

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Variabilita jepic druhové skupiny *Baetis fuscatus***  
**(Insecta, Ephemeroptera, Baetidae)**

Bakalářská práce

**Jan Kollross**

Školitel: RNDr. Pavel Sroka, Ph.D.

České Budějovice 2015

Kollross, J. (2015): Variabilita jepic druhové skupiny *Baetis fuscatus*

(Insecta, Ephemeroptera, Baetidae). [Variability of Ephemeroptera of family Baetidae (Insecta, Ephemeroptera, Baetidae). Bc. Thesis, in Czech.] – 42p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

This thesis deals with a variability of the *Baetis fuscatus* species-group (Ephemeroptera: Baetidae). This study contains three main topics: The first one is distinguishing between two highly similar species, *Baetis scambus* and *Baetis fuscatus* based on morphological structures, specifically their mouthparts - labial palps. To analyze the shape of the labial palps, I applied a computerized outline analysis. Second topic is focused on the validity of *Baetis beskidensis* as a distinct species based on the morphology and DNA sequences (obtained for the topotypical material for the first time). And finally, I also investigated some samples from Corsica in attempt to discover new species of the *Baetis fuscatus* species-group. I found that most probably it is not possible to distinguish between *Baetis scambus* and *Baetis fuscatus* based on the shape of their labial palps. *Baetis beskidensis* is morphologically different, but genetically not distinctly separated from other representatives of the *Baetis fuscatus* species-group. I didn't discover any distinct morphological differences in specimens from Corsica, pointing to the possible existence of new species.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice

Dne 14. 12. 2015

.....

Jan Kollross

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval svému školiteli, RNDr. Pavlu Srokovi, Ph.D. za trpělivost a odborné vedení práce. Dále prof. RNDr. Tomáši Soldánovi, DrSc. (Biologické centrum AV ČR, České Budějovice) za poskytnutý český materiál *B. fuscatus/scambus*, Dr. Romanu Hodunkovi (Biologické centrum AV ČR, České Budějovice) za materiál z typové lokality *B. beskidensis*. Děkuji Mgr. Marku Poláškovvi (Masarykova universita, Brno) za pomoc se statistikou, mé velké díky patří PaedDr. Martině Žurovcové, Ph.D. (Biologické centrum AV ČR, České Budějovice) za pomoc v laboratoři, psychickou podporu a pomoc s molekulární analýzou, Dr. S. Rutschmannové (Universita Vigo) za dodatečné sekvence pro srovnání a Dr. J-L. Gattolliatovi (Zoologické muzeum, Lausanne) za materiál z Korsiky, Aničce Müllerové za pomoc se statistikou a v neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině a blízkým za podporu během celého studia.

# Obsah

1. Cíle práce .....	1
2. Úvod.....	1
2.1. Členění rodu <i>Baetis</i> .....	2
2.2. Charakteristika a rozlišení <i>B. fuscatus</i> a <i>B. scambus</i> .....	3
2.2.1. Morfologická charakteristika.....	3
2.2.2. Shrnutí morfologických znaků používaných pro identifikaci <i>B. fuscatus</i> a <i>B. scambus</i> .....	4
2.2.3. Fenologie a biotopy <i>B. fuscatus</i> a <i>B. scambus</i> .....	6
2.2.3. Geografické rozšíření <i>B. fuscatus</i> a <i>B. scambus</i> .....	6
2.3. Charakteristika a rozlišení <i>Baetis beskidensis</i> .....	8
2.4. Další možné dosud nepopsané druhy skupiny <i>B. fuscatus</i> .....	10
2.5. Molekulární data druhů ze skupiny <i>B. fuscatus</i> .....	10
3. Materiál a metodika .....	11
3.1 Materiál .....	11
3.1.1. <i>B. fuscatus</i> a <i>B. scambus</i> .....	11
3.1.2. <i>Baetis beskidensis</i> .....	11
3.1.3. Potenciální nové druhy .....	12
3.2. Metodika.....	12
3.2.1. Morfologická data .....	12
3.2.2. Molekulární data.....	15
3.2.2.2. Analýza sekvencí.....	16
4. Výsledky .....	17
4.1. Rozlišení <i>B. fuscatus</i> a <i>B. scambus</i> .....	17
4.1.1. Analýza tvaru labiálního palpu.....	17
4.1.2. Ostatní morfologické znaky .....	20
4.2. Validita druhu <i>B. beskidensis</i> .....	21
4.2.1. Morfologická data .....	21
4.2.2 Molekulární data.....	23
4.3. Potenciální nové druhy.....	25
5. Diskuse.....	26
5.1. Rozlišení <i>B. fuscatus</i> a <i>B. scambus</i> .....	26
5.2. Validita druhu <i>Baetis beskidensis</i> .....	28
5.2.1. Porovnání analýzy morfologie s výsledky DNA.....	29

5.3. Potenciální nové druhy.....	29
6. Závěr .....	30
7. Zdroje.....	31
8. Přílohy.....	37

# 1. Cíle práce

1. Vypracovat rešerši se zaměřením na rozlišování druhů skupiny *Baetis fuscatus*.
2. Analyticky zhodnotit, do jaké míry je možné morfologicky rozeznávat blízké příbuzné druhy *Baetis scambus* a *Baetis fuscatus*.
3. Ověřit validitu druhu *Baetis beskidensis* pomocí analýzy morfologických znaků a sekvencí DNA.
4. Analyzovat morfologii jedinců skupiny *Baetis fuscatus* z dosud nestudovaných evropských lokalit, zaměřit se na potencionální nové druhy.
6. Interpretovat výsledky.

## 2. Úvod

Larvy jepic (Ephemeroptera) tvoří významnou složku makrozoobentosu sladkovodních ekosystémů, obývají různé niky a mají na své životní prostředí různé nároky, můžeme je tedy použít jako významné indikátory prostředí (Landa & Soldán, 1989). Díky tomu lze za pomoci výskytu jednotlivých druhů určit kvalitu toku, v dlouhodobějším výzkumu například její změnu a dále z toho vyvozovat určitá opatření. Ať už místní, regionální, či globální změny prostředí se poté značně odráží také na přítomnosti jednotlivých druhů a jejich početnosti. V minulosti bylo například dle změny druhového složení jepic ČR patrné zintenzivnění průmyslu po roce 1970, což značně ovlivnilo většinu našich toků (Zahrádková et al., 2009).

V současnosti probíhá velké množství monitoringových sběrů makrozoobentosu, organizovaných výzkumnými institucemi nebo státními orgány (správy povodí jednotlivých řek, chráněných území atd.). Na území České republiky například zhodnocení kvality a znečištění (Adámek, 2010) a monitoring obsahu těžkých kovů (Kolaříková, et al., 2012) řeky Labe nebo zhodnocení stavu ekosystémů řek Morava a Odra (Zedková, 2014).

Pro podobné výzkumy je zásadní spolehlivá determinace jednotlivých druhů. Zásadní jsou zvláště determinační znaky v larválním stadiu, jelikož larvy jsou stadiem sbíraným v rámci monitoringových aktivit.

V případě, že nemáme jistotu ohledně správnosti určení druhu, všechny dosavadní monitoringy i ty následující by byly nepřesné, zavádějící a scestné. Pokud existují pochybnosti ohledně determinačních znaků jednotlivých druhů, je nutno provést exaktní analýzu a zjistit, jak velké jsou případné odchylky a zda je možné i nadále druh určovat dle stávajících postupů.

Předložená práce se zabývá morfologickou variabilitou jepic rodu *Baetis*, konkrétně druhové skupiny *Baetis fuscatus*. Cílem je zhodnotit spolehlivost vybraných diagnostických znaků pro determinaci jednotlivých druhů z této skupiny.

## 2.1. Členění rodu *Baetis*

První členění jepic na dvě skupiny dle počtu cerků zavedl Leach (Leach, 1815), kdy dělil jepice do dvou skupin, Bätida a Ephemerida. Rod *Baetis* (Leach, 1815) patří do čeledi Baetidae, jedné z druhově nejbohatších skupin jepic vůbec s přibližně 900 popsánymi druhy (Nieto, 2010). Rodem se poprvé podrobně zabývala ve své práci Müller-Liebenau (1969), rozdělila jej na dílčí kategorie, a to konkrétně na osm tzv. „skupin druhů“. Později byly některé z těchto skupin druhů překlasifikovány na podrody nebo sdruženy do větších komplexů dle přítomnosti („*Baetis* complex“), či nepřítomnosti („non-*Baetis* complex“) femorálního villoporu (Waltz & McCaferty, 1987).

Skupina druhů *Baetis fuscatus* byla definována již v původní práci Müller-Liebenau (1969), kde zahrnovala dva druhy, *Baetis fuscatus* (Linnaeus, 1761) a *Baetis scambus* Eaton, 1870. Dodnes v rámci této skupiny nedošlo k žádným taxonomickým změnám, s jedinou výjimkou popisu třetího druhu skupiny, *Baetis beskidensis* (Sowa, 1972).

*B. beskidensis* byl popsán z polských Karpat a od svého popisu je nalézán jen velmi sporadicky (viz níže). Zbylé dva druhy (*B. fuscatus* a *B. scambus*) jsou naopak hojné a rozšířené ve velké části palearktu, včetně České republiky.

Všechny tři druhy skupiny *B. fuscatus* jsou si velice podobné, zvláště v larválním stadiu. Je otázkou, do jaké míry je možná spolehlivá determinace a jaký je rozsah vnitrodruhové variability v klíčových morfologických znacích. V literatuře byly publikovány i domněnky o možné hybridizaci těchto druhů (Bauernfeind & Soldán, 2012).



## 2.2. Charakteristika a rozlišení *B. fuscatus* a *B. scambus*

*B. fuscatus* popsal na základě dospělců již Linné roku 1761 jako *Ephemera fuscata*. Původní typový materiál již neexistuje (Bauernfeind & Soldán, 2012), po popisu druhu bylo publikováno několik studií pouze obecně se zmiňujících o nálezu dospělců či blíže nedefinovaných stadií (Stephens, 1834; Walker, 1853), Brinck a Müller-Liebenau (1965) stanovili neotyp (samčí imago).

*Baetis scambus* byl poprvé po svém popisu zmíněn v Rostockově (1888) práci, kde bylo popsáno zbarvení a velikost dospělců. Typový materiál tohoto druhu je rovněž pravděpodobně ztracený (Kimmins, 1960). Neotyp zde stanoven nebyl. Macan (1961) popisuje larvy, které porovnává s ostatními zástupci čeledi Baetidae. Ve svém popisu morfologie se zaměřuje na femur, maxily, labrum, mandibuly, zbarvení těla a štětů.

První podrobný popis obou druhů, od něhož se odvíjí jejich rozlišování, publikovala Müller-Liebenau (1969).

### 2.2.1. Morfologická charakteristika

#### Larvy

Ve většině morfologických znaků se *B. fuscatus* a *B. scambus* neliší. Larvy mají na hlavě a hrudi tmavší šmouhy na zelenohnědém až žlutošedém podkladu (Landa, 1969) a předohruď se světlými, žlutými skvrnami. Nohy jsou světle žluté, femur s hnědou skvrnou uprostřed (Bauernfeind & Soldán, 2012). Tergity zadečku jsou pokryty tmavšími, dozadu se rozšiřujícími skvrnami lichoběžníkovitého tvaru. V první třetině tergitu jsou dvě tmavé tečky, v zadní třetině dvě světlé skvrnky. Tergit V se od ostatních liší, je bez zřetelného lichoběžníku, pouze se dvěma světlejšími skvrnkami (Landa, 1969). Kromě trojúhelníkovitých ostnů je povrch tergitů pokryt i značným množstvím krátkých sét. Tergity I, V, IX a X jsou bledé, ostatní tmavší. Někdy se objevuje světlejší středový pruh. Žaberní plátky spíše nesymetrické, se žlutavým nádechem (Bauernfeind & Soldán 2012) krátké a poměrně široké (Landa, 1969). Spodní strana těla larvy je světlejší. Štěty světlé, ochlupené, lehce do žluta s tmavým středovým a koncovým pruhem. (Bauernfeind & Soldán 2012) Larvy detailněji popisuje řada publikací (Landa, 1969; Bauernfeind & Soldán, 2012).

## Okřídlená stadia

Oba druhy jsou drobné, uhlově hnědé jepice, ze spodní strany světlejší, bez zřetelné kresby. Dospělci jepic jsou značně redukováni, nejvíce znaků je patrných na těle samců, imaga samic se prakticky neliší v celé čeledi Baetidae.

Tělo **imag samců** je tmavě uhlově hnědé, se světlejšími skvrnkami. Nohy jsou bělavé s hnědavým nádechem, v ohybech mají tmavší odstín. Přední křídla čirá, plamka mléčně zakalená, se slabě zřetelnou žilnatinou. Zadní křídla mají pouze dvě podélné žilky, třetí je jen krátká a nezřetelná (Landa, 1969). Zadeček je mezi druhým a sedmým článkem světlý a průsvitný, od osmého článku je tmavohnědý, se světlejšími až bílými sternity. Na konci zadečku se nacházejí bílé štěty bez paštětu, který je často ve stadiu dospělého u celé čeledi redukovaný.

U **imag samic** je svrchní strana těla světleji zbarvená, žlutohnědá až rezavohnědá, spodní strana těla žlutá (Landa, 1969).

**Subimaga obou pohlaví** mají kouřově šedá křídla, nohy do hněda, ke konci tmavší a štěty spíše do zelena (Bauernfeind & Soldán, 2012).

### 2.2.2. Shrnutí morfologických znaků používaných pro identifikaci *B. fuscatus* a *B. scambus*

#### Larvy

Většina rutinní determinace se týká larev, které se nalézají v běžně odebíraných hydrobiologických vzorcích. V určovacích klíčích a taxonomické literatuře se uvádí několik znaků s různou mírou spolehlivosti.

