Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky

Ouklejka pruhovaná (*Alburnoides bipunctatus) – genetická diverzita populací s ochranářskými aspekty*

Magisterská práce

Bc. Soňa Urbánková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010 **Vedoucí práce: Mgr. Jan Mendel, Ph.D.**

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma **„Ouklejka pruhovaná (*Alburnoides bipunctatus)* – genetická diverzita populací s ochranářskými aspekty“** zpracovala pod vedením školitele samostatně. Použitou literaturu a podkladové materiály jsem v práci citovala a uvedla je v přiloženém seznamu použité literatury.

SOUHRN

Diplomová práce na téma „Genetická diverzita ouklejky pruhované - *Alburnoides bipunctatus*“ reviduje vztahy většiny druhů rodu *Alburnoides* a poskytuje molekulární pohled do populační struktury druhu *A. bipunctatus*, jako jediného zástupce tohoto rodu na českém území. Byly provedeny fylogenetické analýzy markerů z mitochondriálního i jaderného genomu - cytochrom *b* a RAG-1. Sesbírané vzorky pocházely z různých lokalit osmi úmoří - Severního, Baltského, Černého, Kaspického, Egejského, Jónského, Středozemního a Jaderského moře.

V rámci druhu *A. bipunctatus* bylo nalezeno 35 haplotypů a 6 nukleotypů. Řeky úmoří Černého moře vykazovaly větší haplotypovou pestrost než řeky příslušející do úmoří Severního a Baltského. Pro ochranářské účely v ČR nebyl prokázán specifický haplotyp typický pro některé ze tří uvedených úmoří. Během vývoje genomové knihovny bylo objeveno 50 mikrosatelitových lokusů s dinukleotidovými a 79 lokusů s tetranukleotidovými motivy, které tvoří nadějný základ k nalezení vhodných kodominantních markerů pro budoucí populační studie.

SUMMARY

Diploma thesis named „*Alburnoides bipunctatus* - genetic diversity of populations and conservation implications“ revises relationships among the most of the species of genus *Alburnoides* and offers a view into the population structure of the species *A. bipunctatus* as a single representative of this species on the territory of the Czech Republic. Phylogenetic analyses of mitochondrial marker - cytochrome *b*, and nuclear marker - RAG-1 were made. Samples were collected from different habitat of the eight sea-drainage areas - North, Baltic, Black, Kaspian, Aegean, Ionian, Mediterranean and Adriatic Sea.

Thirty five haplotypes and six nucleotypes were found within species *A bipunctatus*. Haplotype diversity was greater in the rivers of Black Sea-drainage area than in the rivers of sea-drainage area of North and Baltic Sea.

During ongoing development of genomic library, were detected 50 microsatellite loci with dinucleotide and 79 loci with tetranucleotide motives which are promising candidates for codominant markers in future population studies.

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Mgr. Janu Mendelovi, Ph.D. za vedení, poskytnutí zázemí, cenných rad a informací.
Za sběr vzorků bych chtěla poděkovat pracovníkům Oddělení ekologie ryb v Brně (doc. Ing. Stanislav Lusk, CSc., Ing. Karel Halačka, CSc., Ing. Lukáš Vetešník, Ph.D.), pracovníkům Národního muzea v Praze a zahraničním kolegům (doc. PaedDr. Ján Koščo, Ph.D., Mgr. Michal Nowak, Mgr. Ladislav Pekárik, Ph.D., prof. Ekaterina Vasileva, Mgr. Tihomir Stefanov, Mgr. Alexander Ruchin) za poskytnuté vzorky.

Diplomová práce byla vypracována za podpory projektu č. M200930901.

OBSAH (Upraveno)

1 ÚVOD.....7
2 PROBLEMATIKA.....8
2.1 ROD Alburnoides.....8
2.2 CHARAKTERISTIKA Alburnoides bipunctatus.....10
2.2.1 VÝSKYT V ČR.....11
2.2.2 VÝSKYT V EVROPĚ.....12
2.3 LEGISLATIVA ČR.....12
2.4 VNITRODRUHOVÁ ROZMANITOST.....13
2.5 ANALÝZA A HODNOCENÍ VNITRODRUHOVÉ DIVERZITY.....14
2.6 GENOMOVÁ KNIHOVNA MIKROSATELITŮ.....16
2.7 CÍLE PRÁCE.....17
3 MATERIÁL A METODIKA.....18
3.1 PŘÍPRAVA KNIHOVNY MIKROSATELITŮ.....19
3.2 PŘÍPRAVA DATOVÉHO SOUBORU PRO FYLOGENETICKOU ANALÝZU....23
3.3 NÁSTROJE PRO VYHODNOCENÍ FYLOGENEZE.....29
4 VÝSLEDKY.....31
4.1 CHARAKTERIZACE DATOVÉHO SOUBORU A OPTIMALIZACE.....31
4.2 ANALÝZA KNIHOVNY MIKROSATELITŮ.....32
4.3 GENETICKÁ VARIABILITA V GENU PRO CYT *B*.....37
4.4 HAPLOTYPY RODU Alburnoides PODLE MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERIZACE GENU PRO CYT *B*.....38
4.5 LINIE RODU Alburnoides PODLE MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERIZACE GENU PRO CYT *B*.....39
4.6 HAPLOTYPOVÁ SÍŤ VARIABILITY GENU PRO RAG-1.....41
4.7 VARIABILITA AMINOKYSELINOVÝCH SEKVENCÍ.....43
5 DISKUZE.....45
6 ZÁVĚR.....48
7 LITERATURA.....49
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....53

ÚVOD

Od nepaměti se lidé snažili najít systém, podle kterého by rozřadili organismy žijící na naší planetě. Prvním významným průkopníkem byl Karl Linné, který na konci 18. století vytvořil binomickou nomenklaturu. Tento systém třídění živočišné a rostlinné říše byl založen na pozorování vnějších znaků. Morfologie a fyziologie přinesly cenné poznatky, na základě kterých byly organismy zařazeny do skupin podle vnější podobnosti. Kdyby roku 1953 Watson a Crick nepřišli se svým převratným objevem struktury DNA, Linneův systém by zůstal dodnes nepřekonán. S rozvojem molekulárně-genetických metod se zjistilo, že systematika podle morfologie a fyziologie není zcela ideální.
Jemné metody molekulární biologie a genetiky přispívají k získávání nových souvislostí na všech taxonomických úrovních u mnoha organismů. Odhalují lépe nejen vzájemnou příbuznost jedinců na druhové úrovni, ale i jejich vnitrodruhovou variabilitu, čehož může být využito v ochranářských projektech.

Diplomová práce se skládá ze čtyř tématických bloků doplněných o stručný souhrn napsaný anglicky. Hlavní výstupy jsou shrnuty v závěru.
První oddíl probírá aktuální informace o dané problematice. Výchozím bodem se stala revize stavu genetické diverzity u ryby ouklejky pruhované *Alburnoides bipunctatus* žijící nejenom na území České republiky. Její výskyt je dokumentován v celé Eurasii, z toho lze vyvodit, že vnitrodruhová rozmanitost tohoto druhu bude daleko pestřejší, než jak se doposud uvádí v literatuře.
Následuje kapitola, kde je popisována laboratorní činnost přípravy sekvencí genu pro cytochrom *b* a RAG-1, a výčet statistických metod sloužících k jejich vyhodnocení. V krátkém přehledu je nastíněna příprava genomové knihovny mikrosatelitů.

Nejdůležitější částí diplomové práce je sekce výsledků; v textu s obrázky a v přehledových tabulkách jsou rozebrány výstupy z jednotlivých analýz. Byla vytvořena haplotypová síť pro gen cytochromu *b* a RAG-1. Hlavním výstupem se stal fylogenetický strom s jasnou topologií. Podle fylogenie s podporou čtyř bioinformatických metod byly učiněny zásadní závěry, které vnášejí nové impulzy do diskuze o stavu rodu *Alburnoides* v Evropě.

2. PROBLEMATIKA

Říše:	živočichoné (Animalia)
Kmen:	strunatci (Chordata)
Podkmen:	obratlovci (Vertebrata)
Podtřída:	paprskoploutví (Actinopterygii)
Řád:	máloostní (Cypriniformes)
Čeleď:	kaprovití (Cyprinidae)
Rod:	ouklejka (*Alburnoides*)

S rozvojem molekulární biologie se otevírají nové možnosti, které mohou být využity při studiu taxonomie a genetické diverzity. Tento obor už v mnoha oblastech přinesl důležité poznatky, které pomohly pochopit souvislosti na různých úrovních.

Rod *Alburnoides* je rozšířen od Francie až po Afghánistán. *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, 1782) je rybí druh s velmi širokým okruhem výskytu. Typová lokalita tohoto druhu byla uvedena řeka Vesera (Münden).

Jejím přirozeným stanovištěm jsou podhorské i nížinné toky s kamenitým dnem rozprostírající se od západu až po východ Evropy, a rovněž se objevující v řekách od jihu k severu. Zasahuje přes Turecko až do Turkmenistánu a přes Ukrajinu do evropské části Ruska (Kottelat, 2007). Uváží-li se, že tuto rozsáhlou oblast s rozličnými habitaty a toky odvodňovanými do více jak sedmi moří, obývá jeden druh, je oprávněná hypotéza existence více kryptických druhů. Dosavadní výzkumy rodu *Alburnoides* byly a jsou prováděny jen na základě morfologie bez uplatnění molekulárního přístupu. Toto potvrzují nejnovější poznatky z roku 2009, které publikovali Coad a Bugotskaya. Na základě morfologie popsali na území Iránu, Turecka a Turkmenistánu zcela nové druhy: *Alburnoides qanati*, *A. gmelini*, *A. nicolausi*, *A. idignensis*, *A. namaki*, *A. varentsovi*.

2.1 ROD Alburnoides

Rod *Alburnoides* (Jeitteles, 1861) náleží do čeledi cyprinidae (kaprovití), řádu máloostní. Kromě nominotypické formy *Alburnoides bipunctatus* bylo popsáno 11 dalších poddruhů a forem (Berg, 1941, Banarescu, 1964).

A. bipunctatus fasciatus Nordman, 1840 je rozšířen na Krymu, západním Zakavkazí a v černomořském úmoří Malé Asie.

V roce 1924 Karaman popsal nový poddruh *A. bipunctatus prespensis*. Lokalizoval jej v Prespanském jezeře na hranicích Řecka, Makedonie a Albánie.

Karaman (1928) jako první popsal poddruh *A. bipunctatus ohridanus* s výskytem v Ohridském jezeře na hranicích Albánie a Makedonie, v Skadarském jezeře na hranicích Černé Hory a Albánie a v Drině. Zardoya a Doadrio (1999) ve své práci popsali místo výskytu řeku Aoos a Prespanské jezero a Talevski *et al*.(2009), Saveljic *et al*. (2009) jezero Skadar.

Další poddruh *A. bipunctatus rossicus* Berg, 1924 (typová lokalita řeka Kama) se vyskytuje v povodí Dněpru, Dněstru, Bugu, Donu, Kamy a Volhy (Ruchin *et al*., 2009), synonymum - *A. bipunctatus rossicus* natio *kubanicus* Berg, 1932 vyskytující se v povodí Kubanu a Laby.

V roce 1933 popsal Chichkoff poddruh *A. bipunctatus tzanevi* s rozšířením ve východním Bulharsku, řeka Riesova, povodí Kamčije, Veleky a Rezovy.

Chichkoff (1940) připustil poddruh *A. bipunctatus strymonicus* žijící v povodí řek Marice, Mesta, Toplitza a Struma (Strymon) v Bulharsku. Název tohoto poddruhu se objevil v práci Zardoya a Doadrio (1999) s potvrzením výskytu v řece Strymon.

A. bipunctatus smyrnaea Pellegrin, 1927 objevující se v severozápadní oblasti Malé Asie.

A. bipunctatus eichwaldii Filippi, 1863 lokalizován v jižním Dagestánu, v povodí Kury a Araksy, Giljanu, Mazanderánu, v povodí Atreku, Urminy, v řekách jižního svahu Elbrusu, v Turkménii, v horním povodí řeky Amudarji, Kašdaarji a v Zeravšanu nad Samarkandem.

A. bipunctatus thessalicus Stephanidis, 1950 se vyskytuje řeckých řekách. Typová lokalita pro tento druh jsou řeky Pinios a Sperchios.

A. bipunctatus armeniensis Dadikyan, 1972 se vyskytuje v povodí arménských řek Aras, Arpa, Vorotan, Vedi, Marmarik a Kasakh.

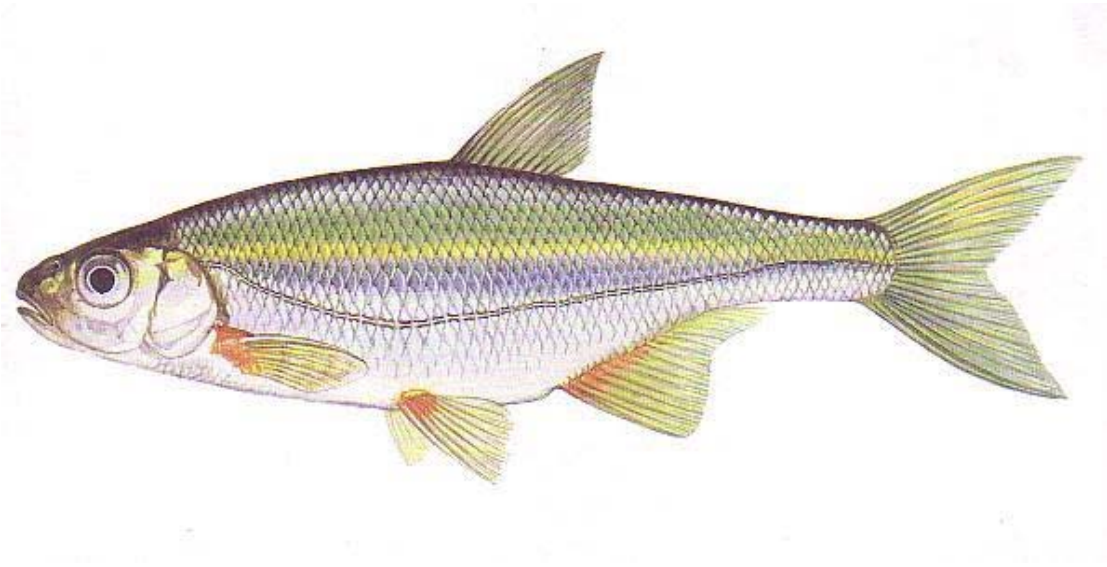
Jednotné uspořádání v systému rodu *Alburnoides* učinili v roce 2007 Kottelat a Freyhof v souhrnném přehledu evropských sladkovodních ryb. Při revizi druhů *Alburnoides* přiznal samostatnost pouze třem druhům; *A. bipunctatus*, *A. ohridanus* a *A. prespensis*. Ale hned v zápětí dodává, že *Alburnoides* z Černé Hory, Řecka, Bulharska, Krymu a Kavkazu budou s velkou pravděpodobností reprezentovat odlišné druhy. Toto tvrzení bude potřeba ověřit pomocí molekulárních metod.

Nejnovější třídění rodu *Alburoides* lze najít v internetové databázi FishBase (05/2010) (Froese a Pauly, 2010). Vyskytuje se zde 15 validních druhů: *A. bipunctatus, A. eichwaldii, A. fasciatus, A. gmelini, A. idignensis, A. kubanicus, A. namaki, A. nicolausi, A. oblongus* Bolgakov, 1923 (typová lokalita Syr-Darya)*, A. ohridanus, A. quanati, A. petrubanarescui, A. prespensis, A. taeniatus* Kessler, 1874 (typová lokalita řeka Amu-Darya, Zeravshen, Syr-Darya a Chu), *A. varentsovi.*

2.2 CHARAKTERISTIKA Alburnoides bipunctatus

Pod latinským názvem *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, 1782) je na našem území znám tento rybí druh jako ouklejka pruhovaná. Další názvy, kterými je tento druh označován, jsou ploska pásavá, bystranka, schneider, rifle minnow (Baruš a Oliva, 1995).

Je to drobná ryba (Obr. 1.) dosahující maximální velikosti 15 cm. Její tělo je středně vysoké a ze stran zploštělé (Baruš a Oliva, 1995). Ústa jsou sešikmená, téměř koncově postavená. Výrazná postraní čára je velmi zřetelně prohnutá směrem k břichu, její smyslové kanálky jsou lemovány černými pigmentovými skvrnami, vytvářejícími charakteristický dvojitý přerušovaný tmavý proužek. Zbarvení této ryby přechází od stříbřité na břichu, až po výrazně tmavý hřbet s nádechem do modra nebo zelena. Hřbetní a ocasní ploutev jsou zbarveny do šedozelena, prsní ploutve jsou světle žluté až růžové, řitní a břišní ploutve bývají skořicově nahnědlé, u kořene až oranžové (Hanel a Lusk, 2005). Tuto sladkovodní rybku nalézáme v mělčích, proudivých úsecích podhorských a nížinných toků s tvrdým kamenitým dnem, nevyhýbá se však ani stojatým vodám (Baruš a Oliva, 1995). Je velmi citlivá na čistotu vody a obsah rozpuštěného kyslíku (Hanel a Lusk, 2005). Využívá se jako bioindikátor kontaminace těžkými kovy (Dušek *et al.*, 2005). Jedná se o převážně hejnovou rybu zdržující se ve středních vodních vrstvách a u hladiny (Baruš a Oliva, 1995). Živí se bentosem, larvami chrostíků, muchniček, pakomárů, náletovým hmyzem, v zimě a na jaře i řasami. Ke tření dochází v hejnech v květnu a v červnu, někdy již koncem dubna v bystře proudící vodě na tvrdém štěrkovitém dně (Hanel a Lusk, 2005).



