je znám i kanibalismus, kdy jsou nauplia požírána kopepodity a dospělci stejného druhu (Van den Bosch a Santer 1993). Tento jev je běžný také u ostatních druhů buchanky (Brandl a Pražáková 2002).

K orientaci v prostředí slouží buchankám jejich smyslové orgány. Zrak, kterým by dokázaly rozeznávat tvary a barvu předmětů, buchanky nemají. Je přítomno jen jednoduché nepárové naupliové oko, které registruje intenzitu světla. Nejlépe jsou vyvinuty mechanoreceptory a chemoreceptory ve formě smyslových tyčinek a brv umístěných převážně na antenulách. Menší smyslové brvy jsou v počtu několika desítek na povrchu těla a mapy těchto brv se dají využít i pro taxonomii (Alekseev a kol. 2006)

Buchanky můžeme nalézt ve většině vodních biotopů (Dussart a Defaye 2001). Sladkovodní buchanky najdeme v malých kalužích, rybnících, jezerech i vodních nádržích od nížin až po vysokohorské polohy. Obývají čistá oligotrofní jezera, mezotrofní a eutrofní biotopy i hypertrofní rybníky, rašelinné a silně znečištěné vody. Žijí ve vodách stálých i astatických.

Aby mohly buchanky dlouhodobě obývat tak rozmanitá prostředí, vyvinuly se u nich různé strategie, jak přečkat nepříznivá období (Santer 1998). V rámci rodu *Cyclops* jsou rozdíly v tom, kdy jednotlivé druhy vstupují do klidového stádia (diapauzy). Nejčastěji diapauza probíhá tak, že se buchanka v kopepoditovém stádiu přesune do bahnitého sedimentu na dně jezera. Přejít do diapauzy probíhá následovně (Elgmork 1967, Santer 1998): kopepodit kolem těla vyloučí soudečkovitý obal chránící metasom; vyčnívající urosom ukryje podvinutím pod metasom. Po „probuzení“ (kyslík x teplota) vypluje ode dna s tímto obalem kolem metasomu (vyčnívají antenuly i urosom) a pluje s ním po několik dní volně, než se ho zbaví.

Například *Cyclops scutifer* z oligotrofního jezera s vysokým predáčním tlakem ryb v jižním Norsku vstupoval do diapauzy na podzim a přetrval v ní až do začátku jara (Elgmork 1978). V jiném pozorování (Santer a Lampert 1995) *Cyclops vicinus* diapauzoval v eutrofním jezeře v létě. U druhu *Cyclops abyssorum* byla diapauza pozorována v oligotrofním jezeře na podzim a v zimě (Nilssen a Elgmork 1977), ale v eutrofním jezeře v létě (Santer a Lampert 1995). Jsou to adaptace na překonání těžkých období, kdy je ve vodě nedostatek kyslíku, málo potravy nebo velký predáční tlak ze strany ryb.

1.2. STRUČNÁ HISTORIE

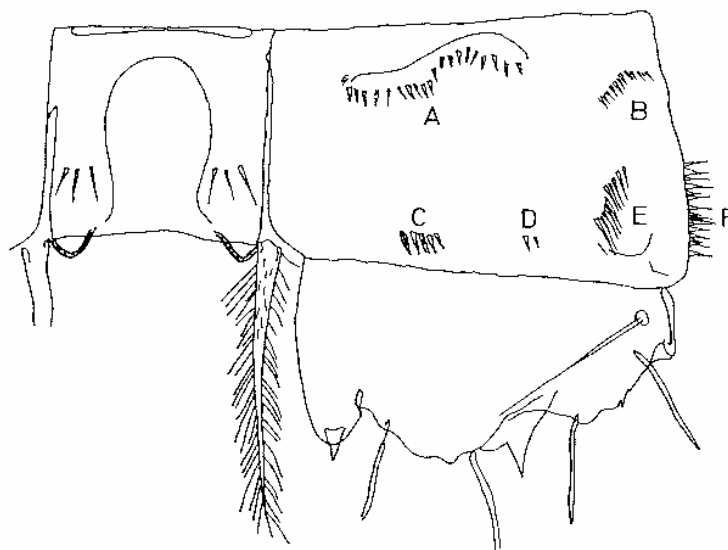
První buchanku rodu *Cyclops* popsal roku 1851 Fischer jako *Cyclops strenuus*. Následoval popis druhů *Cyclops insignis* a *Cyclops furcifer* Clausem (1857), *Cyclops lacustris*, *Cyclops abyssorum* a *Cyclops scutifer* Sarssem (Sars 1863) a *Cyclops vicinus* Uljaninem (1875). V roce 1892 Schmeil zredukoval všechny tyto druhy na pouhé dva: velmi variabilní *C. strenuus* a morfologicky stálý *C. insignis*.

Základ moderní taxonomie čeledi Cyclopidae položil Zygmunt Koźmiński, když roku 1936 publikoval popis své morfometrické analýzy (Koźmiński 1936). Tato metoda je založena na porovnávání součtu druhých mocnin relativních rozdílů osmnácti kvantitativních znaků vždy

u dvou jedinců. Dnes již není tato analýza používána, přesto byla významným přínosem a poměry délek a šířek určitých tělních článků a brv se v taxonomii využívají dodnes.

Hlavním kopepodologem 20. století byl zoolog taxonom Fridrich Kiefer. Prováděl dlouhodobé studie zooplanktonu na jezeře Bodensee a v jeho okolí v jižním Německu. Popisoval nové druhy buchanek ze vzorků přivezených vědeckými expedicemi (Turecko, Indie, Mongolsko /Kiefer 1939/). Provedl také revizi rodu *Acanthocyclops* (Kiefer 1976) a napsal monografii planktonních volně žijících buchanek a vznášivek (Kiefer 1978).

Kieferovým žákem byl další neméně významný kopepodolog Ulrich K. Einsle. Zabýval se ekologickými studii diapauly, sezónní dynamiky a invazí nových druhů zooplanktonu. Morfologickými a morfometrickými analýzami studoval mezidruhové a vnitrodruhové rozdíly buchanek. Zavedl využití pozorování diminuce chromatinu a elektroforézy enzymů v taxonomii buchanek. Pomocí těchto metod popsal nové druhy *Cyclops heberti* a *Cyclops singularis* z jižního Německa (Einsle 1996a). Provedl revizi skupiny *C. abyssorum* (Einsle 1975; Einsle 1980) a popsal nové morfologické znaky v ornamentaci (skupiny trnečků) na coxe (obr. I.2) čtvrtého páru plovacích nožek (Einsle 1985, 1996b). Více o přínosu U. Einsleho pro taxonomii buchanek viz (Wyngaard 2000).



Obr. I.2: Schéma uspořádání skupin trnů na coxe P4 rodu *Cyclops* (převz. z Einsle 1985)

Další údaje o rozšíření buchanek v jiných částech světa můžeme čerpat z příslušných monografií: na území bývalého Sovětského svazu (Rylov 1948), Ukrajiny (Monchenko 1974) a článků: ve Francii (Dussart 1959), v Severní Americe (Yeatman 1959).

V dějinách české hydrobiologie byl významným vědcem a popularizátorem Rudolf Šrámek-Hušek. Prováděl mimo jiné i výzkumy zooplanktonu v Černém jezeře na Šumavě (Šrámek 1937), odkud na základě Kožmiňského morfometrické analýzy popsal nový druh

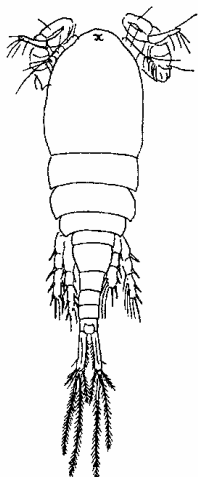
Cyclops bohemicus (Šrámek 1944). Tento druh však dnes není uznáván. Publikoval také první česky psaný klíč k určování buchaneček (Šrámek 1938) a zabýval se též buchankami zimního planktonu (Šrámek 1954).

Výzkumy věnující se morfologii buchaneček pokračují i v současné době. V roce 2004 byla publikována práce (Hołyńska a Dahms 2004) zabývající se taxonomickým významem tykadel a příústních končetin na hlavohruď (cephalosomu) buchaneček rodu *Cyclops*. Autoři tohoto článku měli k dispozici množství originálního materiálu z muzejních sbírek i vlastní vzorky. Podařilo se jim popsat málo známé a v taxonomii dosud opomíjené znaky na antenulách, antenách, maxillule, maxillipedu a prvním páru plovacích nožek. Jejich výsledky jsou sice založeny na poměrně omezeném počtu pozorování (u muzejních vzorků byl z jedné lokality jen jeden, maximálně dva jedinci) a některé znaky nejsou druhově specifické, přesto mohou být dobrým námětem pro další studie.

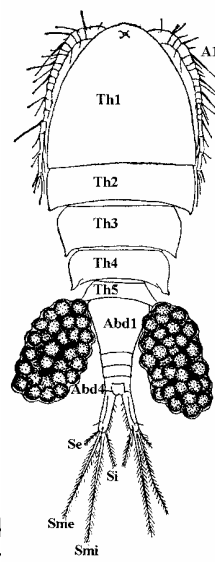
1.3. MORFOLOGIE

MORFOLOGIE DOSPĚLÝCH BUCHANEK

V důsledku sexuálního dimorfismu se tělo dospělé samičky liší od těla dospělého samečka. Rozdíl je hlavně v počtu tělních článků. Samička jich má devět, kdežto sameček deset. Ve fixovaném materiálu samečky poznáme (obr. I.3) podle charakteristicky zkroucených tykadel (zkroucení je způsobeno fixací; v živém vzorku mají samečci tykadla podél těla stejně jako samičky, jsou však zřetelně ztlustlá).



Obr. I.3: Celkový vzhled samečka buchanky z rodu *Cyclops* (převzato z Příkryl, nepublikováno)

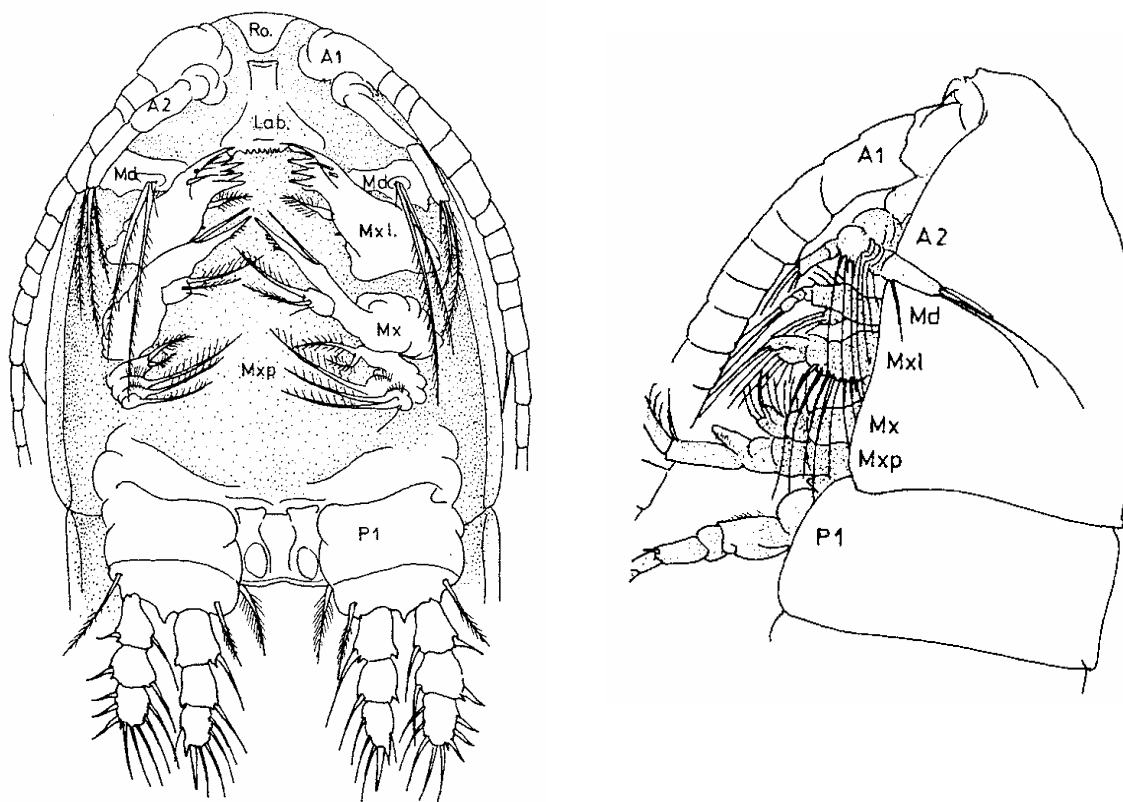


Obr. I.4: Cell z roc buchanky i jednotlivých tělních článků viz. seznam zkratk (převzato z Příkryl, nepublikováno)

Protože se v taxonomii více využívají dospělé samičky, budu se dále věnovat jim. Morfologické názvosloví kopepodů není zcela jednotné, zde se budu přidržovat pojetí Dussart a Defaye (2001).

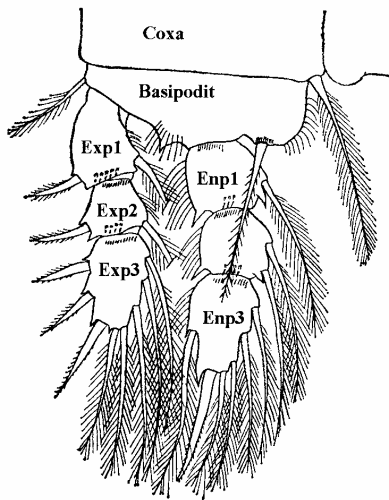
Tělo samičky (obr. I.4) můžeme rozdělit na dvě hlavní části: část přední – metasom čili prosom a část zadní – urosom. Celkem je to devět somitů (= viditelných článků) a dvouvětvná furka.

První somit (cephalosom – CS) vznikl srůstem hlavy, článků (metamerů) nesoucích příústní končetiny a článku nesoucího první pár plovacích nohou (obr. I.5). Cephalosomit nese typické končetiny korýšů. Jsou to tykadla prvního páru (antenuly – A1), u druhu *C. insignis* mají 14 článků, u ostatních druhů rodu *Cyclops* 17 článků. U druhu *C. insignis* 9. článek (u ostatních druhů rodu *Cyclops* 12. článek) nese taxonomicky významnou a dobře pozorovatelnou smyslovou brvu. Dále to jsou čtyřčlanková tykadla druhého páru (anteny – A2, složené z coxobasis a tříčlankového endopoditu). Kusadla (mandibuly – Md), první pár čelistí (maxilluly – Mx1), druhý pár čelistí (maxilly – Mx), čelistní nožky (maxillipedy – Mxp) a první pár dvouvětvných nožek hrudních čili plovacích (pedes 1 – P1).

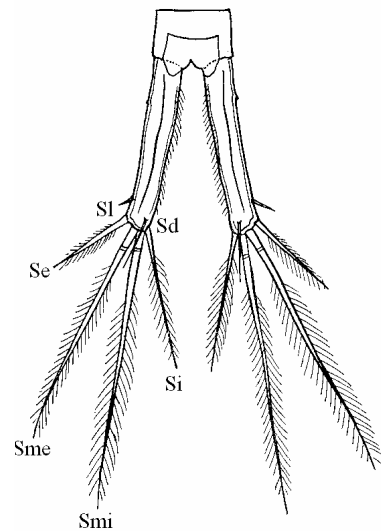


Obr. I.5: Cephalothorax buchanky z rodu *Cyclops*, vlevo pohled z břišní strany, vpravo pohled z boku, zkratky jednotlivých končetin (převzato z Einsle 1996b)

Součástí metasomu jsou dále druhý, třetí a čtvrtý somit (Th2, Th3, Th4). Každý z nich nese jeden pár dvouvětvných plovacích nožek (P2, P3, P4). Jednotlivá plovací nožka (obr. I.6) se skládá z coxy, bazipoditu, vnější větve – tříčlankového exopoditu (Exp1, Exp2, Exp3) a větve vnitřní – tříčlankového endopoditu (Enp1, Enp2, Enp3). Exopodit i endopodit nesou různý počet brv (tenčí, s delším jemným vlášením) a trnů (mohutnější, jen s nepatrným vlášením). Obě nožky stejného páru jsou mezi coxami spojeny intercoxální spojkou.



Obr. I.6: Jednotlivé články plovací nožky P1 (zde druh *Cyclops strenuus*), zkratky vysvětleny v seznamu zkratk (převzato z Příkryl, nepublikováno)



Obr. I.7: Furka (zde druhu *C. strenuus*) a jednotlivé furkální brvy (převzato z Šrámek 1953 a upraveno autorem)

Urosom začíná posledním – pátým somitem (Th5), který nese rudimentální pátý pár nožek (P5). Těmto nožkám se někdy říká kopulační či genitální a mají taxonomický význam pro určení buchanek do rodu.

Následuje tak zvaný genitální dvojsomit (G2S). Vznikl srůstem posledního hrudního článku a prvního abdominálního článku. Nachází se v něm charakteristický útvar – chámová schránka (receptaculum seminis – RS). Po stranách nese tento somit po dvou krátkých trnech a jedné krátké brvě, které jsou rudimentem posledního páru thorakálních končetin (P6). Po G2S následují tři somity zadečkové (Abd2, Abd3 a Abd4), které již nenesou žádné končetiny. Poslední z nich je zakončen dvouvětvnou vidlicí zadečku (furkou – fu) se šesti různě dlouhými furkálními brvami (obr. I.7). Jsou to: vnější (Se), vnější střední (Sme), vnitřní střední (Smi), vnitřní (Si), hřbetní (Sd) a postranní (SI).

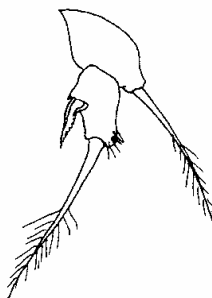
Pro porovnání zde ještě zmíním další odlišující znaky samečků. Celkově bývají menší a štíhlejší než samičky. Jejich urosom se skládá z šesti článků, protože poslední hrudní a první abdominální článek nesrůstají. Rudimentární P6, vyrůstající z posledního thorakálního somitu, se často používá jako taxonomický znak.

