

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

**Molekulární metody jako způsob determinace genetické
diverzity druhů na příkladu raka bahenního na území ČR**

Autor: Lukáš Koryťák

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Martin Bláha, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.

Studijní program a obor: Zootechnika, Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2014

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, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá 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.

Datum:

Podpis studenta:

.....

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svému vedoucímu Ing. Martinu Bláhovi, Ph.D. a konzultantovi doc. Ing. Pavlu Kozákovi, Ph.D., za metodické vedení, odbornou pomoc, poskytnuté rady a cenné připomínky při vypracování této bakalářské práce.

Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru VÚRH JU č. MSM6007665809 a národního dotačního programu MZe č.2A.e.1a.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lukáš KORYTÁK**
Osobní číslo: **V11B015P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Molekulární metody jako způsob determinace genetické diversity druhů na příkladu raka bahenního na území ČR**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Molekulární metody se v posledních desetiletích staly velmi užitečným nástrojem v posuzování a stanovování genetické diversity organismů. Genetická diverzita je většinou posuzována na základě odlišností vybraných úseků DNA mezi jedinci jednoho či různých druhů v závislosti zda nás zajímá studium populační genetiky nebo příbuznosti jednotlivých druhů či fylogenetické vztahy v širším měřítku. Raci jsou na našem území zastoupeni několika druhy, z nichž pouze dva mají status původních, rak říční (*Astacus astacus*) a rak kamenáč (*Austropotamobius torrentium*). Kromě těchto dvou původních druhů se zde vyskytuje také rak bahenní (*Astacus leptodactylus*), který byl do střední Evropy zavlečen v 19. století z oblasti Kaspického moře. V druhé polovině 19. století po epidemiích račího moru byl z Polska introdukovan i na naše území. Na rozdíl od dvou původních druhů raků, kde jsou již genetická data o struktuře populací potažmo druhu jako celku na našem území známá, o genetické diverzitě raka bahenního máme jen kusé informace, ačkoliv se stal součástí naší bioty a obývá na desítky lokalit napříč naším územím.

Cílem bakalářské práce bude sestavit ucelenou rešerši dostupných molekulárních metod, na jejichž základě můžeme posuzovat genetickou diverzitu. Zároveň se student aktivně zapojí do vzorkování jedinců raka bahenního z přírodních populací a zpracování vzorků tkáně v laboratoři. Měl by si osvojit používání postupů při zpracování vzorků pro genetické analýzy (izolace DNA, příprava PCR reakcí) a aplikaci základních molekulárních metod (analýza mtDNA, mikrosatelitů).

Rozsah grafických prací: 5 stran
Rozsah pracovní zprávy: 30 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

- Fetzner J. W., Crandall, K. A., 2002. Biology of Freshwater Crayfish, Department of Zoology, USA, Chapter 8, 291 - 326
Hulák, M., Kašpar, V., Kozák, P., Filipová, L., Petrusek, A., 2010. Cross-species amplification of microsatellite markers in the invasive spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*): assessment and application. Journal of Applied Genetics 51: 73-78
Kočárek E., 2008. Genetika. Scientia Praha, 210 s.
Koiv, K., Gross, R., Paaver, T., Kuehn R., 2008. Isolation and characterization of first microsatellite markers for the noble crayfish, *Astacus astacus*. Conservation Genetics 9: 1703-1706
Koiv, K., Gross, R., Paaver, T., Hurt, M., Kuehn, R., 2009. Isolation and characterization of 11 novel microsatellite DNA markers in the noble crayfish, *Astacus astacus*. Animal Genetics 40: 124-124
Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V. a Koptíková J., 2010. Metody molekulární biologie. Muni Press. Brno, 189 s.
Relichová J., 2009. Genetika populací. Muni Press. Brno, 188 s.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Martin Bláha, Ph.D.
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant bakalářské práce: doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Datum zadání bakalářské práce: 7. prosince 2012
Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2014


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSKÉJÍ A OCHRANY VOD
Zaříší 728/II
389 25 Vodňany (2)


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. února 2013

Obsah

1. Úvod	7
2. Literární přehled	8
2.1 Biologie raka bahenního (<i>Astacus leptodactylus</i> Eschscholtz).....	8
2.2 Rozšíření ve světě	8
2.3 Výskyt v ČR	9
2.4 Studium genetické diverzity raků v ČR	10
2.4.1 Použití molekulárních markerů	11
2.4.2 Mitochondriální DNA	11
2.4.3 Enzymová elektroforéza	12
2.4.4 Variabilní sekvence DNA	12
2.4.5 RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů	13
2.4.6 Polymorfismus jednonukleotidový (SPN).....	13
3. Metodika	14
3.1 Vzorkování na lokalitách výskytu raka bahenního	14
3.2 Zpracování vzorku raků v laboratoři	14
3.2.1 Izolace DNA	14
3.2.2 Příprava polymerázové řetězové reakce (PCR)	15
3.2.3 Analýza sekvencí a fylogenetická analýza	16
4. Výsledky	18
4.1. Odchyt raka bahenního	18
4.2. Genetická diverzita populací raka bahenního.....	18
4.3 Fylogenetická analýza mitochondriálních genů	18
5. Diskuze	21
5.1. Výskyt raka bahenního na území ČR.....	21
5.2. Genetická diverzita raka bahenního.....	21
5.3 Druhový komplex raka bahenního	22

5.4 Možný důvod vzniku dobře definovaných linií	23
6. Závěr.....	24
7. Seznam použité literatury.....	25

1. Úvod

Raci patří mezi nejvíce rozšířenou skupinu bezobratlých živočichů ve sladkých vodách. Díky své velikosti (jsou největšími sladkovodními bezobratlými živočichy v Evropě) bývají občas nazýváni klíčovými druhy („keystone species“) či ekologickými inženýry („ecological engineers“), mající významnou roli ve vodním ekosystému, jehož stav velmi intenzivně ovlivňují. Některé druhy jsou velmi důležitými bioindikátory kvality vody, od které se dále odvíjí zastoupení mnoha jiných druhů živočichů sdílejících s raky společný biotop.

Raky můžeme nalézt v nejrůznějších typech biotopů tekoucích vod (od drobných potoků až po řeky) i vod stojatých (v rybnících, jezerech, bažinách, tůních nebo dočasných nádržích; Holdich, 2002a). Vyskytují se na všech kontinentech, kromě Afriky a Antarktidy, ačkoliv jejich výskyt není zaznamenán v části Asie a Jižní Americe. V nedávné době však došlo k introdukci raků do Afriky, asijské části Ruska a Číny (Holdich, 2002a,b). Druhově nejbohatší společenstvo raků najdeme v Severní Americe, kolem 420 druhů (Crandall a Buhay, 2008; De Grave a kol. 2009), zastoupené čeledí Cambaridae. V porovnání s nimi je evropská astakofauna velmi chudá, čítající pouze tři druhy rodu *Astacus* a dva druhy rodu *Austropotamobius* (Kozák a kol., 2013).

Díky zhoršující se kvalitě vod a negativním hydrologickým podmínkám obecně, docházelo v druhé polovině minulého století k drastickému poklesu početnosti raků a mnoho populací zmizelo úplně. Důvodem byla především nadměrná eutrofizace vod a necitlivé zásahy do morfologie toků. Ty vedly ke snížení rozmanitosti vodního prostředí ve vztahu k rakům, především snížení počtu úkrytů, a k zhoršení fyzikálně chemických ukazatelů vody, zejména koncentrací rozpuštěného kyslíku.

2. Literární přehled

2.1 Biologie raka bahenního (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz)

Rak bahenní patří mezi velké druhy raků, kde samci ojediněle dorůstají celkové délky až 30 cm, častěji je to ale 15 cm. Tento druh raka se dožívá až 10 let (Köksal, 1988; Holdich a kol., 2006). Zbarvení raka bahenního je různé a závisí na prostředí, ve kterém se vyskytuje. Nejčastější barvou je olivově zelená až medově hnědá. Raritou je modré zbarvení. Hlavohruď je štíhlá, vejcovitého až hruškovitého tvaru. Na bocích hlavohruďi jsou trnavé výstupky, díky kterým je povrch drsný. Nejvíce viditelný je pár prominentních výrůstků (trnů), které jsou v blízkosti týlní brázd. Rak bahenní má viditelně úzká a dlouhá klepeta, což je znatelné zvláště u dospělých samců. Klepeta jsou na spodní straně krémově světlá na rozdíl od raka říčního, který je má výrazně červená (Skurdal a Taugbøl, 2002; Pöckl a kol., 2006; Kozák a kol., 2009).

