

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

**Genetická struktura populací lipana podhorního (*Thymallus thymallus*) v rybářsky obhospodařovaných řekách České republiky**

Bakalářská práce

**Dagmar Hucková**

Školitel: Ing. Miloš Havelka, Ph.D.

Školitel specialista: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.

České Budějovice 2015

## **Bakalářská práce**

Hucková, D., 2015: Genetická struktura populací lipana podhorního (*Thymallus thymallus*) v rybářsky obhospodařovaných řekách České republiky. [Genetic structure of European grayling (*Thymallus thymallus*) populations in the Czech rivers affected by fishery management. Bc. Thesis, in Czech.] – 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Annotation**

Populations of freshwater fish *Thymallus thymallus* are considerably affected by intensive human mediated stock transfer in the rivers of Central Europe. These activities cause exogenous genetic drift among populations from geographical isolated hydrological units. Genetic structure of 369 *T. thymallus* individuals of 21 populations from three river basins of the Czech Republic was studied based on analysing of both mtDNA (control region) et nuclear DNA (7 microsatellites loci) markers and the results were compared with similar studies from European region.

Výsledky byly získány za finanční podpory MŠMT projektu CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) a projektu CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I).

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala 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 diplomové 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.

V Českých Budějovicích, 24. 4. 2015

.....

Ráda bych poděkovala Milošovi a Blažkovi za jejich nekonečný humor, Ivance a Marušce za krásné zpříjemnění dlouhých dní v laboratoři a Martině Žurovcové za zapálený výklad, díky kterému se analýza dat stala detektivkou a sci-fi v jednom. Ale hlavně bych oběma svým školitelům chtěla poděkovat za odborné vedení a nekonečnou trpělivost.

## Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Biologie <i>T. thymallus</i> .....	1
1.2	Vliv člověka na ichtyofaunu ve vodních tocích.....	2
1.3	Dosavadní studie.....	3
2	Cíle práce.....	7
3	Materiál a metodika.....	8
3.1	Vzorkování.....	8
3.2	DNA izolace.....	9
3.3	Gelová elektroforéza.....	10
3.4	Amplifikace mikrosatelitních lokusů.....	10
3.5	Amplifikace kontrolní oblasti mtDNA.....	12
3.6	Purifikace PCR produktu.....	12
3.7	Analýza dat.....	13
3.7.1	Mikrosatelity.....	13
3.7.2	mtDNA.....	14
4	Výsledky.....	15
4.1	Mikrosatelity.....	15
4.1.1	Charakteristika mikrosatelitních lokusů.....	15
4.1.2	Charakteristika analyzovaných populací.....	16
4.1.3	Genetická variabilita mezi populacemi.....	17
4.2	Kontrolní oblast mtDNA.....	23
5	Diskuze.....	26
5.1	Mikrosatelity.....	26
5.1.1	Charakteristika lokusů.....	26
5.1.2	Charakteristika populací.....	27
5.1.3	Genetická variabilita mezi populacemi.....	28

5.2	Kontrolní oblast mtDNA.....	29
5.3	Vliv rybářského managementu na analyzované populace .....	30
6	Závěr.....	32
7	Literatura .....	33
8	Přílohy .....	38

# 1 Úvod

## 1.1 Biologie *T. thymallus*

Lipan podhorní (*Thymallus thymallus*) se řadí do třídy Osteichthyes (kostnaté ryby), řádu Salmoniformes, čeledi Salmonidae (lososovití) a podčeledi Thymallinae (lipanovití; Kottelat 1997). *T. Thymallus* má poměrně široký areál rozšíření. Přirozeně se vyskytuje v řekách od Francie a Anglie na západě, přes Skandinávii až po Ural. Ve zbytku Evropy jej můžeme nalézt především v řekách Alpského pohoří (kde obývá i jezera), ale i v České Republice, Německu, Slovensku a Polsku, na jihu pak od Balkánského poloostrova okolo Černého a Kaspického moře po Ural. Introdukcí byl vysazen ve středním Španělsku, do některých jezer Finska a v jižním Skotsku (Northcote 1995).

Tato sladkovodní ryba dorůstá do 35 - 40 cm a hmotnosti 1 kg a řadí se k rychle rostoucím a krátkověkým rybám (dožívá se 3 – 5 let). Štíhlé a torpédovité tělo je pokryté středně velkými šupinami (Lusk *et al.* 1987). Mladí jedinci jsou stříbřití s tmavším hřbetem a bílým břichem. Dospělí jedinci mají hřbet šedozelený až do modra, celkové zbarvení působí jako duhově a na bocích jsou výrazné černé skvrny. V době tření se zbarvení samců zintenzivňuje. Typickým znakem *T. thymallus* je vysoká, pestře zbarvená hřbetní ploutev. U samců bývá tato ploutev ostře černočerveně zbarvená a její konec je výrazně protáhlejší. Ocasní ploutev je černohnědá a výrazně vykrojená a mezi ní a hřbetní ploutí můžeme nalézt červenofialovou tukovou ploutvičku. Prsní ploutve bývají narůžovělé a břišní žluté až šedé. Na menší hlavě jsou velké oči a malá ústa se spodním postavením (Baruš *et al.* 1995).

*T. thymallus* patří mezi chladnomilné ryby a má vysoké nároky na obsah kyslíku ve vodě (Lusk *et al.* 1987). Řadí se do skupiny reofilních ryb, to znamená, že se vyskytuje v rychleji proudících tocích (Kubečka *et al.* 2013). Nevyžaduje úkryty, spíše vyhledává otevřenější místa, v průběhu roku si většinou vystačí v úseku řeky o délce do 200 metrů. Zdržuje se ve větších či menších hejnech, jen největší jedinci žijí samotářsky a chovají se teritoriálně (Baruš *et al.* 1995).

*T. thymallus* se z hlediska reprodukční strategie řadí do skupiny ryb litofilních (Balon 1975). Během rozmnožování vyhledává čistý kamenitý substrát nebo hrubý štěrk, popřípadě drobné oblázky, do kterých ukrývá své jikry (Baruš *et al.* 1995). Samci dospívají ve věku dvou let, samice o rok později (není to však pravidlem; Lusk *et al.* 1987). Rozmnožování probíhá zpravidla v období druhé poloviny dubna až první poloviny května. Začátek je ovlivněn

teplotou okolní vody (od 7 do 10 °C). V době rozmnožování nepodniká žádné delší migrace, pouze ojediněle se vydává hledat místa s teplejší vodou. Na místo, kde rozmnožování probíhá, migrují samci často jako první, aby obsadili a hájili tzv. třecí okrsky. (Baruš *et al.* 1995). Většinou si vybírají úseky řeky s vyšším proudem vody, samci se zde pak zdržují prakticky po celou dobu rozmnožování (obvykle 2-3 dny, ale i 6-12 dní) a poté migruje zpět do původního stanoviště (Lusk *et al.* 1987).

## 1.2 Vliv člověka na ichtyofaunu ve vodních tocích

Ichtyofauna České Republiky je druhově velice pestrá. Je to především díky tomu, že se na našem území nalézají tři úmoří – Severní moře (povodí Vltavy a Labe), Černé moře (povodí Moravy a Dunaje) a Baltské moře (Povodí Odry; Lusk *et al.* 2002). Nachází se zde důležité evropské rozvodí Kralický Sněžník, ze kterého se tato úmoří rozbíhají. Charakteristické pro hydrologickou síť naší republiky je skutečnost, že většina vodních toků zde pramení a odvádí svou vodu do okolních států (Lusk *et al.* 2011). Mezi původní druhy ichtyofauny se řadí celkem 55 druhů ryb a 4 druhy mihulí (Lusk *et al.* 2002).

Vliv člověka na ichtyofaunu v oblasti střední Evropy se začal projevovat už v období středověku, největší dopad mají však aktivity v posledních 100 letech (Lusk *et al.* 2002). Obecně se dá říci, že téměř všechny lidské zásahy na říčních tocích měly a mají nepříznivý vliv na stav ichtyofauny, ať už přímo nebo nepřímo (Lusk *et al.* 2002). Je potřeba si uvědomit skutečnost, že rybí společenstva velmi citlivě reagují na změny jejich prostředí. Mezi nejméně žádané zásahy na tocích se řadí například znečištění, eutrofizace, napřimování koryt řek, vodní díla (a s nimi související změny v průtokovém režimu) a likvidace porostů na březích. Na změny populační skladby mají vliv především zásahy do hydrologického režimu řek stavěním bariér, jako jsou jezy a balvanité skluzy. Populace tak čelí fragmentaci, omezení pohybu a dost často i znemožnění výskytu (Lusk *et al.* 2011).

S rozvojem transportních technik a metod umělého rozmnožování ryb se především na začátku 20. století začaly uměle vysazovat nepůvodní druhy těchto organismů (takto byl introdukován například druh *Salmo trutta* do Afriky nebo Jižní Ameriky), a to nejen do jinak obtížně dostupných lokalit (Vostradovský 2013). Naprostá většina introdukovaných ryb byla do našich řek zavlečena s úmyslem využít je pro umělou reprodukci a k rozšíření druhové bohatosti pro sportovní rybaření. Takovéto umělé rozšiřování nepůvodních druhů může být velice nebezpečné vzhledem k druhům původním (Lusk *et al.* 2002).

Na druhou stranu je umělou reprodukcí možné podpořit populace původních druhů z umělých chovů, to však má většinou degradující dopad z hlediska vnitrodruhové diverzity těchto populací, pokud tak není děláno s ohledem na původ generačních ryb (Lusk *et al.* 2002). Následkem toho je totiž kontaminace původních populací nepůvodními geny v daném povodí či toku. Nepůvodní jedinci odchovaní v akvakulturních chovech, kteří jsou vysazováni do toků, se navíc liší v mnoha ohledech od původních divokých populací (chováním, schopností adaptace, fenotypově, ale častěji právě genotypově; McGinnity *et al.* 2003). Takovéto rozdíly mají pak za následek snížení úrovně přežití oproti původním populacím, horší reprodukční schopnosti atd. Pokud někteří z těchto jedinců přežijí a zapojí se do přirozené reprodukce, dojde ke křížení původních a nepůvodních populací, což vede k celkovému zhoršení fitness a schopnosti adaptace původních populací na lokální podmínky prostředí (Weiss *et al.* 2002). Toto se u lososovitých ryb projeví výrazným snížením početnosti původních populací a to zpravidla i přes intenzivní vysazování za méně jak pět generací (McGinnity *et al.* 2003).

### 1.3 Dosavadní studie

První druhově specifické markery pro *T. thymalus* byly vyvinuty v letech 1999 a 2000 (Sušník *et al.* 1999; Sušník *et al.* 2000) a další byly postupně odvozovány od těch, které byly používány pro příbuzné lososovité druhy ryb. Genetická diverzita tohoto druhu byla studována jak pomocí molekulárních markerů jaderné DNA (Koskinen *et al.* 2001; Koskinen *et al.* 2002; Gum *et al.* 2003), tak mtDNA (Gross *et al.* 2001; Gum *et al.* 2005; Koskinen *et al.* 2000; Sušník *et al.* 2001; Weis *et al.* 2002).

Doby ledové významně ovlivnily druhy sladkovodních ryb a to především fragmentací jejich přirozeného prostředí a zánikem většiny jejich přirozených habitatů, díky čemuž vznikla spousta hydrologicky izolovaných populací. Ty, které přežily nepříznivé podmínky v glaciálních refugiích, byly nucené se velmi rychle přizpůsobovat měnícímu se prostředí. Působil na ně silný přirozený výběr a populace prošly „bottleneckem“. Během dob meziledových se pak mohly rozšiřovat díky nově tvořeným jezerům a řekám z tajících ledovců. Jelikož byly tyto populace rozšiřujícím se ledovcovým pokryvem ze severu (na severní polokouli) během dob ledových utlačovány směrem k rovníku, jejich následná disperze směřovala s ústupem ledovce zpět na sever do nově vznikajících habitatů (Hewitt 2004). Zakládaly populace nové, ale výrazně tím ztrácely svou genetickou variabilitu (tzv. efekt zakladatele). To je příčina skutečnosti, že jedinci směrem na jih jsou geneticky



variabilnější. Dalším vysvětlením může být skutečnost, že směrem na jih byly klimatické podmínky během dob ledových příznivější, jedinci zde měli mnohem větší šance na přežití a nečelili tak výrazným „bottleneckům“ (a s nimi spojenou ztrátou alel; Hewitt 1995).

Cílem populačně genetických studií sladkovodních ryb bylo především zjistit postglaciální směry jejich šíření, lokalizovat geograficky a evolučně oddělené populace a jejich hybridní zóny (např. Koskinen *et al.* 2000; Koskinen *et al.* 2002, Gum *et al.* 2005; Weiss *et al.* 2002; Marić *et al.* 2012). Dalším důvodem bylo studium dopadu lidské činnosti (především umělého posilování populací) na divoké populace a jejich genetickou strukturu (např. Sušnik *et al.* 2004; Gum *et al.* 2006).