PŘEHLED URČOVACÍCH KLÍČŮ

Taxonomie buchanek je založena na morfologii dospělých sameček. Klíče na jejich určování jsou nejvíce propracované (např. Šrámek 1938, Šrámek 1953; Yeatman, 1959; Einsle, 1996b; Brandl nepublikováno). Přesto existují i klíče na určování samečků (Přikryl nepublikováno). Naupliová stádia buchanek se dají bezpečně rozlišit jen do rodu (Kiefer 1973) a navíc je k tomu potřeba dlouholetých zkušeností (Einsle 1996b). Naproti tomu kopepoditová stádia některých buchanek je možné určit i do druhu (Einsle 1989; Přikryl nepublikováno). Typické znaky dospělců ještě nebývají vyvinuty, ale podobnost s dospělci je u nich mnohem vyšší, než u nauplií.

MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA RODU CYCLOPS

Rod *Cyclops* se od ostatních rodů rozeznává podle vzhledu páté hrudní nožky (P5). Einsle (1996b) to charakterizuje následovně: P5 je dvoučlánková. První článek nese laterální (postranní) brvu, druhý apikální (koncovou) brvu a laterální trn. Tento laterální trn je stejně dlouhý jako samotný apikální článek, začíná uprostřed nebo blíže konci tohoto článku a vždy tento článek přesahuje (obr. I.8).



Obr. I.8: Kopulační nožka P5 u *C. singularis* (převzato z Einsle 1996b)

Někteří autoři (Brandl nepublikováno; Přikryl nepublikováno) zdůrazňují přítomnost podélné chitinózní lišty na hřbetní straně furkální větve jako nápadný znak většiny buchanek z rodu *Cyclops*.

MORFOLOGICKÝ POPIS STŘEDOEVROPSKÝCH DRUHŮ RODU CYCLOPS *CYCLOPS STRENUUS* FISCHER, 1851

První buchanka rodu *Cyclops* byla popsána Fischerem roku 1851 z typové lokality v blízkosti Petrohradu v Rusku jako *Cyclops strenuus*. O tomto druhu sice existují bohaté záznamy v literatuře i muzejních sbírkách, ale jasný morfologický popis chybí i v Einsleho

monografii (Einsle 1996b), kde jsou tyto morfologické znaky částečně nahrazeny ekologickými a cytogenetickými charakteristikami (Hołyńska a Dahms 2004).

Morfometrické studie na skupině *Cyclops strenuus*, které ve 30. letech 20. století prováděli Rzoska a Kozminski (1936), vyvrcholily monografií Lindberga (1957), který popsal 52 forem skupiny *strenuus* (znovu tu použil staré označení *rubens*). Lindberg však používal k měření vždy jen několik jedinců. Pozdější autoři Kiefer a Einsle tyto problémy odhalili a navrhli použít metodu diminuce chromatinu (Einsle 1985). O této metodě bude podrobněji pojednáno v příslušné kapitole. Nyní shrnu hlavní, dnes uznávané morfologické znaky tohoto druhu (Einsle 1996b).

Celková délka těla dospělé samičky se pohybuje mezi 1,4 a 2,0 mm s nápadnými sezónními rozdíly. A1 mají 17 článků a dosahují do poloviny Th3. Postranní výběžky na Th2 jen mírné, často šedivě zbarvené (v kontrastu se žlutohnědým zbarvením ostatních článků). Th4 je nápadně nejširší uprostřed článku. Th5 jen mírně širší než GS. Vnitřní okraj furkálních větví je obrvený fu 4-7:1. Trnová formule je typu terni (3.4.3.3). Ornamentace na coxe P4: skupiny A a C, zřídka D. Výběžky nepřesahují okraj intercoxální spojky.

Podle autorů nové práce na mikroskopických znacích na přívěscích hlavohrudi (Hołyńska a Dahms 2004) patří *Cyclops strenuus* do skupiny druhů s relativně dlouhou smyslovou brvou na 12. článku A1. Enp2 A2 nese 9 brv.

Při identifikaci nejmladších kopepoditů nám pomůže jejich žlutohnědá barva a nazelenalý obsah střeva (Einsle 1989). Furkální větve a nejdelší seta (Si) jsou relativně kratší, než u ostatních druhů rodu *Cyclops*.

Celkově je tento druh, stejně jako následující *Cyclops abyssorum*, velmi variabilní.

CYCLOPS ABYSSORUM G.O. SARS, 1863

Cyclops abyssorum byl v roce 1863 popsán Sarsem z lokalit Stensfjord a Lønnavatn ve středním Norsku následovně (Sars 1863): buchanka podobná *C. strenuus* a *C. scutifer* s oválným cephalothoraxem, dlouhými, štíhlými a rozbíhavými furkálními větvemi, antenuly mají 17 článků, délka těla průměrně 2 mm. Následují další znaky na P4, P5 a jiné.

Tento druh buchanky je, co se morfologie i ekologie týká, značně variabilní. Proto byly některé středoevropské populace na základě Koźmińského morfometrické analýzy popsány jako jiné druhy. Z polské části Tater byl roku 1932 Koźmińskim popsán *Cyclops tatricus*, z Černého jezera na Šumavě byl Šrámkem-Huškem hlášen nový druh *Cyclops bohemicus* (Šrámek 1937; Šrámek 1944). Lindberg (1957) dokonce popisuje 11 různých forem *C. abyssorum*.

Rozsáhlou revizi skupiny *abyssorum* provedl Einsle. Využil svých dlouhodobých pozorování, četných měření, pokusů s křížením i diminuce chromatinu (Einsle 1975). Pro všechny morfologické formy mu však vycházela diminuce stejně. Z toho usuzoval, že se může

jednat o začínající speciaci (Einsle 1980). Při studiu ornamentace coxy vykazovaly skupiny trnečků jistou proměnlivost (Einsle 1985). Skupina A byla velmi dobře vyvinuta (zvláště u větších forem), skupina B obyčejně chyběla, skupiny D a F někdy chyběly a skupina E byla typicky přítomna. Od výše popsaného se velmi lišily severské populace, u kterých byla přítomna i skupina B (a obyčejně i skupiny A, C a E). Pro všechny populace byly charakteristické znaky na intercoxální spojce: jedna až dvě řady trnečků a výběžky vybíhající daleko za okraj spojky.

Ve své monografii rozdělil Einsle (1996b) známé ekotypy *C. abyssorum* do několika skupin. V severní Evropě se vyskytující a Sarsem popsany *Cyclops abyssorum* je jen málo variabilní. Dospělé samičky můžeme charakterizovat takto: celková délka těla 1,5 až 1,9 mm, A1 dosahují ke konci Th2, Th4 a Th5 jsou na koncích zašpičatělé, furkální větve rozbíhavé, z vnitřní strany obrvené, fu 5-8:1. Trnová formule je 3.4.3.3.

Ve střední Evropě jsou populace skupin *praealpinus*, *divulsus* a *tatricus*. Do skupiny *praealpinus* Einsle řadí populace z velkých a hlubokých subalpínských jezer. Tyto buchanky mohou být jak štíhlé a malé (1,2 až 1,4 mm), tak i střední velikosti (1,5 až 2,0 mm). Vykazují velké sezónní změny ve velikosti. Největší jedinci byli nalezeni na jaře v populacích pocházejících z larválních stádií, která přezimovala v chladné vodě. Populace z vysokohorských jezer jsou řazeny do skupiny *tatricus*. Ta je charakteristická hlavně extrémně široce utvářeným Th2. Do skupiny *divulsus* Einsle zařadil populace z menších permanentních vod v nížinách.

Co se týče nových mikroskopických znaků na CphThx (Hołyńska a Dahms 2004), podobá se *Cyclops abyssorum* druhu *C. strenuus*. Také patří do skupiny druhů s relativně dlouhou smyslovou brvou na 12. článku A1 a také má 9 brv na Enp2 A2. Jedním znakem na Mx1 se však *Cyclops abyssorum* odlišuje: maxillulární palp je na rozdíl od ostatních druhů rodu *Cyclops* holý, bez trnečků.

Nejmladší kopepoditová stádia je možné určit podle šedivé barvy těla a obyčejně tmavého obsahu střeva. K tomuto určení je třeba pozorovat živé jedince za přirozeného světla. Na rozdíl od *C. strenuus* jsou furkální větve zřetelně štíhlejší a Si delší (Einsle 1989).

CYCLOPS INSIGNIS CLAUS, 1857

Cyclops insignis patří mezi druhy, které je možné jednoduše rozeznat podle tvaru těla a znaků na furce (Einsle 1985). Je to jediný druh z rodu *Cyclops*, který má 14 článků na A1. Údaje o celkové délce těla se značně liší: 2,2 až 2,8 mm (Einsle 1996b), 2,9 až 3,7 mm (Šrámek 1954), 2,5 až 5 mm (Rylov 1948). Všichni autoři se však shodují na dalších znacích: mimořádně dlouhá a štíhlá furka, trnová formule typu bini (2.3.3.3) a výskytem převážně v zimě a předjaří v efemérních tůních.

V ornamentaci coxy nalezneme trnečky skupin A (jemné a více rozptýlené, než u ostatních druhů), B, C a D. Intercoxální spojka je holá a výběžky nikdy nepřesahují její okraj. Brva na rozhraní intercoxální spojky a coxy je velmi silná (Einsle 1985).

Smyslová brva se nachází na 9. článku A1 a je relativně krátká (dosahuje k distálnímu okraji 10. článku A1, nebo jej malinko přesahuje). Počtem sedmi brv na Enp2 A2 se odlišuje od ostatních druhů (Hołyńska a Dahms 2004).

CYCLOPS SINGULARIS EINSLE, 1996

Tento druh byl popsán Ulrichem Einsle z typové lokality Listelsee v jižním Německu za pomoci metod diminuace chromatinu a elektroforézy alozymů (Einsle 1996a). V této astatické tůni se *Cyclops singularis* vyskytoval spolu se třemi dalšími druhy (*C. vicinus*, *C. furcifer* a *C. heberti*). Einsle charakterizuje *Cyclops singularis* následovně (Einsle 1996a): celková délka těla 1,6 až 2,4 mm, A1 má 17 článků a dosahuje ke konci Th2, postranní okraje Th4 a Th5 viditelně zašpičatělé, trnová formule 3.4.3.3, ornamentace coxy A, C a velmi krátké jemné brvy v oblasti E, výběžky přesahují hranu intercoxální spojky.

Smyslová brva na 12. článku A1 je středně dlouhá (končí mezi proximální a distální třetinou 14. článku A1). Enp2 A2 nese 9 brv. Ornamentace na kaudálním povrchu coxobasis A2: ve skupině b jsou silné trnečky. Mxl palp se vyznačuje řadou silných velkých trneček u báze a tenkými trnečky apikálně.

CYCLOPS FURCIFER CLAUS, 1857

Celkovou délku těla udává Einsle (1996b) 1,2 - 1,8 mm, někteří autoři dokonce 1,4 - 2,4 mm (Rylov, 1948 nebo Šrámek, 1953). A1 má 17 článků a dosahuje ke konci Th2. Vnější okraje článků Th4 a Th5 jsou zašpičatělé. Th5 má na ventrální straně poblíž bočních okrajů dva chitinózní výrůstky. Genitální segment je v přední části široký, kulovitý a v zadní výrazně užší, válcovitý. Ozbrojení plovacích nožek může být značně variabilní – normálně typ bini (2.3.3.3), ale vyskytují se i všemožné přechodné typy a typ terni (3.4.3.3). Furkální větve jsou dlouhé a štíhlé, 7:1 - 11:1, mírně rozbíhavé, na vnitřní straně obrvené, s výraznějším chomáčem brv u báze. Ornamentace coxy se skupinami A, B a C, výběžky přesahují hranu intercoxální spojky.

Smyslová brva na 12. článku A1 je relativně dlouhá. Enp2 A2 nese 9 brv. V ornamentaci na kaudálním povrchu coxobasis A2 se *C. furcifer* od ostatních druhů liší přítomností další šikmé řady jemných trneček u středního okraje článku.

CYCLOPS VICINUS CLAUS, 1857

Tato buchanka se jednoduše rozpoznatelná podle výrazných křídlovitých výběžků na Th4. Celková délka těla je 1,2 – 2,5 mm, A1 má 17 článků a dosahuje ke konci Th2. Furkální větve jsou dlouhé a štíhlé, 5:1 – 10:1. Trnová formule typu bini. Na coxe se vyskytují všechny skupiny trnečků (A až F), výběžky nepřesahují hranu intercoxální spojky. Nová morfologická kritéria (Hołyńska a Dahms 2004) nebyla u tohoto druhu zkoumána.

CYCLOPS KIKUCHII SMIRNOV, 1932

Výskyt tohoto druhu na našem území nebyl zatím jednoznačně prokázán. Tato buchanka je morfologicky téměř identická s druhem *C. vicinus* a dlouho měla status poddruhu (*C. vicinus kikuchii*). Přiřazení do samostatného druhu definitivně provedl až Einsle za použití metody enzymové elektroforézy. Hlavní morfologický rozdíl je v délce furkálních brv. U druhu *C. kikuchii* je Si kratší než furka – poměr Si:Lfu je 0,8:1 – 0,9:1 (na rozdíl od *C. vicinus*, kde je poměr 1,2:1). Dále Si je asi 0,35 Smi (oproti 0,5 u *C. vicinus*) a Si méně než 0,5 Sme (oproti 0,6 – 0,75 u *C. vicinus*). Furka 6:1 – 8,5:1. Nová morfologická kritéria (Hołyńska a Dahms 2004) nebyla u této buchanky zkoumána.

CYCLOPS HEBERTI EINSLE, 1996

Stejně jako *C. singularis*, byl i *Cyclops heberti* popsán Ulrichem Einsle z astatické tůně Litzelsee v jižním Německu za použití metody diminuce chromatinu (Einsle 1996a). Délka těla dospělé samičky se pohybuje v rozmezí 1,4 – 2,5 mm. A1 má 17 článků a dosahuje k začátku Th2. Okraje Th4 jsou mírně zašpičatělé a vybíhají do strany. Furkální větve rozbíhavé, 5,5:1 - 8,7:1, vnitřní strana hustěji obrvena v první třetině u báze futky, a jemně v poslední třetině. Trnová formule typu terni. Na coxe se vyskytují skupiny trnečků A a C, výběžky nepřesahují hranu intercoxální spojky.

Podle studie nových mikroskopických znaků na přívěscích hlavohruď (Hołyńska a Dahms 2004) patří *Cyclops heberti* do skupiny druhů s relativně krátkou smyslovou brvou na 12. článku A1. Enp2 A2 nese 9 brv.

CYCLOPS OCHRIDANUS KIEFER, 1932

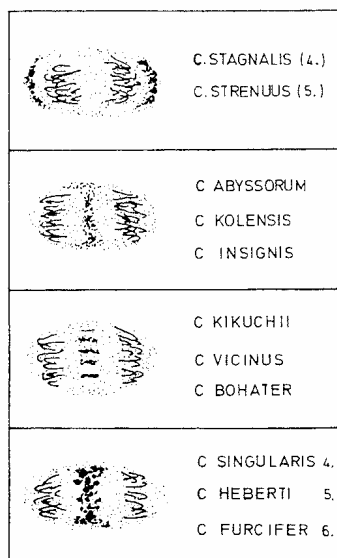
Tento druh se vyskytuje pouze v Ochridském jezeře. Celková velikost těla dospělé samičky je 1,6 – 1,9 mm. Antenuly mají 17 článků a dosahují ke konci Th3. CphThx je štíhlý. Furkální větve úzké, proporce 8:1 – 10:1. S1 velmi dlouhá, asi jako Se. Trnová formule typu terni. Coxa s trnečky skupiny A, B a C, výběžky nepřesahují hranu intercoxální spojky. Nová morfologická kritéria (Hołyńska a Dahms 2004) nebyla u tohoto druhu zkoumána.

1.4. GENETICKÉ METODY

V této kapitole bych rád shrnul přínos cytologických metod (popis diminuace chromatinu) pro systematiku rodu *Cyclops* a možnosti využití molekulárněbiologických technik u klanonožců.

DIMINUCE CHROMATINU

Diminuace chromatinu je jev vyskytující se pouze u několika skupin organismů (někteří nálevníci, hlístice, klanonožci a mihule). Poprvé byla pozorována u hlístic (Boveri 1887 podle Wyngaard 2000). Jedná se o fragmentaci a eliminaci značné části chromozomální DNA v presomatických zárodečných buňkách v časných fázích rýhování vajíčka (u klanonožců nejčastěji ve čtvrtém až šestém dělení). Protože součástí této procedury jsou rozsáhlé přestavby genomu a velké snížení obsahu DNA v buňce, předpokládá se, že se jedná o přesně řízený proces probíhající ve všech presomatických buňkách ve stejnou dobu a stejným způsobem (Wyngaard a Rasch 2000). První detailní porovnávací studie diminuace chromatinu prováděla Beermann na osmi druzích buchanek (Beermann 1959 podle Wyngaard 2000).



Obr. 1.9: Typy diminuace chromatinu u druhů z rodu *Cyclops*. Číslo za názvem druhu popisuje, v kolikátém buněčném dělení se diminuace vyskytuje (převzato z Einsle 1996b)

Využití diminuace chromatinu v taxonomii: metodou popsanou např. ve Wyngaard a Rasch (2000) lze obarvit chromatin a pozorovat pod mikroskopem vzory. Ty jsou vytvářeny v anafázi daného dělení vystříženým heterochromatinem v ekvatoriální oblasti buňky a jsou charakteristické pro jeden nebo více druhů (např. Einsle 1980). Pokud je vzor u dvou druhů stejný, je odlišná doba, ve které se v buňkách objevuje (Einsle 1996a).

Tato metoda se může zdát jednoduchá, ale její využití v praxi je problematické. Uspořádání heterochromatinu v jádře buňky se mění během dělení každou minutu a je tedy velmi obtížné vystihnout správný čas přípravy preparátu. Výsledný vzor navíc záleží na způsobu přípravy preparátu (hlavně na přitlačení krycího sklíčka). Dále je metoda omezena potřebou mít živé samičky s vajíčky v určitém stupni dělení (Einsle 1985). Úspěšné provedení proto vyžaduje značné zkušenosti (Einsle 1996b).

Obrázek I.9 jsou uvádí základní vzory diminuce chromatinu a jejich přiřazení k jednotlivým druhům podle Einsleho (1996b).

