

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie

**Bc. Tereza Rutová**



**Distribuce kryptických linií blešivců druhového komplexu *Gammarus fossarum* na rozhraní Českého masivu a Západních Karpat**

Lineage distribution of the *Gammarus fossarum* species complex (Amphipoda)  
across Bohemian Massif and Western Carpathians

Diplomová práce

Vedoucí práce: **prof. RNDr. Adam Petrušek, Ph.D.**

Praha, 2018

**Prohlášení:**

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

V Praze, 4. ledna 2018

.....

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych nejprve ráda poděkovala svému školiteli Adamovi Petruskovi za nadměrnou vřelost, trpělivost a finanční podporu trvajícící po celou dobu vzniku této práce. Děkuji za udělení množství užitečných rad, připomínek a nápadů nejen v metodické části, ale i v průběhu vzniku samotného textu práce. Slova díky si zaslouží Denis Copilaș-Ciocianu, který mi byl skvělým a vždy ochotným rádcem a konzultantem v metodické a vyhodnocovací části práce. Také je třeba poděkovat Petru Pařilovi, který opatřil značné množství vzorků z oblasti Západních Karpat a byl jedním z iniciátorů vzniku studie na toto téma. Děkuji také kolegům z katedry ekologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy a všem, kteří nám ochotně pomohli se sběrem vzorků napříč Českou a Slovenskou republikou. Díky radám a značné pomoci Michaila Rovatsose jsme se také mohli pustit do testování specifických primerů. Slova díky patří i Petru Janovi Juračkovi za pomoc se statistickým zpracováním dat.

Poděkování patří i celé mé rodině za neutuchající (nejen finanční) podporu po celou dobu mého studia. Můj drahý přítel si zaslouží taktéž vřelá slova díky za psychickou podporu za každé situace a značnou výpomoc v terénu (myslím, že ho to dokonce i bavilo).

## Abstrakt

Sladkovodní blešivci jsou významnou složkou permanentního makrozoobentosu tekoucích vod mírného pásu. Mají sníženou schopnost aktivní disperze, postrádají ve svém vývoji dormantní stádium, a tak jejich genetická variabilita často odráží dávnou geologickou historii daného areálu. Samotný rod *Gammarus* zahrnuje více než 200 popsáných druhů rozšířených v Palearktické oblasti. Mnohé dříve popsané taxony jsou ale ve skutečnosti diverzifikované druhové komplexy, což platí i pro našeho nejběžnějšího blešivce potočního (*Gammarus fossarum*). V této studii jsme se věnovali jejich diverzitě na rozhraní Českého masivu a Západních Karpat, mezi nimiž probíhá významná biogeografická hranice pro řadu dalších organismů. Testovali jsme, jestli se projevuje i ve fylogeografii zástupců permanentní vodní fauny. Analýza dvou mitochondriálních markerů odhalila přítomnost osmi divergentních linií *G. fossarum*, jež se liší i v jaderném genomu. Všech osm linií se vyskytuje v Západních Karpatech, zatímco Český masiv je osídlen pouze dvěma. Mikroendemické areály některých linií a běžný výskyt zřejmě dvou bazálních linií komplexu, jež nebyly nalezeny v jižnějších oblastech, podporují hypotézu, že tito blešivci přežili pleistocenní glaciální cykly i v západokarpatských refugiích. Předpokládáme, že klíčovou roli mohly hrát oteplené minerální prameny, jež jsou v Karpatech běžné a mohly tak zajistit stabilní prostředí i v chladných a suchých obdobích. V oblasti Vsetínska jsme studovali lokální kontakt čtyř linií. Důležité vysvětlující faktory ovlivňující distribuci linií byly místo na toku, a tudíž zřejmě jeho velikost či hloubka, a dále poloha toku v krajině. V lokálních povodích se vyskytují až tři linie i syntopicky a často se jejich distribuce liší mezi horními a dolními částmi toků. Sekvence jaderného markeru (gen pro 28 rRNA) u vybraných jedinců neprokázal křížení mezi těmito liniemi nebo introgresi. Pro zlevnění určování jednotlivých linií vyskytujících se na této lokální škále jsme vyvinuli a otestovali amplifikaci fragmentů genu pro 16S rRNA pomocí specifických primerů pro jednotlivé linie. Tato metoda bude využívána v budoucím výzkumu zaměřeném na ekologické interakce jednotlivých linií.

**Klíčová slova:** *Gammarus fossarum*, druhový komplex, kryptická diverzita, Český masiv, Západní Karpaty, specifické primery

## Abstract

Amphipods are an important component of temperate permanent freshwater macrozoobenthos. They have poor dispersal abilities, lack dormant stages, and their phylogeographies often reflect old historical processes. The genus *Gammarus* itself includes more than 200 described species spread in the Palearctic region. Many of the taxa previously described are, in fact, diversified species complexes, which is the case of our most common *Gammarus* (*G. fossarum*). We have studied their diversity on the transect across the Bohemian Massif and the Western Carpathians, which form a significant biogeographical boundary for a number of other organisms. We tested whether the border between these areas is reflected in the phylogeography of *G. fossarum* as a representative of permanent aquatic fauna. Analysis of two mitochondrial markers revealed the presence of eight divergent *G. fossarum* lineages, which also differed in the nuclear genome. All eight lineages were found in the Western Carpathians, while the Czech Massif is inhabited only by two. The microendemic areas of some lineages and the occurrence of two apparently basal lineages of this complex, which were not found in southern regions, support the hypothesis that these amphipods survived Pleistocene glacial cycles even in West Carpathian refuges. We assume that warm mineral springs, which are common in the Carpathians, could play a key role in ensuring a stable environment even in cold and dry periods. In the Vsetín region, I studied the local contact of four lineages. The position of a locality along the stream, which is related to width or depth and flow intensity, as well as the position of the stream itself in the landscape, could be important explanatory factors affecting the distribution of the lineages at small scale. In individual catchments, up to three lineages were found, often in syntopy, and their distribution frequently differed between the upper and lower parts of the streams. Consistent results from mitochondrial (16S) and nuclear (28S) markers support the hypothesis that studied lineages do not hybridize even in syntopy. At this local scale, we used for determination of individuals not only sequencing but also amplification of 16S gene fragments using lineage-specific primers. This method will be used in future research focusing on the ecological interactions between divergent lineages.

**Key words:** *Gammarus fossarum*, species complex, cryptic diversity, Bohemian Massif, Western Carpathians, lineage-specific primers

## Obsah

1	Úvod	7
1.1	Ekologie a biogeografie sladkovodních blešivců povrchových vod	7
1.2	Evoluční vývoj rodu Gammarus	12
1.3	Druhový komplex Gammarus fossarum	14
1.4	Český masív a Západní Karpaty – historický vývoj, klimatické a biogeografická hranice	16
2	Cíle práce	18
3	Metodika	19
3.1	Výběr lokalit a sběr vzorků	19
3.2	Laboratorní zpracování vzorků a sekvenace	24
3.2.1	Izolace DNA	25
3.2.2	PCR a UV elektroforéza	25
3.2.3	Purifikace produktů PCR	27
3.2.4	Amplifikace genu 16S specifickými primery	28
4	Zpracování dat a analýza	30
5	Výsledky	32
5.1	Diverzita a distribuce Gammarus fossarum v oblasti České a Slovenské republiky	32
5.2	Výsledky amplifikace úseků genu pro 16S rRNA specifickými primery	36
5.3	Detailní výskyt linií komplexu Gammarus fossarum na Vsetínsku	37
6	Diskuze	41
6.1	Diverzita a distribuce druhového komplexu G. fossarum v celoevropském kontextu	41
6.2	Distribuce linií na Vsetínsku	43
6.3	Určování linií za pomoci PCR se specifickými primery	45
6.4	Reprodukční izolace linií	46
7	Závěr	48
8	Seznam citované literatury	49
9	Seznam příloh	56

## 1 Úvod

Tato diplomová práce se zabývá molekulární analýzou našeho nejběžnějšího blešivce, a to blešivce potočního (*Gammarus fossarum*) v kontextu jeho diverzity a distribuce v oblasti České a Slovenské republiky. Vývoj terestrických i vodních ekosystémů od dob třetihor a klimaticky velmi rozkolísané období pleistocénu byly velkými hybateli ovlivňujícími diverzitu organismů v Evropě (např. Weiss et al. 2014). Oblast střední Evropy je velice zajímavá z hlediska biodiverzity, neboť se zde nachází významná biogeografická hranice, a to mezi Českým masivem a Západními Karpaty. Doposud není jasné, jak velkou roli může hrát tato biogeografická hranice roli na rozšíření dnešních zástupců permanentní vodní fauny. Mezi takové zástupce řadíme právě i blešivce potočního (*Gammarus fossarum*). Dříve se myslelo, že se jedná pouze o jeden druh, dnes již víme, že tvoří velice diverzifikovanou skupinu (např. Copilaș-Ciocianu & Petrusek 2015). Blešivci nemají ve vývojovém cyklu žádné dormantní stádium, a tak jsou vhodnou modelovou skupinou reflektující skrze svou bohatou diverzitu dávné historické procesy (Väinölä et al. 2008; Hou et al. 2011).

### 1.1 Ekologie a biogeografie sladkovodních blešivců povrchových vod

Jako blešivce označujeme laterálně zploštělé různonohé korýše (tj. podskupinu řádu Amphipoda, zejména taxony řazené do podřádu Gammaridea). Různonožci jsou diverzifikovanou skupinou korýšů obývajících výhradně vodní habitaty. Primárně obývají mořské prostředí, zde také můžeme nalézt až 80 % veškeré diverzity tohoto řádu. Zbývajících 20 % jejich celkové diverzity tvoří přes 1870 popsanych sladkovodních druhů (Väinölä et al. 2008). Blešivci podzemních vod jsou pravděpodobně druhově nejpočetnějšími živočichy obývající tento typ habitatu. Skoro polovina všech sladkovodních blešivců obývá právě hypogeické habitaty (Sket 1999).

Tělo sladkovodních blešivců bývá laterálně zploštělé, obvykle 2 až 40 mm dlouhé (obr 1). Ve sladkých vodách žije množství druhů a druhových komplexů v povrchových, tak i v podzemních vodách. Zástupci podzemních habitatů se často vyznačují hlavními morfologickými odlišnostmi od zástupců vod povrchových, jako je například nepřítomnost očí a ztráta pigmentu (Väinölä et al. 2008; Fišer et al. 2014; Copilaș-Ciocianu et al. 2018). Kromě toho jsou ale například zástupci rodu *Niphargus* mnohem lépe přizpůsobeni k životu

v hypoxickém prostředí na rozdíl od epigeických blešivců rodu *Gammarus* (Hervant et al. 1995).

Obr. 1 Typický zástupce sladkovodních blešivců (*Gammarus fossarum*). Autor: Denis Copilaș-Ciocianu



Blešivci se především vyskytují v nahromaděném organickém materiálu malých i velkých toků, ale i poblíž litorální vegetace jezer. Je ale důležité, aby se nejednalo o vody vysoce znečištěné (Väinölä et al. 2008; Hou & Sket 2016). Pelagické či parazitické formy jsou v pevninských vodách vzácné, spíše se takové formy vyskytují v mořském prostředí. Blešivci se mohou výrazně lišit v preferenci potravy, existují druhy herbivorní, detritovorní, dravé, či omnivorní. Jsou velice důležitou složkou potravního řetězce vodních ekosystémů, protože slouží jako vhodná potrava živočichů, kteří se vyskytují na vyšší trofické úrovni, a zároveň jsou detritovorní druhy významnými rozkladači organického materiálu (Macneil et al. 1997; Väinölä et al. 2008).

Blešivci postrádají ve svém vývoji jakékoliv dormantní stádium, což je řadí mezi živočichy s omezenou schopností přežívání nepříznivých podmínek a také se sníženou schopností pasivní disperze (Väinölä et al. 2008). Mají také omezenou schopnost aktivní disperze. Vektorem přenosu na kratší vzdálenosti však mohou být například vodní ptáci (Meyran & Taberlet 1998; Swanson 1984). Je tedy nasnadě využít právě blešivce jako modelový organismus pro studium fylogeneze a fylogeografie obyvatel pevninských vod



(Hou et al. 2007). Jejich dnešní distribuce dle všeho reflektuje velmi dávné procesy, které zapříčinily rozvoj diverzity v rámci této skupiny živočichů (Väinölä et al. 2008).

Je důležité zmínit, že u dlouhodobě izolovaných, geneticky odlišných linií blešivců se vytvořily prezygotické bariéry, které by měly zabránit hybridizaci. U odlišných linií blešivců není v přírodě hybridizace běžná (Müller 1998). V laboratorních podmínkách sice ke spárování a kopulaci geneticky odlišných linií došlo, nelze ale s jistotou říci, zda by potomci byli v přírodě konkurenceschopní a zda by byli schopni další reprodukce (Müller 1998; Lagrue et al. 2014; Galipaud et al. 2015).

Sladkovodní různonožci jsou polyfyletickou skupinou, neboť v průběhu posledních 70 milionů let docházelo k množství nezávislých kolonizací pevninských vod z dřívějších oceánů Tethys a Paratethys (například Siegismund & Müller 1991; Väinölä & Väinölä 2003; Wellborn et al. 2005; Hou et al. 2011). Dávná oblast oceánu Tethys je považována za jeden z významných světových ohnisek diverzity pro terestrické i vodní ekosystémy. Význam této oblasti souvisí s bohatou geologickou historií a heterogenní topografií (Hou et al. 2011).

V minulosti došlo ke třem nezávislým invazím předků současných sladkovodních skupin blešivců do pevninských vod tehdejších kontinentů Gondwany a Laurasie. Nejprve před přibližně 250 miliony let osídlili předchůdci skupiny Crangonyctoidea vody Pangey (Väinölä et al. 2008). Přítomnost skupiny Paramelitidae ve vodách Austrálie a Jižní Afriky vypovídá o společném původu jejich předků obývajících Gondwanu ještě dříve, než došlo k jejímu rozpadu v období jury. Třetí typicky sladkovodní skupinu tvoří zástupci skupiny Gammaroidea, jejíž předkové osídlili vody Laurasie (Väinölä et al. 2008).

Vznik větších či menších bariér je jedním z hlavních faktorů ovlivňující vznik nových druhů (Hou et al. 2011). Opakované tektonické výzdvihy a ústup oceánu Tethys, který vznikl v druhohorách mezi kontinenty Laurasie a Gondwana, vyústilo v nárůst heterogenity habitatů a volného prostoru pro množství organismů (Salvo et al. 2010; Hou & Sket 2016).

Odhady stáří jednotlivých druhů a druhových komplexů blešivců bývají složité, neboť fosilní nálezy různonožců jsou velice vzácné a není tedy možné na jejich základě dobře datovat stáří linií. Nejstarší nalezené fosilie jsou z období eocénu (před cca 34 - 56 miliony let), i když řád Amphipoda vznikl v mořském prostředí již před cca 250 miliony let a první sladkovodní formy se diverzifikovaly po rozpadu Pangey před 180 miliony let (Väinölä et al. 2008; Hou et al. 2011).

Sladkovodní blešivci jsou rozšíření v chladném temperátních prostředí v podzemních a povrchových tekoucích i stojatých vodách. V tropických oblastech je lze nalézt jen

v podzemních habitatech. Celkem 70 % známých druhů obývá oblast Palearktu, 13 % oblast Nearktu, 7 % Neotropis, 6 % Australis a pouze 3 % Afrotropis. Dominantním rodem povrchových vod napříč oblastí Palearktu je *Gammarus*, naopak v oblasti Neotropis a Nearktis nejvíce převládá rod *Hyaella*. V evropských podzemních vodách převládá rod *Niphargus*, jehož vysoká diverzita je doložena z krasových jeskyní střední a jižní Evropy, kdy bylo určeno množství endemických druhů a i kryptických linií (například Lefébure et al. 2007; Trontelj et al. 2009; Hou et al. 2011; Copilaș-Ciocianu et al. 2018). Dále pak v Severní Americe (rod *Crangonyx*) a Austrálii (čeleď Paramelitidae). Malý počet druhů registrujeme v oblasti tropů a oblastí vyšších zeměpisných šířek, které byly postiženy pleistocenními glaciály. Největší diverzita je ve středních zeměpisných šířkách, a to konkrétně v oblasti Středomoří, jižní části Severní Ameriky a jižní Austrálie (Väinölä et al. 2008).

Ve studiích zabývajících se molekulární analýzou sladkovodních blešivců v Evropě a odhadem stáří jejich stáří kalibrovali autoři molekulární hodiny většinou na základě několika historických událostí, například ústup oceánu Tethys od východní oblasti Pamíru před 38 miliony let, vznik jezera Bajkal před 28 miliony let a období messinské salinitní krize před 6 miliony let (Hou et al. 2011). V nejnovější studii Hou & Sket (2016) však poukazují na fakt, že nastavení molekulárních hodin by se mohlo odrážet od jiných historických událostí. Vytvořili 10 odlišných kalibračních schémat, na základě kterých se jednotlivé výsledky odhadu stáří linií v rámci čeledi Gammaridae rozcházejí a některé jsou významně nižší než v ostatní recentní literatuře (Hou & Sket 2016); zároveň ale nijak neřeší rozpor mezi odhadem stáří rodu *Gammarus* na základě jimi určeného nejdůvěryhodnějšího kalibračního schématu (cca 25 mil. let) a fosilním záznamem, v němž jsou fosilie údajně tohoto rodu o několik milionů let starší (Hou et al. 2011). Recentní práce se zatím přiklání k vyšším odhadům stáří skupiny (čemuž odpovídá i velmi vysoká genetická variabilita, resp. divergence linií).

Kalibrace použitá v naší práci Copilaș-Ciocianu et al. (2017) odpovídá jiným studiím. My jsme kalibraci sestavili na základě čtyř historických událostech (vznik nejstarších linií blešivců v jezeře Ohrid, geologický pokles v oblasti východní Evropy v období středního miocénu, radiace blešivců v jezeře Bajkal a regrese oceánu Paratethys v období eocénu).

Například Grabowski et al. (2017) uvádějí ve své studii kalibrační hodiny založené na dvou historických událostech, a to ústup Messinského moře před asi 2,6 miliony let a s tím související formování dunajské říční sítě a pak vznik dávného jezera Bajkal přibližně před 27 miliony let. Dále Mamos et al. (2016) nastavují kalibrační hodiny kromě těchto dvou událostí také na radiaci blešivců v jezeře Ohrid, k čemuž došlo před 1 až 3 miliony let a také na

oddělení Černého moře a Kaspického jezera před asi 4,3 miliony let. Dnes předpokládáme, že diverzifikace blešivců je úzce spjata s výše zmíněnými geomorfologickými událostmi, nelze ale s určitostí říci, zda ke vzniku tak velké diverzity relativně brzy po nich (což předpokládají daná kalibrační schémata) nebo až podstatně později.

Velký podíl na nárůstu diverzity blešivců po světě mají adaptivní radiace v dávno vzniklých sladkovodních jezerech. Taková jezera mívají často velmi stabilní prostředí a dávají tak prostor adaptivním radiacím různých živočišných druhů (Schön & Martens 2004). Historie každého jezera se liší a je často těžko rozřešitelnou otázkou, zda radiace probíhaly přímo v jezerech, či i (nebo dokonce zejména) v jejich přítocích. Mezi jezera, kde byla objevena značná variabilita druhů, patří jezero Bajkal, které je největší a nejstarší sladkovodní jezero na světě. Zatím zde bylo popsáno na 265 endemických druhů blešivců (Kamaltynov 1999). Bezpochyby se ale nejedná o číslo konečné. Tamější fauna blešivců se mohla vyvíjet po velice dlouhou dobu, a tak není divu, že se mnohé druhy výrazně liší stavbou a barvou těla, preferencí habitatu a potravy. Tato různorodost lze srovnávat s variabilitou druhů mořských různonožců (například Takhteev 2000). Morfologická rozmanitost bajkalských blešivců není daleko od celé rozmanitosti řádu Amphipoda (Hou & Sket 2016), ačkoli se jedná „pouze“ o radiaci vnitřní skupiny rodu *Gammarus* (Englisch et al. 2003; MacDonald et al. 2005; Hou & Sket 2016).

Dalšími takovými jezery, kde bylo množství endemických druhů odhaleno, jsou jezero Ohrid, které se nachází na Balkánském poloostrově (radiace v rámci komplexu *Gammarus balcanicus*) (Wysocka et al. 2013; Wysocka et al. 2014), jezero Titicaca, kde je velká variabilita zástupců rodu *Hyaella* (Coleman & Gonzalez 2006) a jezero Fuxian Hu v Číně (radiace v rámci komplexu *Anisogammarus*) (Sket & Fišer 2009).

Velice zajímavou oblastí s vysokou variabilitou odlišných druhů blešivců je Pontokaspická oblast (Hou & Sket 2016). V průběhu posledních šesti milionů let prošla tato oblast výraznými geomorfologickými změnami, s čímž souvisí drastické změny v salinitě vody a kolísání hladiny moří (Dumont 1998). Díky těmto změnám jsou tamější druhy velice přizpůsobivé k životu ve sladké i brakické vodě. Monofyletická evoluční linie, jejíž součástí jsou především rody *Echinogammarus*, *Dikerogammarus*, *Obesogammarus* a *Pontogammarus* (Cristescu & Hebert 2005) vznikla přibližně před 71 miliony let (Hou et al. 2011).

V dnešní době dochází k invazím řady druhů či druhových komplexů (*Chelicorophium curvispinum*, *Dikerogammarus villosus*, *D. haemobaphes*, *Pontogammarus robustus* atd.) do

evropských povodí plavebními kanály, s balastní vodou byli dovezeni tito pontokaspičtí blešivci i do přístavů v Baltském moři (Bij de Vaate et al. 2002). Zatím jediným doloženým mezikontinentálním pontokaspickým kolonizátorem mezi blešivci je *Chaetogammarus ischnus*, který je rozšířen ve vodách Severní Ameriky; opačným směrem zamířil *Gammarus tigrinus*, který byl dovezen ze Severní Ameriky do Velké Británie a Německa (Vanderploeg et al. 2002). Nelze ale s jistotou říci, zda se jedná o jediné invazní druhy, jež překročily hranice kontinentů, pravděpodobně jich bude více, neboť tyto invaze prochází velice dynamickým vývojem.