Pohlavně dospívá ve 3-4 roce života a to v délce od 75-85mm (Skurdal a Taugbøl, 2002; Balik a kol., 2005). K páření dochází během října až začátkem listopadu při teplotě 6-12 °C. Po šesti týdnech a později dojde k naklazení vajíček. Malí raci se líhnou v květnu a červnu (Alekhnovich a Kulesh, 1996; Kovačeva, 1998; Kozák a kol., 2009).

Rak bahenní obývá sladké, ale i brakické vody (Souty- Grosset a kol., 2006). Jeho biotopem jsou mělká, ale i hluboká jezera, řeky a potoky. Jelikož je rak bahenní aktivní převážně ve dne, nepotřebuje tolik úkrytů jako rak říční (Skurdal a Taugbøl, 2002). Nejčastěji ho můžeme nalézt v litorální vegetaci při povrchu dna v zatopených lomech (Štěpán, 1932). Tento druh je ze všech přirozeně se vyskytujících druhů nejméně náročný na obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě. Dokáže přežít i pokles na 2 mg/l. Nevadí mu zakalené vody a kolísavé změny teplot (4-32°C), je aktivní i v zimě (Skurdal a Taugbøl, 2002; Souty-Grosset a kol., 2006).

2.2 Rozšíření ve světě

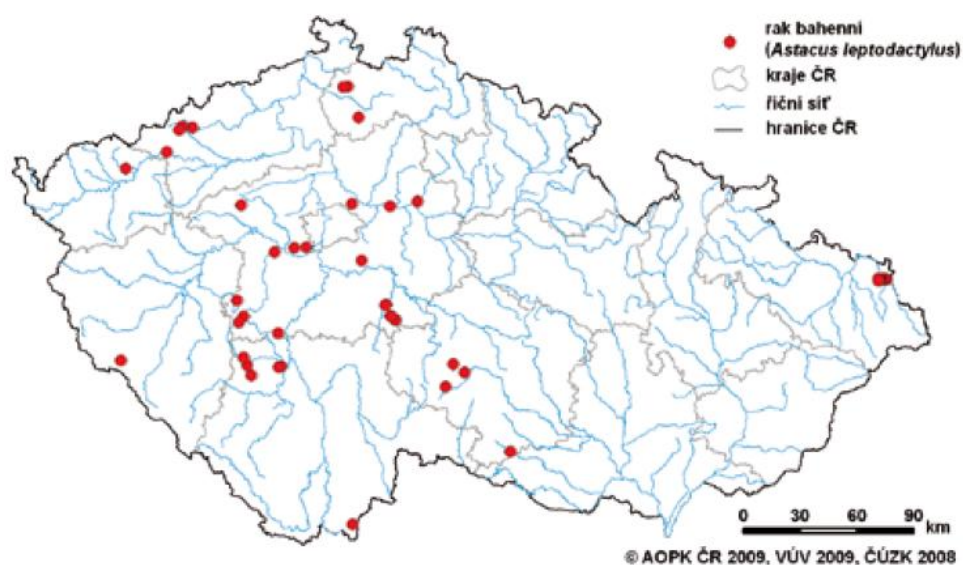
Oblast původu raka bahenního leží na východě Evropy a západě Asie, kde hlavní středisko výskytu spadá do oblasti kolem Kaspického a Černého moře (Pöckl, 1999), odkud se rozšířil skoro po celé Evropě kromě Pyrenejského poloostrova, Norska a

Švédska (Souty-Grosset a kol., 2006). Oblast přirozeného výskytu zasahuje do velké části Ruska od Uralu, části poblíž měst Novosibirsk a Tomsk až k Uzbekistánu a Turkmenistánu. V severní části Ruska ho můžeme najít v povodí řeky Severní Dvina přes oblast Petrohradu až na jih Finska. Kaspické moře je jižní hranicí-Rusko, Kazachstán, Turkmenistán, Írán, Ázerbajdžán a Arménie. S největší pravděpodobností oblast jeho původního výskytu zasahuje na západ Bratislavy, Vídně a dále na jihovýchod Polska a západ Ukrajiny až do historické zóny, která se nazývá Halič. První introdukovaní jedinci v 19. století pocházeli z této oblasti. Z důvodu mylných představ rybářů, že je rak bahenní odolný proti račímu moru, začali vysazovat tento druh jako náhradu za raka říčního, na mnoha lokalitách račím morem vyhubeného. Takto byl rak bahenní introdukován do povrchových vod Polska, Německa, Litvy, Lotyšska, Rakouska, České republiky i Slovenska (Hudec, 1994; Skurdal a Taugbøl, 2002; Pöckl a Pekny, 2002). Za původní lokality výskytu jsou považovány země jako Bělorusko, Chorvatsko, Moldávie, Rumunsko, Bulharsko, Turecko, Maďarsko, Srbsko, Řecko a nejspíše i Slovensko a Rakousko. Druhá vlna introdukce byla směřována ke komerčním účelům a proběhla v 70. a 80. letech 20. století z Turecka a Polska do Dánska, Holandska, Lucemburska, Francie, Itálie, Švýcarska, Anglie a Španělska. Ve Španělsku introdukce tohoto druhu nebyla úspěšná. Pro Českou republiku jsou nejbližší zaznamenány lokality s přirozeným výskytem na území východního Polska, Slovenska, východního Rakouska a Chorvatska. V současné době je zaznamenán výskyt ve 32 evropských zemích. (Pöckl a kol., 2006; Höldich a kol., 2006, 2009)

2.3 Výskyt v ČR

Rak bahenní byl na naše území introdukován v roce 1892 a to do rybníků na Chlumecku, Blatensku a Mladoboleslavsku. Introdukovaní jedinci pocházeli z východu Haliče u Podvoločisky (Štěpán, 1932; 1933; Lohninský 1984). Některé zdroje však uvádějí jeho výskyt u nás již před tím (Dyk, 1953). Mezi další lokality výskytu raka bahenního spadá oblast mezi Sedlicí a Bratronicemi na Blatensku a kolem Drahenic na Příbramsku, Komárkovský rybník u Nouzova, Zámecký rybník v Kopidlně a v sousedních tocích a malých vodních nádržích v Řepích u Prahy. Častý umělý chov vedl k rozšíření do dalších lokalit, do kterých patří oblasti Blanska (Lažany), dále Lišna a Nebřenic, Hluboké nad Vltavou a Nových Hradů (Štěpán, 1934). Oddělený výskyt byl

pozorován na severní Moravě v oblasti Karvinska, kde v důlních vodách žije velká populace (Dolný a Ďuriš, 2001). V současné době je znám výskyt raka bahenního ve skromném počtu asi na čtyřiceti konkrétních místech (Obrázek 1) a to převážně ve středních a severních Čechách (Horká, 2006). Jelikož v rámci monitoringu AOPK ČR byla ve srovnání s podrobným průzkumem malých vodních toků prozkoumána jen malá část stojatých vod, tak se můžeme domnívat, že ve skutečnosti se na našem území vyskytuje více konkrétních míst s tímto druhem (Kozák a kol., 2013).



Obrázek 1 Výskyt raka bahenního na území České republiky (Štambergová a kol., 2009).

2.4 Studium genetické diverzity raků v ČR

Studie genetické diverzity na našem území se prováděla jak na druhu raka říčního (*Astacus astacus*), tak v poslední době i na raku kamenáči (*Austropotamobius torrentium*) a raku bahenním. U raka říčního se studie zabývá analýzou druhově specifických mikrosatelitních markerů. Důvodem je jednak zjištění genetické diverzity, ale také objasnění původu jednotlivých populací. Dále je zde prováděn výzkum fylogenetických poměrů v rámci druhového komplexu raka bahenního, kde jsou vyhodnocovány příbuzenské vztahy mezi vzdálenými populacemi v rámci rozšíření druhu. Tento výzkum probíhá na FROV JU v laboratoři ekologie a etologie ryb a raků.