Obrázek 1: Ouklejka pruhovaná *Alburnoides bipunctatus*
http://atlas-ryb.rybarskeforum.cz/img/ouklejka_pruhovana.jpg

2.2.1 VÝSKYT V ČR

Rozlohou 78 870 km^2 patří Česká republika ke středně velkým evropským státům, z toho 1 600 km^2 zaujímají vodní plochy. Česká republika je důležitým rozhraním vodních systémů celé Evropy. Na našem území se nachází hlavní evropské rozvodí a ČR dostala název „střecha Evropy“. Kralický Sněžík tvoří hranici tří úmoří, z jehož svahů se voda dostává do Severního, Baltského a Černého moře. Tato poloha dává České republice důležitou pozici v rámci hospodaření a ochrany vodních zdrojů.

Jednotlivá povodí byla stanovena jako horní Labe a Orlice, střední Labe, dolní Labe a dolní Vltava, Ohře, Sázava, Berounka, Lužnice, Otava, horní Vltava, Dyje (Svratka), dolní Dyje a dolní Morava, střední Morava, Bečva, horní Morava, Odra (Olše, Opava, Odra) (Lusk *et al*., 2002).

Rozšíření ouklejky v rámci úmoří na našem území je velmi nerovnoměrné. V řekách vlévajících se do Severního moře je v současnosti potvrzen výskyt pouze v potoce Kocába, který patří do povodí Labe a Vltavy. Tento stav je následkem nejen zhoršující se kvality vody, ale také umělého korigování vodních toků, stejně tak i výstavby údolních nádrží. Výskyt tohoto druhu byl omezen vybudováním ÚN Lipno a ÚN Římov. O výskytu ouklejky pruhované v řece Sázavě podal zprávu Bártlík (1953), v Malši byla prokázána před výstavbou ÚN Římov (Vostradovský, 1978). Všechny tyto dříve prezentované populace zanikly a zatím nebylo prokázáno, že by se do těchto vod ouklejka pruhovaná vrátila. Ouklejka pruhovaná se dříve vyskytovala v přítocích řeky Sázavy (např. potok Macourovský, Úsobský, Perlový a Lučicský), dnes se vyskytuje pouze v krátkém úseku mezi ř.km 187 až 200 nad Přibyslaví (Mendel *et al*., 2008).

Lepší situace vládne v řekách tekoucích do Moravy a následně do Černého moře. I přes výstavbu mnohých údolních nádrží, jako třeba na řece Jihlavě ÚN Mohelno a ÚN Dalešice (Lusk, 1977), Oslavě ÚN Mostiště (Hochman a Jirásek, 1969; Lusk, 1978), Svratce ÚN Vír (1953) nebo nádrže Nové Mlýny I (Prchalová *et al*., 2009), odkud ouklejka pruhovaná vymizela, se v mnoha tocích populace ouklejky udržely. Útočiště nabízí především menší toky charakteru lipanového a parmového pásma jako Rokytná, dolní část Jihlavy, Svratka pod Tišnovem, Loučka, Bečva a další (přehled včetně odkazů viz Hanel a Lusk, 2005). Výskyt byl potvrzen i v dolním toku Moravy a dolním toku Dyje nad jejich soutokem (Hanel a Lusk 2005).

Do úmoří Baltského moře spadá povodí Odry, kde je ouklejka pruhovaná místy hojným druhem (Lojkásek a Lusk, 2004).

2.2.2 VÝSKYT V EVROPĚ

Alburnoides bipunctatus se vyskytuje v úmořích Severního, Baltského a Černého moře, v povodí řek vtékajících do Lamanšského průlivu a Biskajského zálivu. Dále se vyskytuje v povodí Rhôny a Dunaje až po řeku Prut, a také v řekách vtékajících do Kaspického moře. Ve Středomoří lze ouklejku pruhovanou nalézt pouze v Rýnu a v nevelké pobřežní oblasti, do které vtékají toky z Provence (Francie), východně od Janova (Itálie), v Aoosu (Řecko, Albánie), a v západním Řecku v povodí řeky Sperchios. Vyskytuje se v povodí Aralu, v povodí horního Amu Darja a Karakumskij (Turkmenistán, Afghánistán) a řekách vtékajících do Azovského moře (Kottelat a Freyhof, 2007). Nevyskytuje se v Anglii, Irsku, Dánsku, Skandinávii, Finsku a na území jižně od Alp a Pyrenejí (Berg, 1948-1949).

2.3 LEGISLATIVA ČR

Ochrana vodních organismů spadá pod Ministerstvo životního prostředí a je právně ošetřena zákony a vyhláškami dostupnými v zákonících a na oficiálních stránkách Ministerstva životního prostředí. Lze zmínit zákon č. 114/1992 Sb o ochraně přírody a krajiny, na který se váže prováděcí vyhláška č. 395/1992 Sb., ve které jsou uvedeny konkrétní druhy spadající pod legislativní ochranu. Ouklejka pruhovaná (*Alburnoides bipunctatus*) je v Příloze III této vyhlášky uvedena jako druh silně ohrožený. V Červeném seznamu ČR je tento druh řazen do kategorie zranitelný (Lusk *et al.*, 2004).

Od 1. května 2004, kdy se ČR stala řádným členem Evropské unie, převzala většinu právních norem platných právě v EU. Zde je vhodné uvést alespoň ty, které mají úzkou souvislost s ochranou vodních organismů. Jedním z nejvýznamnějších evropských právních předpisů vymezujících ochranu vybraných druhů je Směrnice rady č. 92/43/EEC z 21. května 1992 o ochraně přírodních stanovišť volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (zkráceně tzv. Směrnice o stanovištích). Česká republika nařízením vlády č. 71/2003 Sb., v souladu s požadavky směrnice Rady 78/659/EHS, stanovila 305 povrchových vod vhodných pro život a reprodukci původních druhů ryb s rozdělením na 174 lososových a 131 kaprových tekoucích vod o celkové délce 33 240 km.

2.4 VNITRODRUHOVÁ ROZMANITOST

Velmi důležitým aspektem ochrany druhového bohatství je vnitrodruhová rozmanitost neboli genetická diverzita. Ta byla chápána jako diverzita na úrovni poddruhových taxonomických jednotek. Nově se tento pojem spojuje se stanovením různorodosti populací v rámci téhož druhu. Tradiční taxonomický systém je založen na studiu morfologie a fyziologie, ale jak se ukazuje, nemá tento přístup dostatečně citlivé nástroje, aby mohl odhalit i drobné odchylky důležité pro přesnou identifikaci druhů. Proto se začaly hojně využívat molekulárně-genetické přístupy spojené s analýzou DNA (deoxyribonukleová kyselina). Manipulace s DNA umožnila získat cenné poznatky jak na úrovni mezidruhové, tak i vnitrodruhové (Hanel, 1998).

Vnitrodruhová diverzita není prozatím zcela právně zakotvena a i její vymezení není dosud zcela upřesněno. Při řešení této problematiky by měly být zohledněny následující body:

- stanovení rozsahu a úrovně vnitrodruhové diverzity u nativních taxonů naší ichtyofauny,
- vymezení dílčích hydrologických celků, v rámci kterých by bylo možné zacházet s násadami ryb za účelem posílení druhu vyskytujícího se v daném regionu,
- aplikace záchranných programů včetně záchranného chovu jen při znalosti genetické diverzity daného druhu (Lusk *et al*., 2006).

Mezinárodní organizace IUCN (the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) založena v roce 1948 vydává Červený seznam ohrožených druhů (Red List of Threatened Species ^{TM}). Hlavním posláním IUCN je ovlivňovat, povzbuzovat a podporovat společenstva na celém světě k ochraně integrity a rozmanitost přírody a zajistit udržitelné využívání přírodních zdrojů. Poslední seznam vydala IUCN v únoru 2000 a ouklejka pruhovaná se na něm zařadila do kategorie „ohrožených“ (endangered). Česká republika se členem IUCN v roce 1956, a tím začala realizovat vytyčené cíle.

V ČR se sestavuje každých pět let Červený seznam mihulí a ryb. Tento seznam obsahuje veškerou českou ichtyofaunu a rozděluje ji na několik kategorií podle ohroženosti. Ouklejka pruhovaná byla na seznam zařazena jako druh zranitelný (vulnerable). Toto platí pro území České republiky brané jako celek. Z ochranářského pohledu je rozšíření ouklejky pruhované v hydrologických systémech podle úmoří rozdílné a stupně ochrany se od sebe značně liší. Pro úmoří Severního moře (povodí Labe a Vltavy) se jedná o druh kriticky ohrožený, úmoří Baltského moře (povodí Odry) je to druh ohrožený a pro úmoří Černého moře představuje druh zranitelný (Lusk *et al*., 2006).

Je však nanejvýš důležité ochranářské snahy, podpořené vědeckými fakty, prosadit a ukotvit v legislativě všech států. Ale právní mašinérie je složitá a zdlouhavá, a proto se tyto zásady jen velmi pomalu právně ukotvují.

2.5 ANALÝZA A HODNOCENÍ VNITRODRUHOVÉ DIVERZITY

Stupňující důraz na poznání a ochranu biodiverzity a extrémní nárůst aplikace nových zejména molekulárních metod vede od konce 20. století k stále častějším změnám v dosavadní taxonomii.

Každá buňka obsahuje jadernou genetickou informaci. Tato informace je děděna z jedné poloviny od matky a z druhé od otce. Pokud nese jeden rodič (nebo oba) ve svém genomu mutaci, může ji přenést na potomka. Ale jaderná DNA (nDNA) má velmi důmyslné opravné mechanismy, které životu nebezpečné mutace odstraňují. Změny v genomu se dají sledovat a na jejich základě stanovit vzájemnou příbuznost zkoumaných jedinců. Analýza jaderné DNA se využívá při studiu evolučně vzdálenějších taxonů, rodů nebo druhů.

V každé buňce se v mnoha kopiích vyskytuje mitochondriální DNA (mtDNA). Nedochází v ní zpravidla k rekombinacím, ale opravné mechanismy už nejsou tak precizní, jako je tomu v jaderné DNA. Polymerázy často zařadí chybné nukleotidy, které se přenesou na potomstvo, a to pouze po mateřské linii, protože mitochondrie dostává potomek, nehledě na pohlaví, pouze od matky. Této skutečnosti se využívá ve výzkumu nižších taxonomických kategorií.

V této práci byly využity jako markery jaderný gen pro RAG-1 (recombination activating gene 1) o celkové délce 1497 bp a mitochondriální gen pro cytochrom *b* (cyt *b*) o celkové délce 1140 bp. Oba tyto úseky se běžně používají a u mnoha jiných organismů obstály jako dobře zvolené markery pro fylogenetické analýzy (Tang *et al*., 2006; Li a Orti, 2007; López *et al*., 2004).

Například sekvence celého genu cyt *b* lze nalézt v databázi GenBank pro *A. bipunctatus* a *A. bipunctatus strymonycus*. Také jsou vloženy sekvence pro příbuzný druh *A. bipunctatus ohridanus*. Složitější situace je u genu RAG-1. Ten byl použit jako jaderný marker pro ouklejku pruhovanou v jediné práci (Mayden *et al.*, 2008). Tato sekvence je uložena v databázi GenBank, ale její středová oblast není známa.

Pro tyto markery byly vybrány nejvhodnější primery, které byly použity pro amplifikaci úseků DNA. PCR je důležitou součástí celého procesu, protože do dalších analýz je potřeba víc DNA, než kterou lze získat izolací z části ploutve. Pokud PCR proběhne úspěšně, je nutné směs přečistit, aby byla zbavena nezreagovaných komponent. Tyto nečistoty by snižovaly kvalitu další PCR, tzv. sekvenační. Nastavuje se nízká teplota pro nasedání primerů a je proto nutné, aby v reakci byly pouze žádané fragmenty. Amplifikované úseky DNA jsou opět přečištěny a mohou být podrobeny analýze na automatickém sekvenátoru. Tento přístroj aplikuje enzymatickou Sangerovu metodu, která využívá speciální vlastnosti nukleotidů - 2', 3' dideoxyribonukleotidtrifosfátů. Tyto nukleotidy (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) mají na svém 3´ uhlíku ribózy místo OH skupiny jen samotný vodík, a tak se na ně už nemůže vázat další nukleotid. Ve směsi pro sekvenační PCR jsou použity jak normální deoxyribonukleotidtrifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), tak i dideoxyribonukleotidtrifosfáty, ale v daleko menší míře v poměru 1:99. Během procesu prodlužování se deoxyribonukleotidtrifosfát se zařadí s větší pravděpodobností než dideoxyribonukleotidtrifosfát, který ukončuje reakci. Tak je získána směs různě dlouhých oligonukleotidů končících různými nukleotidy fluorescenčně označenými. Každý ze čtyř nukleotidů je označen jinou fluorescenční barvičkou, proto je možné provést celý proces v jediné reakci. V kapiláře probíhá elektroforéza a řadí jednotlivé fragmenty lišící se o jediný flourescenčně značený nukleotid. Dnešní sekvenátory jsou vybaveny velmi citlivou mechanikou a snímacími CCD kamerami, které přesně vyhodnotí míru flourescence vyvolanou laserovým paprskem. Program převede emisní maxima do zápisu, kterému se říká chromatogram.

Každá sekvence je ručně překontrolována v programu MEGA, protože sekvenátor nemusí vyhodnotit vše zcela správně. Překontrolované sekvence se seřadí, nebo-li se z nich vytvoří „alignment“. Správně seřazené a zarovnané sekvence mohou být podrobeny následným statistickým analýzám.

Výstupem fylogenetické analýzy je fylogenetický strom, tzv. fylogram. Strom se skládá z větví a uzlů, kde taxony odpovídají vrcholům stromu. Fylogenetické metody pracují se dvěma typy dat. První jsou znaková, která vychází například ze sekvencí nukleotidů, kdy pozice nukleotidu představuje znak. Druhou kategorii tvoří data ve formě vzdáleností, tj. distancí. Data znaková je možné převést na distanční, ale konverze distančních dat na znaková možná není.

Krátká charakteristika metod konstrukce stromů:

1. Připojení souseda (neighbor-joining, NJ): algoritmická metoda, distanční data, „sousední objekty“ se spojují tak, že jejich výsledkem je co nejkratší strom.
2. Metoda maximální úspornosti (maximum parsimony, MP): znaková data, nalezení stromu s minimálním počtem evolučních kroků.
3. Metoda maximální pravděpodobnosti (maximum likelihood, ML): znaková data, nalezení stromu s nejvyšší pravděpodobností.
4. Bayesovská analýza: data znaková, výpočet posteriorních pravděpodobností (na základě určitých předpokladů), porovnání předem specifikovaného stromu s kombinací délek větví a substitučních parametrů se stromy s různými kombinacemi délek větví a substitučních parametrů.
5. Haplotypová síť: převedení sekvencí na haplotypy, využívá přístup statistické parsimonie.

2.6 GENOMOVÁ KNIHOVNA MIKROSATELITŮ

Mikrosatelity, nebo-li jednoduché opakující se sekvence (simple sequence repeats - SSRs), se nacházejí především v nekódujících oblastech genomu. Jejich distribuce je napříč celým genomem (Field a Wills, 1998; Tóth *et al*., 2000).

Tyto jednotky obsahují 1-10 párů bazí objevující se často jako dinukleotidové $(CA)_n$, trinukleotidové $(GTA)_n$, případně tetranukleotidové repetice $(ACTG)_n$. SSRs se ukázaly jako vhodné genetické markery, protože jsou velmi variabilní, kodominantní a v čase se rychle měnící.

Nejsou však jedinými pozorovatelnými opakováními v genomu. Dalšími jsou minisatelity, které se vyskytují v genomu 100-1000krát a jejich délka je více jak 10 bp. A dále satelity, které jsou časté v oblasti kolem centromery a dosahují velikosti až 5 Mb (Goldenstein a Schlötter, 1999).

Mikrosatelity se dělí na čtyři hlavní typy. Jsou to dokonalé mikrosatelity, ve kterých se za sebou vyskytuje pouze jeden opakující se motiv. Nedokonalé mikrosatelity, ve kterých je na jednom či více místech pár bazí, jež není součástí repetice. Nebo přerušované mikrosatelity obsahující inzerci několika párů bazí. Existují také mikrosatelity složené, které jsou spojením dvou a více sousedících mikrosatelitů s odlišným opakujícím se motivem (Goldenstein a Schlötter, 1999).

Vlastnosti mikrosatelitů se využívají při sledování genetické variability mezi jednotlivými druhy, v rámci jednoho druhu, nebo v rámci jedinců uvnitř jediné populace, při zjišťování příbuzenských vztahů, určování paternity, studiu parametrů populačně-genetické struktury. V ichtyologickém výzkumu našly mikrosatelitové knihovny své uplatnění při charakterizaci genetického původu, selekci potomstva, při studiu toku genů a zjišťování stupně migrace, při mapování ekonomicky významných kvantitativních znaků a identifikaci genů odpovědných za tyto znaky, při aplikaci marker-assisted breeding programech (Chistiakov D. A., 2005).