Pro pochopení dnešní biogeografické struktury a procesů diverzifikace čeledi Gammaridae jsou potřebné detailnější fylogeneticky zaměřené studie (Hou et al. 2011), jelikož nebyl doposud odhalen veškerý skrytý potenciál mechanismů diverzifikace této čeledi (Cristescu & Hebert 2005; Hou et al. 2011).

Nicméně vlivy historických událostí, jako byly období glaciálů, nebo kolísání hladiny moří na druhově bohatou diverzitu jsou jen začátkem, důležité je pochopení, jak tyto události ovlivnily následný vývoj jednotlivých ekosystémů (Yang et al. 2013). S geomorfologickými proměnami prostředí souvisí i množství enviromentálních faktorů, na které bylo nutné se adaptovat, a které zcela jistě mohly hrát významnou roli v distribuci jednotlivých linií na lokálních škálách. Takovými faktory může být například chování v období páření, preference specifických feromonů, pH hodnoty vody, nadmořská výška, množství kyslíku v toku, charakter toku, či chemické stresory (Hervant et al. 1995; Eisenring et al. 2016; Feckler et al. 2012; Feckler et al. 2014).

## 1.2 Evoluční vývoj rodu *Gammarus*

V rámci řádu Amphipoda patří *Gammarus* mezi rody s největším množstvím popsaných druhů (Hou et al. 2011). Tento rod je široce rozšířen po celé severní polokouli v mořském, brakickém i sladkovodním prostředí (Hou & Li 2004). Karaman & Pinkster (1977, 1987) rozdělili tento rod do tří hlavních sladkovodních skupin na základě morfologických odlišností, a to na skupiny *G. pulex*, *G. balcanicus* a *G. roeselli*. Toto rozdělení se ale v dnešní době již nepoužívá, neboť se v mnoha studiích ukázalo, jako je tento rod enormně diverzifikovaný (Hou et al. 2007).

Pokud pomineme kontroverzní studii Hou & Sket (2016), jež naznačuje podstatně mladší datace, je vznik rodu *Gammarus* odhadován na dobu před 61 miliony let (Hou et al.

2011). Došlo k tomu v mořském prostředí v oblasti Západního Palearktu, později se ale rozšířil i v oblasti Nearktis a Východního Palearktu. Sladkovodní habitáty pak poprvé kolonizoval před 43 miliony let v období středního miocénu. Hou et al. (2011) uvádějí, že zřejmě nejstarší fosilie rodu *Gammarus* pochází z doby spodního oligocénu (ca 28-34 milionů let).

V rámci čeledi Gammaridae pozorujeme evoluci třech hlavních linií, kdy evoluce těchto linií vykazuje prvky rozdílné rychlosti diverzifikace a odlišné distribuci. Linie rodu *Gammarus* prošla rychlou radiací napříč euroasijským kontinentem a Severní Amerikou, zatímco rody linie obývající dnešní pontokaspickou oblast se vyvíjely v okolí povodí Paratethys (Cristescu & Hebert, 2005) a jedinci sarothrogammaridní linie zůstaly pouze v malé oblasti dřívějšího výskytu oceánu Tethys, dnes se jedná o oblast Pamíru (Barnard & Barnard 1983; Hou et al. 2011).

Zástupci rodu *Gammarus* se dobře šířili napříč evropsko-asijskou oblastí, kdy například druhové komplexy *Gammarus lacustris* a *Gammarus balcanicus* dosáhly značné vnitrodruhové diverzity právě díky pozdějšímu ústupu oceánu Paratethys a větší kontinentalitě evropsko-asijské oblasti v období miocénu (Hou et al. 2011).

V současné době lze v rámci rodu *Gammarus* popsat čtyři morfologicky a geograficky oddělené větve. Jedná se o větev evropskou, zahrnující druhy a druhové komplexy *Gammarus fossarum*, *G. pulex*, *G. roeselii* a *G. komareki*, dále orientální větev zahrnující všechny východoasijské druhy, a zbylé dvě větve zahrnující druhový komplex *Gammarus lacustris* a druhový komplex *G. balcanicus*, přičemž obě primárně obývají oblast Evropy a střední Asie (například Meyran et al. 1997; Hou et al. 2011; Copilaș-Ciocianu 2013; Copilaș-Ciocianu & Petrusek 2015; Grabowski et al. 2017; Copilaș-Ciocianu et al. 2017a). Ačkoliv se různonožci obývající jezero Bajkal nebo pontokaspickou oblast mohou velice morfologicky lišit od typických blešivců rodu *Gammarus*, bylo potvrzeno, že bajkalští zástupci jsou vnitřní skupinou rodu *Gammarus* a pontokaspičtí zástupci jsou součástí čeledi Gammaridae (Hou et al. 2014; Hou & Sket 2016).

Většina nám známých blešivců jsou druhy či druhové komplexy s relativně omezeným a dobře definovaným areálem výskytu (Hou et al. 2011). Za nejrozšířenější druh byl dlouhou dobu považován *Gammarus lacustris*, obývající kromě cirkum-boreální části také jižní Evropu a střední Asii. Na základě molekulárních analýz však bylo zjištěno, že *G. lacustris* není jeden druh, ale tvoří celý druhový komplex (Meyran & Taberlet 1998; Vainio & Vainölä 2003; Hou et al. 2011; Matafonov & Bazova 2014). Druhový komplex *G. lacustris*

pravděpodobně vznikl v Asii a později se rozšířil do Evropy a Severní Ameriky (Vainio & Väinölä 2003; Hou et al. 2007).

### 1.3 Druhový komplex *Gammarus fossarum*

*Gammarus fossarum*, blešivec potoční, je nejrozšířenějším blešivcem na našem území. Na území České republiky se vyskytují zejména populace *G. fossarum* sensu stricto (viz výsledky), areál rozšíření tohoto komplexu zahrnuje rozsáhlé oblasti napříč celou Evropou (Barnard & Barnard 1983; Copilaș-Ciocianu et al. 2017a). K bohaté diverzitě tohoto komplexu přispívá množství bariér zabraňujících nebo omezujících další šíření jednotlivých populací v daném areálu (Siegismund & Müller 1991), navíc k introgresi v oblastech sekundárního kontaktu linií zřejmě nedochází (Müller 1998). Mnohé studie ale tvrdí, že pro distribuci některých linií nejsou hranice povodí limitující (Westram et al. 2013; Weiss & Leese 2016; Copilaș-Ciocianu et al. 2017). Důsledky kolonizace, extinkční události, fluktuace velikostí populací a selekčního tlaku, fragmentace habitatu (a v současnosti i znečištění vody) by též mohly hrát důležitou roli v populační struktuře tohoto blešivce. To ukazují například odlišné adaptace na faktory prostředí u linií v Západní Evropě (například Siegismund & Müller 1991; Weiss & Leese 2016).

Období vzniku tohoto druhového komplexu je odhadováno na dobu před asi 33 miliony let (eocén) v oblasti oceánu Tethys (Hou et al. 2011). K diverzifikaci vlastních linií v rámci tohoto komplexu mělo docházet především v období miocénu (23-5,3 milionu let) (například Hou et al. 2011; Weiss et al. 2014; Copilaș-Ciocianu & Petrušek 2015; Copilaș-Ciocianu et al. 2017a).

Ačkoliv je v současné době nemožné říci, jaký je přesný počet linií, byly v Evropě doposud objeveny tři hlavní divergentní větve a nově i další skupina. Jedná se o větev středo-západoevropskou, jiho-východoevropskou, východoevropskou a nově také skupinu středoevropskou (například Siegismund & Müller 1991; Weiss et al. 2014; Copilaș-Ciocianu & Petrušek 2015; Copilaș-Ciocianu et al. 2017a). Starší studie se zaměřovaly na oblasti v západní Evropě, kde byly objeveny odlišné linie, za centrum diverzity ale dnes považujeme oblast jihovýchodní Evropy, v oblasti Karpat a Dinárského krasu. Celkem bylo v Evropě odhaleno na 49 divergentních linií (Weiss et al. 2014; Copilaș-Ciocianu & Petrušek 2015; Copilaș-Ciocianu et al. 2017a) a toto číslo jistě není konečné.

Populace z oblastí jihozápadních Karpat, jihovýchodní Evropy a linie z oblastí střední a západní Evropy se pravděpodobně oddělily asi před 19 miliony let (Copilaș-Ciocianu & Petrusek 2015) v tehdejší pohoří nazývaném „Tisza“ (Popov et al. 2004). Vznik samotných linií z východoevropské větve tohoto druhového komplexu je dáván do souvislosti především s fluktuací hladiny oceánů a s nimi i související vznik izolovaných sladkovodních habitatů právě v období miocénu. Pravděpodobně nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím další diverzifikace linií středo-západoevropské větve bylo přežívání pleistocenních glaciálů v odlišných refugiích (Siegismund & Müller 1991; Müller 1998; Müller 2000; Westram et al. 2011).

Weiss et al. (2014) odhalili minimálně 23 mikroendemických linií v oblasti Dinárského krasu, jejichž divergence mohla být zapříčiněna izolací sladkovodních habitatů tehdeším oceánem Paratethys v období miocénu (Rögl 1999; Hou et al. 2011). Velká genetická variabilita nalézaná v rumunských Karpatech a pohoří Apuseni zřejmě souvisí s výraznými geomorfologickými proměnami Karpat v období před 10 až 17 miliony let (Copilaș-Ciocianu & Petrusek 2015). Copilaș-Ciocianu & Petrusek (2015) ve své studii poukázali na nejméně 16 mikroendemických linií v geograficky oddělených areálech jihozápadních Karpat.

V nejnovější studii, na které jsem se v rámci diplomové práce podílela (Copilaș-Ciocianu et al. 2017a), jsme charakterizovali na základě mitochondriální DNA bazální linie v rámci celého druhového komplexu *G. fossarum*. Tyto bazální linie jsme charakterizovali v oblasti Západních Karpat na našem území a na Slovensku, tzn. že v oblasti mnohem vyšší zeměpisné šířky, než v jaké bylo popsáno centrum diverzity tohoto komplexu. Na hranici mezi Českým masivem a Západními Karpaty dochází ke kontaktu hned několika hlavních větví tohoto komplexu, kdy se zde vyskytují populace větve středo-západoevropské, východoevropské a nově charakterizované skupiny středoevropské (Copilaș-Ciocianu et al. 2017a). Předpokládáme, že linie obývající Západní Karpaty přežily pleistocenní glaciály v lokálních refugiích (Copilaș-Ciocianu & Petrusek 2015; Copilaș-Ciocianu et al. 2017a).

Studie z období minulého století se zaměřovaly především na diverzitu v povodí řek Dunaj, Rýn, Isar a Isère (Siegismund 1988; Siegismund & Müller 1991; Müller 1998; Meyran et al. 1998; Müller 2000). Výsledky studií založených dříve na základě alozymů a v dnešní době běžněji na základě mtDNA se shodují v tvrzení, že v oblasti střední a západní Evropy se vyskytují tři základní linie, označované ve starší literatuře jako linie A, B a C (Siegismund 1988; Siegismund & Müller 1991; Müller 2000; Westram et al. 2010). Jako typická forma blešivce potočního byla označena linie A, která se vyskytuje mimo jiné v okolí Řezna

(Regensburgu), kde je typová lokalita druhu *Gammarus fossarum* (Müller 1998). Západní hranicí výskytu populací této linie je řeka Rýn (citace), na východě zasahuje až do Západních Karpat a je nejběžněji se vyskytující linií na našem území (Copilaș-Ciocianu et al. 2017a).

#### **1.4 Český masiv a Západní Karpaty – historický vývoj, klimatické a biogeografická hranice**

Značnou část území České republiky tvoří velký geologický celek Českého masivu, zatímco východní část Moravy a Slezska patří vnější okrajové části Západních Karpat, které pokračují dále na Slovensko. Z hlediska biogeografického vývoje a vývoje ekosystémů je zásadní, že oba tyto celky prošly výrazně odlišným geologickým vývojem (Chlupáč et al. 2011; Kováč et al. 2016).

Zásadním mezníkem ve vývoji Českého masivu bylo variské vrásnění před 380-300 miliony let, kdy došlo k vyvrásnění rozsáhlého variského horstva. Dnes tvoří zbytky tohoto horstva naše hraniční pohoří. Naproti tomu celá karpatská soustava je mnohem mladší než Český masiv. Byla zformovaná až v průběhu alpinského vrásnění v období od svrchní křídly do terciéru (Chlupáč et al. 2011).

Vzhledem k tomu, že k divergenci linií blešivců druhového komplexu *Gammarus fossarum* docházelo od dob terciéru (např. Copilaș-Ciocianu & Petrussek 2015), je pro nás důležitý především vývoj těchto dvou celků právě od této doby do současnosti. V období miocénu byly značné části Karpat zaplaveny oceánem Tethys (Popov et al. 2004; Chlupáč et al. 2011; Hou & Li 2017). V závislosti na tektonických pohybech měla v této době říční síť zcela jiný systém než dnes. Značné výzdvihy Českého masivu jako celku urychlovaly spád vodních toků (Chlupáč et al. 2011).

Ještě v období paleogénu (před 23–66 miliony let) byla částečně pod hladinou oceánu Tethys oblast Moravskoslezských Karpat, kdy moře pronikalo tektonickými depresiemi až do východních Čech. Koncem miocénu (před asi 5 miliony let) moře ustoupilo a teprve od dob pliocénu, kdy jsou oblasti Karpat na našem území již protkány pouze sladkovodními ekosystémy bez vlivu ekosystémů mořských, má karpatská oblast společný vývoj s Českým masivem (Chlupáč et al. 2011).

V období pleistocénu (před 1–3 miliony let) docházelo ke střídání chladných a teplejších období glaciálů a interglaciálů. Období glaciálů se vyznačovalo chladným a suchým



klimatem. Ačkoliv se dříve myslelo, že zdejší prostředí připomínalo tundru a step (Chlupáč et al. 2011), ukazuje se, že i v těchto dobách zde mohly existovat zalesněné plochy (Kuneš et al. 2008). V časech interglaciálů bylo naopak klima teplejší a vlhčí s rozsáhlým zalesněním. Období glaciálů se vyznačují zmenšením areálů výskytu mnohých organismů. Spolu s tím se zřejmě mnohé areály přesunuly směrem na jih (Feliner 2011). Ačkoliv většina refugí se nacházela v oblastech jižní, jihozápadní a jihovýchodní Evropy, bylo možné i v oblasti střední Evropy najít lokální refugia s vhodnými podmínkami pro přečkání nepříznivých období glaciálů (Willis & van Andel 2004; Schmitt 2007; Svenning et al. 2008; Juříčková et al. 2014a).

Pro přežití blešivců byla nutná přítomnost organického detritu jakožto potravního zdroje, a především permanentních vodních toků. Takovými místy mohly být mimo jiné přirozeně oteplené prameny, jež jsou v oblastech Karpat hojné (Franko & Kolářová 1985), zřejmě i z toho důvodu, že celá soustava pohoří Karpat je mnohem mladší než Český masiv a tím pádem je doposud také tektonicky aktivnější.

Již dříve se ukázalo, že hranice mezi Českým masivem a Západními Karpaty tvoří důležitou biogeografickou hranici pro distribuci organismů permanentních vod, jako jsou pijavky (Schenkova et al. 2009), máloštětinatci (Schenkova et al. 2010), plži (Horsák & Černohorský 2008; Horsák et al. 2016), stejně jako larvy vodního hmyzu, např. vážky (Waldhauser 2016a,b). Podstatné rozdíly ve složení fauny napříč oběma areály jsou rovněž patrné u terestrických bezobratlých živočichů (např. Schmitt & Rönn 2011; Juříčková et al. 2014 b).

## 2 Cíle práce

Hlavním cílem této studie bylo zjištění, jaká je diverzita a distribuce linií druhového komplexu *Gammarus fossarum* na území České a Slovenské republiky (dále ČR/SK), tedy napříč oblastmi Českého masivu a Západních Karpat (dále ČM/ZK). Diverzita a distribuce blešivců v této oblasti nebyla donedávna pomocí molekulárních metod zkoumána. Byly známy pouze linie vyskytující se v západní Evropě a v oblasti jihovýchodní Evropy.

Pilotní analýzu vzorků od Petra Pařila z hraniční oblasti mezi Českou a Slovenskou republikou provedl Denis Copilaș-Ciocianu. Výsledky odkryly výskyt vícero vysoce odlišných linií. A na tyto prvotní výsledky navázala moje práce.

Nejprve jsme si položili otázku, jak velká je diverzita blešivců tohoto komplexu v daném areálu, a jak vypadá distribuce zdejších linií. Specificky jsme testovali hypotézu, že se na diverzitě druhového komplexu *G. fossarum* projeví vliv biogeografické hranice mezi Českým masivem a Západními Karpaty. Na této komplexní fylogenetické a fylogeografické studii jsem se podílela určováním zástupců jednotlivých nasbíraných populací pomocí sekvenace mitochondriálních markerů. Výsledky jsme úspěšně publikovali během r. 2017 (příloha 5, Copilaș-Ciocianu et al. 2017a).

Poté jsme pro moji diplomovou práci stanovili další cíl, a to analýzu distribuce linií na menší škále v kontaktní zóně. Naše hypotéza byla taková, že nalezneme syntopické populace a testovali jsme, zda se projeví i nějaké ekologické odlišnosti mající vliv na distribuci linií, ačkoliv na velké škále pozorovány nebyly. Dále jsme u linií (určených na základě mitochondriální DNA), které se potkávají, testovali hypotézu, že u syntopickým populací nedochází k introgresi a sdílení jaderné DNA.

Pro diplomovou práci jsme stanovili také jeden cíl metodický, a to pokusit se navrhnout a otestovat využití druhově specifických primerů amplifikujících fragmenty mitochondriálního genu pro 16S rRNA. Návrh primerů vycházel ze spolupráce Denise Copilaș-Ciocianu, Michaila Rovatsose a Adama Petruska. V ideálním případě by tyto nové primery měly amplifikovat úseky genu 16S o různých délkách, pak by bylo možné více párů zkombinovat v jedné polymerázové řetězové reakci (multiplex). Pokud by se prokázala funkčnost navržených druhově specifických primerů, byla by laboratorní práce související s určováním odlišných mitochondriálních linií nejen zrychlena, ale především zlevněna, neboť by se ušetřily náklady vynaložené na sekvenaci vzorků.

### **3 Metodika**

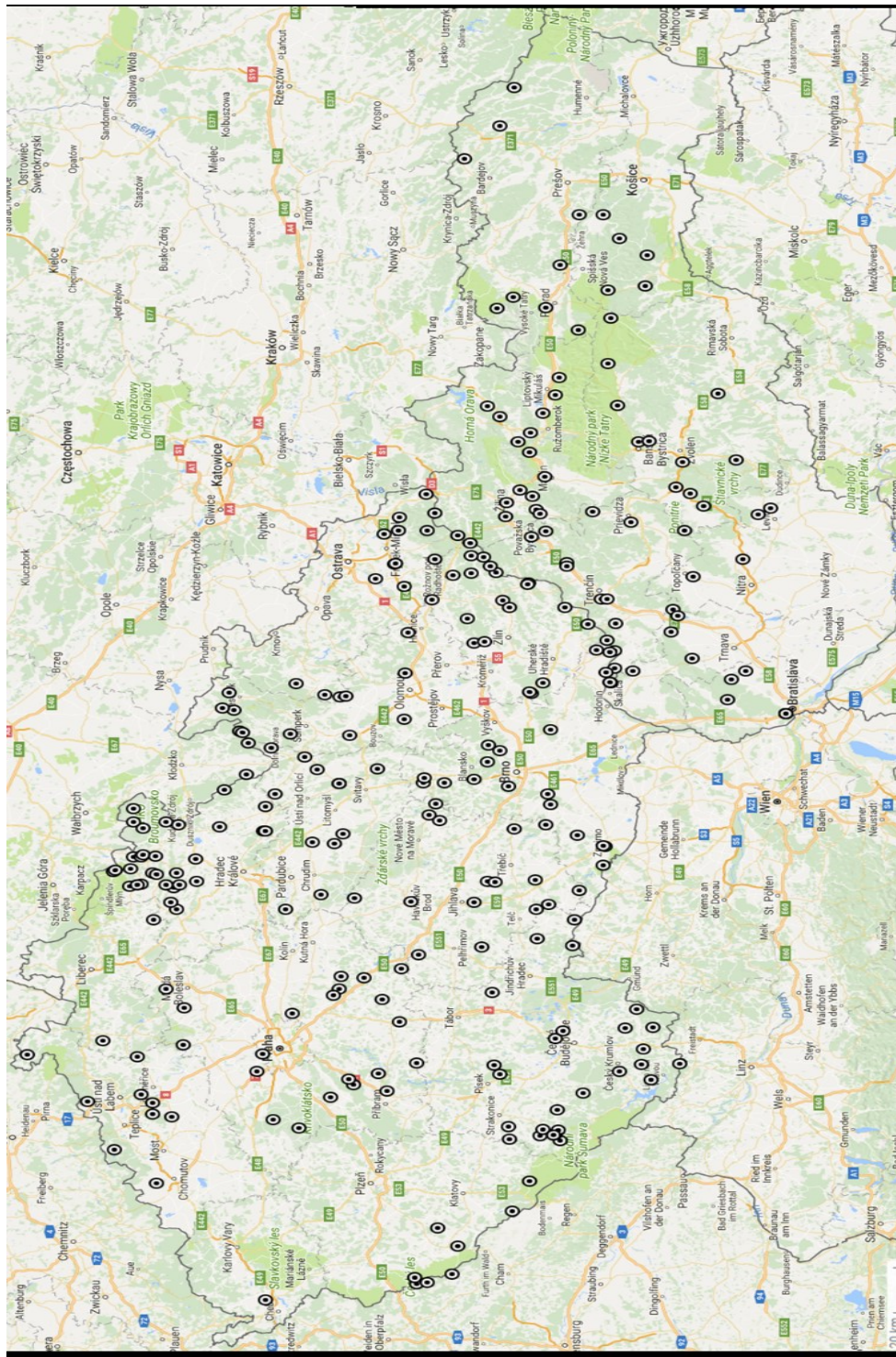
#### **3.1 Výběr lokalit a sběr vzorků**

Pro analýzu dat napříč Českou a Slovenskou republikou probíhal sběr vzorků v letech 2014 až 2016 v takové míře, aby byla celá oblast co možná nejvíce pokryta a nevznikaly výrazné mezery v mapě (obr. 2). I přes intenzivní snahu zůstala prázdná místa, kdy například v oblasti dolního Podyjí, Vysočiny a Plzeňska se nám nepodařilo blešivce tohoto druhového komplexu nalézt, nebo byl sběr jen několika málo jedinců velice zdlouhavý. Zde mohou hrát výraznou roli nepříznivé faktory prostředí, jako například nevhodné pH (Eisenring et al. 2016), lokální geologie, či takové znečištění, organické zatížení nebo charakter toků, který neumožňuje výskyt blešivců tohoto komplexu.