Zde je výčet z klíčů všech odlišností mezi těmito dvěma druhy, jak jsou více či méně konzistentně uváděny v literatuře. Landa (1969) ve své knize píše, že *Baetis scambus* zcela odpovídá larvám *B. bioculatus* (mladší synonymum *B. fuscatus*), avšak liší se barevně a to vzhledem tergitu I, který je u *B. scambus* temně lemován. Odlišnost v kontrastním zbarvení spodní strany zadečku larev udává jako jediná Müller-Liebenau (1969), která dále popisuje odlišné zbarvení skvrn na hlavě mezi očima, které vznikají v místech úponů svalů (*B. fuscatus* je má méně zřetelné a jsou tmavě hnědé, zatímco u *Baetis scambus* jsou nápadné, žlutě zbarvené). Tento znak zmiňuje více prací (Eiseler, 2005; Rozkošný, 1980; Elliott & Humpesch 2010; Bauernfeind & Soldán, 2012; Jacob,

2003). Dalším velmi častým popisovaným znakem je odlišný tvar 2. a 3. segmentu labiálních palpů (Müller-Liebenau, 1969; Eiseler, 2005; Rozkošný, 1980; Elliott & Humpesch, 2010; Bauernfeind & Soldán, 2012; Jacob, 2003), přičemž tento znak bývá různě formulován. Druhy se mohou různit v úhlu svíraném okrajem medioapikálního výběžku druhého článku palpu s vnitřním okrajem článku třetího, přičemž tento úhel má být větší u *B. scambus* než u *B. fuscatus*, s tím souvisí zakulacenější vnitřní strana třetího článku palpu u *B. fuscatus*, než u *B. scambus* (Eiseler, 2005). V zásadě stejný rozdíl uvádí Rozkošný (1980), který pouze používá jinou formulaci (vnitřní okraje třetího článku palpu přibližně ve stejné rovině jako výběžek vnitřní strany druhého článku palpu u *B. fuscatus* oproti situaci u *B. scambus*, kde je vnitřní okraj třetího článku palpu situován více dozadu a tento okraj nedosahuje okraje výběžku vnitřní strany druhého článku). Elliott a Humpesch (2010) uvádějí, že výběžek vnitřní strany druhého článku palpu je delší a vystouplejší u *B. scambus*. Další variance tohoto znaku zní, že 3. segment labiálních palpů je u *B. scambus* téměř symetrický, o 1/3 širší než delší. Druhý segment je zároveň o něco užší než je tomu u *B. fuscatus*. (Bauernfeind & Soldán, 2012). Jacob (2003) u *B. scambus* udává tvar druhého článku labiálního palpu jako více rozšířený v části, kde se napojuje článek třetí, také udává, že se oba druhy liší zbarvením zadečku, kdy *B. fuscatus* má tmavší tergity VIII a tergity IX a X jsou světlé. *B. scambus* má mít rovněž větší množství šupinovitých výběžků na zadním konci tergitů a větší velikost (*Baetis fuscatus* měří v larválním stadiu 5–6,5 mm, *Baetis scambus* 6,0–7,5 mm) (Bauernfeind & Soldán, 2012).

### **Okřídlená stadia**

**Subimago** *B. scambus* má křídla hnědo až modrošedá, kdežto u *B. fuscatus* je jejich barva kouřově šedá. Nohy jsou u obou druhů zelenošedé a cerky šedé (Bauernfeind & Soldán, 2012).

Mezi udávané rozdíly **dospělců** obou druhů patří například délka těla. Ta je o něco větší u *B. scambus*, asi 5–8 mm, *B. fuscatus* pouze 5,5–7,5 mm. Dalším rozdílem je zbarvení turbanovitých očí dospělých samců, které je patrné již v předposledních larválních instarech. U *Baetis fuscatus* mají oči barvu tmavě citrónově žlutou, barva očí samců *Baetis scambus* je spíše červenooranžová (O'Reilly, 1997), někde je také udávána sépiově hnědá (Bauernfeind & Soldán, 2012).

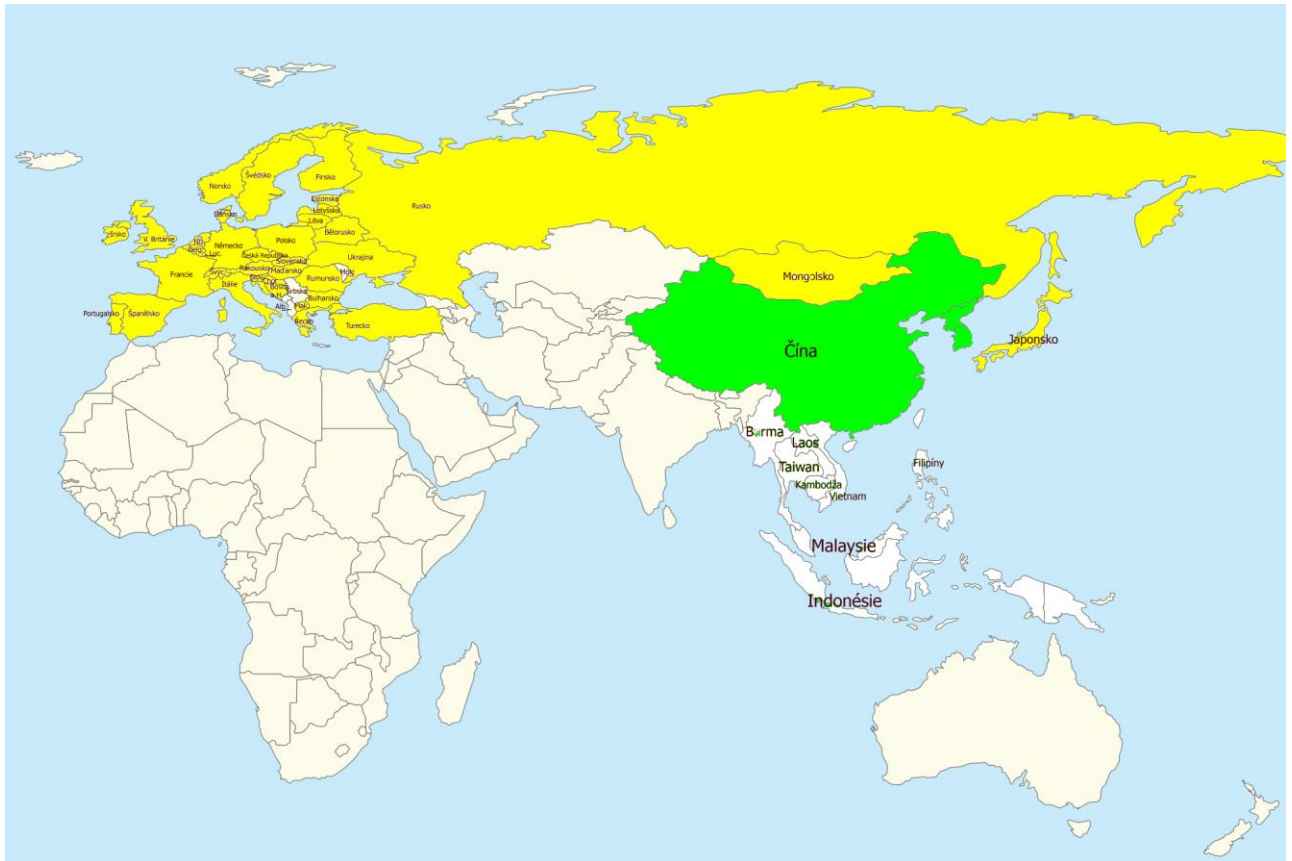
### **2.2.3. Fenologie a biotopy *B. fuscatus* a *B. scambus***

Dle Landy a Soldána (1989) se jedná o druhy bivoltinní (vytváří dvě generace za rok), rovnoměrně a hojně rozšířené ve všech faunistických okresech ČR, a to v nadmořských výškách až do 1500 m. n. m. Oba druhy jsou hlavně druhy vrchovin, jejichž průměrná výška výskytu je přibližně 450 m. n. m. Vyskytují se v okolí rychle tekoucích proudů, larvy žijí pod kameny a v trsech rostlinných porostů. Nejvíce dospělců létá v červenci a srpnu, ale lze je najít od jara až do podzimu (O'Reilly, 1997).

Co se týče ekologických charakteristik, v pracích shrnujících nálezy jepic v ČR (Landa & Soldán, 1989; Zahrádková et al., 2009) se tyto dva druhy prakticky neliší v žádné z charakteristik jejich výskytu (frekvence a abundance výskytu, úroveň saprobity, nadmořská výška, potravní typ, apod.).

### **2.2.3. Geografické rozšíření *B. fuscatus* a *B. scambus***

*Baetis fuscatus* se vyskytuje prakticky v celé Evropě (pro kompletní seznam evropských zemí, kde byl druh nalezen viz Bauernfeind & Soldán, 2012). není hlášen v Albánii a Moldavsku, což je nejspíše dáno málo četnými sběry v těchto oblastech.. Také je zaznamenán na ostrovech mediteránu, avšak v severní Africe již chybí. Na východ od Evropy byly publikovány nálezy z Mongolska (Landa & Soldán, 1983; Soldán et al., 2009) východního Ruska (Tshernova et al., 1986) a Japonska (Matsumura, 1931). Výskyt ve východní části areálu je často udáván nepřesně (Tshernova et al., 1986) a pravděpodobný je i výskyt v Číně a Koreji (obr.1).



Obr. 1: Rozšíření *Baetis fuscatus* v Evropě a Asii. Tmavě zeleně je zvýrazněný neprokázaný výskyt v Číně a Koreji.

*Baetis scambus* je Evropě téměř stejně rozšířený jako *Baetis fuscatus*. Není zaznamenán v Itálii, Dánsku, Estonsku, Bělorusku, Bosně, Srbsku, Albánii, Makedonii a Řecku. Není znám z ostrovů mediteránu. Rozšíření je méně známé než u *Baetis fuscatus*, ale areály obou druhů se v Evropě až na občasnou absenci *Baetis scambus* značně překrývají. *Baetis scambus* není přítomný v Asii, jeho areál končí na území Ruska, ale je nejasné, kde je přesná hranice výskytu směrem na východ (obr. 2). Pokud se druhy vyskytují společně, *B. scambus* je vždy nacházen v nižším počtu (Bauernfeind & Soldán, 2012).



Obr. 2: Rozšíření *Baetis scambus* v Evropě a Asii

Při prohlížení databází a map zobrazujících odběrová místa obou druhů v ČR lze zjistit, že oba druhy jsou přibližně stejnoměrně rozmístěny po celé ČR (Bojková, nepublikovaná data, odkaz č. 2). Dle databáze hydrometeorologického ústavu (odkaz č. 2) byl *Baetis scambus* sbírán rovnoměrně ve všech povodích a existuje 508 záznamů, kdy byly jepice určovány jako *B. scambus*. *Baetis fuscatus* byl sbírán opět rovnoměrně ve všech povodích a existuje 487 záznamů o nalezení *B. fuscatus*.

### 2.3. Charakteristika a rozlišení *Baetis beskidensis*

*B. beskidensis* byl popsán poprvé ve stadiu larvy, v drobných detailech se liší od zbylých druhů skupiny *B. fuscatus* (Sowa, 1972). Popis dospělců byl publikován později (Jacob, 2003).

#### Larvy

Larvy dosahují velikosti 4–5 mm, zbarvením jsou velmi podobné druhům *B. scambus* a *B. fuscatus*. Tykadla na nahnědlé hlavě jsou spíše čirá. Části ústního ústrojí

jsou téměř totožné jako u *B. fuscatus*, avšak na vnější hraně pravé mandibuly se nachází výběžek, subapikální zoubek, který by měl být hlavním rozlišovacím znakem mezi *B. fuscatus*, *scambus* a *beskidensis*, přičemž u *B. beskidensis* chybí (Sowa, 1972), nebo se druhy liší mírou jeho redukce (Bauernfeind & Soldán 2012). Rovněž třetí článek palpu by měl být odlišně klenutý než u dalších zástupců skupiny *fuscatus*. Sěty na zadním okraji femuru jsou kratší než u ostatních dvou druhů, žábra velmi podobná. Tergity I, IV, V, VIII, IX a X se světle hnědými skvrnami v centrální oblasti. Centrální skvrna je ve formě kapky. Na rozdíl od *B. fuscatus*, který má poslední dva zadečkové tergity světlé, *B. beskidensis* by měl mít světlý pouze jeden (Bauernfeind & Soldán, 2012). Dále by měl *B. beskidensis* být nejdrobnějším druhem a měl by se lišit zbarvením svalových úponů na hlavě, které jsou nahnědlé a ne světlé.

## Dospělci

Samci mají silnější klíšťky (orgán sloužící k uchopení samičky při rozmnožování) než oba ostatní druhy skupiny druhů *Baetis fuscatus*. Na bázi klíštěk je velký výběžek, který u *B. scambus* a *B. fuscatus* chybí. Turbanovité oči jsou zelenožluté, thorax a zadečkový článek I tmavě hnědý, články II–VI průsvitné, s kouřovým nádechem. Články VII–X jsou žlutohnědé.

*B. beskidensis* je velmi vzácný, od jeho popisu (Sowa, 1972) byly publikovány jen ojedinělé nálezy z Polska (Jazdzewska & Gorsczynski, 1991), Slovenska (Derka, 2003) a Ukrajiny (Kovács et al., 2008). Ve většině evropských určovacích klíčů *B. beskidensis* zcela chybí. Jeho popis se vyskytuje jen v práci Jacob (2003). Ukrajinské nálezy byly determinovány na základě Sowa (1972) popisu, jako diagnostický znak byl použit chybějící zoubek na pravé mandibule (Hodunko, osobní sdělení).

Zaměřil jsem se na morfologii tohoto druhu, protože Sowa (1972) udávané znaky byly zjištěny na relativně omezeném vzorku jedinců a druh je charakterizován v zásadě jen velmi drobnými odchylkami. Studium rozsáhlejšího materiálu (vzorků z unikátní typové lokality *Baetis beskidensis*, z lokalit okolních, jedinců *Baetis scambus* a *Baetis fuscatus* z ČR) v rámci této práce umožňuje zhodnotit, do jaké míry jsou diagnostické znaky *B. beskidensis* spolehlivé.

## 2.4. Další možné dosud nepopsané druhy skupiny *B. fuscatus*

V rámci práce byl studován rovněž materiál skupiny *B. fuscatus* z oblastí, kde je možné očekávat výskyt dosud nepopsaných druhů jepic. Jednou z takových oblastí je Korsika, která představuje místo s vysokým stupněm endemismu, což je dáno především unikátní geologickou historií ostrova.