ENZYMOVÁ ELEKTROFORÉZA

Tato technika byla poprvé použita při studiu perlooček a podrobně ji popsal Hebert a Beaton (1989). U klanonožců tuto metodu poprvé využil Einsle při studiu dvou příbuzných druhů rody *Megacyclops*. Druhou studií na allozimech Einsle potvrdil, že *Cyclops kikuchii* je samostatným druhem. Využití této metody mělo i velký význam v další Einsleho práci (1996a): popis nových druhů *C. singularis* a *C. heberti* a jejich odlišení od druhu *C. furcifer*. Tato metoda je založená na rozdílné elektroforetické mobilitě allozymů (alelických forem téhož enzymu). Velké množství genů pro enzymy je polymorfních - liší se sekvencí aminokyselin a tudíž i elektromobilitou. Jedná se o levnou a jednoduchou metodu vhodnou pro studium populační struktury (migrace, příbuznost populací), druhové diverzity (kryptické druhy) a fylogeneze na nižší úrovni. Není však jisté, zda tato metoda monitoruje pouze selekčně neutrální znaky (např. jedinci žijící v podobném prostředí mohou mít i podobné enzymy). Tato technika není vhodná pro jedince menší než 1,2 mm.

SEKVENACE DNA

Během posledních let dochází k velkému rozvoji molekulárně-genetických technik. Výsledky analýz nukleových kyselin a proteinů nám poskytují nový pohled na systematiku skupin na všech taxonomických úrovních.

K nejčastěji užívaným metodám nyní patří sekvenace jaderných a mitochondriálních genů. K provedení této analýzy stačí malé množství vzorku (jedna buchanka), metoda je standardní a na základě výsledků je možné konstruovat fylogenetické stromy (dendrogramy) pro jednotlivé taxonomické skupiny. Různé geny mají rozdílnou evoluční rychlost. Obecně lze říci, že jaderné geny mají pomalejší evoluci, a jsou tudíž vhodnější pro fylogenetické studie na vyšších taxonomických úrovních (rodů a čeledí). Naproti tomu rychlejší evoluce mitochondriálních genů způsobuje větší variabilitu sekvencí. Toho lze využít v různých taxonomických, ekologických a fylogeografických studiích.

Mitochondriální DNA je kruhová molekula (15.000 – 17.000 párů bází dlouhá), kódující 13 proteinů, 22 transferových RNA a dvě ribozomální RNA. Sekvence celého mitochondriálního genomu je technicky i finančně náročná. Z klanonožců byla provedena zatím pouze na plazivce *Tigriopus japonicus* (Machida a kol. 2002). Pro většinu studií se sekvenuje pouze část některého mitochondriálního genu: pro COI (kódující podjednotku I enzymu cytochrom oxidáza), pro 12S srRNA (malou ribozomální RNA) nebo 16S lrRNA (velkou ribozomální RNA).

Nejčastěji jsou používány sekvence pro COI, nazývané „čárovým kódem“ druhu (Hebert a kol. 2003). Hojně je této metody využíváno při studiu mořských vznášivek. Na základě sekvencí pro COI byly navrženy druhově specifické primery (Bucklin a kol. 1999) umožňující jednoduché a přesné určení druhů pomocí druhově specifické PCR reakce (Hill a kol. 2001). U jedinců rodu *Calanus* totiž není možné přesně určit larvální stádia a v rodě *Pseudocalanus* se obtížně určují i dospělí jedinci. V jiné studii se kombinací sekvencí pro COI a sekvencí jaderného genu pro 18S rRNA podařilo odhalit fylogenetické vztahy 34 druhů mořských vznášivek (Bucklin a kol. 2003). Jinou kombinací sekvencí mitochondriálních genů pro COI a CYTB (enzym cytochrom B) byla studována fylogeografie atlantických, středomořských a černomořských populací dvou druhů vznášivek rodu *Calanus* (Papadopoulos a kol. 2005).

U sladkovodních korýšů je nejvíce výzkumů prováděno na perloočkách rodu *Daphnia*. Fylogeografické studie (např. Galas a Meester 2005) se snaží potvrdit předpokládaná glaciální refugia a odhalit cesty a průběh postglaciální kolonizace (Taberlet a kol. 1998). Vhodnou kombinací morfologických znaků, sekvencí DNA a ekologických charakteristik je možno provádět taxonomické revize. To ukazuje například studie na skupině buchanek druhů *Eucyclops serrulatus* (Alekseev a kol. 2006).

1.5. EKOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

V této kapitole popíši ekologické nároky jednotlivých druhů. Tyto poznatky nám mohou pomoci v identifikaci druhů (morfologicky těžko rozeznatelné druhy mohou mít rozdílné požadavky na životní prostředí).

CYCLOPS STRENUUS FISCHER, 1851

Tato buchanka se vyskytuje převážně od podzimu do jara v drobných periodických vodách, méně často v rybnících (jen v chladnějších částech roku) a v litorálních oblastech jezer (tam a v drobných vodách ve vyšších nadmořských výškách i během léta), v pravém středovém planktonu však chybí (Šrámek 1954). Impulsem pro vstup do diapauzy je překročení kritické délky dne v dubnu (Einsle 1996b). Dospělci se objevují koncem podzimu. *Cyclops strenuus* je

druh otužilý, odolný vůči sirovodíku, snáší i značný nedostatek kyslíku a znečištění až k α -mezosaprobii (Šrámek 1954).

CYCLOPS ABYSSORUM G.O. SARS, 1863

U druhu *Cyclops abyssorum* můžeme rozlišit tři ekologické skupiny (Einsle 1996b). Skupina „*praealpinus*“ je charakteristická pro velká a hluboká subalpínská jezera. V jezeře Constance (Bodensee) v jižním Německu se vedle *C. a. praealpinus* v pelagiálu vyskytuje i bentická forma *C. a. bodanus* s odlišnou stavbou těla. Einsle však prokázal, že odlišnost je způsobena nižší teplotou vody v hloubce jezera (Einsle 1980).

Další skupina „*tatricus*“ se vyskytuje ve vysokohorských jezerech (v nadmořské výšce nad 1800 metrů). Charakteristický znak (široký Th2) však při pokusech s křížením v laboratoři v Constance (nadmořská výška 400 metrů) zmizel (Einsle 1980). Einsle proto předpokládal, že musí existovat i jiné vnější faktory, které určují morfologický vývoj *C. a. tatricus* ve vysokohorských jezerech (např. množství slunečního záření, roční průběh teplot).

Do skupiny „*divulsus*“ řadí Einsle druhy z menších permanentních jezer v nižších polohách. U těchto populací se také objevuje pravé dormantní stádium.

CYCLOPS INSIGNIS CLAUS, 1857

Tento druh se vyskytuje převážně v zimě a předjaří v periodických tůňích (Einsle 1996b). Je často k nalezení v drobných vodách s břehy porostlými vegetací a v litorálu jezer (Šrámek 1954).

CYCLOPS SINGULARIS EINSLE, 1996

Výskyt *Cyclops singularis* není omezen jen na astatické tůně v jižním Německu, ale je širší (Hołyńska a Dahms 2004). Populace jsou nejpočetnější brzy na jaře, ale můžeme je nalézt i v létě (pokud není lokalita vyschlá). Einsle dále zmiňuje podobnou populaci v Lago di Chiusi v Itálii, kterou je třeba dále prozkoumat (Einsle 1996b). Hołyńska a Dahms (2004) však po podrobnějším prozkoumání mikroznaků zařadili jedince z této lokality ke druhu *C. heberti* (měli však k dispozici jen jednoho jedince).

CYCLOPS FURCIFER CLAUS, 1857

Tento druh se vyskytuje poměrně vzácně v drobných periodických i neperiodických vodách. Dále ho můžeme nalézt na zaplavovaných polích a ve vodách astatických (s nepravidelnou, i několik let dlouhou dobou vyschnutí). Diapauzuje ve čtvrtém kopepoditovém stadiu bez encystace, kopepoditi se objevují brzy po zavodnění lokality.

CYCLOPS VICINUS CLAUS, 1857

C. vicinus je u nás v současné době nejhojněji rozšířená buchanka. Vyskytuje se v pelagické zóně většiny našich eutrofních jezer a rybníků. Často jej nalezneme i v planktonu litorálním a v tůních. Ve vodách silněji znečištěných chybí. Hlavní maximum vývoje spadá do zimního období, během léta (květen či červen) vstupuje do diapauzy ve čtvrtém kopepoditovém stadiu (CIV). Na některých lokalitách se jarní generace dostane do dospělosti a vydrží i přes léto. Tyto populace jsou však menší, s menším počtem vajíček a pomaleji se rozmnožují. Šrámek-Hušek (1954) upozorňuje i na výskyt početných populací v menších vodách během léta, které se však mírně morfologicky lišily (kratší A1 a krátkým trnečkem na P5).

CYCLOPS KIKUCHII SMIRNOV, 1932

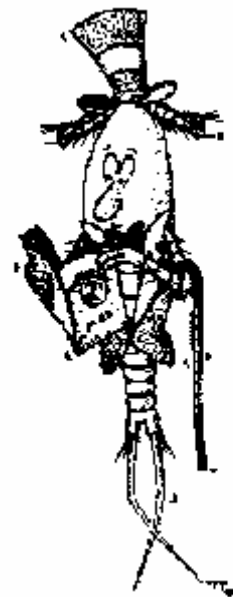
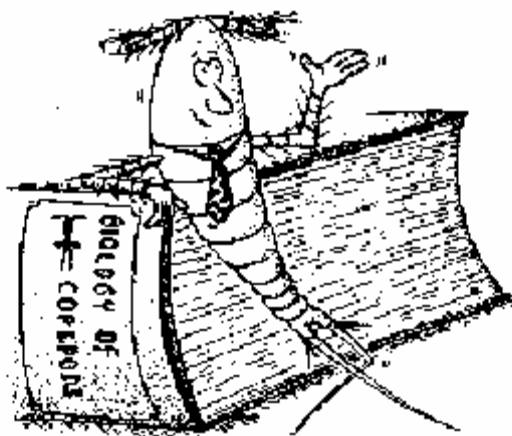
Výskyt stejný jako *C. vicinus*, oba druhy můžou i koexistovat. V diapauze (v CIV) je během léta. Jedinci zimní generace jsou větší. Jedinci jarní generace jsou menší a mohou se mírně lišit i v některých tělních proporcích.

CYCLOPS OCHRIDANUS KIEFER, 1932

C. ochridanus se vyskytuje endemiticky pouze v Ochridském jezeře. Toto třetihorní jezero je tektonického původu a rozkládá se na hranicích Albánie a Makedonie. Jezero leží v nadmořské výšce 693 m, má rozměry 30 x 15 km (350 km²) a maximální hloubku téměř 300 metrů.

2. CÍLE PRÁCE

- Zhodnotit genetickou variabilitu středoevropských populací bucharek z rodu *Cyclops* za pomoci amplifikace a sekvenace části genů pro cytochrom oxidázu I (COI) a 12S RNA.
- V rámci druhu *Cyclops abyssorum* porovnat genetickou variabilitu ekotypů *C. abyssorum* „praealpinus“, *C. a. „divulsus“*, *C. a. „tatricus“*.
- S využitím výše uvedených molekulárních markerů charakterizovat a druhově zařadit populace bucharek r. *Cyclops*, jejichž určení je podle morfologických znaků obtížné či nejednoznačné.



3. METODY

3.1. ODBĚR A UCHOVÁNÍ VZORKŮ

V diplomové práci jsou zpracovány vzorky z více než 100 lokalit. Některé odebíral sám autor práce, jiné získal od kolegů. Na 70 lokalitách byly nalezeny buchanky rodu *Cyclops*, podrobný seznam těchto lokalit je uveden v tabulce (II.1 a II.2 v příloze). Pro tuto práci byly vybrány vzorky z lokalit různých typů převážně v České republice. Dále vzorky z některých vysokohorských jezer na Slovensku, v Polsku, Rumunsku, Černé Hoře a ve Švýcarsku, z Ochridského jezera v Makedonii a z údolní nádrže Lago Lugano ve Švýcarsku. Planktonní vzorky z rybníků, jezer a přehradních nádrží byly odebírány planktonní sítí (s velikostí ok 40, 100, případně 200 μm). Vzorky z astatických tůní byly odebírány planktonní sítí na tyči (s velikostí ok 100 μm). Z polních a lučních rozlitiň byl odběr vzorků prováděn nabíráním vody plastovou odměrkou a filtrací přes sítko (s velikostí ok 200 μm , případně 400 μm).

Odebraný vzorek byl celý převeden do plastových epruven, v některých případech byli plastovou pipetou selektivně vybírání dospělí jedinci. Vzorek byl ihned po odběru fixován 96 % čistým ethanolem. Po jednom a pěti dnech byl vzorek znovu prefixován a následně uchováván v lednici při teplotě 5 °C.

3.2. MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

Každý odebraný vzorek byl před následnou analýzou DNA roztržěn a jedinci určeni do druhu. Určování vzorků prováděl sám autor nebo Jan Fott (viz tabulka II.1 a II.2 b v příloze). Z celého vzorku bylo nejprve pod binokulární lupou vybráno 10 – 40 dospělých samiček a umístěno do mikrozkušavky o objemu 0,5 ml. Následně byli tito jedinci určeni do druhu (pomocí stereomikroskopu se zvětšením 63 – 570x, pro detailní znaky byl použit mikroskop). Jako základní literatura pro určování byla používána monografie (Einsle 1996b) a z ní vycházející klíč od Přikryla (nepublikováno). Všechna jména druhů zde použitá jsou v souladu s monografií (Einsle 1996b).

3.3. ANALÝZA DNA

IZOLACE DNA

Z každé populace bylo pro izolaci DNA vybráno 3 – 6 dobře určených jedinců. Nejprve byl každý jedinec převeden do destilované vody, kde byl za laboratorní teploty ponechán 2 hodiny. Poté byl sterilně přenesen do mikrozkušavky do 50 µl roztoku proteinázy K. Mikrozkušavky s roztokem proteinázy K byly předem připraveny paní laborantkou a uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -15 °C. Složení roztoku vychází z práce Schwenk a kol. (1998). Izolace byla prováděna v thermocycleru případně v heatblocku podle protokolu: 12 h 57 °C (optimum pro činnost proteinázy), 10 min. 95 °C (denaturace proteinázy) a konečný krok 10 °C (vychlazení vzorku).

AMPLIFIKACE GENU PRO 12S SRRNA

Reakční směs byla připravena o celkovém objemu 25 µl a měla následující složení (v závorce je uvedeno látkové množství dané látky v reakční směsi): 7,6 µl sterilizovaná přečištěná destilovaná voda; 2,0 µl 2,5 mM MgCl₂ (2,5 mol); 2,0 µl 10x Taq Buffer with KCl (1 mol); 2,0 µl 2nM dNTP Mix (0,2 mol); 0,4 µl 20 µM primeru L13337-12S (0,4 mol); 0,4 µl 20 µM primeru H13845-12S (0,4 mol); 0,6 µl 1 U/µl Taq DNA Polymerase (Fermentas) a 5 µl templátové DNA z izolátu. Použité primery (Machida a kol. 2002) měly následující sekvenci: L13337-12S (YCT ACT WTG YTA CGA CTT ATC TC) a H13845-12S (GTG CCA GCA GCT GCG GTT A).

PCR reakce probíhala v mikrozkušavkách o objemu 0,2 ml v pásech po 8 (stripech) na thermocycleru iCycler Thermal Cycler (BIO-RAD). Byl použit PCR protokol se zvyšující se teplotou nasedání primeru (postupně 4x 39 °C, 4x 42 °C a 32x 45 °C). Počáteční denaturace 2 min. 95 °C; 40 cyklů: denaturace 0,5 min. 94 °C, nasedání primeru 1 min. (teploty viz výše), elongace 1 min. 72 °C; konečná prodloužená elongace 10 min. 72 °C a vychlazení na 10 °C.

Úspěšnost PCR reakce byla zjištěna elektroforézou na 1,5 % agarozovém gelu.

AMPLIFIKACE GENU COI

Ještě před úspěšným použitím primeru pro 12S srRNA byly prováděny poměrně rozsáhlé pilotní pokusy o amplifikaci části genu pro cytochrom oxidázu podjednotku I (COI). PCR protokol byl obdobný jako u amplifikace genu pro 12S srRNA. Navíc byly prováděny mírné modifikace v teplotě nasedání primeru a v koncentracích jednotlivých složek reakční směsi. Nejprve byl použit univerzální COI primer pro členovce (Folmer a kol. 1994): LCO-1490 (GGT

CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G) a HCO-2198 (TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA). Následně nově navržený univerzální primer založený na velmi konzervativních úsecích genu pro COI (Machida a kol. 2004): L1384-COI (GGT CAT GTA ATC ATA AAG ATA TTG G) a H2612-COI (AGG CCT AGG AAA TGT ATM GGG AAA). Nakonec i směs nepublikovaných degenerovaných primerů (Dirk Steinke).

ÚPRAVA PCR PRODUKTŮ

Podle výsledků elektroforézy byly z každé populace vybrány 2 – 4 vzorky a celý objem PCR produktu byl přečištěn pomocí sady QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) dle příloženého návodu. Následně byla spektrofotometricky změřena koncentrace DNA na přístroji NanoDrop v Sekvenační laboratoři Katedry parazitologie. Poté byl přidán primer LCO-1490, vzorky naředěny (dle požadavků Sekvenační laboratoře) a předány k sekvenační reakci a analýze.

ZPRACOVÁNÍ SEKVENCÍ DNA

Sekvence dodané z laboratoře ve formátu *.ab1 byly v programu BioEdit 7.0 (Hall 1999) manuálně zkontrolovány a zarovnány (funkcí ClustalW Multiple alignment se standardním nastavením). Alignment byl znovu manuálně zkontrolován a uložen ve formátu Fasta. Následné fylogenetické a molekulárně-evoluční analýzy byly prováděny v programu Mega 3.1 (Kumar a kol. 2004).

Pro konstrukci fylogenetických stromů ze sekvencí genu pro COI byl použit výpočetní algoritmus Neighbor-Joining (Saitou a Nei 1987) se substitučním modelem Tamura-Nei (Tamura a Nei 1993) počítajícím s transicemi i transversemi. Ostatní parametry byly ponechány v základním nastavení. Jako outgroup byla nastavena vznášivka *Heterocope saliens*. Statistická signifikance výsledného dendrogramu byla testována metodou Bootstrapping s nastavením 1000 opakování.

Fylogenetické stromy ze sekvencí 12S srRNA byly počítány metodami Neighbor-Joining a UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages, Sneath a Sokal 1973) s nastaveními shodnými jako u sekvencí COI.

Při výpočtu p-distancí (Pairwise distance calculation) ze sekvencí pro COI i 12S srRNA byl použit stejný substituční model i statistické testování jako při konstrukci fylogenetických stromů. Také bylo počítáno nukleotidové složení sekvencí (Nucleotide Composition).