Koskinen *et al.* (2000) ve své studii analyzovali pomocí metody polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) mtDNA 28 populací severní Evropy. Průměrná mezi-populační divergence (1,11-3,59%) mezi studovanými populacemi se ukázala být 10 krát vyšší než u obdobné studie založené na analýze mtDNA příbuzného druhu *T. arcticus* v Severní Americe (Redenbach *et Taylor* 1999). Koskinen *et al.* (2000) odhalili 27 haplotypů klastrovaných do tří fylogenetických linií (severovýchodní – Finsko, Estonsko a severozápadní Rusko; severozápadní/střední – střední Německo, Polsko a Fennoskandinávie; a jižní – přítoky Dunaje). Tyto tři hlavní linie ve své studii definovali i Gum *et al.* (2005), přičemž severozápadní/střední linii rozdělili na dvě podjednotky – první zahrnující populace z povodní Rýna a Anglie a druhou nacházející se ve střední a východní Evropě, na jihu Skandinávie a v Litvě. Gum *et al.* (2005) analyzovali 29 populací *T. thymallus* střední a severní Evropy, které byly vybrány s ohledem na oblasti s minimálním vlivem lidské činnosti. Tito autoři definovali v této oblasti 30 mtDNA haplotypů. Spolu s RFLP mtDNA analyzovali i 12 mikrosatelitních lokusů s průměrným počtem 3,5 alel na populaci a průměrnou očekávanou heterozygotností 0,39. Tady se jejich výsledky velmi podobaly se studií Koskinen *et al.* 2002, kde byl popsán stejný průměrný počet alel na populaci (viz níže).

Už Koskinen *et al.* (2000) naznačovali existenci několika glaciálních refugií, ve kterých populace *T. thymallus* přežily dramatické kolísání teplot v období pleistocénu. Předpokládali, že jedno se nacházelo na sever od Kaspické nížiny a mohlo přispívat ke kolonizaci Archangelské oblasti a odtud severozápadního Ruska, Estonska a Finska. Druhé refugium existovalo pravděpodobně ve střední Evropě a populace z něj kolonizovaly střední Německo, Dánsko, Polsko, Švédsko a Norsko (jižní a střední). Skutečnost, že třetí haplotypová linie, kterou Koskinen *et al.* (2000) v této studii definovali, sestávala výlučně z Dunajských populací, naznačovala existenci dalších refugií. Následně Koskinen *et al.* (2002) potvrdili existenci jižního refugia studií založenou na mikrosatelitních datech 14 populací ze severní a

4 ze střední Evropy. Bylo odhaleno blízké genetické seskupení populací ze Švédska, Norska, Dánska, Německa a Slovinska, což naznačuje, že populace *T. thymallus* ze severozápadní a střední Evropy byly odvozeny z jižních refugií. Weiss *et al.* (2002) předpokládali, že se tato refugia nacházejí v Dolním Porýní a v okolí Labe a populace z nich expandovaly směrem na sever, stejně jako na jih. Jako hlavní refugium, ze kterého byla kolonizována střední, východní a část jižní Evropy, bylo označováno Dunajské refugium (Koskinen *et al.* 2000; Weiss *et al.* 2002; Gum *et al.* 2005).

V poměrně nedávné studii zaměřené na objasnění genetického původu *T. thymallus* na západním Balkáně analyzoval Marić *et al.* (2012) 14 populací z Jadranského a Dunajského povodí. Použil k tomu jak kontrolní region mtDNA, tak 12 mikrosatelitních markerů. Odhalil 11 haplotypů; jeden Jadranský, jeden Alpský a zbytek haplotypů označil jako tzv. balkánskou linii. Populace vykazovaly vysokou genetickou diverzitu v porovnání s ostatními studii (Koskinen *et al.* 2002; Weiss *et al.* 2002; Gum *et al.* 2003; 2005), což naznačuje, že se jedná o významnou oblast z hlediska evropského genofondu *T. thymallus*. Obecně se jižní oblasti vyznačují vyšší diverzitou než ty severní, což podporuje i skutečnost, že populace jižního Bavorska byly výrazně geneticky rozmanitější než populace severního Bavorska (Gum *et al.* 2003). Přestože se populace severní Evropy zdají být geneticky méně bohaté a nebyl u nich evidován žádný latitudinální gradient genetické rozmanitosti, který by vyplýval z postglaciálního šíření, vykazují tyto populace značné genetické rozdíly i přes krátké geografické vzdálenosti (Koskinen *et al.* 2000).

Ve střední Evropě se jako první zabýval populační genetikou *T. thymallus* Gross *et al.* (2001). Analyzoval jak mitochondriální, tak nukleární geny (spolu se čtyřmi mikrosatelitními lokusy) u populací z Dunaje, Labe a Mohanu. Tato povodí vykazovala vysokou diverzifikaci odpovídající přírodnímu stavu geograficky oddělených populací.

Různorodost genotypových četností, vysoké hodnoty  $F_{ST}$  a vysoký počet specifických alel ukazovaly na významnou genetickou divergenci způsobenou dlouhodobou reprodukční izolací mezi třemi povodími severního Bavorska (dunajským, labským a rýnským), jak ve studii založené na analýze 20 mikrosatelitních lokusů popsali Gum *et al.* (2003). V souladu s předchozími studii také zaznamenali nízkou úroveň vnitro-populační diverzity v porovnání s diverzitou mezi jednotlivými populacemi a zároveň omezení toku genů mezi nimi. Naproti tomu celková diverzita použitých mikrosatelitních lokusů se ukázala být vysoká, v průměru 12,4 alel na lokus (Gum *et al.* 2003).

Jejich následující práce se zabývala populacemi střední Evropy, mezi kterými byly i některé z České republiky. Výsledky ukázaly nejméně čtyři velké mtDNA linie, které se

pravděpodobně vyvinuly během izolace v pleistocénu. V kontaktních zónách mezi povodími byl odhalen vysoký stupeň promíchání, který má pravděpodobně historický důvod (ledovce, staré říční spoje apod.). Z mikrosatelitních dat vyplynulo, že jsou říční systémy silně diferenciované a vykazují velké množství privátních alel (Gum *et al.* 2005). V navazující studii se Gum *et al.* (2006) zaměřili na kontaktní zóny povodí Dunaje, Rýna, Labe a Mohanu, kde potvrdili promíchanost jednotlivých mtDNA linií, a byla pozorována podstatná exogenní introgrese v místech, které byly populace ovlivňované vysazováním *T. thymallus* různého původu.

## **2 Cíle práce**

Cílem této práce bylo analyzovat genetickou strukturu populací lipana podhorního (*Thymallus thymallus*) v tocích České Republiky a na základě zjištěných výsledků dále posoudit vliv rybářského obhospodařování volných vod na genetickou strukturu populací tohoto druhu a určit míru narušení přirozené genetické variability hydrologicky oddělených populací.

## 3 Materiál a metodika

### 3.1 Vzorkování

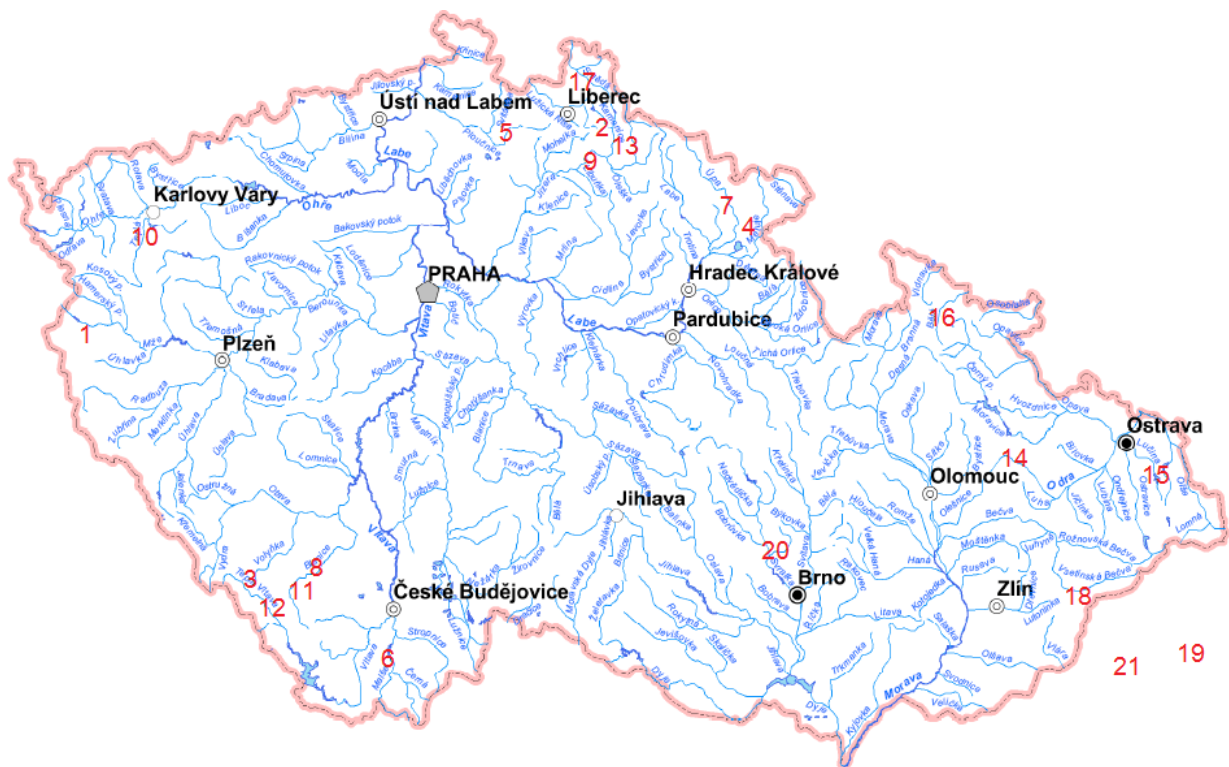
Celkem 369 jedinců druhu *T. thymallus* bylo vzorkováno v letech 2011 a 2012. Na pstruhových líhních byly vzorkovány generační ryby sloužící k reprodukci, popřípadě potomstvo z umělé reprodukce. Jedinci z řek byli chytáni za použití elektrického agregátu, tzv. elektrolov. Tato metoda je používána především kvůli své efektivitě v habitatech rychle proudících toků pstruhového a lipanového pásma. Po druhovém určení byla každému jedinci druhu *T. thymallus* odstřižena malá část prsní ploutve a ryby byly vypuštěny zpět do řeky. Takto získané vzorky byly uloženy do označených mikrozkušnic s 96% ethanolem.

Celkem 21 vzorkovacích lokalit bylo vybráno tak, aby pokryly všechna tři povodí České republiky – Oderské, Labské a Dunajské. K populacím reprezentujícím povodí Dunaje byly přidány dvě populace ze Slovenska, převážně pak populace Biely Potok, která reprezentuje významnou pstruhovou líheň. Seznam všech vzorkovaných lokalit a jejich charakteristika jsou uvedeny v Tabulce 1. Na Obrázku 1 je znázorněno rozmístění lokalit, čísla reprezentují populace v pořadí, v jakém jsou seřazeny v Tabulce 1.

**Tab. 1: Seznam vzorkovaných lokalit, příslušnost k jednotlivým povodím, geografická pozice a příslušnost k divokým populacím (D) nebo populacím z líhní (L).**

Číslo	Kód	Lokalita	Tok	Povodí	Geografická pozice		Status
1	TA	Tachov	Mže	Labe	49,797° N	12,623° E	L
2	HK	Horní Kamenice	Horní Kamenice	Labe	50,736° N	15,286° E	D
3	BL	Borová Lada	Vltava	Labe	48,984° N	13,662° E	L
4	MET	Hronov	Metuje	Labe	50,489° N	16,183° E	D
5	SVIT	Zákupy	Svitávka	Labe	50,690° N	14,655° E	D
6	MS	Skoronice	Malše	Labe	48,722° N	14,499° E	D
7	UPA	Trutnov	Úpa	Labe	50,549° N	15,977° E	D
8	HU	Husinec	Blanice	Labe	49,053° N	14,002° E	L
9	TU	Turnov	Jizera	Labe	50,613° N	15,195° E	D
10	TE	Bečov nad Teplou	Teplá	Labe	50,095° N	12,841° E	D
11	BN	Husinec	Blanice	Labe	49,035° N	13,960° E	D
12	VL	Lenora	Vltava	Labe	48,931° N	13,792° E	D
13	JI	Zlatá Olešnice	Jizera	Labe	50,691° N	15,321° E	D
14	OD	Libavá	Odra	Odra	49,715° N	17,587° E	D
15	ZE	Žermanice	Lučina	Odra	49,733° N	18,445° E	L

Číslo	Kód	Lokalita	Tok	Povodí	Geografická pozice	Status
16	JE	Jeseník	Bělá	Odra	50,236° N 17,204° E	L
17	SE	Raspenava	Smědá	Odra	50,901° N 15,129° E	D
18	UV	Ústí u Vsetína	Vsetínská Bečva	Dunaj	49,314° N 17,999° E	D
19	BP	Biely Potok	Revúca	Dunaj	49,040° N 19,297° E	L
20	SV	Tišnov	Svratka	Dunaj	49,334° N 16,423° E	D
21	GA	Gápel	Jasenina	Dunaj	48,913° N 18,490° E	L



Obr. 1: Mapa rozmístění vzorkovaných lokalit s číselným označením jednotlivých populací.