Z hlediska následné analýzy dat se však nejedná o výrazné mezery, které by zásadně ovlivnily výsledky. V počátcích projektu jsme ani nedoufali v takové pokrytí na Slovensku, ale nakonec se podařilo získat dostatečné množství vzorků i z této oblasti. Celkem jsme analyzovali vzorky ze 173 lokalit (příloha 1). Navíc byly ve výsledné studii zahrnuty i vzorky získané mimo hlavní studovanou oblast (z Francie, Polska, Maďarska, Srbska, Bulharska, Bosny a Hercegoviny a Chorvatska). Tyto vzorky zpracovával Denis Copilaș-Ciocianu.

Samotný sběr vzorků probíhal na menších až středně velkých tocích, na kterých bychom výskyt blešivců tohoto druhového komplexu mohli předpokládat. Ideální toky, kde se mohou blešivci vyskytovat, bývají málo zatížené organickým znečištěním, dobře prokysličené, s kamenito-písčítým substrátem a rostlinným opadem (Hervant et al. 1995). Vzorky, v přibližném počtu 15–20 jedinců na lokalitu, byly následně uchovávány v označených epruvetách naplněných 96 % etanolem.

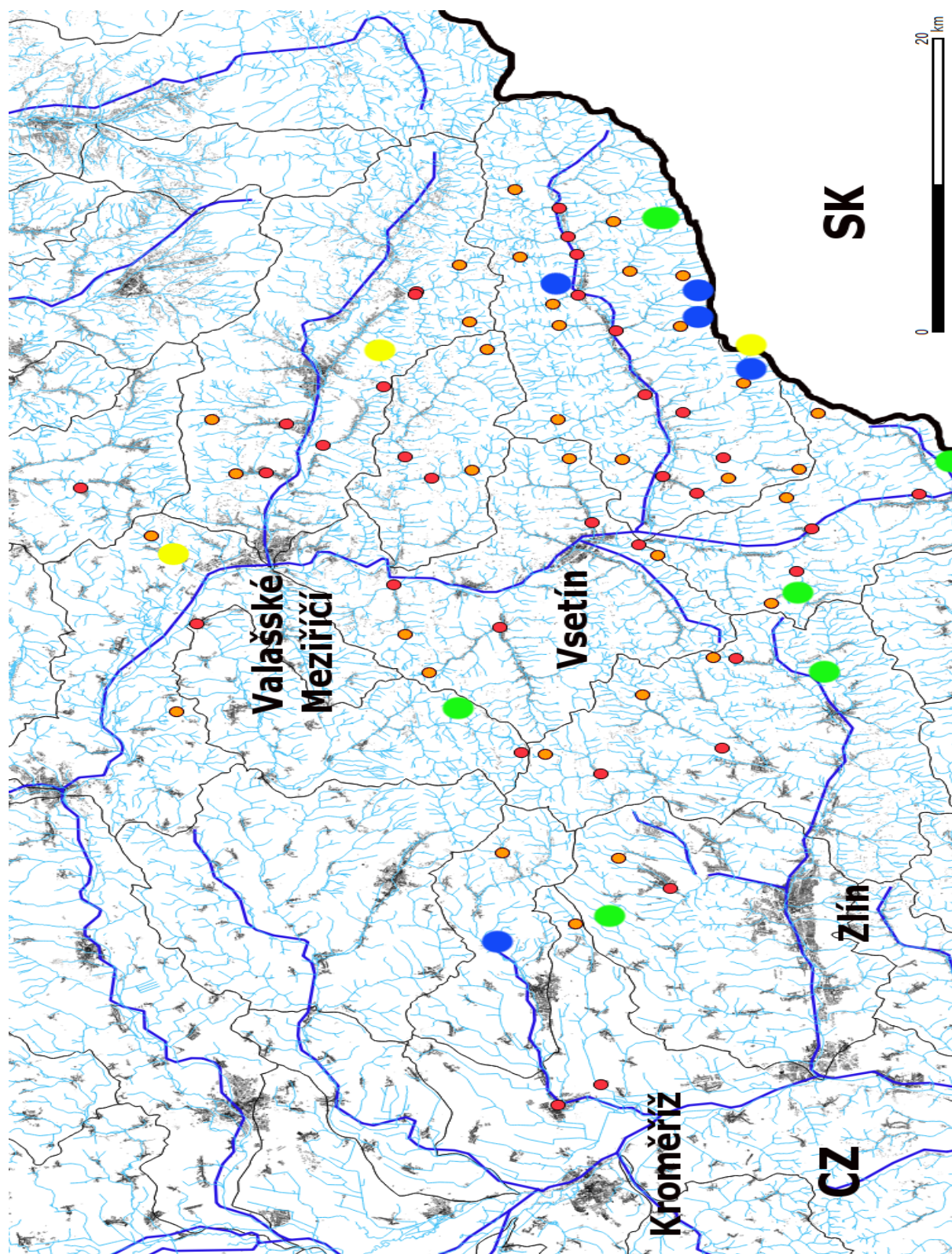
Obr. 2 Lokality s výskytem blešivců *Gammarus fossarum* z ČR a SK, které byly zahrnuty v naší analýze.



Poté, co byly známy výsledky o množství a distribuci linií vyskytujících se na v oblasti ČM/ZK, přistoupili jsme k výběru lokality vhodné pro studium na malé škále. Takovou lokalitou se stala oblast Vsetínska (obr. 3), kde výsledky výše zmíněné velkoškálové studie naznačily blízký kontakt minimálně třech linií. Tato oblast byla zvolena i proto, že je zde hustá síť malých toků s dostatečným výskytem populací studovaného druhového komplexu.



Obr. 3 Oblast Vsetínska, kde probíhal sběr vzorků na detailnější prostorové škále. Tlustá černá čára značí hranici mezi CZ a SK, tenčí černé čáry značí hranici menších jednotek povodí. Tmavě modrá čára značí řeky vyšších řádů. Lokality sběru v horní části toku (●) a v dolní části toku (●). Linie objevené v předchozí fázi studie na československé škále jsou označeny barevně (CWE A ●, CE A ●, EE Q ●).





Zde jsme vzorky odebírali na dvou místech na toku, vždy v horní (obr. 4) a dolní části (obr. 5), obvykle několika set metrů až několik kilometrů od sebe v závislosti na délce jednotlivých toků. Většinou se jednalo o téměř pramennou část, kde by nemělo být tolik patrné ovlivnění toku antropogenní činností. Druhá lokalita se často nacházela v obydlených oblastech, tedy často ve vysoce regulovaných částech toku. Pro otestování možného vlivu základních charakteristik toku na výskyt odlišných linií v různých částech toku jsem na každé vzorkované lokalitě vypsala protokol s informacemi o nadmořské výšce, přibližné rychlosti proudění, hloubce a šířce toku, okolní vegetaci, přítomnosti lidských sídel, typu organického sedimentu v toku, o hrubosti substrátu a také o přítomnosti larev chrostíků jakožto dalších významných konzumentů hrubého detritu. Celkem jsme se pokusili odebrat vzorky na 69 lokalitách (obr. 6 a příloha 2), na všech lokalitách jsme ale blešivce tohoto komplexu nenalezli.

Obr. 4 Ukázka toku v horní části (Zděchovka, ZDE1). Autor: Tereza Rutová





Obr. 5 Ukázka toku ve spodní části (Zuberský potok, ZUB2) Autor: Tereza Rutová



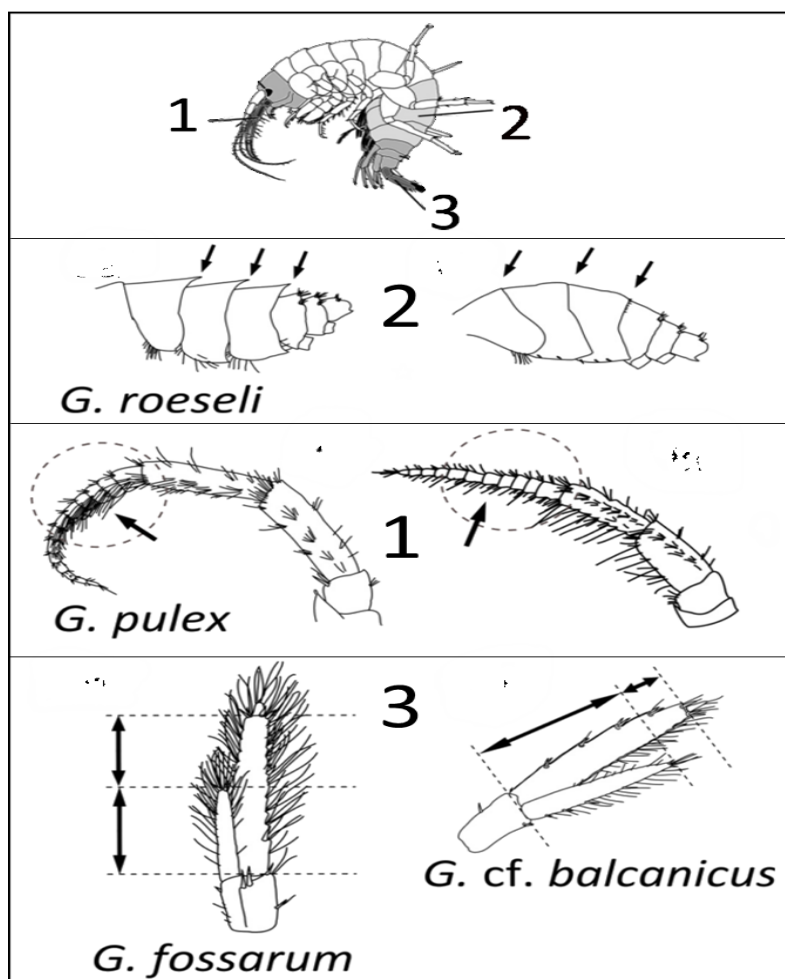
Obr. 6 Foto z terénu (Hořanský potok, HOV2). Blešivci v cedníku, na některých je patrná oranžová skvrna značící přítomnost parazitické larvy vrtejše. Autor: Tereza Rutová



### 3.2 Laboratorní zpracování vzorků a sekvenace

Zafixované vzorky byly nejprve pod binokulární lupou prohlédnuty a rozříděny do příslušných druhových komplexů, neboť se u nás i na Slovensku vyskytují i zástupci jiných druhových komplexů rodu *Gammarus* (*G. pulex*, *G. roeselli* či *G. balcanicus*). Jedinci těchto odlišných skupin buď nebyli zpracováni, nebo byli použiti jako outgroup při zpracování výsledků. Taxonomické zařazení odlišných druhů bylo provedeno dle morfologických odlišností na základě determinačního klíče ze studie Copilaș-Ciocianu et al. (2014). Hlavní determinačními znaky jsou: 1. šířka antény spolu s množstvím a délkou jejich obrvení (*G. pulex*; č. 1 v obr. 7), 2. přítomnost trnitých výběžků na vrchní části metasomálních segmentů (*G. roeselli*; č. 2 v obr. 7), a 3. délkový poměr mezi vnitřními a vnějšími částmi urosomu (rozlišení *G. fossarum* a *G. balcanicus*; č. 3 v obr. 7).

Obr. 7 Označení klíčových determinačních znaků blešivců vyskytujících se v oblasti CZ/SK. Upraveno ze studie Copilaș-ciocianu et al. (2014)





### 3.2.1 Izolace DNA

Pro izolaci DNA ze vzorků z oblasti ČR/SK byl vybrán vždy jeden jedinec z každé lokality. V případě analýzy vzorků ze Vsetínska bylo vybráno obvykle pět jedinců z každé lokality. Z každého zpracovávaného jedince byla přibližně 1/4 těla odejmuto, a etanol z této části se nechal odpařit na vzduchu. Pro zabránění kontaminace byly pitevní nástroje používané během této části postupu sterilizovány peroxidem vodíku. Každý vybraný jedinec byl následně uchováván ve zkumavce naplněné 96 % etanolem odděleně.

Izoláty DNA ze vzorků z oblasti ČR/SK byly extrahována pomocí komerčně prodáváného izolačního kitu (Geneaid Biotech, Taipei) metodou kolonkové chromatografie. Izoláty DNA ze vzorků ze Vsetínska byly ve většině případů z důvodů snížení nákladů získány pomocí směsi extrakčního pufru H3 obsahující proteinázu K (Schwenk et al. 1998). Všechny izoláty byly uchovávány po dobu zpracování vzorků v laboratorní lednici při teplotě 7 °C.

### 3.2.2 PCR a UV elektroforéza

Pro určení mitochondriálních linií jedinců z oblasti ČR/SK jsem z DNA izolátů polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) amplifikovala jeden ze dvou mitochondriálních genů, zejména gen pro podjednotku I cytochrom c oxidázy (COI) celkem ze 145 jedinců, případně gen pro velkou ribozomální podjednotku 16S rRNA (16S) ze 79 jedinců, u nichž proběhla neúspěšně amplifikace genu pro COI. Pro následnou fylogenetickou analýzu byly pro vybrané zástupce každé mitochondriální linie kromě obou výše zmíněných genů použity i tři geny jaderné, které analyzoval Denis Copilaș-Ciocianu (Copilaș-Ciocianu et al. 2017a).

V případě analýzy DNA izolátů ze Vsetínska jsem se zaměřila na amplifikaci úseku genu pro 16S. Nejprve jsem osekvenovala ze 4 náhodně vybraných lokalit 6 jedinců, abychom ověřili, jestli se linie vyskytují i syntopicky. Poté jsem osekvenovala vždy jen jeden DNA izolát z každé lokality a následně jsem kvůli snížení nákladů začala určovat linie pomocí amplifikace 16S specifickými primery (viz níže).

COI byla amplifikována v minimální délce 600 bp, kdy byly použity primery LCO1490 a HCO2198 (Folmer et al. 1994) nebo UCOIF a UCOIR (Costa et al. 2009). V případě 16S se jednalo o amplifikaci fragmentů o počtu 323 bp a použité primery 16STf (Macdonald et al. 2005) and 16Sbr (Palumbi et al. 1991). Sekvence primerů jsou uvedeny v tab. 1.

Reakční směs pro všechny geny byla v objemu 25 µl. PCR probíhala dle následujícího nastavení na přístrojích iCycler Thermal Cycler (BIO-RAD) a TC-CEA Gene Touch (BIOER). Směs pro COI obsahovala 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific, Waltham, USA), PCR pufr s KCl (Thermo Scientific), 0,2 mM směsi deoxynukleosid trifosfátů dATP, dCTP, dGTP a dTTP (Thermo Scientific), oba primery v koncentraci 0,3 µM, 1 jednotku Taq polymerázy (Thermo Scientific) a 2 µl templátové DNA doplněné do 25 µl sterilní H<sub>2</sub>O. Program pro amplifikaci COI byl nastaven následovně: počáteční denaturace probíhala 5 minut na 94 °C, následovalo 37 cyklů po 50 s na 95 °C, 50 s na 47 °C, 50 s na 72 °C a finální fáze prodlužování probíhala 5 min na 75 °C.

Směs pro 16S obsahovala 2 mM MgCl<sub>2</sub>, PCR pufr s KCl, 0,2 mM směsi deoxynukleosid trifosfátů, oba primery v koncentraci 0,4 µM, 0,625 jednotky Taq polymerázy a 2 µl templátové DNA doplněné do 25 µl sterilní H<sub>2</sub>O. Program pro amplifikaci 16S byl nastaven následovně: počáteční denaturace probíhala 2,5 min na 94 °C, následovalo 37 cyklů po 40 s na 94 °C, 40 s na 46 °C, 80 s na 65 °C a finální fáze prodlužování probíhala 8 min na 65 °C.

Velice důležité bylo otestování minimálně jednoho jaderného markeru, který by poukázal na případnou hybridizaci či známky introgrese. Prvotní studie z oblasti ČR/SK ukázala, že se na jaderných genech mitochondriální linie lišily, ale nebylo možno vyloučit, že na kontaktu ke genovému toku mezi nimi dochází. Proto jsme sekvenovali úsek jaderného genu pro 28S rRNA (28S), který byl vybrán i v předchozí studii. Vybrala jsem 24 jedinců ze 3 linií (celkem 12 syntopických populací). Oblast 28S byla amplifikována v přibližné délce 1265 bp za použití dvojice primerů 28F a 28R (Hou et al. 2007).

Směs pro 28S obsahovala 2 mM MgCl<sub>2</sub>, PCR pufr s KCl, 0,32 mM směsi deoxynukleosid trifosfátů, oba primery v koncentraci 0,4 µM, 0,75 jednotky Taq polymerázy a 1 µl templátové DNA doplněné do 25 µl sterilní H<sub>2</sub>O. Program pro amplifikaci 28S byl nastaven následovně: počáteční denaturace probíhala 1 min na 94°C, následovalo 35 cyklů po 30 s na 94°C, 45 s na 45°C a 60 s na 72°C a finální fáze prodlužování probíhala 5 min na 72°C.

Tab. 1 Sekvence použitých primerů

Gen:	Název primeru:	Sekvence (5'-3'):	Zdroj:
COI	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer et al. (1994)
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAA AAT	Folmer et al. (1994)
	UCOIF	TAWACTTCDGGRTGRCCRAAAAAYCA	Costa et al. (2009)
	UCOIR	ACWAAAYCAYAAAGAYATYGG	Costa et al. (2009)
16S	16STf	GGTAWHYTRACYGTGCTAAG	Macdonald et al. (2005)
	16Sbr	CCGGTTTGAACTCAGATCATGT	Palumbi et al. (1991)
28S	28F	TTAGTAGGGGCGACCGAACAGGGAT	Hou et al. (2007)
	28R	GTCTTTCGCCCTATGCCCAACTGA	Hou et al. (2007)

Pro kontrolu správného průběhu reakce a vyloučení případných negativních výsledků jsem ověřila výsledek PCR pomocí agarózové elektroforézy. Připravila jsem 1,5 % gel smícháním 750 mg agarózy společně s 50 ml Tris/Borate/EDTA (TBE) pufru. Přítomnost produktu očekávané délky byla ověřena pod UV lampou.

### 3.2.3 Purifikace produktů PCR

Pozitivní výsledky PCR ověřené elektroforézou byly dále přečištěny srážením v etanolu s octanem sodným a znovu rozpuštěny ve sterilní vodě do objemu 20  $\mu$ l. Na základě naměřené koncentrace DNA v přečištěném vzorku na přístroji NanoDrop Spectrophotometer ND 1000 (Thermo Scientific) jsem vybrala ty, které měly naměřené hodnoty koncentrace vyšší než 10  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Podle sekvenačního protokolu jsem namíchala vzorky na sekvenační reakci o hmotnosti 70 ng DNA s 0,5  $\mu$ l reverzního primeru, doplněné sterilní vodou do objemu 8  $\mu$ l.

Sekvenace vzorků probíhala na kapilárovém sekvenátoru ABI 3130XL Prism Genetic Analyzer v Laboratoři sekvenace DNA biologické sekce PŘF UK. Většina vzorků byla sekvenována pouze z jednoho směru.

### 3.2.4 Amplifikace genu 16S specifickými primery

Pro tuto diplomovou práci jsme stanovili také jeden cíl metodický, a to pokusit se navrhnout a otestovat druhově specifické primery v oblastech úseku genu 16S amplifikovaného univerzálními primery. Návrh primerů vycházel ze spolupráce Denise Copilășe-Ciocianu, Michaila Rovatsose a Adama Petruska. Hledali jsme variabilní oblasti, kde by se od sebe linie lišily a zároveň aby byla tato místa vhodná pro design primeru (oblasti bohaté na nukleotidy C a G, srovnatelná teplota nasedání primerů v páru apod.). V cílových místech se linie od sebe musely lišit, ale zároveň v rámci linie měla být variabilita minimální, ideálně žádná.

Podařilo se nám navrhnout přední (forward) primery pro tři linie (CWE A, EE Q, CE A) a pro jednu linii (CWE D) pak kompletní pár (forward i reverse) primerů. V tab. 2 jsou vyznačeny výsledné sekvence po opravě primeru pro linii CWE A. Nové přední primery jsem používala v kombinaci s běžně používaným zadním (reverse) univerzálním primerem (Palumbi et al. 1991) pro amplifikaci úseku genu 16S. Pozice navržených primerů v aligmentu vybraných jedinců je zobrazena v příloze 3.

Reakční směs při využití těchto specifických primerů obsahovala 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, PCR pufr, 0,2 mM dNTPs, 0,3 μM všech primerů, 0,625 jednotky Taq polymerázy a 1 μl templátové DNA doplněné do 25 μl sterilní H<sub>2</sub>O. V případě amplifikace úseků genu 16S pomocí specifických primerů probíhaly reakce s opakováním 40 cyklů, kdy se u původního nastavení reakce pro gen 16S měnilo pouze nastavení teploty přisedání primerů na 62 °C v případě amplifikace s primery pro CWE A a EE Q, respektive 64 °C v případě amplifikace s primery pro CE A a CWE D.