4. VÝSLEDKY

4.1. ODEBRANÉ VZORKY

Výsledky v této diplomové práci vychází ze zpracování 66 vzorků z 59 lokalit (z toho 32 vzorků odebral autor práce). Většina lokalit je z České republiky, další se nachází na území těchto států: Slovensko, Polsko, Švýcarsko, Rumunsko, Bulharsko, Černá Hora, Makedonie. Podrobný přehled lokalit (včetně typu stanoviště a geografického popisu) je uveden v tab. II.1 a II.2 v příloze. Rybníky byly v kolonce A / P (voda astatická / permanentní) klasifikovány jako permanentní, protože doba vypuštění po výlovu bývá zpravidla krátká.

4.2. MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

Před následnou analýzou DNA byli dospělí jedinci z odebraných lokalit určení do druhu. Autor práce takto určil jedince z 37 vzorků, ostatní vzorky určil Jan Fott. I tyto informace jsou uvedeny v tab. II.1 a II.2 v příloze.

4.3. ANALÝZA DNA

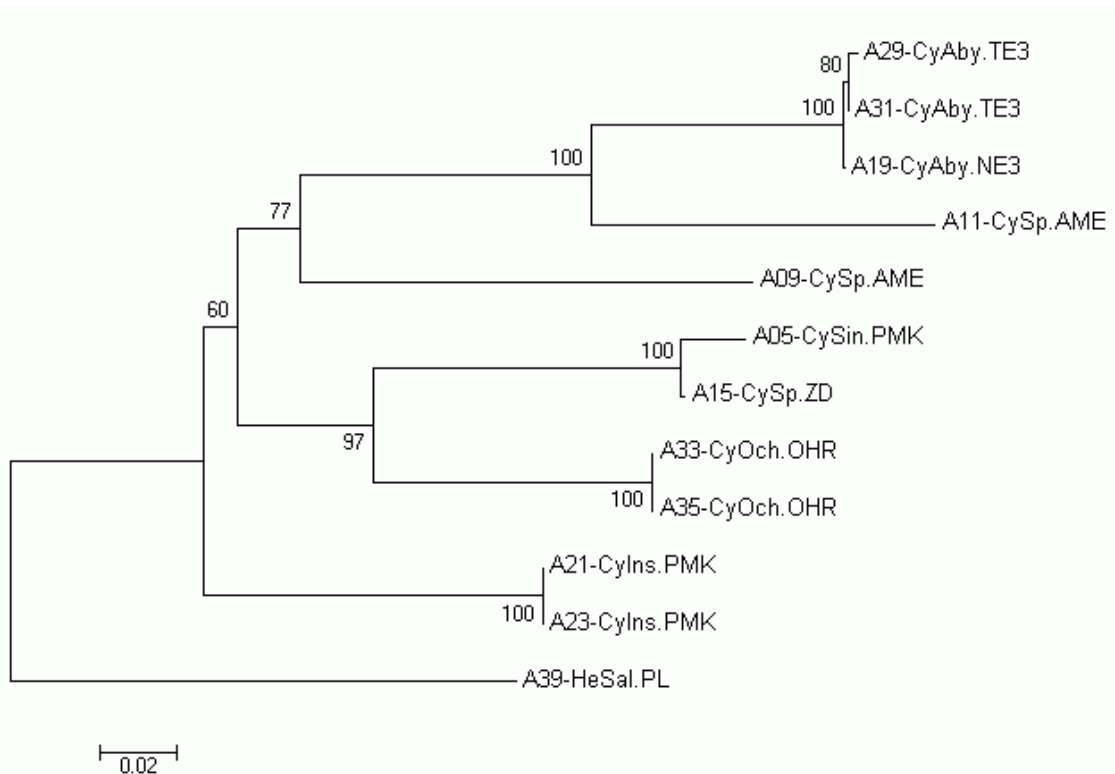
GEN PRO COI

Při pokusech o amplifikaci části genu kódující podjednotku I enzymu cytochrom oxidáza (COI) bylo provedeno celkem 126 izolací DNA a 269 PCR reakcí.

S univerzálním COI primerem (Folmer a kol. 1994) byly pozitivní výsledky PCR zaznamenány pouze u populací *C. insignis* z tůň Modřany – Komořany (PMK), *C. ochridanus* z Ochridského jezera (OHR), *C. vicinus* (laboratorní kultura neznámého původu), *C. abyssorum* z Vysokých Tater (lokality NE3 a TE3) a *Cyclops sp.* z Velké Ameriky (AME). Několik pozitivních výsledků z většího počtu zpracovaných vzorků (úspěšnost asi 21 %) bylo zaznamenáno u druhů *C. strenuus* a populací *C. singularis* (PMK) a *Cyclops sp.* ze Žďárského jezírka (ZD). Pouze negativní výsledky byly zjištěny u druhu *C. furcifer*, populací *C. abyssorum* ze Šumavy a *Cyclops sp.* ze Slapské nádrže.

Nově navržený univerzální primer pro COI (Machida a kol. 2004) neposkytl u testovaných druhů (*C. vicinus*, *C. strenuus*, *C. singularis*, *C. abyssorum*) žádný pozitivní výsledek. Výsledky PCR při použití směsi degenerovaných primerů (Dirk Steinke, nepublikováno) byly totožné s výsledky univerzálního primeru (Folmer a kol. 1994).

Přesto bylo vybráno 20 PCR produktů, přečištěno a předáno k sekvenaci. První čtyři vzorky byly pro sekvenaci připraveny paralelně – jedna čtveřice s primerem LCO-1490, druhá s HCO-2198. Po porovnání dodaných chromatogramů byly vzorky pro další sekvenační reakce připravovány pouze s primerem LCO-1490. Z dodaných sekvencí o délce 650 bp bylo vybráno 12 kvalitnějších (tj. s lépe čitelnými chromatogramy) a zarovnáno (ClustalW Multiple alignment). Výsledný soubor (COI_ALN2e na přiloženém CD) o délce 532 bp (párů bazí) byl použit ke konstrukci fylogenetického stromu metodou Neighbor-Joining – (obr. I.10), k výpočtu párových rozdílů v sekvencích, tzv. p-distancí (Pairwise distance calculation) – (tab. I.1) a nukleotidového složení sekvencí (Nucleotide composition) – (tab. I.2).



Obr. I.10: Fylogram z 12 sekvencí části genu pro COI (délka alignmentu 532 bp) vytvořený metodou Neighbor-Joining. Čísla u jednotlivých větví vyjadřují hodnoty bootstrap (s nastavením 1000 opakování). Označení sekvencí je vytvořeno systémem: číslo sekvence, zkratka druhu (viz tab. II.3 v příloze), kód lokality (viz tab. II.1 v příloze). Měřítko odpovídá rozdílu 2 % v nukleotidovém složení sekvencí.

Vnitrodruhová variabilita sekvencí (viz tabulka I.1) u jedinců z populací *C. insignis* (PMK), *C. ochridanus* (OHR), *C. abyssorum* (NE3) a *C. abyssorum* (TE3) byla maximálně 0,2 %. Variabilita mezi populacemi byla 0,4 % u *C. abyssorum* (NE3 x TE3), respektive 1,7 % u *C. singularis* z lokalit PMK a ZD. Tento výsledek je přínosný, protože nám pomohl správně přiřadit populaci ze Žďárského jezírka ke druhu *Cyclops singularis*. Rozdílnost sekvencí A09

a A11 (28,2 %) dvou jedinců *Cyclops* sp. z lomu Velká Amerika (AME) jasně ukazuje, že se jedná o dva různé druhy. Po podrobnějším rozboru celého vzorku z této lokality bylo zjištěno, že kromě druhu *Cyclops* sp. (morfologicky se podobajícímu druhu *C. abyssorum*) se zde vyskytuje i druh *C. vicinus* a mohlo tedy během manipulace se vzorkem dojít k záměně jedinců.

Tab. I.1: P-distance, párové rozdíly v sekvencích části genu pro COI (délka alignmentu 532 bp), k výpočtu použit substituční model Tamura-Nei, hodnoty v závorkách [] udávají střední chybu průměru (S.E.), zkratky druhů viz tab. II.3 v příloze

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]
[1] #A29-CyAby.TE3		[0.002]	[0.003]	[0.020]	[0.028]	[0.029]	[0.028]	[0.028]	[0.028]	[0.026]	[0.026]	[0.034]
[2] #A31-CyAby.TE3	0.002		[0.002]	[0.019]	[0.027]	[0.029]	[0.028]	[0.028]	[0.028]	[0.026]	[0.026]	[0.034]
[3] #A19-CyAby.NE3	0.004	0.002		[0.019]	[0.027]	[0.029]	[0.027]	[0.028]	[0.028]	[0.026]	[0.026]	[0.034]
[4] #A11-CySp.AME	0.160	0.158	0.155		[0.029]	[0.033]	[0.031]	[0.028]	[0.028]	[0.028]	[0.028]	[0.034]
[5] #A09-CySp.AME	0.267	0.264	0.264	0.282		[0.027]	[0.026]	[0.026]	[0.026]	[0.024]	[0.024]	[0.031]
[6] #A05-CySin.PMK	0.292	0.289	0.286	0.345	0.259		[0.006]	[0.021]	[0.021]	[0.026]	[0.026]	[0.030]
[7] #A15-CySp.ZD	0.277	0.274	0.271	0.322	0.244	0.017		[0.019]	[0.019]	[0.025]	[0.025]	[0.029]
[8] #A33-CyOch.OHR	0.277	0.274	0.271	0.278	0.246	0.171	0.154		[0.000]	[0.022]	[0.022]	[0.030]
[9] #A35-CyOch.OHR	0.277	0.274	0.271	0.278	0.246	0.171	0.154	0.000		[0.022]	[0.022]	[0.030]
[10] #A21-CyIns.PMK	0.253	0.250	0.253	0.279	0.231	0.245	0.227	0.196	0.196		[0.000]	[0.027]
[11] #A23-CyIns.PMK	0.253	0.250	0.253	0.279	0.231	0.245	0.227	0.196	0.196	0.000		[0.027]
[12] #A39-HeSal.PL	0.357	0.354	0.357	0.368	0.331	0.304	0.298	0.313	0.313	0.272	0.272	

	d	S.E.
celkový průměr	0.236	0.017

Do této fylogenetické analýzy nebylo zařazeno několik sekvencí – mezi nimi i dvě sekvence jedinců z lokalit PMK a ZD kvůli špatné kvalitě (nečitelnosti chromatogramu). Následnou kontrolou laboratorních protokolů bylo zjištěno, že PCR produkty z těchto vzorků měly (oproti ostatním) nižší koncentraci amplifikované DNA.

Zastoupení nukleotidů G a C (tab. I.2) se u studovaných sekvencí COI pohybovalo mezi 36,8 % (*C. insignis*, PMK) a 44,6 % (*Cyclops* sp., AME).

Tab. I.1: nukleotidové složení sekvencí části genu pro COI (délka alignmentu 532 bp), zkratky druhů viz tab. II.3 v příloze, kódy lokalit viz tab. II.1 v příloze.

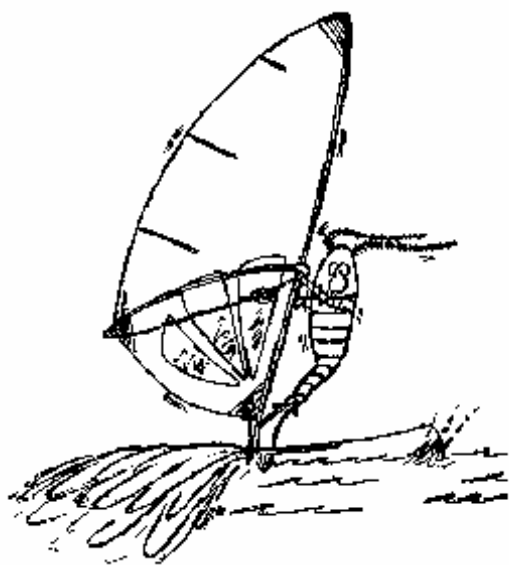
	T	C	A	G	C+G
A29-CyAby.TE3	34,6	22,0	21,6	21,8	43,8
A31-CyAby.TE3	34,6	22,0	21,8	21,6	43,6
A19-CyAby.NE3	34,6	22,0	22,0	21,4	43,4
A11-CySp.AME	32,7	22,6	22,7	22,0	44,6
A09-CySp.AME	38,0	19,9	23,5	18,6	38,5
A05-CySin.PMK	35,6	21,1	21,8	21,5	42,6
A15-CySp.ZD	36,8	20,1	21,8	21,2	41,3
A33-CyOch.OHR	37,2	19,0	22,9	20,9	39,9
A35-CyOch.OHR	37,2	19,0	22,9	20,9	39,9
A21-CyIns.PMK	37,4	17,3	25,8	19,5	36,8
A23-CyIns.PMK	37,4	17,3	25,8	19,5	36,8
A39-HeSal.PL	35,3	18,4	22,7	23,5	41,9
Průměr	36,0	20,1	23,0	21,0	41,1

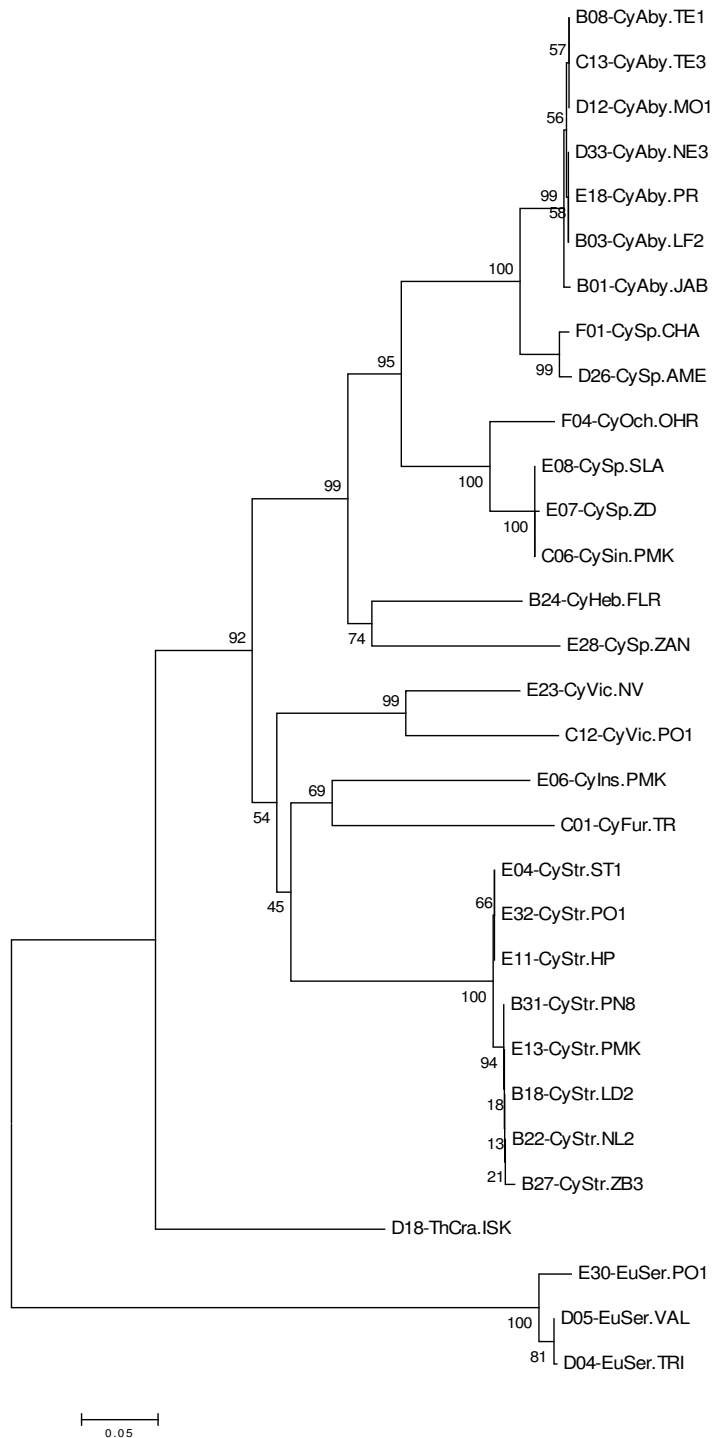
GEN PRO 12S SRRNA

Při amplifikaci části genu pro malou ribozomální RNA (12S srRNA) bylo z 201 izolátů DNA provedeno 232 PCR reakcí. Pozitivních výsledků bylo dosaženo u všech testovaných populací (celková úspěšnost amplifikace byla asi 87 %). Vybráno, přečištěno a k sekvenaci předáno bylo 123 PCR produktů. Dodaných 112 sekvencí o délce 390 bp bylo zarovnáno (Clustal W Multiple alignment) a do následné analýzy byly použity i 4 sekvence (M3, S12, S21 a S49) získané od Jany Sloukové (2007). Ke konstrukci fylogenetických stromů a výpočtům p-distancí byly použity soubory s 10 – 116 sekvencemi o délce 396 – 409 znaků (včetně mezer).

Nejprve byl pro kontrolu dat zkonstruován fylogenetický strom ze všech 116 sekvencí (soubor 12S_ALN1e na příloženém CD; 405 znaků včetně mezer) metodou UPGMA – obr. II.1 v příloze. Jako outgroup byl vybrán druh *Thermocyclops crassus*, protože jeho sekvence byly rodu *Cyclops* fylogeneticky nejbližší. Následně byl z 89 kvalitnějších sekvencí (tj. sekvencí s čitelným chromatogramem a minimem chybějících dat /N/; viz soubor 12S_ALN3e na CD v příloze; 398 znaků včetně mezer) vytvořen fylogram metodou Neighbor-Joining (NJ) – obr. II.2 v příloze.