2.7 CÍLE PRÁCE

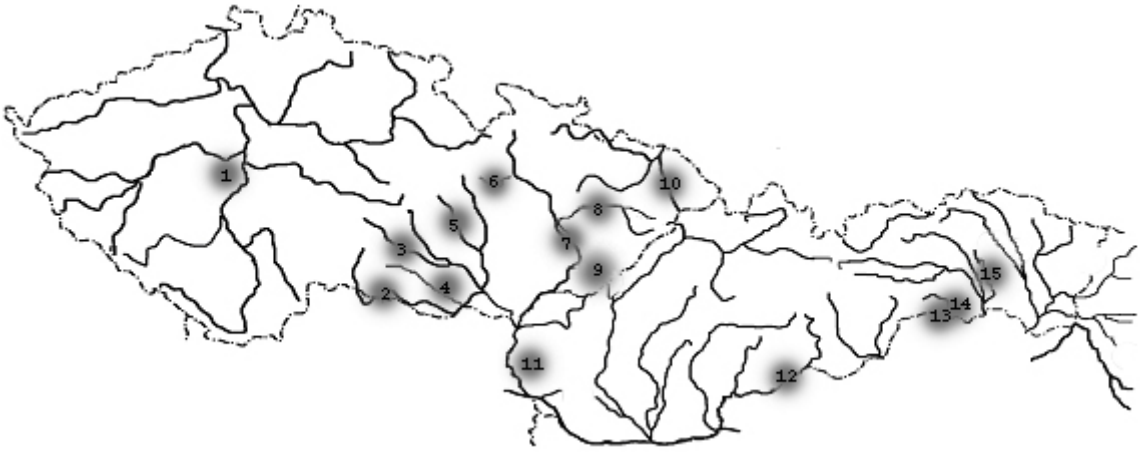
Jak bylo řečeno, dle morfologických studií výskyt ouklejky pruhované byl zaznamenán na rozsáhlém území i mimo Evropu. Doposud neexistuje žádná komplexní fylogenetická studie rodu *Alburnoides*. V roce 2008 Mendel *et al*. uveřejnil prvotní krátkou studii zabývající se genetickou diverzitou a výskytem *A. bipunctatus*. Předložená studie si klade za cíl přinést kompletní výsledky o stavu populací druhu *A. bipunctatus* ve Střední Evropě.

Cíle diplomové byly rozděleny do čtyř oddílů:

- Fylogenetická analýza sesbíraných vzorků pomocí sekvenace genu pro cyt *b* a RAG-1.
- Ze získaných dat vyhodnotit, zda má *A. bipunctatus* jednotnou strukturu nebo se jedná o více druhů (kryptických druhů).
- Ověřit hypotézu o odlišnosti populací porovnáním českých vzorků z úmoří Černého, Severního a Baltského moře; tím poskytnout vědecké podklady pro ochranářskou problematiku na území ČR.
- Zahájení vývoje genomové knihovny mikrosatelitů.

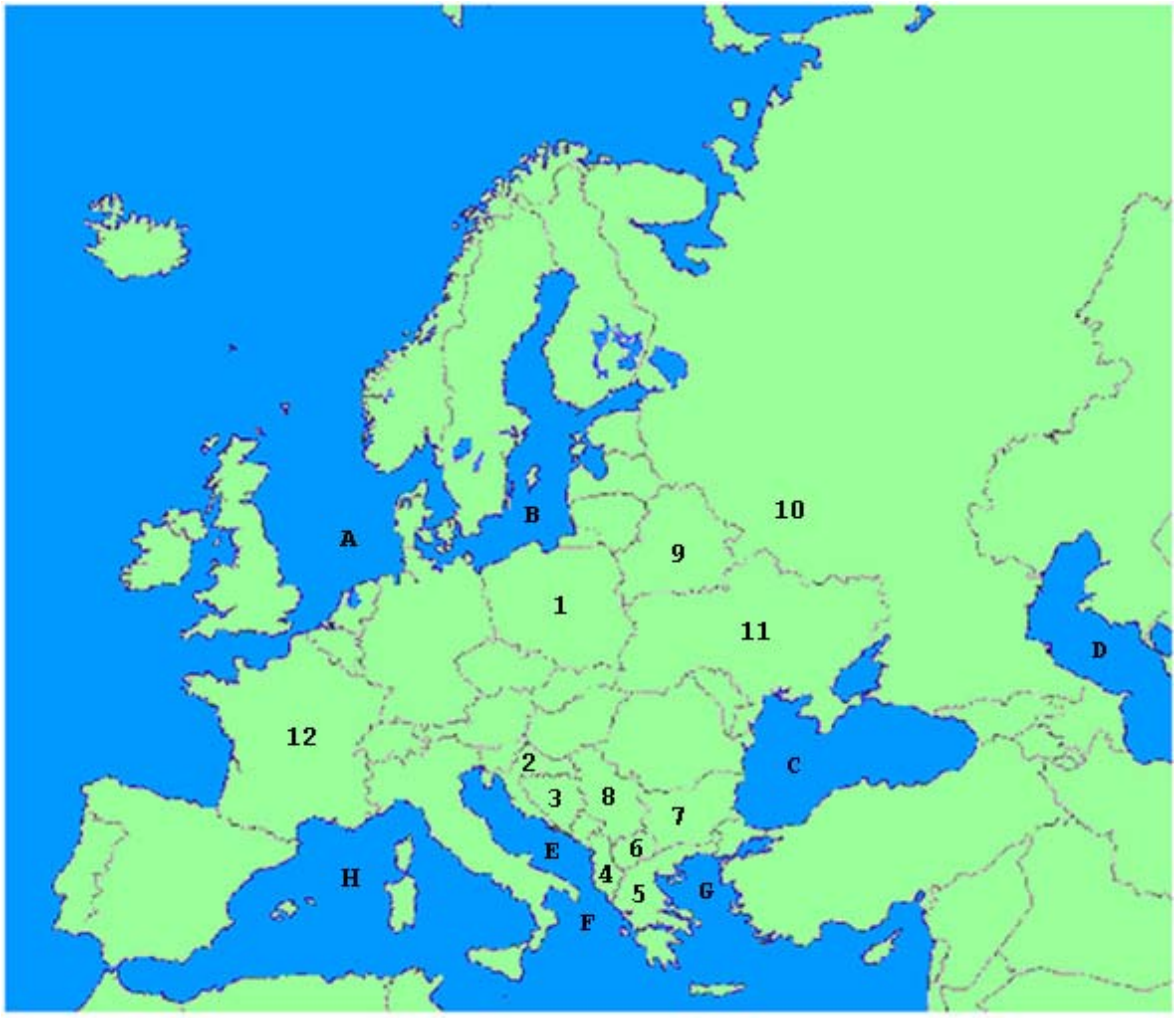
3 MATERIÁL A METODIKA

Analyzované vzorky pocházely z jedinců reprezentujících lokality z České republiky, Slovenska (Obr. 2.), Polska a Francie (Obr. 3., Tab. I.). Řeky odvodňující toto území ústí do Severního, Baltského, Černého a Středozemního moře. Pro zmíněnou oblast se předpokládá výskyt ouklejky pruhované *A. bipunctatus*.



Obrázek 2: Mapa českých a slovenských sběrových lokalit.
Pod čísly jsou pojmenovány řeky, na kterých byl proveden odchyt ryb.
1: Kocába; 2: Dyje; 3: Jihlava; 4: Jevišovka; 5: Svratka; 6: Jevíčka; 7: Morava; 8: Bečva; 9: Vlára; 10: Olše; 11: Rudava; 12: Ipeľ; 13: Bodva; 14: Ida; 15: Oľšava;

Pro porovnání byly přibrány vzorky z širšího distribučního areálu druhu *A. bipunctatus* a současně i z lokalit s možným výskytem jiných druhů rodu *Alburnoides*: Albánie, Bělorusko, Bosna a Hercegovina, Bulharsko, Chorvatsko, Makedonie, Rusko, Srbsko a Ukrajina (Obr. 3., Tab. I.). Řeky protékající těmito státy vtékají do Baltského, Jaderského, Egejského, Jónského Kaspického, Středozemního a Černého moře. Tak bylo dosaženo velkého souboru dat, který zachytil rozmanitost nejenom v rámci druhu *A. bipunctatus* ale i v rámci celého rodu *Alburnoides*.



Obrázek 3: Mapa států (mimo ČR a SR), ve kterých byly sbírány vzorky.
Písmenem jsou označena jednotlivá úmoří řek, z kterých byly získány vzorky. Číslice ukazují státy, na jejichž území byl prováděn sběr vzorků.
A: úmoří Severního moře; B: úmoří Baltu; C: úmoří Černého moře; D: úmoří Kaspického moře; E: úmoří Jaderského moře; F: úmoří Jónského moře; G: úmoří Egejského moře; H: úmoří Středozemního moře
1: Polsko; 2: Chorvatsko; 3: Bosna a Hercegovina; 4: Albánie;; 6: Makedonie; 7: Bulharsko; 8: Srbsko; 9: Bělorusko; 10: Rusko; 11: Ukrajina; 12: Francie.

3.1 PŘÍPRAVA KNIHOVNY MIKROSATELITŮ

Součástí této práce byla spoluúčast na přípravě mikrosatelitové knihovny *A. bipunctatus*, která pro zmíněný druh není dostupná. Je známo jen několik polymorfních lokusů získaných cross-species amplifikací z genomových knihoven jiných druhů (Mendel *et al.*, 2008). Knihovna mikrosatelitů s repeticemi (TG) a (ATCT) byla zhotovována pro populační studii v rámci APVV projektu (Vliv heterogenity habitatů na diverzitu ichtyofauny). Repetitivní lokusy byly hledány v genomu zástupce *A. bipunctatus* z řeky Dyje (lokalita Bulhary) pod evidenčním číslem 9110 ze sbírky Oddělení ekologie ryb (OER). Úseky obsahující opakující se motiv TG byly cíleně zvoleny pro vytvoření

knihovny. Jiná dinukleotidová repetice AT se sice v genomech vyskytuje často, ale její slabá vazba mezi bázemi není optimální pro PCR. Hodnocení velikosti je nesnadné. Problémy při PCR mohou způsobovat i tetranukleotidové repetice, ale jsou zase méně poznamenány mutačními procesy (Goldstein a Schlötter, 1999).

Vývoj takové knihovny je časově náročný. Musí se provádět mnohá testování pro ujištění, že knihovna byla úspěšně sestavena. V rámci diplomové práce byl zahájen vývoj genomové knihovny mikrosatelitů a z pěti níže uvedených hlavních bodů byly zatím zpracovány první tři.

Genomová DNA byla rozštípána na fragmenty. Ty byly zaklonovány do vektorů, které byly vneseny do kompetentních buněk a vysazeny na médium. Na základě modro-bílé selekce byly vybrány pozitivní klony. Buňky s vnesenými vektory byly otestovány na přítomnost repetitivních úseků ve fragmentu DNA pomocí hybridizace s mikrosatelitovou sondou. Kolonie buněk s inzerty, které splnily kritérium, byly dále analyzovány. Z primerů na vektoru byly amplifikovány úseky genomové DNA a následně sekvenovány za využití komerčně dostupných služeb společnosti Macrogen Inc. (Korea). Získané sekvence byly selektovány na přítomnost dinukleotidových a tetranukleotidových repetitivních úseků.

Další práce na genomové knihovně mikrosatelitů bude spočívat v hledání vhodných primerových míst. Bude proveden rozsáhlý test připravené mikrosatelitové knihovny s mnoha vzorky, aby se zjistila alelická variabilita, odhalily se nulové alely a vazebná nerovnováha.

Vývoj knihovny mikrosatelitů je finančně i časově náročný úkol obsahující těchto pět hlavních kroků:

1. Konstrukce genomové knihovny

DNA byla izolována pomocí kitu Qiagen, poté co byl vzorek ploutve ouklejky pruhované natráven proteinázou K. Izolovaná DNA byla štěpena restrikčním enzymem *RSA I* (Promega). Tento enzym štípe dvojvlákno v jedinečných místech obsahujících specifický sled nukleotidů, který se v genomu objevuje asi po 500-900 bp.

Místo rozpoznání: 5’...GT▼AC...3’

3’...CA▲TG...5’

Takto naštípaná genomová DNA je elektroforeticky otestována na agarózovém gelu. Z gelu je vyříznuta oblast obsahující fragmenty o požadované délce 500-900 bp. Zvolená byla právě tato délka fragmentů, protože se ukázala jako nejvhodnější pro zaklonování a sekvenování.

Dalším krokem přípravy byla ligace adaptorů, díky kterým mohou být připravené fragmenty zaklonovány do bakterií. Zde byly použity adaptory ADAPFR.

ADAPFR: Rsa21 5'...CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA...3'

Rsa25 3'...TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG CAC A...5'- fosfát

Ligace byla provedena kitem pGEM-T Vector system II (Promega). Fragmenty s adaptory byly použity jako matrice pro PCR a úspěšnost byla ověřena elektroforézou. Po úspěšné ligaci následovalo obohacování prováděné magnetickými kuličkami firmy Promega Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles (SA-PMPs). Obohacování probíhá na magnetických kuličkách nesoucích na svém povrchu streptavidin. Ligovaná DNA je hybridizována s biotinylovanými oligonukleotidovými próbami. Zvoleny byly oligonukleotidy se sekvencí nukleotidů $(TG)_n$ a $(ATCT)_n$. Takto byly získány pouze ty fragmenty genomové DNA, které obsahují požadované repetitivní úseky TG anebo ATCT. Byla provedena PCR a elektroforeticky ověřené PCR produkty byly přečištěny kitem QIAquick PCR Purification (Qiagen).

Následovala fáze klonování PCR produktů kitem pGEM-T Easy Vector system II (Promega) do bakterií. Podle protokolu byly připraveny vektory pGEM-T a do nich se ligovaly připravené PCR produkty. Při transformaci teplotním šokem došlo k narušení buněčné stěny JM109 kompetentních buněk a mohlo dojít ke vstupu vektorů do intracelulárního prostoru.

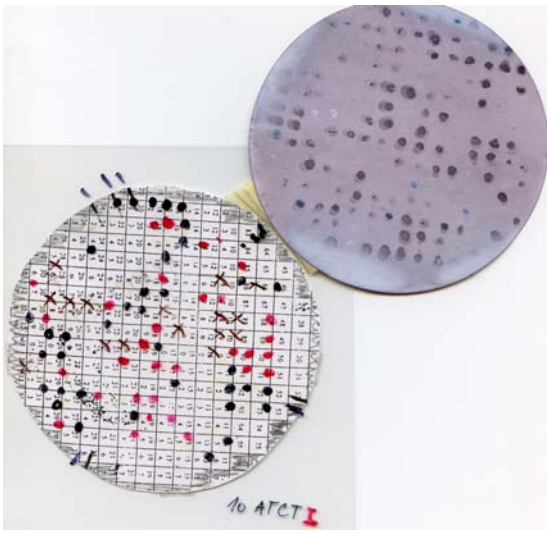
Kompetentní buňky byly rozetřeny na LB médium s přídavkem ampicilinu, IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) a X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-galaktopyranosid). Ampicilin brání jiným bakteriím, aby vyrostly na médiu. IPTG a Xgal se používají při modro-bílé selekci. Pokud buňka neobsahuje vektor s inzertem, kolonie mají modrou barvu; gen pro β-galaktozidázu aktivní, X-gal je štěpen. Buňky, které mají ve vektoru vložený fragment DNA, tvoří bílé kolonie; gen pro β-galaktozidázu vyřazen z funkce, Xgal v médiu není štěpen. Bílé kolonie jsou přeočkovány na nové médium.

2. Detekce pozitivních klonů pomocí hybridizace s mikrosatelitovou sondou

Po získání pozitivních kolonií buněk, které obsahovaly vektor s inzertem, bylo potřeba vybrat pouze takové, které obsahovaly ve vloženém fragmentu DNA repetitivní úseky TG anebo ATCT. K tomuto účelu slouží technika hybridizace na nylonovou membránu.

Na nylonovou membránu se fixuje DNA. Na takto připravenou membránu bylo potřeba hybridizovat sondy. Zvoleny byly Oligonucleotide Tailing Kit a DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche). Tento proces zahrnoval mnoho kroků, které vedly k získání spotů

dvou barev. Na membráně se objevily klony světle hnědé,které neobsahují inzert s hledanými repeticemi a tmavě fialové, které inzert s repetice obsahovaly (pozitivní klony). Podle pozice na membráně jsou pozitivní kolonie (Obr. 4.) z Petriho misek inokulovány do tekutého média. V tekutém LB médiu s ampicilinem a glycerolem v -80 °C lze buňky uchovávat mnoho let.



Obrázek 4: Nylonová membrána a předloha určující pozici klonu na Petriho misce.
V pravém horním rohu jsou fialové body označující pozitivní klony. V levém dolním rohu šablona, podle které byly pozitivní klony hledány na Petriho misce.