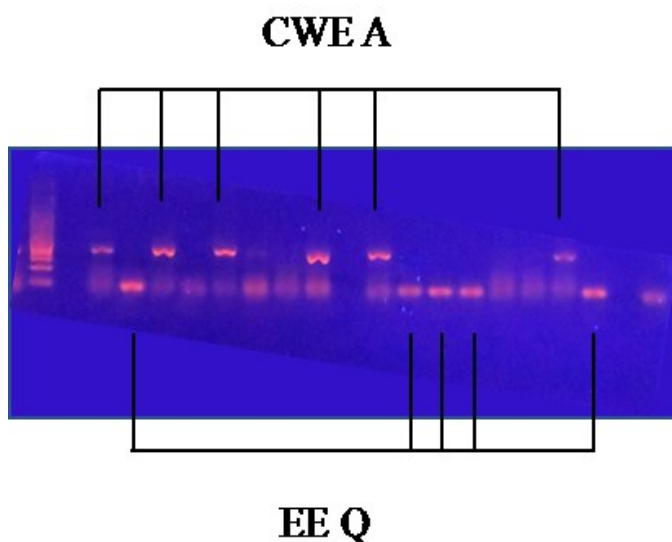
Během samotného testování těchto nových primerů bylo zapotřebí jednak optimalizovat složení reakční směsi, nalézt optimální nastavení teploty ve fázi nasedání primerů a zároveň bylo třeba dobře odlišit kladné výsledky amplifikace na agarózovém gelu pod UV lampou. Samozřejmě proběhlo několik kol ověřování, zda nevyjdou pro stejného jedince několikery pozitivní výsledky při použití kombinací primerů pro odlišné linie. K takovýmto výsledkům docházelo zejména ze začátku, kdy ještě nebyly PCR protokoly dostatečně upraveny. Navíc jsme nový přední primer pro linii CWE A objednali chybně, kdy v něm v daném oligonukleotidu chyběla jedna báze. Pomocí tohoto primeru sice k amplifikaci daného úseku genu docházelo, ale jeho funkčnost byla omezena, což potvrdily lepší výsledky po testu nového primeru poté, co jsme tento nedostatek odhalili (viz diskuze).

Úseky amplifikované specifickými primery byly o přibližné délce v rozmezí 200–300 bp u linií CWE A, CWE D a CE A a 50 bp u linie EE Q. Proto bylo možné použít do multiplexu pouze kombinace primerů linie CWE A a EE Q, neboť tyto dvě linie od sebe lze na agarózovém gelu rozeznat, a navíc reagovaly dostatečně specificky při shodné teplotě nasedání primerů (62 °C). Při rutinním testování jsem tedy nejprve používala kombinace primerů pro multiplex, tedy pro linie CWE A a EE Q (obr. 8) a poté jsem testovala zbylé dvě linie odděleně pro jedince, kde v předchozích reakcích nebyl amplifikován žádný fragment. Na závěr jsem zkusila amplifikovat univerzálními primery ty vzorky, které nevyšly ani v jednom případě. A také jsem ověřila 49 vzorků sekvenací (či naopak, amplifikovala jsem sekvenované jedince pomocí specifických primerů).

Tab. 2 Výsledné sekvence použitých primerů

	Název primeru:	Sekvence (5'-3'):
CWE D	CWD_DG_fwd	AGGTAGTTTGTGTAATCTAGTTAGT
	CWD_DG_rev	CAAGAATACCGCACTGTTATCC
CE A	CEA_YL_fwdP	AGGTGGTTTGTATAGTTTAGCTGGT
	16Sbr	CCGGTTTGAACCTCAGATCATGT
CWE A + EE Q	EEQ_BL_fwdP	AAGAGGTCTATATGAAGAAGTAGGC
	CWA_GR_fwdP_DEG	GATGAAGGGTTAAACAGGCTGARG

Obr. 8 Ukázka výsledku amplifikace specifickými primery pro linie CWE A a EE Q.



## 4 Zpracování dat a analýza

U sekvencí úseku genu pro COI získaných při analýze jedinců z oblasti ČR/SK jsem nejprve nejdříve překontrolovala jednotlivé chromatogramy v programu MEGA 6 (Tamura et al. 2013). Následně jsem určila příslušnost k jednotlivým mitochondriálním liniím přístupem analogickým k tzv. *DNA barcodingu*, což je metoda určování druhů na základě sekvenace standardizovaného markeru. U živočichů se zpravidla sekvenuje krátký úsek pojednotky I cytochrom c oxidázy (Hebert et al. 2003), ale pro účely určování se používají i jiné mitochondriální geny. Pro COI jsem vytvořila alignment za použití algoritmu MUSCLE (Edgar 2004) v programu MEGA 6. Poté jsem vytvořila strom podobnosti sekvencí metodou *neighbor-joining*, pomocí kterého jsem zařazovala jedince do mitochondriálních linií. Další náročnější analýzy pro potřeby publikace provedl Denis Copilaș-Ciocianu.

U sekvencí úseku genu pro 16S z oblasti Vsetínska jsem opět nejprve překontrolovala jednotlivé chromatogramy v programu MEGA 6. Alignment jsem vytvořila v programu MAFFT 7 (Katoh & Standley 2013) a následně v programu MEGA 6 upravila sekvenace na stejný počet nukleotidů o délce 330 bp. Postup dále odpovídal tomu pro COI.

V případě mitochondriálních genů byli jedinci sekvenováni pouze z jednoho směru. V případě úseku genu pro 28S jsem přistoupila k sekvenaci obou směrů, kdy jsem po sestavení konsenzuálních sekvencí získala úsek o délce 1269 bp. Poté jsem opět vytvořila strom dle parametrů zmíněných výše.

Pro vizualizaci vnitrodruhových vztahů jsem vytvořila v programu POPART 1.7 (Leigh & Bryant 2015) haplotypovou síť metodou TCS (Clement et al. 2000). Použila jsem získané sekvenace úseku genu pro 16S z oblasti ČR/SK (81 sekvencí) a také všechny sekvenace úseku genu 16S ze vzorků z oblasti Vsetínska (123 sekvencí).

Pro přeformátování dat za účelem jejich přenosu mezi výše uvedenými programy byl použit konvertor Mesquite 3.04 (Madison & Madison 2015). Mapu vyobrazenou na obr. 3 jsem vytvořila v programu QGIS2.18.4 (QGIS Development Team 2016). Obrazovou úpravu jsem provedla v programech Microsoft PowerPoint a GIMP 2.8.22.

V prostředí R za použití knihovny „vegan“ (Oksanen et al. 2011) byl statisticky vyhodnocen vztah mezi parametry prostředí a přítomností linií na daném místě metodou analýzy redundance (RDA). Testovalo se, jaké množství variability v datech (tj. v rozšíření linií na lokalitách) může vysvětlit poloha v krajině (geografické souřadnice lokality a příslušnost ke konkrétnímu potoku kódovaná kategoriálně) a kolik místní parametry.

Parametry prostředí, které vstupovaly do analýzy (tab. 3), byly třech typů: 1. ordinální proměnné: rychlost proudění, hrubost substrátu dna a množství chrostíků, 2. kategoriální proměnné (tj. převedeny na binární zástupné proměnné): charakter organického detritu, místo na toku (horní nebo dolní úsek), 3. číselné proměnné: nadmořská výška, naměřená šířka a hloubka toku v místě sběru jedinců.

Abychom posoudili, kolik variability v distribuci linií (jež byla kódována binárně jako přítomnost/nepřítomnost na dané lokalitě) lze vysvětlit polohou lokality v krajině (tj. prostorovou strukturou lokalit) a kolik vybranými proměnnými prostředí, provedli jsme dekompozici variability (pomocí funkce „varpart“ s maticemi prostorových a lokálních proměnných). Matice prostoru obsahovala příslušnost k potoku a souřadnice lokalit, matice lokálních charakteristik prostředí zahrnovala pouze ty proměnné, které byly měly signifikantní efekt (což bylo vyhodnoceno pomocí funkce „ordistep“): nadmořskou výšku, šířku a hloubku toku, rychlost proudění polohu na toku (horní/dolní tok). S těmito vybranými proměnnými prostředí jsme provedli analýzu redundance také bez zohlednění polohy lokalit.

Tab. 3 Zvolené škály proměnných parametrů prostředí, jež byly odhadnuty na místě během odběru

	<b>Organický sediment</b>		<b>Rychlost proudění [m/s]</b>		
kategoriální	1	absence	1	0 - 0,1	ordinální
	2	jen málo listů	2	0,11 - 0,3	
	3	listy a jehličí	3	0,31 - 0,7	
	4	listy, jehličí, větve	4	0,71 - 1	
	5	balno	5	1,1 +	
	<b>Substrát</b>		<b>Přítomnost - Trichoptera</b>		
ordinální	1	kamenná plotna	1	absence	ordinální
	2	velké balvany	2	vzácná	
	3	větší kameny	3	běžná	
	4	drť	4	dominantní	
	5	písek			

## 5 Výsledky

### 5.1 Diverzita a distribuce *Gammarus fossarum* v oblasti České a Slovenské republiky

Naše studie prokázala dramatický rozdíl v diverzitě a distribuci linií napříč Českým masivem a Západními Karpaty (obr. 9). V oblasti Českého masivu jsme našli pouze dvě linie, v oblasti Západních Karpat je pak možné nalézt minimálně osm divergentních mitochondriálních linií druhového komplexu *Gammarus fossarum*, které se liší i svým jaderným genomem (Copilaș-Ciocianu et al. 2017a). Dále je skutečně možné potvrdit informaci, že blešivec potoční *G. fossarum* sensu stricto, jehož reprezentuje linie CWE A, je náš nejběžnější blešivec. Ačkoliv jsme se zaměřili na analýzu komplexu *G. fossarum*, na některých lokalitách jsme našli zástupce *Gammarus pulex* (na Chebsku) a *G. roeselli*, na Slovensku i *G. balcanicus*. Jednalo se ale v rámci studovaných lokalit o minoritní zastoupení v porovnání s výskytem zástupců *G. fossarum*.

Diverzita a distribuce studovaného druhového komplexu v dané oblasti skutečně odráží vliv biogeografických hranic na rozšíření geneticky odlišných kryptických linií. Právě takovou hranicí přechod mezi geomorfologicky a historicky odlišnými oblastmi Českého masivu a Západními Karpaty tvoří. Je ale důležité poznamenat, že distribuce linií vychází ze studie pouze jednoho jedince z lokality, takže mnohé linie mohou mít širší areál výskytu a také je tu možnost jejich bližšího kontaktu (viz níže).

Celkem jsme v oblasti CZ/SK charakterizovali na základě mitochondriální DNA osm divergentních linií. Z těchto osmi linií byly dříve známy pouze linie CWE A např. v Německu (Müller 2000) a EE T v Polsku (Hou et al. 2007). Minimálně jedna linie se zdá být velice bazální v rámci celého druhového komplexu. Ve studované oblasti se potkávají linie patřící do odlišných evropských větví. Fylogenetický strom vytvořený na základě mitochondriální DNA je vyobrazen na obr. 10.

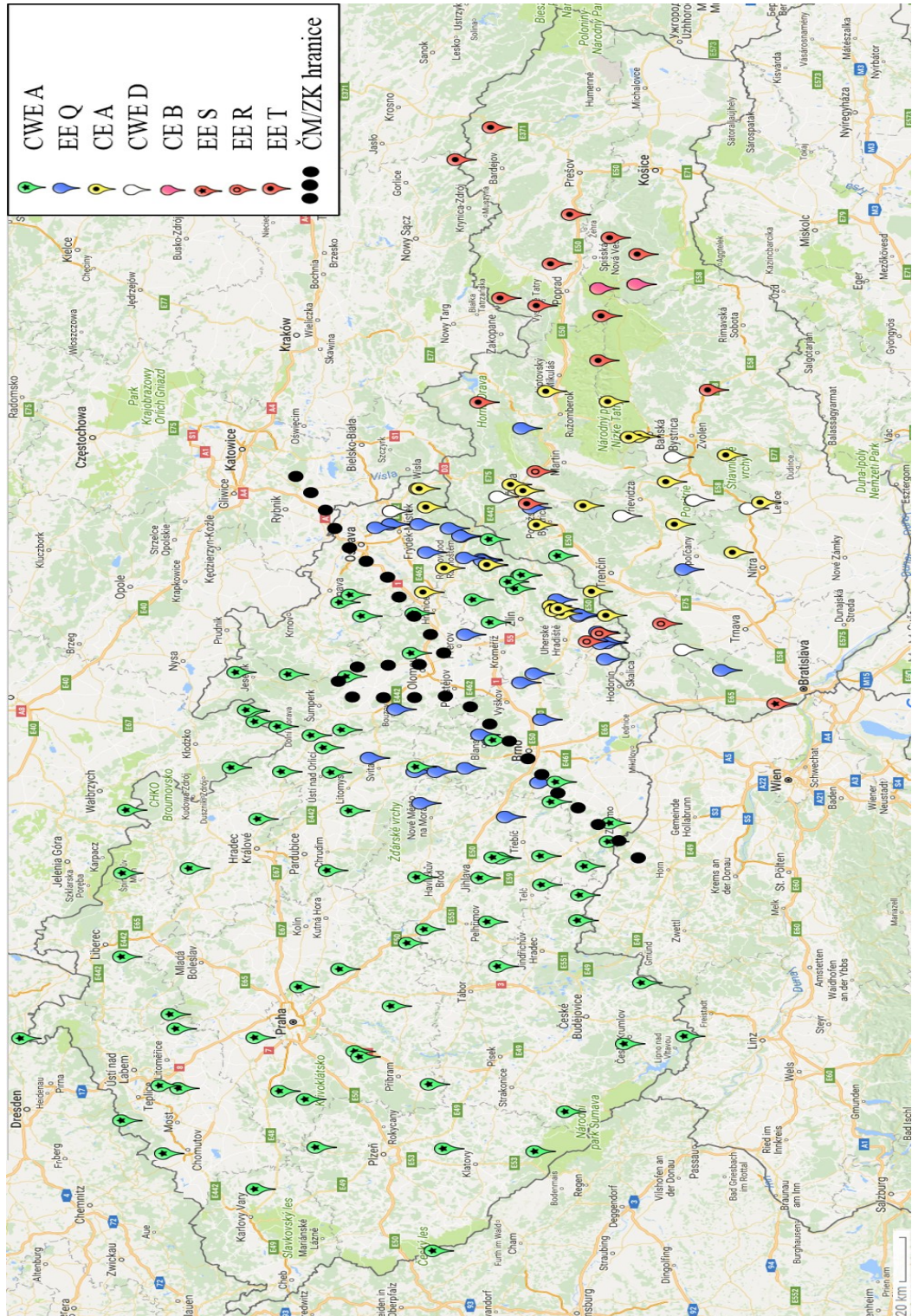
V Českém masivu jsme našli pouze linie CWE A a EE Q. Linie CWE A se vyskytuje ve všech hlavních povodích České republiky. Patří do fylogenetické větve s výskytem ve střední a západní Evropě a jedná se o *G. fossarum* sensu stricto (CWE A se vyskytuje v oblasti typové lokality druhu). Ve východní části Českého masivu se dále vyskytuje linie EE Q, jejíž zástupci obývají, na rozdíl od zástupců CWE A, pouze povodí řek Dyje, Moravy a Odry (tab. 4).

V Západních Karpatech se vyskytují kromě obou výše zmíněných linií také linie CE A, CWE D, CE B, EE R, EE S a EE T. Linie CWE A do oblasti Západních Karpat zasahuje



pouze okrajem svého areálu, její výskyt jsme zaznamenali pouze v západní části studovaného území. Podobně je tomu tak i v případě linie EE Q, ačkoliv její zástupce jsme našli na lokalitách i dále směrem na východ.

Obr. 9 Výsledky analýzy diverzity a distribuce blešivců druhového komplexu *G. fossarum* v oblasti CZ/SK dle studie Copilaș-Ciocianu et al. 2017.



Významným objevem je samotná existence a pozoruhodné rozšíření linií EE Q a CE A. Na základě mtDNA se obě linie ukazují jako bazální v rámci celého druhového komplexu (obr. 9), v případě linie EE Q se však zdá, že v minulosti došlo k introgresi, neboť dle jaderných markerů (18S, 28S a EF1 $\alpha$ ) se linie EE Q zařazuje jako bazální v rámci východoevropské větve komplexu (Copilaş-Ciocianu et al. 2017a). Každopádně se jedná o velmi divergentní skupiny v rámci celého druhového komplexu.

Linie CWE A a CWE D tvoří dvojici blízce příbuzných linií středo-západoevropské větve. Linie EE R, EE S a EE T byly přiřazeny do větve východoevropské vyskytujících se v oblasti Karpat, jejichž diverzitu studovali Copilaş-Ciocianu & Petrusek (2015) v Rumunsku. Nově jsme charakterizovali linie CE A a CE B, které jsou společně zařazeny do nově zdefinované skupiny komplexu *G. fossarum* se zřejmě omezeným středoevropským rozšířením. Výskyt CE A je poměrně častý na československém pomezí a dále v západní části Slovenska, zatímco CE B objevili pouze v omezeném areálu výskytu ve východnější oblasti Slovenska (povodí Hronu a Bodrogu a Hornádu).

Distribuce linií není zřejmě omezena hranicemi jednotlivých povodí nebo úmoří. Mnoho linií je možné nalézt ve vícero povodích, ačkoliv výskyt mnohých je omezený jen na určité části studované oblasti (tab. 4). Je ale patrné, že povodí Labe (alespoň jeho část v ČR, jež zaujímá většinu Českého masivu) je na rozdíl od hlavních povodí v Západních Karpatech z hlediska variability *G. fossarum* velice homogenní. Linii CWE A lze jako jedinou nalézt ve všech úmořích a hlavních povodích v ČR.

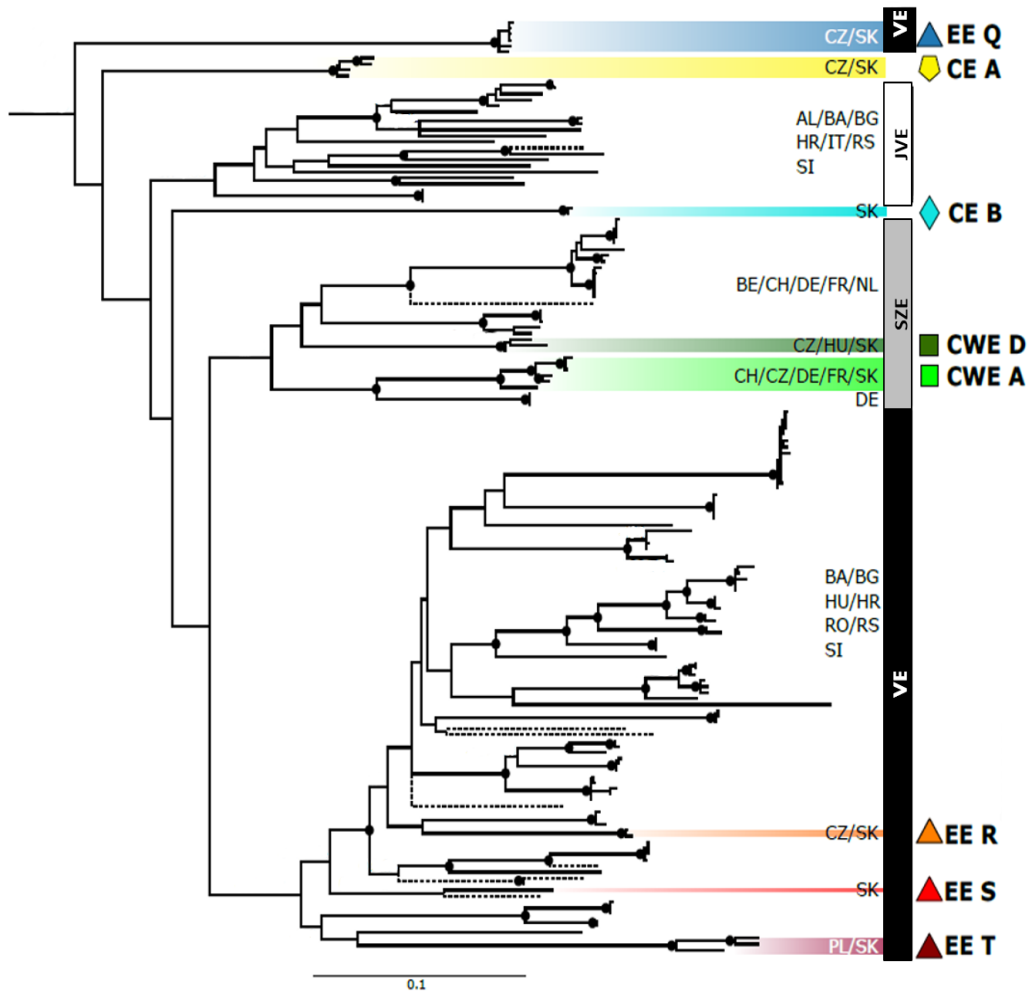
Úmoří Baltského a Černého moře oplývají velmi podobnou diverzitou, kdy se řada linií vyskytuje v jejich hraničních oblastech. Linii CWE D jsme v České republice nejprve našli pouze na jedné lokalitě v povodí Odry. Následná detailní analýza na Vsetínsku ale odhalila tuto linii i v povodí Moravy.

Pomyslnou hranici oblastí s odlišnou diverzitou netvoří hranice povodí, pohoří nebo jiná očekávatelná geografická bariéra, ale řeka Morava, kdy na západ od ní je patrný výskyt pouze dvou linií, a naopak na východ od ní, již v oblastech hraničních pohoří mezi Českou a Slovenskou republikou, je diverzita bohatší a linie se tu vyskytují ve velmi blízkém kontaktu. Zde byl doložen i jejich syntopický výskyt (viz výsledky z detailnější analýzy níže).

Situace na Slovensku je podobná a distribuce linií není příliš omezena hranicemi jednotlivých povodí (tab. 4). V povodí Dunaje se hojně vyskytují bazální linie CE A a EE Q, a dále EE T a EE R, které jsou blízce příbuzné jižněji se vyskytujícím liniím. Na území Česka jsme popsali výskyt EE R pouze na jedné lokalitě. Nalezli jsme ale také dvě linie unikátní

pouze pro Slovensko. Linie EE S je zatím známa z jedné lokality poblíž Bratislavy a linie CE B ze dvou lokalit (viz výše). Ve východní části Slovenska, kde dochází k přechodu mezi Západními a Východními Karpaty, je patrný převážný výskyt linie EE T.