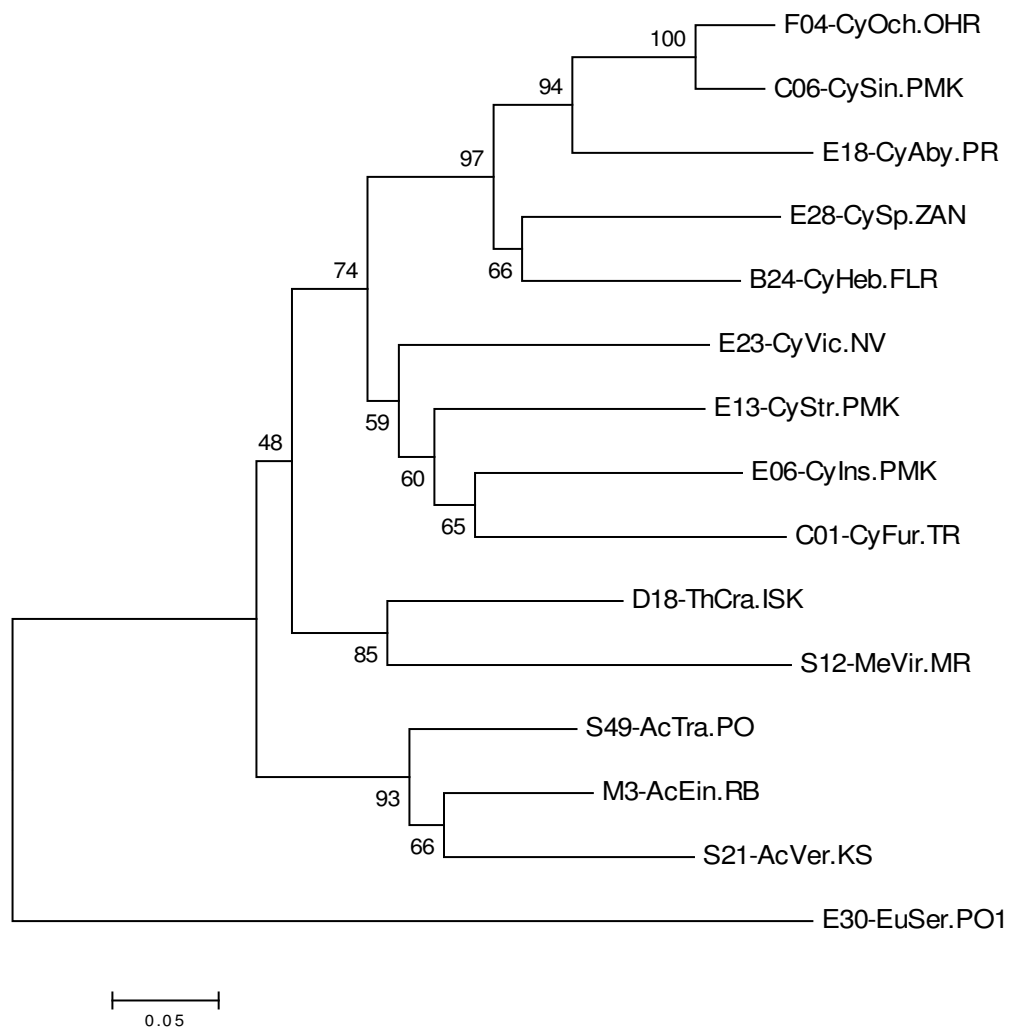
Poté byl sestrojen NJ fylogram z 31 sekvencí (soubor 12S_ALN8e na CD, 392 znaků včetně mezer) – obr. I.11. V tomto stromu jsou zastoupeny všechny druhy rodu *Cyclops* studované v této práci s důrazem na populace *C. abyssorum* a *C. strenuus*. Jako outgroup byly použity populace *T. crassus* a *E. serrulatus*. Z těchto sekvencí byly vypočítány i hodnoty p-distancí (tab. II.4 v příloze).





Obr. I.11: Fylogram ze 31 sekvencí části genu pro 12S srRNA (délka alignmentu 392 znaků včetně mezer) vytvořený metodou Neighbor-Joining. Výběr sekvencí zahrnuje všechny studované druhy rodu *Cyclops* s důrazem na populace *C. abyssorum* a *C. strenuus*. Čísla u jednotlivých větví vyjadřují hodnoty bootstrap (1000 opakování). Označení sekvencí je vytvořeno systémem: číslo sekvence, zkratka druhu (viz tab. II.3 v příloze), kód lokality (viz tab. II.1 v příloze). Měřítka odpovídá rozdílu 5 % v nukleotidovém složení sekvencí.

Fylogenetické vztahy druhů z rodů *Cyclops* a *Acanthocyclops* a druhů *T. crassus*, *E. serrulatus* a *M. viridis* jsou znázorněny NJ fylogramem na obr. I.12 (sekvence ze souboru 12S_ALN7e na CD; 409 znaků včetně mezer).



Obr. I.12: Fylogenetické vztahy druhů z rodů *Cyclops* a *Acanthocyclops* a druhů *T. crassus*, *E. serrulatus* a *M. viridis*. Fylogram z 15 sekvencí části genu pro 12S srRNA (délka alignmentu 409 znaků včetně mezer) vytvořený metodou Neighbor-Joining. Čísla u jednotlivých větví vyjadřují hodnoty bootstrap (1000 opakování). Označení sekvencí je vytvořeno systémem: číslo sekvence, zkratka druhu (viz tab. II.3 v příloze), kód lokality (viz tab. II.1 v příloze). Měřítka odpovídá rozdílu 5 % v nukleotidovém složení sekvencí.

5. DISKUZE

5.1. STUDOVANÉ LOKALITY A DRUHY

Populace buchaneček rodu *Cyclops* zpracovávané v této práci pocházejí ze širokého spektra typů stanovišť v České republice a z horských (převážně ledovcových) jezer na Slovensku, ve Švýcarsku a na Balkáně.

V práci jsou zahrnuty všechny druhy rodu *Cyclops* známé z území České republiky (*C. strenuus*, *C. vicinus*, *C. abyssorum*, *C. insignis*, *C. singularis* a *C. furcifer*; výskyt dalších dvou druhů, *C. singularis* a *C. heberti* nebyl dosud z území ČR publikován). Dále endemický druh z Ochridského jezera (*C. ochridanus*), pravděpodobně nový druh rodu *Cyclops* z rumunského Retezatu, a také populace *Cyclops* sp. ze zatopeného lomu Velká Amerika a Chabařovického jezera (morfoloogicky blízké druhu *C. abyssorum*).

Z druhů rodu *Cyclops* zaznamenaných ve střední Evropě nebyly k dispozici pouze druhy *C. bohater*, *C. kikuchii* a *C. stagnalis*. Nejbližší populace *C. bohater* jsou známy z hlubokých jezer v Polsku, další z jezer v západní Evropě. Výskyt druhu *C. kikuchii* zatím nebyl na našem území jednoznačně potvrzen. Morfoloogicky je velmi podobný druhu *C. vicinus*, od kterého se bezpečně pozná jen podle poměru furkálních brv. Z našich výsledků máme podezření na možnost výskytu druhu *C. kikuchii* na jedné lokalitě na Domažlicku. Druh *C. stagnalis* našel zatím pouze Einsle v astatických vodách v jižním Německu (Einsle 1996b), formální popis tohoto nového druhu však nikdy nevyšel (Brandl, osobní sdělení).

5.2. MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

Detailní morfoloogický popis populací v této práci neuvádím. Rozbor morfoloogických znaků byl omezen na bezpečné určení dospělých jedinců (samiček) do druhu, převážně podle monografie Einsle (1996b). Podrobnější morfoloogické analýzy některých populací na optickém a skenovacím elektronovém mikroskopu prováděli Jan Fott a Petr Jan Juračka (nepublikováno).

5.3. ANALÝZA DNA

Jak již bylo zmíněno v literárním úvodu, doposud nebyly publikovány žádné výzkumy na buchankách rodu *Cyclops*, využívající metodu sekvenace DNA. Proto jsou zde předkládané výsledky zcela originální. Zároveň je však není jednoduché srovnávat s jinými výzkumy.

Existuje velký počet prací o mořských vznášivkách (řád Calanoida), popisujících genetickou variabilitu (Bucklin a Lajeunse 1994; Bucklin a Kocher 1996; Bucklin a kol. 1998), fylogenetické vztahy (Hill a kol. 2001; Bucklin a kol. 2003; Thum 2004) či fylogeografii (Papadopoulos a kol. 2005). V mořském prostředí však platí jiné zákonitosti co se týče charakteru biotopů a možností šíření organismů.

Publikované práce o analýze DNA u sladkovodních buchanek (řádu Cyclopoida) jsou (podle mých současných znalostí) pouze dvě. Obě využívají sekvenaci části jaderného genu pro 18S rRNA. V první práci (Grishanin a kol. 2005), studující komplex kryptických druhů *Acanthocyclops vernalis*, je použití tohoto genu s relativně pomalou evoluční rychlostí nevhodné (z 593 nukleotidů bylo variabilních pouze 1-4). Druhá práce (Alekseev a kol. 2006), věnující se revizi druhu *Eucyclops serrulatus*, kombinuje data morfologická (klasické znaky a mapování kutikulárních pórů), genetická (sekvence genu pro 18S rRNA dlouhé 1809 bp) a populačně-genetická (pokusy z křížením). Sekvence DNA zde vykazovaly mezi populacemi variabilitu maximálně v jednom nukleotidu, což není (jak sami autoři dané práce přiznávají) příliš taxonomicky informativní hodnota. U obou prací byly ke zpracování sekvencí použity sofistikované parsimonní metody.

GEN PRO COI

Sekvence části mitochondriálního genu pro COI je hojně používanou metodou pro tzv. barcoding – rutinní determinaci druhů na základě genetické informace (Hebert a kol. 2003) a univerzální COI primer pro členovce (Folmer a kol. 1994) je při studiu korýšů nejpoužívanější. Bohužel, při našich studiích druhů rodu *Cyclops* poskytoval tento primer (i další z něho odvozené) neuspokojivé výsledky. DNA se spolehlivě amplifikovala pouze u druhů *C. vicinus*, *C. insignis*, *C. ochridanus* a u některých populací druhu *C. abyssorum*.

Amplifikace DNA u ostatních studovaných druhů vykazovala nulovou, případně velmi nízkou úspěšnost. Pravděpodobně došlo u těchto druhů k více mutacím v oblastech, na které nasedají primery. Možností do budoucna může být pokus o nalezení jiných konzervativních oblastí v sekvenci tohoto genu.

Kvalita získaných sekvencí části genu pro COI byla různá, přesto můžeme z fylogramu na obr. I.10 vyvodit některé závěry.

Jako první se zde odvětčuje *Cyclops insignis* (sekvence A21 a A23). Tento fakt by se dal odůvodnit větší morfologickou odlišností od ostatních druhů (větší velikost těla, 14 článků antenuly), avšak fylogram ze sekvencí 12S srRNA (obr. I.11) žádné výsadní postavení tohoto druhu neukazuje.

Do stejné větve k populacím *Cyclops abyssorum* z tatranských jezer (sekvence A29, A31 a A19) se řadí sekvence druhu *Cyclops sp.* z lomu Velká Amerika (sekvence A11). Sekvence

dalšího jedince (A09) je velmi odlišná. Možná se jedná o druh *C. vicinus*, který se na této lokalitě také vyskytuje a mohlo tedy neopatrností dojít k záměně s jedincem druhu *Cyclops sp.* (podobně jako u sekvence D28 na obr. II.1).

Velké rozdíly mezi sekvencemi s druhu *Cyclops singularis* jsou dány převážně tím, že sekvence A03 a A13 jsou méně kvalitní (obsahují větší počet chybějících znaků /N/ díky špatně čitelnému chromatogramu). Přesto nám tato data ukazují, že populace *Cyclops sp.* ze Žďárského jezírka (ZD) patří k druhu *C. singularis*. Ekologická valence tohoto druhu bude podrobněji diskutována v následující kapitole.

GEN PRO 12S srRNA

Amplifikace části genu pro malou ribozomální RNA (12S srRNA) byla velmi úspěšná. Pomocí použitých primerů (Machida a kol. 2002) se podařilo amplifikovat DNA ze všech populací zahrnutých v této práci. Amplifikované úseky nejsou příliš dlouhé (390 nukleotidů), přesto můžeme z výsledků vyvodit zajímavé závěry.

GENETICKÁ VARIABILITA DRUHU *CYCLOPS ABYSSORUM*

Tento druh je popisován jako morfologicky i ekologicky velmi variabilní (Einsle 1975, Einsle 1985). Středoevropské populace Einsle (1996b) rozdělil do tří ekotypů. Diminuce chromatinu však vycházela pro všechny typy stejně, z čehož Einsle usuzoval, že se jedná o začínající speciaci (Einsle 1980). V mé studii jsou zahrnuty všechny tři ekotypy: *praealpinus* z jezera Lago di Lugano (lokality LLG, LLM, LLF), *divulsus* z Prášílského (PR) a Plešného (PL) jezera a *tatricus* z vysokohorských jezer v Tatrách (TE1, TE3, NE3, MO1), ve Švýcarsku (SBE, LF2) a v Černé Hoře (JAB). Všechny tyto populace se nacházejí v jedné větvi fylogramu a variabilita mezi jejich sekvencemi je max. 0,1 % (viz tab. II.4 v příloze). Jednotlivé ekotypy nejsou na fylogramu (obr. I.11 a II.2) nijak odděleny, můžeme tudíž usuzovat, že se jedná pouze o morfologické adaptace na dané prostředí. Tuto možnost připouštěl i Einsle (1980), když pozoroval, že charakteristický znak *C. abyssorum* „*tatricus*“ (široký Th2) v laboratorním chovu v další generaci zmizel.

Do blízkosti jednotné skupiny druhů *C. abyssorum* se řadí dvě morfologicky podobné populace *Cyclops sp.* ze zatopeného lomu Velká Amerika (AME) a z Chabařovického jezera (CHA). Rozdíl v sekvencích mezi těmito populacemi je 0,1 % a od druhů *C. abyssorum* je dělí vzdálenost 0,6 % (viz tab. II.4 v příloze). Zajímavou otázkou zůstává, jakým způsobem a odkud se dostala populace *Cyclops sp.* do recentně vzniklých lokalit vytvořených člověkem.

EKOLOGICKÁ VALENCE DRUHU *CYCLOPS SINGULARIS*

Einsle (1996a) popsal druh *C. singularis* z astatické tůně v jižním Německu za pomoci metod diminuace chromatinu a elektroforézy alozymů. Do té doby ho spolu s druhem *C. heberti* považoval za součást variační řady druhu *C. furcifer*. Tyto tři druhy patří podle diminuace chromatinu do stejné skupiny – odlišují se podle toho, ve kterém rýhování dochází k eliminaci (největšího množství) chromatinu (viz obr. I.9). Členění a rozlišování druhů rodu *Cyclops* podle typu diminuace chromatinu až dosud nikdo nezpochybnil (Grishanin a Akif'ev 1999, Wyngaard a Rash 2000, Dussart a Defaye 2001). Při porovnání s dendrogramy mých sekvencí 12S srRNA je očekávaně rozdělení druhů do skupiny odlišné.

Mými výsledky můžeme však potvrdit zařazení populace *Cyclops sp.* ze Slapské nádrže (SLA) do druhu *C. singularis*. Dospělí jedinci této populace byli zaznamenáni pouze v malých počtech začátkem léta v a na podzim v hypolimniu nádrže (Fott, osobní sdělení). Brandl a Lavická (2002) měli k dispozici jeden exemplář samičky s ovisaky, jejíž potomstvo pěstovali v chovu až do dosažení dospělosti. Vypěstované jedince zařadili podle ekologického kritéria (výskyt v hluboké nádrži) k tzv. *C. abyssorum „divulsus“*. Zatímco druhy *C. heberti* vs. *C. singularis* a *C. abyssorum „divulsus“* lze rozlišit na základě morfologických kritérií, rozlišení dvou posledně jmenovaných druhů je obtížné (Fott, osobní sdělení). Při porovnání (obr. II.2, případně i obr. I.11) se sekvencemi populací *C. singularis* z pořičních tůní Modřany-Komořany (PMK), z astatických tůní (BAB, FL1) a rybníků (ZD, LI) potvrdíme nejen příslušnost populace *Cyclops sp.* SLA ke druhu *C. singularis*, ale i velmi širokou ekologickou valenci tohoto druhu. V době vysokých průtoků a vysokého stavu vody se může *C. singularis* z pořičních tůní šířit řekou po zátopovém území (Fott, osobní sdělení). V pořičních tůních se vyskytují dospělí jedinci *C. singularis* na jaře, ale v chladném hypolimniu Slapské nádrže mohou přežít do začátku léta. Zda se na Slapech i rozmnožují a vytvářejí populaci, je otázka hodná pozornosti.

Další populací, kterou lze na základě porovnání sekvencí přiřadit ke druhu *C. singularis*, je *Cyclops* ze Žďárského jezírka (ZD) na Šumavě. I v tomto případě se jedná o permanentní, nikoliv astatickou loklaitu.

CYCLOPS HEBERTI POPRVÉ NA NAŠEM ÚZEMÍ

Výskyt druhu *C. heberti* (stejně jako *C. singularis*) na našem území zatím nebyl (dle mých současných znalostí) publikován. Na základě analýzy 12S srRNA a následných podrobnějších morfologických rozborů (furkální poměry, trnečky na 4. coxe) byly objeveny tři populace *C. heberti* v lučních rozlitiinách na Moravě (MLR, SN4, FLR).

NEZNÁMÝ DRUH RODU *CYCLOPS* Z RUMUNSKA

Z odběrů zooplanktonu z ledovcových jezer v rumunském pohoří Retezat byly do analýzy 12S srRNA zařazeny dva vzorky *Cyclops sp.* z jezera Bucura (BUC) a jezera Zănoaga (ZAN). Morfologické určení do druhu dopadlo při použití určovacích klíčů (Einsle 1996b, Přikryl nepublikováno) neúspěšně. Jedinci neodpovídali svou morfologií ani žádnému z druhů z těchto jezer známému (Dan Cogalniceanu, osobní sdělení). Na fylogenetickém stromu (obr. I.11, případně II.2) tvoří tyto populace izolovanou větev poblíž druhu *C. heberti*. Pro přesný popis těchto populací bude třeba provést důkladný morfologický rozbor a rešerši literatury.

GENETICKY IDENTICKÝ *CYCLOPS VICINUS* A NÁLEZ *CYCLOPS KIKUCHII*

Druh *C. vicinus* je v současnosti u nás nejčastěji se vyskytující buchankou rodu *Cyclops*. Do analýzy DNA byly zahrnuty populace z různých typů tůní (PR4, LK1, MR1, REP, ML1) a z retenční nádrže Nová Ves (NV). Přestože se jednalo o populace z různých míst České republiky, sekvence vykazují nulovou variabilitu a studované populace *C. vicinus* je tedy geneticky uniformní. Výjimku tu tvoří jeden vzorek z litorální oblasti PR Postřekovské rybníky (PO1), jehož sekvence se od ostatních populací *C. vicinus* liší v 1,7 % nukleotidů. Mohlo by se jednat o druh *C. kikuchii*, který se od druhu *C. vicinus* liší poměrem délek furkálních brv, jinak je morfologicky velmi podobný. Na ověření této domněnky bude třeba se znovu vydat na lokalitu pro více dospělých jedinců.