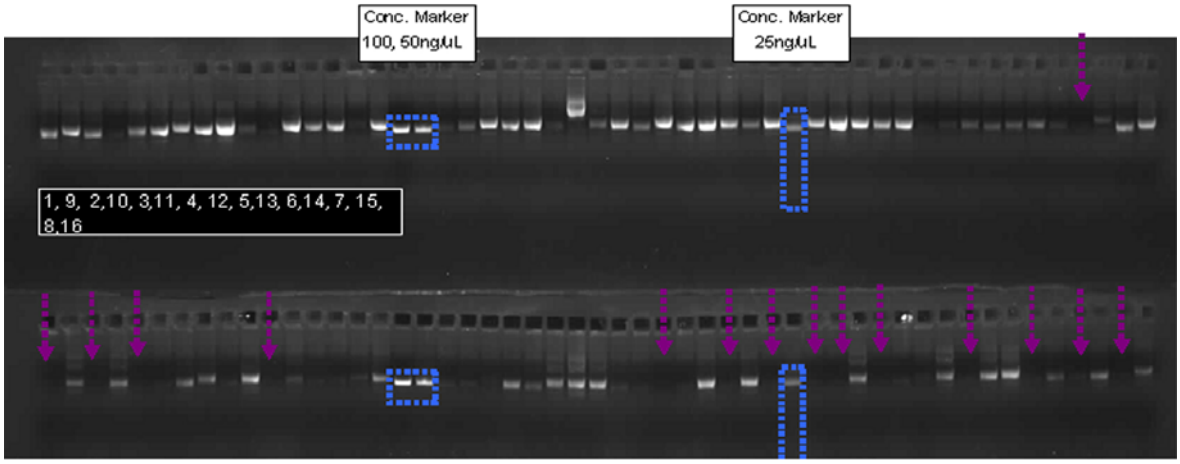
3. Sekvenování pozitivních klonů

Pozitivní klony byly sekvenovány (Obr. 5.), opakující se motivy byly vyhledány a potvrzeny programem Tandem Repeats Finder 4.00 (Benson, 1999). Sekvence, které nemusí být specifikovány, jsou prohledávány algoritmem a jsou v nich nalézány tandemové repetice.

Výsledky uvedené v této práci vychází pouze z informací získaných metodami popsanými do třetího bodu. Na dokončení genomové mikrosatelitové knihovny se pracuje.

4. Navržení primerů pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů

Vychází se ze získaných sekvencí v blízkosti repetitivních oblastí. Primery musí být navrženy tak, aby nasedaly pouze v oblastech kolem repetic, nikoli na jiných místech v genomu. Navrhování jedinečných primerů se provádí počítačovými programy OLIGO, Primer 3, atd., které vhodná primerová místa najdou.



Obrázek 5: Koncentrace klonu s inzertem na gelu pro sekvenaci.
Modré obdélníky kolem jamek označují množství DNA ve vzorku, fialové šipky ukazují jamky vzorků s nízkou/nulovou koncentrací. Čísla v rámečku odpovídají jednotlivým vzorkům.

5. Testování primerů a stupně alelického polymorfismu

Poslední fází vývoje knihovny mikrosatelitů je testování primerů na velkém množství vzorků. Je potřeba zjistit, zda primery nasedají na správných místech v genomu. U každého lokusu se testuje stupeň polymorfismu, přítomnost nulových alel a vazebná nerovnováha.

3.2 PŘÍPRAVA DATOVÉHO SOUBORU PRO FYLOGENETICKOU ANALÝZU

Odlov adultních jedinců byl prováděn elektrolovem (160-220 V, 2,0-3,1 A) v časovém rozmezí 2004-2009. Jedincům byl ustřižen kus prsní ploutve, který byl uložen do 96% alkoholu. Z takto fixovaných vzorků byla izolována DNA, podle které byly sekvenovány geny pro cyt *b* a RAG-1. To platí pro vzorky uložené ve sbírce Oddělení ekologie ryb na Ústavu biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., Květná 8, Brno.

Bylo vyhodnoceno 146 vzorků (Tab. I.), z toho 112 bylo sekvenováno na Ústavu biologie obratlovců AV ČR. Zbylých 30 sekvencí genu pro cyt *b* poskytlo Národní muzeum v Praze a 4 sekvence byly získány z databáze GenBank.

Pro genetický marker RAG-1 bylo sekvenováno 39 vzorků. Tento marker byl sekvenován pouze u vzorků dostupných na Ústavu biologie obratlovců AV ČR.

Tabulka I: Přehled analyzovaných vzorků pro cyt *b* a RAG-1.
U tučně označených vzorků sekvenován i gen pro RAG-1. Označení haplotypu a linie platí pro analýzy genu cyt *b*. Vzorky uloženy ve sbírce Oddělení ekologie ryb Ústavu biologie obratlovců AV ČR v. v. i (bez zkratky) a v Národním muzeu v Praha (NMP). (Uvedeny pouze vzorky pocházející z ČR, SR, PL a FRA)

Vzorek (sekvence)	Haplotyp	Linie
9420	H_1	
9267, 9268, 9270, 9271, 9272, 9409, 9410, 9411, 9412, 9413, 9415, 9416, 9417, **9418**, 9534, 9535, 9537, 9539, 9540, 9541, 9542, 9543, **9545**, 9548, 9694, **9695**, **9696**	H_2	
9547	H_3	
4456	H_4	
6261	H_5	
6263	H_6	
6262	H_7	
8076	H_8	
9536	H_9	
9546	H_10	
4447, **4448**, 4449, 4611, **4612**, 4613, 5613**,** 5617, **5633**, 6887, **8075**, **8081**, 8822, 8921, 8922, 8924, **8925**, 9244, 9419, 9421, Y10445 (GenBank)	H_11	L_I
8086	H_12	
4446	H_13	
6614	H_14	
9106	H_15	
8719	H_16	
8921, **8925**	H_17	
4266, 4333	H_18	
4614	H_19	
4478	H_20	
4328	H_21	
9245	H_22	
9603	H_23	
9605	H_24	
9604	H_25	
9610	H_26	
5696, 5697, 5699, **5700**, 8718, 8720, 8721	H_27	
8717	H_28	
4605	H_29	
4450, 8080	H_30	
9105	H_31	
8085	H_32	
9611	H_33	
6888	H_34	
4607	H_35	
6260	H_36	
9423	H_37	

Izolace DNA

Celková genomová DNA byla izolována fenol-chloroform-izoamylalkoholovou metodou (Sambrook *et al*., 1989) s modifikacemi takto:

1. Vzorek ploutve osušit a vložit do 1,5 ml mikrozkumavky;
2. Přidat 500 µl STE pufru;
3. Přidat 30 µl 10% SDS;
4. Přidat 10 µl proteinázy K (20mg/ml 50% glycerolu ve vodě);
5. Inkubovat v termobloku při 50 °C přes noc;
6. V digestoři přidat 500 µl směsi fenol:chloroform:izoamylalkohol (PCIA) 25:24:1;
7. Točit 10 min. na kolotoči;
8. Centrifugovat 10 min. při 4 °C a 14 000 otáčkách (14 000/10´/4 °C);
9. Přenést horní fázi do nové mikrozkumavky;
10. V digestoři přidat 500 µl PCIA;
11. Točit 10 min. na kolotoči;
12. Centrifugovat 14 000/10´/4 °C;
13. Přenést horní fázi do nové mikrozkumavky;
14. V digestoři přidat 500 µl směsi chloroform:izoamylalkohol 24:1;
15. Točit 10 min. na kolotoči;
16. Centrifugovat 14 000/10´/4 °C;
17. Přenést horní fázi do nové mikrozkumavky;
18. Přidat 2-3 díly 96% etanolu;
19. Jemně protřepat a po vysrážení DNA pomalým obracením nechat klubíčko DNA sbalit a klesnout ke dnu;
20. Centrifugovat 14 000/30´/4 °C;
21. Odlít supernatant;
22. Přidat 350 µl 70% etanolu;
23. Centrifugovat 14 000/30´/4 °C;
24. Odlít supernatant a vysušit pod alobalem;
25. DNA rozpustit v 150-200 µl TE pufru.

Koncentrace DNA byla vypočítána podle absorbance při 260 nm.

Geny pro cyt *b* (1140 bp) a RAG-1 (1497 bp) se amplifikovaly pomocí PCR na termocykleru TGRADIENT (Whatman Biometra). Amplifikace proběhla použitím primerů GluDG.L (5´-TGACT TGAAR AACCA YCGTTG-3´) a H16460 (5´-CGYC TTCGG

ATTAA CAAGA CCG-3´) (Perdices a Doadrio, 2001) pro gen cyt *b* a pro RAG-1 pomocí vnějších primerů RAG1_F1(5´-CTGAGCTGCAGTCAGTACCATAAGATGT-3´) a RAG1_R1 (5´-CTGAGTCCTTGTGAGCTTCCATRAAYTT-3´) nebo RAG1_R2 (5´-TGAGCCTCCATGAACTTCTGAAGRTAYTT-3´) a vnitřním primerem RAG1_R3 (5´- GTC TTG TGS AGG TAG TTG GT - 3´).

Složení PCR směsi pro cyt *b*:

ddH_2O	podle množství DNA
Taq pufr (+ $(NH_4)_2SO_4$)(10x)	5 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	3 µl (1,5 mM)
dNTP (10 mM)	1 µl (0,2 mM)
primery (100 mM)	každý 1 µl (2 mM)
DNA	podle koncentrace
Taq DNA polymeráza (Fermentas) (5 U/ µl)	0,4 µl
celkový objem	50 µl

Podmínky PCR pro cyt b (Perdices a Doadrio, 2001):

predenaturace	94 °C/ 120 s
	94 °C/45 s
5 cyklů	53 °C/45 s
	72 °C/90 s
	94 °C/45 s
29 cyklů	58 °C/45 s
	72 °C/90 s
	72 °C/560 s
chlazení	4 °C

Reakční směs pro RAG-1:

ddH_2O	podle koncentrace DNA
10x ExTaq pufr+Mg^{2+}	5 µl
dNTP (2,5 mM)	4 µl
primery (100 mM	každý 0,5 µl (1 mM)
DNA	podle koncentrace
Takara ExTaq (5 U/ µl)	0,25 µl
celkový objem	50 µl

Reakční podmínky pro RAG-1 (Šlechtová, 2008):

predenaturace	95 °C/300 s
	94 °C/60 s
5 cyklů	56 °C/150 s
	72 °C/120 s
	94 °C/120 s
30 cyklů	54 °C/150 s
	72 °C/120 s
	72 °C/120 s

Reakční podmínky pro RAG-1 (Chen *et al*., 2007):

predenaturace	95 °C/240 s
	95 °C/45 s
35 cyklů	51 °C/30 s
	72 °C/90 s
	72 °C/420 s

Úspěšnost PCR byla kontrolována na 1,7% gelu s přidáním ethidium bromidu pod UV zářením. Úspěšně amplifikované vzorky byly přečištěny pomocí precipitace ve směsi PEG/Mg/NaAc následujícím postupem:

1. Do zkumavky s 40 µl amplifikátu napipetovat 40 µl PEG/Mg/NaAc (1:1);
2. Protřepat na vortexu, nechat stát 10-15 min. při laboratorní teplotě;
3. Centrifugovat 14 000/20´/4 °C;
4. Odsát supernatant, k peletu přidat 200 µl 96% etanolu, protřepat na vortexu;
5. Centrifugovat 14 000/5´/4 °C;
6. Odsát supernatant, promýt 200 µl 70% etanolu;
7. Centrifugovat 14 000/5´/4 °C;
8. Odsát supernatant, pelet vysušit pod alobalem;
9. DNA rozpustit ve 25 µl ddH_2O.

Z přečištěných vzorků bylo odebráno vždy 2 µl a zkontrolována koncentrace DNA ve spektrofotometru (Helios Gamma, Thermo Spectronic). Byla připravena sekvenační PCR pro amplifikaci genu pro cyt *b* i RAG-1, ve které byla požadovaná koncentrace DNA 30-70 ng.

Složení sekvenační PCR směsi:

ddH_20	podle množství DNA (0-5 µl)
pufr (5x)	2 µl (1x)
sekvenační kit	2 µl
primer (5 mM)	1 µl (0,5 mM)
DNA	podle koncentrace (1-5 µl)
celkem	10 µl

Sekvenační kit (ABI PRIM Big Dye Termintor Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) obsahuje Ampli Taq DNA polymerázu FS, dNTPs, fluorescenčně značené ddNTP (Dye-Labeled Terminators).

Podmínky sekvenační PCR:

	96 °C/30 s
35 cyklů	50 °C/20 s
	60 °C/240 s

Produkty reakce byly přečištěny metodou EtOH/EDTA precipitace:

1. Po sekvenační PCR produkty přenést do zkumavek pro sekvenování;
2. Přidat 2,5 µl 125 mM EDTA;
3. Přidat 25 µl 96% etanolu;
4. Uzavřít, 4x převrátit, stočit a nechat stát při laboratorní teplotě 15 min.;
5. Centrifugovat 3000/30´/4 °C;
6. Odsát supernatant, přidat 30 µl 70% etanolu;
7. Centrifugovat 1650/15´/4 °C;
8. Odsát supernatant, vysušit v termobloku pod alobalem při 60 °C;
9. Pelet rozpustit ve 20 µl formamidu.

Přečištěné vzorky byly zbaveny nezreagovaných komponent a denaturovány v termobloku při 95 °C/120 s a pak rychle zchlazeny na ledu, aby nedošlo k opětovnému spojení řetězců DNA. Takto nachystané vzorky byly vloženy do automatického podavače (autosampleru) genetického analyzátoru ABI PRIM 310 (Applied Biosystems).

3. 3 NÁSTROJE PRO VYHODNOCENÍ FYLOGENEZE

Získané sekvence byly zpracovány v programu MEGA 4.0.1 (Kumar *et al*., 2004), srovnány do „alignmentu“ a zarovnány na stejnou délku. Blok sekvencí genu pro cyt *b* měl konečnou délku 992 bp a délka „alignmentu“ genu pro RAG-1 byla 1107 bp. Program MEGA 4.0.1 posloužil k zjištění předběžné míry genetické variability a soubory uložené v tomto programu sloužily jako matrice pro konvertování do ostatních vyhodnocovacích softwarů.

Haplotypové sítě byly zhotoveny v programu TCS 1.21 (Clement *et al*., 2000) s využitím statistické parsimonie (Templeton *et al.*, 1992). Počet kroků potřebných pro oddělení byl zadán 10 a spojovací limit 95%. Program vyhodnotí zadané bloky sekvencí na základě jejich substituční a indelové rozmanitosti a roztřídí sekvence do jednotlivých haplotypů.

Haplotypová (Hd) a nukleotidová diverzita (π) (Nei, 1987) byla vyhodnocena počítačovým programem DNA SP 5.10 (Librado a Rozas, 2009).

Fylogenetické stromy byly konstruovány na základě Bayesovské analýzy (BI) pomocí programu MrBayes 3.12 (Ronquist a Huelsenbeck, 2005), metody Neighbour-joining (NJ) (Saitou a Nei, 1987) a Maximum parsimony (MP) v programu PAUP* 4.0B.10 (Swofford,

2002). Metoda Maximum likelihood (ML) bylo aplikováno pomocí programu PhyML (Guindon a Gascuel, 2003).

Pomocí programů PAUP* 4.0B.10 a ModelTest 3.8 (Poseda, 2006) byl z 56 různých evolučních modelů vybrán ten nejvhodnější pro analyzovaný datový soubor. Substituční model byl vybrán dle Akaikeho kritéria (AIC) porovnávajícího váhu všech modelů. V rámci NJ analýzy byly počítány DNA distance na pozadí nejvhodnějšího modelu mezi liniemi a uvnitř linií. Neparametrická bootstrap analýza s 1000 pseudoreplikacemi byla prováděna pro získání odhadu nodální podpory.

Fylogram MP byl sestaven analýzou nevážené parsimonie s heuristickým vyhledáváním. Bootstrap hodnota stanovena na 100 opakování určila stupeň spolehlivosti výsledných vztahů.

ML analýza proběhla s heuristickým vyhledáváním a zadanými 1000 bootstrap replikacemi.

Výsledný strom byl upraven v programu FigTree, v1.2.1 (Rambaut, 2009).

Program ProtTest 2.4 (Abascal *et al*., 2005) vybral nejvhodnější evoluční model pro translatované sekvence genu cyt *b*.

Jako outgroup byla zvolena sekvence druhu *Alburnus arborella* (GenBank přístupové číslo GU479874; Buj *et al*., 2010).

4 VÝSLEDKY

4.1 CHARAKTERIZACE DATOVÉHO SOUBORU A OPTIMALIZACE

Celkem bylo analyzováno 146 vzorků sesbíraných Oddělením ekologie ryb a na základě spolupráce s Národním muzeem a zahraničními kolegy. Výběr lokalit sběru pokrýval hlavní distribuční oblasti zkoumaných taxonů. (Počet zjištěných haplotypů a nukleotypů není uveden, protože tyto informace budou teprve publikovány).Cyt *b* haplotypová diversita byla Hd=0,945±0,012, nukleotidová diversita π= 0,032±0,003 byla úměrná počtu zjištěných substitucí. Počet variabilních pozic byl 217, invariabilních 773 a parsimony informativních míst 194. Nukleotidová sekvence byla translatována do řetězce obsahujícího 330 aminokyselin. Z velké většiny převažovaly synonymní substituce, což se odrazilo na nízké aminokyselinové diverzitě. V rámci druhu *A. bipunctatus* bylo odhaleno 37 mitochondriálních haplotypů a 6 nukleotypů. Cyt *b* haplotypová diverzita byla Hd=0,857±0,027. Většina haplotypů se odlišovala pouze v několika málo substitucích, což představovalo velmi nízkou nukleotidovou diverzitu π= 0,003±0,0003. Počet variabilních pozic byl 42, invariabilních 949 a parsimony informativních míst 16.