Korsicko-sardinský blok se odtrhl od Evropy před 30 miliony let (Oggiano et al., 2009). Po vyschnutí Středozevního moře (Murphy et al., 2009) a jeho opětovného, rychlého naplnění nastala konečná izolace Korsiky a Sardinie od pevniny (Garcia-Castellanos et al., 2009), s jen občasným vznikem jakýchsi mostů (Stöck et al., 2008), které se objevovaly během kolísání hladiny moře. Díky těmto historickým událostem je Korsika 25. největší hotspot na světě. Je známa i jako místo s vysokým výskytem endemických druhů jepic. Z 28 na Korsice a Sardinii popsáných druhů byla polovina popsána jako druhy endemické, při sekvenování vzorků z 50 lokalit Korsiky, Sardinie, severní Afriky a jižní Evropy bylo zjištěno, že potenciální výskyt endemitů zde byl značně podceňován, a dokonce došlo k objevení 6 nových druhů (Gatoliat et al., 2015). Je proto vhodné vzorkům z této oblasti i nadále věnovat pozornost a vzít v potaz možnost výskytu nových endemických druhů.

## 2.5. Molekulární data druhů ze skupiny *B. fuscatus*

Problematika rozlišování jednotlivých druhů v rámci skupiny *B. fuscatus* byla doposud studována jen na základě morfologických dat.

U 19 jedinců byl dosud sekvenován úsek mtDNA kódující cytochrom oxidázu, podjednotku I (*COI*) neboli tzv. barcode (Ratnasingham & Hebert, 2007). Tyto sekvence byly získány v rámci obecných projektů s cílem pouze získat sekvence velkého počtu druhů, většinou bez následného porovnání (odkaz č. 1), nebo pro účely obecnějších studií příbuznosti jednotlivých linií v rámci rodu *Baetis* (Sroka, 2012).

V rámci práce proběhla analýza variability těchto dostupných sekvencí spolu s analýzou morfologie daných jedinců (kutikulárních zbytků larev, tzv. voucherů). Byly rovněž osekvenovány další jedinci, včetně *B. beskidensis*. To mi umožnilo zjistit míru odlišnosti *B. beskidensis* od ostatních druhů skupiny *B. fuscatus*.



## 3. Materiál a metodika

### 3.1 Materiál

Všechn materiál použitý pro tuto práci je uskladněn ve sbírce Entomologického ústavu Biologického centra AV ČR.

#### 3.1.1. *B. fuscatus* a *B. scambus*

Pro morfologickou analýzu byly použity vzorky jepic čeledi *Baetidae*, skupiny druhů *B. fuscatus*, jež byly sbírány T. Soldánem a J. Bojkovou ve vodních tocích ČR v rámci monitoringového výzkumu v letech 2007–2009. Použití jedinci byli určeni do úrovně skupiny druhů *B. fuscatus* s použitím určovacího klíče Bauernfeind a Humpesch (2001).

Pro vytipování jedinců pro další analýzy byla použita databáze nálezů jepic v ČR (Bojková, nepublikovaná data). Tato databáze zahrnuje nálezy od 40. let 20. stol. do současnosti. Byly z ní rovnoměrně vybrány lokality, odkud byly určovány oba druhy, a byl zpracován materiál z těchto lokalit. Je tedy pravděpodobné, že na daných lokalitách se budou vyskytovat morfotypy obou zájmových druhů.

Celkem bylo analyzováno 72 jedinců. Vzorky byly před použitím uskladněny v přibližně 75% ethanolu. Materiál použitý pro morfologická srovnání již nebyl vhodný pro analýzu DNA (dlouhodobé skladování v denaturovaném lihu za pokojové teploty). Byly však analyzovány vouchery (kutikulární zbytky larev) dříve sekvenovaných jedinců z různých evropských lokalit spolu s několika dodatečně sebranými vzorky z ČR (tab. I).

#### 3.1.2. *Baetis beskidensis*

Získaný materiál pochází z typové lokality *B. beskidensis* (Polsko, Beskydy, řeka Hoczewka u osady Hoczew, 3. 8. 2014, leg. Hodunko). Lokalita je shodná se Sowovým popisem (1979, str. 712): „rivière Hoczewka à Hoczew (Beskides orientales), 340m d'altitude“.

Celkem bylo shromážděno 5 larev, sbíraných do 96% čistého lihu. Larvy byly uchovány při -20°C a vhodné k izolaci DNA. Pro srovnání a případné vyloučení či

potvrzení výskytu *B. beskidensis* byly sebrány rovněž vzorky jepic ze skupiny *B. fuscatus* na okolních lokalitách:

- Beskydy, řeka San u města Sanok, silnice směrem na Przemysl, u mostu, 3. 8. 2014, leg. Hodunko (9 larev),
- oblast Małopolska, povodí řeky Raba, potok Niewiaków u osady Poręba Szpytkowska, 6. 8. 2014, leg. Hodunko (3 larvy),
- řeka Tanew, osada Ulanów, 3. 8. 2014, leg. Hodunko (2 larvy).

### **3.1.3. Potenciální nové druhy**

Analyzoval jsem materiál s podezřením na výskyt nových druhů z následující lokality:

Korsika, řeka Fiume Secco, 5 km západně od Calvi, 47°29'S, 7°18'V, 10 m n. m., 10. 4. 2006 (5 larev).

Materiál bohužel nebyl vhodný pro extrakci DNA (dlouhodobé skladování v denaturovaném lihu za pokojové teploty), byly tedy analyzovány jen morfologické znaky.

## **3.2. Metodika**

### **3.2.1. Morfologická data**

#### **3.2.1.1. Zpracování vzorků**

U jedinců pro morfologická srovnání byly odpreparovány jednotlivé části těla larvy a zafixovány v médiu Liquide de Faure jako trvalý mikroskopický preparát. Pro preparaci byla použita binokulární lupa Olympus SZX7, pro následné pozorování preparátů mikroskop Olympus BX41.

#### **3.2.1.2. Analýza tvaru labiálního palpu**

Pro podrobnou analýzu tvaru labiálních palpů bylo nejprve pod binokulární lupou provedeno odstranění obou labiálních palpů a rozložení celého ústního ústrojí. Labiální palpy byly poté přeneseny na podložní sklíčko s připravenou kapkou vody, přikryty krycím sklíčkem a přesunuty pod mikroskop s nainstalovaným fotoaparátem Olympus CMEDIA C5060. Zde se vyfotografoval pravý i levý palpus. Ústní ústrojí včetně labiálních palpů se

poté zafixovalo spolu s ostatními částmi těla larvy k pozdější případné kontrole jako standardní trvalý preparát.

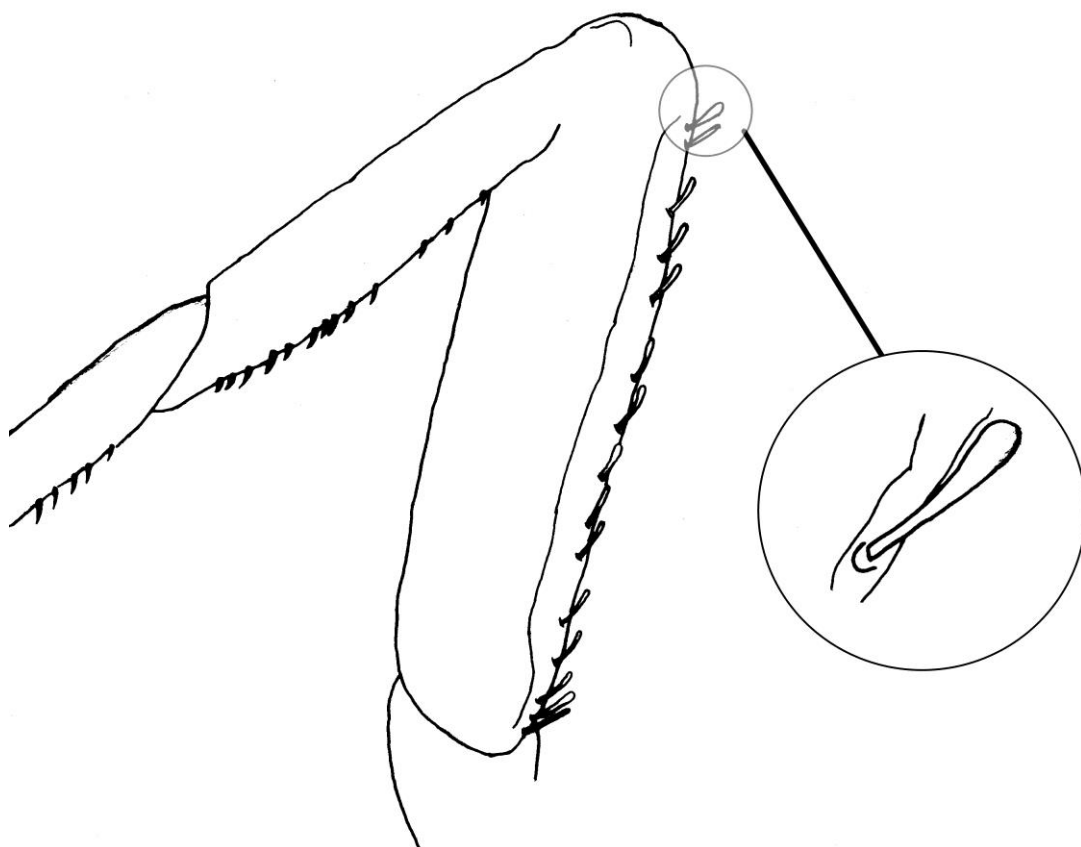
Nafotografované labiální palpy byly upravovány v programu Gimp 2.8.14 (Gimp team et al., 2009) tak, aby vyhovovaly dalšímu analytickému zpracování, pro které je důležitý pouze výsledný obrys celého palpu. Vybraný tvar byl manuálně co nejpřesněji ohraničen za použití nástroje „volný výběr“. Nejprve byla smazána ohraničená oblast a vyplněna černou barvou. Poté se možností „invertovat“ ohraničilo okolí tvaru a také vymazalo. Takto vznikl pouze požadovaný černý tvar na bílém pozadí. Tento obrázek byl převeden na černobílý pomocí výběru „odstíny šedi“. Výsledné tvary bylo nutné orientovat vždy na jednu stranu. Takto upravené obrázky se uložily jako binární ve formátu BMP. Obrisy těchto tvarů byly extrahovány a byla provedena eliptická Fourierova analýza. Následně byla vypočtena analýza hlavních komponent (PCA) na tvarových deskriptorech a variabilita těchto deskriptorů byla analyzována s použitím balíčku Momocs v programu R 3.1. (R Core Development Team, 2015). Pro další podrobnosti viz Bonhomme, et al. (2014).

### **3.2.1.3. Analýza ostatních morfologických znaků**

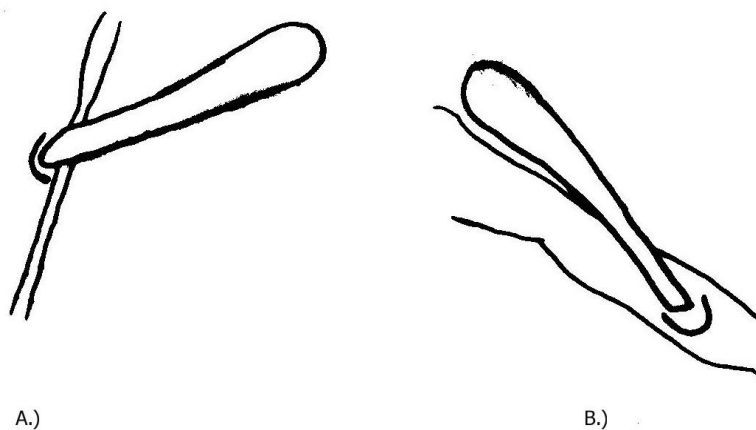
Při analýze morfologie jsem se zaměřil na struktury používané jako diagnostické znaky pro definici jednotlivých druhů v rámci rodu *Baetis* (Bauernfeind & Soldán 2012), a to především na:

- počet sít na dorzálním povrchu labra, celkový tvar labra,
- poměr délky a šířky labra,
- tvar incisivní části mandibul,
- tvar labiálních palpů,
- délku a tvar sít podél zadního okraje femuru (obr. 3, obr. 4),
- tvar výběžků na zadního okraji zadečkových tergítů.

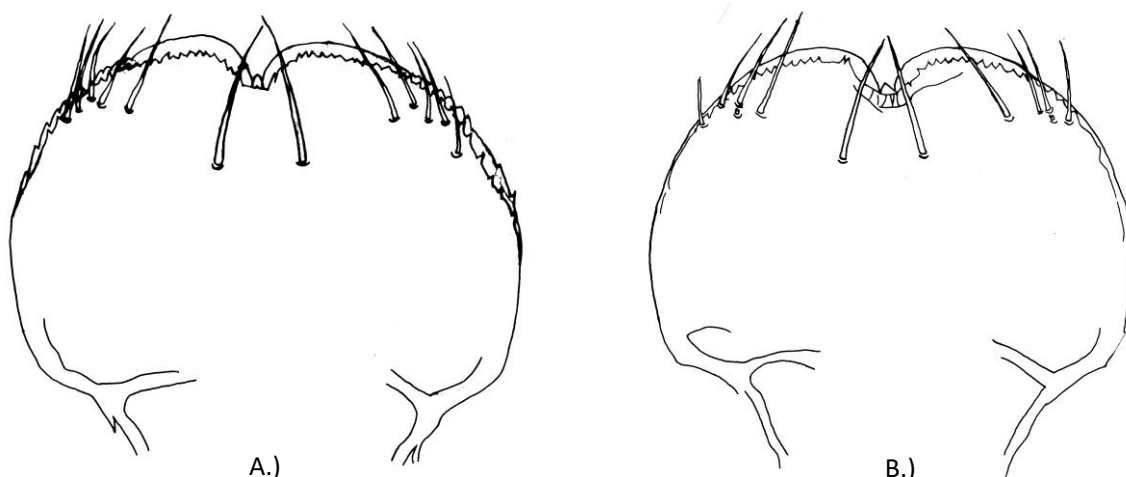
Pro morfologické porovnávání *Baetis beskidensis* a ostatních jedinců skupiny druhů *Baetis fuscatus* byly mandibuly vzorků připraveny pro pozorování pod skenovacím elektronovým mikroskopem. Vzorky byly přeneseny do acetonu, vysušeny, potaženy zlatem pomocí přístroje Polaron PS 100 a následně pozorovány pod mikroskopem Jeol JSM 7401F při napětí 4 kV.



Obr. 3. Délka sét.



Obr. 4: Tvar sét jedince skupiny *fuscatus* (A) a jedince z Korsiky (B).



Obr. 5: Tvar labra jedince skupiny *fuscatus* (A) a jedince z Korsiky (B).

