

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta

Diplomová práce

**Genetická diverzita lipana podhorního (*Thymallus thymallus*) a její
vztah ke stavu jeho populací v ČR**

Vypracoval: Miloš Havelka
Vedoucí práce: doc. Ing. Petr Hartvich, CSc.

České Budějovice 2009

Havelka M., 2009: Genetická diverzita lipana podhorního (*Thymallus thymallus*) a její vztah ke stavu jeho populací v ČR. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 24.4. 2009

Miloš Havelka

Na tomto místě bych rád poděkoval Ing. Janu Kohoutovi za jeho pomoc, rady, bezmeznou ochotu a trpělivost. Dále pak RNDr. Vlastimilu Šlechtovi, CSc. za odborné konzultace a cenné rady, doc. Ing. Petru Hartvichovi, CSc. za podporu a motivaci, Mgr. Ivo Papouškovi, Ph.D. za poskytnutí části vzorků a Ing. Radku Haladovi.

Největší díky patří mé rodině za dlouhodobou podporu a porozumění, nejen při přípravě této práce , ale ve všech oblastech mého života.

Obsah:

SOUHRN	5
ABSTRACT.....	5
1. ÚVOD.....	7
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1 POPIS	9
2.2 POHLAVNÍ DVOJTVÁRNOST	9
2.3 STANOVIŠTĚ	9
2.4 CHOVÁNÍ	10
2.5 POTRAVA	11
2.6 ROZMNOŽOVÁNÍ	11
2.7 ZDROJE GENETICKÝCH ZMĚN V PŘÍRODĚ.....	12
2.8 FYLOGEOGRAFIE.....	14
2.9 SOUČASNÉ EVOLUČNÍ PROCESY	15
2.10 <i>THYMALLUS THYMALLUS</i>	16
2.11 GENETICKÁ DIVERZITA A VZTAHY MEZI POPULACEMI VE STŘEDNÍ EVROPĚ.....	19
2.12 MITOCHONDRIÁLNÍ DNA	22
2.13 IZOLACE DNA	22
2.14 PCR.....	23
2.14.1 <i>Průběh PCR</i>	23
2.15 PURIFIKACE PCR PRODUKTU.....	24
2.16 SEKVENAČNÍ REAKCE	24
2.18 DENATURACE	26
2.19 SEKVENACE	26
3. MATERIÁL A METODIKA	27
3.1 IZOLACE DNA	29
3.2 PCR.....	30
3.2.1 <i>Výběr primerů</i>	30
3.2.2 <i>Složení reakční směsi</i>	31
3.2.3 <i>Parametry cyklování</i>	31
3.3 PURIFIKACE PCR PRODUKTU.....	32
3.4 SEKVENAČNÍ REAKCE	32
3.5 PURIFIKACE PO SEKVENAČNÍ REAKCI.....	33
3.6 DENATURACE A SEKVENACE.....	33
3.7 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ.....	33
4. VÝSLEDKY	35
5. DISKUSE.....	47
6. ZÁVĚR	53
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	55
8. PŘÍLOHA	61

Souhrn

Cílem této práce je posouzení genetické diverzity lipana podhorního (*Thymallus thymallus*). Ze 147 vzorků z celkem 21 populací byla osekvenována část mitochondriální DNA, a to fragment pro D-loop o délce 1083 párů bází a fragment pro cytochrom b o délce 1076 párů bází. Populace byly vzorkovány na území České republiky, Slovenska a Bosny. Bylo odhaleno celkem 17 haplotypů s průměrnou hodnotou haplotypové diverzity $H_d = 0,5480$ a s hodnotami genetické vzdálenosti (F_{ST}) v rozsahu od 0,001 do 0,9341. Nejčastěji byl zastoupen haplotyp TH1, a to u 92 jedinců. Odvozený vnitrodruhový fylogenetický strom odhalil tři dobře oddělené skupiny. Jedna skupina byla reprezentována dunajskými haplotypy ze Slovenska. Druhá vysoce divergentní skupina obsahovala jedince z řeky Vrbas v Bosně a poslední největší skupina zahrnovala haplotypy ze všech tří povodí na našem území. Předpokládáme, že získané výsledky budou později aplikovány pro vhodnou volbu ochranných strategií, které povedou k ustálení stavů původních populací tohoto stále vzácnějšího druhu na našem území.

Klíčová slova: populace; *Thymallus thymallus*; haplotyp; cytochrom b; D-loop

Abstract

Goal of this Thesis is the comparison of the Grayling's genetic diversity. The complete mitochondrial DNA (mtDNA) control region (1083 base pairs) and gene for cytochrom B (1076 base pairs) were sequenced in 147 European grayling (*Thymallus thymallus*), from 21 populations in Czech Republic, Slovakia and Bosnia. In samples, 17 haplotypes were detected with average haplotype diversity $H_d = 0,5480$ and genic differentiation (F_{ST}) from 0,001 to the 0.9341. The most common haplotype TH1 was detected in 92 samples. An inferred intraspecific phylogenetic tree revealed three well-separated clades. One clade was represented by Danubian haplotypes from Slovakia. Second highly divergent clade contained individuals from river Vrbas in Bosnia, and the last

biggest clade included haplotypes of all three sea basins from Czech Republic. We suppose that the gained results will be later utilized to the choice of suitable conservation measures that will lead to stabilization of the state of ancestral population of this ever more rare species in our region.

Key words: population; *Thymallus thymallus*; haplotypes; cytochrom b; control region

1. Úvod

Práce zaměřené na genetické populační studie rodu *Thymallus* rozlišily a popsaly několik druhů. Celkový pohled na taxonomii rodu *Thymallus* a počet jednotlivých druhů není dodnes zcela jednotný. Podle nejnovějších poznatků se u rodu *Thymallus* vyskytují následující druhy: *Thymallus thymallus*, *Thymallus arcticus*, *Thymallus brevirostris*, *Thymallus grubii*, *Thymallus baicalensis*, *Thymallus brevipinnis*, *Thymallus burejensis*, *Thymallus martensii*, *Thymallus nigrescens*, *Thymallus tugarinae* (Eschmeyer & Fricke 2008). Rod *Thymallus* je ukázkou různorodé životní strategie. Většina populací dokončí svůj celistvý životní cyklus v řekách nebo jezerech (Northcote 1995), někteří lipani jsou přizpůsobeni poloslanému prostředí a obývají části Baltského moře (Nykanen & Huusko 1999), a u některých populací byly pozorovány anadromní tahy (Northcote 1995). Ačkoli je lipan podhorní méně významný pro komerční rybníkářství než mnoho jiných lososovitých ryb, je považován za kulturně velmi důležitý rybářský druh a je vysoce hodnotným druhem mezi sportovními rybáři. Rybářský tlak na lipana podhorního vedl k lokálním úbytkům ve velikosti populací (Maitland & Campbell 1992) a tento druh byl uveden mezi ohroženými rybami Evropy v roce 1984 (Lelek 1984).

Lipan podhorní je vedle pstruha obecného sportovně i hospodářsky nejvýznamnějším druhem v pstruhových a lipanových úsecích našich toků. Je příkladem toho, že lze umělým chovem zvýšit rozšíření a početnost druhu tak, že se stává významným objektem rybolovu. V posledních deseti letech však úlovky lipana klesají. Z tohoto faktu lze usuzovat na klesající tendenci počtu lipana v našich vodách a lze předpokládat, že vysazování lipana podhorního do našich toků bude pokračovat ve stejné míře jako je tomu doposud, popřípadě se mohou počty vysazovaných kusů i zvyšovat. Je proto nezbytné zmapovat genetickou strukturu populací lipana v jednotlivých povodích, popřípadě i chovech, přihlídnout k těmto výsledkům při sestavování zarybnovacích plánů pro jednotlivá povodí, zamezit míchání geneticky odlišných populací lipanů a zvýšit tak ochranu vnitrodruhové diverzity.