### 3.2 DNA izolace

Ze vzorků rybích ploutví a plůdků bylo nejprve nutno izolovat DNA. To bylo provedeno pomocí komerčního extrakčního kitu Nucleo Spin® Tissue (Macherey-Nagel, Německo).

Každý vzorek ploutve byl nejprve vysušen, rozstříhán na malé kousky a uložen do čisté mikrozkušavky. Do každé zkumavky bylo přidáno 180 µl lyzačního pufru T1 spolu s 20 µl proteinázy K (20 mg/ml). Mikrozkušavky byly uloženy do termobloku nastaveného na 56 °C a inkubovány. Po nejméně 3 hodinách (vzorky musely být zcela rozpuštěné) bylo do směsi přidáno 200 µl B3 pufru. Následovala další inkubace v termobloku při teplotě 70 °C a po

uplynutí 10 minut bylo do směsi přidáno 210  $\mu$ l 96% ethanolu. Po vortexování všech vzorků byla veškerá směs z každé mikrozkušavky přepipetována na filtrační kolonky Nucleo Spin, ve kterých byla centrifugována po dobu jedné minuty při 11 000 otáčkách za minutu. V dalším kroku byly kolonky promyty BW a B5 pufrů (500  $\mu$ l BW a 600  $\mu$ l B5). Po promytí byly kolonky znovu centrifugovány, aby se odstranil zbytek vymývacích pufrů z filtrační křemíkové membrány. Suché kolonky byly umístěny do čistých mikrozkušavek a po přidání 100  $\mu$ l elučního pufru BE předehřátého na 70 °C opět centrifugovány. Extrahovaná DNA byla uskladněna v mrazáku při teplotě do -20 °C.

### 3.3 Gelová elektroforéza

Kvalita extrahované DNA byla kontrolována pomocí gelové elektroforézy za použití 1,2% agarózového gelu. Směs 1,2 g agarózy a 98,8 ml 0,5x TBE pufru (zásobní roztok na 1 l: 54 g Tris, 27,5 g kyseliny borité a 20 ml 0,5 M EDTA) byla ohřívána v mikrovlnné troubě a následně zchlazena pod tekoucí vodou. Po dostatečném ochlazení bylo přidáno 5  $\mu$ l GoldView (Guangzhou Geneshun Biotech Ltd., Čína) sloužící pro vizualizaci DNA fragmentů v gelu. Rozpuštěný gel byl přelit do formy, kde se ponechal do úplného ztuhnutí.

Následně byl každý vzorek nanesen na gel v poměru 3  $\mu$ l vzorku DNA a 2  $\mu$ l nanášecího pufru „Loading dye“ (TaKaRa Bio Inc., Japonsko). Gelová elektroforéza běžela při napětí 100 V po dobu 45 minut. Poté byla vizuálně zkontrolována přítomnost a kvalita DNA pod UV zářením o vlnové délce 300 nm.

### 3.4 Amplifikace mikrosatelitních lokusů

Pro analýzu bylo použito celkem 7 mikrosatelitních lokusů, které byly již dříve vyvinuty a testovány na druhu *T. thymallus*, a to: *Bfro 005*, *Bfro 013*, *Bfro 015*, *Bfro 018* (Sušník *et al.*, 1999), *Bfro 010* (Sušník *et al.*, 2000) a *One 2*, *Ogo 2* (Gross *et al.* 2001). Přehled základních charakteristik vybraných primerů je v Tabulce 2.

**Tab. 2: Seznam použitých primerů, jejich sekvencí a délkou.**

Lokus	Orientace	Délka	Sekvence primerů (5' → 3')
<i>Bfro 010</i>	přímý	18	GGACGGAGCCAGCATCAC
	zpětný	24	GTTTGCCCCCAGGTTATCATAGCT
<i>Bfor 015</i>	přímý	24	GA CTCAGTGAAGA ACTAAAGTACA
	zpětný	26	GTTTGAAAAGTTATGAAGGTCAACCC
<i>Bfro 018</i>	přímý	20	AGAGGGGTCCAGCAACATCA
	zpětný	24	GTTTGGGGAACCAGTCTAAAGCCT
<i>Bfro 013</i>	přímý	23	GATGTAGTTGCATTGCTTGCTCT
	zpětný	27	GTTTGGCTTTACCATTATCATATGAGC
<i>Bfro 005</i>	přímý	20	CGCATCTGTATGAAAAACCT
	zpětný	24	GTTTTGGTTTGGTAGGAGTTTCGT
<i>Ogo 2</i>	přímý	20	ACATCGCACACCATAAGCAT
	zpětný	26	GTTTCGACTGTTTCCTCTGTGTTGAG
<i>One 2</i>	přímý	23	GGTGCCAAGGTTTCAGTTTATGTT
	zpětný	23	CAGGAATTTACAGGACCCAGGTT

Byla připravena reakční směs v následujícím poměru: 5 µl zásobního roztoku PPP Mastermix (TopBio, ČR) o následujícím složení - 150 mM Tris-HCl, 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva, 2,9 µl destilované H<sub>2</sub>O a 0,3 µl od každého z primerů. Do jednotlivých kolonek PCR platíčka bylo pipetováno 8,5 µl směsi a 1,5 µl vzorků DNA. Příprava probíhala na šupinkatém ledu. Platíčka byla vložena do T3 termocyklieru Biometra (Whatman Biometra, Německo). Parametry PCR profilu jsou uvedeny v Tabulce 3.

**Tab. 3: PCR profil pro amplifikaci mikrosatelitních lokusů.**

	Iničiační denaturace	Denaturace*	Nasedání*	Elongace*	Finální elongace	Počet cyklů
Teplota (°C)	95	95	55	72	72	25
Čas (s)	180	60	45	60	300	

Úspěšnost PCR amplifikace byla zkontrolována pomocí gelové elektroforézy (viz 3.3) za použití 1,5% agarózového gelu po dobu 30 minut. Amplifikované fragmenty byly následně analyzovány pomocí automatického kapilárového sekvenátoru Beckman Coulter CEQ 2000.



### 3.5 Amplifikace kontrolní oblasti mtDNA

Pro amplifikaci kontrolní oblasti mtDNA (dále jen CR mtDNA) byly použity primery vyvinuté ke studiu genetické variability *T. thymallus* rakouských řekách (Uiblein *et al.* 2001). Sekvence zpětného i přímého primeru jsou uvedeny v Tabulce 4.

**Tab. 4: Sekvence přímého a zpětného primeru pro CR mtDNA a jejich délka.**

Název	Orientace	Délka	Sekvence oligonukleotidu (5' → 3')
LRBT-25	přímý	20 bp	AGA CGC CCG GTG TTG TAA TC
LRBT-1195	zpětný	22 bp	GCT AGC GGG ACT TTC TAG GGT C

Reakční směs byla připravena na šupinkatém ledu podle následujícího protokolu: do 8 µl destilované H<sub>2</sub>O bylo přidáno 12,5 µl PPP mastermixu (TopBio, ČR), 1,25 µl přímého a zpětného primeru a 3 µl extrahované DNA. Takto připravená reakční směs byla opět vložena do termocykleru. Parametry cyklování jsou uvedeny v Tabulce 5.

**Tab. 5: PCR profil pro amplifikaci CR mtDNA.**

CR mtDNA	Iniciační denaturace	Denaturace*	Nasedání*	Elongace*	Finální elongace	Poček cyklů
Teplota (°C)	95	94	62	72	72	30
Čas (s)	300	60	30	120	600	

### 3.6 Purifikace PCR produktu

Přečištění PCR produktů bylo provedeno pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Německo). Nejprve do nich bylo přidáno 50 µl vazebného pufru NTI, s nímž byly přepipetovány na kolonky. Směs byla centrifugována po dobu 30 sekund při 11 000 otáčkách za minutu. Následně byla promyta membrána pomocí 500 µl NT3 pufru a dvakrát centrifugována, aby byla dostatečně vysušena. Suché kolonky byly přemístěny do čistých mikrozkušavek, na každou bylo přidáno 30 µl NE pufru a kolonky byly centrifugovány.

PCR produkty byly opět zkontrolovány pomocí gelové elektroforézy za použití 1,5% agarózového gelu po dobu 30 minut.

Přečištěné PCR produkty byly následně sekvenovány. K jejich sekvenaci bylo využito sekvenačního servisu společnosti Macrogen Europe Ltd. (Nizozemsko).

## 3.7 Analýza dat

### 3.7.1 Mikrosatelity

Mikrosatelitní data byla odečítána z chromatogramů a zapisována do tabulky Microsoft Office Excel v podobě čísel, která vyjadřovala velikosti jednotlivých alel.

Pro výpočet základních charakteristik byl použit program GenAlEx 6.5 (Peakall *et* Smouse 2012), který je volně stažitelný z internetu a pracuje jako doplněk k Excelu. V něm byly spočítány hodnoty očekávané ( $H_e$ ) a pozorované heterozygoty ( $H_o$ ), počet jednotlivých alel na lokus ( $N_a$ ) a na populaci ( $A$ ) a párový fixační index ( $F_{ST}$ ), která vyjadřuje úroveň genetické diferenciace mezi jednotlivými populacemi. Dále byly pomocí tohoto programu stanoveny privátní alely pro jednotlivé populace, proveden Mantelův test pro porovnání závislosti genetické a geografické vzdálenosti a spočítána analýza hlavních komponent (principal component analysis, PcoA) pro populace z hodnot  $F_{ST}$ . Tento program byl také použit pro konverzi dat pro programy Arlequin, GenePop, Microchecker a Structure.

Pomocí programu Genepop 4.2 (Raymond *et* Rousset 2008) byla spočtena vazbová nerovnováha (linkage disequilibrium, LD) pro ověření, zda jsou lokusy nezávislé a není nutno je z dalších analýz vyřadit. Dále byl tento program použit pro vypočtení Hardy-Weinbergovy rovnováhy, konkrétně byl zjišťován nedostatek heterozygotů ( $H$  – deficit) na populace a na jednotlivé lokusy. Pro vyloučení náhodné chyby v důsledku velkého počtu párových testů následovala Bonfferoniho korekce (Dunn 1961).

Populačně genetické studie založené na mikrosatelitních datech bývají často narušeny výskytem mutace v místě DNA, kde má dosedat používaný primer. V takovém případě nedojde k amplifikaci daného úseku DNA a vzniká tzv. nulová alela. K detekci nulových alel byl použit program Microchecker 2.2.3 (van Oosterhout *et al.* 2004).

Pravděpodobnost, že analyzované populace prošly nedávnou redukcí efektivní velikosti populace – tzv. „bottleneckem“, byla počítána pomocí programu Bottleneck 1.2.02 (Cornuet *et* Luikart 1997). Vzhledem k počtu jedinců a lokusů byl použit podle doporučení autorů programu dvoufázový model (T. P. M.) a Wilcoxonův test porovnávající očekávanou a pozorovanou heterozygotitu. Parametry byly nastaveny takto: variance=10 a pravděpodobnost 90%. Odhad odchylek byl vypočten na základě 1 000 opakování.

V programu Geneclone 2.0 (Arnaud-Haond *et* Belkhir 2007) bylo vypočteno množství multilokusových genotypu (MLG). Pro výpočet alelové bohatosti (allelic richness,  $A_R$ ), určující počet alel stetandizovaný na velikost populace s nejnižším počtem jedinců, byl použit

software FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995). Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.* 2010) byl použit pro analýzu molekulární variability (AMOVA), testována byla 1 000 permutacemi.

Populační struktura byla analyzována v programu STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000), který simuluje různý počet populací (každou se svou vlastní sadou alel a jejich frekvencí) a následně do nich přiřazuje jednotlivé jedince, přičemž pokud není jejich zařazení jednoznačné, zařadí je do více simulovaných populací. Pro analýzu byly zadány celkem 4 základní modely s následujícími vstupními hodnotami: model 1 „admixture – correlated“, model 2 „admixture – independent“, model 3 „nonadmixture – correlated“, model 4 „nonadmixture – independent“. Počet předpokládaných populací byl nastaven na  $K=1-21$ , počet iterací 10, „burn in“ period 100 000 a 500 000 opakování. Nejpravděpodobnější hodnota  $K$  byla vybrána pomocí internetového programu Structure Harvester (Earl *et von* Holdt 2012).

### 3.7.2 mtDNA

Seřazení sekvencí bylo provedeno v programu Mega 6 (Tamura *et al.* 2013) používaným k zarovnávání sekvencí, budování fylogenetických vztahů a k molekulárně evolučním analýzám. V tomto programu byly spočteny základní charakteristiky sekvencí, jako je počet konzervovaných pozic (všichni jedinci mají na této pozici stejnou bázi), variabilních pozic (obsahuje alespoň dva typy bází), parsimoniálně informativní pozice (pozice obsahuje alespoň dva druhy bází a četnost výskytu alespoň dvou z nich je rovna dvěma) a „singleton“ pozice (obsahuje alespoň dva typy bází a nanejvýš jedna se vyskytuje vícekrát). Dále byly vypočteny párová genetická vzdálenost mezi všemi jedinci a průměrná genetická vzdálenost mezi povodími a uvnitř jednotlivých povodí pomocí Kimurova dvouparametrového modelu (Kimura 1980), který zohledňuje pouze rozdílnost mutací u tranzic a transverzí.