### 3.2.2. Molekulární data

#### 3.2.2.1. Extrakce, amplifikace a sekvenování DNA

Veškerý materiál použitý pro analýzu DNA byl fixován a uchováván v 96% etanolu. Celkem byly analyzovány sekvence 32 jedinců. Pro analýzy byly použity sekvence jedinců získané v rámci projektu FREDIE - Freshwater Diversity Identification for Europe (odkaz č. 1) a z dříve publikovaných prací (tab. I). Dodatečně bylo osekvenováno i několik nově sbíraných jedinců, včetně *B. beskidensis*.

Vouchery (kutikuly larev) všech analyzovaných jedinců jsou uchovány ve sbírce Entomologického ústavu Biologického centra AV ČR.

U nově sekvenovaných jedinců byla DNA extrahována z celé larvy pomocí kitu DNeasy® 96 Tissue Kit (Qiagen) podle instrukcí výrobce. Pomocí PCR byl amplifikován fragment mtDNA kódující cytochrom oxidázu, podjednotku I (*COI*).

PCR amplifikace byla provedena použitím systému Unis Taq (TopBio s.r.o., Praha, ČR) a univerzálních primerů pro „DNA Barcoding“, LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') a HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (Folmer et al., 1994), které amplifikují cca 650 bp 5' konce mitochondriálního genu pro cytochromoxidázu I. Reakce o objemu 12,5 µl obsahovala: 7,625 µl ddH<sub>2</sub>O, 1µl

templátové DNA (nekvantifikované), 1,25 µl 10 × reakčního pufru, 1 µl směsi dNTP (2,5 mM každého), 0,75 µl každého primeru, a 0,125 µl UNIS Taq polymerázy. Amplifikace byla provedena v termocykléru XP Cyclor (BioerTechnology, Ltd., Japan) v následujícím teplotním profilu: počáteční denaturace 94 °C 1 min, následovalo 35 cyklů denaturace 94 °C/30 s, nasedání primerů („annealing“) 47 °C/30 s, elongace 72 °C/50 s, a pak závěrečná elongace 72 °C/2 min 30 s. PCR produkty byly zkontrolovány na elektroforéze a enzymaticky přečištěny (pomocí směsi ExoI a FastAP, Fermentas) a poté sekvenovány firmou SeqMe s. r. o. (Dobříš, ČR).

DNA sekvence byly alignovány a editovány s použitím programů MEGA 5 (Tamura et al., 2011) a BioEdit (Hall, 1999).

### 3.2.2.2. Analýza sekvencí

Genetická variabilita mezi jednotlivými jedinci ve studovaném vzorku byla určována pomocí tzv. Kimurovy dvouparametrové vzdálenosti, K2p (Kimura, 1980), široce používané v analýzách COI oblasti u jepic (Hebert et al., 2003; Ball et al., 2005; Webb, Sun, McCafferty & Ferris, 2007; Gattolliat et al., 2015). Analýzy probíhaly v programu MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

Matice párových K2p vzdáleností byla upravena pro program GenAlEx 6.5 (Peakal & Smouse, 2006), v němž byla zpracována analýzou hlavních komponent (principal component analysis, PCoA). Tato metoda umožňuje nahradit velký soubor základních měřených proměnných (které mohou být vzájemně korelovány) menším množstvím nekorelovaných proměnných, které vznikly buď lineární kombinací, nebo váženým průměrem měřených proměnných hodnot (Lepš, 1996). Na výsledném grafu lze podle vytvořených či nevytvořených shluků posoudit genetickou blízkost analyzovaných jedinců.

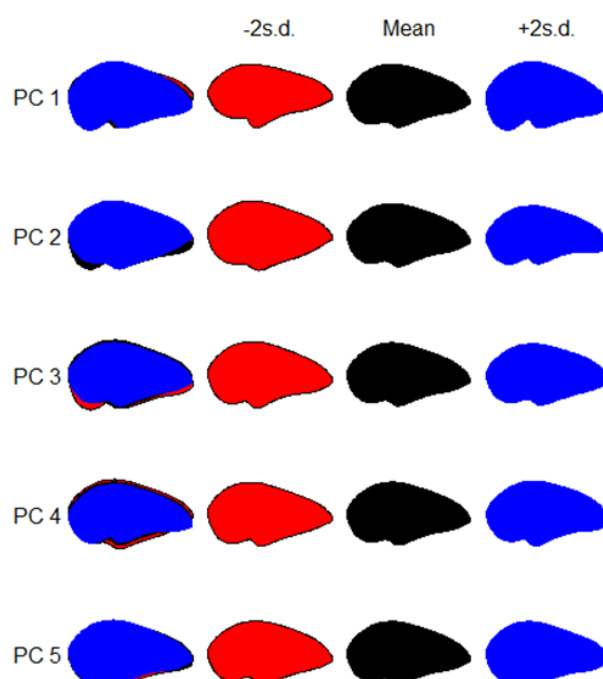
Byly rovněž vytvořeny kladogramy analyzovaných sekvencí pomocí metod Neighbor Joining (model K2p), Maximum Parsimony a Maximum Likelihood (model HKY, selektován na základě AIC kritéria). Hodnoty bootstrapu byly vypočítány při 1000 replikacích. Jako outgroup pro zakořenění stromů byl použit *Baetis rhodani*.

## 4. Výsledky

### 4.1. Rozlišení *B. fuscatus* a *B. scambus*

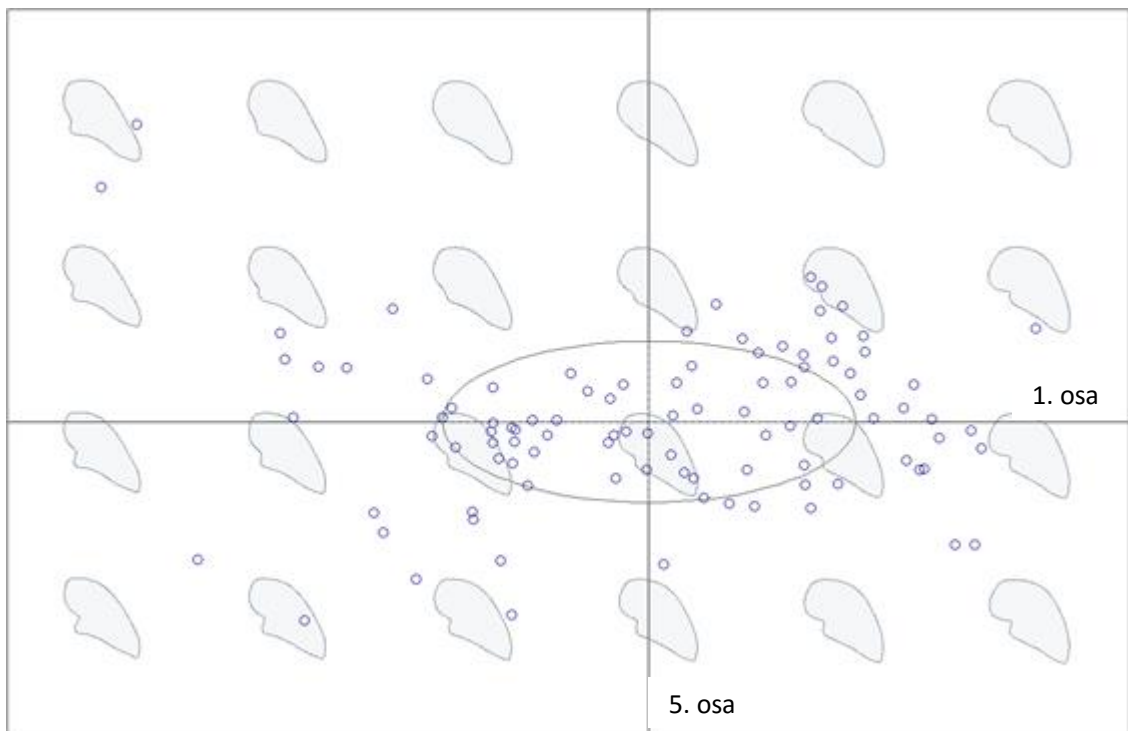
#### 4.1.1. Analýza tvaru labiálního palpu

Byl analyzován dataset 72 jedinců skupiny *fuscatus* z ČR. Z výsledků PCA analýzy tvaru vyplývá, že první osa největší variability nese informaci o zakřivení v apikální části (obr. 6, PC 1), druhá pak celkové zakřivení palpu (obr. 6, PC 2), třetí určitou baňatost (obr. 6, PC 3), čtvrtá klenutost (obr. 6, PC 4) a pátá hloubku zářezu na vnitřním okraji palpu, mezi druhým a třetím článkem (obr. 6, PC 5).



Obr. 6: Variabilita tvaru labiálního palpu *B. fuscatus* a *B. scambus* podle jednotlivých os variability. Každý řádek představuje jednu osu. Sloupce -2s.d., Mean a 2s.d. představují rozsah variability na dané ose. Levý sloupec je tvořen překrytím všech tří tvarů. Variabilita v zakřivení apikální části palpu (PC 1), celkové zakřivení palpu (PC 2), určité baňatosti (PC 3), klenutosti palpu (PC 4) a hloubce mezery pod výběžkem 2. článku labiálního palpu (PC 5.)

Z rozložení jedinců na jednotlivých osách variability vyplývá, že na všech osách existuje mezi jedinci plynulý přechod (obr. 7, obr. 8, obr. 9).

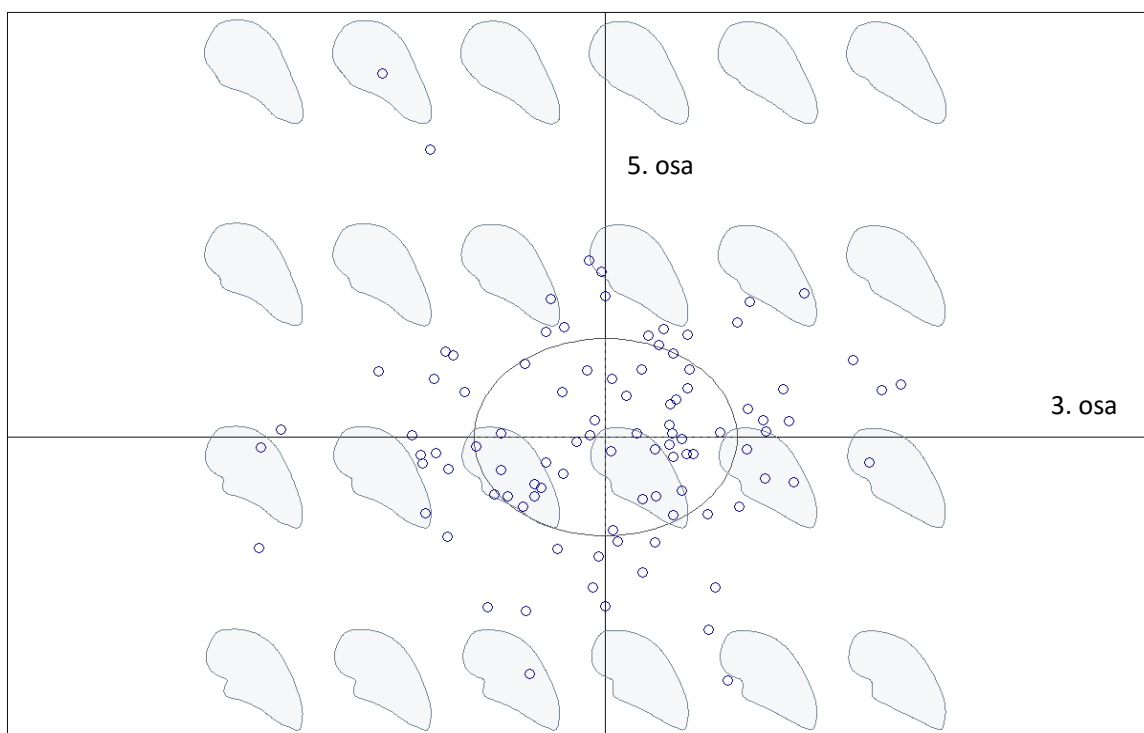


Obr. 7: Variabilita tvaru labiálního palpu *B. fuscatus* a *B. scambus*. Porovnání 1. osy nesoucí variabilitu o zakřivení v apikální části a 5. osy nesoucí variabilitu v hloubce zářezu.



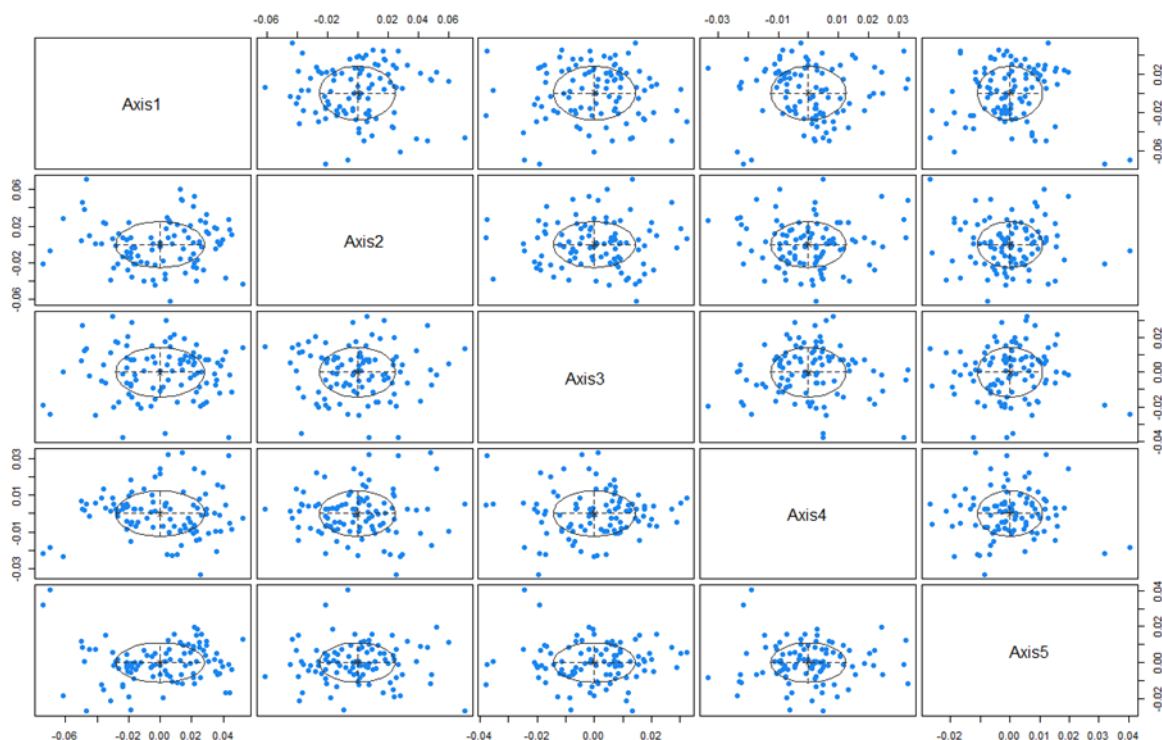


Obr. 8: Variabilita tvaru labiálního palpu *B. fuscatus* a *B. scambus*. Porovnání 2. osy nesoucí variabilitu v celkovém zakřivení palpu a 5. osy nesoucí variabilitu v hloubce zářezu.