Druhem raka kamenáče se zabývali odborníci z Karlovy Univerzity. Analyzovali genetickou diverzitu u tohoto druhu napříč populacemi na našem území a došli k závěru, že rak kamenáč je na našem území původním druhem (Pešek 2013).

2.4.1 Použití molekulárních markerů

Slovem marker rozumíme studovanou oblast genomu, tedy geny mitochondriální (mtDNA) či jaderné DNA (nDNA). Při analýze velkého rozmezí molekulárních markerů je možné podrobněji zkoumat populace, detekovat mezidruhové hybridizace, dopodrobna analyzovat geografické rozšíření a fylogenetický původ jednotlivých druhů či linií (Paaver, 1983; Zardoya a Doadrio, 1999; Kohlmann a Luczynski, 2000; Hulák, 2008). S pomocí statistických programů lze použít molekulární markery k detailním studiím genetické diverzity populací. Výsledky nám mohou odkrýt různé jevy, kterými populace v minulosti prošly, a které zůstali zaznamenány v DNA jedinců (Nei a kol., 1975; Hulák, 2008).

2.4.2 Mitochondriální DNA

Předchůdce (předky) lze vysledovat díky mitochondriální DNA (mtDNA), jelikož se tato DNA přenáší z matky na potomstvo beze změn, ale obvykle jen v jedné variantě (Petrušek a kol., 2013). V dnešní době je nespočet markerů, které lze použít při zkoumání genetiky raků. Obecné vlastnosti mitochondriálních markerů jsou natolik dobré, proto se řadí mezi nejpoužívanější. Mitochondriální DNA se vyskytuje u všech živočichů a její struktura je natolik podobná, že můžeme využívat stejné metody u různých druhů. Její mutace probíhá tak rychle, že je možné zkoumat také vnitrodruhovou variabilitu. Markery mtDNA jsou vhodné k využití studia fyto geografie. Mitochondriálními markery jsou většinou fragmenty mitochondriálních genů. Ty lze získat z izolované DNA z relativně malého množství tkáně, aniž by se daný jedinec musel usmrcovat. Nejvíce využívanými mitochondriálními markery u raků jsou geny pro COI (cytochromoxidáza podjednotka I) a geny, které se vyskytují na malé a velké ribozomální podjednotce (12S a 16S rRNA). Mitochondriální DNA není vhodná ke studiu genetické diverzity uvnitř populací, neboť její variabilita není pro tento účel dostatečná. K tomuto účelu jsou vhodnější variabilnější markery, zejména mikrosatelity.

V mtDNA dochází mnohonásobně častěji k mutacím než u jaderné DNA. Hlavní příčinou je nejspíše menší přesnost replikace a reparace. MtDNA patří mezi snadno dostupné, přesné a velice vhodné chronometry (mitochondriální hodiny) (Řehout a kol., 2000), kdy na základě četností mutací můžeme u jednotlivých genů (jednotlivé geny mutují různou rychlostí) stanovit časový úsek potřebný k těmto mutacím a tedy předpokládaný vznik jednotlivých fylogenetických linií, poddruhů, druhů atp.

2.4.3 Enzymová elektroforéza

Patří mezi nejstarší molekulární metody sloužící ke studiu populační struktury. Tato metoda nepracuje přímo s genetickou informací sledovaného jedince (s DNA), ale zaměřuje se na biochemické projevy. Využívá se různého kódování enzymu stejným genem, což způsobuje různou strukturu téhož proteinu. Kladem této metody je univerzálnost. Konkrétní enzym se dá kombinovat mezi různými živočichy a není zapotřebí vytvářet nové markery pro každý studovaný taxon. Mezi nevýhody, které zkoumají populační studie, patří navíc ohraničená různorodost jednotlivých enzymů, která nedosahuje takové schopnosti, aby rozlišila variabilitu DNA markerů. Další nevýhodou je uchovávání vzorků v terénu, protože při této metodě musíme mít vzorek čerstvý nebo hluboce zmražený a to nám práce v terénu neumožňuje (Filipová a kol., 2009).

2.4.4 Variabilní sekvence DNA

Hlavně mikrosatelity (STR, SSR) a minisatelity (VNTR). Jsou typické vysokým polymorfismem, tzn. velkým počtem alel. Mikrosatelity (SSRs- simple sequence repeat) jsou nekódující repetitivní úseky jednoho a více nukleotidů. Jsou nejvhodnější, pokud chceme zjistit genetickou variabilitu v rámci populací. Tyto markery mají obrovský stupeň polymorfismu alel, což znamená, že mají vysokou mutační rychlost (Litt a Luty, 1989; Weber a May, 1989; Tautz, 1989; Hulák, 2008). Mutace probíhající na lokusech má za následek vznik velkého počtu alelových variant, což znamená heterozygotnost. V jedné populaci se díky tomu nachází více variant. (Hulák, 2008). Proto můžeme nalézt např. CA sekvence v různě dlouhých řetězcích jako například CACACACA, což je čtyři krát opakující se a nebo CACACACACACA šest krát opakující se. Protože

mikrosatelity mají relativně malou velikost, můžeme je pomocí PCR amplifikovat (Christiakov a kol., 2005).

2.4.5 RFLP – polymorfismus délky restričních fragmentů

Pomocí restričních endonukleáz se izolovaná DNA či amplifikované specifické části DNA (pcr-RFLP) štěpí na menší fragmenty v místech se specifickým pořadím nukleotidů pro danou restriční endonukleázu. Takto lze popsat rozdíly či naopak podobnosti mezi jedinci v rámci populací, rodin atp. (např. Grandjean a kol., 1997; Gouin a kol., 2003).

2.4.6 Polymorfismus jednonukleotidový (SPN)

Jsou jednotlivé polymorfismy (genové mutace) v úsecích genů, které jsou kódující nebo v úsecích genomu, který je nekódující. V porovnání s mikrosatelity jsou v genomu častější (Řehout a kol., 2005). Výskyt v genomu je cca. každých 500-1000 bp (Hulák a kol., 2006).

3. Metodika

3.1 Vzorkování na lokalitách výskytu raka bahenního

Na základě dat z nálezové databáze AOPK ČR (portal.nature.cz) byly členy laboratoře etologie ryb a raků vytipovány lokality ve středočeském kraji, kde se měl rak bahenní vyskytovat (Tabulka 1). Výskyt raků byl zjišťován odlovem do vrší s návnadou. Na každé lokalitě bylo stráženo 10 až 20 vrší, které zde byly ponechány přes noc. Jako návnada sloužil kus rybího masa. Druhý den byly vrše vyndány, ulovení raci byli spočtení a deseti jedincům byla odebrána část končetiny na molekulární analýzy. Vzorek byl fixován v 96 % lihu. Lokality s předpokládaným výskytem raka bahenního, kde jsme prováděli vzorkování, byly následující: Sobenský rybník (49°37'35.120"N, 13°50'40.465"E), Velký Kotelský rybník (49°35'52.351"N, 13°48'40.014"E), lom Marušák (50°10'43.227"N, 14°36'46.848"E), lom Chlum (49°54'42.921"N, 14°41'36.051"E), lom v Horkách u Čáslavi (49°52'26.310"N, 15°26'1.288"E), kaskáda rybníků pod Pravonínem (49°37'53.246"N, 14°57'15.625"E), lom Hromady (49°33'10.107"N, 14°5'55.060"E) u obce Kozárovice. Osobně jsem se účastnil výjezdu a strážení pastí na lokalitách lom Kosov, Sobenský a Velký Kotelský rybník.