V programu DNASp 5.10.1 (Rozas *et Rozas* 1995) používaného pro analýzu polymorfismu sekvencí DNA byla provedena analýza haplotypů a výsledek naformátován pro další rozbor jejich příbuznosti. Ta pak byla vyhodnocena a graficky znázorněna pomocí programu Network v. 4.6.1.3 (Bandelt *et al.* 1999) metodou „Median Joining“.

## 4 Výsledky

### 4.1 Mikrosatelity

Všechny lokusy u všech jedinců celkového počtu 369 byli úspěšně amplifikováni, a proto nebylo nutné žádného vyřazovat z analýz, stejně tak žádná z populací. Pro analýzu molekulární variance (AMOVA) musel být vyřazen lokus (*One 2*) z důvodu vyššího počtu neskórovaných dat.

#### 4.1.1 Charakteristika mikrosatelitních lokusů

Počet alel na lokus, očekávaná a pozorovaná heterozygotita a hodnota  $F_{ST}$  jsou uvedeny v Tabulce 6. Všechny použité lokusy byly polymorfní. Nejvyšší polymorfismus byl zaznamenán u lokusů *Bfro 018* (22 alel) a *One 2* (23 alel). Očekávaná heterozygotita se pohybovala od 0,482 do 0,782, přičemž nejnižší hodnotu vykazoval lokus *Bfro 010* a nejvyšší *Bfro 018*. Nejnižší pozorovaná heterozygotita byla 0,440 u lokusu *Bfro 010* a nejvyšší 0,760 u lokusu *Bfro 018*. Hodnota  $F_{ST}$  se pohybovala v rozmezí 0,097 až 0,147. Deficit heterozygotů ( $p < 0,01$ ) byl zaznamenán na lokusu *Bfro 010*, *Bfro 005*, *Bfro 013* a *One 2*.

**Tab. 6: Tabulka s použitými mikrosatelitními lokusy, počet alel na jednotlivé lokusy ( $N_a$ ), pozorovaná ( $H_o$ ) a očekávaná ( $H_e$ ) heterozygotita, hodnota  $F_{ST}$  a deficit heterozygotů na jednotlivé lokusy ( $H - def$ ).**

Locus	$N_a$	$H_o$	$H_e$	$F_{ST}$	H - def
<i>Bfro 010</i>	12	0,44	0,482	0,102	0,0000
<i>Bfor 015</i>	15	0,741	0,727	0,098	0,0536
<i>Bfro 018</i>	22	0,76	0,782	0,097	0,0127
<i>Ogo 2</i>	16	0,702	0,664	0,101	0,3708
<i>Bfro 005</i>	17	0,585	0,613	0,141	0,0000
<i>Bfro 013</i>	20	0,579	0,641	0,147	0,0008
<i>One 2</i>	23	0,444	0,517	0,137	0,0000

Po provedení globálního testu na párovou vazebnou nerovnováhu (LD) bylo zaznamenáno 36 signifikantních hodnot ( $p < 0,001$ ) z celkového počtu 441 srovnání. Po provedení Bonferroniho korekce (Dunn 1961) byl počet signifikantních srovnání snížen na 3.

Nebyla zaznamenána žádná systematická tendence ve výskytu nulových alel. Z 21 populací se nulové alely vyskytly maximálně ve třech z nich, a to konkrétně u lokusů *Bfro 015*, *Bfro 005* a *One 2*.

#### 4.1.2 Charakteristika analyzovaných populací

V Tabulce 7 jsou uvedeny základní charakteristiky jednotlivých populací - počet jedinců v populaci, průměrný počet alel na lokus, alelová bohatost a počet privátních alel na jednotlivé populace, deficit heterozygotů, očekávaná a pozorovaná heterozygotita a test na výskyt „bottlenecku“. Nejvyšší průměrný počet alel na lokus byl zaznamenán u populace Gápel (7,286 alel) a nejnižší u populace Svatka (4,143 alel). Alelová bohatost vychází z nejnižší velikosti populace (6 jedinců u populace Svatka) a pohybuje se v rozmezí 2,874 u populace Teplá až 7,724 u populace Biely Potok. Nejvíce privátních alel bylo detekováno u populace Biely Potok. Výpis všech privátních alel je možné nalézt v Příloze 1. Nedostatek heterozygotů byl zaznamenán ( $p < 0,001$ ) u populací Malše a Svatka. Naopak vysoký počet heterozygotů byl zaznamenán u populací Smědá ( $p = 0,790$ ) a Ústí u Vsetína ( $p = 0,673$ ). Očekávaná heterozygotita se pohybovala v rozsahu 0,462 u populace Svatka až 0,694 u populace Smědá a pozorovaná heterozygotita od 0,534 u populace Teplá do 0,742 u populace Biely Potok. Testování na redukci populací nepotvrdilo výskyt „bottlenecku“ u žádné z nich. Zkratky populací viz Tabulka 1.

**Tab. 7: Přehled počtu jedinců v jednotlivých populacích (n), průměrný počet alel na lokus (A), alelová bohatost ( $A_R$ ) a počet privátních alel ( $A_{pr}$ ), očekávané ( $H_E$ ) a pozorované ( $H_O$ ) heterozygotnosti, deficitu heterozygotů (H - def; červeně jsou vyznačené signifikantní hodnoty  $p < 0,01$ ) a bottleneck.**

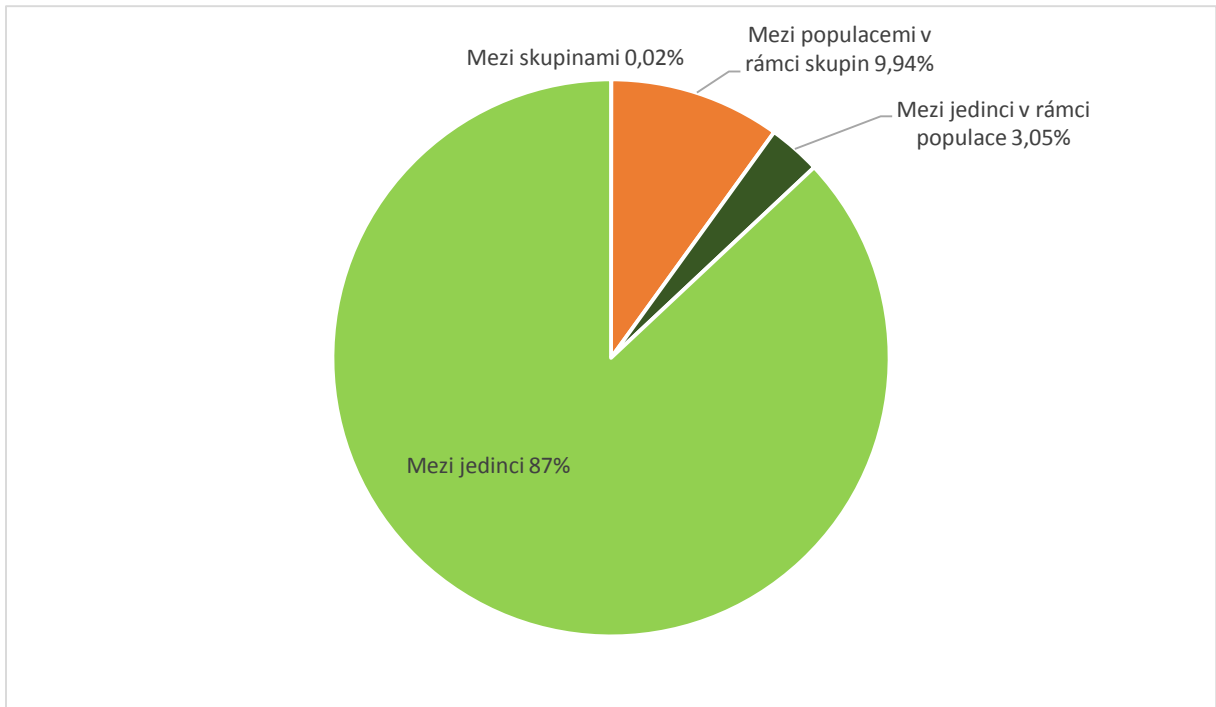
Pop	n	A	$A_R$	$A_{pr}$	$H_E$	$H_O$	H - def	$H_B$
TA	12	5,429	3,985	1	0,650	0,632	0,327	0,851
HK	12	4,000	3,366	0	0,626	0,598	0,575	0,054
BL	16	4,286	3,189	1	0,596	0,563	0,220	0,765
MET	22	5,714	3,743	2	0,613	0,643	0,361	0,765
SVIT	20	6,143	4,036	2	0,578	0,619	0,014	0,765
MS	22	6,143	3,802	1	0,544	0,625	0,000	0,980
UPA	10	4,571	3,496	0	0,576	0,548	0,153	0,945
HU	24	5,857	3,894	2	0,687	0,658	0,016	0,710
TU	24	4,571	3,211	0	0,490	0,555	0,002	0,468
TE	22	4,286	2,874	1	0,486	0,534	0,001	0,992
BN	23	6,714	3,950	1	0,651	0,664	0,134	0,980
VL	21	6,714	4,038	1	0,647	0,681	0,008	1,000
JI	17	6,429	4,096	5	0,652	0,664	0,101	0,468
OD	15	6,143	4,158	3	0,657	0,678	0,112	0,593
ZE	16	6,000	4,468	1	0,636	0,741	0,002	0,027
JES	24	6,000	3,854	0	0,634	0,637	0,015	0,851
SE	8	4,286	3,624	0	0,694	0,606	0,789	0,593

Pop	n	A	A <sub>R</sub>	A <sub>pr</sub>	H <sub>E</sub>	H <sub>O</sub>	H - def	H <sub>B</sub>
UV	15	5,714	3,846	3	0,648	0,618	0,673	0,765
BP	16	6,857	4,724	10	0,692	0,742	0,027	0,656
SV	6	4,143	3,870	2	0,462	0,640	0,000	0,468
GA	24	7,286	4,129	4	0,535	0,634	0,003	0,945

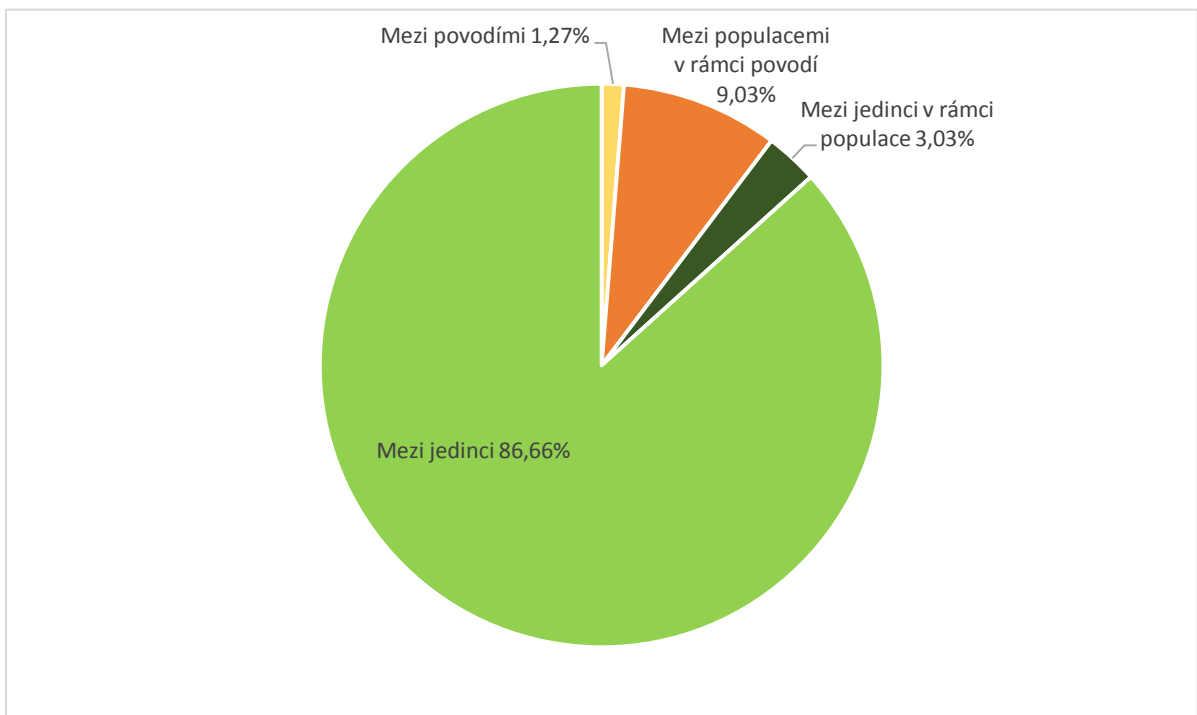
Pomocí analýzy multilokusových genotypů bylo mezi vzorkovanými jedinci detekováno celkem 368 různých (unikátních) genotypů. Pouze jeden genotyp byl stejný u dvou jedinců. Oba tyto jedinci pocházeli z populace Turnova.