Obr. 9: Variabilita tvaru labiálního palpu *B. fuscatus* a *B. scambus*. Porovnání 3. osy nesoucí variabilitu v určité baňatosti a 5. osy nesoucí variabilitu v hloubce zářezu.

Z analýzy vyplývá, že jedinci s různým tvarem palpů se neoddělili do dvou či více významnějších skupin, ale vytvořili vždy jen jeden plynulý shluk, a to platí pro všechny jedince na různých osách variability. Po použití nástroje pro umělé seskupení jedinců opět vyšel jako nejpravděpodobnější výsledek jeden shluk jedinců (obr. 10)



Obr. 10: Nejpravděpodobnější model seskupení jedinců do shluků na všech osách variability.

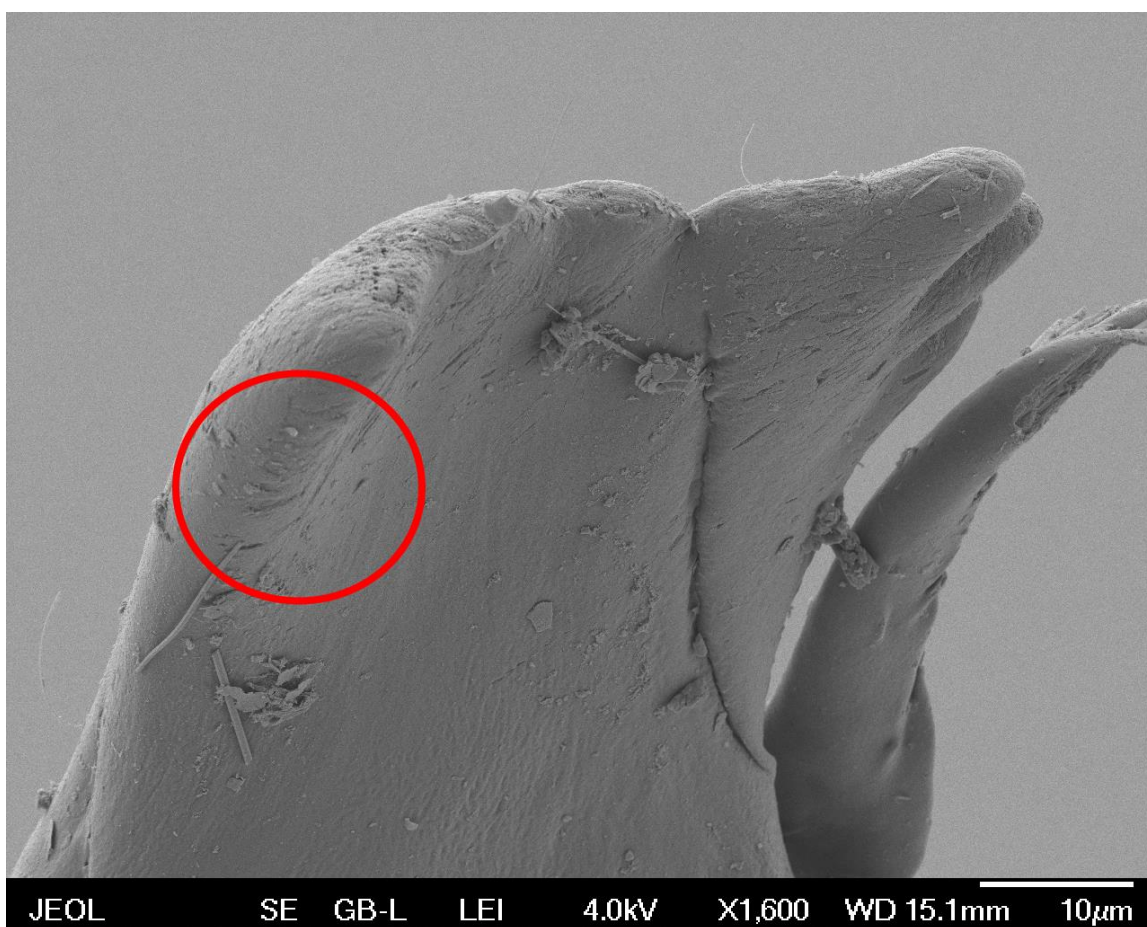
#### 4.1.2. Ostatní morfologické znaky

Ze všech jedinců, u kterých byly analyzovány labiální palpy, byly rovněž studovány trvalé preparáty zbývajících částí těla. Všechny preparáty byly podrobně prohlédnuty pod mikroskopem a porovnány s dosavadními popisy *B. fuscatus* a *B. scambus*. Podrobně sledovány byly sěty na femuru, jejich délka a tvar, tvar labra, výběžky na koncích tergitů, tvar žaber, ostatní části ústního ústrojí. Barva jedinců porovnávána nebyla. Na základě žádného znaku nebylo možné rozdělit studované jedince do více morfologicky definovaných skupin.

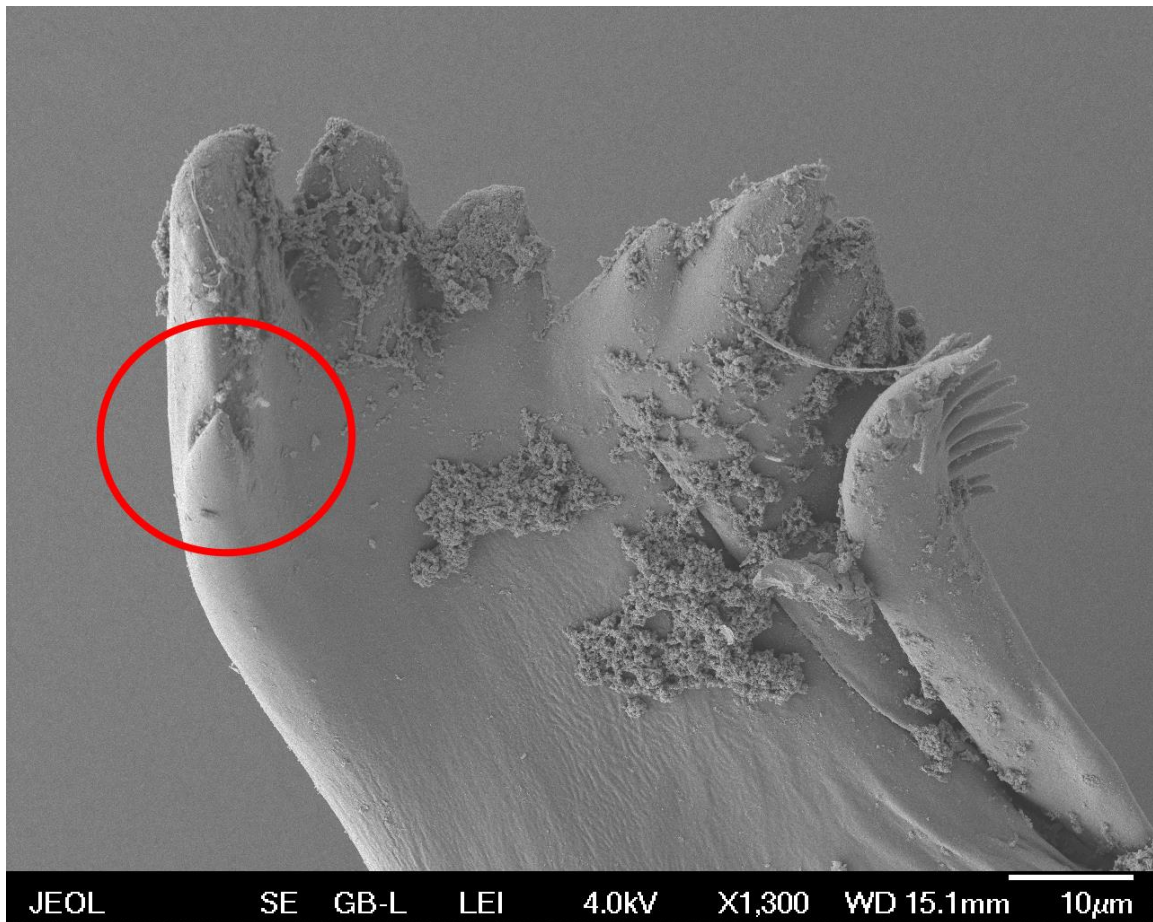
## 4.2. Validita druhu *B. beskidensis*

### 4.2.1. Morfologická data

Jedinci skupiny *B. fuscatus*, nalezení na typové lokalitě *B. beskidensis* vykazovali shodu s morfologickým popisem *B. beskidensis* publikovaným Sowou (1972). U všech larev chyběl subapikální zoubek na pravé mandibule (obr. 11). Další morfologické znaky, odlišující tyto jedince od ostatního studovaného materiálu skupiny *fuscatus* nebyly nalezeny.

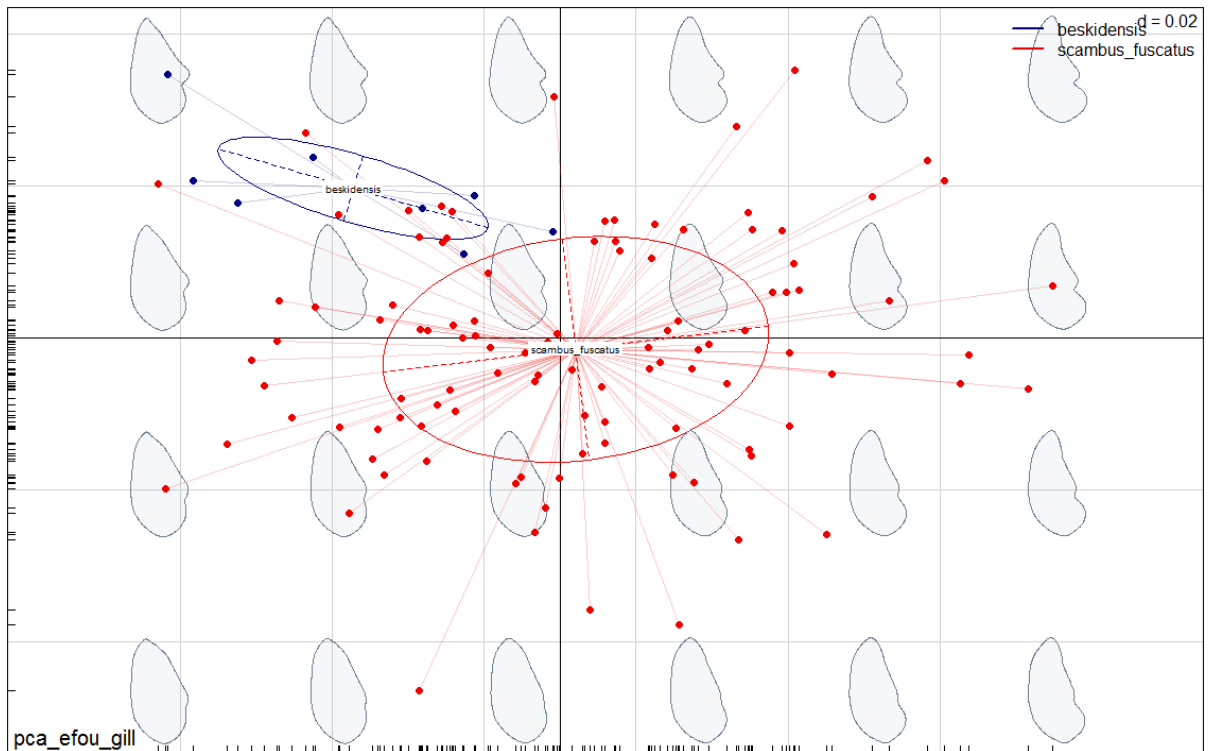


Obr. 11: Mandibula *Baetis beskidensis*, červený obrys ukazuje polohu subapikálního zoubku u *Baetis fuscatus/scambus*.



Obr. 12: Mandibula *Baetis fuscatus* se subapikálním zoubkem.