Cílem mnoha dnešních projektů je snaha o udržení biodiverzity naší ichtyofauny. Do této oblasti bezesporu patří i snaha o zmapování a popsání genetické struktury

populací lipana podhorního. Biodiverzitu je nezbytné chápat ve dvou základních úrovních – biodiverzitu mezidruhovou a biodiverzitu vnitrodruhovou (genetickou).

U ryb jsou naše znalosti vnitrodruhové diverzity přinejmenším kusé, a proto i vnímání tohoto fenoménu je prozatím na nízké úrovni. Přispívá k tomu i skutečnost, že vnitrodruhová diverzita nemá v ochranářské legislativě přímé a ucelené vymezení. V zásadě platí, že rizika ohrožující existenci druhu současně ohrožují i vnitrodruhovou diverzitu. Např. v oblasti rybářského hospodaření podpůrné vysazování násad lipana z různých chovů a povodí představuje v současnosti nejvážnější hrozbu pro původní strukturu vnitrodruhové diverzity, i když rybářská veřejnost tyto aktivity vnímá jako podporu rybích populací. V podmínkách ČR zabezpečuje chov a vysazování lipana do toků Český rybářský svaz. Vlivem nedostatku násadového materiálu jsou velmi často jedinci převáženi mezi povodími a dokonce i mezi jednotlivými úmořímí. Toto může mít pravděpodobně rozhodující vliv na snižování genetické variability jednotlivých populací lipana podhorního. V roce 1959 byl na naše území introdukován lipan bajkalský (*Thymallus baicalensis*) v podobě oplozených jiker. Po inkubaci a raném odkrmu byl rozkrmený plůdek vysazován do našich toků. Po roce 1975 tento druh z našich vod mizí pravděpodobně vlivem hybridizace s místními populacemi lipana podhorního (*Thymallus thymallus*) (Lukeš 1960).

Výrazným mezníkem při sledování biodiverzity, její ochrany a sjednocení aktivit s cílem zamezit erozi a snižování biodiverzity se stala konference OSN o životním prostředí a rozvoji – UNCED - Summit o zemi v Rio de Janeiro v červnu 1992, kde byla přijata „**Úmluva o biologické rozmanitosti**“. V ČR vstoupil tento dokument v platnost až 3. března 1994.

V nedávné minulosti byl vypracován dokument – **Strategie ochrany biologické rozmanitosti v České republice**, který byl projednán a schválen vládou ČR usnesením č. 620 ze dne 25. května 2005. Tento dokument představuje výchozí podklad pro strategii a taktiku ochrany tohoto životně nezbytného základního přírodního fenoménu v rámci ČR.

2. Literární přehled

2.1 Popis

Štíhlým protáhlým tělem torpédovitého tvaru připomíná síha. Hlava je poměrně malá, oči velké, ústa jsou malá se spodním postavením pod přesahujícím rypcem, nedosahují ani ke svislici od předního okraje oka. Na čelistech, radličné kosti a kostech patrových jsou drobné štětinkovité zoubky. Celé tělo je pokryté středně velkými šupinami. Nápadná je velká hřbetní ploutev, pestře zbarvená. Řitní ploutev dospělců má poslední paprsek ztloustlý (Dyk 1956). Mezi hřbetní a ocasní ploutví je tuková ploutev, ocasní ploutev je hluboce vykrojená, prsní a břišní ploutve v normálním postavení jako u lososovitých ryb. Tvar těla, zejména pak výška, je ovlivněn prostředím, v němž dlouhodobě žijí populace tohoto druhu.

2.2 Pohlavní dvojtvárnost

Lusk et Skácel (1978) uvádějí, že samci mají tmavší zbarvení než samice včetně břišní části a delší břišní ploutve. Typický druhotný pohlavní znak samců je hřbetní ploutev, která je plošně větší, její poslední měkké paprsky jsou protáhlé do špičky, u samic je ploutev menší, poslední paprsky jsou kratší, zadní část je zaokrouhlená. Hřbetní ploutev samců je pestřeji vybarvena než u samic. Velikost a výška hřbetní ploutve je dávana do souvislosti s lepší možností obchvatu těla samice a jejímu přitlačení ke dnu v době tření (Baruš et al. 1995). Celkové zbarvení samců je výraznější než u samic zvláště v období rozmnožování, kdy u samic je břicho čistě bílé, u samců špinavě bílé, mramorované, na přechodu v boční část až černé (Nieslanik 1959). Pohlavní dvojtvárnost je u pohlavně dospělých jedinců lipana podhorního natolik výrazná, že umožňuje s vysokou spolehlivostí rozlišení samců a samic podle zevního vzhledu.

2.3 Stanoviště

Nároky lipana podhorního na určité vodní prostředí jsou do té míry vyhraněné, že Borne doplnil systém rybářsko-biologické klasifikace tekoucích vod na rybí pásma,

který navrhl Frič, o tzv. lipanové pásmo, které zařadil mezi pásmo pstruha a pásmo parmy. U nás lipan obývá středně velké vodní toky. Vyhovují mu především úseky, kde se střídá proud na mělkých prazích a brodech s klidnější hlubší vodou, případně i s tůněmi, dno převážně kamenito-šterkovité a písčité. Lipanovi vyhovují nekrytá otevřená místa ve vodě, nevyžaduje úkryty jako pstruh obecný. S narůstající velikostí vyhledává stanoviště s hlubší a proudivější vodou. I když lipan podhorní patří mezi chladnomilné ryby, s vysokým nárokem na obsah kyslíku ve vodě, snáší mírné organické znečištění a je rovněž odolnější vůči vyšším teplotám vody v letním období než pstruh obecný. Proto se s ním setkáváme i ve vyhovujících částech tzv. parmového [PV3]pásma (Holčík 1998). Podle Dyka (1984) má lipan širší ekologickou valenci, než se předpokládalo, a přesto je významným bioindikátorem kvality vody v tekoucích vodách.

2.4 Chování

Lipan podhorní žije společensky ve větších či menších skupinkách. Podle Šimka (1959) nevyhledává ve vodě úkryty, hejno lipanů se zdržuje vždy pohromadě těsně u dna a sbírá larvy vodního hmyzu. Když voda hmyz unáší, stoupá lipan k hladině a sbírá jej, avšak s uchvácenou kořistí sjíždí ke dnu, kde ji pozře, a stoupá znovu lovit k hladině. Z hladiny sbírá hmyz, tzv. náletovou potravu. Potravu přijímá i v zimě (Kubíček 1974).

Hejna jsou tvořena většinou přibližně stejně velkými jedinci, přičemž menší ryby (plůdek, roček) vytváří početnější skupiny, starší se sdružují do hejn obvykle v počtu 5-15 kusů. Pouze největší exempláře žijí samotářsky a projevují sklon k ochraně svého stanoviště. V průběhu roku se lipan obvykle zdržuje v úseku toku v délce 100-200 metrů, pouze výjimečně mění svůj „domovský“ úsek toku (Baruš et al. 1995).

V některých případech se u nás lipan přizpůsobil i životu ve stojatých vodách, kde se zdržuje převážnou část roku a vytahuje odtud pouze v době tření na trdliště do přítoků. Pouze v době tření podniká lipan kratší migrace na trdliště kde mají zejména samci teritoriální chování s agresivními projevy. (Baruš et al. 1995).

2.5 Potrava

Lipán je typický bentofágem. Hlavní složku potravy tvoří především larvální stadia vodního hmyzu, na prvním místě jepic, chrostíků a pakomárů. V menší míře se uplatňují pošvatky, koryši a červi. Z měkkýšů je to zvláště kamomil říční. Potrava se mění podle ročních období, Podstatnou složkou potravy jsou larvy chrostíků, dále se uplatňuje významně i hmyz spadlý do vody, z bentických živočichů jsou významné i larvy jepic a pošvatek (Kubíček 1974).