Pro amplifikaci markeru RAG-1 byly používány čtyři primery. Ukázalo se, že s primery RAG_F1 a RAG_R2 poskytuje PCR u analyzovaných vzorků produkt ve větší míře. Zatím co úspěšnost při použití primerů RAG_R1 a RAG_F1 byla téměř nulová. Přesto výtěžnost reakce nebyla dostačující a přistoupilo se k navýšení počtu cyklů z 30 na 40. Při sekvenační PCR byl použit jako třetí primer RAG_R3, z kterého však amplifikace požadovaného produktu neprobíhala dobře. Proto se přistoupilo k další optimalizaci. Nejkvalitnějších výsledků bylo dosaženo při amplifikaci žádaného produktu z primerů RAG_F1 a RAG_R3. Sekvenační PCR pak vycházela pouze ze dvou primerů.

General time-reversible model (Lanave *et al*., 1984) s počítáním gama distribuce a zahrnutím invariabilních pozic (GTR+Γ+I) byl zvolen ideálním pro cyt b sekvenční matrici a byl použit pro statistické metody NJ a ML.

Nastavení nejlepšího modelu pro ML: Gamma shape parametr: 1,249; proporce invariant: 0,599; nukleotidové frekvence: f(A)= 0,24945, f(C)= 0,29158; f(G)= 0,16412; f(T)= 0,29485 a Log-likelihood score: -4406,28309. Parametry charakterizující MP strom: TL (délka stromu)= 590; CI (consistency index)= 0,555; RI (retention index)=0,7183. V Bayesovské analýze byly parametry modelu určeny osmi Markovovými řetězci, 3 x 10^6 generací se samplovací frekvencí 100, které byly zahájeny z náhodného stromu.

Bayesovská analýza aminokyselinového řetězce probíhala pod modelem MtREV+I. Bylo generováno 2,5 milionů generací se samplovací velikostí 1000.

Počítání distanční vzdáleností pro gen RAG-1 bylo provedeno podle modelu Tamura Nei se zahrnutím invariabilních pozic (TrN+I) (Tamura a Nei, 1993). Charakteristiky ostatních metod nejsou uvedeny z důvodu malé vypovídající hodnoty tohoto markeru.

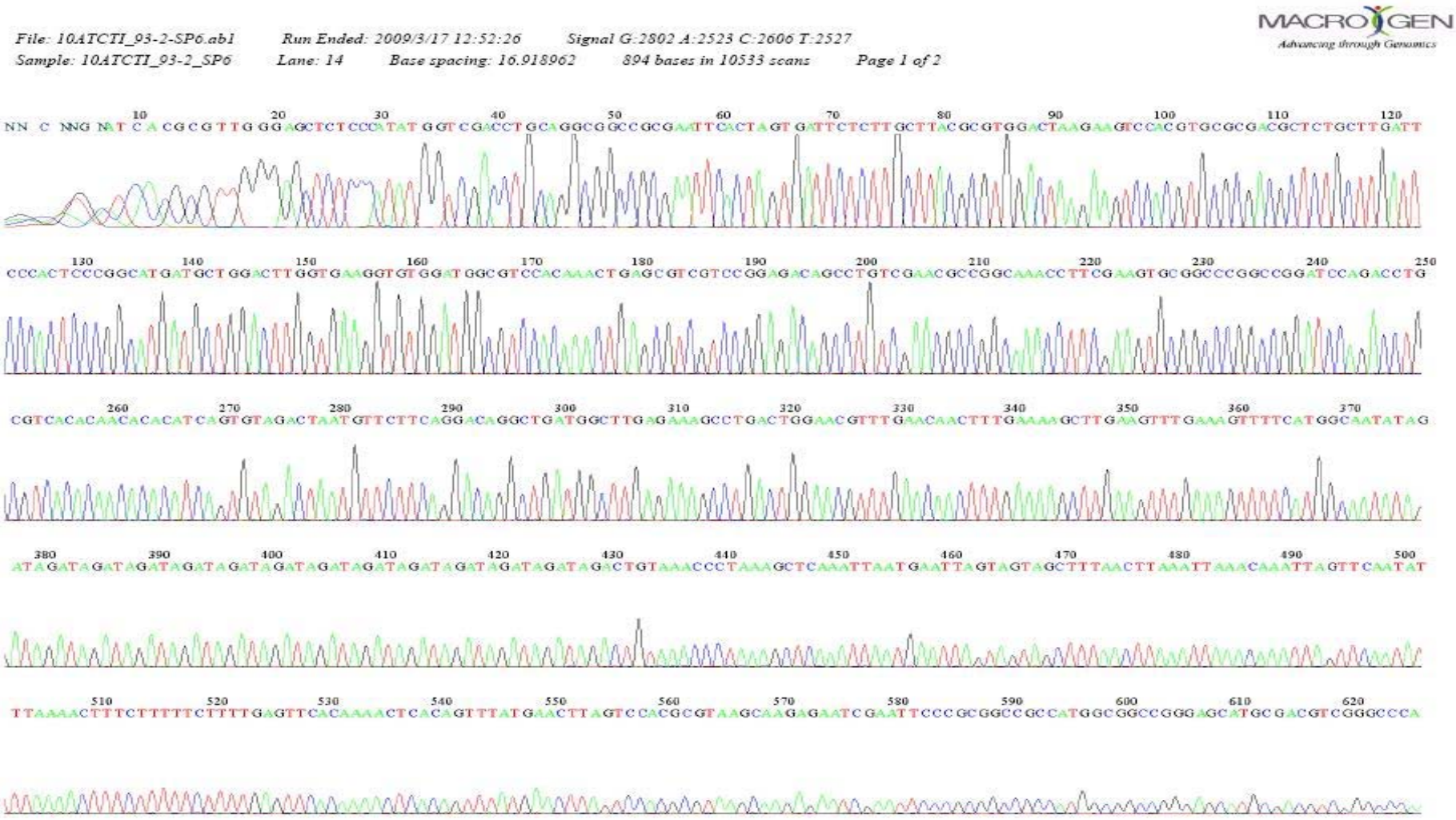
4. 2 ANALÝZA KNIHOVNY MIKROSATELITŮ

Sekvenované inzerty byly prohledány programem Tandem Repeat Finder (Benson, 1999) a byly v nich nalezeny očekávané opakující se motivy. V jednom souboru dat byly hledány dinukleotidové repetice TG a v druhém tetranukleotidové ATCT a jejich variace.

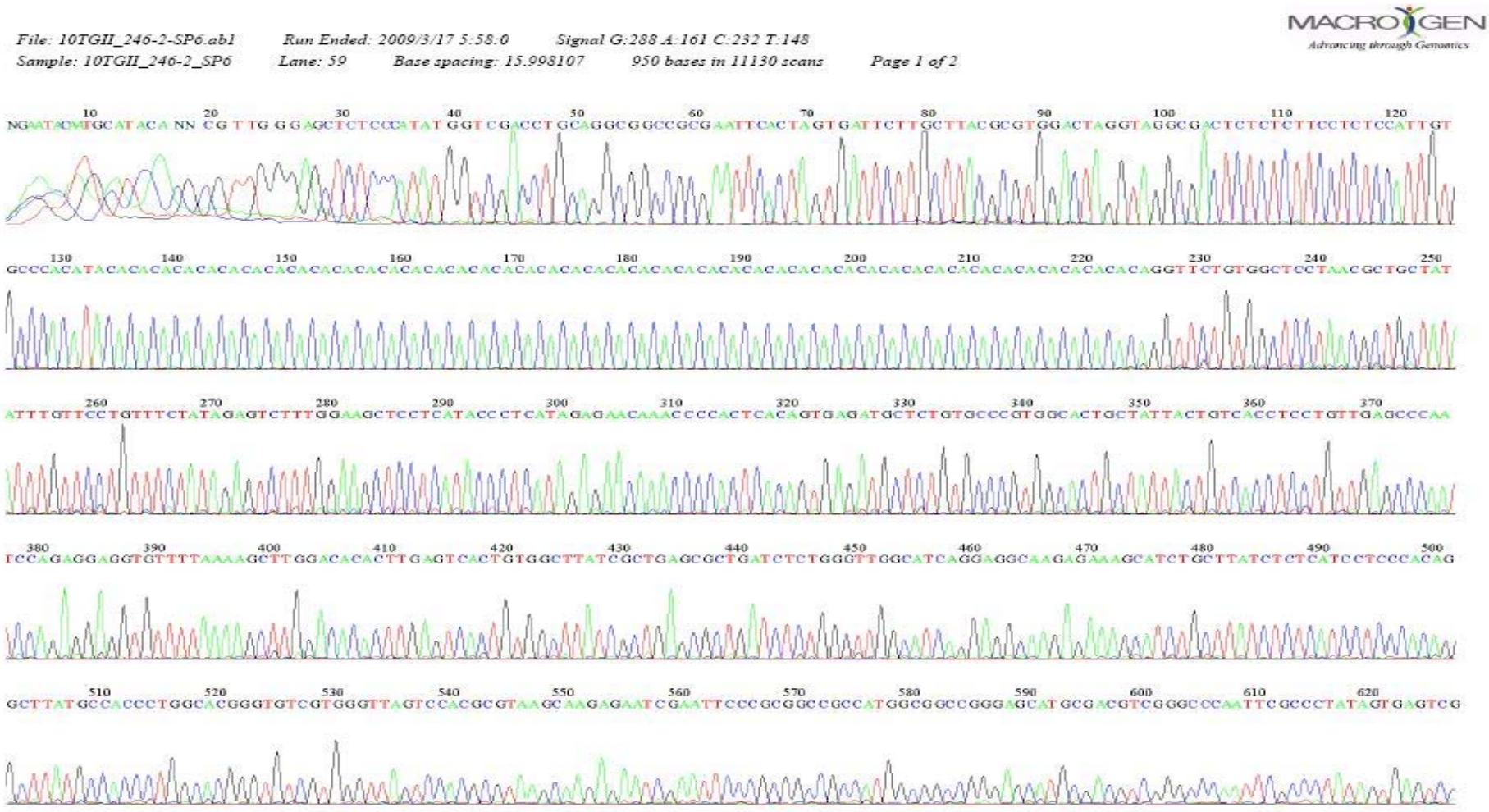
Bylo objeveno 50 inzertů dinukleotidových a 79 inzertů tetranukleotidových repetic. Všechny sekvence jsou dostupné na vyžádání na web stránkách školitele (http://www.ivb.cz/zamestnanci-mgr-jan-mendel-ph-d.html). Pro ilustraci jsou uvedeny jen modelové sekvence demonstrující dokonalé (Obr. 6.), nedokonalé (Obr. 7.), přerušované (Obr. 8.) a složené (Obr. 9.) mikrosatelity v genomu *A. bipunctatus*. Lokusy specifické pouze dokonalými mikrosatelity jsou uvedeny v Tabulce II.

Tabulka II: Ukázka lokusů a počet repeticí dokonalých tetranukleotidových a dinukleotidových mikrosatelitů.

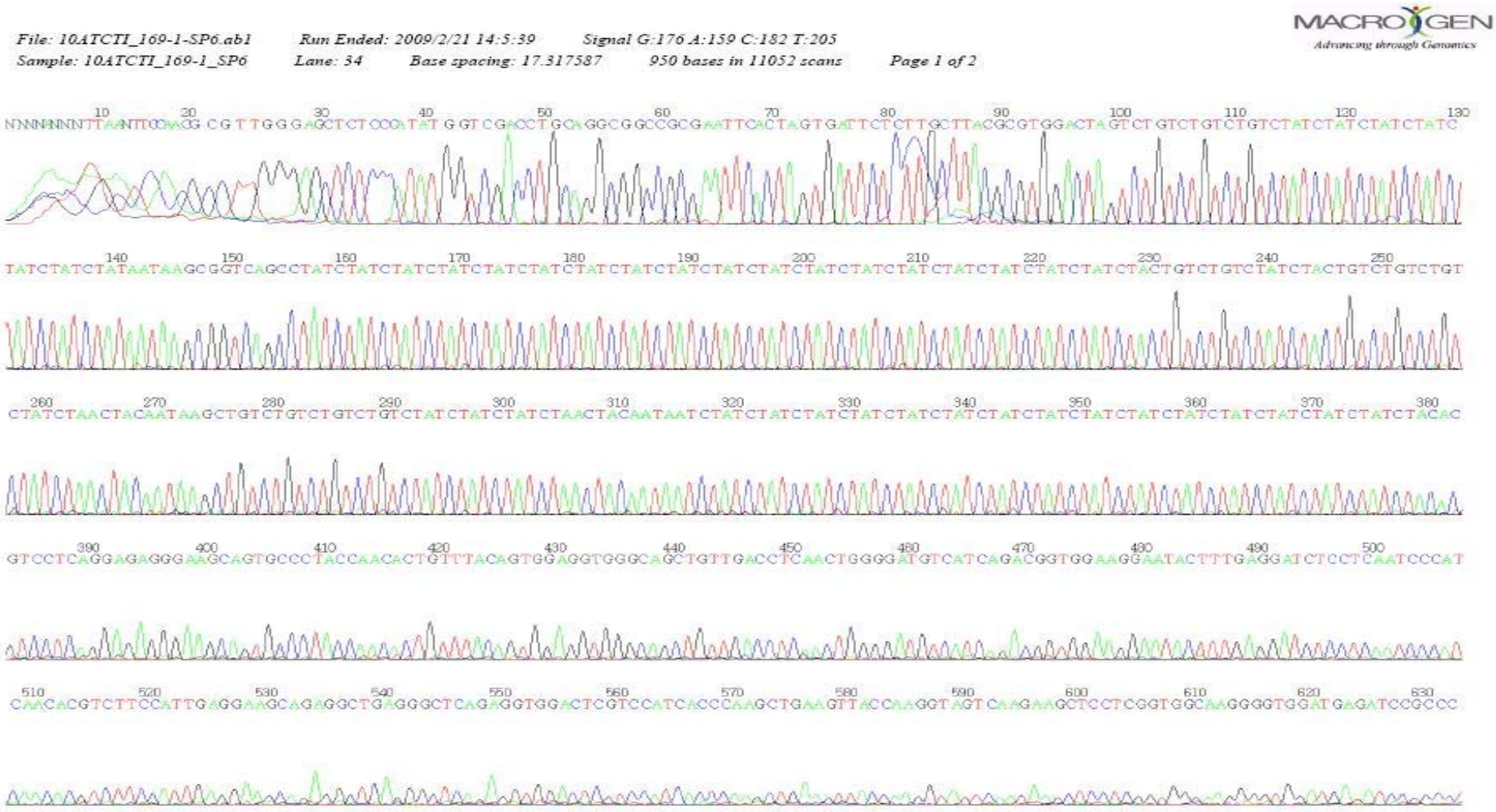
Lokus	Repetitivní motiv
10ATCTI_46-2	$(GATA)_{20}$
10ATCTI_72-2	$(GATA)_{27}$
10ATCTI_93-2	$(ATAG)_{14}$
10ATCTI_165-2	$(ATAG)_{25}$
10ATCTI_194-2	$(ATCT)_{17}$
10ATCTI_271-2	$(TACT)_{29}$
10ATCTI_273-2	$(TAGA)_{18}$
10ATCTI_293-2	$(GATA)_{22}$
10ATCTII_205-1	$(GATA)_{30}$
10ATCTII_211-1	$(CTAT)_{30}$
10ATCTII_224-1	$(GATA)_{33}$
10ATCTI_196-2	$(ATAG)_{26}$
10ATCTI_48-1	$(ATCT)_{19}$, $(ATCT)_{32}$
10ATCTI_107-1	$(TACT)_{26}$
10ATCTI_124-1	$(CTAT)_{37}$
10ATCTI_154-1	$(TAGA)_{28}$
10ATCTI_173-1	$(AGAT)_{14}$
10ATCTII_189-1	$(TATC)_{19}$
10TGI_114-2	$(TG)_{37}$
10TGI_215-2	$(TG)_{8}$
10TGII_206-1	$(AC)_{30}$