GENETICKY TĚMĚŘ UNIFORMNÍ *CYCLOPS STRENUUS*

První popsanou buchankou rodu *Cyclops* byl *C. strenuus*. Přestože jde o druh ekologicky a morfologicky poměrně variabilní, variabilita v sekvencích 12S srRNA je max. 0,1 %. Z rozboru vzorků z velkého množství odebraných lokalit vyplývá, že se *C. strenuus* převážně vyskytuje v různých typech tůní v lesním porostu či na kraji lesa. Naproti tomu v lučních a polních tůních a rozlitiích je větší pravděpodobnost nalezení jiných druhů (*C. singularis*, *C. heberti*, *C. furcifer* a *C. vicinus*).

ZAMĚNĚNÉ VZORKY VYSVĚTLENY

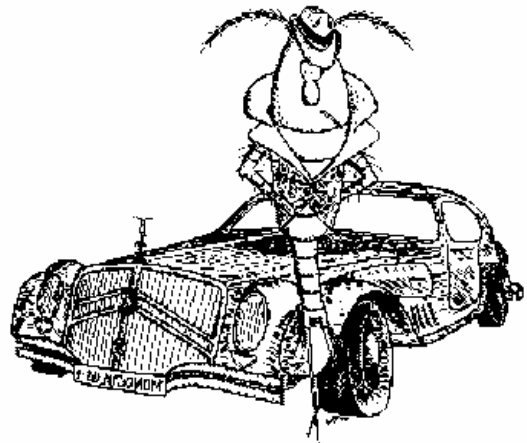
Kladogram ze všech sekvencí 12S srRNA (obrázek II.1 v příloze) umožňuje rozpoznat případné chybné určení či záměnu při manipulaci se vzorky. U sekvence E22 s popiskem *C. vicinus* z nádrže Nová Ves (NV) došlo pravděpodobně k záměně při vybírání jedince k izolaci DNA. Ke stejné chybě došlo u sekvence D28, protože *C. vicinus* se ve vzorku z lokality AME také vyskytuje. U sekvencí D21 a D22 došlo k chybnému určení jedince

(původně *C. heberti*), ale po analýze DNA byl vzorek se zbylými jedinci znovu překontrolován bylo zjištěno, že jedinci se ve všech důležitých znacích shodují s druhem *C. strenuus*. Z těchto chyb vyplývá, že napříště bude nutné věnovat kontrole jedinců vybíraných na PCR mnohem větší pozornost.

FYLOGENETICKÉ VZTAHY A FYLOGEOGRAFIE

Pokusem o nastínění fylogenetických vztahů mezi studovanými druhy rodu *Cyclops* a druhy *Thermocyclops crassus*, *Megacyclops viridis*, *Acanthocyclops trajani*, *A. einslei*, *A. vernalis* a *Eucyclops serrulatus* je fylogram ze sekvencí 12S srRNA na obr. I.12. Bootstrap hodnoty jsou poměrně nízké a fylogram tedy není příliš statisticky průkazný. Pro podrobnější rekonstrukci fylogenetických vztahů bude potřeba do dalších výzkumů zahrnout i amplifikaci jiného genu (nejlépe více genů s odlišnými evolučními rychlostmi) a použít sofistikovanější statistické zpracování (např. parsimonní metody).

Použitá část genu pro 12S srRNA není vhodná pro fylogeografické studie. Vhodnější by bylo použití amplifikace některého genu s rychlejší evolucí (např. COI v případě nalezení vhodného primeru) nebo metody analýzy mikrosatelitů.



6. ZÁVĚR

Hlavní výsledky mého výzkumu genetické variability buchaneč rodu *Cyclops* lze shrnout v následujících bodech:

Amplifikace části mitochondriálního genu pro COI pomocí univerzálního primeru pro členovce (Folmer a kol. 1994) či primerů z něho odvozených byla úspěšná pouze u necelé poloviny studovaných populací. Naopak amplifikace části genu pro malou ribozomální RNA (12S srRNA) pomocí primeru (Machida a kol. 2002) probíhala velmi dobře u všech studovaných populací.

Cyclops abyssorum – morfologicky i ekologicky variabilní druh – vykazuje velmi nízkou odlišnost v sekvencích mezi různými populacemi (max. 0,1 %). Ekotypy „*praealpinus*“, „*divulsus*“, „*tatricus*“ jsou pouze morfologickou adaptací a nemají charakter druhu ani poddruhu.

Populace z hypolimnia Slapské nádrže a ze Žďárského jezírka (permanentní lokality) byly na základě analýzy DNA přiřazeny ke druhu *C. singularis*, čímž značně rozšiřují jeho dosud předpokládanou ekologickou valenci.

Na základě analýzy 12S srRNA a následných podrobnějších morfologických rozborů byly objeveny tři populace *C. heberti* v lučních rozlitinách na Moravě. Tento druh nebyl dosud na území ČR nalezen.

Analýza 12S srRNA poukázala na dvě populace pravděpodobně neznámého druhu *Cyclops sp.* z ledovcových jezer v rumunském pohoří Retezat. Pro přesný popis těchto populací bude třeba provést důkladný morfologický rozbor a rešerši literatury.

Druh *C. strenuus* se převážně vyskytuje v různých typech tůní v lesním porostu či na kraji lesa a studované populace vykazovaly nízkou variabilitu v sekvencích 12S srRNA (max. 0,1 %).

Naše v současnost nejhojnější buchanka *C. vicinus* se vyskytuje ve vodách permanentních i astatických a sekvence 12S srRNA jsou mezi populacemi prakticky identické. Ve fylogramu se vyčlenila zvláště jedna populace z PR Postřekovské rybníky (odlišnost od ostatních populací *C. vicinus* v 1,7 % nukleotidů). Možnou příslušnost této populace ke druhu *C. kikuchii* bude možno potvrdit detailním morfologickým rozbohem po získání dalších dospělých jedinců z této populace.

Gen pro 12S srRNA je díky své nižší evoluční rychlosti nevhodný pro fylogeografické studie.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- Alekseev V., Dumont H.J., Pensaert J., Baribwegure D. & Vanfleteren J.R.** (2006) – A redescription of *Eucyclops serrulatus* (Fischer, 1851) (Crustacea: Copepoda: Cyclopoida) and some related taxa, with a phylogeny of the *E. serrulatus*-group. *Zoologica Scripta* 35: 123–147.
- *Beermann S.** (1959) – Chromatin-Diminution bei Copepoden. *Chromosoma (Berl.)* 10: 504–514.
- *Boveri T.** (1887) – Über Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von *Ascaris megalcephala*. *Anat. Anz.* 2: 688–693.
- Brandl Z.** (1998) – Feeding strategies of planktonic cyclopoids in lacustrine ecosystems. *Journal of Marine Systems* 15: 87–95.
- Brandl Z. & Lavická M.** (2002) – Morphological differences of some population of the genus *Cyclops* (Copepoda: Cyclopoida) from Bohemia (Czech Republic). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*. 66: 161–168.
- Brandl Z. & Pražáková J.** (2002) – Impact of predation by cyclopoid copepods (Copepoda: Cyclopoida) on zooplankton in a carp pond in Czech Republic. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*. 66: 169–175.
- Bucklin A. & Lajeunesse T. C.** (1994) – Molecular genetic variation of *Calanus pacificus* (Copepoda: Calanoida): Preliminary evaluation of genetic structure and subspecific differentiation based on mtDNA sequences. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports*. 35: 45–51.
- Bucklin A. & Kocher T. D.** (1996) – Source regions for recruitment of *Calanus finmarchicus* to Georges Bank: Evidence from molecular population genetic analysis of mtDNA. *Deep-Sea Research II*. 43: 1665–1681.
- Bucklin A., Bentley A. M. & Franzen S. P.** (1998) – Distribution and relative abundance of *Pseudocalanus moultoni* and *P. newmani* (Copepoda : Calanoida) on Georges Bank using molecular identification of sibling species. *Marine Biology* 132: 97–106.
- Bucklin A., Guarnieri M., Hill R. S., Bentley A. M. & Kaartvedt S.** (1999) – Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. *Hydrobiologia* 401: 239–254.
- Bucklin A., Frost B.W., Bradford-Grieve J., Allen L.D. & Copley N.J.** (2003) – Molecular systematic and phylogenetic assesment of 34 calanoid copepod species of the Calanidae and Clausocalanidae. *Marine Biology* 142: 333–343.
- Dussart B. H.** (1959) – Le genre CYCLOPS s.str. (Crustace copepode) en France. *Revue de Pathol.Gener.et de Phys.Clin.* 704: 27–32.

- Dussart B. H. & Defaye D.** (2001) – Copepoda: Introduction to the Copepoda, 2nd edition. In: **Dumont H.F.J.** (ed.) – Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World 16. *SPB Academic Publishing, Amsterdam*, 344 s.
- Einsle U.** (1975) – Revision der Gattung *Cyclops s. str.*, speziell der *abyssorum*-Gruppe. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* 32: 97–214.
- Einsle U.** (1980) – Systematic problems and zoogeography in Cyclopoids. In: **Kerfoot W.Ch.** (ed.) – Evolution and Ecology of Zooplankton Communities. *The University Press of New England, Trustees of Dartmouth College*, 679–684.
- Einsle U.** (1985) – A Further Criterion for the Identification of Species in the Genus *Cyclops* S Str (Copepoda, Cyclopoida). *Crustaceana* 49: 299–309.
- Einsle U.** (1989) – The identification of copepodit instars of some Calanoid and Cyclopoid Copepods of Lake Konstanz, Federal Republic of Germany. *Crustaceana* 57: 79–87.
- Einsle U.** (1996a) – *Cyclops heberti* n sp and *Cyclops singularis* n sp, two new species within the genus *Cyclops* ('strenuus-subgroup') (Crust Copepoda) from ephemeral ponds in southern Germany. *Hydrobiologia* 319: 167–177.
- Einsle U.** (1996b) – Copepoda: Cyclopoida, Genera *Cyclops*, *Medacyclops*, *Acanthocyclops*. In: **Dumont H.F.J.** (ed.) – Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World. *SPB Academic Publishing, Amsterdam*, 82 s.
- Elgmork K.** (1967) – Ecological aspects of diapause in copepods. *Proc. Symp. Crust.* III: 947–954.
- Elgmork K., Nilssen J., Broch T., & Ovrevik R.** (1978) – Life cycle strategies in neighbouring populations of the copepod *Cyclops scutifer* SARS. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 20: 2518–2523.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R. & Vrijenhoek R.** (1994) – DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294–299.
- Fryer G.** (1998) – The role of copepods in freshwater ecosystems. *Journal of Marine Systems* 15: 71–73.
- Grishanin A. K. & Akif'ev A. P.** (1999) – Interpopulation differentiation within *C. kolensis* and *C. strenuus strenuus* (Crustacea: Copepoda): evidence from cytogenetic methods. *Hydrobiologia* 417: 37–42.
- Grishanin A. K., Rasch E. M., Dodson S. L., & Wyngaard G. A.** (2005) – Variability in genetic architecture of the cryptic species complex of *Acanthocyclops vernalis* (Copepoda). I. Evidence from karyotypes, genome size, and ribosomal DNA sequences. *Journal of Crustacean Biology* 25: 375–383.

- Hall A.** (1999) – BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Hebert P. & Beaton M.** (1989) – Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. *Helena Laboratories, Beaumont, Texas*: 1–31.
- Hebert P., Cywinska A., Ball S., & DeWaard J.** (2003) – Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* 270: 313–321.
- Hill R.S., Allen L.D., & Bucklin A.** (2001) – Multiplexed species-specific PCR protocol to discriminate four N. Atlantic *Calanus* species, with an MTCOI gene tree for ten *Calanus* species. *Marine Biology* 139: 279–287.
- Holynska M. & Dahms H. U.** (2004) – New diagnostic microcharacters of the cephalothoracic appendages in Cyclops O. F. Muller, 1776 (Crustacea, Copepoda, Cyclopoida). *Zoosystema* 26: 175–198.
- Kerfoot W. C., Kellogg D. L. & Strickler J. R.** (1980) – Visual observations of live zooplankters: Evasion, escape, and chemical defenses. In: **Kerfoot W. C.** (ed.) – Evolution and Ecology of Zooplankton Communities. Special Symposium III American Society of Limnology and Oceanography. *Univ. Press of New England*, 10–27.
- Kiefer F.** (1939) – Freilebende Ruderkußkrebse (Crust. Cop.) aus Nordwest und Südindien (Pandschab, Kaschmir, Ladak, Nilgirigebirge). *Mem.Ind..Mus. Calcutta* 13: 83–203.
- Kiefer F.** (1973) – Vergleichende studies an Nauplien verschiedener Cyclopiden /Crustacea, Copepoda/. *Mem.Ist.Ital.Idrobiol* 30: 45–60.
- Kiefer F.** (1976) – Revision der robustus-vernalis - Gruppe der Gattung *Acanthocyclops* Kiefer (Crustacea, Copepoda) (Mit eingehender Beurteilung des „*Cyclops americanus* Marsh 1892“). *Beiträge zur naturkundlichen Forschung in Südwestdeutschland* 35: 95–110.
- Kiefer F.** (1978) – Freilebende Copepoda. In: **Kiefer F. & Fryer G.** (eds.) – Das Zooplankton der Binnengewässer, 2. Teil. Die Binnengewässer, Band 26. *E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart*, 1–343.
- Koźmiński Z.** (1936) – Morphometrische und ökologische Untersuchungen an Cyclopiden der strenuus-Gruppe. *Int. Revue ges Hydrobiol. Hydrogr.* 33: 161–240.
- Kumar S., Tamura K., & Nei M.** (2004) – MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150–163.
- Lee C. E.** (2000) – Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate "populations". *Evolution* 54: 2014–2027.

- Lee C. E. & Frost B. W.** (2002) – Morphological stasis in the *Eurytemora affinis* species complex (Copepoda : Temoridae). *Hydrobiologia* 480: 111–128.
- Lindberg K.** (1957) – Le groupe *Cyclops rubens* (syn. *Cyclops strenuus*). Revision du genre *Cyclops* s. str. (O.F. Müller, 1770) (Crustacés, Copépodes). *C.W.K. Glerup, Lund* 335 s.
- Machida R.J., Miya M.U., Nishida M. & Nishida S.** (2002) – Complete mitochondrial DNA sequence of *Tigriopus japonicus* (Crustacea: Copepoda). *Marine Biotechnology* 4: 406–417.
- Machida R.J., Miya M.U., Nishida M. & Nishida S.** (2004) – Large-scale gene rearrangements in the mitochondrial genomes of two calanoid copepods *Eucalanus bungii* and *Neocalanus cristatus* (Crustacea), with notes on new versatile primers for the srRNA and COI genes. *Gene* 332: 71–78.
- Maier G.** (1998) – Differential success of cyclopoid copepods in the pelagic zone of eutrophic lakes. *Journal of Marine Systems* 15: 135–138.
- Monchenko V. I.** (1974) – Cyclopoidae. In: Fauna Ukrainy. *Naukova dumka, Kiev*, 452 s. (ukrajinsky)
- Nilssen J. P. & Elgmork K.** (1977) – *Cyclops abyssorum* - life cycle dynamics and habitat selection. *Mem.Ist.Ital.Idrobiol.* 34: 197–238.
- Papadopoulos L.N., Peijnenburg K.T.C.A. & Luttkhuizen P.C.** (2005) – Phylogeography of the calanoid copepods *Calanus helgolandicus* and *C. euxinus* suggests Pleistocene divergences between Atlantic, Mediterranean, and Black Sea populations. *Marine Biology* 147: 1353–1365.
- Rylov V. M.** (1948) – Crustacea, Cyclopoida. In: Fauna SSSR. *Akad. Nauk SSSR, Moskva*, 318 s. (rusky)
- Saitou N. & Nei M.** (1987) – The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.
- Santer B. & Lampert W.** (1995) – Summer diapause in cyclopoid copepods: adaptive response to a food bottleneck. *Journal of Animal Ecology* 64: 600–613.
- Santer B.** (1998) – Life cycle strategies of free-living copepods in fresh waters. *Journal of Marine Systems* 15: 327–336.
- Sars G. O.** (1863) – Oversigt af de indenlandske Ferskvandscopepoder. *Forh. VidenskSelsk. Christiania*. 212–262. (norsky)
- Schwenk K., Sand A., Boersma M., Brehm M., Mader E., Offerhaus D. & Spaak P.** (1998) – Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in cladocera. *Aquatic Ecology* 32: 37–51.
- Sneath P. H. A. & Sokal R. R.** (1973) – Numerical taxonomy. *W. H. Freeman and Company, San Francisco*, 132 s.

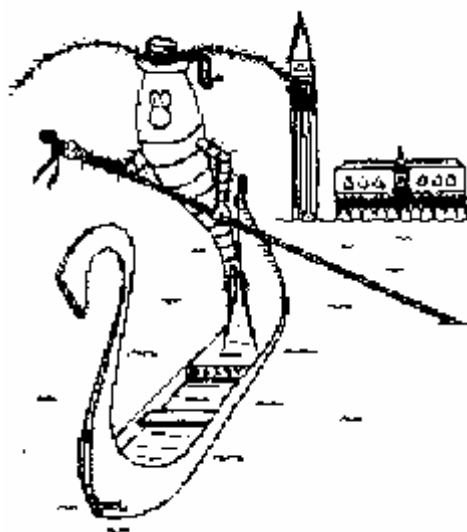
- Šrámek-Hušek R.** (1937) – K revizi perlooček a buchanek Černého jezera na Šumavě. *Věda přírodní* 18: 259–263.
- Šrámek-Hušek R.** (1938) – Klíč k určování buchanek čeledi Cyclopidae. *CNM, Praha* 112: 252–272.
- Šrámek-Hušek R.** (1940) – K poznání podrodu Cyclops, zvl. druhu Cyclops vicinus v Čechách. *Věstník Královské České Společnosti Nauk* 1–11.
- Šrámek-Hušek R.** (1944) – Einige Bemerkungen über die Arten Cyclops bohemicus Sramek und Cyclops praealpinus Kiefer [Copepoda]. *Archiv für Hydrobiologie* 39: 693–697.
- Šrámek-Hušek R.** (1953) – Naši klanonožci. *Nakladatelství ČSAV, Praha*. 64 s.
- Šrámek-Hušek R.** (1954) – Buchanky zimního planktonu. *Věstník Československé Společnosti Zoologické* 18: 225–259.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G. & Cosson J.F.** (1998) – Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453–464.
- Tamura K. & Nei M.** (1993) – Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512–526.
- Thum R. A.** (2004) – Using 18S rDNA to resolve diaptomid copepod (Copepoda : Calanoida : Diaptomidae) phylogeny: an example with the North American genera. *Hydrobiologia* 519: 135–141.
- Van den Bosch F. & Santer B.** (1993) – Canibalism in Cyclops abyssorum. *Oikos* 67: 19–28.
- Wyngaard G.** (2000) – The contributions of Ulrich K. Einsle to the taxonomy of the copepoda. *Hydrobiologia* 417: 1–10.
- Wyngaard G. A. & Rasch E. M.** (2000) – Patterns of genome size in the copepoda. *Hydrobiologia* 417: 43–56.
- Yeatman H. C.** (1959) – Free-living Copepoda: Cyclopoida. In: **Edmondson W.T.** (ed.) – Fresh-water biology, 2nd edition. *J. Wiley, New York*, 795–815.