#### 4.1.3 Genetická variabilita mezi populacemi

Analýzou molekulární variance (AMOVA) bylo nejprve zjišťováno, jaký je podíl variability mezi líhněmi a divokými populacemi (tj. skupinami), mezi populacemi v rámci skupin, mezi jedinci v rámci populací a mezi všemi jedinci (Obr. 2a). Jelikož se ukázalo, že se líhně od divokých populací geneticky nijak neliší, vzhledem k tomu, že podíl variability mezi nimi byl 0,02% (a ani tato nízká hodnota nebyla signifikantní,  $p=0,504$ ), mohlo být na obě skupiny nahlíženo rovnocenně ve všech dalších analýzách. Byla provedena nová analýza molekulární variance, kde byly jako skupiny porovnávány jednotlivá povodí (Obr. 2b). Je zřejmé, že prakticky veškerá variabilita je rozložena mezi jedinci napříč všemi populacemi, téměř 87% (signifikantní pro  $p<0,001$ ). Naopak mezi povodími je genetická variabilita zanedbatelná (signifikantní pro  $p<0,05$ ). Podíl variability byl u populací v rámci povodí signifikantní pro  $p<0,001$  a u jedinců v rámci populací pro  $p<0,01$ .



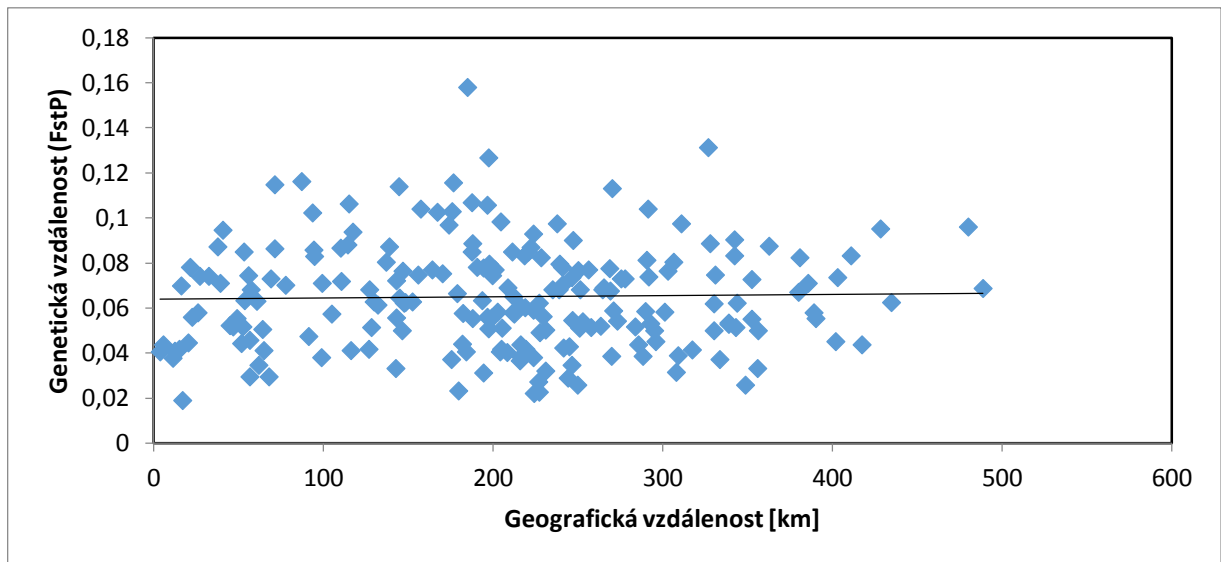
a)



b)

**Obr. 2: Graf znázorňující podíl genetické variability mezi skupinami, mezi populacemi v rámci skupin, mezi jedinci v rámci populací a mezi všemi jedinci - a) líhně a divoké populace, b) jednotlivá povodí.**

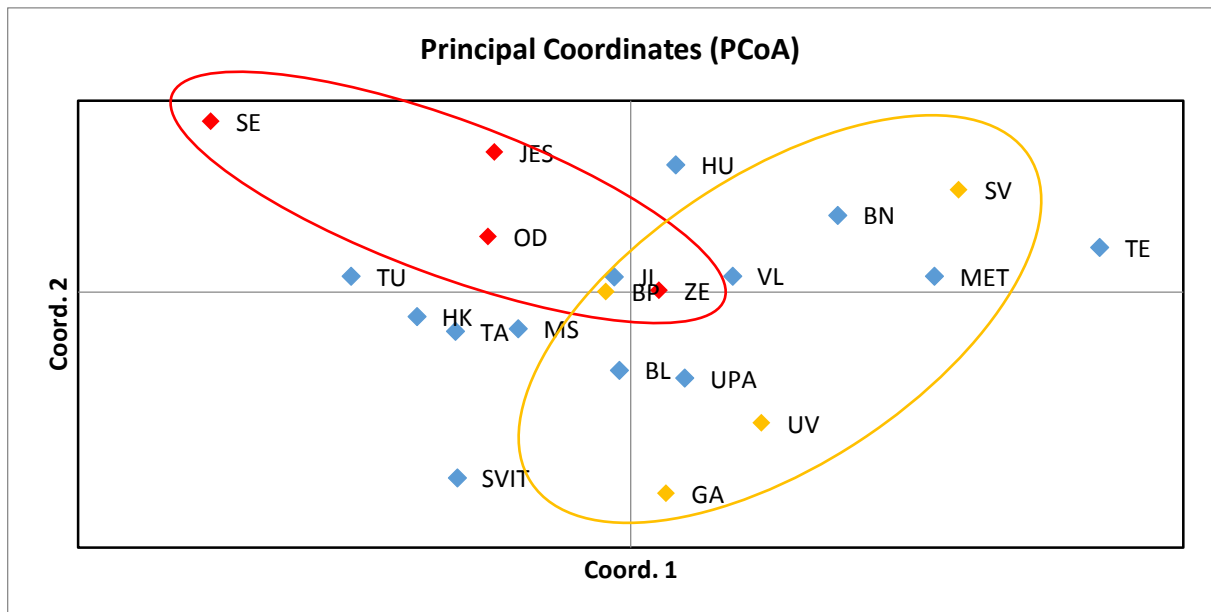
Závislost geografické a genetické ( $F_{ST}$ ) vzdálenosti byla testována pomocí Mantelova testu (Obr. 3), matice s hodnotami je uvedena v Příloze 2. Hodnota  $p=0,407$  vyšla neprůkazná, tudíž zde žádná závislost není. Podle tvaru grafu (široký rozptyl párových hodnot) lze předpokládat převládání genetického driftu (Hutchison *et* Templeton 1999).



**Obr. 3: Výsledky Mantelova testu porovnávání hodnot geografické vzdálenosti (GGD) a  $F_{ST}$ .**

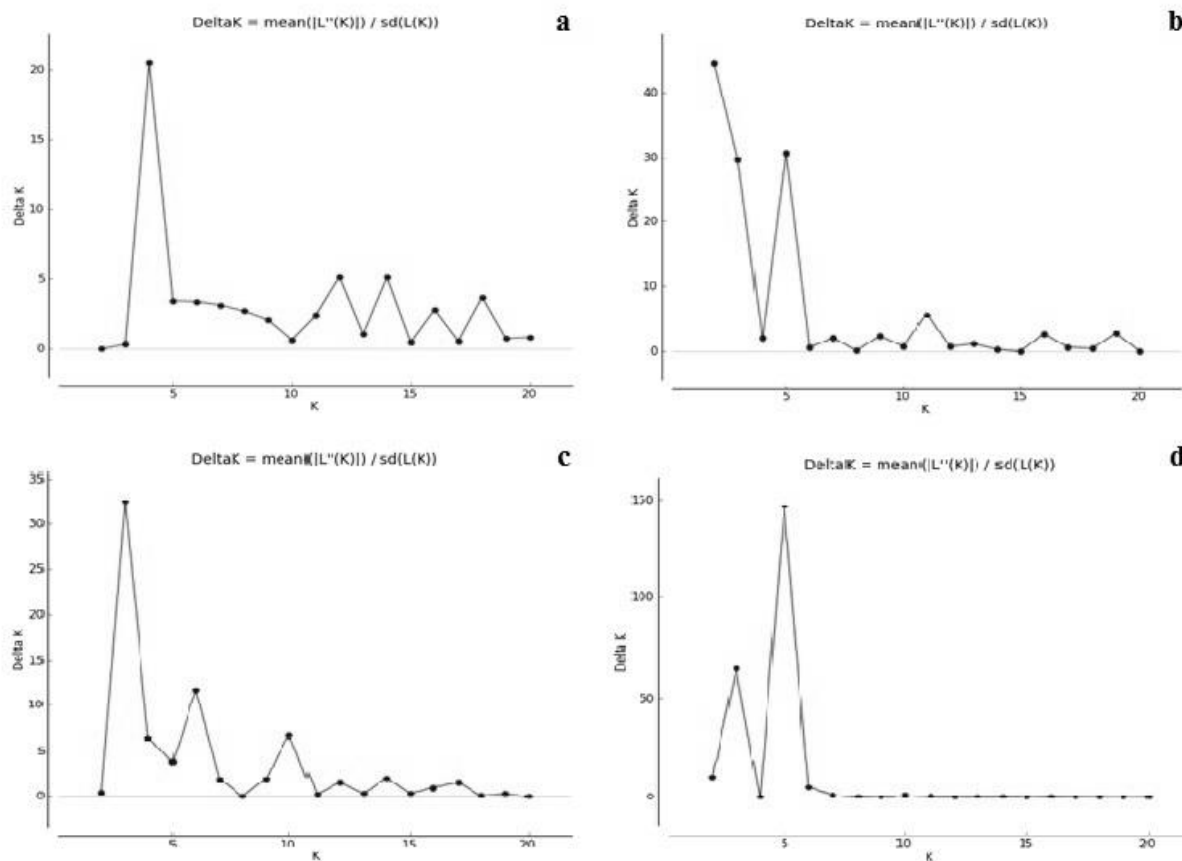
Na Obrázku 4 je sestaven graf metodou analýzy hlavních komponent. Pro výpočet byly použity hodnoty  $F_{ST}$ . Jednotlivá povodí jsou odlišena barvami. Jak je patrné, populace z různých povodí netvoří žádné výrazně oddělené shluky, ačkoli je tu určitá tendence k rozdělení oderských a dunajských povodí.





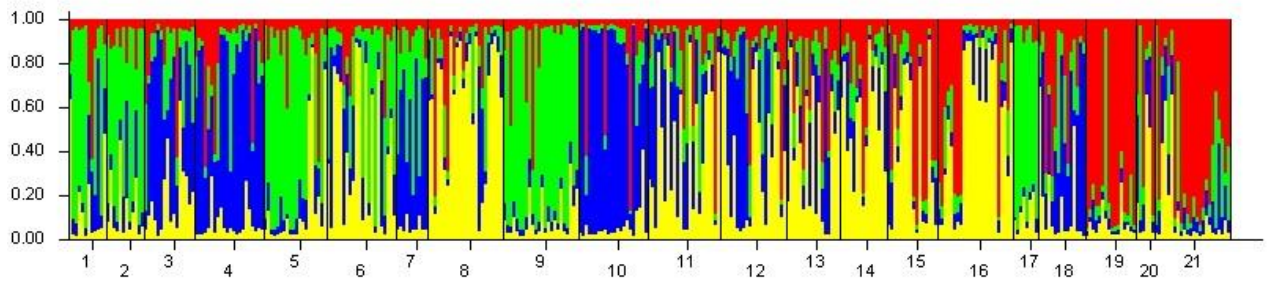
**Obr. 4:** Grafické znázornění vzdálenosti jednotlivých populací mezi sebou, povodí jsou barevně rozlišena (červená – oderské, žlutá – dunajské, modrá – labské).

Pomocí internetového programu StructureHarvester bylo pro každý model vyhodnoceno nejvhodnější  $\Delta K$  (určuje pravděpodobný počet populací, shluků). Pro model 1 (admixture – correlated) bylo  $K=4$ , pro model 2 (admixture – independent)  $K=2$ , model 3 (nonadmixture – correlated)  $K=3$  a model 4 (nonadmixture – independent) bylo  $K=5$  (viz Obr. 5 a, b, c, d). Barevné čárové grafy znázorňují příslušnost jedinců ke genetickým skupinám. Pravděpodobnost náležitosti do jednotlivých populací je vyznačeno barevně (Obr. 6 a, b, c, d). Čísla na ose x označují čísla jednotlivých populací podle Tabulky 1.

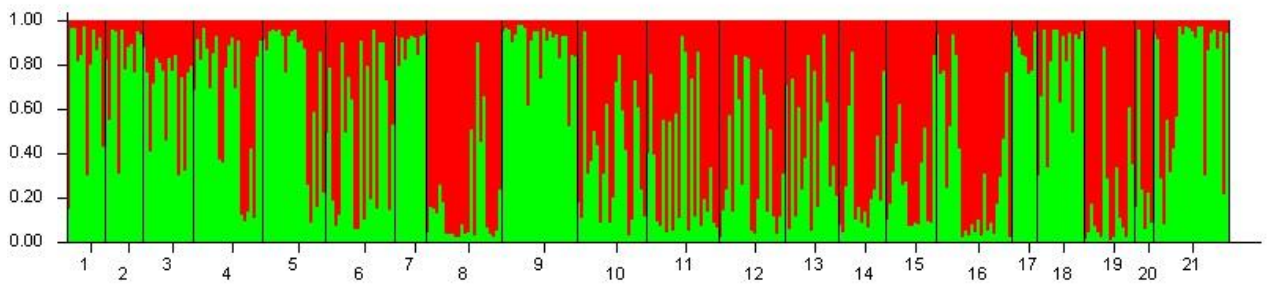


Obr. 5: Grafické znázornění počtu hypotetických populací podle jednotlivých modelů (a „admixture – correlated“, b „admixture – independent“, c „nonadmixture – correlated“, d „nonadmixture – independent“).