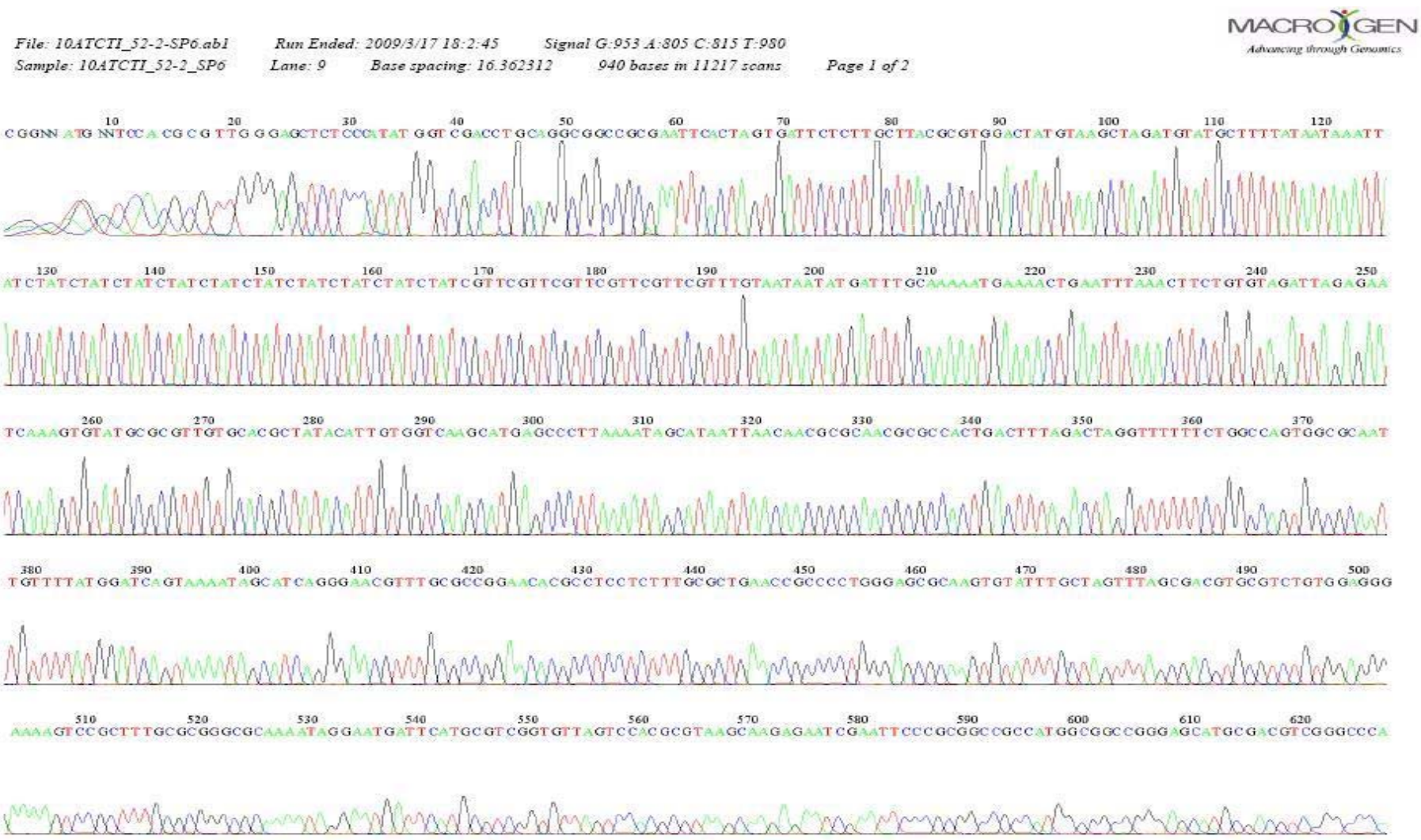
Obrázek 6: Ukázka sekvence obsahující dokonalý mikrosatelit (pozice 374-429). Prvních asi 90 bazí je součástí vektoru.



Obrázek 7: Ukázka sekvence obsahující nedokonalý mikrosatelit (pozice 128-226,pozice 133 substituce T). Prvních asi 90 bazí je součástí vektoru.



Obrázek 8: Ukázka sekvence obsahující přerušovaný mikrosatelit v kombinaci se složeným (pozice 100-112, 112-230 přerušení 146-154). Prvních asi 90 bazí je součástí vektoru.



Obrázek 9: Ukázka sekvence obsahující složený mikrosatelit (pozice 126-189). Prvních asi 90 bazí je součástí vektoru.

4. 3 GENETICKÁ VARIABILITA V GENU PRO CYT B

Předložené výsledky vycházejí z variability 992bp úseku genu pro cyt *b*. Získaný soubor dat byl pro lepší orientaci rozdělen na dvě skupiny. První skupinu tvořily populace druhu *A. bipunctatus*. Pro ilustraci je předložen přehled 42 variabilních pozic (Obr. 10). Jsou uvedeny, ale nejsou zde započítány variabilní místa u sekvencí z řek Ida (vzorek č. 6260) a Morava (vzorek č. 9423), protože jejich původ je nejasný, a proto budou předmětem dalšího zkoumaní.

Druhou skupinu představují vzorky převážně z lokalit orientovaných na východ od Slovenska (Obr. 11.). (Informace o druhé skupině nejsou publikována).

```
                       112 2222233344 4445555555 6666666777 7777777888 888888999]
                1114678691 2345904966 6772345567 2477889001 1125689001 144789078]
                1697735094 9289843736 9399890184 5569584091 5801619231 717262462]
#9420_Morava    CGGCTCCAAT CAGAAAGGCC CGACTACAAC CATGCTGAAC GAATTGGGCC AGACAATCT
#9541_Olsava    .....T.... .......... .......... .......... .......... .........
#9547_Olsava    .....T.... .......... .......... .......... ...C...... .........
#4456_Olsava    .....T..G. ..K....... .......... .........M .......... .........
#6261_Ida       .....T.... .......... ..C....... .......... .......... .........
#6262_Ida       .....T.... .......... ..C....... .C........ .......... .........
#6263_Ida       .....T.... .......... ..C....... ....G..... .......... .........
#9536_Bodva     .....T.... ........G. .......... .......C.. .......... ....G....
#5633_Vlara     .......... .......... .......... ......A... .......... .........
#8086_Rudava    .......... .......... .......... ......A... ....C..... .........
#4446_Jihlava   .......... .C........ .......... ......A... .......... .........
#6614_Vlara     .......... .......... .......... ...A..A... .......... .........
#9106_Morava    .......... .......A.. .......... ......A... .......... .........
#9604_Dyje      ...T...... .......... .......... ......A... .......... .........
#9610_Dyje      ...T...... ........GG G......... ......A... .......... .........
#9245_Solinka   .......... ........G. .......... ......A... .......... .........
#9605_Dyje      .....T.... ........GG G......... ......A... .......... .........
#9603_Dyje      .......... ........G. .....GAC.. ......A... .......... .........
#8921_8925_Olse .......... .......... .......... ......A..A .......... .........
#4266_Becva     .......... ..K....... .T........ ......A..M .......... .........
#4478_Becva     ......T... ..T....... .T......G. ......A... ........T. .........
#4328_Morava    .......... ..T....... .T..C..... G.....A..M ...C...... .A.......
#8719_Kocaba    .......... .......... .......... ......A... .......... .......T.
#5700_Jevisovka .....T.... .......... .......... ......A... .......... .......T.
#8717_Kocaba    .....T.... .......... .......... ......A... .TT....... .......T.
#8076_Rudava    .....T.... .......... ..C....... .C....A... .......... .........
#4605_Jevicka   .....T.... T......... .........T ......A... .......... .......TG
#4607_Jevicka   .....T.... ...C...... .......... ......A... .......... .........
#4450_Jihlava   .....T.... T......... .........T ......A... .......... ........G
#9105_Svratka   .....T.... T..G...... .........T ......A... .......... ........G
#8085_Rudava    .....T.... T......... .........T ......A... ......A... ........G
#9546_Olsava    .....T.... ........T. .......... ..C....C.. .......... .........
#9611_Dyje      .....T.... T.......GG .........T ......A... .......... ........G
#6888_Jihlava   .....T.... T......... .......... ......A... .......... ........G
#4614_Jevicka   .......... ..K....... .T.T...... ......A..M .......... .........
#9423_Morava    TAA.CT.G.C .G..GGA.G. .......... ......A... .......... .........
#6260_Ida       .....T.... .......... ..C....... .C..GCACG. A....AAA.A G.GA.GC.G
```

Obrázek 10: Variabilní pozice genu cyt *b* u zástupců *A. bipunctatus*. Tečky znázorňují shodné nukleotidy s první sekvencí. Čísla v horní části vyjadřují pozice nukleotidů v sekvenci.

4. 4 HAPLOTYPY RODU Alburnoides PODLE MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERIZACE GENU PRO CYT B

V Tab. I. jsou uvedeny identifikační čísla vzorků uložených v OER a NMP z kterých byly sekvence genu pro cyt *b* získány a jejich přístupová čísla v databázi GenBank (HM173097-HM173175) (Tab. III.). (V Tab. I. a III. uvedeni jen zástupci druhu *A. bipunctatus*)

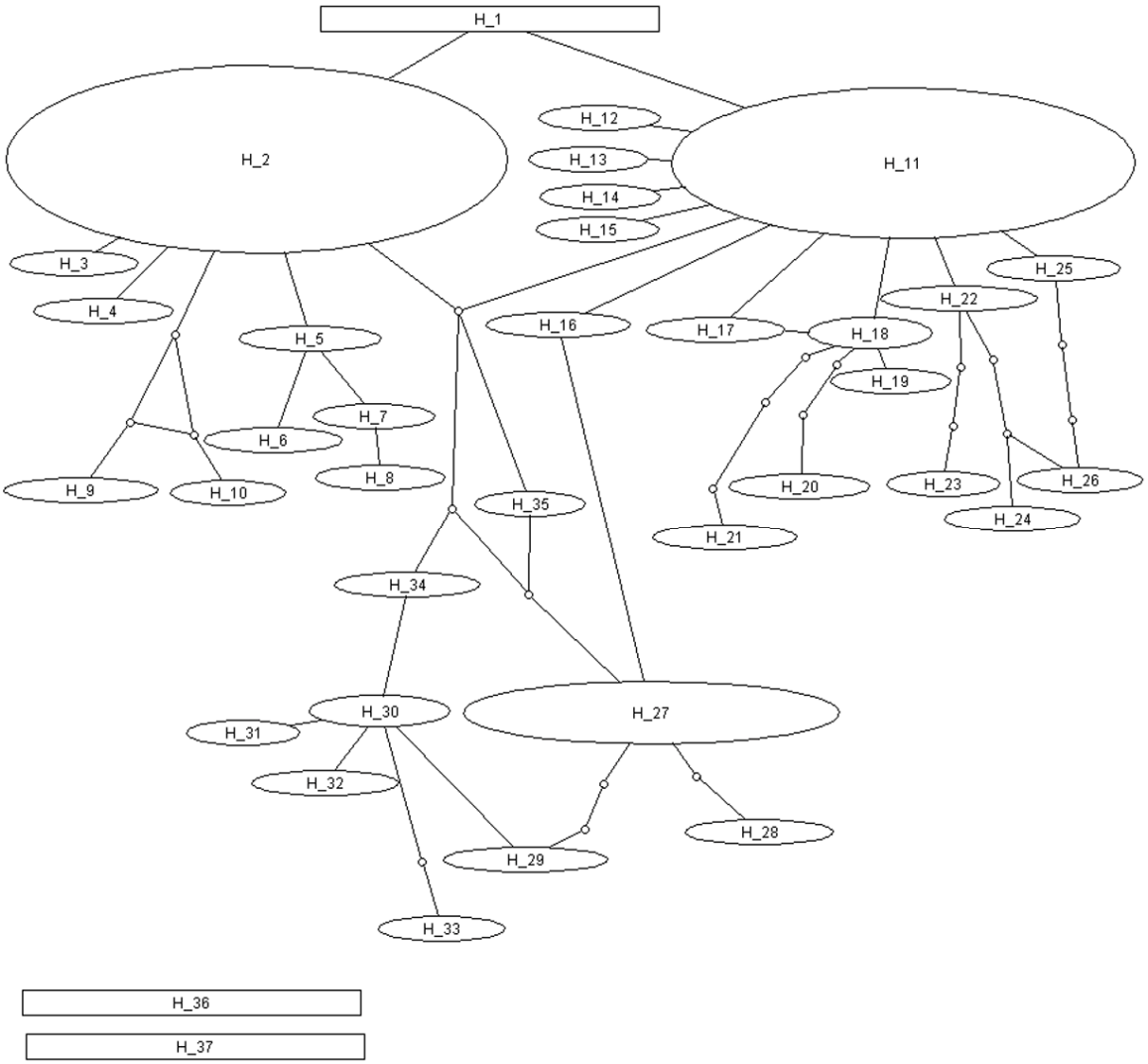
Na Obr. 12. je zobrazena haplotypová síť jedinců odchycených na českých, slovenských a polských lokalitách a jeden databázový jedinec z Francie (řeka Saone). Přesněji se jednalo o řeky: v ČR - Bečva, Dyje, Jevíčka, Jevišovka, Jihlava, Kocába, Morava, Olše, Rudava, Svratka; v SR - Ida, Ipel´, Bodva, Olšava, Vlára; v PL - Jasiolka, Nida, San, Skawinka, Solinka, Stara Rzeka, Strwiaz. Z celkového sekvenčního vzoru *A. bipunctatus* se vymykají dva haplotypy, tj. H_36 a H_37, které budou podrobeny dalšímu zkoumání pro svůj nejasný původ.

Na první pohled jsou patrné v haplotypové síti tři větší skupiny. Předpokládalo se, že tyto tři skupiny budou zastupovat jednotlivá úmoří. V průběhu analýz se však ukázalo, že zástupci ze stejných lokalit spadali do různých skupin. Nepotvrdilo se, že by jedinci z různých úmoří (popřípadě povodí) tvořili odlišné skupiny haplotypů.

Největší skupinu tvořil haplotyp H_2 čítající 27 jedinců, kterou tvořilo 9 jedinců z Jasiolky, 7 z Olšavy a 7 z Bodvy, po jednom zástupci z Nidy, Sanu, Skawinky a Staré Rzeky. Druhá největší skupina H_11 zahrnovalo 21 zástupců z Jihlavy (4 jedinci), Olše (4), Jevíčka (3), Rudavy (2), Moravy (2), Vláry (2), Svratky (1), Ipel´u (1) a Saony (1). Haplotyp 27 byl zastoupen čtyřmi jedinci z Jevišovky a třemi z Kocáby. Ostatní haplotypy jsou reprezentovány jedním nebo dvěma zástupci. Tito jedinci se liší v rozmezí jedné až šesti substitucí od hlavních haplotypů H_2, H_11 nebo H_27.

Přesný popis lokalit uvádí Tab. III.

(Pro vzorky druhů než *A. bipunctatus* není haplotypová síť zveřejněna. (Obr. 13.)).



Obrázek 12: Nezakořeněná haplotypová síť založená na sekvencích genu cyt *b*. Obsahuje haplotypy (H_1-37) z lokalit v ČR, SK, PL a FRA spadajících do úmoří Černého, Severního, Baltského a Středozemního moře. Jednotlivé uzly proporčně odpovídají haplotypové frekvenci (viz Tab. I. a III.). Délka větví je zanedbána.

4. 5 LINIE RODU Alburnoides PODLE MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERIZACE GENU PRO CYT B

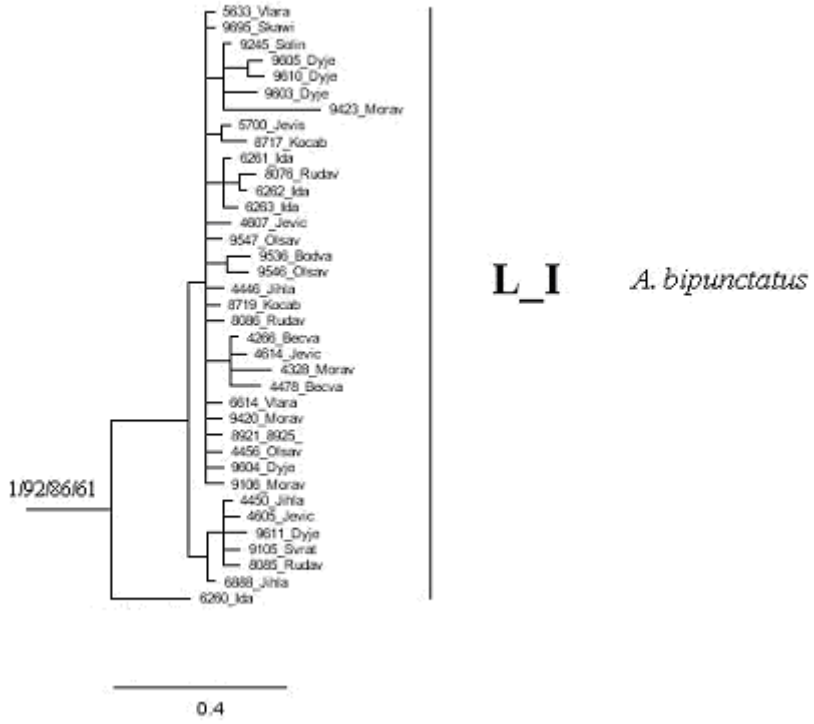
Výsledný strom (Obr. 14.) graficky znázorňuje genetickou vzdálenost vybraných zástupců jednotlivých linií. U uzlů fylogramu jsou v řadě za sebou napsány hodnoty Bayesovské posteriorní probability, NJ, MP a ML bootstrap podpory. Pokud mělo více jedinců identickou sekvenci genu pro cyt *b* je ve stromu uveden jen jeden zástupce.

Jedinci s haplotypy H_1-H_37 poskytly natolik podobné sekvence genu pro cyt b, že byly všemi analýzami sloučeny do Linie I, nesoucí druhové označení *A. bipunctatus*. Linie představuje zástupce čtyř úmoří (Balt, Černé, Severní, Středozemní moře) a zahrnuje území ČR, Slovenska, Polska a Francie. Průměrná vnitrodruhová variabilita byla 0,35 %.