Obr. 10 Zjednodušený fylogram vytvoření metodou Maximum Likelihood z mitochondriálních sekvencí COI a 16S upravený dle naší studie (Copilaș-Ciocianu et al. 2017a). Zkratka VE značí oblast východní Evropy, SZE oblast střední a západní Evropy a JVE oblast jihovýchodní Evropy.



Tab. 4 Výskyt linií v jednotlivých povodí v oblasti ČR/SK.

Povodí ČR	Přítomné linie	Poznámka	Povodí SK	Přítomné linie	Poznámka
Labe	CWE A	pouze tato linie	Dunaje	EE Q	v ČR/SK pouze zde
				EE R	
Dyje	CWE A			EE S	
	EEQ				
Moravy	CWE A	v ČR pouze zde	Váhu	CWE A	převažuje
	EEQ			EE Q	
	CE A			CE A	
	EE R			CWE D	
	EE R				
	EE T				
Odry	CWE A	v ČR pouze zde	Hronu	CE A	převažuje
	EEQ			CWE D	
	CE A			EE T	
		CE B		pouze 1 lokalita	
		EE T		dominantní	
		CE B		pouze 1 lokalita	
			Bodrogu a Hornádu		

## 5.2 Výsledky amplifikace úseků genu pro 16S rRNA specifickými primery

Při použití specifických primerů jsem získala 202 amplifikovaných fragmentů 16S. Celkem jsem takto určila 62 jedinců linie CWE A, 98 jedinců linie EE Q, 34 jedinců linie CE A a 8 jedinců linie CWE D. 49 z nich (28 sekvencí CWE A, 15 sekvencí EE Q, 5 sekvencí CE A a 1 sekvence CWE D) bylo ověřeno kontrolní sekvenací a nebyl nalezen rozdíl oproti výsledku na základě amplifikace specifickými primery.

Ve 48 případech jsem nebyla schopna amplifikovat fragment 16S s žádnou kombinací specifických primerů. Až amplifikaci pomocí univerzálních primerů (Palumbi 1991; Macdonald et al. 2005) se úsek podařilo v některých případech amplifikovat a bylo tak možné získat sekvenci 16S, díky níž jsem příslušného jedince určila do jedné ze čtyř studovaných linií. Neodhalila jsem přítomnost žádné další linie. Bohužel 34 DNA izolátů nefungovalo ani s univerzálními primery (a to ani pro jiné studované geny), což interpretujeme jako pravděpodobnou chybu při izolaci DNA.

### 5.3 Detailní výskyt linií komplexu *Gammarus fossarum* na Vsetínsku

V detailně studované oblasti na Vsetínsku jsem odhalila celkem čtyři linie (CWE A, CWE D, EE Q a CE A). Z předchozích výsledků jsme v této oblasti věděli pouze o třech liniích (Copilaș-Ciocianu et al. 2017a), nález linie CWE D byl neočekávaný, ale pro vývoj specifických kombinací primerů jsme ji již zahrnuli. Z 277 analyzovaných jedinců z 61 lokalit se mi podařilo určit 91 jedinců linie CWE A (57 sekvencí, zbytek pomocí specifických primerů), 126 (43 sekvencí) jedinců linie EE Q, 52 (22 sekvencí) jedinců linie CE A a 8 (1 sekvence) jedinců linie CWE D (příloha 4).

Lze předpokládat, že koexistence odlišných linií je ve skutečnosti velmi častá, neboť jsme ve vzorcích z malé škály ze 61 vzorkovaných lokalit s výskytem blešivců jsem u 31 populací určila pouze jednu vyskytující se linii, dále ve 23 populacích jsem určila dvě linie a v případě sedmi populací jsem našla výskyt dokonce třech linií. Je nutné podotknout, že z každé lokality jsem většinou pracovala pouze s pěti jedinci, a tak je četnost koexistence pravděpodobně ještě podhodnocena.

Haplotypové síť (obr. 11) vytvořené na základě sekvencí úseku genu (323bp) pro 16S z oblasti ČR/SK a z této detailně studované oblasti ukazují, že i v takto malé oblasti je patrný výskyt řady odlišných haplotypů, ačkoliv je lokální diverzita samozřejmě menší než v celém studovaném areálu (tab. 5).

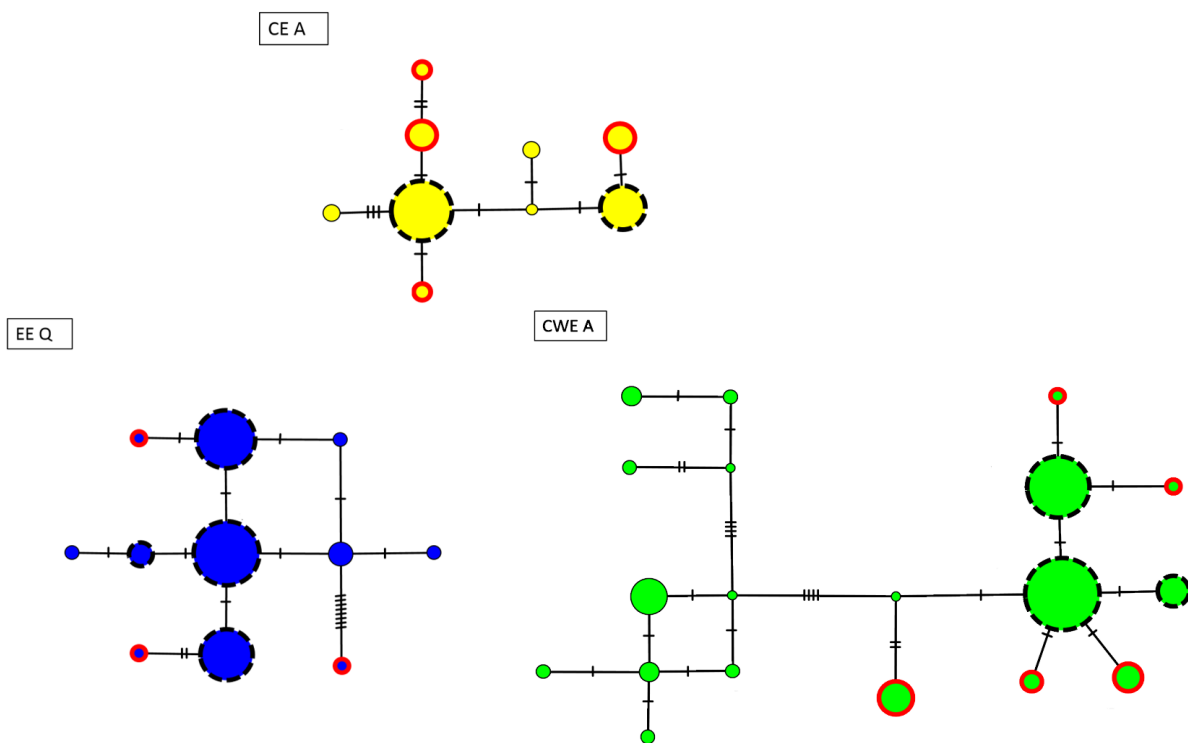
V severní a západní části námi vytyčené oblasti byl výskyt blešivců toho komplexu velice omezený (obr. 12), a to pravděpodobně z toho důvodu, že se jedná o oblast v nižší nadmořské výšce, kde navíc toky protékají zemědělsky obdělávanou půdou. Ačkoliv jsou linie mozaikovitě rozšířeny, je možné poukázat na převážný výskyt linie EE Q ve východní části a linie CWE D pak byla objevena pouze na 6 lokalitách v populacích v jižní části studované oblasti. Celkem na 11 tocích se zastoupení linií na horní a dolní části toku shoduje, naopak na pěti tocích je zastoupení naprosto odlišné, kdy se ve všech případech vyskytují zástupci linie EE Q v horní části toku a linie CE A, nebo CWE A na dolní části toku. Linií s nejčastějším výskytem v dané oblasti je linie EE Q, naopak linie CWE D je v této oblasti vzácná.



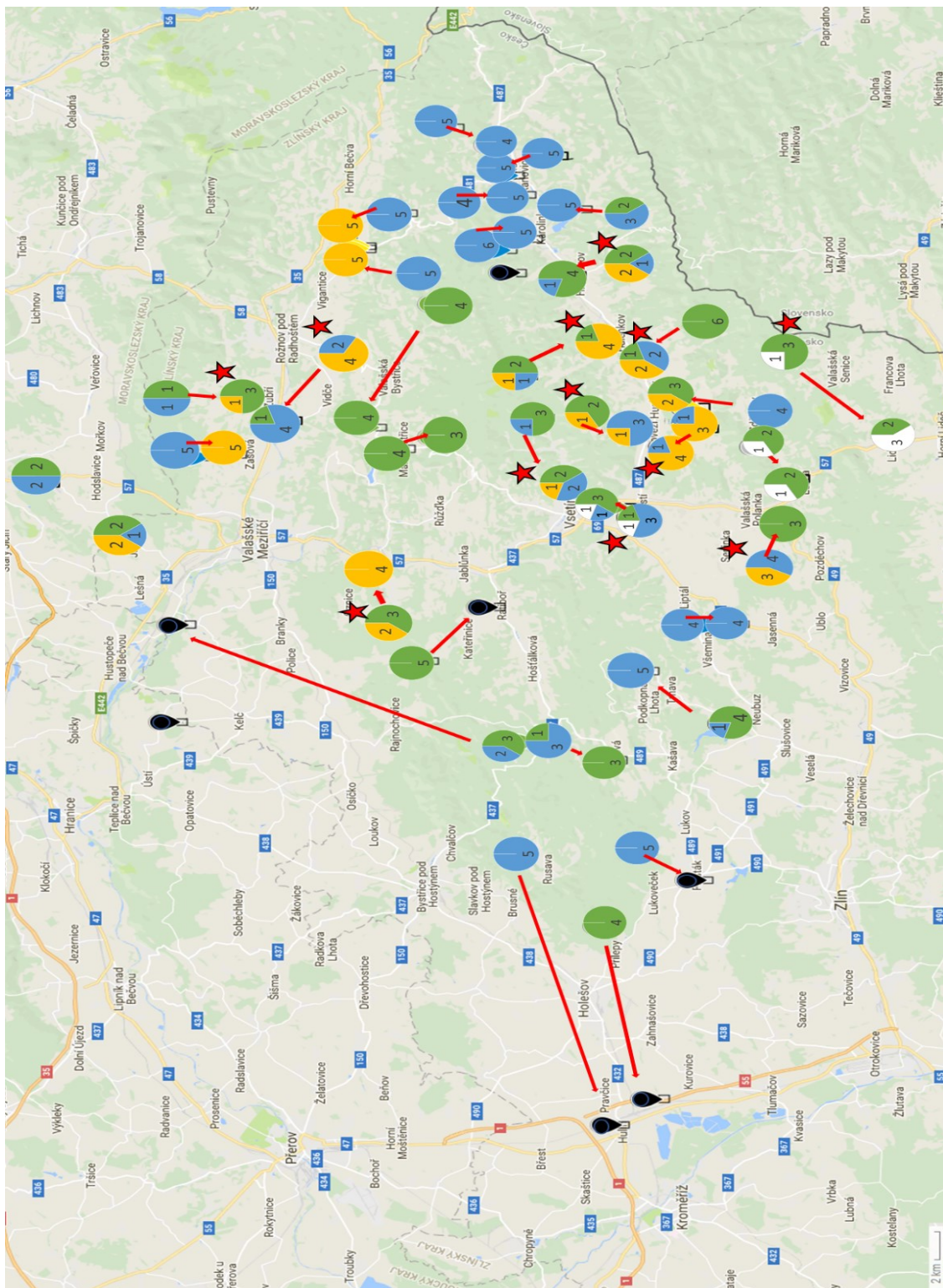
Tab. 5 Počty sdílených haplotypů z oblasti ČR/SK a Vsetínska a nových haplotypů z detailnější analýzy na základě uvedených počtů sekvencí úseku genu (323bp) pro 16S z obou oblastí.

		CWE A	EE Q	CE A	CWE D
počet sekvencí	ČR/SK	24	23	8	5
	Vsetínsko	57	43	22	1
počet haplotypů		16	11	8	4
sdílené haplotypy		3	4	2	1
pouze Vsetínsko		5	3	4	0

Obr. 11 Haplotypové sítě vytvořené metodou TCS na základě 323 bp dlouhého fragmentu genu pro 16S poukazují na existenci množství odlišných haplotypů i na detailnější škále. Nové haplotypy z oblasti Vsetínska jsou označeny červeným ohraňčením. Haplotypy ohraňčené přerušovanou čarou značí haplotypy identické z CZ/SK i vsetínské analýzy.



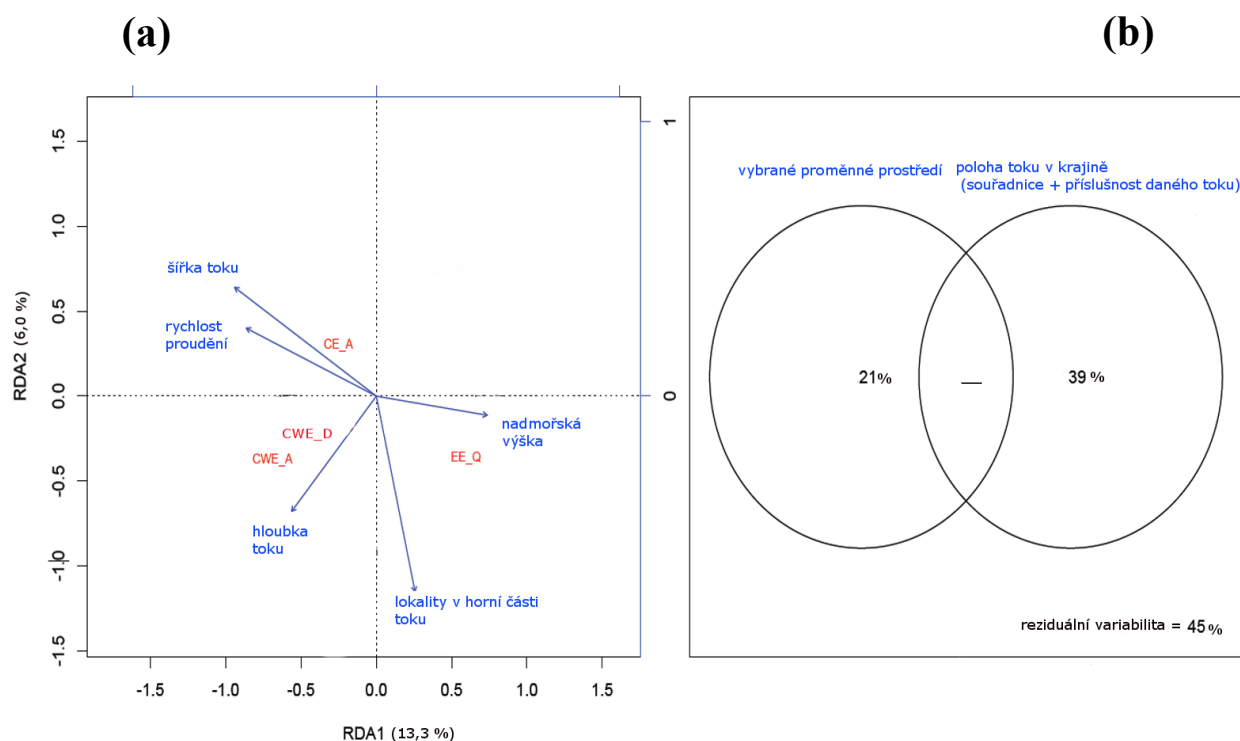
Obr. 12 Distribuce linií v oblasti Vsetínska. Jednotlivé koláčové grafy značí počet určených jedinců do linií vyskytujících se na lokalitách. Červené šipky spojují lokality na stejném toku ve směru po proudu. ● CWE A, ○ CWE D, ● CE A, ● EE Q, ● lokalita bez blešivců a ★ značí 12 lokalit, kde se testovala možnost hybridizace.



Sekvence úseku jaderného genu pro 28S rRNA odpovídaly určení linií podle mtDNA. Výsledky sekvenace 24 jedinců ze třech linií (CWE A, CE A a EE Q) a 12 syntopických populací neukazují na ani jeden případ, kdy by prokazatelně došlo k hybridizaci nebo recentní introgresi jaderné DNA.

Mnoharozměrná analýza redundance (RDA) ukázala, že distribuci linií na lokální škále by mohla být vysvětlena některými charakteristikami prostředí (obr. 13). Při dekompozici variability se ukázalo, že 21 % variability vysvětlují vybrané proměnné prostředí a celých 39 % lze vysvětlit polohou toku v krajině. Jako významné faktory související s distribucí linií mají šířka a hloubka toku, rychlost proudění, nadmořská výška a místo na toku v jeho horní části. Analýza redundance s použitím těchto proměnných vysvětlila 23 % variability (z toho první dva faktory 19,3 %). Typ substrátu, množství organického sedimentu a přítomnost, resp. množství chrostíků se výrazněji neprojeví, tyto parametry nebyly do výsledného modelu zahrnuty jako signifikantní.

Obr. 13 (a) Ordinační diagram redundanční analýzy. (b) Dekompozice variability vyjádřená Vennovým diagramem ukazuje, kolik variability vysvětluje matice prostředí (vlevo) a matice prostoru (vpravo). Sdílená variabilita je minimální.





## 6 Diskuze

### 6.1 Diverzita a distribuce druhového komplexu *G. fossarum* v celoevropském kontextu

Výsledky této studie výrazně přispěly ke znalosti diverzity a distribuce blešivců druhového komplexu *Gammarus fossarum* v kontextu jeho evropského areálu rozšíření. Ačkoliv se řada prací v minulosti zabývala rozkrýváním skryté diverzity tohoto komplexu (například Müller 2000; Westram et al. 2011; Weiss et al. 2014; Copilaș-Ciocianu & Petrušek 2015), stále v Evropě existují významné oblasti s výskytem *G. fossarum*, kde jeho diverzita zatím zkoumána nebyla (např. v oblasti Alp a na jihu Balkánského poloostrova, nebo jaderských povodí).

V oblasti České a Slovenské republiky doposud nebyla na studium diverzity blešivce potočního upřena pozornost, ačkoliv se jedná o velice zajímavou oblast z hlediska přítomnosti hranice mezi dvěma geologicky a biogeograficky odlišnými celky (Českým masivem a Západními Karpaty), a také se se zde nachází hlavní evropské rozvodí neboli hranice úmoří Severního, Baltského a Černého moře. Některé studie vodních a terestrických skupin bezobratlých živočichů v oblasti Českého masivu a Západních Karpat poukazují na změnu ve výskytu některých druhů mezi těmito dvěma celky (Schenkova 2009; Horsák & Černožský 2008; Juříčková et al. 2014b). Předpokládali jsme, že se tu mohly potkávat linie odlišných evropských větví, neboť jsme věděli o přítomnosti středo – západoevropské větve skrze linii CWE A z oblasti Českého masivu (Hou et al. 2011) a také o přítomnosti východoevropské větve (linie EE T) na sever od polských Karpat (Hou et al. 2007).

Na území České a Slovenské republiky jsme potvrdili výskyt osmi odlišných linií. Z hlediska celoevropského kontextu je velice důležité zjištění, že zde skutečně dochází ke kontaktu linií patřících do dvou výše zmíněných ze třech doposud známých hlavních evropských větví. Dnes můžeme s jistotou říct, že převážně oblast Českého masivu obývá pravý blešivec potoční *Gammarus fossarum* sensu stricto. Nevíme jistě, zda kryptické linie ze Západních Karpat jsou odlišné i morfologicky či ne, neboť zatím jsme se studiu odlišných determináčnických znaků mezi liniemi nevěnovali.

Při pohledu na distribuci linií v daném areálu je zřejmé, že na rozdíl od Českého masivu, kde je patrné rozšíření linií ze středo-západoevropské větve (CWE A) a východoevropské větve (EE Q), je oblast Západních Karpat osídlena šesti dalšími liniemi (CWE D, CE A, CE B, EE T, EE R a EE S). Také jsme ale odhalili dvě linie (CE A a CE B),

kteře doposud nebyly známy, a tak tvořĩ novou středoevropskou skupinu. Navĩc dvě nalezené linie (EE Q a CE A) se jeví jako bazální linie v celoevropském kontextu na základě mtDNA.

Mnohé linie jsme našli pouze z mála lokalit (CE B, EE R a EE S, CWE D). Linie EE R, EE S a CE B by tedy mohly být zajímavé i z hlediska potencionální ochrany lokalit jejich výskytu, neboť se zřejmě jedná o lokální endemity.

Vĩme, že oblast pohoří Karpat je centrem diverzity mnohých organismů (Bálint et al. 2011), což je zřejmé i v případě blešivců tohoto druhového komplexu (Copilaș-Ciocianu & Petrusek 2015). Mimo jiné Karpaty hrály důležitou roli v období pleistocenních glaciálů, kdy sloužily jako glaciální refugia (Provan & Bennett 2008) pro blešivce obecně a zřejmě i pro další permanentní vodní faunu, jak ukazují například molekulární data druhového komplexu *G. balcanicus* (Mamos et al. 2014; Copilaș-Ciocianu & Petrusek 2017b), nebo pošvatky *Arcynopteryx dichroa* (Theissing et al. 2012). Dlouhodobá existence vhodných stanovišť pro různé organismy v několika klimatických cyklech pravděpodobně souvisí s vysokou topografickou rozmanitostí Karpat, čímž vzniká velký počet mikrohabitatů, které jsou klimaticky nezávislé od okolních oblastí (Bálint et al. 2011).

Dřívější představy o aridním prostředí našeho území v období posledního glaciálního maxima (Chlupáč 2011) dnes nahrazuje předpoklad o přítomnosti zalesněných ploch v různých izolovaných areálech střední Evropy a Západních Karpat (Willis & van Andel 2004; Magri et al. 2006; Kuneš et al. 2008; Juřičková et al. 2014a; Mítka et al. 2014). Srovnání glaciálních fosilních pylovými záznamy ze střední Evropy s dnešními pylovými analýzami různých druhů vegetace z jižní Sibiře potvrdilo značnou podobnost u dominantních druhů rostlin a typů vegetace (Kuneš et al. 2008). Tato studie také zdůrazňuje přítomnosti zamokřených biotopů, taková místa byla často izolovaná (Horsák et al. 2015).