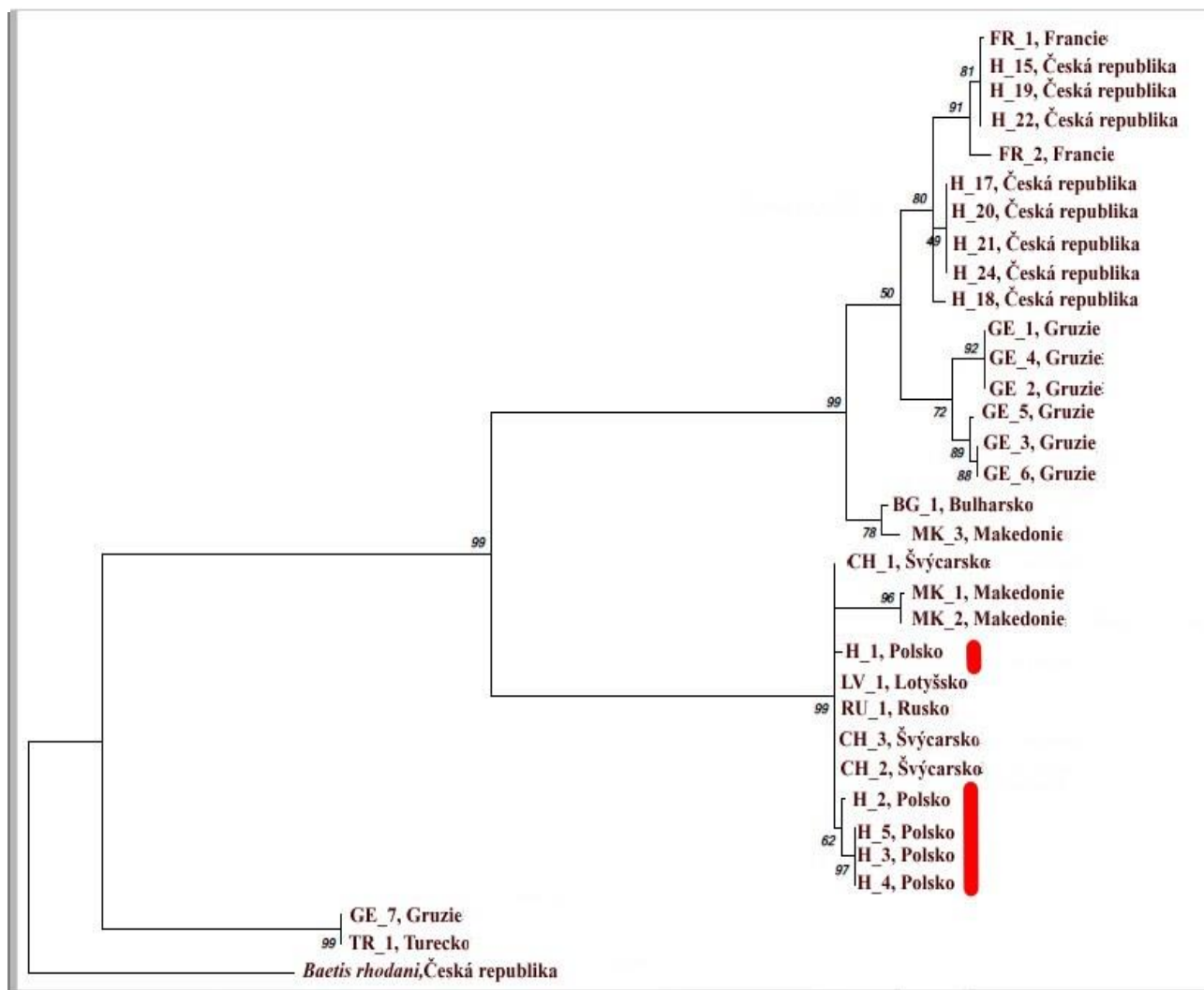
Tvar labiálního palpu byl analyzován spolu s datasetem jedinců skupiny *fuscatus* z ČR. Na prakticky všech osách variability tvořili jedinci *B. beskidensis* shluk na okraji variability hlavního shluku, avšak nenalézali se výrazně mimo shluk hlavní, tvořený jedinci skupiny *fuscatus* z ČR (obr. 13)



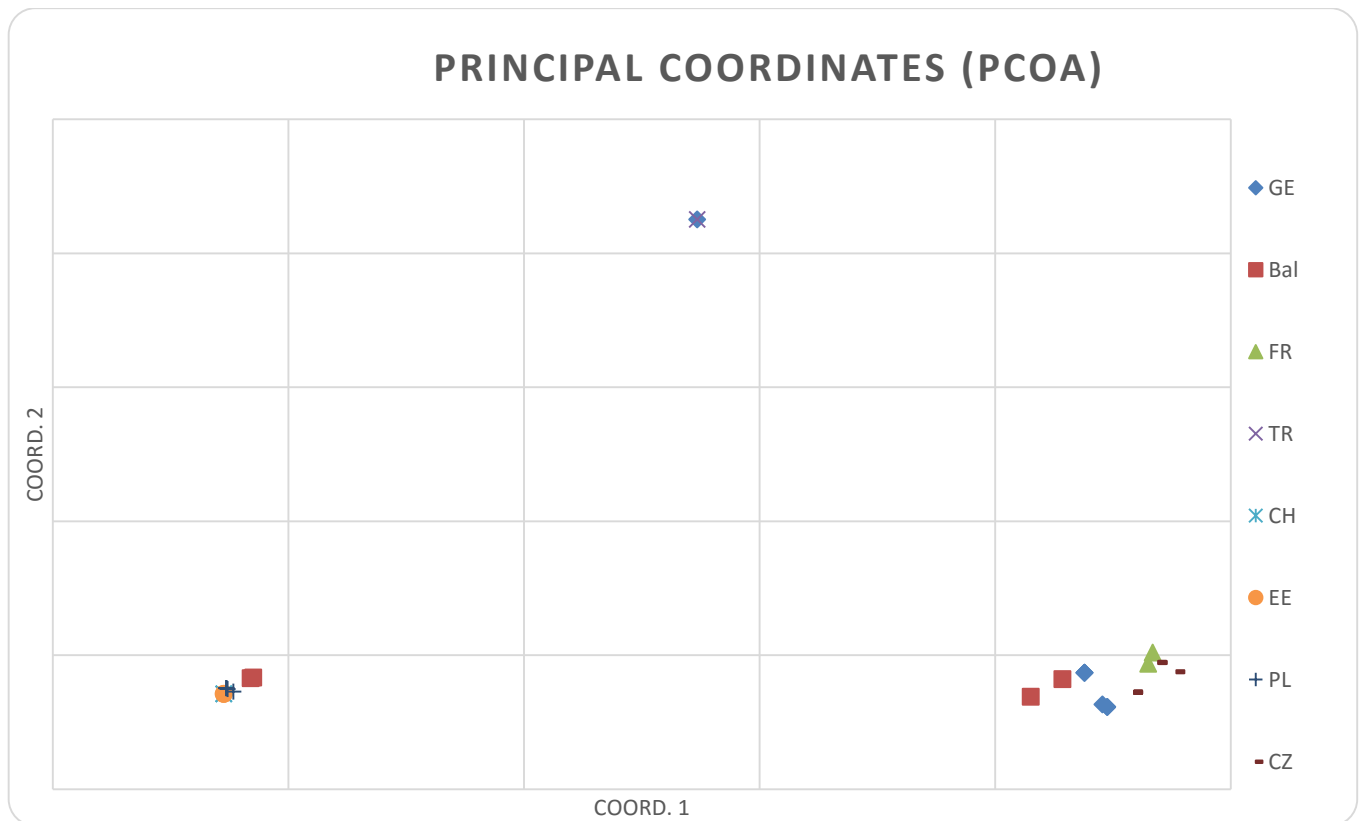
Obr. 13: Variabilita tvaru labiálního palpu *B. fuscatus*, *B. scambus* a *B. beskidensis*. Porovnání 1. a 2. osy variability.

#### 4.2.2 Molekulární data

Analyzoval jsem úsek 657 bází COI. Parsimonně informativních pozic bylo 195. U všech použitých metodických přístupů došlo k rozdělení na tři shluky. Jeden shluk vytvořily vzorky z Gruzie, Francie, Bulharska, Makedonie a České republiky, druhý vytvořily vzorky ze Švýcarska, Lotyšska, Ruska, Makedonie, *B. beskidensis* z Polska (který nevytvořil shluk vlastní) a třetí shluk vytvořily vzorky z Gruzie a Turecka. Tyto shluky byly konzistentní ve výsledcích PCoA analýzy párových K2p vzdáleností (obr. 15) i ve výsledcích všech použitých fylogenetických metod (obr. 14, obr. 17, obr. 18), kde byly podpořeny vysokými hodnotami bootstrapu.



Obr. 14: Fylogenetický strom skupiny druhů *Baetis fuscatus* z různých zemí Evropy vytvořený metodou ML. Hodnoty bootstrapu jsou uvedeny u jednotlivých větví. Červeně je zvýrazněný *Baetis beskidensis*.



Obr. 15: Výsledky PCoA analýzy párových K2p vzdáleností. GE- Gruzie, Bal- Balkánský poloostrov, FR- Francie, TR- Turecko, Ch- Švýcarsko, EE- Litva a Rusko, PL- Polsko (*Baetis beskidensis*), CZ- Česká republika.

COI sekvence *B. beskidensis* nebyly prokazatelně odlišné od zbylých sekvencí *B. fuscatus/scambus*. S jednou ze skupin byly sekvence téměř identické (obr. 14, obr. 17, obr. 18). Ve fylogenezi rozpoznané skupiny se kryjí se skupinami rozpoznávanými metodou PCoA analýzy.

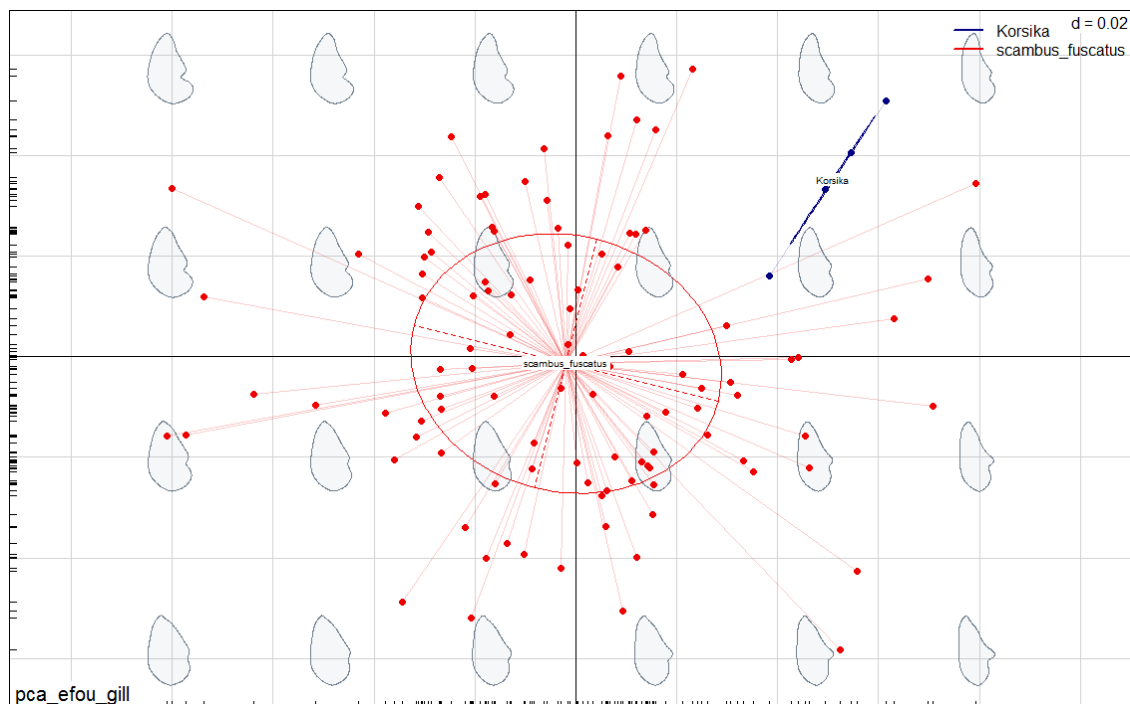
K2P vzdálenost mezi jedinci *B. beskidensis* a *B. fuscatus/scambus* se pohybovaly mezi 0,05- 0,246 (tab. III).

### 4.3. Potenciální nové druhy

V žádném ze sledovaných kvalitativních znaků nebyly nalezeny jasné odlišnosti vymezující případný nový druh od zbylých druhů skupiny *B. fuscatus*. Hodnoty kvantitativních znaků u korsických populací nebyly odlišné od srovnávacích vzorků *B. fuscatus/scambus*. Testoval jsem poměr délky a šířky labra a poměr délky sít na zadním

okraji femuru a šířky femuru (tab. II). Zjištěné hodnoty se výrazně nelišily mezi korsickými vzorky a vzorky *B. fuscatus/scambus* (tab. II).

Analýza tvaru labiálního palpu ukázala korsické jedince jako poměrně odlišné od jedinců *B. fuscatus/scambus* z ČR, přičemž jejich palpus je užší a výběžek vnitřní strany druhého článku palpu je málo výrazný (obr. 16)



Obr. 16: Variabilita tvaru labiálního palpu *B. fuscatus*, *B. scambus* a vzorků z Korsiky. Porovnání 1. a 2. osy variability.

## 5. Diskuse

### 5.1. Rozlišení *B. fuscatus* a *B. scambus*

Během své práce jsem se zaměřil na porovnání tvaru labiálního palpu. Neanalyzoval jsem variabilitu zbarvení, jelikož jsem neměl k dispozici dostatečně reprezentativní vzorek čerstvého materiálu a během uchovávání larev v etanolu dochází ve zbarvení rychle k výrazným změnám. Zbarvení je u larev jepic obecně velmi variabilní (Rozkošný, 1980) a tvar labiálního palpu proto tedy představoval nejexaktnější znak, který bylo možno porovnávat. Přesto by bylo zajímavé v budoucnosti u obou druhů vypracovat i analýzu na základě odlišného zbarvení obou druhů.



Oproti existenci dvou odlišitelných forem (charakteristických pro *B. fuscatus* a *B. scambus*), jak je prezentována v řadě klíčů (Bauernfeind & Soldán, 2012; Bauernfeind & Humpesh, 2001; Rozkošný, 1980 atd.), jsem zaznamenal poměrně značnou variabilitu v tomto znaku. Je známo, že některé části ústního ústrojí larev jepic se mohou během života obrušovat a výrazně měnit tvar (Arens, 1990). Týká se to nicméně jen těch částí, které se přímo podílejí na získávání a mechanickém zpracování potravy (typicky seškrabávání nárostů řas, drcení potravy). Na těchto činnostech se labiální palpy u čeledi Baetidae nepodílejí (Brown, 1961). Rovněž při podrobném studiu labiálních palpů jsem nepozoroval výrazné opotřebení. Změny tvaru následkem opotřebení lze tedy vyloučit.

Výsledky analýzy tvaru labiálního palpu neukazují na existenci dvou odlišitelných forem ve studovaném vzorku jedinců. Ani na základě žádného z dalších porovnávaných morfologických znaků není možné odlišit *B. fuscatus* od *B. scambus*.

**Pro interpretaci výsledků proběhlé analýzy (vyšel pouze jeden celkový shluk) lze formulovat několik alternativních vysvětlení:**

- Oba druhy existují, ale labiální palpus je příliš variabilní pro spolehlivé rozlišení.

Bude nutné revidovat určovací klíče v tom smyslu, že nelze spoléhat na tvar labiálního palpu při určování *B. fuscatus* a *B. scambus*.

- Druhy jsou synonymní, při podrobné analýze ostatních znaků (včetně imag) rovněž nebudou zjištěny jasné odlišitelné formy.

Prohlásit *B. scambus* za mladší synonymum *B. fuscatus*.

- V našich vzorcích byl zastoupen jen jeden ze studovaných druhů.