Hlubší průzkum by bylo třeba provést u jedinců s haplotypy H_36 a H_37. Každý haplotyp byl zastoupen pouze jedním jedincem a sekvence genu pro cyt *b* vykazovaly vyšší sekvenční odlišnost od jedinců spadajících do druhu *A. bipunctatus*. Tyto dvě sekvence jsou příčinou zvýšení směrodatné odchylky v rámci Linie I. Rozmezí vnitrodruhové variability Linie I bylo 0,1-1,3 %. Toto procentuální rozmezí nezahrnuje vzorky z Idy (H_36) a Moravy (H_37), pro které distance vzrostly na 3,3 % a 2,0 %.

Tabulka III: Přehled jednotlivých haplotypů a nukleotypů podle lokalit včetně linijní příslušnosti.
Zařazení haplotypů do linií (L_I-XIII)/druhové označení. Lokalizace sběru vzorků, povodí, stát, označení haplotypů podle genu pro cyt *b*: H_1-37/počet jedinců, podle genu pro RAG-1: N_1-6/počet jedinců. (ČR: Česká republika, SR: Slovensko, PL: Polsko, FRA:Francie). Přístupová číslo v databázi GenBank. (Upraveno).

Linie/taxon	Řeka (oblast), povodí, stát, č. haplotypu/počet jedinců	NCBI (přístup. č.)
Linie_I / *A. bipunctatus*	Bečva, Morava, ČR, H_18/1, H_20/1, N_1/1; Bodva (Hostovce), Bodva, SR, H_9/1, H_2/7; Dyje (Podhradí), Morava, ČR, H_23/1, H_24/1, H_25/1, H_26/1, H_33/1, N_4/1, N_6/1; Ida, Bodva, SR, H_5/1, H_6/1, H_7/1, H_36/1, N_1/2; Ipeľ (stupeň), Dunaj, SR, H_11/1; Jasiolka, Visla, PL, H_2/9, N_4/1; Jevíčka (U Nerázka), Morava, ČR, H_11/3, H_19/1, H_29/1, H_35/1, N_4/1; Jevišovka (Lechovice), Morava, ČR, H_27/4, N_1/1; Jihlava (Iváň, Dolní Kounice), Morava, ČR, H_11/4, H_13/1, H_30/1, H_34/1, N_1/1; Kocába (Pouště), Vltava, ČR, H_16/1, H_27/3, H_28, N_1/2; Morava (Dub, Tovačov), Morava, ČR, H_1/1, H_11/2,H_15/1, H_18/1, H_21/1, H_37/1, N_4/1; Nida, Visla, PL, H_2/1; Olšava (Topľá, Opiná, Bidovce, N. Myška), Tisa, SR, H_2/7, H_3/1, H_4/1, H_10/1, N_1/1, N_2/1, N_4/1; Olše (Třinec), Odra, ČR, H_11/4, H_17/1, N_1/1; Rudava (pod jezem), Dunaj, SR, H_8/1, H_11/2, H_12/1, H_30/1, H_32/1, N_1/1, N_4/2; San, Visla, PL, H_2/1; Saone, Loire, FRA, H_11/1; Skawinka, Visla, PL, H_2/1, N_5/1; Solinka, Visla, PL, H_22/1, N_3/1; Stara Rzeka, Visla, PL, H_2/1, N_3/1; Strwiaz, Dněstr, PL, H_11/1 Svratka (Tišnov), Morava, ČR, H_11/1, H_31/1, N_6/1; Vlára (hranice), Dunaj, SR, H_11/2, H_14/1, N_1/1;	HM173097, HM173098, HM173099, HM173100, HM173101, HM173102, HM173103, HM173104, HM173105, HM173106, HM173107, HM173108, HM173109, HM173110, HM173111, HM173112, HM173113, HM173114, HM173115, HM173116, HM173117, HM173118, HM173119, HM173120, HM173121, HM173122, HM173123, HM173124, HM173125, HM173126, HM173127, HM173128, HM173129, HM173130, HM173131



Obrázek 14: Bayesovský konsenzuální strom sestrojený na základě sekvencí genu cyt *b*.
Čísla v uzlech stromu představují hodnoty bayesovské posteriorní probability a bootstrap podpory použitých statistických metod v pořadí BI/MP/NJ/ML. Zobrazeny jsou hodnoty jen nad 75%. Vyznačena Linie I (L_I) patřící do druhu *A. bipunctatus*. (Získané výsledky zde nebudou zveřejněny).

Zmíněné zařazení jedinců k druhu koreluje s informacemi autorů Kottelat a Freyhof (2007). Uváděné lokality typické pro druh *A. bipunctatus* korespondují s výše popsanými sběrovými lokalitami. Procentuální odlišnost od ostatních druhů je zobrazena v Tab. IV (Tabulka není poskytnuta, protože obsahuje informace, které zatím nebudou publikovány).

4. 6 HAPLOTYPOVÁ SÍŤ VARIABILITY GENU PRO RAG-1

Jako druhý marker pro zkoumání genetické variability u rodu *Alburnoides* byl zvolen jaderný gen pro RAG-1. Bylo získáno celkem 39 sekvencí ze vzorků označených tučně v Tab. I. Je nutno podotknout, že analýze genu pro RAG-1 nebyly podrobeny vzorky z Národního muzea v Praze. Sekvence byly zarovnány do bloku o délce 1107 bp.

Některé jaderné markery poskytují jistou variabilitu i díky evidenci indelů, tj. inzercí nebo delecí. Pro studium fylogeneze rodu *Alburnoides* gen RAG-1 byl shledán nevhodným. Na 1107 bazí sekvence připadalo pouze devět variabilních míst, z čehož čtyři byly heterozygotního charakteru (Obr. 15.) (Uvedeny pouze vzorky z ČR, SR a PL).

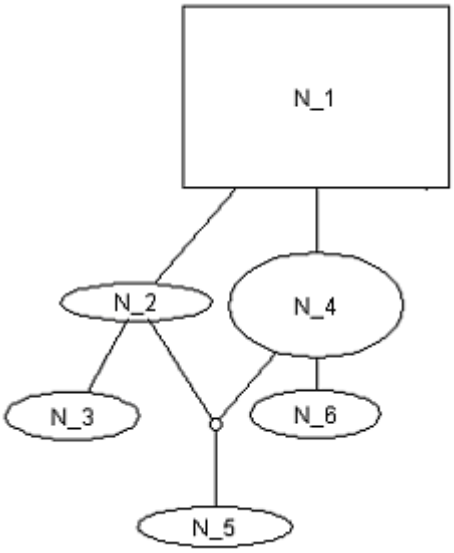
```
                        1224699]
                       91235428]
                      331243027]
#4266_Becva           TCYTCAACG
#9544_Olsava          .TC......
#9696_Stara_Rzeka     .TC....T.
#5633_Vlara           .........
#8717_Kocaba          .........
#6260_Ida             .......Y.
#9603_Dyje            C........
#9418_Jasiolka        CY.......
#4612_Jevicka         C.T......
#4328_Morava          C......T.
#9423_Morava          C........
#9545_Olsava          C.T....Y.
#8075_Rudava          C........
#8081_Rudava          C......Y.
#9695_Skawinka        CTC.....C
#5700_Jevisovka       Y.T......
#4448_Jihlava         Y.T......
#9547_Olsava          Y........
#8925_Olse            Y........
#8085_Rudava          Y.T......
#8719_Kocaba          Y........
#6262_Ida             YY.......
#9245_Solinka         YTC....TS
#9105_Svratka         Y......T.
#9587_Shakhe          ..TATGC..
```

Obrázek 15: Variabilní místa v sekvenci RAG-1 všech analyzovaných vzorků . Tečky znázorňují shodné nukleotidy s první sekvencí. Čísla v horní části vyjadřují pozice nukleotidů v sekvenci. (Upraveno).

Program TCS 1.21 rozlišil pro 25 jedinců pouze 6 nukleotypů označených N_1-N_6 (Obr. 16.) (Provedena korekce). Nejpočetnější skupinu tvořil nukleotyp N_1. Představuje 11 jedinců z řek Bečva, Vlára, Kocába, Olše, Olšava, Ida, Jevišovka, Jihlava, Rudava, Druhou nejpočetnější skupinu N_4 tvořilo 7 jedinců z řek Dyje, Jasiolka, Jevíčka, Morava, Olšava a Rudava. Nukleotyp N_3 je zastoupen po dvou jedincích ze Staré Rzeky a Solinky, obdobně i nukleotyp N_6 tvoří jedinci ze Svratky a Moravy. Zbylé dva haplotypy byly zastoupeny vždy jednou sekvencí, N_2 reprezentuje jedinec z řeky Olšava, N_5 z řeky Skawinka.

Fylogenetický signál tohoto markeru je velmi slabý a vypovídající hodnota je proto malá. Nukleotypová síť sestrojená na základě genu pro RAG-1 potvrdila jednotnou strukturu druhu *A. bipunctatus* v rámci úmoří a to platí i pro oba zvláštní jedince s haplotypy H_36 a H_37.

Malá variabilita v sekvencích genu pro RAG-1 předznamenala, že distance uvnitř této skupiny nebudou mít dostatečnou vypovídající hodnotu. Přesto byly distance spočítány v programu MEGA na pozadí modelu TrN+I (Tamura a Nei, 1993). Vnitrodruhová variabilita byla 0,0-0,4 %.



Obrázek 16: Nezakořeněná haplotypová síť založená na sekvencích genu pro RAG-1. Zobrazuje jaderné haplotypy (N_1-6). Jednotlivé uzly proporčně neodpovídají haplotypové frekvenci. Délka větví je zanedbána. (Nejsou uvedeny všechny zjištěné haplotypy. Zatím nebudou publikovány).

4. 7 VARIABILITA AMINOKYSELINOVÝCH SEKVENCÍ

Mitochondriální gen pro cyt *b* je kódujícím genem, který lze translatovat do aminokyselinového řetězce. V případě neúplné sekvence genu musí být stanoven první triplet, od kterého se začne řetězec překládat. Triplety, kterých je 64, kódují jednotlivé aminokyseliny. Aminokyselin je však pouze 20. To znamená, že některé aminokyseliny jsou kódovány více triplety. Ty se liší především nukleotidem zastoupeným na třetí pozici. V sekvenci nukleotidů bude patrná substituce, ale v aminokyselinovém řetězci se zařadí tatáž aminokyselina, to je označováno jako synonymní substituce.

Získaná nukleotidová sekvence byla přeložena do sekvence 330 aminokyselin (Obr. 18.) (Uvedeny pouze sekvence vzorků příslušících k druhu *A. bipunctatus*). Rozmanitost jednotlivých aminokyselin je zaznamenána vůči první sekvenci. Je patrné, že se snížila variabilita celého analyzovaného souboru. To je způsobeno tím, že změny v sekvenci genu pro cyt *b* u různých linií proběhly právě na třetím místě v kodonu. Proto sekvence aminokyselin zůstává nezměněná.

Pro jedince zařazené do druhu *A. bipunctatus* nebyla pozorována žádná aminokyselinová substituce typická pro všechny zástupce tohoto druhu. Přesto lze vypozorovat, že např.

jedinci z řeky Ida mají společnou substituci prolinu za treonin na pozici 160, ale tato záměna byla pozorována i jedince z Rudavy. Šest jedinců z různých úmoří mělo substituovaný leucin na pozici 154 za fenylalanin. Na 158. pozici měli čtyři jedinci glycin zaměněný za cystein. Ojedinělou substitucí se vyznačoval jedinec z řeky Jihlavy (asparagin za lysin, pozice 77), Kocáby (glycin za tryptofan, pozice 239 a fenylalanin za tyrozin, pozice 240). Patnáct zbývajících zástupců bylo v aminokyselinovém řetězci shodných s první sekvencí.

Byl sestrojen strom metodou MP na základě dat získaných z aminokyselinového řetězce (Obr. 17.). (Informace vyplývající ze stromu na základě aminokyselinové sekvence nebudou zveřejněny).

```
                 1111 1111222222 2233]
           2467882355 6688133479 9922]
           8837390148 0134579030 1237]
#9420      TSLKGLVIFG TIDKNPWYIF LFIA
#9541      .......... .......... ....
#9547      .......... .......... ....
#4456      .......... .......... ....
#6261      .......... P......... ....
#6262      .......... P...T..... ....
#6263      .......... P......... ....
#9536      ........L. .......... ....
#5633      .......... .......... ....
#8086      .......... .......... ....
#4446      ...N...... .......... ....
#6614      .......... .......... ....
#9106      .......... .......... ....
#9604      .......... .......... ....
#9610      ........L. .......... ....
#9245      ........L. .......... ....
#9605      ........L. .......... ....
#9603      ........L. ..GQ...... ....
#8921      .......... .....H.... ....
#4266      .........C .......... ....
#4478      ....C....C .......... ....
#4328      ....C....C .......... ....
#8719      .......... .......... ....
#5700      .......... .......... ....
#8717      .......... ......CF.. ....
#8076      .......... P...T..... ....
#4605      .......... .......... ....
#4607      .......... .......... ....
#4450      .......... .......... ....
#9105      .......... .......... ....
#8085      .......... .......... ....
#9546      .......... .......... ....
#9611      ........L. .......... ....
#6888      .......... .......... ....
#4614      .........C .......... ....
```

Obrázek 18: Variabilní místa v sekvenci aminokyselin cyt *b*.
Tečky znázorňují shodné aminokyseliny s první sekvencí. Čísla v horní části vyjadřují pozice aminokyselin v sekvenci. (Upraveno).

DISKUZE

Hypotézy a cíle diplomové práce vznikly na základě krátkého článku vztahujícího se k problematice diverzity ouklejky pruhované a jejím výskytu. Byla provedena fylogenetická analýza na základě sekvence genu pro cyt *b*, analýza alozymů a cross-species amplifikace mikrosatelitových lokusů designovaných z genomových knihoven *Luxilus cornutus, C. carpio*, a *Labeo rohita* (Mendel *et a*l., 2008).

Od roku 1782, kdy Bloch popsal druh *A. bipunctatus*, se objevovaly stále nové publikace zabývající se výskytem ouklejky pruhované v různých geografických oblastech. Dostupné práce rozebírají lokalizaci tohoto druhu na základě morfologické charakterizace. Většina autorů v průběhu celé historie druhu se shoduje na oblastech výskytu souhrnně popsaných v Příručce evropských sladkovodních ryb (Kottelat a Freyhof, 2007). Doložená místa výskytu na území České republiky, včetně citací autorů jsou souhrnně sepsány v knize Mihule a ryby České republiky (Hanel a Lusk, 2005).

Pozorováním morfometrických znaků se rovněž zabývala ve své práci Syriová (2004). Naměřené hodnoty u ryb odchycených ve slovenské řece Rudava porovnávala s dostupnými údaji jiných autorů. Pozorovaní jedinci z Rudavy se však svými morfometrickými znaky liší od vzorků z Vláry a Oslavy. Vzorky byly také porovnávány s hodnotami jedinců z Dviny (úmoří Baltu) a Ogosty (úmoří Černého moře). Diplomová práce nepotvrdila, že by se na základě molekulárně-genetických analýz na lokalitě Rudava vyskytovala odlišná linie. S morfologickými znaky pracují rovněž i autoři Bogutskaya a Coad (2009). Podle těchto charakteristik objevili autoři šest nových druhů: na území Ruska *A. gmelini* (typová lokalita Sunzha), Turkmenistánu *A. varentsovi* (typová lokalita Askhabadka) a *A. petrubanrescui* (typová lokalita Qasemlou), Iránu *A. namaki* (typová lokalita Taveh), *A. nicolausi* (typová lokalita Simareh) a *A. idignensis* (typová lokalita Bid Sorkh). Stávající druh *A. bipunctatus* revidovali a poddruhy *A. bipunctatus rossicus*, *A. bipunctatus kubanicus*, *A. bipunctatus maculatus*, *A. bipunctatus eichwaldii*, *A. bipunctatus fasciatus* povýšili na samostatné druhy.

Pro vznik této práce byl sestaven soubor dat z různých geografických lokalit pro posouzení jednotné struktury druhu *A. bipunctatus* a pro posouzení validity dříve popsaných poddruhů a variet v rámci rodu *Alburnoides*. Velmi široká distribuční oblast ouklejky pruhované nabádala k hypotéze, že jednotná druhová struktura bude patrně podhodnocena a že může se očekávat existence nových dosud nepopsaných druhů.

Genetická diverzita byla sledována u zástupců čeledi cyprinidae v rámci Evropy autory Zardoya a Doadrio, 1999. V této studii byly sestaveny fylogenetické stromy podle sekvencí genu pro cyt *b* členící evropské kaprovité ryby do taxonomických celků. *A. bipunctatus* z Francie se oddělila od *A. bipunctatus ohridanus* zastoupena dvěma jedinci z Prespanského jezera a z řeky Aoos a *A. bipunctatus strymonicus*.

Genetické markery byly zvoleny na základě informací získaných z jiných prací, ve kterých se ukázalo, že variabilita uvnitř DNA je dostatečná pro dané druhy. Řád Cypriniformes byl podle genu pro RAG-1 rozdělen na příslušné taxony (Mayden *et al*., 2008). Šlechtová *et al.* (2008) použila genetický marker cyt *b* a RAG-1 při hledání vztahů v čeledi cobitidae (řád Cypriniformes).