Kromě přítomnosti ploch s vegetací a tím i přínosem organického detritu je pro existenci blešivců v přírodě zásadní přítomnost permanentních vodních toků. Vzhledem k tomu, že v Karpatech nebyly ledovce rozsáhlé, omezujícím faktorem pro přežití suchozemských horských organismů byl pravděpodobně vlhkost prostředí a dostupnost vody, jako v případě kontinentálních druhů (Bálint et al. 2011).

Minerální vody včetně termálních pramenů, které jsou hlubší a mají velkou sběrnici, bývají v obdobích sucha i zimy mnohem stabilnější, neboť by nemělo docházet k jejich vyschnutí či zamrznutí. A právě takové termální prameny se v oblasti Západních Karpat vyskytují v mnohem větší míře než v oblasti Českého masivu (Franko & Kolářová 1985;

Franko et al. 2008). Na Slovensku vyvěraly tyto prameny již před 2 miliony let na konci pozdního Pliocénu a mnohem častěji se vyskytovaly během interglaciálních období (Franko et al. 2008). Období chladných klimatických podmínek v dobách pleistocénu mohly mnohé organizmy přežít v tocích, které byly pufrovány vodou z termálních pramenů, jež zamezily jejich zamrznutí (Theissinger et al. 2012).

V naší práci předpokládáme, že právě i linie určené jako bazální, anebo s endemickým výskytem *in situ*, mohly v oblasti Západních Karpat přežít nepříznivá období glaciálů v takových tocích. Oproti tomu jedinci linie CWE A zřejmě přežili toto období v jiných evropských refugiích (Weiss & Leese 2016; Westram et al. 2011).

## 6.2 Distribuce linií na Vsetínsku

Po studiu v celé oblasti ČR/SK jsme se zaměřili na detailnější analýzu v oblasti blízkého kontaktu několika linií. Z výsledků na velkém měřítku jsme věděli o blízkém kontaktu třech linií v námi vybrané lokalitě na Vsetínsku. Hned první analýza ale ukázala výskyt linií čtyř (CWE A, CWE D, EE Q a CE A). S výskytem linie CWE D jsme v prvopočátku nepočítali, neboť na území České republiky jsme ji našli pouze na jedné lokalitě v povodí Odry, zatímco Vsetínská oblast spadá pod povodí Moravy. Na Slovensku byla ale nalezena na šesti lokalitách v povodí Váhu a Hronu, její areál je tedy zjevně rozsáhlejší. Výskyt jedinců CWE D na Vsetínsku byl potvrzen, ale stejně jako v případě velké škály se jednalo pouze o osm z celkového počtu 277 analyzovaných jedinců. Stále tedy platí, že se tato linie vyskytuje jen velmi vzácně. Také jsme předpokládali, že se nám podaří nalézt linie na tocích i syntopicky, neboť byly již dříve objeveny takové lokality, kde se setkávají linie středo-západoevropské větve CWE A a CWE B (Müller 1998; Altermatt et al. 2014).

Z 61 analyzovaných lokalit jsem určila u 31 lokalit výskyt pouze jedné linie. Přičemž při naší analýze lokalit z horní i dolní části toku nastala situace, kdy na horním i dolním toku jsem určila zástupce pouze jedné linie, zároveň se ale v horní části vyskytuje odlišná linie než na spodní části toku. Tento zdánlivě dramatický rozdíl by ale mohl být alespoň do určité míry důsledkem náhody při výběru jednotlivých jedinců, neboť jsem z každé lokality většinou pracovala pouze s 5 kusy. Minimálně to ale znamená, že se v některých tocích výrazně měnil na jejich podélném profilu poměr linií. K potvrzení, nebo vyvrácení těchto prvotních výsledků bude v budoucnu nutné zanalyzovat mnohem větší množství jedinců. Na zbylých 30 lokalitách jsem odhalila koexistenci více linií. Pokud by se tento trend projevil i po určení

dalších jedinců z populací, bylo by možné uvažovat, že nějaké parametry prostředí mají na distribuci linií vliv.

Studium genetiky druhových komplexů je jen prvním krokem, poté je možné zvažovat jaké (pokud nějaké) to má ekologické důsledky (Feckler et al. 2012; Eisenring et al. 2016). Různé druhy blešivců mají rozdílné preference a míru tolerance na vlivy prostředí, jako je salinita (MacNeil & Prenter 2000), množství kyslíku (Hervant et al. 1995) či nadmořská výška (Müller et al. 2000; Eisenring et al. 2016). To neplatí jen pro morfologicky dobře odlišené druhy, ale i pro některé linie morfologicky kryptických druhových komplexů (Müller et al. 2000; Feckler et al. 2012; Eisenring et al. 2016).

Blešivci potoční obvykle upřednostňují pramenné části a toky s vyšším spádem (Hervant et al. 1995; Copilaș-Ciocianu et al. 2014; Eisenring et al. 2016). Nám se je podařilo nalézt nejen v oblasti Vsetínska, ale i v nejrůznějších oblastech v České a Slovenské republice i v zakalených a téměř stojících malých tocích (např. pod výpustí z rybníka). To lze vysvětlit poměrně vysokými úživnostmi těchto úseků toku a tím i vysokým množstvím vhodné potravy, což obvykle koreluje s abundancí vodních bezobratlých živočichů (Krull 1970; Anteau et al. 2011). Limitující pro tyto blešivce nicméně dostatečné prokysličené toku bude, v pomalých tocích nížin jihovýchodní Moravy nebo Podunají jsme je nenalezli.

Na možné odlišné podmínky prostředí jsme se při analýze na velké škále příliš nezaměřovali. V rámci studovaného areálu se výškový rozsah běžných linií signifikantně nelišil. Čtyři nejčastěji se vyskytující linie (CWE A, CE A, EE Q a EE T) byly všechny vzorkovány v nadmořských výškách mezi cca 250 a 850 m.n.m. (Copilaș-Ciocianu et al. 2017a) a jejich valence je jistě ještě širší. To by nasvědčovalo, že topografie a současné podmínky prostředí nejsou limitními faktory disperze (Lee et al. 2009). U linií CWE A a CWE B byly popsány odlišné preference či adaptace na určité podmínky na tocích (Müller et al. 2000; Feckler et al. 2012; Eisenring et al. 2016), přičemž vliv nadmořské výšky je považován za faktor zásadní (Eisenring et al. 2016). V povodí řeky Rýn v Německu a Švýcarsku obývá linie CWE B převážně toky v nižší nadmořské výšce v méně zalesněných oblastech s vyšší antropogenní činností, zatímco linie CWE A ukazuje opačný trend a obývá spíše toky ve vyšších nadmořských výškách v zalesněných oblastech (Müller et al. 2000; Eisenring et al. 2016). I pro mou studii bylo jedním z cílů detailní analýzy na Vsetínsku zaměřením se na proměnné parametry prostředí. Výsledky ukázaly, že významnou roli by mohla hrát velikost toku, která souvisí právě i s nadmořskou výškou. Zatím ale nejsme schopni říct, který parametr je důležitější. S velikostí toku může souviset rychlost

proudění, větší stabilita podmínek (malé toky mohou více fluktuovat), či menší predační tlak ryb. Samozřejmě se zde může jednat o kombinaci vlivu kolonizační historie, kompetice či mikrohabitatové preference.

V rámci Vsetínska jsem na lokalitách s vyšší nadmořskou výškou (většinou v téměř pramenné části) našla častěji jedince linie EE Q, linie CWE A byla podle RDA spíše na lokalitách ve spodní části, kde je tok větší. To ukazuje, že linie CWE A je přizpůsobena i mnohem širšímu spektru environmentálních podmínek, než jaké obvykle panují v lokalitách ve vyšší nadmořské výšce s malým vlivem antropogenní činnosti. Dále zástupci CE A z detailní analýzy jsou více vázáni na spodní části toku, které se vyznačují větší šířkou toku a rychlejším prouděním. Na kontaktu s jinými liniemi může v důsledku interakcí dojít k rozrůznění, které jsme doposud nepozorovali. Například Muller (2000) a Eisinger et al. (2016) předpokládají, že adaptace na podmínky prostředí linií CWE A a CWE B mohou souviset s přežíváním pleistocenních glaciálů v charakterově odlišných refugích. K potvrzení nebo vyvrácení této hypotézy by bylo v našem případě nutné otestovat, zda linie vykazují stejný trend v rozšíření na tocích i v dalších oblastech na kontaktu.

### **6.3 Určování linií za pomoci PCR se specifickými primery**

Vzhledem k tomu, že bude analýze blešivců tohoto komplexu nejen na Vsetínsku, ale i v dalších oblastech ČR, kde se linie potkávají, věnováno více prostoru v navazujících studiích, bylo vhodné vyvinout a otestovat pro účely určování linií rychlejší a levnější metodu, což umožní v budoucnu analyzovat velké množství vzorků.

Ačkoliv jsem pomocí specifických primerů získala 202 amplifikovaných fragmentů, nemůžu říci, že specifické primery fungovaly vždy zcela spolehlivě. Ve 48 případech jsem musela vzorky, u nichž nedošlo k amplifikaci ani s jednou kombinací primerů, amplifikovat univerzálními primery pro úsek genu 16S a až z fylogenetického stromu jsem mohla určit, o jakou linii se jedná. Příčinu, proč někteří jedinci nereagovaly na specifické primery, lze vysvětlit přítomností dalších mutací v úseku nasedání primerů. O nich jsme při návrhu primerů nevěděli, v sekvencích těchto nereagujících jedinců jsem však bodové mutace našla. Pro budoucí lze tedy uvažovat o návrhu nového degenerovaného primeru pro určení linie CWE A (u které docházelo k problémům s amplifikací nejčastěji).

Po sérii testů prvního primeru, u něž jsme předpokládali specificitu pro linii CWE A jsem zjistila, že docházelo občasně i k amplifikaci jedinců patřících ve skutečnosti do linie CE A (u těchto dvou linií v oblasti nasedání primeru se prvních 17 nukleotidů vůbec nelišilo). Později jsem ale přišla na zásadní chybu a to, že nám v sekvenci tohoto primeru chyběl jeden nukleotid, označený žlutě v sekvenci primeru v závorce (5'- GATGAA**G**GGTTAAACAG GCTGARG - 3'). Nový primer je výrazně spolehlivější a k amplifikaci jedinců CE A již nedocházelo.

Designováním specifických primerů pro určení taxonů pomocí PCR se zabývá mnoho studií. Jednak lze specifické primery využít pro identifikaci kryptických linií ve vzorcích (Stewart et al. 2010; Grabbert et al. 2010; Piergiorgio et al. 2014), velice často se ale jedná o určování rozličných taxonů bakterií, kdy rychlé určení nejrůznějších patogenů je velice zásadní (Berthier & Ehrlich 1998; Reitstetter 2006; Pagès et al. 2009; Chen et al. 2010).

#### 6.4 Reprodukční izolace linií

Výsledky z oblasti ČR/SK ani z oblasti Vsetínska nenasvědčují, že by mezi liniemi (i syntopickými) mělo docházet ke křížení. Tomu nasvědčují i výsledky zaměřené na blešivce tohoto komplexu v západních oblastech Evropy (Müller et al. 2000). Předpokládá se, že v rámci této skupiny existují dobře vyvinuté prezygotické reprodukční bariéry, například behaviorální neschopnost rozeznat při sekundárním kontaktu geneticky vzdáleného příslušníka odlišné linie jako vhodného partnera k párování (Cothran et al. 2013; Lagrue et al. 2014; Galipaud et al. 2015). Müller et al. (2000) a Westram et al. (2013) naznačující, že místa, kde se setkávají linie CWE A, B a C v západní Evropě jsou oblasti sekundárního kontaktu po návratu z rozdílných refugii (). Tato izolace mohla dát vznik dostatečné genetické bariéře na to, aby již nedocházelo k hybridizaci. Jak ukazuje analýza prekopulačních párů, je zde vysoká preference pro příslušníky z vlastní linie (Westram et al. 2011).

V laboratorních podmínkách k páření a vniku hybridních embryí sice došlo, ale není jisté, zda by vzniklí kříženci byli schopni přežít a množit se v přírodních podmínkách. Doposud proběhlé výzkumy se spíše zaměřují na preference při prekopulačním párování mezi liniemi a na reprodukční interferenci, protože na základě několika málo doposud provedených prací se předpokládá, že ke vzniku hybridů v rámci této skupiny vlivem reprodukčních bariér v přírodě příliš často nedochází (Cothran et al. 2013; Lagrue et al. 2014). Z analýzy vybraných jedinců linií CWE A, EE Q a CE A ze syntopických populací vyplývá, že zde



k hybridizaci také nedochází (alespoň ne příliš často), neboť jsme nenalezli diskrepanci mezi výsledky mitochondriální DNA (úseku genu pro 16S rRNA) a jaderné DNA (úseku genu pro 28S rRNA). Bohužel se mi nepodařilo amplifikovat úsek genu 28S ani u jednoho DNA izolátu jedinců ze syntopických populací z linie CWE D. Výsledky reprodukční izolace linií podporují výsledky z analýzy z oblasti ČR/SK. Nicméně v minulosti zjevně k nějakým procesům křížení docházelo, což je zřejmé z rozporu ve fylogenetickém zařazení linie EE Q, kdy se na základě mitochondriální DNA zdá být bazální v rámci komplexu, na základě jaderné DNA však nikoliv (Copilaș-Ciocianu et al. 2017a).

Díky tomu, že se linie dle všeho nekříží, otvírají tyto výsledky možnost dalším výzkumům zaměřených na detailnější analýzy na mikrohabitatové úrovni. Při alopatrické speciaci totiž může dojít ke vzniku reprodukčně izolovaných linií, u kterých ale nemuselo dojít k diverzifikaci jejich nik či k významným morfologickým změnám (Leibold & McPeck 2006). Již nyní se začíná řešit diplomová práce zaměřená na experimentální studie s blešivci tohoto komplexu v oblastech blízkého kontaktu ze Vsetínska, a i dalších obdobných míst na našem území. Pokusy se týkají potenciálního párování mezi příslušníky z různých linií, jejich lokální distribuci na mikroměřítku a případných habitatových preferencí.

## 7 Závěr

Hlavním cílem této studie bylo zjištění, jaká je diverzita a distribuce linií druhového komplexu *Gammarus fossarum* oblastmi Českého masivu a Západních Karpat. Naše výsledky ukázaly výrazný rozdíl v osídlení těchto dvou celků, kdy se v prvně jmenované oblasti vyskytují pouze dvě linie s převahou výskytu pravého blešivce potočního *Gammarus fossarum* sensu stricto. Oblast Západních Karpat oplývá diverzitou větší, neboť se zde vyskytuje dalších šest linií, přičemž předpokládáme, že distribuce a divergence těchto linií je způsobena jejich dlouhodobým přežíváním pleistocenních glaciálu v oblastech jejich dnešního výskytu, i díky přítomnosti termálně pufrovaných toků. Linie s velmi omezenými areály mohou být místními endemity, do budoucna by bylo vhodné zvážit i případnou cílenou ochranu jejich habitatů.

Při pohledu na detailní analýzu linií v blízkém kontaktu na Vsetínsku jsme potvrdili hypotézu, že odlišné linie koexistují na stejných lokalitách. Již z výsledné mapy vyskytujících se jedinců v oblasti lze vyčíst určité trendy v distribuci linií v oblasti. Na základě RDA analýzy jsme dospěli k závěru, že by nemalé procento variability mohly vysvětlovat i faktory prostředí.

Podarilo se nám vytvořit specifické primery amplifikující fragmenty mitochondriálního genu pro 16S rRNA pro čtyři linie, jejichž výskyt jsme potvrdili na základě sekvenace. Využití této metody bylo sice z počátku časově náročné z důvodu optimalizace protokolu, na druhou stranu jsme ušetřili značnou sumu peněz za jinak potřebnou sekvenaci a protokol bude využíván v navazujících studiích.

Pro budoucí studie kontaktních lokalit blešivců tohoto komplexu na území ČR bylo důležité otestovat hypotézu, že u syntopickým populací nedochází k masivní introgresi a sdílení jaderné DNA. Tento předpoklad se nám podařilo také potvrdit, a tak výsledky z této studie mohou být brány jako základní kámen studia blešivců druhového komplexu *Gammarus fossarum* v oblasti Českého masivu a Západních Karpat.

## 8 Seznam citované literatury

- Altermatt, F., Alther, R., Fišer, C., Jokela, J., Konec, M., Küry, D., Mächler, E., Stucki, P. & Westram, A.M. (2014). Diversity and distribution of freshwater amphipod species in Switzerland (Crustacea: Amphipoda). *PloS ONE* 9: 110328.
- Anteau, M.J., Afton, A.D., Anteau, A.C. & Moser, E.B. (2011). Fish and land use influence *Gammarus lacustris* and *Hyaella azteca* (Amphipoda) densities in large wetlands across the upper Midwest. *Hydrobiologia* 664: 69-80.
- Bálint, M., Domisch, S., Engelhardt, C.H.M., Haase, P., Lehrian, S., Sauer, J., Theissinger, K., Pauls, S.U. & Nowak, C. (2011). Cryptic biodiversity loss linked to global climate change. *Nature Climate Change* 1: 313-318.
- Barnard, J.L. & Barnard, C.M. (1983). Freshwater amphipods of the World. I. Evolutionary patterns. II. Handbook and bibliography. *Hayfield Associates: Mt. Vernon, Virginia*.
- Berthier, F. & Ehrlich, S.D. (1998). Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiology Letters* 161: 97-106.
- Bij de Vaate, A., Jazdzewski, K., Ketelaars, H.A., Gollasch, S. & Van der Velde, G. (2002). Geographical patterns in range extension of Ponto-Caspian macroinvertebrate species in Europe. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 1159-1174.
- Coleman, C.O. & Gonzalez, E.R. (2006). New hyalellids (Crustacea, Amphipoda, Hyalellidae) from Lake Titicaca. *Organisms Diversity and Evolution* 6: 218.
- Copilaș-Ciocianu, D. & Petrusek, A. (2015). The southwestern Carpathians as an ancient centre of diversity of freshwater gammarid amphipods: insights from the *Gammarus fossarum* species complex. *Molecular Ecology* 24: 3980-3992.
- Copilaș-Ciocianu, D. (2013). *Gammarus komareki* Schäferna, 1922 (Peracarida, Amphipoda), a new amphipod species for the Romanian fauna, with remarks on its biogeography. *Crustaceana* 6: 673-681.
- Copilaș-Ciocianu, D., Grabowski, M., Pârvolescu, L. & Petrusek, A. (2014). Zoogeography of epigeal freshwater Amphipoda (Crustacea) in Romania: fragmented distributions and wide altitudinal variability. *Zootaxa* 3893: 243-260.
- Copilaș-Ciocianu, D., Rutová, T., Pařil, P. & Petrusek, A. (2017a). Epigeal gammarids survived millions of years of severe climatic fluctuations in high latitude refugia throughout the Western Carpathians. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 112: 218-229.
- Copilaș-Ciocianu, D. & Petrusek, A. (2017b). Phylogeography of a freshwater crustacean species complex reflects a long-gone archipelago. *Journal of Biogeography* 44: 421-432.
- Copilaș-Ciocianu, D., Fišer, C., Borza, P. & Petrusek, A. (2018). Is subterranean lifestyle reversible? Independent and recent large-scale dispersal into surface waters by two species of the groundwater amphipod genus *Niphargus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 119: 37-49.
- Cothran, R.D., Henderson, K.A., Schmidenberg, D. & Relyea, R.A. (2013). Phenotypically similar but ecologically distinct: differences in competitive ability and predation risk among amphipods. *Oikos* 122: 1429-1440.
- Costa, F.O., Henzler, C.M., Lunt, D.H., Whiteley, N.M. & Rock, J. (2009). Probing marine *Gammarus* (Amphipoda) taxonomy with DNA barcodes. *Systematics and Biodiversity* 7: 365-379.
- Cristescu, M.E. & Hebert, P.D. (2005). The "Crustacean Seas" – an evolutionary perspective on the Ponto-Caspian peracarids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62: 505-517.

- Dumont, H.J.** (1998). The Caspian Lake: history, biota, structure, and function. *Limnology and Oceanography* 43: 44-52.
- Edgar, R.C.** (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Eisenring, M., Altermatt, F., Westram, A.M. & Jokela, J.** (2016). Habitat requirements and ecological niche of two cryptic amphipod species at landscape and local scales. *Ecosphere* 7: 1319.
- Englisch, U., Coleman, C.O. & Wägele, J.W.** (2003). First observations on the phylogeny of the families Gammaridae, Crangonyctidae, Melitidae, Niphargidae, Megaluropidae and Oedicerotidae (Amphipoda, Crustacea), using small subunit rDNA gene sequences. *Journal of Natural History* 37: 2461-2486.
- Feckler, A., Thielsch, A., Schwenk, K., Schulz, R. & Bundschuh, M.** (2012). Differences in the sensitivity among cryptic lineages of the *Gammarus fossarum* complex. *Science of the Total Environment* 439: 158-164.
- Feckler, A., Zubrod, J.P., Thielsch, A., Schwenk, K., Schulz, R. & Bundschuh, M.** (2014). Cryptic species diversity: an overlooked factor in environmental management? *Journal of Applied Ecology* 51: 958-967.
- Feliner, G.N.** (2011). Southern European glacial refugia: a tale of tales. *Taxon* 60: 365-372.
- Fišer, C., Pipan, T. & Culver, D.C.** (2014). The vertical extent of groundwater metazoans: an ecological and evolutionary perspective. *BioScience* 64: 971-979.
- Fišer, Ž., Altermatt, F., Zakšek, V., Knapič, T. & Fišer, C.** (2015). Morphologically cryptic amphipod species are “ecological clones” at regional but not at local scale: a case study of four *Niphargus* species. *PloS ONE* 10: 134384.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W. & 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.
- Franko, O., Kolářová, M. & Mateovič, E.** (1985). Katalóg dokumentačných bodov k mape minerálnych vôd ČSSR 1: 500 000. *Geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava*.
- Franko, O., Sivo, A., Richtáriková, M. & Povinec, P.P.** (2008). Radiocarbon ages of mineral and thermal waters of Slovakia. *Acta Physica Universitatis Comenianae* 48-49: 111-124.
- Galipaud, M., Gauthey, Z., Turlin, J., Bollache, L. & Lagrue, C.** (2015). Mate choice and male–male competition among morphologically cryptic but genetically divergent amphipod lineages. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 6: 1907-1916.
- Grabbert, S., Renz, J., Hirche, H.J. & Bucklin, A.** (2010). Species-specific PCR discrimination of species of the calanoid copepod *Pseudocalanus*, *P. acuspes* and *P. elongatus*, in the Baltic and North Seas. *Hydrobiologia* 652: 289-297.
- Grabowski, M., Mamos, T., Baćela-Spychalska, K., Rewicz, T. & Wattier, R.A.** (2017). Neogene paleogeography provides context for understanding the origin and spatial distribution of cryptic diversity in a widespread Balkan freshwater amphipod. *PeerJ* 5: 3016.
- Hebert, P.D., Cywinska, A. & Ball, S.L.** (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270: 313-321.
- Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D. & Fréminet, A.** (1995). Behavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and the epigeal *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). *Physiological Zoology* 68: 223-244.
- Horsák, M. & Černohorský, N.** (2008). Mollusc diversity patterns in Central European fens: hotspots and conservation priorities. *Journal of Biogeography* 35: 1215-1225.
- Horsák, M., Chytrý, M., Hájková, P., Hájek, M., Danihelka, J., Horsáková, V., Ermakov, N., German, D.A., Kočí, M., Lustyk, P. & Nekola, J.C.** (2015). European glacial relict snails and plants: environmental context of their modern refugial occurrence in southern Siberia. *Boreas* 44: 638-657.