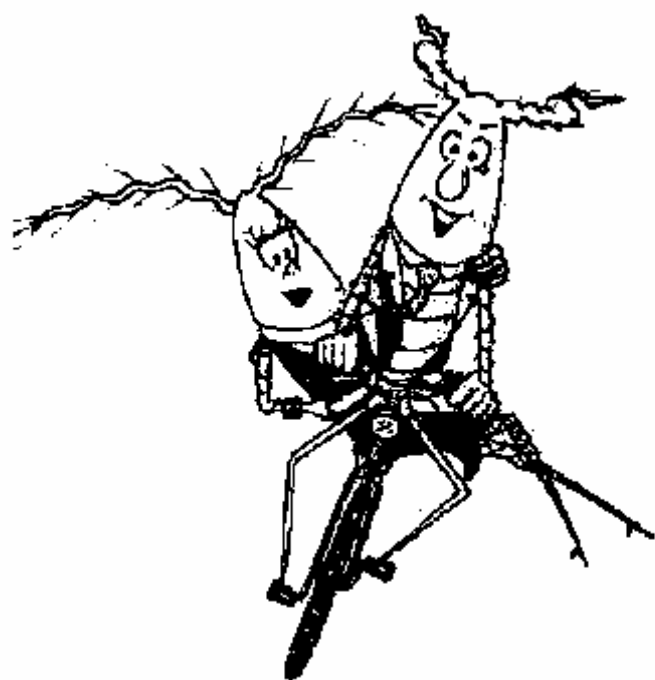
* = nepřímá citace

Neoznačené ilustrační kresby v textu byly převzaty z čísel časopisu MONOCULUS, který vydává World Association of Copepodologists.

PŘÍLOHY

SEZNAM LOKALIT SE ZÁKLADNÍMI ÚDAJI (TAB. II.1 A 2)	41
POUŽITÉ ZKRATKY DRUHŮ (TAB. II.3)	43
TABULKA P-DISTANCE PRO 12S SRRNA (TAB. II.4)	44
FYLOGRAM ZE 116 SEKVENCÍ 12S SRRNA (OBR. II.1)	45
FYLOGRAM Z 89 SEKVENCÍ 12S SRRNA (OBR. II.2)	46
OBSAH PŘILOŽENÉHO CD	47





Tab. II.1: Seznam a charakteristiky lokalit, populace u kterých byla zkoumána genetická variabilita pomocí sekvenace COI

název lokality	oblast	kód	typ	A / P	hloubka (max.) / m	nadm. výška	zeměpisná šířka	zeměpisná délka	datum sběru	leg.	det.	druh	číslo sekvence
České republiky													
Plešné jezero	Šumava	PL	ledovcové jezero	P	19	1087	48°46'35"N	13°51'55"E	23.9.04	Fott	Fott	HeSal	A39
Žďárské jezírko	Šumava	ZD	podhorský rybník	P	1,5	962	48°56'8"N	13°39'10"E	24.09.04	Fott	Fott	CySpZD	A15
Modřany - Komořany, břeh Vltavy	Praha	PMK	poříční tůň	P, A	0,5-1,5	190	49°59'24.6"N	14°24'5.2"E	26.12.04	Fott	Fott	CyIns	A21, A23
									7.5.05	Fott	Fott	CySin	A05
Velká Amerika	Berounsko	AME	zatopený váp. lom	P	11	410	49°57'32"N	14°11'44"E	21.4.04	Fott	Fott	CySpAME	A09, A11
Slovensko													
Nižné Temnosmrečinské (TA0019)	Vysoké Tatry	TE3	ledovcové jezero	P	38	1674	49°11'32"N	20°1'47"E	24.09.04	Hardekopf	Fott	CyAby	A29, A31
Nižné Terianské (TA0011)	Vysoké Tatry	NE3	ledovcové jezero	P	47	1941	49°10'12"N	20°0'45"E	24.09.04	Krajíček	Fott	CyAby	A19
Makedonie													
Ochridské jezero	JZ Makedonie	OHR	tektonické jezero	P	289	695	41°2'19"N	20°44'13"E	léto 2004	Marková	Fott	CyOch	A33, A35

vysvětlivky: A/P - voda astatická/permanentní (rybníky klasifikovány jako voda permanentní)

Tab. II.2: Seznam a charakteristiky lokalit, populace u kterých byla zkoumána genetická variabilita pomocí sekvenace 12S srRNA

název lokality	oblast	kód	typ	A / P	hloubka (max.) / m	nadm. výška	zeměpisná šířka	zeměpisná délka	datum sběru	leg.	det.	druh	číslo sekvence
České republiky													
Prášílské jezero	Šumava	PR	ledovcové jezero	P	17	1079	49°4'32"N	13°24'0"E	12.7.2007	Fott & Sacherová	Fott	CyAby	E17, E18, E19
Plešné jezero	Šumava	PL	ledovcové jezero	P	19	1087	48°46'35"N	13°51'55"E	18.4.2007	Fott	Fott	CyAby	D24, E01, E02
Žďárské jezírko	Šumava	ZD	podhorský rybník	P	1,5	962	48°56'8"N	13°39'10"E	24.9.2004	Fott	Fott	CySpZD	D30, D31
									23.10.2004	Fott	Fott	CySpZD	C16
									10.7.2007	Sacherová	Fott	CySpZD	E07
Horní Polka	Šumava	HP	podhorský rybník	P	1,5	957	48°56'35"N	13°40'16"E	10.7.2007	Sacherová	Fott	CyStr	E10, E11, E12
Tchořovická polní rozlitiina	Blatensko	TR	polní rozlitiina	A	0,8	448	49°25'49.7"N	13°50'22.8"E	6.4.2007	Fott	Fott	CyFur	C01, C02, E24
Smyslovská tůň 1	Blatensko	ST1	tůň na kraji lesa	A	0,5	465	49°25'7.7"N	13°48'7.7"E	27.3.2005	Fott	Fott	CyStr	E04, E05
Blatná, lesní tůň pod Dolejším	Blatensko	DT	lesní tůň	A	0,5	448	49°25'56.2"N	13°50'0.9"E	11.4.2004	Fott	Fott	CyStr	C07, E15, E16
Blatná - Rečice, luční příkop	Blatensko	REP	luční rozlitiina	A	0,5	442	49°25'44.7"N	13°51'7.0"E	10.4.2004	Fott	Fott	CyVic	E20, E21
Modřany - Komořany, břeh Vltavy	Praha	PMK	poříční tůň	P, A	0,5-1,5	190	49°59'24.6"N	14°24'5.2"E	26.12.2004	Fott	Fott	CyIns	C17, E06
									5.4.2004	Fott	Fott	CyStr	E13, E14
									5.4.2004	Fott	Fott	CySin	E25, E26
									6.4.2004	Fott	Fott	CySin	C05, C06
Nová Ves, nádrž	Praha	NV	retenční nádrž	P	3	280	50°2'39.3"N	14°21'1.6"E	17.2.2007	Fott	Fott	CyVic	E22, E23
Průhonice, tůň u Bořina	Praha	PR3	tůň u rybníka	A	0,6	325	49°58'50.09"N	14°32'31.23"E	8.4.2006	Krajíček	Krajíček	CyStr	D19, D20
Průhonice - park, tůň u Botiče	Praha	PR1	tůň u potoka	P	0,4	323	49°59'26.68"N	14°33'21.91"E	8.4.2006	Krajíček	Krajíček	CyIns	B10
Průhonice - za oborou, tůň u Botiče	Praha	PR4	tůň u potoka	A	0,3	328	49°58'40.33"N	14°32'53.42"E	8.4.2006	Krajíček	Krajíček	CyVic	B11
Kokořínský důl, tůň u Pšovky	Kokořínsko	KK1	tůň u potoka	A	0,2	239	50°25'44.56"N	14°34'47.36"E	17.4.2006	Krajíček	Krajíček	CyStr	C08, C09
Podhradská tůň (rybník Kačírek)	Kokořínsko	KK4	rybník, litorál	P	2	242	50°25'58"N	14°34'52"E	17.4.2006	Krajíček	Fott	CyStr	D21, D22
Lišovský rybník	České Budějovice	LI	městský rybník	P	2	392	48°59'18.41"N	14°25'59.00"E	23.2.2007	Bláha	Fott	CySin	E27
PR Postřevkovské rybníky	Domažlicko	PO1	rybník, litorál	A	0,5	429	49°26'50.15"N	12°49'36.08"E	15.4.2006	Bartovičová	Krajíček	CyVic	C12
									15.4.2006	Bartovičová	Krajíček	CyStr	E31, E32
									15.4.2006	Bartovičová	Krajíček	EuSer	E30
Chabařovické jezero	Ústí nad Labem	CHA	revital. uhelný lom	P	15	124	50°39'7"N	13°57'3"E	8.11.2006	Havel	Fott	CySpCHA	E03
Slapská nádrž, hydr.stanice, bóje	Střední Povltaví	SLA	údolní nádrž	P	45	294	49°45'58"N	14°24'54"E	16.6.2007	Fott	Fott	CySpSLA	E08, E09
									25.6.2005	Fott	Fott	CySpSLA	D23

Velká Amerika	Berounsko	AME	zatopený váp. lom	P	11	410	49°57'32"N	14°11'44"E	21.4.2004	Fott	Fott	CySpAME	D26, D28, D29
Babiny	Litoměřicko	BAB	luční tůň	A	0,7	567	50°36'8.40"N	14°7'56.40"E	14.8.2006	Petrusek	Fott	CySin	C03, C04
Polanská niva 8 (O-P8)	CHKO Poodří	PN8	lesní tůň	?	0,5	232	49°45'48.88"N	18°11'3.45"E	3.4.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B31
Suchdol nad Odrou (rozlitiina)	CHKO Poodří	SOR	luční rozlitiina	A	0,3	249	49°38'33.53"N	17°57'14.61"E	3.4.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B32
Žebračka 3 (M-Z3)	povodí Bečvy (Přerovsko)	ZB3	lesní tůň	?	0,5	221	49°28'19.60"N	17°27'21.04"E	1.4.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B27
Moravičany 1 (M-MOR1)	CHKO Litovelské Pomoraví	MR1	luční tůň	?	0,5	242	49°45'15.06"N	16°58'45.06"E	24.4.2006	Sacherová	Krajiček	CyVic	B13
Hejtmanka 1 (M-H1)	CHKO Litovelské Pomoraví	HJ1	lesní tůň	?	0,9	244	49°42'41.28"N	17°1'25.92"E	2.4.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B29
Sířeh 4 (M-ST3)	CHKO Litovelské Pomoraví	SN4	luční rozlitiina	A	0,3	226	49°42'18.63"N	17°9'22.57"E	2.4.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B30
Les Království 1 (M-KR1)	Pomoraví (Olomoucko)	LK1	lesní tůň	A	0,3	215	49°31'20.16"N	17°18'29.76"E	26.4.2006	Sacherová	Krajiček	CyVic	B12
Les Království 3 (M-KR3)	Pomoraví (Olomoucko)	LK3	lesní tůň	?	0,4	214	49°31'1.80"N	17°17'28.40"E	1.4.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B26
Včelín 4 (M-V4)	Pomoraví (Kroměřížsko)	VC4	tůň (les/pole)	A	0,4	196	49°22'10.73"N	17°19'34.89"E	1.4.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B28
Filena (rozlitiina)	Pomoraví (Kroměřížsko)	FLR	luční rozlitiina	A	0,3	187	49°15'54.95"N	17°28'58.09"E	31.3.2007	Krajiček	Fott	CyHeb	B24
Filena 1	Pomoraví (Kroměřížsko)	FL1	luční tůň	A	0,5	189	49°15'48.97"N	17°28'53.80"E	31.3.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B25
									31.3.2007	Krajiček	Krajiček	CySin	B14
Kunovický les 2 (M-KUNL2)	Pomoraví (Uherské Hradiště)	KL2	lesní tůň	?	0,6	183	49°3'39.48"N	17°26'31.12"E	31.3.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B23
Nedákonický les 2 (M-NED2)	Pomoraví (Uherské Hradiště)	NL2	lesní tůň	A	0,2	186	49°1'38.04"N	17°23'55.32"E	31.3.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B22
Soutok 13 (S13)	soutok Moravy a Dyje	S13	lesní tůň	?	0,6	160	48°41'35.70"N	16°57'9.70"E	30.3.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B21
Drnholec 1	Podyjí (Pálavsko)	DR1	lesní tůň	?	0,5	172	48°50'51.64"N	16°29'2.46"E	28.3.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B15
Mošovský luh 1	Podyjí (Pálavsko)	ML1	lesní tůň	?	1,3	179	48°54'44.43"N	16°34'41.74"E	28.3.2007	Krajiček	Krajiček	CyVic	B16
Mošovský luh (rozlitiina)	Podyjí (Pálavsko)	MLR	polní rozlitiina	A	0,3	184	48°54'31.20"N	16°34'18.15"E	28.3.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B17
Lednice 2 (D-LED2)	Podyjí (Lednicko)	LD2	lesní tůň	?	0,5	174	48°48'38.93"N	16°47'34.09"E	29.3.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B18
Kančí obora 2 (D-KAN2)	Podyjí (Lednicko)	KO2	luční rozlitiina	A	0,5	167	48°46'4.53"N	16°52'8.45"E	29.3.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B19
Kančí obora (rozlitiina)	Podyjí (Lednicko)	KOR	luční rozlitiina	A	0,2	158	48°46'8.23"N	16°52'32.38"E	29.3.2007	Krajiček	Krajiček	CyStr	B20
Slovensko													
Vyšné Temnosmrečinské (TA0022)	Vysoké Tatry	TE1	ledovcové jezero	P	19	1716	49°11'20"N	20°2'16"E	24.8.2004	Marková	Krajiček	CyAby	B08, D13
Nižné Temnosmrečinské (TA0019)	Vysoké Tatry	TE3	ledovcové jezero	P	38	1674	49°11'32"N	20°1'47"E	24.9.2004	Hardekopf	Fott	CyAby	C13, C14
Nižné Terianské (TA0011)	Vysoké Tatry	NE3	ledovcové jezero	P	47	1941	49°10'12"N	20°0'45"E	24.9.2004	Krajiček	Fott	CyAby	D32, D33
Polsko													
Czarny staw pod Rysami (TA0029)	Vysoké Tatry	MO1	ledovcové jezero	P	76	1580	49°11'20"N	20°4'40"E	16.7.2003	Marková	Krajiček	CyAby	B07, D12
Švýcarsko													
Lac du col du Gd St Bernard	Západní Alpy	SBE	ledovcové jezero	P	3	2447	45°52'06"N	7°10'03"E	6.9.2005	Černý	Krajiček	CyAby	B02
Lac de Fenetre	Západní Alpy	LF2	ledovcové jezero	P	8	2495	45°52'58"N	7°8'27"E	20.9.2004	Marková	Krajiček	CyAby	B03, D08
Lago di Lugano, Gandria	JV Švýcarsko	LLG	ledovcové jezero	P	270	268	46°0'22"N	9°0'59"E	5.10.2004	Marková	Krajiček	CyAby	B04, D09
Lago di Lugano, Melide	JV Švýcarsko	LLM	ledovcové jezero	P	270	270	45°56'46"N	8°57'17"E	6.10.2004	Marková	Krajiček	CyAby	B05, D10
Lago di Lugano, Figino	JV Švýcarsko	LLF	ledovcové jezero	P	270	270	45°57'32"N	8°53'36"E	7.10.2004	Marková	Krajiček	CyAby	B06
Rumunsko													
Zănoaga	Retezat	ZAN	ledovcové jezero	P	29	1997	45°20'49"N	22°49'20"E	23.10.2005	Krajiček	Fott	CySp	E28, E29
Lacu Bucura	Retezat	BUC	ledovcové jezero	P	15,7	2041	45°21'37"N	22°52'29"E	24.10.2005	Krajiček	Fott	CySp	C15, C18, D01
Lacu Păpușa	Retezat	PAP	luční tůň	P	1,5	1876	45°19'45.45"N	22°53'57.55"E	26.10.2005	Krajiček	Krajiček	EuSer	D02
Bulharsko													
Iskar	Sofia	ISK	údolní nádrž	P	76	809	42°27'58"N	23°34'47"E	14.8.2004	Marková	Krajiček	ThCra	D17, D18
Trilistnika (Detelinata)	Rila	TRI	ledovcové jezero	P	6,5	2216	42°12'21"N	23°19'5"E	28.10.2005	Krajiček	Krajiček	EuSer	D04
Černá Hora													
Jablan jezero	Durmitor	JAB	ledovcové jezero	P	8,5	1788	43°10'4"N	19°3'35"E	20.8.2004	Krajiček	Krajiček	CyAby	B01, D03
Valovito jezero	Durmitor	VAL	ledovcové jezero	P	3,5	1695	43°5'47"N	19°3'57"E	4.11.2005	Krajiček	Krajiček	EuSer	D05
Veliko Škrčko jezero	Durmitor	SKR	ledovcové jezero	P	17,2	1700	43°8'8"N	19°0'55"E	6.11.2005	Krajiček	Krajiček	EuSer	D06
Makedonie													
Ochridské jezero	JZ Makedonie	OHR	tektonické jezero	P	289	695	41°2'19"N	20°44'13"E	léto 2004	Marková	Fott	CyOch	C10, C11

vysvětlivky: A/P - voda astatická/permanentní (rybníky klasifikovány jako voda permanentní)