3.2 Zpracování vzorku raků v laboratoři

Zpracování vzorků probíhalo na Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém ve Vodňanech. Kromě mnou odebraných vzorků byli také analyzováni jedinci z dalších populací z území Čech již dříve ovzorkovaných členy laboratoře ekologie a etologie ryb a raků, jmenovitě populace odlovená v nádrži v Praze Stodůlkách (50°2'18.834"N 14°18'22.057"E), populace ze Stanislavi na Ukrajině (N 46°33,910' E 32°09,982'), jedinci z populace lomu Mačkov u Blatné (49°23'42.865"N, 13°53'2.658"E) a jedinci z populace v lomu Řečice (49°26'6.180"N 13°51'42.300"E) (Tabulka 1).

3.2.1 Izolace DNA

Izolace probíhala v laboratoři prePCR, kde nejprve musel být z části končetiny odstraněn tvrdý exoskelet a vyškrábána měkká tkáň. Při opakovaném procesu s končetinami od dalších jedinců se musela pokaždé vytrít Petriho miska a nástroje

(nůžky a pinzeta) lihem a nechat vypálit nad kahanem, aby se předešlo možné kontaminaci DNA a následnému zkreslení výsledků. Na izolaci DNA byl použit komerční kit NucleoSpin Tissue od firmy Macherey-Nagel. Tkáně byly umístěny do 1,5 ml zkumavek (eppendorfky) spolu se 180 μ l bufferu T1 a těsně před umístěním zkumavek na termoblok bylo ještě přidáno 15 μ l proteínasy K. Následně se tkáň nechala inkubovat při teplotě 56°C přes noc. Po rozpuštění buněk se přidal buffer B3, vzorky se promíchaly a opět umístily na termoblok s přednastavenou teplotou 70°C na deset minut. Poté se přidalo 220 μ l 96-100% etanolu a opět se celé vzorky promíchaly. Obsah zkumavek byl napipetován do kolonek, kde se DNA v průběhu centrifugace při 11 tisících otáčkách zachytila na filtru. Dalším krokem bylo promytí kolonek 400 μ l B5 buffrem a 300 μ l BW bufferem. Následně se vzorky nechaly dvě minuty při 13 000 otáčkách vysušit. Po vysušení se ke vzorkům přidalo 70 μ l BE-„elution bufferu“ a zahřály se na 70°C. Poté následovala poslední centrifugace při 11 000 otáčkách. Tímto krokem došlo k vymytí DNA zachycené na membráně do připravené zkumavky. Pro kontrolu byla změřena koncentrace nukleových kyselin na přístroji Nanodrop 2000, aby se zjistila čistota a koncentrace DNA ve vzorku.

3.2.2 Příprava polymerázové řetězové reakce (PCR)

Izolovaná DNA byla použita jako templát pro následnou amplifikaci specifických genů při polymerázové řetězové reakci (PCR).

Před umístěním na Thermocycler T3000 od firmy biometra byly namíchány vzorky pro amplifikaci mitochondriálního genu pro cytochromoxidázu a ribosomální rRNA 12S podjednodku. Pro oba geny se použily následující primerové páry: ORCO1F (AACGCAACGATGATTTTTTCTAC) (Taylor and Hardman, 2002) a Apa COI 1H (ATAGCGACTATAGCATAAATTATC) (Pedraza-Lara a kol., 2010) pro COI a 12SF6259 (GTGCCAGCAGCTGCGGTTA) a 12SR6859 (CTACTATGTTACGACTT ATYTC) pro 12S rRNA. Tyto dva primery byly vyvinuty mým školitelem M. Bláhou v laboratoři. Na přípravu 10 μ l pro PCR se použilo 0,3 μ l forward primeru a 0,3 μ l revers primeru, 1 μ l vyizolované DNA daného jedince, 5 μ l PPP Mastermixu a 3,4 μ l vody. Aby během amplifikace nedošlo k odpaření vzorku, do každé mikrozkušavky se přidala kapka minerálního oleje. Vzorky se zvortexovaly a umístily na Thermocycler, kde se přednastavil program. Základní protokol pro PCR byl: iniciální denaturace při

96°C po dobu 3 minut, následované 38 cykly s denaturací při 96°C po dobu jedné minuty, nasedání primerů při specifické teplotě (53-56°C) po dobu jedné minuty a prodlužování fragmentu při 72°C po dobu 45 sekund. Posledním krokem bylo finální prodlužování při teplotě 72°C po dobu 10 minut. Při čekání na dokončení programu se připravil gel, který se skládal z 1,5 g agarózy a 100 ml TBE bufferu. TBE buffer má složení z trisu, kyseliny borité a EDTA. Pro vizualizaci DNA v gelu jsou do agarózy napipetovány 3,5 µl Good View barvičky, která vizualizuje DNA v gelu. Příprava gelu probíhala navážením agarózového prášku a smícháním s TBE bufferem. Tato směs se musela zahřát, důkladně rozmíchat a následně zchladit. Namíchaný gel v tekutém stavu se nalil do vaničky v horizontální elektroforéze a instaloval se do ní hřeben, který po ztuhnutí gelu zanechal komůrky, do kterých se pipetovaly vzorky PCR. Elektroforéza probíhala v TBE bufferu po dobu 1 hodiny a 10 minut, při napětí 90 V. Po skončení programu v elektroforéze byl gel prosvícen pod UV lampou, aby se zobrazila DNA. Za dobré znamení se považoval jasně svítivý a celistvý proužek DNA, který odpovídal délce amplifikovaného fragmentu. Dosažená délka jednotlivých genů se posuzovala podle přidaného DNA markeru. Extrakce fragmentů z gelu se prováděla pomocí skalpelu a vzorky se umístily do zkumavek pro pozdější pročištění pomocí purifikačního kitu. Pročištěné vzorky byly následně zaslány do společnosti MacroGen na sekvenaci. Výsledky ze sekvenace byly staženy z webových stránek společnosti z účtu laboratoře ekologie a etologie ryb a raků.

3.2.3 Analýza sekvencí a fylogenetická analýza

Pro stanovení divergence sekvencí fragmentů jednotlivých genů byl použit program DnaSP v5 (Librado a Rozas, 2009). Zarovnání (alignment) sekvencí bylo provedeno pomocí algoritmu MUSCLE (Edgar, 2004) inkorporovaného v programu MEGA 6 (Tamura a kol. 2013). Pro fylogenetické analýzy byla pro COI gen jako outgroup použita sekvence raka říčního z populace Světlohorská. Pro 12S rRNA byla použita sekvence raka kamenáče z webového portálu GenBank (přístupové číslo AY 151527). Vlastní fylogenetické analýzy byly provedeny v programu MEGA 6 (Tamura a kol., 2013) za použití algoritmu Neighbour-Joining (NJ) a Maximum Likelihood (ML). Pro evoluci COI genu byl použit model Hasegawa Kishino Yano (Hasegawa a kol. 1985) s

diskrétní Gamma distribucí (nejvhodnější model evoluce byl vybrán v programu MEGA, pomocí Bayesovského informačního kritéria).

4. Výsledky

4.1. Odchyt raka bahenního

Na základě získaných dat z webových stránek AOPK ČR, bylo vybráno ve středních a jižních Čechách 13 lokalit s prokázaným výskytem raka bahenního. Dané lokality měly charakter vodní nádrže (rybník, zatopený lom).

Raci byli odloveni na 6 z 13 vytipovaných lokalit. Na jedné lokalitě s uváděným výskytem raka bahenního byl zjištěn výskyt raka říčního (lom Chlum). Na ostatních lokalitách (Sobenský rybník, Velký Kotelský rybník, lom Marušák, lom Chlum, lom v Horkách u Čáslavi, lom Hromady, kaskáda rybníků pod Pravonínem) nebyl výskyt raka bahenního potvrzen. Nejvíce jedinců se podařilo odchytit v lomu Kosov a to konkrétně 153 jedinců.

4.2. Genetická diverzita populací raka bahenního

Pro popis genetické diverzity populací raka bahenního byly použity geny kódující ribozomální 12S rRNA a cytochromoxidázu podjednotku I (COI). Analyzováno bylo celkem 30 jedinců z 6 lokalit (Tabulka 1).