- Horsák, M., Čejka, T., Juříčková, L., Beran, L., Horáčková, J., Hlaváč, J.Č., Dvořák, L., Hájek, O., Divíšek, J., Mañas, M. & Ložek, V. (2016). Seznam a distribuční mapy měkkýšů České a Slovenské republiky. *Online [cit. 14. 7. 2016]. Dostupné z <http://mollusca.sav.sk/malacology/checklist>.*
- Hou, Z. & Li, S. (2004). *Gammarus* species from Tibet Plateau, China (Crustacea: Amphipoda: Gammaridae). *Raffles Bulletin of Zoology* 52: 147-170.
- Hou, Z., Fu, J. & Li, S. (2007). A molecular phylogeny of the genus *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda) based on mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 596-611.
- Hou, Z., Sket, B., Fišer, C. & Li, S. (2011). Eocene habitat shift from saline to freshwater promoted Tethyan amphipod diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 108: 14533-14538.
- Hou, Z., Sket, B. & Li, S. (2014). Phylogenetic analyses of Gammaridae crustacean reveal different diversification patterns among sister lineages in the Tethyan region. *Cladistics* 30: 352-365.
- Hou, Z. & Sket, B. (2016). A review of Gammaridae (Crustacea: Amphipoda): the family extent, its evolutionary history, and taxonomic redefinition of genera. *Zoological Journal of the Linnean Society* 176: 323-348.
- Yu, S., Chen, W., Wang, D., He, X., Zhu, X. & Shi, X. (2010). Species-specific PCR detection of the food-borne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* using the *irgB* gene identified by comparative genomic analysis. *FEMS Microbiology Letters* 307: 65-71.
- Chlupáč, I. (2011). Geologická minulost České republiky. *Academia, Praha* 436 s.
- Juračka, P.J., Declerck, S.A., Vondrák, D., Beran, L., Černý, M. & Petrusek, A. (2016). A naturally heterogeneous landscape can effectively slow down the dispersal of aquatic microcrustaceans. *Oecologia* 180: 785-796.
- Juříčková, L., Horsák, M., Horáčková, J., Abraham, V. & Ložek, V. (2014). Patterns of land-snail succession in Central Europe over the last 15,000 years: main changes along environmental, spatial and temporal gradients. *Quaternary Science Reviews* 93: 155-166.
- Juříčková, L., Horáčková, J. & Ložek, V. (2014). Direct evidence of central European forest refugia during the last glacial period based on mollusc fossils. *Quaternary Research* 82: 222-228.
- Kamaltynov, R.M. (1999). On the evolution of Lake Baikal amphipods. *Crustaceana* 72: 921-932.
- Karaman, G.S. & Pinkster, S. (1977). Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). *Bijdragen tot de Dierkunde* 47: 1-97
- Karaman, G.S. (1987). Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda) and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). *Bijdragen tot de Dierkunde* 57: 207-260.
- Katoh, K. & Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772-780.
- Kornobis, E., Pálsson, S., Sidorov, D.A., Holsinger, J.R. & Kristjánsson, B.K. (2011). Molecular taxonomy and phylogenetic affinities of two groundwater amphipods, *Crangonyx islandicus* and *Crymostygius thingvallensis*, endemic to Iceland. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 58: 527-539.
- Kováč, M., Plašienka, D., Soták, J., Vojtko, R., Oszczytko, N., Less, G., Čosović, V., Fügenschuh, B. & Králiková, S. (2016). Paleogene palaeogeography and basin evolution of the Western Carpathians, Northern Pannonian domain and adjoining areas. *Global and Planetary Change* 140: 9-27.
- Krull, J.N. (1970). Aquatic plant-macroinvertebrate associations & waterfowl. *The Journal of Wildlife Management* 4: 707-718.
- Lagrange, C., Wattier, R., Galipaud, M., Gauthey, Z., Rullmann, J.P., Dubreuil, C., Rigaud, T. & Bollache, L. (2014). Confrontation of cryptic diversity and mate discrimination within *Gammarus pulex* and *Gammarus fossarum* species complexes. *Freshwater Biology* 59: 2555-2570.

- Lee, J.E., Janion, C., Marais, E., van Vuuren, B.J. & Chown, S.L.** (2009). Physiological tolerances account for range limits and abundance structure in an invasive slug. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 276: 1459-1468.
- Lefébure, T., Douady, C.J., Malard, F. & Gibert, J.** (2007). Testing dispersal and cryptic diversity in a widely distributed groundwater amphipod (*Niphargus rhenorhodanensis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 676-686.
- Leibold, M.A. & McPeck, M.A.** (2006). Coexistence of the niche and neutral perspectives in community ecology. *Ecology* 87: 1399-1410.
- Leigh, J.W. & Bryant, D.** (2015). Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6: 110-1116.
- Macdonald I, K.S., Yampolsky, L. & Duffy, J.E.** (2005). Molecular and morphological evolution of the amphipod radiation of Lake Baikal. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 323-343.
- MacNeil, C. & Prenter, J.** (2000). Differential microdistributions and interspecific interactions in coexisting native and introduced *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Zoology* 251: 377-384.
- MacNeil, C., Dick, J.T. & Elwood, R.W.** (1997). The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Reviews* 72: 349-364.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R.** (2015). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.04, <http://mesquiteproject.org>.
- Magri, D., Vendramin, G.G., Comps, B., Dupanloup, I., Geburek, T., Gömöry, D., Latalowa, M., Litt, T., Paule, L., Roure, J.M. & Tantau, I.** (2006). A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist* 171: 199-221.
- Mamos, T., Wattier, R., Majda, A., Sket, B. & Grabowski, M.** (2014). Morphological vs. molecular delineation of taxa across montane regions in Europe: the case study of *Gammarus balcanicus* Schäferna, (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 52: 237-248.
- Mamos, T., Wattier, R., Burzyński, A. & Grabowski, M.** (2016). The legacy of a vanished sea: a high level of diversification within a European freshwater amphipod species complex driven by 15 My of Paratethys regression. *Molecular Ecology* 25: 795-810.
- Matafonov, D.V. & Bazova, N.V.** (2014). Decline of *Gammarus lacustris* Sars (Crustacea: Amphipoda) population in the delta of the Selenga River. *Biology Bulletin* 41: 168-175.
- McInerney, C.E., Maurice, L., Robertson, A.L., Knight, L.R., Arnscheidt, J., Venditti, C., Dooley, J.S., Mathers, T., Matthijs, S., Eriksson, K. & Proudlove, G.S.** (2014). The ancient Britons: groundwater fauna survived extreme climate change over tens of millions of years across NW Europe. *Molecular Ecology* 23: 1153-1166.
- Meyran, J.C., Monnerot, M. & Taberlet, P.** (1997). Taxonomic Status and Phylogenetic Relationships of Some Species of the Genus *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) Deduced from Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 1-10.
- Meyran, J.C. & Taberlet, P.** (1998). Mitochondrial DNA polymorphism along alpine populations of *Gammarus lacustris* (Crustacea: Amphipoda). *Freshwater Biology* 39: 259-266.
- Meyran, J.C., Gielly, L. & Taberlet, P.** (1998). Environmental calcium and mitochondrial DNA polymorphism among local populations of *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Molecular Ecology* 7: 1391-1400.
- Mitka, J., Bába, W. & Szczepanek, K.** (2014). Putative forest glacial refugia in the Western and Eastern Carpathians. *Modern Phytomorphology* 5: 85-92.
- Müller, J.** (1998). Genetic population structure of two cryptic *Gammarus fossarum* types across a contact zone. *Journal of Evolutionary Biology* 11: 79-101.
- Müller, J.** (2000). Mitochondrial DNA variation and the evolutionary history of cryptic *Gammarus fossarum* types. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 260-268.



- Müller, J., Partsch, E. & Link, A.** (2000). Differentiation in morphology and habitat partitioning of genetically characterized *Gammarus fossarum* forms (Amphipoda) across a contact zone. *Biological Journal of the Linnean Society* 69: 41-53.
- Oksanen, J.** (2011). Multivariate analysis of ecological communities in R: vegan tutorial. *R package version 1*: 11-12.
- Pagès, N., Muñoz-Muñoz, F., Talavera, S., Sarto, V., Lorca, C. & Núñez, J.I.** (2009). Identification of cryptic species of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus Culicoides and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. *Veterinary Parasitology* 165: 298-310.
- Palumbi, S.R., Martin, A., Romano, S., Mcmillan, W.O., Stice, L. & Grabowski, G.** (1991). The Simple Fool's Guide to PCR. A Collection of PCR Protocols, Version 2. *University of Hawaii, Honolulu*.
- Pârvulescu, L., Zaharia, C., Satmari, A. & Drăguț, L.** (2013). Is the distribution pattern of the stone crayfish in the Carpathians related to karstic refugia from Pleistocene glaciations? *Freshwater Science* 32: 1410-1419.
- Piergiorgio, R.M., Pontes, M.N., Duarte, A.V.B. & Gusmão, J.** (2014). Haplotype-specific single-locus multiplex PCR assay for molecular identification of sea-bob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862), cryptic species from the Southwest Atlantic using a DNA pooling strategy for simultaneous identification of multiple samples. *Biochemical Systematics and Ecology* 54: 348-353.
- Popov, S.V., Rögl, F., Rozanov, A.Y., Steininger, F.F., Shcherba, I.G. & Kovac, M.** (2004). Lithological-Paleogeographic maps of Paratethys-10 maps Late Eocene to Pliocene. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg* 250: 1-46.
- Provan, J. & Bennett, K.D.** (2008). Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in ecology & evolution* 23: 564-571.
- QGIS Development Team** (2016). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>
- Reitstetter, R.E.** (2006). Development of species-specific PCR primer sets for the detection of *Leptosira*. *FEMS Microbiology Letters* 264: 31-39.
- Rögl, F.** (1999). Mediterranean and Paratethys. Facts and hypotheses of an Oligocene to Miocene paleogeography (short overview). *Geologica Carpathica* 50: 339-349.
- Salvo, G., Ho, S.Y., Rosenbaum, G., Ree, R. & Conti, E.** (2010). Tracing the temporal and spatial origins of island endemics in the Mediterranean region: a case study from the citrus family (*Ruta* L., Rutaceae). *Systematic Biology* 59: 705-722.
- Schenková, J., Sychra, J., Košel, V., Kubová, N. & Horecký, J.** (2009). Freshwater leeches (Annelida: Clitellata: Hirudinida) of the Czech Republic (Central Europe): check-list, new records, and remarks on species distributions. *Zootaxa*, 2227: 32-52.
- Schenková, J., Pařil, P., Petřivalská, K. & Bojková, J.** (2010). Aquatic oligochaetes (Annelida: Clitellata) of the Czech Republic: check-list, new records, and ecological remarks. *Zootaxa* 2676: 29-44.
- Schmitt, M. & Rönn, T.** (2011). Types of geographical distribution of leaf beetles (Chrysomelidae) in Central Europe. *ZooKeys* 157: 131.
- Schmitt, T.** (2007). Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology* 4: 11.
- Schön, I. & Martens, K.** (2004). Adaptive, pre-adaptive and non-adaptive components of radiations in ancient lakes: a review. *Organisms Diversity & Evolution* 4: 137-156.
- Schwenk, K., Sand, A., Boersma, M., Brehm, M., Mader, E., Offerhaus, D. & Spaak, P.** (1998). Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the Cladocera. *Aquatic Ecology* 32: 37-51.
- Siegismund, H.R. & Müller, J.** (1991). Genetic structure of *Gammarus fossarum* populations. *Heredity* 66: 419-436.
- Siegismund, H.R.** (1988). Genetic differentiation in populations of the freshwater amphipods *Gammarus roeseli* and *Gammarus fossarum*. *Hereditas* 109: 269-276.

- Sket, B. & Fišer, C.** (2009). A new case of intralacustrine radiation in Amphipoda. A new genus and three new species of Anisogammaridae (Crustacea, Amphipoda) from the ancient lake Fuxian Hu in Yunnan, China. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 47: 115-123.
- Sket, B.** (1999). The nature of biodiversity in hypogean waters and how it is endangered. *Biodiversity and Conservation* 8: 1319-1338.
- Stewart, L.C., Hale, R.J. & Hale, M.L.** (2010). Species-specific primers for the molecular identification of cryptic *Bombus* species in New Zealand. *Conservation Genetics* 11: 1207-1209.
- Svenning, J.C., Normand, S. & Kageyama, M.** (2008). Glacial refugia of temperate trees in Europe: insights from species distribution modelling. *Journal of Ecology* 96: 1117-1127.
- Swanson, G.A.** (1984). Dissemination of amphipods by waterfowl. *The Journal of Wildlife Management* 48: 988-991.
- Takhteev, V.V.** (2000). Trends in the evolution of Baikal amphipods and evolutionary parallels with some marine malacostracan faunas. *Advances in Ecological Research* 31: 197-220.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S.** (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Theissinger, K., Bálint, M., Feldheim, K.A., Haase, P., Johannesen, J., Laube, I. & Pauls, S.U.** (2013). Glacial survival and post-glacial recolonization of an arctic–alpine freshwater insect (*Arcynopteryx dichroa*, Plecoptera, Perlodidae) in Europe. *Journal of Biogeography* 40: 236-248.
- Trontelj, P., Douady, C.J., Fišer, C., Gibert, J., Gorički, Š., Lefébure, T., Sket, B. & Zakšek, V.** (2009). A molecular test for cryptic diversity in ground water: how large are the ranges of macro-stygobionts? *Freshwater Biology* 54: 727-744.
- Vainio, J.K. & Väinölä, R.** (2003). Refugial races and postglacial colonization history of the freshwater amphipod *Gammarus lacustris* in Northern Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 523-542.
- Väinölä, R., Witt, J.D.S., Grabowski, M., Bradbury, J.H., Jazdzewski, K. & Sket, B.** (2008). Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 241-255.
- Vanderploeg, H.A., Nalepa, T.F., Jude, D.J., Mills, E.L., Holeck, K.T., Liebig, J.R., Grigorovich, I.A. & Ojaveer, H.** (2002). Dispersal and emerging ecological impacts of Ponto-Caspian species in the Laurentian Great Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 1209-1228.
- Waldhauser, M.** 2016a. Mapa rozšíření *Cordulegaster boltonii* v České republice. V: Zicha, O. (Ed.), *Biological Library – BioLib*. <http://www.biolib.cz/cz/taxonmap/id283/>.
- Waldhauser, M.** 2016b. Mapa rozšíření *Cordulegaster bidentata* v České republice. V: Zicha, O. (Ed.), *Biological Library – BioLib*. <http://www.biolib.cz/cz/taxonmap/id282/>.
- Weiss, M. & Leese, F.** (2016). Widely distributed and regionally isolated! Drivers of genetic structure in *Gammarus fossarum* in a human-impacted landscape. *BMC Evolutionary Biology* 16: 153.
- Weiss, M., Macher, J.N., Seefeldt, M.A. & Leese, F.** (2014). Molecular evidence for further overlooked species within the *Gammarus fossarum* complex (Crustacea: Amphipoda). *Hydrobiologia* 721: 165-184.
- Wellborn, G.A., Cothran, R. & Bartholf, S.** (2005). Life history and allozyme diversification in regional ecomorphs of the *Hyaella azteca* (Crustacea: Amphipoda) species complex. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 161-175.
- Westram, A.M., Jokela, J. & Keller, I.** (2010). Isolation and characterization of ten polymorphic microsatellite markers for three cryptic *Gammarus fossarum* (Amphipoda) species. *Conservation Genetics Resources* 2: 401-404.
- Westram, A.M., Jokela, J., Baumgartner, C. & Keller, I.** (2011). Spatial distribution of cryptic species diversity in European freshwater amphipods (*Gammarus fossarum*) as revealed by pyrosequencing. *PloS ONE* 6: 23879.

- Westram, A.M., Jokela, J. & Keller, I.** (2013). Hidden biodiversity in an ecologically important freshwater amphipod: differences in genetic structure between two cryptic species. *PLoS ONE* 8: 69576.
- Willis, K.J. & Van Andel, T.H.** (2004). Trees or no trees? The environments of central and eastern Europe during the Last Glaciation. *Quaternary Science Reviews* 23: 2369-2387.
- Wysocka, A., Grabowski, M., Sworobowicz, L., Burzyński, A., Kilikowska, A., Kostoski, G. & Sell, J.** (2013). A tale of time and depth: intralacustrine radiation in endemic *Gammarus* species flock from the ancient Lake Ohrid. *Zoological Journal of the Linnean Society* 167: 345-359.
- Wysocka, A., Grabowski, M., Sworobowicz, L., Mamos, T., Burzyński, A. & Sell, J.** (2014). Origin of the Lake Ohrid gammarid species flock: ancient local phylogenetic lineage diversification. *Journal of Biogeography* 41: 1758-1768.
- Yang, L., Hou, Z. & Li, S.** (2013). Marine incursion into East Asia: a forgotten driving force of biodiversity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 280: 20122892.

## 9 Seznam příloh

**Příloha 1** Seznam lokalit v oblasti ČR/SK

**Příloha 2** Seznam lokalit na Vsetínsku

**Příloha 3** Alignment jedinců odlišných haplotypů

**Příloha 4** Tabulka s výslednými počty zařazených jedinců na jednotlivých lokalitách

**Příloha 5** Publikace shrnující diverzitu a distribuci blešivců druhového komplexu *Gammarus fossarum* v oblastech Českého masivu a Západních Karpat (Copilaş-Ciocianu et al. 2017)

Příloha 1 Seznam lokalit v oblasti ČR/SK

	Lokalita	Stát	Souřadnice		Nadm. v. [m]	Kód
1	Pleš	ČR	49,5334	12,6021	707	16441-8
2	Verušičky	ČR	50,1407	13,1823	555	1VEL-VER
3	Orasin	ČR	50,5298	13,3795	606	15446
4	Prášily	ČR	49,1492	13,3975	814	1KRE-PRA
5	Neurazy	ČR	49,4391	13,5074	471	1TUN-NEU
6	Borek	ČR	49,9156	13,5209	286	1BER-BOR
7	Dlouhá Louka	ČR	50,6835	13,6424	785	15347
8	Michlova Huť	ČR	49,0341	13,7158	860	1MED-MIC
9	Nezabudice	ČR	50,0074	13,8172	272	1TYT-NEZ
10	Lány	ČR	50,1046	13,8829	360	1KLI-LAN
11	Třebívlice	ČR	50,4740	13,9016	336	1ZEJ-TRE
12	Milešov	ČR	50,5446	13,9274	429	1MIL-MIL
13	Slavkovice	ČR	49,4942	14,0213	454	1MIS-SLA
14	Dobříš	ČR	49,8060	14,1534	411	1LIP-DOB
15	Voznice	ČR	49,8246	14,2019	385	1VOZ-VOZ
16	Kájov	ČR	48,8117	14,2605	536	1POL-JAK
17	Studánky	ČR	48,5811	14,3193	700	1BYS-STU
18	Velký Šenov	ČR	50,9984	14,3908	370	1VES
19	Velký Šenov	ČR	50,9984	14,3908	370	2VES
20	Velký Šenov	ČR	50,9984	14,3908	370	3VES
21	Praha	ČR	50,1432	14,3994	181	2PRG
22	Praha	ČR	50,1432	14,3994	181	3PRG
23	Praha	ČR	50,1471	14,4061	240	1DRA
24	Tupadly	ČR	50,4347	14,4693	199	2TUP
25	Vojtěchov	ČR	50,4549	14,5863	263	1PSO-VOJ
26	Votice	ČR	49,6357	14,6530	503	1KON-VOT
27	Třebohostice	ČR	50,0312	14,7157	335	1DOB-TRE
28	Dlouhá Stropnice	ČR	48,7441	14,7513	579	1STR-DST
29	Stříbrná Skalice	ČR	49,8819	14,8614	294	1NUC-STR
30	Lipovka	ČR	49,2907	14,8783	517	1LIP-LIP
31	Klamorna	ČR	50,6316	15,0448	295	1MOH-KLA
32	Čechtice	ČR	49,6287	15,0673	437	1CEC-CEC
33	Senožaty	ČR	49,5649	15,1758	444	1MAR-SEN
34	Veselá	ČR	49,3270	15,2372	622	1BEZ-VES
35	Staré Město pod Landštejnem	ČR	48,9875	15,2483	530	1PST-LAN
36	Modletice	ČR	48,9808	15,4523	444	1MOR-MOD
37	Červený Hrádek	ČR	49,1234	15,5366	516	1REC-CER
38	Rančířov	ČR	49,3587	15,5883	525	1RAN-JIH
39	Havlíčkův Brod	ČR	49,5930	15,5946	425	2SLA-HAV