Tato možnost není příliš pravděpodobná. Byl studován materiál z širokého spektra lokalit, odkud byly v minulosti determinovány opakovaně oba druhy. Navíc zjištěná variabilita tvaru labiálního palpu je natolik široká, že je těžké představit si labiální palpus druhého druhu mimo zaznamenanou variabilitu.

Pro definitivní vymezení druhů v rámci skupiny *B. fuscatus* bude nutné v budoucnu komplexněji analyzovat morfologické a molekulární znaky nejen larev, ale i imag na čerstvém materiálu, umožňujícím analýzu zbarvení i izolaci DNA.

## 5.2. Validita druhu *Baetis beskidensis*

Tento druh je obecně málo známý, nalézán jen sporadicky, přičemž jeho determinace se opírá o původní popis Sowy (1972). Vzhledem k tomu, že typový materiál *B. beskidensis* je pravděpodobně ztracen (Bauernfeind & Soldán, 2012; Kłonowska-Olejnik, osobní sdělení), pro účely porovnání *B. beskidensis* s ostatními druhy skupiny *B. fuscatus* jsem získal tzv. topotypy, jedince sbírané na typové lokalitě, odkud byl druh popsán.

Pochopitelně neexistuje záruka, že populace na typové lokalitě přežila více než 30 let beze změny. Nicméně populace jepic jsou poměrně úzce vázány na svůj habitat, nové druhy se do biocenóz tekoucích vod nedokáží včlenit a místo pro příchod nových druhů zde není (Landa & Soldán 1989) a pakliže v oblasti nedošlo k závažnějším zásahům do vodního toku, je pravděpodobnost přežití takové populace poměrně značná. Náš materiál tedy za předpokladu morfologické shody s popisem Sowy (1972) můžeme pokládat za reprezentativní pro druh *B. beskidensis*.

Sowa (1972) uvádí několik diagnostických znaků, odlišujících *B. beskidensis* od zbylých druhů skupiny *fuscatus*. Borevně bohužel naše vzorky již nebylo možné analyzovat, proto jsem se zaměřil pouze na morfologické struktury. Ze Sowova popisu se jeví jako nejspolehlivější přítomnost subapikálního zoubku na vnějším okraji pravé mandibuly (obr. 11, obr. 12), přičemž *B. fuscatus* jej má mít vyvinutý, zatímco u *B. beskidensis* tento zoubek zcela chybí.

Ohledně tohoto znaku je v další literatuře mírný zmatek, např. Bauernfeind a Soldán (2012) uvádí zmíněný zoubek rovněž jako klíčový znak, ale podle těchto autorů se má vyskytovat i u *B. fuscatus*, přičemž je u tohoto druhu méně výrazný (Bauernfeind & Soldán, 2012, str. 116). Pravděpodobně se jedná jen o omyl, jelikož Bauernfeind a Soldán (2012) vycházeli z práce Sowy (1972), bez studia dalšího materiálu.

Všechny mnou pozorované vzorky z typové lokality *Baetis beskidensis* skutečně neměly subapikální zoubek na hraně pravé mandibuly, zatímco všechny studované vzorky *Baetis fuscatus/scambus* v rámci této práce jej měly. Tyto výsledky tedy nevyvracejí závěry Sowy (1972) ohledně diagnostické hodnoty tohoto znaku.

Subapikální zoubek představuje poměrně nepatrný znak, avšak na mikroskopickém preparátu jej nelze přehlédnout. Ve výjimečných případech jsem zaznamenal jeho

odlomení, které však vždy zanechá viditelné stopy. U incisivní části mandibuly dochází časem k jejímu obroušování, zoubek je však situován pod úroveň maximálního obroušení.

Sowa (1972) rovněž popisuje odlišnou klenutost třetího článku labiálního palpu, než u dalších zástupců skupiny druhů *Baetis fuscatus*. (Sowa, 1972). To bylo ověřeno analýzou tvaru, kdy se vzorky *Baetis beskidensis* vyčlenily na okraji celkového shluku jedinců *Baetis fuscatus/scambus*, avšak stále byly pouze na okraji celkového shluku, ne mimo něj (obr. 13). Sovou (1972) uváděná odlišnost v délce sít na zadním okraji femuru nebyla potvrzena.

### 5.2.1. Porovnání analýzy morfologie s výsledky DNA

Analýza DNA oproti očekávání neukázala, že by jedinci *B. beskidensis* tvořili separátní skupinu sesterskou k ostatním sekvenovaným jedincům *B. fuscatus/scambus*. Sekvence *B. beskidensis* vykazovaly vysoký stupeň podobnosti se sekvencemi jedinců *B. fuscatus/scambus* ze Švýcarska a východní Evropy.

Tito jedinci se nedají morfologicky přiřadit k druhu *B. beskidensis*, protože nevykazují žádný z diagnostických znaků popsaných Sovou (1972), především mají zřetelný subapikální zoubek na pravé mandibule.

Vzniká tak rozpor mezi morfologickými daty topotypického materiálu (které nevyvracejí *B. beskidensis* jako platný druh) a COI daty, které tento závěr nepotvrzují. K vyřešení tohoto rozporu mohou přispět další analýzy rozsáhlejších dat.

### 5.3. Potenciální nové druhy

Dosud popsané tři druhy skupiny *B. fuscatus* jsou morfologicky poměrně uniformní. Vzhledem k tomu, že jsou velmi často a dlouhodobě sbírány a určovány, nelze předpokládat výskyt jasně odlišitelných nových druhů této skupiny v částech Evropy, kde se průzkumy makrozoobentosu dlouhodobě a intenzivně provádí.

I v rámci Evropy však existují oblasti, kde se jepicemi rodu *Baetis* zatím nikdo podrobně nezabýval a je zde potenciál pro výskyt dosud nepopsaných druhů. V rámci své práce jsem studoval materiál skupiny *B. fuscatus* z Korsiky, jehož sběratelé jej poskytli k posouzení právě na základě podezření z příslušnosti k dosud nepopsaným druhům.

Jednalo o poměrně reálnou možnost, jelikož 50 % tamní druhové diverzity jepic je endemických pro tento ostrov (Gatolliat et al., 2015). U několika druhových skupin rodu *Baetis*, poukazují nedávno publikované výsledky DNA barcodingu na existenci několika kryptických druhů, pravděpodobně ostrovních endemitů a složitou historii jejich speciace (Gatolliat et al., 2015).

Studiem morfologie materiálu z Korsiky se nepodařilo najít výrazné morfologické odlišnosti od srovnávacího materiálu *B. fuscatus/scambus*. Měl jsem však k dispozici poměrně malé množství vzorků (pouze 2 jedinci z Korsiky byli použitelní pro měření labra a sít na femuru).

Analýza tvaru labiálního palpu (porovnání jedinců z Korsiky s jedinci *B. fuscatus/scambus*) poukazuje na poměrně odlišný tvar palpu u korsických jedinců (obr. 16). Nepodařilo se ale najít žádné podpůrné morfologické znaky, na jejichž základě by bylo možno popsat nový druh.

## 6. Závěr

Pro určování *Baetis fuscatus* a *Baetis scambus* jsem tvar labiálního palpu vyhodnotil jako nespolehlivý diagnostický znak. Potvrdil jsem morfologickou charakteristiku druhu *B. beskidensis*, druh je však zpochybněn výsledky analýzy DNA, kde se jednoznačně neoddělil od druhů určovaných jako *Baetis scambus*, *Baetis fuscatus*. Ve vzorcích z Korsiky jsem neobjevil žádný potencionální nový druh. V práci testovaná metodika analýzy tvaru může mít značný potenciál pro budoucí využití v taxonomii jepic.

## 7. Zdroje

Adámek, Z., Orendt, C., Wolfram, G., & Sychra, J. (2010). Macrozoobenthos response to environmental degradation in a heavily modified stream: Case study the Upper Elbe River, Czech Republic. *Biologia*, 65(3), 527-536.

Arens, W. (1990), 'Wear and tear of mouthparts: a critical problem in stream animals feeding on epilithic algae', *Canadian Journal of Zoology*, 68, 1896–1914.

Bonhomme, V., Picq, S., Gaucherel, C., & Claude, J. (2013). Momocs: outline analysis using R. *Journal of Statistical Software: InReview*.

Barber-James, H. M., Gattolliat, J. L., Sartori, M., & Hubbard, M. D. (2008). Global diversity of mayflies (Ephemeroptera, Insecta) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 339-350.

Bauernfeind, E., & Humpesch, U. H. (2001). *Die Eintagsfliegen Zentraleuropas (Insecta: Ephemeroptera): Bestimmung und Ökologie*. Verlag des Naturhistorischen Museums.

Bauernfeind, & Soldán, T. (2012) *The mayflies of Europe (Ephemeroptera)*. Ollerup: Apollo Books

Ball, S. L., Hebert, P. D., Burian, S. K., & Webb, J. M. (2005). Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society*, 24(3), 508-524.

Brinck, P., & Müller-Liebenau, I. (1965). On the status of *Ephemera fuscata* Linnaeus, 1761 (Insecta, Ephemeroptera). *Proposed designation of a Neotype*. *ZN (S.)*, 1620, 119-122.

Brown, D.S. (1961), 'The morphology and functioning of the mouthparts of *Chloeon dipterum* L. and *Baetis rhodani* Pictet (Insecta, Ephemeroptera)', Proceedings of the Zoological Society of London, 136(2), 147–176.

Derka, T. *Ephemeroptera // Vodné makroinvertebráta Slovenska, súpis druhov a autekologické charakteristiky*. – Bratislava: Slovenský hydrometeorologický ústav, 2003.– S. 22-26

Eiseler, B. (2005). *Bildbestimmungsschlüssel für die Eintagsfliegenlarven der deutschen Mittelgebirge und des Tieflandes*. Mauch.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5), 294.

GIMP Team. (2009). the GIMP. *Development*.

Garcia-Castellanos, D., Estrada, F., Jiménez-Munt, I., Gorini, C., Fernández, M., Vergés, J., & De Vicente, R. (2009). Catastrophic flood of the Mediterranean after the Messinian salinity crisis. *Nature*, 462(7274), 778-781.

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(1512), 313-321.

Jacob, U. (2003). *Baetis* Leach 1815, sensu stricto oder sensu lato. Ein Beitrag zum Gattungskonzept auf der Grundlage von Artengruppen mit Bestimmungsschlüsseln. *Lauterbornia*, 47, 59-129.

Jazdzewska, T., & Gorczynski, A. (1991). Les éphéméroptères des rivières qui franchissent la zone marginale du Roztocze Central. *Overviews and strategies of the Ephemeroptera and Plecoptera*. Sandhill Crane Press, Inc., Gainesville, 263-270.

Rozkošný, R (ed.). *Klíč vodních larev hmyzu*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1980, 521 s.

Kimmins, D. E. (1960). The Ephemeroptera types of species described by AE Eaton, R. McLachlan and F. Walker, with particular reference to those in the British Museum (Natural History). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology*, 9(4), 269-318.

Kolaříková, K., Stuchlík, E., Liška, M., Horecký, J., Tátosová, J., Hardekopf, D., ... & von Tümpling, W. (2012). Long-term changes in the bioaccumulation of As, Cd, Pb, and Hg in macroinvertebrates from the Elbe river (Czech Republic). *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(6), 3511-3526.

Kovács, T. I. B. O. R., Godunko, R., Juhász, P. É. T. E. R., Kiss, B. É. L. A., & Müller, Z. O. L. T. Á. N. (2008). Quantitative records of larvae of Ephemeroptera, Odonata and Plecoptera from the Zakarpats' ka Region, Ukraine (2004, 2006). *Folia Historico Naturalia Musei Matraensis*, 32, 135-147.

Landa, V. (1969). Fauna CSSR, Svazek 18—Jepice—Ephemeroptera. *Ceskoslovenska Akademie VED*.

Landa, V., & Soldán, T. (1983). Ephemeroptera from Mongolia. *Folia entomologica Hungarica; Rovartani kozlemenyek*.

Landa, V., & Soldán, T. (1989). Rozšíření řádu Ephemeroptera v ČSSR s ohledem na kvalitu vody. Academia.

Leach, W. E. (1815). Entomology [pp. 57–172]. Brewster's Edinburgh Encyclopedia, 9(part I).

Lepš, J. (1996). Biostatistika. Jihočeská univerzita, Biologická fakulta.

Elliott, J. M., & Humpesch, U. H. (2010). *Mayfly larvae (Ephemeroptera) of Britain and Ireland: keys and a review of their ecology*. Freshwater Biological Association (FBA).

Elliott, J. M., Humpesch, U. H., & Macan, T. T. (1988). *Larvae of the British Ephemeroptera: a key with ecological notes* (No. 49). Freshwater Biological Association.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.

Matsumura, S. (1931). 6000 illustrated insects of Japan-Empire.

Murphy, L. N., Kirk-Davidoff, D. B., Mahowald, N., & Otto-Bliesner, B. L. (2009). A numerical study of the climate response to lowered Mediterranean Sea level during the Messinian Salinity Crisis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 279(1), 41-59.

Müller-Liebenau, I. (1969). *Revision der europäischen Arten der Gattung Baetis Leach, 1815 (Insecta, Ephemeroptera)*. Max-Planck-Gesellschaft.

Nieto, C. (2010). Cladistic analysis of the family Baetidae (Insecta: Ephemeroptera) in South America. *Systematic Entomology*, 35(3), 512-525.

Oggiano, G., Funedda, A., Carmignani, L., & Pasci, S. (2009). The Sardinia-Corsica microplate and its role in the Northern Apennine Geodynamics: new insights from the Tertiary intraplate strike-slip tectonics of Sardinia. *Bollettino della Società Geologica Italiana*, 128(2), 527-539.

O'Reilly, P. (1997). *Matching the Hatch: Stillwater, River & Stream*. Quiller.



- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537-2539.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, 7(3), 355-364.
- Rostock, M. (1888). Neuroptera germanica- Jahresber. *Ver. Naturk.*
- Soldán, T., Enktaivan, S., & Godunko, R. J. (2009). Commented checklist of mayflies (Ephemeroptera) of Mongolia. *Aquatic Insects*, 31(sup1), 653-670.
- Sowa, R. (1972). *Baetis beskidensis* n. sp. des Carpates polonias (Ephemeroptera: Baetidae). *Acad Polon Sci Bull Ser Sci Biol*.
- Sowa, R. (1979). developpement des Ephemeropteres de la riviere dunajec aux environs de Pieniny. In *Proceedings... International Conference on Ephemeroptera*.
- Sroka, P. (2012). Systematics and phylogeny of the West Palaeartic representatives of subfamily Baetinae (Insecta: Ephemeroptera): combined analysis of mitochondrial DNA sequences and morphology. *Aquatic Insects*, 34(1), 23-53.
- Stephens, J. F. (1834). *Illustrations of British entomology* (Vol. 4). Baldwin and Cradock.
- Stöck, M., Sicilia, A., Belfiore, N. M., Buckley, D., Brutto, S. L., Valvo, M. L., & Arculeo, M. (2008). Post-Messinian evolutionary relationships across the Sicilian channel: Mitochondrial and nuclear markers link a new green toad from Sicily to African relatives. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 56.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Team, R. C. (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012.