Pro 12S rRNA gen bylo analyzováno celkem 30 sekvencí. Délka sekvencí po zarovnání byla 527 bp s počtem 69 variabilních pozic. Haplotypová diverzita pro 12S rRNA byla v rozmezí od 0 do 1 (Tabulka 1). Nejnižší hodnota byla zjištěna u jedinců z lokalit Kosov a Mačkov. Naopak nejvyšší haplotypovou diverzitu vykazovali jedinci z lokality Řečice ($H_d=1$) a Stanislav (Ukrajina) ($H_d=0,866$). Pro COI gen se obdrželo celkem 28 sekvencí. Délka sekvencí po zarovnání byla 497 bp s počtem 65 variabilních pozic. Haplotypová diverzita pro COI byla v rozmezí od 0 do 0,733. Nulová haplotypová diverzita byla zjištěna v populaci Stodůlky, Mačkov a Kosov, naopak analyzovaní jedinci z populace ze Stanislavi na Ukrajině vykazovali nejvyšší haplotypovou diverzitu ($H_d=0,733$).

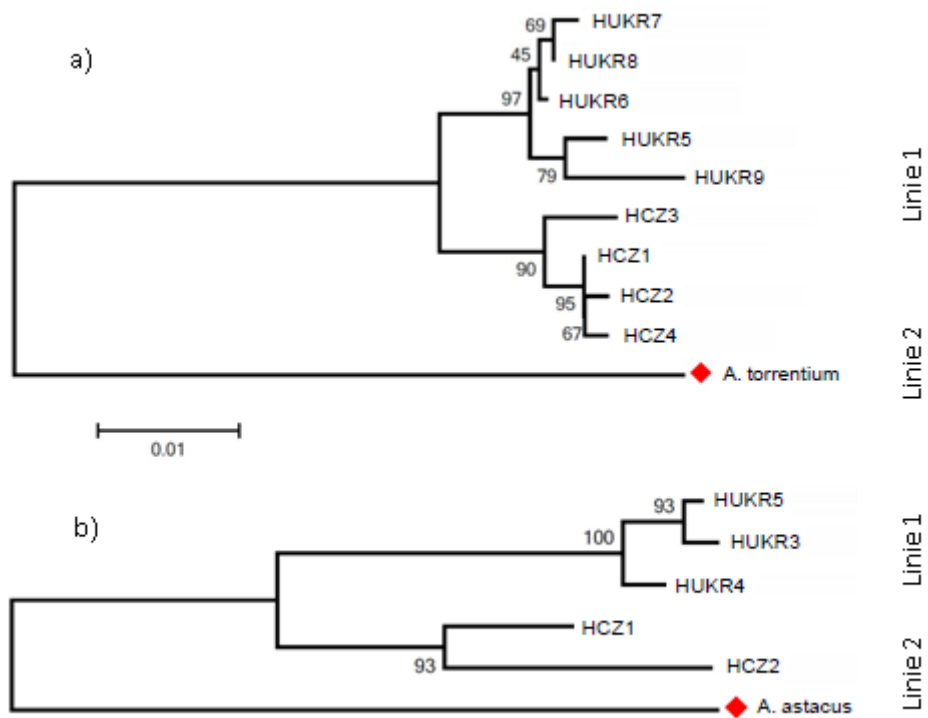
4.3 Fylogenetická analýza mitochondriálních genů

Topologie fylogenetických stromů zkonstruovaných za použití metody Neighbour joining (NJ) a Maximum likelihood (ML) byly totožné (Obrázek 2). Populace byli

klastrovány do dvou hlavních fylogenetických linií. Rozdíly mezi jednotlivými fylogenetickými liniemi představovaly 5,5 % pro COI a 2,6 % pro 12S rRNA. Rozdíly v rámci jednotlivých linií dosahovaly nižších hodnot. U 12S rRNA byla divergence uvnitř linie 1 0,6 %, a pro linii 2 činila 0,3 %. U genu COI dosahovala divergence uvnitř linie 1 0,5 % a uvnitř linie 2 1 %. Hodnota divergence mezi outgroupem u 12S rRNA, kde byl použit rak kamenáč, činila 10,1 %. Pro gen COI dosáhla divergence 9,8 %, jako outgroup byl použit rak říční.

Tabulka 1 Přehled lokalit, haplotypů a holotypové diverzity raka bahenního.

Populace	12S			COI		
	Haplotypy	počet sekvencí	Hd	Haplotypy	počet sekvencí	Hd
Kozárovice	H 01	7	0,607	H 01	3	0,500
	H 02	1		H 02	1	
	H 03	2				
Stodůlky	H 01	7	0,250	H 01	8	0,000
	H 04	1				
Řečice	H 01	1	1,000	H 01	1	0,667
	H 03	1		H 02	2	
Kosov	H 01	3	0,000	H 01	3	0,000
Mačkov	H 03	1	0,000	H 02	2	0,000
Stanislav (Ukrajina)	H 05	1	0,866			0,733
	H 06	2		H 03	1	
	H 07	1		H 04	2	
	H 08	1		H 05	3	
	H 09	1				



Obrázek 2 Fylogram detekovaných haplotypů zkonstruovaný metodou NJ a ML. a) 12S rRNA, b) COI.

5. Diskuze

5.1. Výskyt raka bahenního na území ČR

Jedním z možných hlavních důvodů nepotvrzeného výskytu raka bahenního na 7 lokalitách, rybnících, je pravděpodobně rybářské hospodaření a s ním spojené sezónní výlovy rybníků. Obecně meliorační zákroky rybářů na rybnících, jako jsou vápnění, zimování, letnění, v případě výskytu jakéhokoliv druhu raka mají na jeho populaci devastující vliv (Štambergová a kol., 2009). Tuto situaci dokresluje stav na lokalitě kaskáda rybníků pod Pravonínem, kde byl dokladovaný výskyt raka bahenního, ale rybník byl vypuštěn a podle rostoucí vegetace na dně, již delší dobu.

Dalším běžným důvodem vymizení populací původních druhů raků je přítomnost nepůvodních druhů přenašečích původce onemocnění račího moru, *Aphanomyces astaci* (Oidtmann, 2000; Jussila a kol., 2011; Schrimpf a kol., 2012; Filipová a kol., 2013). Ačkoliv je toto onemocnění pro původní druhy raků doslova likvidační, tak právě u raka bahenního bylo zjištěno zotavení populace v tureckých jezerech i po nákaze račím morem (Kokko a kol., 2012). Dále bylo dokonce popsáno přežití raka kamenáče (*Austropotamobius torrentium*) infikovaného *A. astaci* ve Slovinsku (Kusar a kol., 2013). Nicméně možnost vymizení raka bahenního ze vzorkovaných lokalit v rámci ČR z důvodu račího moru je nepravděpodobná, i když ji nemůžeme stoprocentně vyloučit. Na těchto lokalitách však nebyl zjištěn výskyt nepůvodních druhů raků. Je tak zřejmé, že snížení lokalit s uváděným výskytem je logickým vyústěním stylu hospodaření na rybnících využívaných k chovu ryb. Jsou to právě lokality typu zatopeného lomu či pískovny, kde byl a je výskyt raka bahenního opakovaně potvrzován. Zde raci dlouhodobě přežívají bez větších problémů a úspěšně se zde také rozmnožují.

5.2. Genetická diverzita raka bahenního

V současné době existuje pouze jediná zmínka o genetické diverzitě raka bahenního (Maguire a kol., 2012). Na území České republiky je genetická diverzita vyjádřená počtem haplotypů či genetickou divergencí spíše nízká (Tabulka 1). Jako hlavní důvod připadá v úvahu zejména omezené množství raků, kteří byli na naše území introdukováni na konci 19. století (Štěpán, 1932; 1933; Lohninský 1984). Lze tedy předpokládat, že na území ČR bude diverzita nižší než v porovnání s celým areálem

výskytu, či v porovnání výrazně vzdálených populací jako v případě zmínky Maguire a kol. (2012). Překvapivé bylo zjištění existence dvou dobře oddělených fylogenetických linií (divergence mezi liniemi 5,5 % COI a 2,6 % 12S rRNA). Tyto linie, nazývané evropská a asijská, popisuje také Maguire a kol. (2012). Námi zjištěné divergence mezi dvěma detekovanými liniemi v rámci mé bakalářské práce odpovídají hodnotám uváděným Maguire a kol. (2012) pro gen COI (4,22 – 8,25 %). Druhá linie byla tvořena populací ze Stanislavi, která má původ na Ukrajině. To vysvětluje výrazné rozdíly mezi touto populací a zbytkem analyzovaných jedinců, kteří pochází pravděpodobně z prvního nasazení na konci 19. století.