2.6 Rozmnožování

Tření lipána u nás probíhá obvykle v druhé polovině dubna a v první polovině května. Pouze výjimečně dochází ke tření koncem března, avšak častěji již v první polovině dubna, ojediněle až v druhé polovině května. Doba tření je určována především teplotou vody v závislosti na nadmořské výšce a průběhu počasí (např. sněhové jarní vody, sluneční svit). V době tření nepodniká lipán obvykle delší migrace na trdliště a většinou se tře na vhodných místech domovského toku. Pokud je možné, vytahuje do přítoků, které jej lákají teplejší vodou a tře se obvykle v úseku několika set metrů nad ústím.

Z hlediska ekologické charakteristiky rozmnožování zařazujeme lipána podhorního do skupiny druhů litofilních, zakrývajících, resp. zahrabávajících jikry. Trdliště lipána jsou v úsecích toků s proudivou vodou, obvykle 0,3-0,7 m.s⁻¹, pouze výjimečně i více, až 1 m.s⁻¹. Výška vody dosahuje obvykle v době tření na trdlištích 0,3-0,6 m, pouze výjimečně více či méně. Dno trdliště je tvořeno štěrkem, drobnými oblázky a pískem, pouze ojediněle i jemnějším substrátem.

Rozhodujícím stimulačním činitelem pro tření lipána je teplota vody (Holčík 1998). Tření lipána ve vodách v podhůří nastává, když teplota vody dosahuje 7 °C, v nižších polohách 8-10 °C. V průběhu tření při výrazném oteplení dosahuje teplota vody zejména v odpoledních hodinách i 13-15 °C. Z větších toků, zejména z toků pod přehradami, které vypouštějí chladnější vodu, lipán obvykle vytahuje na tření do přítoků, které mají teplotu vody o 2-5 °C vyšší. Na trdliště migrují většinou obě pohlaví společně, někdy samci o něco dříve než samice. Rozdílné je však jejich další chování.

Vlastní trdliště obsazují nejdříve samci, kteří zaujímají a aktivně brání tzv. třecí okrsky. Samice zůstávají v hlubší vodě pod trdlištěm a čekají, až dosáhnou plné zralosti, tj. uvolnění jiker z vaječníků. Samci se na trdlišti zdržují zejména v polední a odpolední době, kdy i vlastní tření bývá nejintenzivnější. V noci, zvláště po půlnoci, samci z větší části trdliště na několik hodin opouštějí. Vlastní tření probíhá v párech, když k tření dozralá samice vyplouvá na trdliště, kde se s čekajícím samcem v jeho třecím okrsku vytírá. Vlastní tření u lipana na základě pozorování v akvarijských podmínkách velmi podrobně popsali Fabricius et Gustafson (1955). Podle těchto autorů lze rozčlenit tření na několik fází. Nejdříve samci obsadí vlastní třecí okrsky, které aktivně brání a útočí na každého vetřelce, ať už samce či samice nebo na jiné druhy ryb. V další fázi, když do třecího okrsku samce vpluje samice zralá ke tření, mění se útočné chování samce i samice a nastává fáze dvoření, tj. v podstatě seznamování páru pomocí sblížovacích projevů včetně vzájemných dotyků. Potom nastává vlastní tření, přičemž samice vypouští jikry na dno trdliště a samec vypouští mlíčí. V této fázi se většinou ryby vzájemně, zejména v ocasních částech, dotýkají. Dochází se zviřování dna, takže část jiker je zakryta pískem, šterkem a někdy i jemným jílem. Samice po krátké době opouští třecí okrsek samce a po obnově sil se vytírá ještě několikrát s tímto samcem či s jinými samci až do úplného vytření většiny jiker. Po úplném vytření opouští samice prostor trdliště. Samci většinou setrvávají na trdlišti až do skončení tření celé populace. Po vytření se matečné ryby vracejí na svá původní stanoviště v řece. Za příhodných podmínek proběhne výtěr lipana na trdlišti v průběhu 2-5 dnů.

2.7 Zdroje genetických změn v přírodě

Jeden z hlavních cílů populační genetiky je určit zastoupení dědičných variací přítomných v přírodě. Populační genetiky se tím pokouší osvětlit základní otázku v evoluční biologii: co určuje rozdíly mezi druhy, populacemi a jedinci? Mezi prvotními mechanismy, které mají potenciál k tomu, aby tvořily a homogenizovaly variace, jsou přirozený výběr, náhodný genetický drift, mutace a tok genů (Simpson 1953). Obecně platí, že přizpůsobování populací ke specifickým lokalitám je převážně výsledkem přirozeného výběru vlivem životního prostředí a zdrojové konkurence (Schluter 2000).

Přirozený výběr funguje tak, že jsou jedinci vybíráni podle biologické zdatnosti (fitness), to jest podle příspěvku jejich potomstva k další reprodukcující se generaci. Jestliže jsou rozdíly fitness mezi jedinci spojené s jedním daným genem, vyplývá z toho, že tento výběr bude operovat na tomto jednom genu. Pro geny, které podléhají výběru, rodiče různých genotypů předají své geny nerovnoměrně k další generaci, což vede ke genovým rozdílům mezi izolovaným populacemi (Falconer & Mackay 1996). Náhodný genetický drift je nepředvídatelný v směru. Za nepřítomnosti výběru, mutací a migrací zůstávají genové a genotypové četnosti dlouhodobě konstantní pouze u efektivně velkých panmiktických populací. V malé populaci nebo populaci rozdělené na podskupiny, genové a genotypové četnosti vždy podléhají kolísání mezi generacemi kvůli ztrátě části gamet z populace. Nezávislá ztráta gamet v populaci vede k lišícím se genovým a genotypovým četnostem v různých generacích, což je podstatou náhodného genetického driftu (Wright 1931).

Změny které se vyskytují v DNA sekvencích (mutace), mohou být ireversibilní nebo reversibilní. Nevratné (ireversibilní) změny mají velmi malý evoluční význam a jejich šance na přežití je ve velké populaci malá. Vratné (reversibilní) mutace jsou evolučně významné, ale jejich četnosti jsou obecně velmi nízké (Papadopoulos et al. 1999). Nicméně, když jsou populace dostatečně dlouho izolované, to jest alespoň po dobu 10 000 generací, mohou mít tyto změny významné evoluční důsledky (Remold & Lenski 2001). Tyto změny se mohou stěží projevit u druhu, který má dlouhé generační intervaly (Falconer & Mackay 1996). (Všimněme si, že toto není případ mikroorganismů, které byly právě pro svůj krátký generační interval využívány pro odhalení vlivu mutací; Papadopoulos et al. 1999).

Migrace (tok genů) homogenizuje proměnlivost mezi populacemi. Takzvaná stepping-stone migrace modeluje přibližně přírodní procesy podle vypočítaných prvků z genetické difference, které se budou zvyšovat se zeměpisnou vzdáleností, a vytváří tak schéma vzdálenostní izolace (Slatkin 1993). Principy migrační rovnováhy spočívají v tom, že menší populace vyžaduje vyšší úroveň toku genu než větší populace k tomu, aby zůstávala v rovnovážném stavu (je očekáváno, že silnější drift bude v menší populaci). Kromě toho je zřejmé, že i relativně malé počty imigrantů bude předcházet

velkým rozdílům v náhodném driftu (Falconer & Mackay 1996). Poslední empirické studie odhalily, že místní populace (ty populace, které kolonizovaly svá současná stanoviště, po pleistocenní době ledové, to jest přibližně před 10 000 lety) ještě možná nedosáhly rovnováhy migračního driftu (Turgeon & Bernatchez 2001). Všechny výše uvedené evoluční síly působí v času a prostoru (Wright 1931). K tomu, abychom porozuměli komplexním procesům řízení distribuce genetické diverzity v přírodě, je důležité prostudovat historii populací, současně evoluční činitele, stejně jako kombinaci historických a současných faktorů (Templeton et al. 1995).

2.8 Fylogeografie

Fylogeografie je rychle expandující vědní obor, týkající se historických procesů, řídících zeměpisnou distribuci genetických variací (Avice 2000). Demografická a rodopisná minulost populace je těsně spjata s geologickými událostmi, které vytvářejí nebo omezují vhodné lokality. Fylogeografické hypotézy vznikají porovnáním genetických dat s nezávisle vytvořenými teoriemi historie krajiny (Avice 2000).