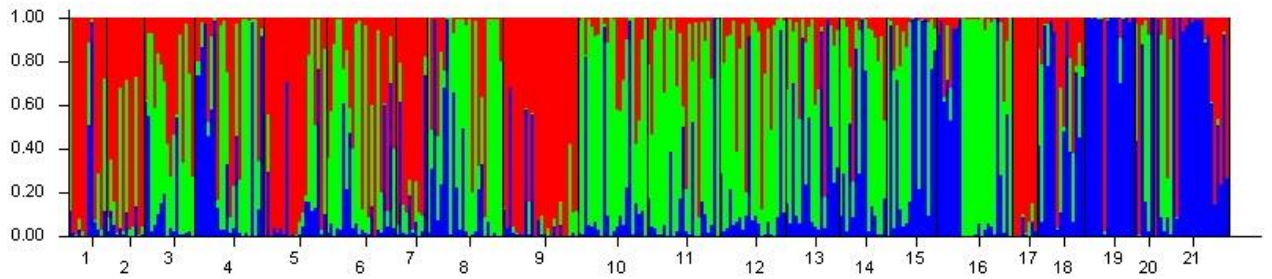
**a) Model admixture – correlated (K=4).**



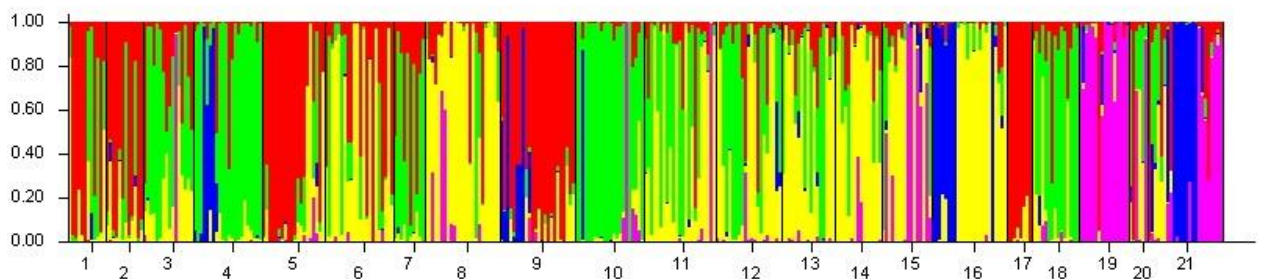
**b) Model admixture – independent (K=2).**



**c) Model nonadmixture – correlated (K=3).**



**d) Model nonadmixture – independent (K=5).**



**Obr. 5: Příslušnost jedinců do genetických shluků (K je odhadovaný počet populací na základě uvedeného modelu); populace jsou označeny čísla na ose x.**

## 4.2 Kontrolní oblast mtDNA

CR mtDNA se podařila úspěšně amplifikovat u 230 jedinců (Tab. 8).

**Tab. 8: Seznam použitých populací pro analýzu mtDNA s počty jedinců (n).**

<b>Kód</b>	<b>Povodí</b>	<b>Kód</b>	<b>n</b>
HK	Horní Kamenice	Labe	9
BL	Borová Lada	Labe	6
MET	Metuje	Labe	16
SVIT	Svitava	Labe	20
MS	Malše	Labe	10
UPA	Úpa	Labe	7
HU	Husinec	Labe	24
TU	Turnov	Labe	13
TE	Teplá	Labe	17
BN	Blanice	Labe	19
VL	Vltava	Labe	16
JI	Jizera	Labe	5
OD	Odra	Odra	4
ZE	Žermanice	Odra	16
JES	Jeseník	Odra	17
UV	Ústí u Vsetína	Dunaj	1
BP	Biely Potok	Dunaj	6
GA	Gapel	Dunaj	24

Z celkového počtu 589 bazí bylo 570 konzervovaných pozic, 15 variabilních pozic, 3 pozice informativní pro parsimonii a 12 singleton pozic (u jedinců z populací Biely Potok, Úpa, Žermanice, Husinec a Blanice). Frekvence jednotlivých bazí byly následující: T (32,1%), C (15,2%), A (30,3%) a G (22,4%). Z frekvencí je jasně patrné zatížení AT.

Dále byla stanovena párová genetická vzdálenost Kimurovým dvouparametrovým modelem (Kimura 1980) mezi všemi jedinci. Průměrná genetická vzdálenost mezi jedinci byla 0,001. Průměrné genetické vzdálenosti v rámci jednotlivých povodí jsou uvedeny v Tabulce 9a a v Tabulce 10b jsou uvedeny vypočtené průměrné vzdálenosti mezi povodími.

**Tab. 9: Průměrné genetické vzdálenosti (d) a jejich směrodatná odchylka (SE): a) v rámci povodí, b) mezi povodími.**

a)

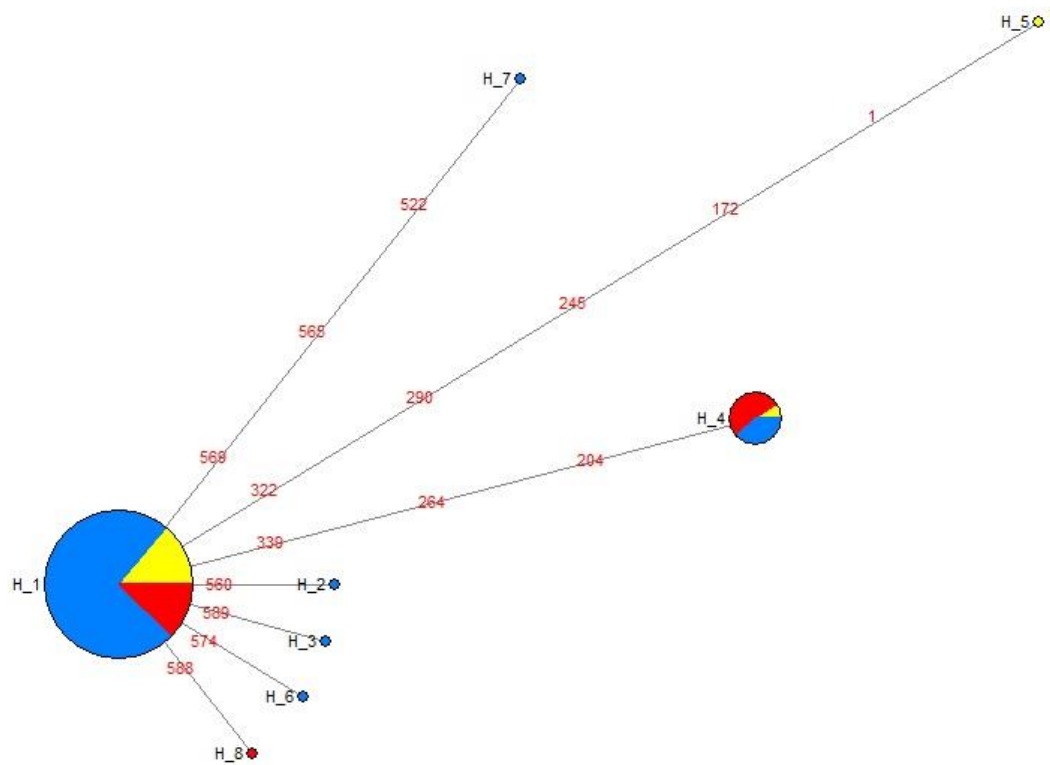
Povodí	d	SE
Labe	0,000610352	0,000277444
Dunaj	0,001199525	0,000434783
Odra	0,002345304	0,001281138

b)

Povodí 1	Povodí 2	d	SE
Labe	Dunaj	0,001	0,000
Labe	Odra	0,002	0,001
Dunaj	Odra	0,002	0,001

Z celkového počtu 230 sekvencí bylo detekováno 8 haplotypů. Nejvíce zastoupen byl haplotyp 1, který se vyskytoval u 203 jedinců napříč všemi analyzovanými populacemi. Haplotyp 2 a 3 byl detekován pouze u jednoho jedince, oba tyto jedinci byly z populace Blanice. Haplotypy 5, 6, 7 a 8 byly také detekovány pouze u jednoho jedince (haplotyp 5 Biely Potok, haplotyp 6 Husinec, haplotyp 7 Úpa a haplotyp 8 u jedince z populace Žermanice). Haplotyp 4 měl zastoupení u populací Biely Potok, Jeseník, Jizera, Malše, Odra, Svitava, Vltava a Žermanice. Haplotyp 1 se nachází ve všech populacích.

V haplotypové síti (Obr. 6) jsou haplotypy reprezentovány kruhy, jejichž velikost prezentuje četnost výskytu daného haplotypu. Spojnice pak vyjadřují příbuznost, přičemž číslice udávají mutované pozice. Z grafu lze odvodit, že základním je pravděpodobně nejrozšířenější H1, z něhož pak přímo vznikly všechny haplotypy ostatní. Jednotlivá povodí jsou vyznačena barevně.



Obr. 6: Haplotypová síť (červená – oderské, žlutá – dunajské, modrá– labské).

## 5 Diskuze

### 5.1 Mikrosatelity

#### 5.1.1 Charakteristika lokusů

V této studii se počet alel na lokus pohyboval od 12 do 23. Pozorovaná heterozygotita od 0,44 do 0,76 a očekávaná od 0,48 do 0,78. Gum *et al.* (2006) zaznamenali u populací ze střední Evropy, mezi kterými byly i dvě líně z České republiky, od 3 alel po 23 na lokus. Tito autoři zaznamenali výrazně nižší úroveň očekávané heterozygotity, v průměru 0,42. Populace Jadranského a Dunajského povodí také vykazovaly mnohem nižší pozorovanou heterozygotitu, od 0,28 do 0,58 a zároveň nižší polymorfismus analyzovaných lokusů (od 1 do 10 alel na lokus; Sušnik *et al.* 2004).

Deficit heterozygotů byl zaznamenán celkem na čtyřech ze sedmi lokusů ( $p < 0,001$ ). Ve studii Koskinen *et al.* (2002), kde bylo analyzováno 17 lokusů, vyšel signifikantní pro deficit heterozygotů ( $p < 0,05$ ) pouze jeden. Jako pravděpodobné vysvětlení se nabízí skutečnost, že Koskinen *et al.* (2002) vybírali vzorkované lokality s ohledem na ty nejméně zasažené rybářským managementem. V případě rybářského managementu může vlivem umělé reprodukce ryb docházet v takto vzniklých populacích k výraznému úbytku heterozygotů v důsledku použití omezeného počtu rodičovských jedinců („inbreeding“).

Výskyt nulových alel v této studii nenaznačoval žádnou systematickou tendenci. Po porovnání s výsledky testu na Hardy-Weinbergovu rovnováhu se ukázalo, že nulové alely vykazují především ty lokusy u populací, kde je H-W rovnováha narušena (vyskytl se zde deficit heterozygotů,  $p < 0,05$ ). Gum *et al.* (2006) odhalili potenciální přítomnost nulové alely pouze u jedné z 26 populací a to u dvou jejích lokusů, deficit heterozygotů zaznamenal u 11 populací ( $p < 0,05$ ). Gum *et al.* (2003) zaznamenali narušenou H-W rovnováhu u 6 Bavorských populací z 15. Zároveň však jimi studované populace vykazovaly vysokou hladinu diverzity, což může být důvod, proč byl u populací z České Republiky zaznamenán tak častý nadbytek homozygotů.

Po provedení Bonferroniho korekce (Dunn 1961) byly ze 441 srovnání na párovou vazebnou nerovnováhu signifikantní ( $p < 0,001$ ) pouze 3 srovnání. Z toho lze vyvodit, že žádná dvojice použitých lokusů nebyla ve vazbě. Obdobné výsledky zaznamenali i Gum *et al.* (2003), kterým vyšlo 2 signifikantní hodnoty ze 190 srovnání, v navazující studii zabývající se populacemi z celé střední Evropy zaznamenali Gum *et al.* (2006) párovou vazebnou nerovnováhu u 12 populací z 26. Koskinen *et al.* (2002) také zaznamenali výskyt vazebné

nerovnováhy u dvou párových srovnání, vyřazení těchto lokusů však viditelně nezměnilo výsledky analýz.

### 5.1.2 Charakteristika populací

Očekávaná (0,462 – 0,694) i pozorovaná (0,534 – 0,742) heterozygotita byla u studovaných populací poměrně vysoká. Ve studii zaměřené na Bavorsko byla zaznamenána očekávaná heterozygotita od 0,28 do 0,63 a pozorovaná heterozygotita od 0,22 do 0,62 (Gum *et al.* 2003). Stejně tak ve studii zaměřené na celou střední Evropu vykazovaly populace nižší pozorovanou (0,23 – 0,59) a očekávanou (0,21 – 0,58) heterozygotitu (Gum *et al.* 2006). Podle Gum *et al.* (2006) vykazovaly populace ovlivněné lidskými aktivitami spojenými s umělým vysazováním vyšší heterozygotitu ( $H_e=0,46$ ) než populace bez zásahu člověka ( $H_e=0,36$ ). Je tedy možné, že populace studované v této práci jsou mnohem více zasažené lidskými aktivitami, než populace ze studií Gum *et al.* (2003) a Gum *et al.* (2006).