	Lokalita	Stát	Souřadnice		Nadm. v. [m]	Kód
40	Kostelec u Heřmanova Městce	ČR	49,9270	15,6525	325	1NAH-KOS
41	Zblovice	ČR	48,9615	15,6841	386	1ZEL-ZBL
42	Čichov nad	ČR	49,2783	15,7507	491	1CICH-JAL
43	Bransouze nad	ČR	49,3073	15,7567	468	1BRA-CHL
44	Miřejov	ČR	50,3832	15,7567	284	1TRO-MIR
45	Babice	ČR	49,1265	15,7665	512	1BAB-SEB
46	Lukov	ČR	48,8733	15,8827	381	1KLA-LUK
47	Znojmo	ČR	48,8665	16,0268	297	1GRA-ZNO
48	Nové Hrady pod	ČR	49,8453	16,1274	368	1NOV-NOV
49	Čestice	ČR	50,1328	16,1503	266	1OLS-CES
50	Náměšř nad Oslavou	ČR	49,2074	16,1643	392	1OSL-NAM
51	Dukovany	ČR	49,0886	16,1972	338	1DUK-DUK
52	Verněřovice	ČR	50,6147	16,2218	458	1VER-VER
53	Dvořiště u Rožné	ČR	49,4868	16,2323	478	NDVG2
54	Dvořiště u Rožné	ČR	49,4868	16,2323	478	NDVG3
55	Bystřice nad Pernštejnem	ČR	49,5235	16,2743	518	1BYS-BYS
56	Budkovice	ČR	49,0690	16,3608	256	1ROK-BUD
57	Moravské Bránice	ČR	49,0795	16,4391	199	1BUK-MOR
58	Zamberk	ČR	50,0976	16,4416	407	1KAM-ZAM
59	Orlické Záhoří	ČR	50,2829	16,4733	673	1DIV-ORL
60	Česká Třebová	ČR	49,8588	16,5260	421	1LUK-CTR
61	Vranová	ČR	49,5474	16,5269	399	1BOH-VRA
62	Drnovice	ČR	49,4672	16,5291	377	1LHO-DRN
63	Lažany	ČR	49,3589	16,5543	330	1LAZ-LAZ
64	Letovice	ČR	49,5424	16,5700	332	1LET
65	Letovice	ČR	49,5424	16,5700	332	2LET
66	Letovice	ČR	49,5424	16,5700	332	3LET
67	Lanškroun	ČR	49,9397	16,6321	410	1KAL-LAN
68	Moravská Třebová	ČR	49,7187	16,6395	392	1TRE-MTR
69	Habrůvka	ČR	49,3082	16,6916	319	1KRI-BYC
70	Heroltice	ČR	49,9877	16,7330	541	1BRE-HER
71	Hoštejn	ČR	49,8721	16,7758	323	1BEZ-HOS
72	Hostěnice	ČR	49,2611	16,7795	370	1RIC-HOS
73	Dolní Morava	ČR	50,1097	16,8055	589	1MOR-DOL
74	Bukovinka	ČR	49,3047	16,8231	416	1RAK-BUK
75	Horní Morava	ČR	50,1951	16,8407	1033	1MOR-HOR
76	Nová Seninka	ČR	50,2169	16,9224	728	1KRU-SEN
77	Zdravá Voda	ČR	49,0704	16,9472	282	1ZDR-VOD
78	Čakov	ČR	49,6190	17,0278	327	1BLA-CAK
79	Ruda	ČR	49,8563	17,2067	390	1HUN-RUD
80	Česká Ves	ČR	50,2659	17,2367	403	1ZLE-CES

	Lokalita	Stát	Souřadnice		Nadm. v. [m]	Kód
81	Zástřizly	ČR	49,1493	17,2441	332	1REF_073
82	Malá Morávka	ČR	50,0172	17,3106	660	1MOR- MAL
83	Buchlovice	ČR	49,0989	17,3142	321	1BUCH- BUC
84	Hlubočky	ČR	49,6129	17,3909	277	1ZLA-HLU
85	Tvarožná Lhota	ČR	48,8289	17,4272	533	BUKG1
86	Javorník	ČR	48,8453	17,5565	406	1HRU-JAV
87	Javorník	ČR	48,8289	17,5690	558	NHRCZG1
88	Suchov	ČR	48,8964	17,5745	409	1KAZ- SUCH
89	Jankovice	ČR	49,3565	17,6282	295	1ZHR-JAN
90	Přílepy	ČR	49,3178	17,6382	318	1MOJ-PRI
91	Vápenky	ČR	48,8589	17,6472	685	DURCZG1
92	Olšovec	ČR	49,6033	17,7122	361	1MRA-OLS
93	Vítkov	ČR	49,7471	17,7754	414	1CER-VIT
94	Lopeník	ČR	48,9309	17,7782	777	MLOCZG1
95	Lopeník	ČR	48,9265	17,7850	760	MLOSKG21
96	Komňa	ČR	48,9952	17,7972	360	1KOM- KOM
97	Krhov	ČR	49,0253	17,8199	302	1BZO-KRH
98	Pod Sochovou	ČR	49,3822	17,8207	467	1REF_242
99	Bzová	ČR	49,0071	17,8380	384	1SKA-BZO
100	Pitín	ČR	49,0342	17,8563	340	1OLS-PIT
101	Skřipov	ČR	49,8285	17,8882	390	1HRA-SKR
102	Bratřejov	ČR	49,2255	17,9078	373	1BRA-BRA
103	Pitín	ČR	49,0118	17,9094	597	HRASKG1
104	Vilémův dvůr	ČR	49,7870	17,9486	340	1BIL-VIL
105	Prlov	ČR	49,2490	17,9607	477	1POZ-PRL
106	Jasenice	ČR	49,5152	17,9665	305	1REF_234
107	Študlov	ČR	49,1516	18,1020	716	POZCZG1
108	Rožnov pod Radhoštěm	ČR	49,4368	18,1606	450	1REF_243
109	Nový Hrozenkov	ČR	49,3664	18,1750	565	HBRG2
110	Nový Hrozenkov	ČR	49,3664	18,1750	565	HBRG3
111	Huslenky	ČR	49,2764	18,1816	689	PAPCZG1
112	Vranča	ČR	49,2975	18,2332	784	KOHCZG1
113	Raťkov	ČR	49,3594	18,2443	519	1RAT-RAT
114	Maralův kopec	ČR	49,5030	18,2888	685	1REF_254
115	Karolinka	ČR	49,3219	18,3017	666	1REF_255
116	Uzgrůň	ČR	49,3732	18,4106	850	OSECZG1
117	Dolní Tošanovice	ČR	49,6919	18,4824	329	1CZK1
118	Obidová	ČR	49,5332	18,5120	672	1MOH-OBI
119	Komorní Lhotka	ČR	49,6376	18,5135	530	1STO-KOM
120	Trinec	ČR	49,6359	18,6168	542	1REF_235



	Lokalita	Stát	Souřadnice		Nadm. v. [m]	Kód
121	Přelač	ČR	49,5034	18,6509	914	MURCZG1
122	Písek	ČR	49,5290	18,7956	731	GIRSKG1
123	Písek	ČR	49,5354	18,7965	663	GIRCZG1
124	Černý Důl	SR	50,6290	15,7138	568	1SMR-CER
125	Bratislava	SR	48,1788	17,0725	211	1ZEL-STU
126	Píla	SR	48,3861	17,3396	250	1GID-PIL
127	Naháč	SR	48,5364	17,5082	233	2SK30
128	Pánikovci	SR	48,8222	17,5612	557	NHRSKG1
129	Súš	SR	48,8520	17,6408	693	DURSKG1
130	Vrbové	SR	48,6135	17,7179	190	1SK29
131	Leteskovie	SR	48,8233	17,7830	254	1SK28
132	Kostolná-Záriečie	SR	48,8781	17,9736	206	1SK01
133	Zubák	SR	49,1469	18,1043	701	POZSKG1
134	Chrabrany	SR	48,5301	18,1467	158	2NIT-CHR
135	Čertov	SR	49,2759	18,1870	694	PAPSKG1
136	Lamže	SR	49,2929	18,2232	806	KOHSKG1
137	Košeca	SR	49,0101	18,2609	284	1SK02
138	Beladice	SR	48,3418	18,2883	162	1SKBEL
139	Trojačka	SR	49,3748	18,4167	823	OSESKG1
140	Zátoka	SR	49,4179	18,4812	827	LUKSKG1
141	Prečín	SR	49,0897	18,5058	325	1SK03
142	Štiefleje	SR	48,5627	18,5124	426	1SK27
143	Opatovce nad Nitrou	SR	48,7669	18,5777	254	1NIT-OPA
144	Nová Dedina	SR	48,2816	18,6397	191	2SK25
145	Kľače	SR	49,1090	18,6417	433	1RAJ-KLA
146	Kľačno	SR	48,9123	18,6584	401	1NIT-KLA
147	Rajecké Teplice	SR	49,1258	18,6756	419	1SK4
148	Horša	SR	48,2344	18,6886	199	1SIK-HOR
149	Žarnovica	SR	48,4897	18,7033	243	1SK26
150	Žilina	SR	49,2353	18,7332	328	1VAH-ZIL
151	Turie	SR	49,1370	18,7800	571	1RIE-TUR2
152	Turie	SR	49,1370	18,7800	572	1RIE-TUR1
153	Stráňavy	SR	49,1844	18,8331	385	1SK05
154	Žiar nad Hronom	SR	48,5972	18,8538	263	1LUT-ZIA
155	Vrútky	SR	49,0924	18,9358	385	1SK06
156	Budča	SR	48,5694	19,0489	283	1SLI-BUD
157	Krupina	SR	48,3672	19,0644	281	1SK24
158	Šalková	SR	48,7375	19,2074	352	1SK22
159	Horná Mičíná	SR	48,6990	19,2139	438	1SK23
160	Valaská Dubová	SR	49,1468	19,2833	708	2SK08
161	Podbiel	SR	49,3087	19,4912	557	1STU-POD

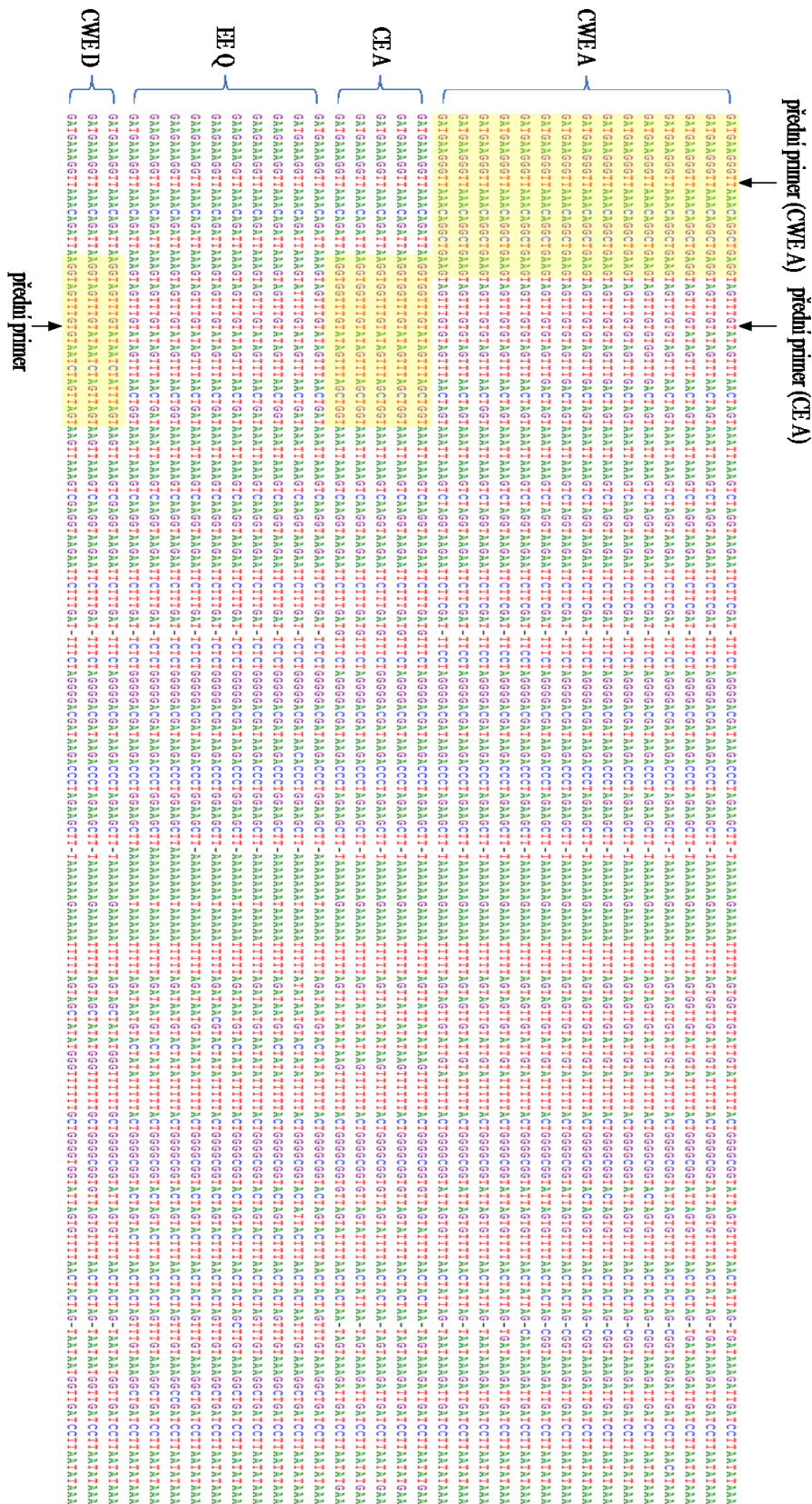
	<b>Lokalita</b>	<b>Stát</b>	<b>Souřadnice</b>		<b>Nadm. v. [m]</b>	<b>Kód</b>
162	Lopej	SR	48,8170	19,4973	449	1SK21
163	Demánová	SR	49,0532	19,5773	643	1SK09
164	Lovinobaňa	SR	48,4383	19,5894	242	1SKLOV
165	Polomka	SR	48,8526	19,8272	579	1SK20
166	Telgárt	SR	48,8416	20,1830	844	1SK19
167	Veľký Slavkov	SR	49,0896	20,2622	702	1SK11
168	Tatranská Kotlina	SR	49,2244	20,3223	779	1BIE-TAT
169	Prostredný Hámor	SR	48,8555	20,4022	759	1SK18
170	Henckovce	SR	48,7139	20,4355	339	2SK17
171	Levoča	SR	49,0347	20,6004	596	1SK12
172	Úhorná	SR	48,7061	20,6776	687	1SK16
173	Mníšek nad Hnilcom	SR	48,8089	20,8096	418	1SK15
174	Ovčie	SR	48,9610	20,9938	503	1SK13
175	Hutka	SR	49,3944	21,4344	370	1SLK5
176	Bukovce	SR	49,2624	21,6950	228	1SLK4

Příloha 2 Seznam lokalit ze Vsetínska. H – horní část toku, D – dolní část toku

	Kód	Lokalita	Souřadnice		Nadm. v. [m]	Místo na toku
1	BRO	Brodská	49°21'	18°11'	517	H
2	BYS	Malá Bystřička	49°23'	18°03'	503	H
3			49°24'	18°02'	421	D
4	BZO	Bzový potok	49°22'	18°15'	596	H
5			49°21'	18°15'	495	D
6	CER	Červenka	49°20'	18°04'	476	H
7			49°20'	18°00'	374	D
8	DIN	Dinotice	49°21'	18°06'	510	H
9			49°19'	18°08'	417	D
10	DRE	Dřevnice	49°20'	17°47'	460	H
11			49°19'	17°46'	359	D
12	FRY	Fryštácký potok	49°18'	17°42'	348	H
13			49°16'	17°40'	264	D
14	HLU	Hlubocký potok	49°30'	17°48'	288	D
15	HOS	Jasenický potok	49°31'	17°58'	316	H
16			49°29'	17°56'	281	D
17	HOR	Hořanský potok	49°16'	18°03'	536	H
18			49°17'	18°03'	429	D
19	HOV	Hovízky	49°19'	18°04'	444	H
20			49°18'	18°03'	380	D
21	HUT	Hutiský potok	49°23'	18°11'	647	H
22			49°25'	18°13'	482	D
23	JAS	Jasenka	49°16'	17°53'	473	H
24			49°15'	17°53'	392	D
25	JUC	Juchyně	49°21'	17°47'	546	H
26			49°29'	17°53'	272	D
27	KAT	Kateřinka	49°23'	17°52'	501	H
28			49°22'	17°54'	387	D
29	KOB	Kobylská	49°21'	18°13'	537	H
30			49°21'	18°13'	478	D
31	KOJ	Kojetínský potok	49°33'	18°01'	323	H
32	KYC	Kychová	49°16'	18°09'	545	H
33			49°18'	18°07'	433	D
34	LUZ	Lužanka	49°15'	18°03'	478	H
35			49°14'	18°01'	406	D
36	MAR	Maretká	49°27'	18°04'	346	H
37			49°25'	18°07'	533	D

	Kód	Lokalita	Souřadnice		Nadm. v. [m]	Místo na toku
38	MIK	Mikulůvka	49°24′	17°54′	393	H
39			49°25′	17°56′	370	D
40	MIL	Miloňovský potok	49°23′	18°19′	653	H
41			49°21′	18°18′	531	D
42	MOJ	Mojena	49°19′	17°38′	323	H
43			49°17′	17°29′	208	D
44	PLU	Pluskavec	49°20′	18°17′	593	H
45			49°21′	18°16′	507	D
46	POZ	Pozdčchůvka	49°14′	17°58′	416	D
47		Prlovský potok	49°15′	17°57′	495	H
48	RUS	Rusava	49°21′	17°42′	439	H
49			49°18′	17°28′	208	D
50	SEN	Senice	49°14′	18°07′	605	H
51			49°11′	18°03′	486	D
52	SOL	Solánecký potok	49°24′	18°15′	595	H
53			49°25′	18°13′	482	D
54	STA	Velká Stanovnice	49°18′	18°15′	679	H
55			49°19′	18°15′	546	D
56	TRN	Trnávka	49°15′	17°48′	294	H
57			49°18′	17°51′	376	D
58	UST	Bezejmenný tok	49°18′	17°59′	428	H
59			49°18′	17°59′	371	D
60	VAL	Bystřice	49°23′	18°10′	660	H
61			49°25′	18°04′	445	D
62	VRA	Malá Vranča	49°18′	18°12′	573	H
63			49°20′	18°11′	451	D
64	ZAS	Zašovský potok	49°29′	18°02′	388	H
65			49°28′	18°02′	354	D
66	ZDE	Zděchovka	49°14′	18°04′	599	H
67			49°16′	18°05′	445	D
68	ZUB	Zuberský potok	49°30′	18°05′	465	H
69			49°28′	18°05′	381	D

**Příloha 3** Alignment jedinců odlišných haplotypů linií CWE A, CWE D, CE A a EEQ. Žluté rámečky značí oblasti specifických primerů. Přední primery pro linie CWE A, EE Q a CE A byly v reakci doplněny zadním univerzálním primerem (Palumbi et al. 1991).





**Příloha 4** Tabulka s výslednými počty zařazených jedinců na jednotlivých lokalitách

Celkem	91	126	52	8	277
Kód	CWE A	EE Q	CE A	CWE D	Celkem
BYS1	3	0	0	0	3
BYS2	4	0	0	0	4
BZO1	0	4	0	0	4
BZO2	0	5	0	0	5
CER1	3	1	0	0	4
CER2	2	2	1	0	5
DIN1	2	1	1	0	4
DIN2	1	0	4	0	5
DRE1	1	3	0	0	4
DRE2	3	0	0	0	3
FRY1	0	5	0	0	5
HOS1	2	1	2	0	5
HOV1	0	1	3	0	4
HOV2	0	1	4	0	5
HOV3	2	0	1	0	3
HOV4	0	3	1	0	4
HUT1	0	5	0	0	5
HUT2	0	0	5	0	5
JAS1	0	4	0	0	4
JAS2	0	4	0	0	4
JUC1	3	2	0	0	5
KAT1	5	0	0	0	5
KOB1	0	6	0	0	6
KOB2	0	5	0	0	5
KOJ1	2	2	0	0	4
KYC1	6	0	0	0	6
KYC2	1	2	2	0	5
LUZ1	2	0	0	1	3
LUZ2	2	0	0	1	3
MAR1	1	4	0	0	5
MAR2	0	2	4	0	6
MIK1	3	0	2	0	5
MIK2	0	0	4	0	4
MIL1	0	5	0	0	5
MIL2	0	4	0	0	4
MOJ1	4	0	0	0	4
PLU1	0	5	0	0	5
PLU2	0	5	0	0	5



Kód	CWE A	EE Q	CE A	CWE D	Celkem
POZ1	3	0	0	0	3
PRL1	0	4	3	0	7
RUS1	0	5	0	0	5
SEN1	3	0	0	1	4
SEN2	2	0	0	3	5
SOL1	0	5	0	0	5
SOL2	0	0	5	0	5
STA1	2	3	0	0	5
STA2	0	5	0	0	5
TRN1	4	1	0	0	5
TRN2	0	5	0	0	5
UST1	1	3	0	1	5
UST2	3	1	0	1	5
VAL1	4	0	0	0	4
VAL2	4	0	0	0	4
VRA1	2	1	2	0	5
VRA2	4	1	0	0	5
ZAS1	0	5	0	0	5
ZAS2	0	0	5	0	5
ZDE1	0	4	0	0	4
ZDE2	3	0	2	0	5
ZUB1	1	1	0	0	2
ZUB2	3	0	1	0	4

**Příloha 5** Copilaş-Ciocianu, D., **Rutová, T.**, Pařil, P. & Petrusek, A. (2017). Epigean gammarids survived millions of years of severe climatic fluctuations in high latitude refugia throughout the Western Carpathians. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 112: 218-229.