Doba ledová ovlivnila rybí druhy fragmentací areálů jejich rozšíření a zánikem jednotlivých lokalit. Rozdělení areálů vedlo ke vzniku hydrologicky izolovaných a potenciálně malých subpopulací, kde se mohl uplatnit silný genetický drift (Avice 2000). Také doby meziledové byly pravděpodobně evolučně velmi důležité; tající vody z ustupujících ledovců tvořily nová jezera a řeky, které nabídly obrovské možnosti rozšíření pro populace přežívající na okrajích zaledněných oblastí (Avice 2000). Meziledové období tím poskytlo optimální podmínky pro homogenizaci mezipopulačních rozdílů (Avice 2000). Je také pravděpodobné, že během Pleistocénu probíhal silný přirozený výběr, způsobený stálým přizpůsobováním populací relativně rychle se měnícím podmínkám prostředí (Merilä 1997). Fylogeografické studie evropských taxonů navrhly tři hlavní regiony, které pravděpodobně sloužily jako postglaciální zdroje kolonizace pro mnoho druhů: Iberský poloostrov, Balkánský poloostrov a Apeninský poloostrov (Hewitt 2000). Ačkoli všechny druhy mají přirozeně svoji vlastní historii kolonizace, vzory doložené na příkladech kobyly (*Chorthippus parallelus*), ježka (*Erinaceus* spp.) a medvěda (*Ursus arctos*) byly navrhnuty k tomu,

aby představovaly nejčastěji využitě postupy kolonizace a sloužily jako vzory napříč všemi taxony (Hewitt 2000). Nicméně, některé studie již poukázaly na to, že ryby nemusejí zapadat do tohoto vzoru kolonizace. Je to možné demonstrovat na příkladu populace pstruha obecného (*Salmo trutta*), který přetrvával během Pleistocénu v pěti evolučních, pozoruhodně odlišných liniích (Bernatchez 2001). S postupným objasňováním dopadu historických událostí, které ovlivnily genovou strukturu populací, se ukázalo, že fylogeografie způsobila převrat v moderní populační genetice (Avice 2000; Hewitt 2000). Navíc fylogeografie vede ke zvýšení našich znalostí jak o vzniku druhů, tak i samotných populací, a je velmi důležitá pro zachování ohrožených druhů. Předpoklad pro uchování biologické rozmanitosti je rozpoznání populačních skupin s nezávislou evoluční historií a populační studie mohou poskytnout tyto důležité informace.

2.9 Současné evoluční procesy

Zatímco doby ledové v Pleistocénu mohou být viděny jako dominantní pro stavbu dnešní genetické diverzity (Avice 2000; Hewitt 2000), všechny evoluční síly spojitě ovlivňují genetickou strukturu populace. Nicméně, relativně důležitému přírodnímu výběru (Fisher 1930) a náhodnému genetickému driftu (Wright 1931) bylo v současném vývoji slabě porozuměno a je předmětem diskuse od prvních populačních genových modelů (Schluter 2000). Klasická ichtyologická evoluční teorie (Fisher 1930), ovlivněná teorií Charlese Darwina (Darwin 1859), je založena na hypotéze, že fenotypová rozdílnost vyplývá v první řadě z pozitivního přirozeného výběru (Fisher 1930). Další evoluční modely oproti tomu zdůrazňovaly potenciální význam náhodného genetického driftu (Kimura 1995).

Některé experimentální údaje z populací zdůrazňují význam změny podmínek prostředí a podporují tak myšlenku důležitosti přirozeného výběru (Grant & Grant 2002). Nicméně, empirické poznatky, které by porovnávaly klasickou ichtyologickou evoluční teorii s teoriemi alternativními, jsou překvapivě vzácné (Schluter 2000).

V posledních desetiletích je stále významnější formou toku genů lidmi zprostředkovaná introdukce. Introdukce může hrát důležitou roli v současné

mikroevoluci některých místních populací (Allendorf & Waples 1996). Introdukovaní jedinci mohou mít pravděpodobně škodlivé účinky na původní populace, ve kterých mohou způsobit pokles celkové diverzity, zmenšení fitness vlivem outbreední deprese a ztrátu schopnosti přizpůsobit se místním podmínkám (Allendorf & Waples 1996). Vzhledem k těmto faktům je důležité odhalovat a také odhadovat vliv, který mají nepůvodní jedinci na původní divoké populace a jejich genové složení.

2.10 *Thymallus thymallus*

V porovnání s ostatními druhy uvnitř čeledi Salmonidae existuje pouze málo studií o lipanu podhorním *Thymallus thymallus*. Tato lososovitá ryba je považována za kulturně významný a vysoce ceněný druh. Nicméně během posledních několika dekad faktory, jako regulace vodních toků, znečištění, predace a silný rybářský tlak, výrazně přispěly k poklesu velikosti místních populací v Evropě (Sušnik et al. 2001). Následkem toho byly zahájeny rozsáhlé programy, zaměřené na znovunavrácení lipana do evropských vod. Avšak tyto záchranné akce jsou založeny jen na malé nebo dokonce žádné informovanosti o distribuci složité genetické proměnlivosti u lipana. Pro náhradu ztrát byly vysazovány ryby z líhní po celém dunajském, labském i oderském povodí bez ohledu na jejich původ (Sušnik et al. 2001). Rybářské hospodaření čelí problému záchrany zbývajících divokých populací a je tedy potřeba určit lokality s těmito divokými populacemi a navrhnout chráněné a hospodářské oblasti jako Evolučně významné jednotky (ESUs).

Genetické studie lipana jsou velmi důležité k tomu, aby nám pomohl dále porozumět, jak byly evropské druhy sladkovodních ryb ovlivňovány čtvrtohorním střídáním dob ledových a meziledových a poskytly nám informace, které mohou být použity pro vytvoření vhodných směrnic pro reintrodukci této ohrožené lososovité ryby. Data založená na molekulárních studiích dávají jasné závěry o dunajském povodí jako o největším a nejdůležitějším refugiu pro kolonizaci vodních biotopů severní a střední Evropy. Nicméně, některé studie chladnomilných druhů (*Salmo trutta*, *Salmo salar*, *Thymallus thymallus* a *Cottus gobio*) ukázaly na možnost existence vícečetných refugií severně od dunajského povodí (Englbrecht et al. 2000). I přes toto zevšeobecnění

neexistuje žádný jasný konsenzus nebo běžné schéma vysvětlující, kde a kdy taková refugia existovala, ani kde přesně se nacházely hydrologické cesty sloužící pro poledové expanze.

Jako první shromáždili komplexní fylogeografická data pro *Thymallus thymallus* Koskinen et al. (2000) analýzou celkem 623 jedinců z celé Evropy. Zde však byla takřka opomenuta oblast střední Evropy. Výsledky jsou založené na metodě PCR RFLP přibližně z poloviny mitochondriálního genomu, 529 párů bází (bp) dlouhé sekvence mitochondriálního (mt) genu ND5 a 17 mikrosatelitových lokusů (Koskinen et. al 2000). Analýzy mtDNA odhalily celkem 27 haplotypů, které byly seskupeny do tří fylogenetických linií. Linie vykazovaly nukleotidovou divergenci 1.11-3.59%. Zeměpisná distribuce haplotypů indikuje genetickou diferenciaci mezi: severovýchodní (NE), severozápadní/střední (NW/C) a jižní Evropou (S). Tyto závěry byly podpořeny i analýzou mikrosatelitů (Koskinen et al 2000).

Zeměpisné rozdělení linií je podle této studie obecně velmi jasné v severní Evropě, kde byli zahrnuti jedinci ze dvou geneticky odlišných oblastí:

1. Finsko, Estonsko a severozápadní Rusko
2. centrální Německo, Polsko a západní Skandinávie

Průměrná diference mezi populacemi *Thymallus thymallus* v severní Evropě byla 10krát vyšší než ta, která byla pozorována v podobných studiích u druhu *Thymallus arcticus* v Severní Americe (Koskinen et. al 2000).