Průměrný počet alel na populaci vycházel v této studii podobně jako u ostatních autorů: 4,00 – 7,28 u populací z České republiky, 3,00 – 7,20 u populací z Bavorska (Gum *et al.* 2003) a 1,9 – 6,3 u populací z celé střední Evropy (Gum *et al.* 2006). Počet vzorků v jednotlivých populacích může přímo ovlivnit tuto hodnotu, nemusí to však být pravidlo. U dvou populací z této studie (Svratka a Malše) byl zaznamenán signifikantní ( $p<0,001$ ) nedostatek heterozygotů. Počet vzorkovaných jedinců ze Svratky byl velice nízký (6), z Malše však vysoký (22), tudíž nelze říci, zda to bylo důsledek nízkého počtu jedinců v populaci.

Pro většinu populací (16 z 21) byla nalezena alespoň jedna privátní alela. Nejvyšší počet privátních alel byl detekován u populace Biely Potok (10), Jizera pak měla počet privátních alel jako druhá nejvyšší (5). Gum *et al.* (2006) detekovali 21 privátních alel u poloviny analyzovaných populací (13 z 16). Koskinen *et al.* (2002) zaznamenali výskyt geograficky specifických alel, které by mohly být specifické pro jednotlivé fylogenetické linie (například pro severovýchodní). Vzhledem k nižšímu průměrnému počtu vzorků na populaci v této studii vůči studii Koskinen *et al.* (2002; 17,6 : 34,7) je pravděpodobné, že výskyt privátních alel u populacích České republiky je ve většině případů způsoben pouze nízkým počtem vzorků, kdežto u člověkem téměř nedotčených populací ze severní Evropy je výskyt privátních alel více než pravděpodobný. Alelová bohatost byla u našich populací mezi 2,874 – 4,724. Tyto výsledky jsou srovnatelné s Gum *et al.* (2003), kterému tato hodnota vycházela mezi 2,4 – 4,6, a s Gum *et al.* (2006), kde se alelová bohatost pohybovala mezi 1,9 a 4,5.

Test na „bottleneck“ neprokázal, že studované populace prošli nedávným historickým snížením efektivní velikosti populace.



### 5.1.3 Genetická variabilita mezi populacemi

Analýza molekulární variance (AMOVA) procentuálně rozděluje množství variability mezi jedince, skupiny populací a populace. Nejprve bylo testováno, zda se mezi sebou geneticky liší populace z líhní a populace z divokých řek. Jelikož genetická variabilita mezi těmito skupinami byla zanedbatelná (0,02%), původ populací se nezohledňoval v dalších srovnávacích analýzách. Po provedení nové analýzy molekulární variance, kde byly jako skupiny nadefinována povodí, byla nejvyšší variabilita detekována mezi jedinci napříč všemi testovanými populacemi (86,66%), mezi povodími byla naopak téměř zanedbatelná (1,27%). Podobné výsledky rozdělení variability byly zaznamenány i v případě rozdělení na skupiny populací z líhní a z divokých řek. Z toho vyplývá, že jde o geneticky homogenní území, na rozdíl od populací severní Evropy, kde bylo detekováno 49,1 – 58,0% variability mezi populacemi (Koskinen *et al.* 2002). Jednotlivé linie rozdělené podle analýzy mtDNA ve studii Koskinen *et al.* (2000) na tomto území navíc vykazovaly i vysokou diferenciaci ( $p < 0,001$ ) mezi všemi zkoumanými populacemi, a to i v místech s malou geografickou vzdáleností, mezi kterými teoreticky mohlo v postglaciálním období docházet k mísení (Koskinen *et al.* 2002).

Mantelův test, který porovnával závislost genetické a geografické vzdálenosti, vyšel neprůkazně, žádná závislost mezi těmito proměnnými tudíž nebyla nalezena. Podle tvaru grafu, kdy jsou párové hodnoty široce rozptýlené, lze usuzovat, že u populací převládá genetický drift. Ten je s největší pravděpodobností zapříčiněn intenzivním umělým vysazováním bez respektování původní přirozené genetické struktury populací.

Metodou analýzy hlavních komponent (PCoA) byl pak vytvořený graf z hodnot  $F_{ST}$ , ve kterém se příbuznější populace seskupují do shluků. V ideálním případě by byly jasně viditelné tři shluky populací rozdělených podle jednotlivých povodí. Ačkoli je zde patrná tendence k rozdělení oderského a dunajského povodí, přičemž labské se s nimi překrývá, populace netvoří žádné na první pohled viditelné skupinky, což jen potvrzuje výsledky z analýzy molekulární variance. Koskinen *et al.* (2002) naproti tomu zjistil velmi jasné fylogenetické vztahy analyzovaných populací korelujících s geografickým územím a tím se mu podařilo populace rozdělit do zřetelných fylogenetických skupin.

V programu STRUCTURE byly testovány čtyři základní modely. Jednotlivá  $\Delta K$  byla vyhodnocena pro model 1 (admixture – correlated)  $K=4$ , pro model 2 (admixture – independent)  $K=2$ , model 3 (nonadmixture – correlated)  $K=3$  a model 4 (nonadmixture – independent) bylo vyhodnoceno  $K=5$ . Vzhledem k tomu, že původních populací bylo 21, jedná se o velmi nízká čísla. Pokud se podíváme na výstupní čárové grafy tohoto programu

(kde je jedinec prezentován jako svislá čára složená z barev, které určují procentuální náležitost do simulovaných populací), je jasně patrné, že jedinci po seřazení podle jejich skutečné sounáležitosti k 21 populacím jsou geneticky vysoce promíchané. Analyzované populace ze střední Evropy ve studii Gum *et al.* (2006) měly podobnou tendenci se ustalovat na  $K > 3$ , přičemž  $K = 3$  bylo vyhodnoceno jako nejvhodnější, vzhledem k fylogenetickým liniím založeným na mtDNA v předchozí studii Gum *et al.* (2005)

## 5.2 Kontrolní oblast mtDNA

Pro kontrolní oblast „D-loop“ mtDNA bylo vybráno 288 jedinců, přičemž se podařilo úspěšně sekvenovat 230 z nich. Průměrná genetická vzdálenost mezi jedinci byla nízká (0,001), stejně tak byly velice nízké průměrné genetické vzdálenosti v rámci povodí a mezi jednotlivými povodí. Z těchto výsledků je možné usoudit, že studovaní jedinci jsou geneticky velmi homogenní a hydrologické celky jako takové nevykazují žádnou diverzifikaci mezi sebou navzájem. To rozhodně neodpovídá přirozenému stavu, ve kterém by populace mezi sebou měly vykazovat určitý stupeň diferenciaci.

Bylo detekováno celkem 8 haplotypů z 230 sekvencí. Z haplotypové sítě lze odvodit, že nejrozšířenějším haplotypem na našem území je H1 (203 jedinců), který se vyskytl ve všech analyzovaných populacích. Je pravděpodobné, že je tento haplotyp rozšířen mezi generačními rybami na líhních, díky čemuž by mohl být uměle rozšiřován introdukcí do českých řek. Z něho pak přímo (bez přechodného haplotypu) vzniklo ostatních sedm haplotypů. Druhý nejrozšířenější haplotyp H4 (21 jedinců) se vyskytoval u všech třech povodích. Ostatních šest haplotypů mělo zastoupení vždy jen u jednoho jedince. Jelikož není výskyt haplotypů vázán na jednotlivé populace ani geografické povodí, bylo tím pouze potvrzeno, že populace v České republice jsou velmi homogenní. Počet mutací (max. 5) ukazuje na to, že ostatní haplotypy jsou pravděpodobně nově vzniklé.

Počet nalezených mitochondriálních haplotypů ostře kontrastuje s počtem mikrosatelitních genotypů (368 z 369 jedinců). To dokumentuje rozdílnost použitých markerů z hlediska mutační rychlosti. Dalším možným vysvětlením může být i skutečnost, že v této studii byl použit poměrně krátký úsek mtDNA a zároveň sedm mikrosatelitních lokusů.

### 5.3 Vliv rybářského managementu na analyzované populace

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že populace *T. thymallus* na území České republiky vykazují výraznou vnitro-populační diverzitu. Oproti tomu genetická diferenciacie populací v jednotlivých povodích a populacích mezi povodími je velmi malá. Tento stav neodpovídá přirozenému stavu volně žijících populací tohoto druhu v místech, kde neprobíhala jejich podpora rybářským managementem (např. Koskinen *et al.* 2001, 2002, Gum *et al.*, 2005). Vzhledem k tomu, že *T. thymallus* vykazuje omezenou migrační aktivitu, dokonce i v období reprodukce (Northcote 1995), byla u populací *T. thymallus*, které nebyly historicky ovlivněny umělým vysazováním, zaznamenána velmi nízká úroveň vnitro-populační genetické diverzity. Naproti tomu mezi-populační genetická diverzita byla u takovýchto populací vždy vysoká (např. Koskinen *et al.* 2001; Gum *et al.* 2003).

V oblasti střední Evropy byly identifikovány kontaktní zóny tří hlavních evolučních linií *T. thymallus* (Gum *et al.* 2005), což mohlo do jisté míry umožnit i přirozený tok genů mezi populacemi ve studovaných povodích. Na druhou stranu bylo prokázáno, že i geograficky blízké přirozené populace *T. thymallus* vykazovali relativně vysokou úroveň mezi-populační genetické diverzity (Koskinen *et al.* 2002; Gum *et al.* 2003) což je v rozporu se zjištěnými výsledky této studie.

Na území dnešní České republiky má rybářské obhospodařování dlouholetou tradici a *T. thymallus* je jednou z lososovitých ryb, jejíž populace jsou intenzivně podporovány umělým vysazováním. Jak je patrné ze zjištěných výsledků, toto vysazování a jím zprostředkovaný genetický drift probíhal, a pravděpodobně stále probíhá, bez jakéhokoliv respektování základní principů udržování přirozené genetické struktury volně žijících populací. Nejenže byly jednotlivé populace promíchány mezi sebou v rámci jednoho povodí, ale docházelo k převozům populací i mezi jednotlivými hydrologicky izolovanými celky. Toto pravděpodobně zapříčinilo výraznou homogenizaci genetické diverzity populací *T. thymallus* mezi studovanými povodími. Obdobný vliv exogenní introgrese genů na volně žijící populace *T. thymallus* byl v nižší míře pozorován v Bavorsku (Gum *et al.*, 2006) a také ve Slovinsku (Sušnik *et al.*, 2004).

Podobná situace byla zdokumentována i v případě populací *Salmo trutta* (pstruh obecný) v povodích českých a slovenských toků. Na území České republiky a Slovenska byla zjištěna výrazná homogenizace mezi-populačních rozdílů a také výrazná uniformita Atlantických a Dunajských populací tohoto druhu. V povodí Dunaje bylo nalezeno značné množství jedinců náležících do Atlantické linie (Kohout *et al.* 2011). Toto poukazuje na exogenní tok genů

směrem z povodí Labe do povodí Dunaje a dále také na skutečnost, že většina populací pstruha, které jsou chovány na líhních, pochází právě z Atlantické linie. Obdobně tomu může být i u *T. thymallus*, jak lze nepřímo usuzovat ze zjištění výrazného zastoupení CR mtDNA haplotypu, který byl rozšířen napříč všemi studovanými populacemi a také z takřka zanedbatelné úrovně diverzifikace CR mtDNA haplotypů. V neposlední řadě rybí líhně, které se věnují produkci násad pstruha obecného, se ve většině případů také zabývají i produkcí násad *T. thymallus* a jejich distribuce probíhá zpravidla obdobně.

## 6 Závěr

Ze statistické analýzy je zřejmé, že lidmi zprostředkovaná introdukce u *T. thymallus* v posledních 200 letech výrazně homogenizovala mezi-populační rozdíly, které se vytvářely v průběhu evoluce po desítky tisíc let. Populace, které byly v této práci studovány, pocházely původně ze tří povodí České republiky. Bohužel zde nebyla patrná žádná diverzita mezi těmito povodími, ani mezi populacemi samotnými. Analýza CR mtDNA sice odhalila celkem osm haplotypů, ovšem šest z nich se objevilo pouze u jednoho jedince. Z výsledků vyplývá, že intenzivní rybářské obhospodařování potírá původní genetickou variabilitu mezi geograficky oddělenými hydrologickými celky.

Dnes již s jistotou víme, že toto narušení přirozené genetické struktury lososovitých ryb má výrazný podíl na poklesu stavu jejich populací. Znovuobnovení alespoň částečné genetické struktury populací *T. thymallus* v tocích bude v budoucnu velmi obtížné, nicméně pro zachování tohoto druhu pravděpodobně nezbytné.

## 7 Literatura

Arnaud-Haond S., Belkhir K. 2007. Genclone: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes* 7: 15–17.

Balon E. K. 1975. Reproductive guilds of fishes: A proposal and identification. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 32: 821-864.