V porovnání s ostatními druhy raků v Evropě je divergence sekvencí COI genu z naší studie (5,5 %) podobná divergencím v rámci druhu raka bělonohého (*Austropotamobius pallipes*; 6 %) či raka kamenáče (*A. torrentium*; 4 %); (Trontejl a kol., 2005)

Haplotypová diverzita v rámci lokality Řečice byla vysoká ($Hd=1$; 12S rRNA a $Hd=0,667$; COI), ovšem je to výsledek analýzy pouze dvou (12S) či tří jedinců (COI), kteří měli odlišné haplotypy (Tabulka 1). Naopak u jedinců z lokality ze Stanislavi (Ukrajina) je vysoká diverzita výsledkem analýzy více jedinců (6) s vyšším počtem dosažených haplotypů (5 pro 12S rRNA; 3 pro COI). Právě zjištění pravého původu jedinců z této populace dává jasnou odpověď na vyšší diverzitu v porovnání s našimi ostatními populacemi.

5.3 Druhový komplex raka bahenního

Zajímavosti raka bahenního plynou z nejasností kolem počtu druhů či morfologických forem. Skupina autorů řadí tento druh do samostatného rodu *Pontastacus* (Bott, 1950), který obsahuje velké množství druhů či poddruhů (Brodski, 1983; Starobogatov, 1995). Jiná skupina autorů (Gherardi a Holdich, 1999; Taylor, 2001; Souty-Grosset, 2006) uvádí pouze název rak bahenní *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 a kupříkladu Holdich (2002) používá pro tyto morfologicky podobné jedince název druhový komplex raka bahenního. Právě použití molekulárních metod dává jedinečnou možnost rozklíčovat vztahy v rámci tohoto druhového komplexu, pokud použijeme označení Holdicha (2002).

Velikost divergence v rámci všech sekvencí pro oba geny činila X (COI) a X (12S rRNA). Divergence mezi dvěma hlavními liniemi v rámci analyzovaných populací

dosahovala 5,5 % pro COI a 2,6 % pro 12S rRNA. Tyto hodnoty odpovídají běžné mezidruhové divergenci pro 12S rRNA u různých druhů korýšů: například 2,5 – 3,5 % (buchanky rodu *Acanthocyclops*; Bláha a kol., 2010) či 0,3 – 7,2 % (perloočky rodu *Daphnia*; Petrusek a kol., 2007, Mergeay a kol., 2005). Také pro gen COI jsou tyto hodnoty v rámci vnitrodruhových divergencí ostatních druhů raků (raka kamenáče a raka bělonohého; Trontejl a kol., 2005). Velikost divergence indikující existenci možného dalšího druhu raka jsou zpravidla vyšší, dosahující hodnot nad 10 % (Trontejl a kol., 2005). Tomu odpovídá divergence mezi sekvencemi raka bahenního a outgroupy. V případě genu 12S rRNA činily rozdíly se sekvencí raka kamenáče 10,1 %, v případě genu COI dosahovala divergence 9,8 % se sekvencí raka říčního.

5.4 Možný důvod vzniku dobře definovaných linií

Jedno z vysvětlení pro získanou genetickou diferenciaci mezi dvěma zjištěnými fylogrupami raka bahenního, pocházejícími ze střední Evropy a Ukrajiny, lze hledat v dávné historii utvářející současné rozšíření druhů nejen raků na území Evropy. Hlavním faktorem modelujícím recentní rozšíření druhů byly nepříznivé klimatické podmínky během doby ledové (Hewitt 1999). Z prapůvodní oblasti rozšíření raka bahenního byly jeho populace vytlačeny vlivem doby ledové k jihu, či do oblastí s mírnějším klimatem umožňující přežití. Existence dvou poměrně dobře definovaných linií může naznačovat existenci dvou glaciálních refugií v průběhu poslední doby ledové. Umístění těchto refugií by mohlo být vzhledem k popsané vysoké morfologické diverzitě (Starbogatov, 1995) a přirozenému areálu výskytu raka bahenního v oblasti Černého či Kaspického moře. Po překonání nepříznivých klimatických podmínek v oblastech, které byly od sebe izolovány, se začali jedinci z těchto skupin od sebe geneticky rozcházet (Hewitt 1999). Pro úplné objasnění taxonomie a fylografické historie těchto původních evropských raků je zapotřebí provést analýzu většího počtu populací z celé oblasti rozšíření komplexu druhu *A. leptodactylus*, spolu s analýzou jaderných molekulárních markerů.

6. Závěr

V této práci jsem se zabýval molekulárními metodami, které slouží ke studiu genetické diverzity druhů obecně. Aplikoval jsem je na populace raka bahenního z území České republiky. Analyzovány byly dva mitochondriální geny kódující COI a 12S rRNA. Zjištěná haplotypová diverzita na všech vytipovaných lokalitách byla spíše nízká, výjimku tvořili populace Řečice, Stanislav (Ukrajina) a Kozárovice. U obou genů byly detekovány dvě velmi dobře definované fylogenetické linie. Divergence mezi těmito liniemi dosahovali hodnot 5,5 % pro COI a 2,6 % pro 12S rRNA. Tyto hodnoty nenapovídají o existenci dalšího druhu, spíše odrážejí hlubší historii a možnou existenci dvou glaciálních refugií. Ovšem pro potvrzení této domněnky je nutné analyzovat větší množství jedinců z více populací napříč celým areálem rozšíření tohoto druhu.

7. Seznam použité literatury

- Alekhovich, A., Kulesh, V., (1996). Comparative analysis of reproduction of narrow-clawed crayfish, *Astacus leptodactylus* Esch. (Crustacea: Decapoda: Astacidae), in its eastern areas. *Freshwater Crayfish* 11, 339-347.
- Balik, I., Cubuk, H., Özkök, R., Uysal, R., (2005). Some biological characteristics of crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) in Lake Eğirdir. *Turk. J. Zool.* 29, 295-300.
- Bláha, M., Hulák, M., Slouková, J., Těšitel, J., (2010). Molecular and morphological patterns *Acanthocyclops vernalis-robustus* species complex (Copepoda, Cyclopoida). *Zool. Scr.* 39, 259-268.
- Bott, R., (1950). Die Flusskrebse Europas (Decapoda, Astacidae). *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft* 483, 1-36.
- Braband, A., Kawai, T. a Scholtz, G., (2006). The phylogenetic position of the East Asian freshwater crayfish *Cambaroides* within the Northern Hemisphere Astacoidea (Crustacea, Decapoda, Astacida) based on molecular data. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 44(1), 17-24.
- Brodski, S.Y., (1983). On the systematics of palaeartic crayfishes (Crustacea, Astacidae). *Freshwater Crayfish* 5, 464-469.
- Crandall, K. A., Buhay J. E., (2008). Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae and Parastacidae-Decapoda) in freshwater. *Hidrobiologica* 595, 295-301.
- Crandall K. A., Harris D. J. a Fetzner W. Jr (2000). The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *P. R. Soc. London* 267, 1679-1686.
- Crandall, K.A., Fitzpatrick, J.F., (1996). Crayfish molecular systematic: Using a combination of procedures to estimate phylogeny. *Systematic Biol.* 45, 1-26.
- Crandall, K.A., Lawler, S.H., Austin, C., (1995). A preliminary examination of the molecular phylogenetic relationships of the crayfish genera of Australia (Decapoda: Parastacidae). *Freshwater Crayfish* 10, 18-30.
- De Grave, S., Pentcheff, N.D., Ahyon, S.T., Chan, T.Y., Crandall, K.A., Dworschak, P.C., Felder, D.L., Feldmann, R.M., Franssen, Ch.H.J.M., Goulding, L.Y.D., Lemaitre, R., Low, M.E.Y., Martin, J.W., Ng, P.K.L., Schweizer, C.E., Tan, S.H., Tshudy, D., Wetzer, R., (2009).