Podle zjištění autorů populace *Thymallus thymallus*, které přežily dramatické teplotní výkyvy v období Pleistocénu, pocházejí z dávných východoevropských a středoevropských refugií. Genetické rozdíly mezi populačními skupinami v severní Evropě byly značné a geograficky zřetelné. Zbytek Evropy obývají odvozené populace, které se pravděpodobně rozšířily z dunajského refugia (Koskinen et. al 2000). Autoři dále soudí, že lipan, který kolonizoval Norsko a Švédsko, pochází ze středoevropského refugia, které mohlo být zdrojem pro postglaciální rozšíření lipana do centrálního Německa, Dánska a Polska. Můžeme se domnívat, že i povodí Labe bylo využito pro postglaciální expanzi lipana, podobně, jako bylo zjištěno u síha, *Coregonus clupeaformis* (Hansen et al.1999).

Skupina jihoevropských populací charakterizovaná pomocí mikrosatelitů se pravděpodobně šířila v době postglaciální specifickými cestami. (Koskinen et al. 2000). Proto je možné, že z jihoevropských populací byly odvozeny populace severozápadní a střední Evropy. Tato kolonizace na sever byla pravděpodobně uskutečněna přes Dunaj do Labe během časů, kdy tehdejší horní toky povodí Labe byly spojeny s povodím Dunaje (asi před 1,8 miliony let - Hantke 1993). Dunaj byl také považován za zdroj pro postglaciální expanzi populací okouna říčního (*Perca fluviatilis*; Nesbø et al. 1999) a vranky obecné (*Cottus gobio*; Englbrecht et al. 2000). Evropské populace lipana, které v současnosti obývají hydrologicky spojené lokality, mohou být zřejmě geneticky velmi rozdílné v důsledku původu z různých refugií (Koskinen et al. 2002). Pro vysoké hodnoty genetické diferenciace mezi podobnými populacemi existují dvě alternativní vysvětlení. Buď vznikly ve dvou nebo více izolovaných glaciálních refugiích a přetrvávaly v izolaci v postglaciálu navzdory možnosti fyzického kontaktu, jako tomu bylo mezi některými populacemi síha v povodí řeky St. John v Severní Americe (Lu et al. 2001) nebo populace vznikly ze stejného panmiktického refugia, ale postglaciální stěhování bylo značně omezené.

Nedávná analýza polymorfismu mikrosatelitů sladkovodních, anadromních a mořských ryb ukázala u sladkovodních populací v průměru 9.1 (± 6.1) alel na lokus a průměrnou heterozygotnost 0.54 (± 0.25 ; DeWoody & Avise 2000). Některá data indikovala u evropských populací lipana v průměru jen 3.5 (± 2.2) alel na lokus a heterozygotnost 0.41 (± 0.27 ; Koskinen et al. 2000). Protože celková diverzita 17 mikrosatelitů byla vysoká (5-58 alel na lokus), nízká úroveň diverzity *Thymallus thymallus* nebyla vlastností vybraných markerů, ale populací. Jedno z možných vysvětlení je, že rozptylování populací *Thymallus thymallus* z míst jejich výtěru je omezené. To může mít za následek dlouhodobě nízkou efektivní populační velikost a následkem toho nízkou úroveň vnitropopulační proměnlivosti. Alternativní vysvětlení vychází z názoru, že juvenilní lipani nevykazují přílišnou pohybovou aktivitu a s tím i spojené rozptýlení od rodných míst. Značení některých jedinců ukazuje na poměrně slabé migrační chování, a to v případě migrací za výtěrem jen do vzdálenosti 15 km a v období mimo tření jen okolo 1 km (Stein et al. 2001). Bylo argumentováno tím, že tato

tendence může mít za následek masivní časnou úmrtnost, kdy pulzace hladiny vody znemožní juvenilním jedincům efektivně změnit stanoviště do hlubších vod, na rozdíl od juvenilních jedinců *Salmo trutta* nebo *Salmo salar* (Nykänen & Huusko 1999). Takováto událost, která postihne jeden ročník, může snížit efektivní populační velikost a genetickou diverzitu populace. Omezená mezipopulační proměnlivost lipana byla také zjištěna v práci Koskinen et al. (2001). Další vysvětlení může spočívat v tom, že dominantní samci lipana chrání nejlépe trdliště a můžou se účastnit vícenásobných tření s několika samicemi (Stein et al. 2001). Tyto biologicky charakteristické rysy lipana vedou k populační substrukturaci a pravděpodobně způsobují relativně nízkou vnitropopulační genetickou proměnlivost.

2.11 Genetická diverzita a vztahy mezi populacemi ve střední Evropě

Počty vzorkovaných lokalit ze střední Evropy v studiích Koskinen et al. (2000, 2002) a Weiss et al. (2002) byly bohužel buď nízké nebo úplně chyběly. Ve střední Evropě publikovali Gross et al. (2001) studii založenou na proměnlivosti mitochondriálních a nukleárních genů a čtyř mikrosatelitů, v níž porovnávali divoké populace z Dunaje, Labe a Mohanu. Poskytli tím první náhledy na genetickou strukturu populací lipana ve střední Evropě.

Rozdíly mezi genotypovými četnostmi ve střední Evropě jsou vysoce významné pro většinu populací, kromě populací z Innu a mezi populacemi Innu a řeky Lech v dunajském povodí. Celková úroveň genetické diferenciaci mezi bavorskými populacemi lipana se ukázala jako vysoká ($F_{ST}=0.394$).

Genetická divergence mezi třemi povodími v Bavorsku (29.1% celkového množství genetické proměnlivosti) je značná, což demonstruje vysoce statisticky významná různorodost genotypových četností, velký počet specifických alel, vysoká hodnota F_{ST} a další ukazatele. Tato vysoká divergence naznačuje dlouhé období reprodukční izolace mezi populacemi lipana v povodích Dunaje, Rýna, Mohanu a Labe, navzdory jejich zeměpisné blízkosti (Gross et al. 2001; Weiss et al. 2002). Výsledky těchto autorů ukázaly, relativně vysoké hodnoty celkové diverzity mikrosatelitů v bavorských populacích lipana s průměrným počtem 12.4 alely na lokus a $H_e = 0.48$.

Úroveň genetické diverzity u populací v severním Bavorsku (to jest v povodí Rýna a Labe) je významně nižší než u populací v jižním Bavorsku (to jest v povodí Dunaje; Gum et al. 2003). Toto se shoduje s pozorováním, že jižní refugia populací poskytují vyšší úroveň proměnlivosti než populace v severních oblastech, které byly ovlivněné drastickým snížením velikosti ancestrálních populací – tzv. bottleneck effect (Bernatchez and Wilson 1998). Koskinen et al. (2002) nenašel žádnou významnou souvztažnost mezi počtem alel a zeměpisnou šířkou u populací lipana, nicméně jeho vzorky zahrnují jen dvě populace z Dunajského povodí. Veškeré Dunajské populace které byly doplněné rybami uměle vytřeny v líhních, ukázaly vyšší hodnoty, *AR* a *He* než původní populace (které nebyly nikdy uměle doplněné). Vyšší úroveň genové proměnlivosti může být vysvětlena kombinovanými vlivy rybářského hospodaření a vícenásobných postglaciálních rekolonizací.