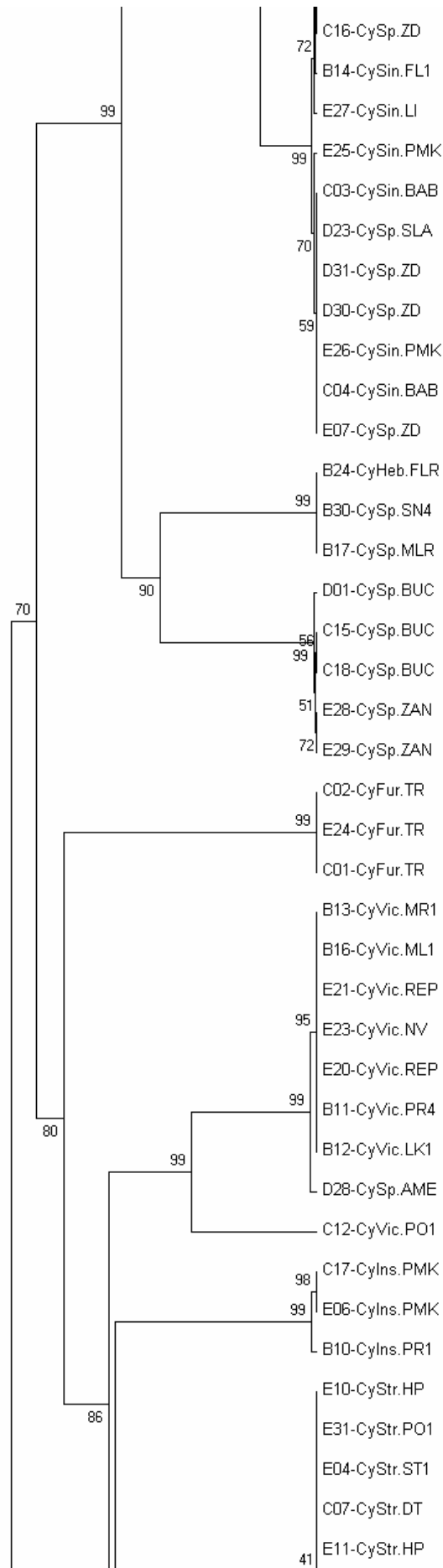
Tab. II.2: použité zkratky druhů

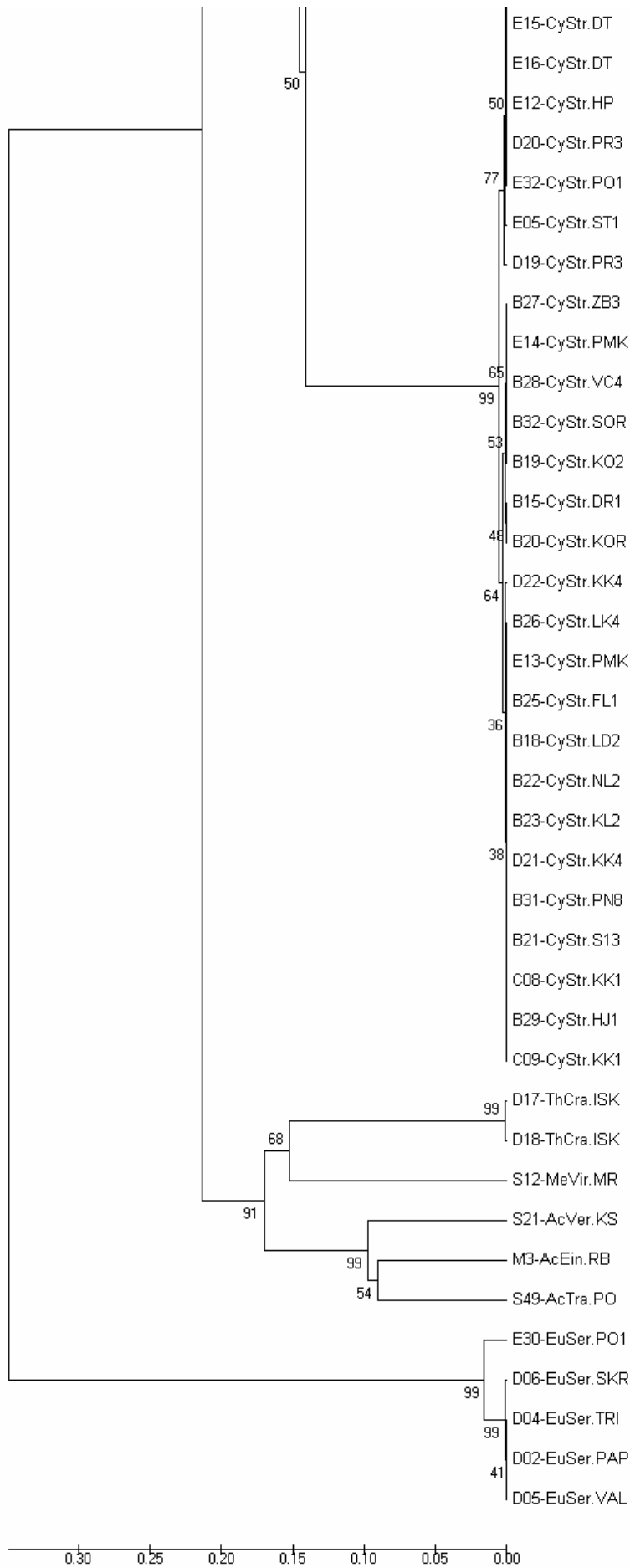
Název druhu	kód
<i>Acanthocyclops einslei</i> Mirabdullayev & Defaye, 2004	AcEin
<i>Acanthocyclops trajani</i> Mirabdullayev & Defaye, 2002	AcTra
<i>Acanthocyclops vernalis</i> Fischer, 1853	AcVer
<i>Cyclops abyssorum</i> Sars, 1863	CyAby
<i>Cyclops furcifer</i> Claus, 1857	CyFur
<i>Cyclops heberti</i> Einsle, 1996	CyHeb
<i>Cyclops insignis</i> Claus, 1857	CyIns
<i>Cyclops ochridanus</i> Kiefer, 1932	CyOch
<i>Cyclops singularis</i> Einsle, 1996	CySin
<i>Cyclops strenuus</i> Fischer, 1851	CyStr
<i>Cyclops vicinus</i> Claus, 1857	CyVic
<i>Eucyclops serrulatus</i> Fischer, 1851	EuSer
<i>Hetercope saliens</i> (Lilljeborg, 1863)	HeSal
<i>Megacyclops viridis</i> Jurine, 1820	MeVir
<i>Thermocyclops crassus</i> Fischer, 1853	ThCra





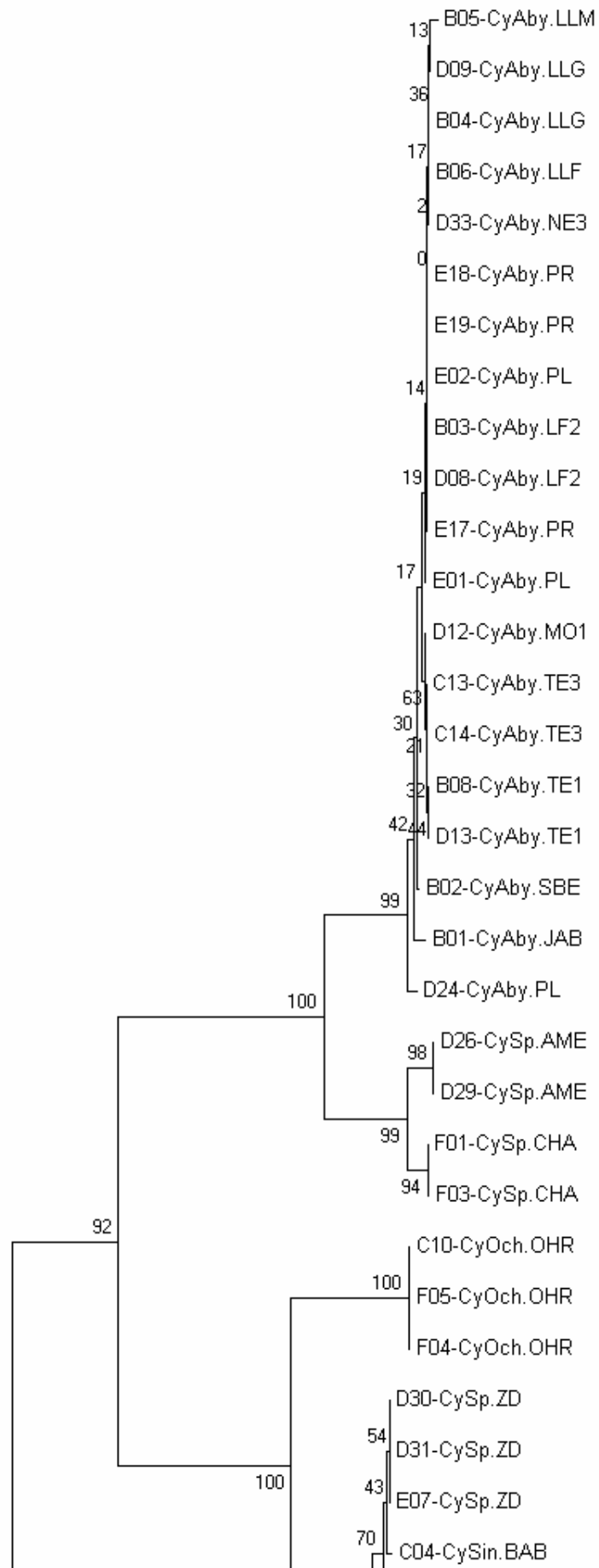
Obr. II.1: Fylogram ze všech 112 sekvencí části genu pro 12S srRNA vytvořený metodou UPGMA. Čísla u jednotlivých větví vyjadřují hodnoty bootstrap (1000 opakování). Označení sekvencí je vytvořeno systémem: číslo sekvence, zkratka druhů (viz tab. II.3 v příloze), kód lokality (viz tab. II.1 v příloze). Měřítka ukazuje rozdíl v nukleotidovém složení sekvencí.

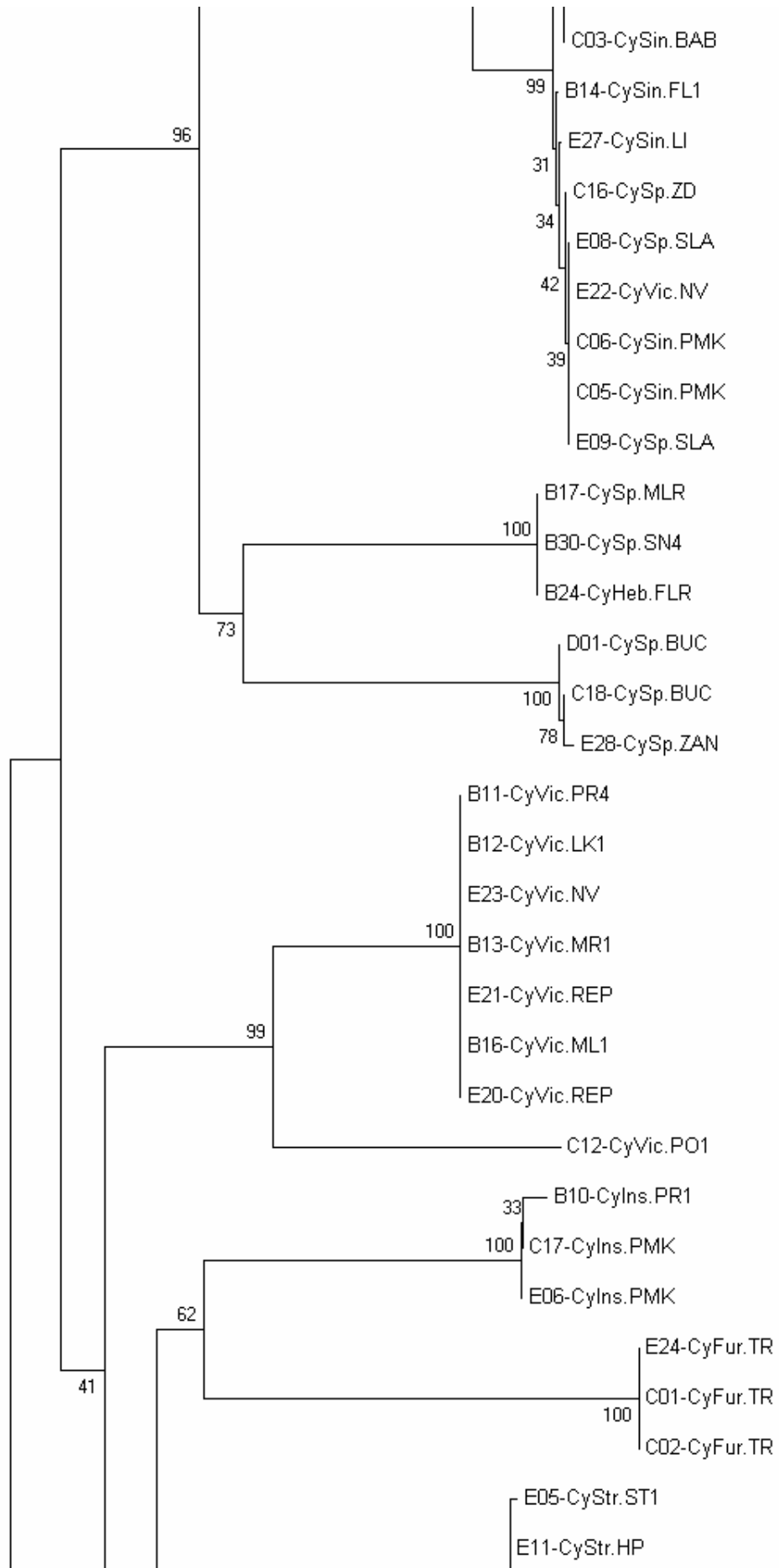


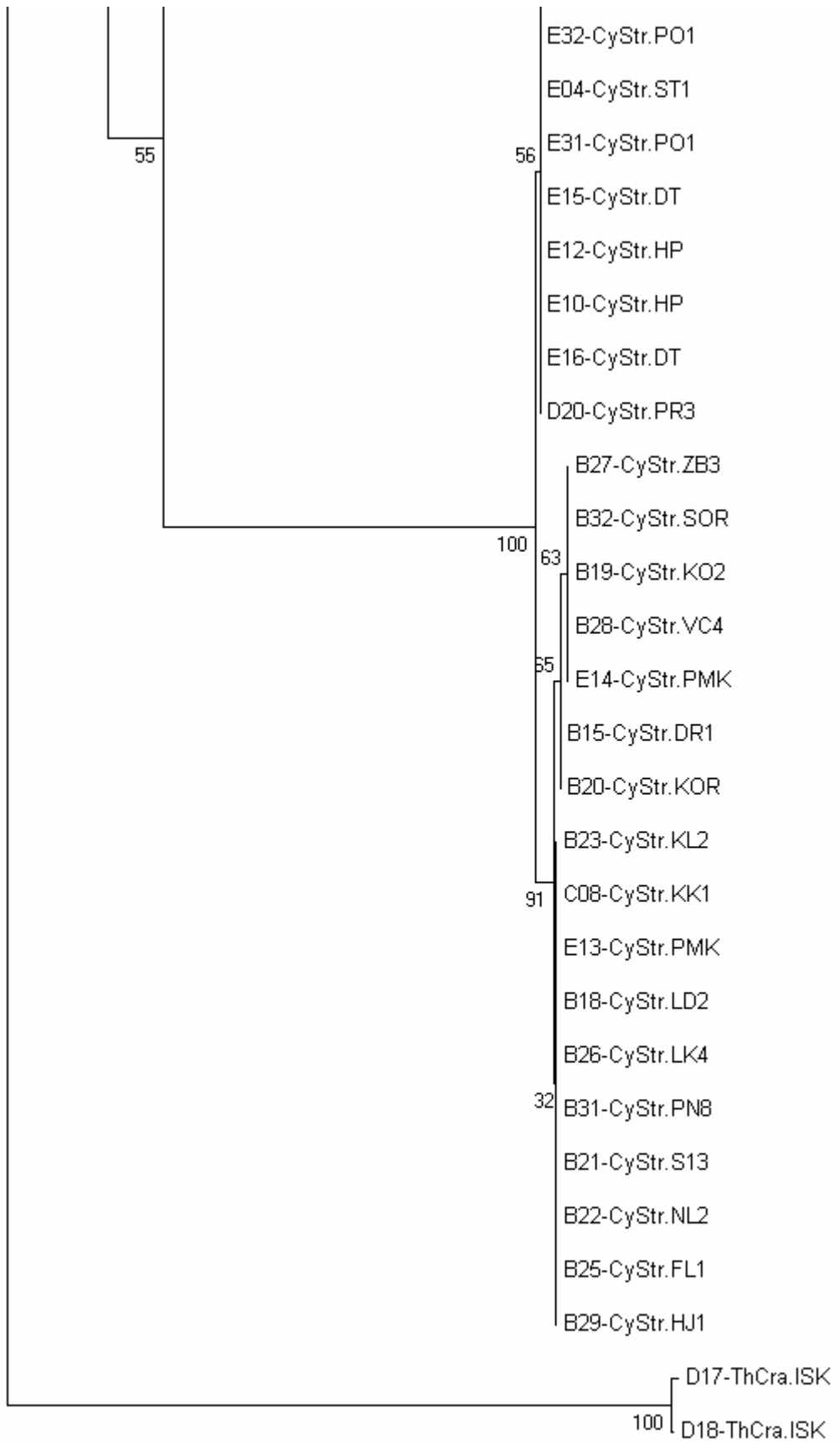




Obr. II.2: Fylogram z 89 sekvencí části genu pro 12S srRNA vytvořený metodou NJ.
Číslo u jednotlivých větví vyjadřují hodnoty bootstrap (1000 opakování).
Označení sekvencí je vytvořeno systémem: číslo sekvence,
zkratka druhů (viz tab. II.3 v příloze), kód lokality (viz tab. II.1 v příloze).
Měřítko odpovídá 5 % rozdílu v nukleotidovém složení sekvencí.







OBSAH PŘILOŽENÉHO CD

Přiložený kompaktní disk obsahuje sekvence použité k molekulárně-genetickým analýzám. Data jsou rozdělena do dvou hlavních složek (podle genu, ze kterého pocházejí), z nichž každá ještě do tří podsložek (podle formátu, v kterém jsou uložena).

Jednotlivé složky a jejich obsah:

COI - data z analýzy genu kódujícího enzym cytochrom oxidáza I (COI)

- AB1 – 12 chromatogramů ve formátu *.ab1
- FAS – 12 sekvencí ve formátu Fasta (*.fas)
- ALN – 2 soubory zarovnaných sekvencí ve formátu Fasta

12S - data z analýzy genu kódujícího enzym 12S srRNA

- AB1 – 112 chromatogramů ve formátu *.ab1
- FAS – 112 sekvencí ve formátu Fasta (*.fas)
- ALN – 4 soubory zarovnaných sekvencí ve formátu Fasta
- JAS – 4 sekvence ve formátu Fasta od Jany Sloukové