- A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology* 21, 1-109.
- Dolný, A., Ďuriš, Z., (2001): Výskyt ohrožených bezobratlých na důlních odkalištích v Karviné. - *Živa*, 6, 268-270.
- Dyk, V., (1953). Hospodářská hodnota raka říčního a bahenního. Sborník Československé akademie zemědělských věd (řada B) XXVI (1-2), 143-148.
- Edgar, R.C., (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5), 1792-97.
- Fetzner, J.W., Crandall, K.A., (1999). Genetic variability within and among populations of the golden crayfish (*Orconectes luteus*): A comparison using amplified fragment length 44 polymorphisms (AFLPs) and mitochondrial 16S gene sequences. *Freshwater Crayfish* 12, 396-412.
- Filipová, L., Kozubíková, E., Petrusek, A., (2009). Allozyme variation in Czech populations of the invasive spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* (Cambaridae). *Knowl. Manag. Aquat. Ec.* 10, 394-395.
- Filipová, L., Petrusek, A., Matasová, K., Delaunay, C., Grandjean, F., (2013). Prevalence of the Crayfish Plague Pathogen *Aphanomyces astaci* in Populations of the Signal Crayfish *Pacifastacus leniusculus* in France: Evaluating the Threat to Native Crayfish. 8(7): 70157.
- Fornůsková, A., (2007). Mikrosatelity a jejich využití při studiu genetické struktury populací netopýrů. Masarykova Univerzita v Brně, s. 3-8.
- Gherardi, F., Holdich, D. M., (1999). Native and alien crayfish in Europe: an introduction. In: Eds F. Gherardi, D. M. Holdich. *Crustacean. Iss. : How to make the best of a bad situation.* 3-9. Rotterdam.
- Gouin, N., Grandjean, F., Pain, S., Souty-Grosset, C., Reynolds, J., (2003). Origin and colonization history of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes*, in Ireland. *Heredity* 91, 70-77.
- Grandjean, F., Harris, D.J., Souty-Grosset, C., Crandall, K.A., (2000). Systematics of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae). *J. Crustacean Biology* 20, 522-529.

- Grandjean, F., Souty-Grosset, C., (2000). Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes pallipes*. *Conserv. Genet.* 1. 309-319.
- Grandjean, F., Souty-Grosset, C., Raimond, R., Holdich, D.M., (1997). Geographical variation of mitochondrial DNA between populations of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Fresh. Biol.* 37, 493-501.
- Hancock, J.M., (1995). The contribution of slippage-like processes to genome evolution. *J. Mol. Evol.* 41(6), 1038-1047.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T., (1985). „Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA“. *J. Mol. Evol.* 22(2), 160-174.
- Hewitt, G.M., (1999). Post-glacial recolonization of European biota. *Biol. J. Linn. Soc.* 68, 87-112.
- Holdich D. M., (2002a). Background and Functional Morphology. In: Holdich D. M. (ed.): *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science Ltd, London, 3-27.
- Holdich, D. M., (2002b). Distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries. *B. Fr. Peche. Piscic.* 367, 611-650.
- Holdich, D.M., Haffner, P., Noël, P., Carral, J., Föderer, L., Gherardi, F., Machino, Y., Madec, J., Pöckl, M., Smietana, P., Taugbol, T., Vigneux, E., (2006). Species files. Atlas of crayfish in Europe. Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P., Reynolds, J.D., Haffner, P. (eds), 49-130. Publications Scientifiques du MNHN, Paris.
- Holdich, D.M., Reynolds, J.D., Souty-Grosset, C., Sibley, P.J., (2009). A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.* 11, 394-395.
- Horká, I., (2006): *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 - rak bahenní. - In: J. Mlíkovský & P. Stýblo (eds.). *Nepůvodní druhy fauny a flory České republiky*. ČSOP. 229-231. Praha.
- Hudec, I., (1994): Rozšírenie rakov (Crustacea, Decapoda) na východnom Slovensku. - Zborník Východoslovenského múzea v Košiciach, *Prírodné vedy*, 35, 9-14. Košice.
- Hulák, M., (2008). Molekulárne základy biológie a genetiky v rybárstve, VÚRH JU, Vodňany, 80-110.

- Hulák, M., Kašpar, V., Flajšhans, M., Linhart, O., (2006). Využití molekulárních metod a DNA markerů v genetice ryb – přehled, Bulletin VÚRH JU, Vodňany, 69-73.
- Chistiakov, D., Hellemans, B., Volckaert, F., (2005). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255, 1-29.
- Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H., Brow, M.A.D., (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 8, 9436-9440.
- Ipsier, J., (2006). Genetika. UJEP, Ústí nad Labem, s. 185-189.
- Jarne, P., Lagota, P.J.L., (1996). Microsatellites, from molecule to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11(10), 424-429.
- Jussila, J., Makkonen, J., Vainikka, A., Kortet, R., Kokko, H., (2011). Latent crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) infection in a robust wild noble crayfish (*Astacus astacus*) population. *Aquaculture*. 321, 17-20.
- Kohlmann, K., Luczynski, M., (2000). Genetic control of Glucosephosphate Isomerase (GPI) in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Hered.* 91, 400-402.
- Kokko, H., Koistinen, L., Harlioglu, M.M., Makkonen, J., Aydin, H., Jussila, J., (2012). Recovering Turkish narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) populations carry *Aphanomyces astaci*. *Knowl. Manag. Aquat. Ec. Issue: 404 Article Number: 12 DOI: 10.1051/kmae/2012006*.
- Köksal, G., (1988). *Astacus leptodactylus* in Europe. In: Holdich, D.M., Lowery, R.S. (Eds), *Freshwater Crayfish, Biology, Management and Expolitation*. Croom Helm Ltd., London, pp. 365-400.
- Kovačeva, N., (1998). Reprodukce raka bahenního (*Astacus leptodactylus* Esch.) v řízených podmínkách v Bulharsku. *Bulletin VÚRH Vodňany* 30(3), 103-108.
- Kozák, P., Polícar, T., Kouba, A., Buřič, M., Ďuriš, Z., (2009). Problematika reintrodukcí a hospodářského využití původních druhů raků v Evropě, realita a perspektivy v ČR. *Bulletin VÚRH JU, Vodňany* 25-33.

- Kozák, P., Polícar, T., Kouba, A., Buřič, M., Ďuriš, Z., Petrusek, A., Horká, I., Kozubíková, E., (2013). Biologie a chov raků. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, 19-51.
- Kušar, D., Vrezec, A., Očepek, M., Jenčič, V., (2013). *Aphanomyces astaci* in wild crayfish populations in Slovenia: first report of persistent infection in a stone crayfish *Austropotamobius torrentium* population. Dis. Aquat. Org. 103, 157-169.
- Librado, P., Rozas, J., (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data Bioinformatics 25, 1451-1452.
- Litt, M. and Luty, J.A., (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Genet. 44, 397-401.
- Lohnický, K., (1984). Rozlišení raků ve východních Čechách a jeho změny v posledních desetiletích. Zpravodaj Krajského Muzea východních Čech v Hradci Králové 11, 5-28.
- Maquire, I., Podnar, M., Jelić, M., Štambuk, A., Schrimpf, A., Schulz, H., Klobučar, G., (2012). First report on the phylogenetic relationship between European and Asian populations of the *Astacus leptodactylus* species complex. In: Füreder L. Book of abstracts. 19th meeting of IAA (international association of astrology). 41. Innsbruck.
- Mergeay, J., Verschuren, D., De Meester, L., (2005). Cryptic invasion and dispersal of an American *Daphnia* in East Africa. Limnol. Oceanogr. 50, 1278-1283.
- Nei, M., Maruyama, T., Chakraborty, R., (1975). Bottleneck effect variability in populations. Evolution 29, 1-10.
- Oidtmann, B., (2000). Diseases in freshwater crayfish. In: Rogers, D., Brickland, J. (Eds), Crayfish conference Leeds, Proceedings of the Crayfish Conference, Leeds, Velká Británie, pp. 9-18.
- Paaver, T., (1983). Biochemical genetics of the common carp (*Cyprinus carpio*L.) Valgus, Tallinn.
- Pedraza-Lava, C., Alda, F., Carranza, S., Doadrio, I., (2010). Mitochondrial DNA structure of the Iberian populations of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius italicus italicus* (Faxon, 1914). Mol. Phylogenet. Evol. 57, 327-342.
- Pešek, P., (2013). Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze.