Bližší vztah mezi Rýnem, Rhonou a Labem a jejich povodími je evidentní z analýzy mtDNA ve srovnání s většinou dunajských haplotypů (Weiss et al. 2002). Dva dunajské haplotypy tvoří samostatnou skupinu společně s několika haplotypy ze švýcarského Rýna, což poukazuje na určitý historický tok genu mezi horním Rýnem a Dunajem. Tento fakt je podpořen i zeměpisnými daty. Významnější spojení mezi horním Dunajem a horním Rýnem existovalo v Době ledové asi před 150 000-300 000 lety (Hantke 1993). Podobně mitochondrialní analýzy vranky obecné (*Cottus gobio*) také odhalily tok genů mezi horním Rýnem a horním Dunajem, ale nenašly žádný sdílený haplotyp mezi populacemi Mohanu, Labe a horního Dunaje (Hanfling et al. 2002). V porovnání s vrankou obecnou a lipanem (kteří sdílí podobnou reprodukční strategii a podobné migrační chování), mitochondriální studie mobilnějších druhů jako je jelec tloušť (*Leuciscus cephalus*) nebo okoun říční (*Perca fluviatilis*) indikovaly časný postglaciální odklon a nižší úroveň diferenciace mezi studovanými povodími (Hanfling and Brandl 1998).

Ve své studii Weiss et al. 2002 rozdělil na základě analýz části mtDNA jedince do pěti oddělených skupin. Jedna skupina je reprezentována osamocenými haplotypy s povodí řeky Loiry, další skupina odpovídá dunajským populacím severně od alpského masivu, dále skupina populací nacházejících se jižně od Alp, jedna skupina spadá do

jaderského úmoří a jedna velká skupina je reprezentovaná populacemi z Rýna, Rhóny, Skandinávie a třemi vysoce divergentními haplotypy z povodí slovinské řeky Sávy (Weiss et al. 2002).

Populace, které mají nezávislé evoluční historie, čímž nejvíce přispívají do celkové vnitrodruhové biologické rozmanitosti, by pravděpodobně měly být upřednostňovány při volbě ochranných opatření (Moritz 1994). Jedna alternativa pro přímou aplikaci výsledků genetických analýz ve vývoji vhodných ochranných směrnic zahrnuje rozpoznání tzv. management jednotek (MU). Samostatná MU byla definována jako populace spojená malým nebo žádným současným tokem genů, ale neoddělená historicky na dlouhé časové období (Moritz 1994). Zdá se, že některé výsledky mtDNA a mikrosatelitů demonstrují, že populace lipana oddělené vodním tokem, které jsou vzdáleny jen v řádu sta kilometrů, splňují tato kritéria pro zařazení do jednotlivých MU (Koskinen et al. 2000). Zdá se také možné, že tyto značné genové rozdíly se mohou vyskytovat v mnohem menších zeměpisných vzdálenostech (Koskinen et al. 2000). Lze tedy konstatovat, že severoevropské populace lipana vznikly přinejmenším ze dvou refugií, která byla geneticky izolována po stovky tisíc let. V jižní Evropě se vyskytují linie, z nichž se později oddělily populace v severozápadní a střední Evropě. Populační skupiny zůstaly velkou měrou alopatrické také v postglaciálních dobách a tehdejší mezipopulační tok genů byl velmi omezený, dokonce i v případech možného fyzického kontaktu. Celková úroveň mezipopulační genetické diverzity u *Thymallus thymallus* je velká, zatímco vnitropopulační diverzita je neobvykle nízká. Koskinen et al. (2000) na základě těchto závěrů navrhuje, aby evropské populace lipana byly považované za samostatné MU dokonce u relativně ne příliš geograficky vzdálených populací.

Tato zjištění by měla poskytovat užitečné informace pro rozvíjení vhodných strategií pro ochranu původních populací lipana *Thymallus thymallus* a dokázat tak potřebu mnohonárodnostní spolupráce pro uchování biologické rozmanitosti.

2.12 Mitochondriální DNA

Mitochondrie mají svou vlastní DNA, která obsahuje životně důležité geny. MtDNA má velikost jen 16000 až 20000 bp a od jaderné DNA je oddělena plazmatickými membránami, což umožňuje její relativně snadnou izolaci (Carvalho et al. 1995). Mitochondrie jsou děděny maternálně, tedy z cytoplazmy vajíčka pocházejícího od matky. Vlivem toho je mtDNA haploidní, tudíž obsahuje pouze jednu kopii každého genu. Rozdíly v DNA sekvenci v mitochondriálním genomu podmiňují výskyt rozdílných haplotypů (variant mtDNA). U ryb, stejně jako u většiny živočichů, akumuluje mtDNA mutace asi 5krát častěji než jaderná DNA. Poskytuje tak genetické znaky s větší variabilitou a senzitivitou na genetický drift, a proto je vhodnější na prokazování rozdílů mezi populacemi či druhy.

Protože se jednotlivé úseky mtDNA vyvíjely různou rychlostí, jsou dnes určité oblasti mtDNA vhodnější pro určité typy studií. Například úsek pro cytochrom b vhodně vypovídá o variabilitě na úrovni populací (Mortiz 1994). Vysokou variabilitu u většiny obratlovců vykazuje také úsek zvaný D-LOOP nebo „control region“. U některých ryb byla však pozorována nízká úroveň polymorfismu tohoto úseku mtDNA (Ferguson et al., 1995).

2.13 Izolace DNA

Způsobů izolace DNA existuje celá řada a navíc jsou neustále vylepšovány a jsou vyvíjeny metody nové (Žurovec 1999). DNA lze teoreticky izolovat z jakékoliv živočišné tkáně obsahující nativní buňky. U organismů malé velikosti se používá i celých jedinců (Zima et al. 2004). Jako nejběžnější materiál se používá krev, avšak u ryb jsou to častěji části ploutví, svalová či jaterní tkáň. K následným analýzám slouží tato DNA v různém stupni čistoty jako templát (Žurovec 1999).

K izolaci se používá celá řada různých protokolů. V poslední době se velice osvědčilo používání komerčně dodávaných souprav (kitů). Během extrakce odstraníme všechny látky, které DNA doprovázejí. Jsou to především proteiny, tuky, různé soli, inhibiční látky atd. Výsledkem by měla být čistá nedestruovaná DNA. Izolace DNA se musí provádět velmi pečlivě, jinak by se mohly při jejím dalším použití (např. při PCR)

vyskytnout komplikace (Žurovec 1999). Koncentrace izolované DNA se ověřuje spektrofotometricky, nebo pomocí elektroforézy na agarosovém gelu. Izolovaná DNA se ředí podle potřeby a uchovává v mrazničce při teplotách pod -18°C .

2.14 PCR

Účelem PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) je získat velké množství kopií určitého genu či jiného úseku DNA, které je nezbytné pro následné analýzy, např. sekvenaci (Zima et al. 2004).

Pro zdárný průběh reakce, kdy dochází ke kopírování úseku původní DNA (která byla předtím již izolována a zkontrolována, ev. bylo změřeno její množství), je nutné do reakční směsi přidat:

izolovanou DNA, která funguje jako předloha (template, matrice - matrix)

deoxynukleotidy (dNTP) - stavební kameny řetězce DNA

enzym DNA-polymerasu, která zajišťuje vzájemné spojování nukleotidů do komplementárního řetězce podle předlohy

primer = oligonukleotidový řetězec (ca. 20 bazí), jehož struktura je navržena a syntezována tak, aby se navázal na předlohu na začátku nebo na konci úseku, který chceme namnožit; připravují se dvojice primerů - pro každý z komplementárních řetězců se musí vytvořit prostředí, ve kterém bude reakce nejlépe probíhat (pH - určeno a udržováno pufrům; koncentrace iontů Mg^{2+} , které jsou nutné pro funkci polymerasy apod.; Zima et al. 2004)

2.14.1 Průběh PCR

PCR probíhá ve třech cyklicky se opakujících krocích:

Denaturace - dochází k zahřátí DNA na teplotu 94°C po dobu 60 sec., což způsobí rozštěpení vodíkových můstků a vznik jednořetězcové molekuly DNA.

Annealing - v této fázi dochází k „nasedání“ primerů na template podle principu komplementarity, čímž je umožněno, za přítomnosti enzymu DNA-polymerasy, zahájení další fáze (Žurovec 1999).