Mitochondriální gen pro cyt *b* splnil svou funkci variabilního markeru. Celý soubor 146 jedinců byl s vysokou hodnotou podpory rozčleněn na monofyletické linie (Upřesnění není možné. Získaná data nebudou publikována). Jaderný gen pro RAG-1 jako marker neprokázal dostatečnou variabilitu uvnitř rodu *Alburnoides*. Uvažuje se proto, že vybraní jedinci budou podrobeni nové analýze na základě jiného jaderného markeru (např. intronu S7 r-proteinu).

Pro ouklejku pruhovanou bylo odhaleno celkem 37 mitochondriálních haplotypů z 23 lokalit (Tab. I. a III., Obr. 12.). Nejvíce haplotypů, tj. 6, bylo rozpoznáno na lokalitě Morava. Pět haplotypů bylo identifikováno na lokalitách Dyje a Rudava. Řeky Jevíčka, Jihlava, Ida a Olšava poskytly příklady čtyř a Kocába tří haplotypů. Lokality Bečva, Bodva, Olše, Svratka a Vlára byly zastoupeny vždy dvěma haplotypy. Po jednom haplotypu bylo zjištěno v řekách Ipeľ, Jasiolka, Jevišovka, Nida, San, Saone, Skawinka, Solinka, Stara Rzeka a Strwiaz.

Do úmoří Severního moře patří jediná řeka Kocába, která nevykazuje haplotyp nebo skupinu haplotypů ojedinělou pro dané úmoří. Stejný haplotyp byl nalezen i u jedinců z řeky Jevišovka (úmoří Černého moře). To stejné platilo pro úmoří Baltu (Jasiolka, Nida, Odra, San, Skawinka, Solinka, Stara Rzeka a Strwiaz) i Černého moře, kde byl největší počet haplotypů (Bečva, Bodva, Dyje, Ida, Ipeľ, Jevíčka, Jevišovka, Jihalva, Morava, Olšava, Rudava, Svratka a Vlára). U zástupců obou úmoří byla zaznamenána větší promíšenost haplotypů než v případě jedinců z úmoří Severního moře.

Závěrem lze říci, že zjištěné haplotypy nevykazovaly žádnou jedinečnou příslušnost k jednotlivým úmořím.

Intraspecifická diverzita se držela v rozmezí 0,1-1,3 %. Jak bylo řečeno dříve nejsou do tohoto intervalu započítány vzorky z řek Ida (6260) a Morava (9423). Ovšem analýzy jaderného markeru prokázaly jednoznačně příslušnost k Linii_I, proto se předpokládá, že se stala chyba během laboratorní přípravy mitochondriálního markeru.
Pro ochranářské aktivity zjistila předkládaná studie vysokou míru genetické variability uvnitř druhu *A. bipunctatus* na území České republiky. Bylo odhaleno celkem 22 mitochondriálních haplotypů soustředěných především kolem hlavních haplotypů H_11 a H_27.

V letech 1993-2005 (Hanel a Lusk, 2005) bylo pozorováno drastické snížení na výskytových lokalitách v ČR. Proto Lusk *et al*. (2006) zařadil ouklejku pruhovanou v úmoří Severního moře do skupiny kriticky ohrožených druhů, v úmoří Baltu mezi ohrožené druhy a v úmoří Černého moře jako zranitelné.
V této diplomové práci zjištěná míra vnitrodruhové diverzity přináší ouklejce pruhované jako druhu dobrou zprávu. Byl zjištěn široký potenciál tohoto rybího druhu, který by mohl být dostatečný pro zachování variability v dalších generacích.

ZÁVĚR

Předkládaná studie je vůbec první souhrnnou fylogenetickou studií v Evropě zabývající se taxonomií a systematikou druhů rodu *Alburnoides* na molekulární úrovni. Datový soubor obsahoval cca 150 porovnávaných jedinců obývajících území České republiky, Slovenska, Polska, Francie, Řecka, Chorvatska, Ruska, Ukrajiny, Albánie, Makedonie, Bulharska, Běloruska, Srbska, Bosny a Hercegoviny. Výsledky založené na genetických markerech obou genomů cyt *b* a RAG-1 prokázaly druhovou podhodnocenost tohoto rodu. Odhalily 37 mitochondriálních haplotypů a 6 nukleotypů vyskytujících se u druhu *A. bipunctatus*. (Informace o ostatních lokalitách nebudou uvedeny).

Některé mají své označení jako např. *A. bipunctatus*, ovšem jeho distribuční oblast byla významně pozměněna. Výskyt tohoto rybího druhu byl jednoznačně prokázán na území Francie, Polska, České republiky a Slovenska.

Na území ČR nebyla prokázána specifická příslušnost populací k větším hydrologickým celkům. Současně byla odhalena velká haplotypová pestrost jedinců obývajících území ČR, jež tvoří jedinou linii s druhovým označením *A. bipunctatus*. Tato haplotypová bohatost je dobrou základnou pro udržení životaschopnosti tohoto druhu.

Zdárný průběh vývoje genomové knihovny mikrosatelitů a nalezení 129 nadějných dinukleotidových a tetranukleotidových lokusů jsou dobrým příslibem pro další a hlubší analýzu stavu populací ouklejky pruhované nejen na našem území.

Tato studie bude sloužit jako základ pro následnou disertační práci diplomantky, která se bude zabývat dalšími doposud neanalyzovanými druhy rodu *Alburnoides* v euroasijském kontextu. Bude se mimo jiné podílet i na dokončení započaté genomové knihovny mikrosatelitů.

7 LITERATURA

Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D. 2005. ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics: 21(9): 2104-2105*.

Banarescu, P. 1964: Fauna Republicii Populare Romine Pisces – Osteichthyes. *Academia republicii populare Romine XIII: 525-529*.

Bártlík, M. 1953: Rybí biocenosy Sázavy a jejích přítoků v okolí Havlíčkova Brodu. *Časopis nár. musea, odd. přír. 122: 52-56*.

Baruš, V., Oliva, O. (edc.) 1995: Fauna ČR a SR. Mihulovci – *Petromyzontes* a ryby – *Osteichthyes* (2). *Academia, Praha*.

Benson, G. 1999: Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research. 27 (2):573-580*.

Berg, L. S. 1941: Lower Triassic Fishes of the Tunguska Coal Basin, Yenisei, Siberia. *Bulletin of the Academy of Sciences U.S.S.R., Biological Sciences 3:414–419*.

Berg, L. S. 1948-1949: Freshwater Fishes of the USSR and Adjacent Countries. *Acad. Sci. USSR,1 (1948):1-466; 2 (1949a): 469-925; 3(1949b): 929-1382 [in Russian]*.

Bogutskaya, N. G., Coad, B. W. 2009: A review of vetebral and fin-ray counts in the genus *Alburnoides* (Teleostei: Cyprinidae) with a description of six new species. *Zoosystematica Rossica 18 (1): 126-173*.

Buj, I., Vukic, J., Sanda, R., Perea, S., Caleta, M., Marcic, Z., Bogut, I., Povz, M. and Mrakovcic, M. (2010): Morphological comparison of bleaks (Alburnus, Cyprinidae) from the Adriatic Basin with the description of a new species. *Folia Zool. Brno (0139-7893)*.

Clement, M., Posada, D., Crandall, K. 2000: TCS: a **computer** program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol. 9 (10): 1657-1660*.

Coad, B. W., Bogutskaya, N. G. 2009: Alburnoides qanati, a new species of cyprinid fish from southern Iran (Actinopterygii, Cyprinidae). *ZooKeys 13: 67-77*.

Dušek, L., Svobodová, Z., Janoušková, D., Vykusová, B., Jarkovský, J., Šmíd, R., Pavliš, P. 2005: Bioaccumulation of mercury in muscle tissue of fish in the Elbe River (Czech Republic): multispecies monitoring study 1991-1996. *Ecotoxicol. Environ. Saf. 61: 256-267*.

Field, D., Wills, C. 1998: Long polymorphic microsatellites in simple organisms. Proceeding of the Royal Society of London. *Series B: Biological Sciences 263: 209-215*.

Froese, R., Pauly, D. (edc.) 2010: FishBase. *World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org*.

Goldenstein, D. B., Schlötter, Ch. 1999: Microsatellites: Evolution and applications. *Oxford University Press, Oxford. ISBN 0 19 850407 1*.

Guindon, S., Gascuel, O. 2003: PhyML 3.0: new algorithms, methods and utilities. *Syst. Biol. 52 (5): 696–704*.

Hanel, L. 1998: Ochrana druhového bohatství ryb a mihulí ČR. *Nika 05-06*.

Hanel, L., Lusk, S. 2005: Ryby a mihule České republiky. Rozšíření a ochrana. *ZO ČSOP, Vlašim*.

Hochman, L., Jirásek, J. 1969: Zarybnění horní části řeky Oslavy a růst hlavních druhů ryb před ovlivněním řeky údolní nádrží u Mostiště. *Sb. VŠZ v Brně, ř. A 18 (2): 413-423*.

Chen, W. J., Ruiz-Carus, R., Ortí, G. 2007: Relationships among four genera of mojarras (Teleostei: Perciformes: Gerreidae) from the western Atlantic and their tentative placement among percomorph fishes. *Journal of Fish Biology 70 (B): 202-218*.

Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Haley, C.A., Law, S.A., Tsigenopoulos, C.S., Kotoulas, G., Bertotto, D., Volckaert, F.A.M. 2005: A microsatellite linkage map of the European seabass **Dicentrarchus labrax** L. *Genetics 170:1821-1826*.

Kottelat, M. 1997: European freshwater fishes. *Biologia, Bratislava 52/Supplement 5: 1-271*.

Kottelat, M., Freyhof, J. 2007: Handbook of European freshwater fishes. *Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany*.

Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. 2004: MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics 5: 150-163*.

Lanave, C., Preparata, G., Saccone, C., Serio, G. 1984: A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol. 20: 86-93*.

Li Ch., Ortí, G. 2007: Molecular phylogeny of Clupeiformes (Actinopterygii) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol. 44: 386-398*.

Librado P., Rozas J. 2009: DNASP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics 25: 1451-1452*.

Lojkásek, B., Lusk, S. 2004: Ichtyofauna dorzecza górnogo biagu Odry na terenie republiki Czeskej. *Arch. Pol. Fish 12 (2): 73-89*.

López, J. A., Chen W., Ortí G. 2004: Esociform Phylogeny. *Copeia 3: 449-464*.

Lusk, S. 1977: The ichtyofauna of the middle course of Jihlava River in relation to the water reservoir at Dalešice. *Folia Zool. 26: 255-269*.

Lusk, S. 1978: Fish stock and angeling in the middle course of Svratka River. *Folia Zool. 27: 71-84*.

Lusk, S., Lusková, V., Dušek, M. 2002: Biodiverzita ichtyofauny České republiky a problematika její ochrany. *Biodiverzity ichtyofauny ČR (IV): 5-22*.

Lusk, S., Hanel, L., Lusková, V. 2004: Red list of ichtyofauna of the Czech Republic. Development and present status. *Folia Zool. 53: 215-226*.

Lusk, S., Hanel, L., Lusková, V., Lojkásek, B., Hartvich, P. 2006: Červený seznam mihulí a ryb České republiky – verze 2005. *Biodiverzita ichtyofauny ČR (VI): 7-16*.

Mayden, R., Tang, K. L., Wood, R. M., Chen, W., Agnew, M. K., Conway, K. W., Yang, L., Simons, A. M., Bart, H. L., Harris, P. M., Li, J., Wang, X., Saitoh, K., He, S., Liu, H., Chen, Y., Nishida, M., Miya, M. 2008: Inferring the tree of life of the order Cypriniformes, the earth's most diverse clade of freshater fishes: Implication of varied taxon and character sampling. *J. System. Evol. 46(3): 424-438*.

Mendel, J., Lusk, S., Halačka, K., Lusková, V., Vetešník, L., Čelata, M., Ruchin, A. 2008: Genetická diverzita a poznámky k výskytu ouklejky pruhované *Alburnoides bipunctatus*. *Biodiverzita ichtyofauny ČR (VII): 25-37*.

Nei, M. 1987: Molecular Evolutionary Genetics. *Columbia University Press, New York*.

Perdices, A., Doadrio, I. 2001: The molecular systematics and biogeography of the European cobitides based on mitocondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.19: 468-478*.

Poseda, D. 2006: ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Research 34, Web Server issue. Avialable for : <http://darwin. uvigo.es>/software/modeltest_server.html>*.

Prchalová, M., Kubečka, J., Muška, M., Frouzová, J., Jankovský, M. 2009: Průzkum rybí osádky nádrže Nové mlýny I v roce 2008. *Zpráva pro Hydrobiologický ústav, BC AV ČR, v.v.i., pp. 12*.

Rambaut, A. 2009: FigTree: tree figure drawing tool, v1.2.1. university of Edinburgh, UK.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. 2005: Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. In: Nielsen R. (eds), Statistical Methods in Molecular Evolution. *Springer, New York*.

Ruchin, A. B., Shlyakhtin, G. V., Artaev, O. N. 2009: Species composition and quantitative representation of fishes in biotopes with the riffle minnow *Alburnoides bipunctatus*. *Russ. J. Ecol. 3 (40): 194-198*.

Saitou, M., Nei, M. 1987: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol. 4 (4): 406-425*.

Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. *Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Saveljic, D., Mrdak, D., Kneževic, M., Marojevic, J., Antonelli, F. 2009: Proposed construction of dams on Morača river: environmental risk assessment of Morača canyon and Skadar lake. *Short version of three reports commissioned by WWFMedPO and Green*

Home under the framework of Sharing Waters Project - Skadar Lake component, Rome, http://assets.panda.org/downloads/moraca_summary_report_final_en.pdf.

Siryová, S. 2004: External morphology of Spirlin *Alburnoides bipunctatus*. *Acta Zoologica Universitatis Comenianae 42 (2): 65-72*.

Swofford, D. L., Selander, R. B. 2002: PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). *Sinauer Associates, Sunderland, MA*.

Šlechtová, V., Bohlen, J., Perdices, A. 2008: Molecular phylogeny of the freshwater fish family Cobitidae (Cypriniformes: Teleostei): Delimitation of genera, mitochondrial introgression and evolution of sexual dimorphism. *Mol. Phylogenet. Evol. 47: 812-831*.

Talevski, T., Milosevic, D., Maric, D., Petrovic, D., Talevska, M., Talevsky, A. 2009: Biodiversity of ichtyofauna from Lake Prespa, Lake Ohrid and Lake Skadar. *Biotechnology & Biotechnological Equipment (23) 2009 Special Edition XI anniversary scientific conference 120 years of academic education in biology, 45 years Faculty of biology Special edition Biology pp. 400-404, http://www.diagnosisp.com/dp/journals/view_pdf.php?journal_id=1&archive=0&issue_id=22&article_id=680*.

Tamura, K., Nei, M. 1993:Estimation of number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.10: 512-526*.

Tang, Q., Liu, H., Mayden, R., Xiong, B. 2006: Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes). *Mol. Phylogenet. Evol. 39: 347-357*.

Templeton, A. R., Crandall, K. A., Sing, C. F. 1992: A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inffered from endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics 132: 619-633*.

Tóth, G., Gáspari, Z. and Jurka, J. 2000: Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research 10: 967-981*.

Vostradovský, J. 1978: Prognóza vývoje rybářských poměrů ve vodní nádrži Římov. *Vertebratologické zprávy, ÚVO ČSAV Brno, 1978: 61-65*.

Zardoya, R., Doadrio, I. 1999: Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *J. Mol. Evol. 49: 227-237*.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BI	Bayesovská analýza
CI	consistency index
cyt *b*	cytochrom *b*
ddATP	dideoxyadenosintrifosfát
ddCTP	dideoxycytidintrifosfát
ddGTP	dideoxyguanidintrifosfát
ddTTP	dideoxythymidintrifosfát
dATP	deoxyadenosintrifodfát
dCTP	deoxycytidintrifodfát
dGTP	deoxyguanidintrifodfát
dNTPs	deoxyribonukleozidtrifosfáty
dTTP	deoxythymidintrifosfát
ddNTPs	dideoxyribonukleozidtrifosfáty
ESC	evolution species concept
EtOH/EDTA	96% alkohol/ethylenediaminetetraacetic acid
f	nukleotidová frekvence
Γ	gamma shape parametr
GTR	General time-reversible model
Hd	haplotypová diverzity
I	invariabilní pozice
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
IUCN	Mezinárodní unie pro ochranu přírody a přírodních zdrojů, the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources
ML	maximální pravděpodobnost, maximum likelihood
MP	maximální úspornost, maximum parsimony
mtDNA	mitochondriální DNA
nDNA	jadená (nuclear) DNA
NJ	připojení souseda, neighbor-joining
NMP	Národní muzeum v Praze
OER	Oddělení ekologie ryb
π	nukleotypová diverzita
PCIA	fenol:chloroform:izoamylalkohol
PCR	polymerázová řetězová reakce, polymerase chain reaction
PEG/Mg/NaAc	26% polyethylen glykol/ 6,5 mM $MgCl_2$. $6H_2O$/0,6 M NaAc.$3H_2O$
RAG-1	rekombinací aktivovaný gen, recombination activating gene
RI	retention index
SA-PMPs	Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles
SSRs	jednoduché opakující se sekvence, simple sequence repeats
TL	délka stromu
TrN	Tamura Nei model
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-galaktopyranosid