- Petrusek, A., Černý, M., Mergeay, J., Schwenk, K., (2007). *Daphnia* in the Tatra Mountain lakes: multiple colonisation and hoden species diversity revealed by molecular markers. *Fund. Appl. Limnol.* 169, 279-291.
- Pöckl, M., Pekny, R., (2002). Interaction between native and alien species of crayfish in Austria: Case studies. *B. Fr. Peche. Piscic.* 367. 763-776.
- Pöckl, M., Holdich, D.M., Pennerstorfer, J., (2006). Identifying native and alien crayfish species in Europe. European Project CRAYNET 47s.
- Řehout, V., Čítek, J., Hradecká, E., (2005). *Genetika II.* JCU, České Budějovice, 119-129.
- Řehout, V., Čítek, J., Sáková, L., (2000). *Genetika I. (Úvod do studia genetiky)*, JCU, České Budějovice, 12-168.
- Scholtz, G., (2002): Phylogeny and Evolution. In: D.M. Holdich (ed.). *Biology of Freshwater Crayfish.* Blackwell Science Ltd. 30-52. Oxford.
- Schrimpf, A., Parvulescu, L., Copilas-Ciocianu, D., Petrusek, A., Schulz, R., (2012). Crayfish plague pathogen detected in the Danube Delta – a potential threat to freshwater biodiversity in southeastern Europe. *Aquatic Invasions* 4, 503–510.
- Skurdal, J., Taugbøl, T., (2002). *Astacus.* In: *Biology of Freshwater Crayfish.* Holdich D.M. (ed.), 467-510. Blackwell Science Ltd., London.
- Soroka, M., (2008). Application of mitochondrial DNA in the identification of diverse crayfish species. *Polish Journal of Natural Sciences*, Vol. 23(3), 624-634.
- Souty-Grosset, C., Grandjean, F., Raimond, R., Frelon, M., Debenest, C., Bramard, M., (1997). Conservation genetics of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*: The usefulness of the mitochondrial DNA marker. *B. Fr. Peche. Piscic.* 347, 677-692.
- Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noel, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P., (2006). Atlas of crayfish in Europe. *Mus. Natl. Hist. (Patrimoines Naturels)*. 64, 187. Paris.
- Stallings, R.L., (1994). Distribution of trinucleotide microsatellites in different categories of mammalian genomic sequence: implications for human genetic diseases. *Genomics* 21, 116-121.

- Starobogatov, Y.I., (1995). Taxonomy and geographical distribution of crayfishes of Asia and East Europe (Crustacea, Decapoda, Astacoidei). *Arthropoda Selecta* 4(3/4), 3-25.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., (2005). *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita v Brně. ISBN 80-210-3841-1.
- Štambergová, M., Svobodová, J., Kozubíková, E., (2009): *Raci v České republice*. - 1. vydání. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR. Praha. - 255 s.
- Štěpán, V. J., (1934): Výsledky chovu raků v rybnících za poslední léta. - *Československý rybař*, 14, 1, 4-5. České Budějovice.
- Štěpán, V.J., (1932-33). Soudobý stav rakařství v Čechách. *Československý rybař*, 20 s.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipi, A., Kumar, S., (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evo.* 30, 2725-2729.
- Tautz, D., (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17, 6463-6471.
- Taylor, C.A., Hardman, M., (2002). Phylogenetics of the crayfish subgenus *Crockerinus*, genus *Orconectes* (Decapoda: Cambaridae), based on cytochrome oxidase I. *J. Crustacean Biol.* 22, 874-881.
- Taylor, C. A., (2011). Taxonomy and conservation of native crayfish stocks. In: Ed. D. M. Holdich. *Biology of Freshwater Crayfish*. 236—257. Oxford.
- Trontelj, P., Machino, Y., Sket, B., (2005). Phylogenetic and phylogeographic relations hips in the crayfish genus *Austropotamobius* in ferred from mitochondrial COI gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34, 212-226.
- Weber, & May, (1989). Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 388-396.
- Zardoya, R., Doadrio, I., (1999). Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European Cyprinids. *J. Mol. Evol.* 49, 227-37.
- Žurovec, M., a kol., (1999). Soubor materiálů k předmětu metody molekulární biologie, JCU, České, 1-60.

Abstrakt

Rak bahenní (*Astacus leptodactylus*) byl na naše území introdukován na počátku 19. století. Zdrojové populace pocházeli z oblasti Haliče (Polsko). Cílem této práce bylo kromě osvojení si molekulárních metod, vzorkování vybraných populací a zjištění genetické diverzity na těchto populacích v rámci České republiky. Výskyt byl zjištěn na šesti z třinácti vytipovaných lokalit. Analyzováno bylo celkem 30 jedinců z šesti populací. Zkoumána byla diverzita mitochondriálních genů COI a 12S rRNA. Haplotypová diverzita pro oba geny byla nejvyšší v populaci Řečice (12S: Hd=1,000; COI: Hd=0,667), Stanislav (Ukrajina) (12S: Hd=0,866; COI: 0,733) a Kozárovice (12S: Hd=0,607; COI: Hd=0,500). Naopak existence pouze jednoho haplotypu byla zjištěna pro oba studované geny v populacích Kosov, Mačkov a Stodůlky. Divergence sekvencí pro 12S rRNA činila 1 %, pro COI 2 %. Topologie fylogenetických stromů byla totožná pro oba dva studované geny s existencí dvou dobře definovaných fylogenetických linií. Jedna z linií byla tvořena pouze jedinci (haplotypy) z populace ze Stanislavi (Ukrajina). Druhá pak obsahovala zbylé analyzované populace raka bahenního. Protože populace ze Stanislavi je z Ukrajiny, můžeme říci, že populace z východní Evropy jsou odlišné od populací na našem území, resp. populací z Polska, odkud byli raci bahenní na naše území přivezeni. Abychom mohli potvrdit tento trend, je třeba analyzovat větší počet jedinců a více populací z celého areálu výskytu raka bahenního.

Klíčová slova: *Astacus leptodactylus*, COI, 12S rRNA, genetická diverzita, fylogenetické vztahy, molekulární divergence

Abstract

The narrow-clawed crayfish was introduced to our country at the beginning of the 19th century. The population originally came from Galicia in Poland. The aim of this work was the sampling of chosen populations and the assessing genetic diversity at these locations in the Czech republic. The occurrence of crayfish was confirmed at 6 out of 13 chosen locations. Thirty specimens were analysed from 6 populations and the diversity of mitochondrial genes COI and 12S rRNA was evaluated. The haplotype diversity was highest for both genes in the Řečice population, (12S: Hd=1.000; COI: Hd=0.667), Stanislav (Ukrajina) (12S: Hd=0,866; COI: 0,733) and Kozárovice populations (12S: Hd=0,607; COI: Hd=0,500). On the other hand, the existence of only one haplotype was recorded for both respective genes in the Kosov, Mačkov and Stodůlky populations. The divergence of sequences for 12S rRNA and COI was 1 and 2%, respectively. The topology of phylogenetic tree was identical for both genes with the existence of two well defined phylogenetic lineages. One of the lineages was made up only out of the specimens (haplotypes) from the Stanislav (Ukraine) population. The other one contained the rest of the analysed populations of the narrow-clawed crayfish. The Stanislav (Ukraine) population comes originally from Ukraine, therefore it can be said that the populations from Eastern Europe are different from those at our country, or the populations from Poland, which is where the crayfish on the Czech Republic originated from. In order to confirm this trend, it would be necessary to analyze a larger number of specimens and more population from every area where this crayfish species occurs.

Key words: *Astacus leptodactylus*, COI, 12S rRNA, genetic diversity, fylogenetic relationship, molecular divergence