Tshernova, O. A., Kluge, N. J., Sinitshenkova, N. D., & Belov, V. V. (1986). Order Ephemeroptera–Mayflies. *Opredelotel' nasekomykh Dal'nego Vostoka SSSR, 1*, 99-142.

Walker, F. (1853). List of specimens of Neuropterous insects in the collection of the British Museum. Part III. *List of specimens of Neuropterous insects in the collection of the British Museum. Part III.*, 501-529.

Waltz, R. D., & McCafferty, W. P. (1987). New genera of Baetidae for some Nearctic species previously included in Baetis Leach (Ephemeroptera). *Annals of the Entomological Society of America*, 80(5), 667-670.

Webb, J. M., Sun, L., McCafferty, W. P., & Ferris, V. R. (2007). A new species and new synonym in Heptagenia Walsh (Ephemeroptera: Heptageniidae: Heptageniinae) based on molecular and morphological evidence. *Journal of Insect Science*, 7(1), 63.

Zahrádková, S., Soldán, T., Bojková, J., Helešic, J., Janovská, H., & Sroka, P. (2009). Distribution and biology of mayflies (Ephemeroptera) of the Czech Republic: present status and perspectives. *Aquatic insects*, 31(sup1), 629-652.

Zedková, B., Rádková, V., Bojková, J., Soldán, T., & Zahrádková, S. (2014). Mayflies (Ephemeroptera) as indicators of environmental changes in the past five decades: a case study from the Morava and Odra River Basins (Czech Republic). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*.

## **Odkazy:**

Odkaz č. 1:

FREDDIE. *Freshwater Diversity Identification for Europe*. [online]. [2003] [cit. 2015-11-26]. Dostupné z: <http://www.fredie.eu/index.php/check-lists/58-checklist-of-european-mayflies>

Odkaz č. 2:

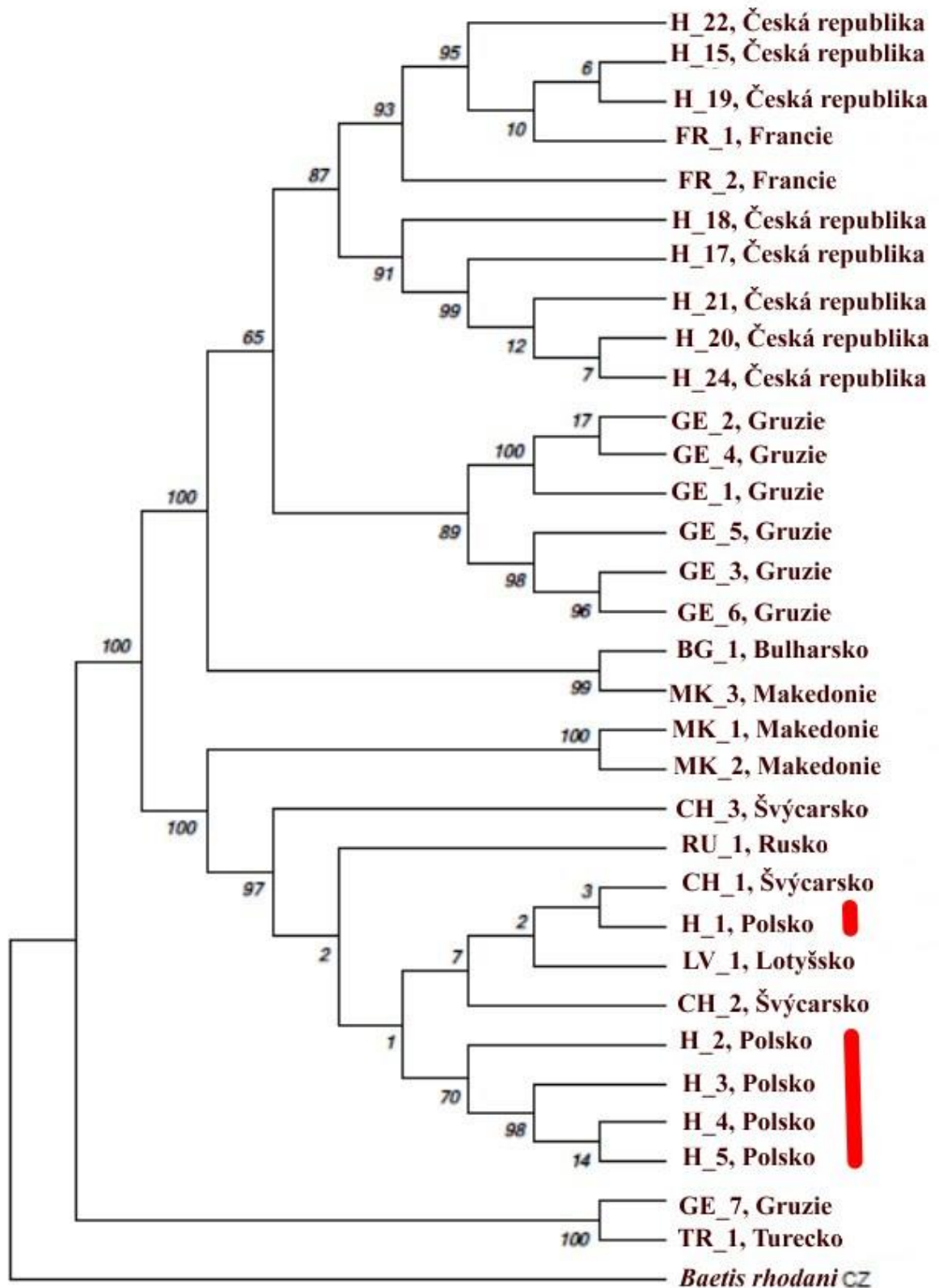
IS Arrow. Český hydrometeorologický ústav. [online]. [2015] [cit. 2015-11-26]. Dostupné z: <http://hydro.chmi.cz/isarrow/taxontable.php?agenda=POV>

## 8. Přílohy

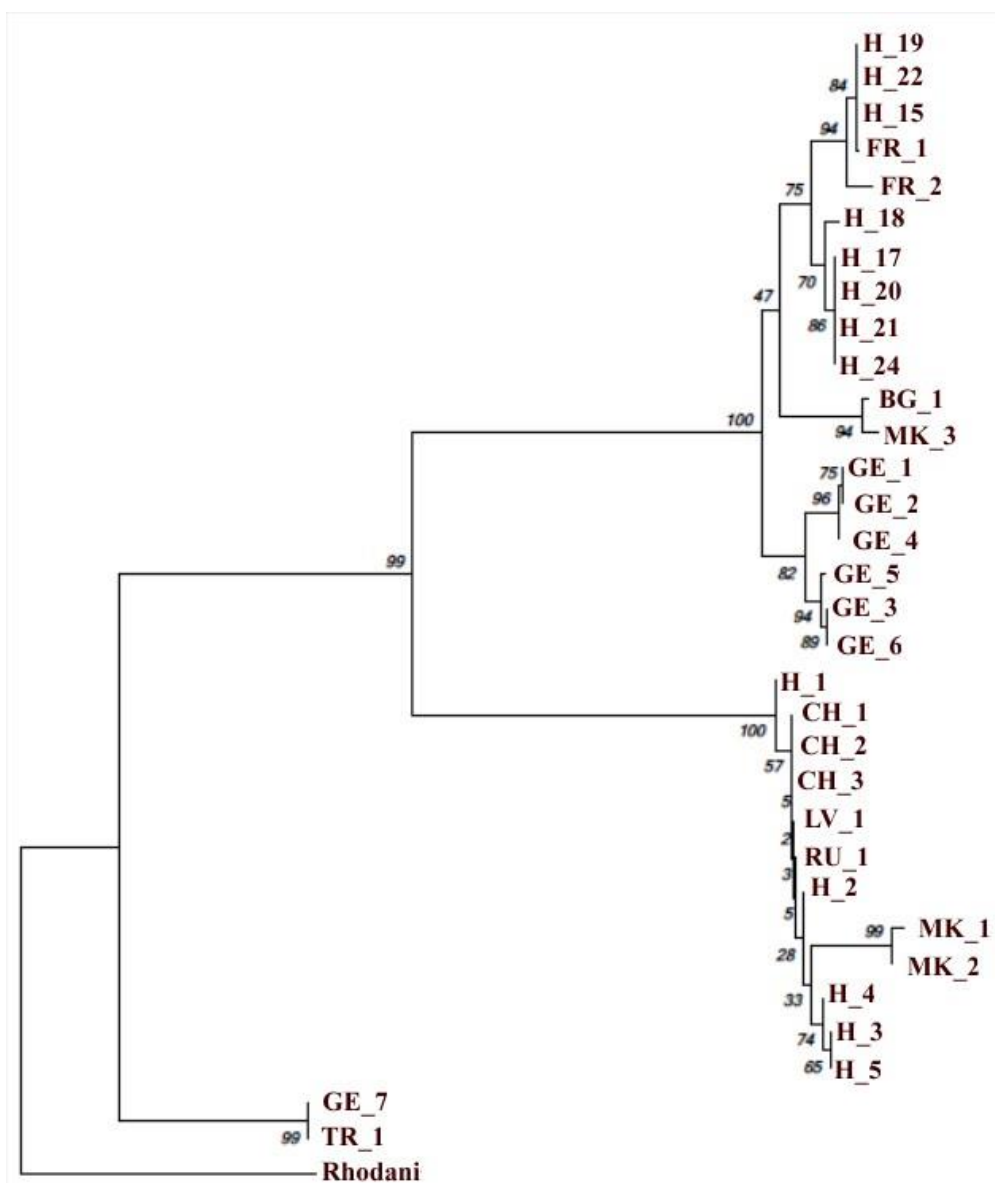
Tab. I: Přehled vzorků používaných pro DNA analýzu

Druh	Kód jedince	Země původu	Zdroj sekvence
<i>B. fuscatus / scambus</i>	FR_1	Francie	FREDIE
<i>B. fuscatus / scambus</i>	FR_2	Francie	FREDIE
<i>B. fuscatus / scambus</i>	GE_1	Gruzie	GenBank č. JN164321
<i>B. fuscatus / scambus</i>	GE_2	Gruzie	GenBank č. JN164322
<i>B. fuscatus / scambus</i>	GE_3	Gruzie	GenBank Č. JN164324
<i>B. fuscatus / scambus</i>	GE_4	Gruzie	GenBank Č. JN164323
<i>B. fuscatus / scambus</i>	GE_5	Gruzie	GenBank Č. JN164326
<i>B. fuscatus / scambus</i>	GE_6	Gruzie	GenBank Č. JN164325
<i>B. fuscatus / scambus</i>	GE_7	Gruzie	FREDIE
<i>B. fuscatus / scambus</i>	H_15	Česká republika	vlastní sběr
<i>B. fuscatus / scambus</i>	H_17	Česká republika	vlastní sběr
<i>B. fuscatus / scambus</i>	H_18	Česká republika	vlastní sběr

<i>B. fuscatus / scambus</i>	H_19	Česká republika	vlastní sběr
<i>B. fuscatus / scambus</i>	H_20	Česká republika	vlastní sběr
<i>B. fuscatus / scambus</i>	H_21	Česká republika	vlastní sběr
<i>B. fuscatus / scambus</i>	H_22	Česká republika	vlastní sběr
<i>B. fuscatus / scambus</i>	H_24	Česká republika	Vlastní sběr
<i>B. fuscatus / scambus</i>	BG_1	Bulharsko	GenBank Č. JN164327
<i>B. fuscatus / scambus</i>	MK_1	Makedonie	FREDIE
<i>B. fuscatus / scambus</i>	MK_2	Makedonie	FREDIE
<i>B. fuscatus / scambus</i>	MK_3	Makedonie	FREDIE
<i>B. fuscatus / scambus</i>	CH_1	Švýcarsko	FREDIE
<i>B. fuscatus / scambus</i>	CH_2	Švýcarsko	FREDIE
<i>B. fuscatus / scambus</i>	CH_3	Švýcarsko	FREDIE
<i>B. fuscatus / scambus</i>	LV_1	Lotyšsko	FREDIE
<i>B. fuscatus / scambus</i>	RU_1	Rusko	FREDIE
<i>B. fuscatus / scambus</i>	TR_1	Turecko	FREDIE
<i>B. beskidensis</i>	H_1	Polsko	Vlastní sběr
<i>B. beskidensis</i>	H_2	Polsko	Vlastní sběr
<i>B. beskidensis</i>	H_3	Polsko	Vlastní sběr
<i>B. beskidensis</i>	H_4	Polsko	Vlastní sběr
<i>B. beskidensis</i>	H_5	Polsko	Vlastní sběr



Obr. 17: Fylogenetický strom skupiny druhů *Baetis fuscatus* z různých zemí Evropy vytvořený metodou Maximum parsimony. Hodnoty bootstrapu jsou uvedeny u jednotlivých větví.



Obr. 18: Fylogenetický strom skupiny druhů *Baetis fuscatus* z různých zemí Evropy vytvořený metodou neighbourhood joining. Hodnoty bootstrapu jsou uvedeny u jednotlivých větví. Lokality sběru jsou popsány v tabulce (tab. I).

Tab. II: Morfometrická data jedinců skupiny *fuscatus*.

vzorek	původ	Poměr délky a šířky labra	Poměr šířky femuru a délky chlupu
1.	Česká republika	x	3,200
2.	Česká republika	1,279	3,809
3.	Česká republika	1,424	3,052
4.	Česká republika	1,397	4,300
5.	Česká republika	1,438	4,500
6.	Bulharsko	1,784	4,842
7.	Česká Republika	1,627	4,895
8.	Turecko	x	4,420
9.	Česká republika	1,617	5,059
10.	Bulharsko	x	5,444
11.	Česko	1,924	3,250
12.	Korsika	1,417	4,325
13.	Korsika	1,621	4,634