Annealing probíhá při teplotě přibližně 54 °C, avšak tato teplota je pro každý analyzovaný fragment (pár primerů) specifická a často vyžaduje dosti zdlouhavou optimalizaci.

Elongace (extenze) - reakční směs se zahřeje na teplotu 72 °C po dobu 180 sec. Tato teplota je optimální pro zahájení enzymové reakce DNA-polymerasy, která umožní zabudování volných nukleotidtrifosfátů na základě komplementarity do nově vznikajícího řetězce DNA.

Tyto jednotlivé kroky se opakují ve 25 až 35 cyklech.

Prvnímu cyklu předchází úvodní denaturace, prodloužená na 2-10 min., aby došlo k úplnému rozdělení všech vláken dvouřetězcové DNA. Celá reakce je zakončena konečnou elongací, trvající obvykle zhruba 10min, což umožní dokončení DNA polymerace u většiny navázaných primerů. Celá PCR je zakončena chlazením vzniklého produktu na 4 °C. Úspěšnost PCR se opět kontroluje elektroforézou na agarosovém gelu (Žurovec 1999)..

2.15 Purifikace PCR produktu

Tato purifikace se dnes provádí za pomoci kitů dodávaných různými firmami. PCR produkt je pomocí speciálních kolonek s křemičitou filtrační membránou zbaven všech kontaminantů, které by ovlivňovaly výsledek budoucí sekvenace. DNA má tu vlastnost, že se za přítomnosti chaotropních solí váže na oxid křemičitý a v průběhu centrifugace je zachycena na filtrační křemičité membráně (Boom 1990). Tyto soli jsou poté odplaveny spolu s kontaminanty pomocí ethanolu a speciálních pufrů. Vlivem snížení koncentrace chaotropních solí dochází k uvolnění vazby DNA na oxid křemičitý v membráně a DNA je následně vyplavena z membrány pomocí pufru nebo vody (Melzal 1996).

2.16 Sekvenační reakce

Sekvenování probíhá prostřednictvím syntézy nového (komplementárního) vlákna podle templátu. Celá reakce je v podstatě modifikovaná PCR. Cílem sekvenace je určit pořadí nukleotidů v genu. Na rozdíl od PCR se začíná od fragmentů - produktů PCR.

Pro určení místa zahájení syntézy se využívá jedné z vlastností DNA-polymerasy. Ta je totiž schopna zahájit syntézu nového vlákna pouze pokud je již k dispozici hotový krátký úsek druhého vlákna, tzv. primer. V živých buňkách vytváří tyto primery RNA-polymerasa, která je na rozdíl od DNA-polymerasy schopná zahájit syntézu na „holém“ templátovém vlákně. Při sekvenační reakci se musí přidat do reakční směsi tyto primery, jejichž sekvence je komplementární k určitému úseku templátové DNA. Kromě toho se do reakce vedle deoxynukleotidů (dNTP) přidává i malé množství dideoxynukleotidů (ddNTP), které zastaví růst řetězce a které jsou označeny fluorescenčními barvami. Průběh denaturace je stejný jako u PCR. Dále se vytvoří vhodné teplotní podmínky pro vznik vodíkových můstků a dochází k nasednutí primerů na templát. Pro amplifikaci se používá nižší teplota - okolo 60°C, aby nedošlo k poškození ddNTP. Amplifikace probíhá asi takto: Pokud se do řetězce zapojují pouze dNTP, reakce pokračuje; jakmile se na 3' konec připojí ddNTP, růst tohoto řetězce se zastaví, protože ddNTP má v poloze 3' atom H (místo OH v dNTP) a další nukleotid se nemá na co připojit. Protože na ddNTP je navázána fluorescenční barva, můžeme detekovat barvu poslední báze fragmentu na automatickém sekvenátoru. Pokud je každý z ddNTP označen jinou barvou, detekujeme podle ní, kterou ze čtyř bazí každý z řetězců končí a tak postupně určíme jejich pořadí ve zkoumaném úseku DNA (Žurovec 1999).

2.17 Purifikace po sekvenační reakci

Jedná se v podstatě o analogii předchozí purifikace s tím rozdílem, že se zde odstraňují i ddNTP, které se nenavázaly během sekvenační reakce. Opět se používají speciální purifikační kity. Tyto kity obsahují filtrační kolonky, pomocí kterých se ze vzorku odstraní nežádoucí složky. Děje se tak díky prehydratované gelové filtrační náplni kolonek, která má tu vlastnost, že separuje molekuly podle jejich velikosti. Nízkomolekulární složky – hlavně ddNTP a další kontaminanty jsou zadrženy v pórech gelové membrány, zatímco samotná DNA prochází touto membránou a je zachycena v mikrozkuřavce. Účinnost této purifikace závisí především na délce fragmentu DNA, na objemu vzorku a množství kontaminantů (Boom 1990).

2.18 Denaturace

Denaturace se provádí zahřáním v termocyleru na teplotu 95°C po tak dlouhou dobu, aby došlo k rozrušení vodíkových můstků mezi vlákny DNA. Vzorek musí být poté velice rychle zchlazen na teplotu pod 4°C, aby nedocházelo k renaturaci.

2.19 Sekvenace

Fragmenty, které jsou na konci označené ddNTP s fluorescenčním barvivem, migrují gelem a procházejí postupně dráhou laserového paprsku na konci gelu. Laser excituje molekuly fluorescenčního barviva, které vysílají světlo různé barvy (podle typu molekuly). Světlo je vedeno optickými drahami do spektrografu, který je rozkládá podle barvy a vede na kameru. Vzhledem k tomu, že každá báze má svou barvu, může sekvenátor určit pořadí bází v sekvenovaném genu (Žurovec 1999).

3. Materiál a metodika

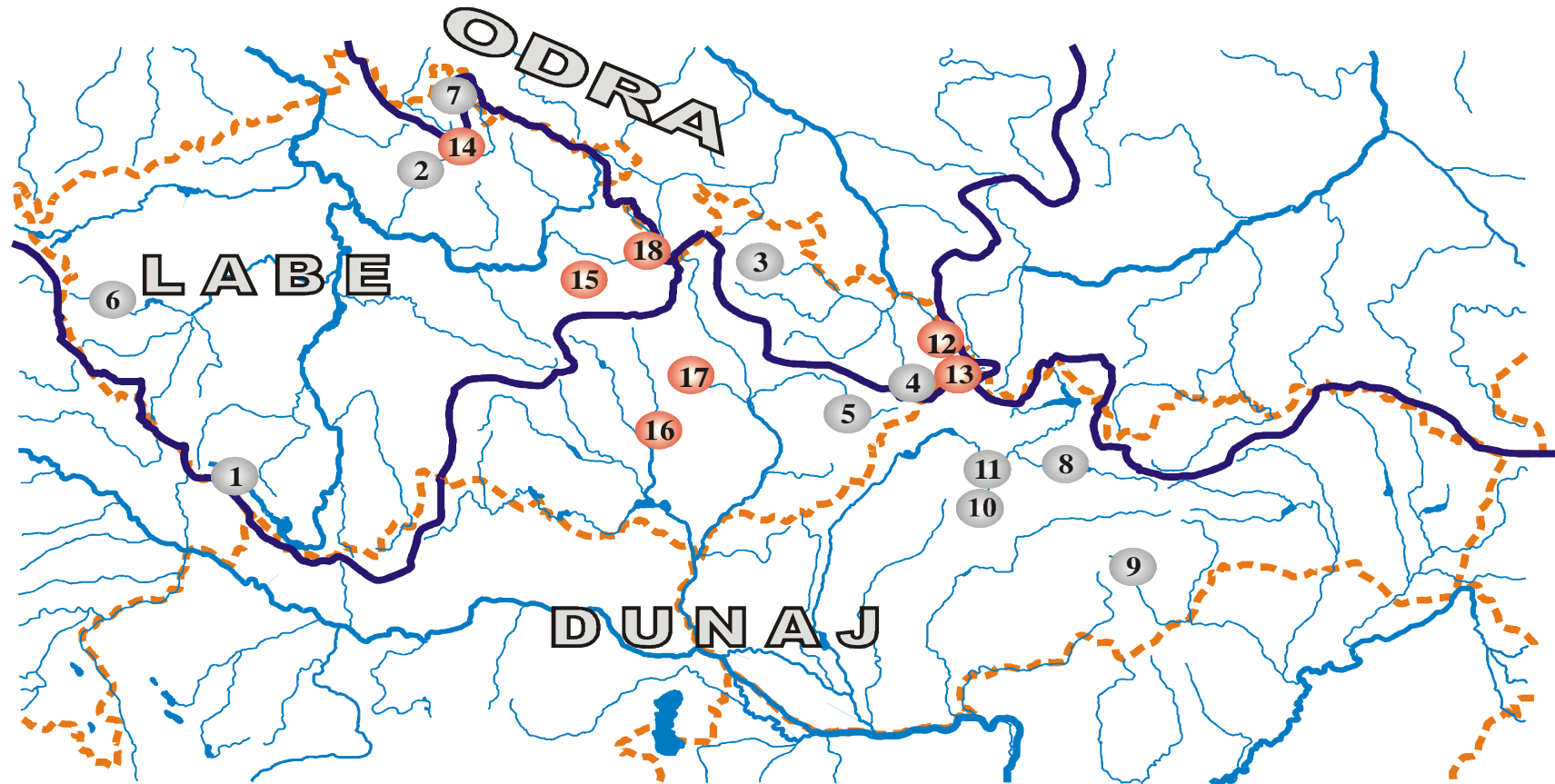
Vzorky byly získány pomocí elektrolovu, popřípadě od pracovníků místních organizací ČRS. K celkovému počtu 75 vzorků z 8 lokalit na území České republiky bylo odebráno 22 jedinců ze tří lokalit na Slovensku a pět jedinců z lokality v Bosně a Hercegovině. Přesný přehled odběrových lokalit a počty odebraných vzorků jsou uvedeny v Tabulce č. 1.