Baruš V., Oliva O., Baradlaiová M. 1995. Mihulovci (Petromyzontes) a ryby (Osteichthyes). Academia, Praha.

Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.

Cornuet J. M., Luikart G. 1997. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.

Dunn O. J. 1961. Multiple Comparisons Among Means. *Journal of the American Statistical Association* 56 (293): 52–64.

Earl D. A., von Holdt B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4 (2): 359-361.

Excoffier L., Lischer H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

Hewitt G. M. 1995. Some genetic consequences of ice ages and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.

- Hewitt G. M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359 (1442): 183-195.
- Goudet J. 1995. FSTAT (version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- Gross R., Kühn R., Baars M., Schröder W., Stein H., Rottmann O. 2001. Genetic differentiation of European grayling populations across the Main, Danube and Elbe drainages in Bavaria. *Journal of Fish Biology* 58: 264– 280.
- Gum B., Gross R., Kuehn R. 2005. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of European grayling (*Thymallus thymallus*): evidence for secondary contact zones in central Europe. *Molecular Ecology* 14: 1707–1725.
- Gum B., Gross R., Kuehn R. 2006. Discriminating the impact of recent human mediated stock transfer from historical gene flow on genetic structure of European grayling (*Thymallus thymallus* L.). *Journal of Fish Biology* 69 (C): 115–135.
- Gum B., Gross R., Rottmann O., Schröder W., Kühn R. 2003. Microsatellite variation in Bavarian populations of European grayling (*Thymallus thymallus*): implications for conservation. *Conservation Genetics* 4: 659–672.
- Gum B., Gross R., Geist J., Razpat A., Lukić-Bilela L., Pojskić N., Bajec S. S. 2008. Conservation genetics and management implications for European grayling, *Thymallus thymallus*: synthesis of phylogeography and population genetics. *Fisheries Management and Ecology* 16: 37-51.
- Hutchison D. W., Templeton A. R. 1999. Correlation of Pairwise Genetic and Geographic Distance Measures: Inferring the Relative Influences of Gene Flow and Drift on the Distribution of Genetic Variability. *Evolution* 53 (6): 1898.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.

Kohout, J., Jašková, I., Papoušek, I., Šedivá, A., Šlechta, V. 2011. Effects of stocking on the genetic structure of brown trout, *Salmo trutta*, in Central Europe inferred from mitochondrial and nuclear DNA markers. *Fisheries Management and Ecology* 19 (3): 252-263.

Koskinen M. T., Primmer C. R. 2001. High throughput analysis of 17 microsatellite loci grayling (*Thymallus* spp. Salmonidae). *Conservation Genetics* 2: 173–177.

Koskinen M. T., Nilsson J., Veselov A., Potutkin A. G., Ranta E., Primmer C. R. 2002. Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae. *Heredity* 88: 391–402.

Koskinen M. T., Ranta E., Piironen J., Veselov A., Titov S., Haugen T. O., Nilsson J., Carlstein M., Primmer C. R. 2000. Genetic lineages and postglacial colonization of grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) in Europe, as revealed by mitochondrial DNA analyses. *Molecular Ecology* 9, 1609–1624.

Kottelat M. 1997. European freshwater fishes. *Biologia* 52 (5): 1–271.

Kubečka J., Horký P., Prchalová M., Peterka J., Jůza T., Boukal D., Slavík O. 2013. Volné vody a jejich charakteristika. *Rybářství ve volných vodách* (eds. Randák T.), pp. 33-53. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany.

Lusk S., Hartvich P., Lojkásek B., Lusková V. 2011. Migrace ryb a migrační propustnost vodních toků. *Biodiverzita ichtyofauny České republiky VIII* (eds. Lusk S., Lusková V.), pp. 20-26. Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i., Brno.

Lusk S., Lusková V., Dušek M. 2002. Biodiverzita ichtyofauny České republiky a problematika její ochrany. *Biodiverzita ichtyofauny České republiky IV* (eds. Lusk S., Lusková V., Halačka K.), pp 5-15. Ústav biologie obratlovců AV ČR, Brno.



- Lusk S., Skácel L., Sláma B., 1987. Lipan podhorní. Český rybářský svaz, Praha.
- Marić S., Kalamujić B., Snoj A., Razpet A., Lukić-Bilela L., Pojskić N., Bajec S. S. 2012. Genetic variation of European grayling (*Thymallus thymallus*) populations in the Western Balkans. *Hydrobiologia* 691 (1): 225-237.
- McGinnity, P., Prodöhl, P., Ferguson, A., Hynes, R., Ó Maoiléidigh, N., Baker, N., Cotter, D., O'Hea, B., Cooke, D., Rogan, G., Taggart, J., Cross, T. 2003. Fitness reduction and potential extinction of wild populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*, as a result of interactions with escaped farm salmon. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 270: 2443-2450.
- Northcote T. G. 1995. Comparative biology and management of Arctic and European grayling (Salmonidae, *Thymallus*). *Reviews in Fish Biology* 5: 141–194.
- Northcote T.G. 1995. Comparative biology and management of Arctic and European grayling (Salmonidae, *Thymallus*). *Reviews in Fish Biology* 5: 141–194.
- Peakall, R., Smouse P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Raymond M., Rousset F. 1995. GENEPOP: Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Heredity* 86 (672): 248–249.
- Redenbach Z, Taylor E. B. 1999. Zoogeographical implications of variation in mitochondrial DNA of Arctic grayling (*Thymallus arcticus*). *Molecular Ecology* 8: 23–35.
- Rozas J., Rozas, R. 1995. DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating Population Genetics parameters from DNA sequence data. *Computer Applications in the Biosciences* 11: 621-625.

Sušnik S., Berrebi P., Dovc P., Hansen M.M., Snoj A. 2004. Genetic introgression between wild and stocked salmonids and the prospects for using molecular markers in population rehabilitation: the case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus* L. 1785). *Heredity* 93: 273–282.

Sušnik S., Snoj A., Dovc P. 1999. A new set of microsatellite markers for grayling: *BFRO014*, *BFRO015*, *BFRO016*, *BFRO017* and *BFRO018*. *Animal Genetics* 30: 462–478.

Sušnik S., Snoj A., Jesensek D., Dovc P. 2000. Microsatellite DNA markers (*BFRO010* and *BFRO011*) for grayling. *Journal of Animal Science* 78: 488–489.

Sušnik S., Snoj A., Dovc P. 2001. Evolutionary distinctness of grayling (*Thymallus thymallus*) inhabiting the Adriatic river system, as based on mtDNA variation. *Biological Journal of the Linnean Society* 74: 375–385.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.

Uiblein F., Jagsch A., Honsig-Erlenburg W., Weiss S. 2001: Status, habitat use, and vulnerability of the European grayling in Austrian waters. *Journal of Fish Biology* 59: 223–247.

van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. M., Shipley P. 2004. MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535–538.

Vostradovský J. 2013. Význam a historie rybářství ve volných vodách. Rybářství ve volných vodách (eds. Randák T.), pp. 15–31. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany.

Weiss S., Persat H., Eppe R., Schlötterer C., Uiblein F. 2002. Complex patterns of colonization and refugia revealed for European grayling *Thymallus thymallus*, based on complete sequencing of the mitochondrial DNA control region. *Molecular Ecology* 11: 1393–1407.

## 8 Přílohy

**Příloha 1: Výpis privátních alel a jejich frekvence pro jednotlivé populace.**

<b>Populace</b>	<b>Lokus</b>	<b>Alela</b>	<b>Frekvence</b>
TA	Ogo 2	234	0,045
BL	Bfro 013	222	0,033
MET	One 2	246	0,023
MET	One 2	252	0,023
SVIT	Bfro 013	198	0,025
SVIT	Bfro 013	238	0,025
MS	One 2	260	0,025
HU	Bfro 018	187	0,021
HU	Bfro 018	222	0,021
TE	One 2	224	0,033
BN	Bfro 013	232	0,022
VL	Bfro 005	130	0,024
JI	One 2	200	0,031
JI	One 2	208	0,031
JI	One 2	228	0,031
JI	One 2	230	0,031
JI	One 2	280	0,031
OD	Bfro 005	216	0,033
OD	Bfro 013	192	0,033
OD	Bfro 013	212	0,033
ZE	Bfro 010	112	0,133
UV	Bfro 018	200	0,067
UV	Bfro 005	96	0,033
UV	Bfro 005	108	0,033
BP	Bfro 010	100	0,133
BP	Bfro 010	104	0,067
BP	Bfro 010	116	0,033
BP	Bfro 018	202	0,063
BP	Bfro 018	206	0,063
BP	Bfro 018	208	0,063
BP	Bfro 018	232	0,031
BP	Ogo 2	202	0,063
BP	One 2	198	0,094
BP	One 2	234	0,031
SV	One 2	206	0,100
GA	Bfro 010	110	0,065
GA	Bfor 015	166	0,021
GA	Bfor 015	174	0,021
GA	One 2	148	0,023

**Příloha 2: Genetická ( $F_{ST}$ ) pod diagonálou a geografická vzdálenost mezi populacemi nad diagonálou.**

	TA	HK	BL	MET	SVIT	MS	UPA	HU	TU	TE	BN	VL	OD	ZE	JES	SE	UV	BP	SV	GA
TA	0.000	216.099	116.039	264.711	175.337	179.663	252.742	128.079	204.177	37.488	127.100	126.695	355.803	417.268	330.261	216.135	390.394	488.883	277.812	434.975
HK	0.090	0.000	226.992	69.020	44.771	231.039	52.994	208.517	15.080	187.345	211.732	227.543	199.177	250.781	146.636	21.435	250.070	343.660	175.868	306.413
BL	0.088	0.109	0.000	246.662	202.585	67.817	240.708	25.995	212.009	137.037	22.463	11.209	295.691	356.213	290.671	237.650	317.518	410.961	204.542	352.643
MET	0.093	0.113	0.096	0.000	110.201	230.970	16.029	223.649	71.181	241.439	227.279	244.064	131.992	181.822	77.665	87.300	184.288	275.612	129.644	241.276
SVIT	0.076	0.042	0.099	0.117	0.000	219.089	94.612	187.854	39.034	144.564	190.637	205.105	235.117	289.861	187.352	40.805	283.696	379.868	196.748	338.738
MS	0.069	0.075	0.027	0.093	0.084	0.000	229.386	51.739	216.240	194.179	52.563	56.695	249.996	307.777	257.914	246.536	263.565	352.602	155.938	292.999
UPA	0.101	0.112	0.125	0.094	0.106	0.103	0.000	218.526	55.688	228.303	222.094	238.790	147.503	197.842	93.664	71.435	199.448	291.416	138.896	256.306
HU	0.089	0.105	0.045	0.101	0.107	0.031	0.118	0.000	193.442	142.944	3.716	20.481	269.697	330.237	265.357	220.720	291.881	385.839	178.680	327.852
TU	0.086	0.040	0.112	0.124	0.067	0.083	0.102	0.094	0.000	176.688	196.661	212.492	197.471	251.240	148.360	32.346	247.124	342.272	167.260	302.868
TE	0.075	0.134	0.110	0.067	0.132	0.113	0.115	0.108	0.141	0.000	142.897	146.560	342.448	403.164	311.116	184.982	380.855	479.991	271.123	428.467
BN	0.110	0.101	0.048	0.064	0.101	0.041	0.126	0.038	0.114	0.085	0.000	16.805	273.257	333.752	269.068	223.771	295.205	388.989	182.106	330.904
VL	0.088	0.094	0.036	0.072	0.090	0.027	0.114	0.035	0.102	0.084	0.013	0.000	288.476	348.663	285.511	239.081	309.007	401.790	196.583	343.210
OD	0.058	0.100	0.088	0.085	0.096	0.065	0.104	0.083	0.090	0.103	0.101	0.082	0.000	61.692	64.035	218.773	53.589	144.807	94.099	110.635
ZE	0.069	0.093	0.092	0.070	0.091	0.075	0.123	0.094	0.108	0.093	0.080	0.071	0.032	0.000	104.847	268.858	56.634	98.755	152.484	91.232
JES	0.084	0.112	0.119	0.097	0.112	0.093	0.142	0.110	0.097	0.123	0.105	0.085	0.070	0.083	0.000	164.177	117.291	201.005	114.918	173.860
SE	0.095	0.066	0.129	0.151	0.056	0.100	0.125	0.127	0.053	0.179	0.139	0.113	0.104	0.115	0.106	0.000	270.214	362.849	197.276	326.777
UV	0.102	0.123	0.070	0.081	0.094	0.079	0.121	0.089	0.137	0.111	0.071	0.066	0.086	0.069	0.131	0.144	0.000	99.199	114.178	57.169
BP	0.112	0.104	0.106	0.115	0.102	0.080	0.147	0.092	0.124	0.131	0.079	0.071	0.106	0.083	0.119	0.120	0.095	0.000	211.373	60.539
SV	0.097	0.120	0.097	0.077	0.109	0.078	0.089	0.082	0.116	0.095	0.065	0.061	0.112	0.095	0.140	0.146	0.087	0.094	0.000	157.489
GA	0.096	0.111	0.089	0.095	0.099	0.073	0.115	0.082	0.114	0.108	0.071	0.066	0.073	0.056	0.120	0.131	0.057	0.075	0.083	0.000