Vzorkované lokality byly voleny tak, aby co nejlépe pokryly všechna tři povodí v ČR, přičemž byl brán zvláštní zřetel na výběr populací, které nebyly v posledních letech „posíleny“ vysazením nepůvodních jedinců. Vzorkované lokality jsou znázorněny na Obrázku č.1.

Celkem 37 vzorků v podobě hotových sekvencí poskytl Mgr. Ivo Papoušek, Ph.D. z Ústavu biologie obratlovců Akademie věd ČR, v.v.i. Brno. Tyto sekvence byly využity pro porovnání zjištěných výsledků. Seznam poskytnutých sekvencí s lokalitami je uveden v Tabulce č. 2. Tyto lokality jsou znázorněny i na Obrázku. č.1 a jsou barevně odlišeny od lokalit, které vzorkoval autor.

Příslušné úseky mtDNA, tedy gen pro cytochrom b (cyt b) a „control region“ (D-loop) byly následně amplifikovány pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce), za použití primerů popsanych v literatuře. Tyto fragmenty byly dále sekvenovány v automatickém sekvenátoru ABI Prism 3130 a část byla odeslána do korejského sekvenačního servisu Marogen, Inc. Sekvence byly seřazeny a porovnány v programu BioEdit a následné statistické analýzy byly provedeny v programech DnaSP 4.90, Arlequin 3.1 a Network 4.5.1.0.

Obrázek č. 1: Mapa vzorkovaných lokalit



1. Teplá Vltava
2. Jizera
3. Bělá
4. Ostravice
5. Vsetínská Bečva
6. Mže

7. Smědá
8. Revúca
9. Muráň
10. Slovianský potok
11. Turiec
12. Olše

13. Morávka
14. Jizera
15. Loučná
16. Svatka
17. Křetínka
18. Tichá Orlice

Tabulka č. 1: Seznam vzorkovaných lokalit

Zkratka	Vzorkovaná lokalita	Tok	Povodí	Počet vzorků
BL	Borová Lada-Líheň	Teplá Vltava	Labe	10
TA	Tachov	Mže	Labe	5
JZ	Turnov	Jizera	Labe	10
OD	Libavá	Odra	Odra	10
SH	Staré Hamry	Ostravice	Odra	10
SE	Raspenava	Smědá	Odra	10
JE	Jeseník	Bělá	Odra	10
UV	Ústí u Vsetína	Vsetínská Bečva	Dunaj	10
SD	Slovianská dolina	Slovian. potok (SK)	Dunaj	10
VR	Bravnice	Vrbas (BIH)	Dunaj	5
TU	Dubová	Turiec (SK)	Dunaj	2
BP	Biely potok- Líheň	Revúca (SK)	Dunaj	10

Tabulka č. 2: Seznam vzorkovaných lokalit (Mgr. Ivo Papoušek Ph.D.)

Zkratka	Vzorkovaná lokalita	Tok	Povodí	Počet vzorků
OL	Třinec	Olše	Odra	1
MO	ÚN Morávka	Morávka	Odra	3
TO	Králíky	Tichá Orlice	Labe	9
JI	Semily	Jizera	Labe	1
NE	Nedošín	Loučná	Labe	5
SV	Tišnov	Svratka	Dunaj	14
KR	Horní Poříčí	Křetínka	Dunaj	5

3.1 Izolace DNA

Celková DNA byla extrahována z ústřížků ploutví, které byly do doby zpracování uloženy v koncentrovaném etanolu, pomocí extrakčního kitu Nucleo Spin® Tissue (Macherey-Nagel)

Do mikrozkuumavky s vysušenou tkání, nastříhanou na malé kousky, bylo nejprve přidáno 180 µl pufru T1 a dále 25 µl proteinasy K. Proteinasa K je enzym, aktivní vůči širokému spektru proteinů, které degeneruje. Digesce probíhá ve speciálním pufru, jehož složení brání degeneraci DNA. Takto připravená směs byla vložena do termobloku, nastaveném na teplotu 56 °C, kde byla za občasného vortexování ponechána 8 až 12 hodin. Po úplném rozpuštění tkáně bylo ke vzorku přidáno 200 µl pufru B3. Následovala inkubace při teplotě 70 °C po dobu 10 minut. Po přidání 210 µl 96% etanolu byla celá směs přepipetována do filtračních kolonek, které byly vloženy do centrifugy a odstředěny při 8000 ot/min.

V dalších krocích byly filtrační membrány promývány pufrů BW (500 µl) a B5 (600 µl), opět s použitím centrifugy. Po promytí byly filtrační kolonky se zachycenou DNA vloženy do čistých mikrokumavek, do nichž byla DNA centrifugací vymyta společně se 100µl BE pufru, předehřátého na 70 °C. Takto extrahovaná DNA byla uchována zamražená při teplotě do -20 °C.

3.2 PCR

3.2.1 Výběr primerů

Pro amplifikaci fragmentu kódujícího cytochrom b byly zvoleny primery, které byly původně vyvinuty pro čeled' okounovití (*Percidae*) (Song et al. 1998).

Tyto primery se u lipana podhorního osvědčily už dříve a proto nebylo nutné hledat nové.

Tabulka č. 3: Použité primery pro fragment cytochrom b

Název	Orientace	Délka	Sekvence oligonukleotidu (5' → 3')
L14724F	přímý	19 bp	GTG ACT TGA AAA ACC GTT G
H15918R	zpětný	22 bp	CTC CAT CTC CGG TTT ACA AGA C

Podle (Song et al. 1998).

Pro fragment D-loop byly použity primery, které byly vyvinuty pro studium genetické variability lipana podhorního v rakouských tocích (Uiblein et al. 2001).

Tabulka č. 4: Použité primery pro fragment D-loop

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

Podle (Uiblein et al. 2001)

3.2.2 Složení reakční směsi

Konkrétní složení reakční směsi bylo nejprve optimalizováno. Celkový objem reakční směsi činil 25 μ l a tato směs byla vždy připravována na šupinkovém ledu. Reakční směs obsahovala 3 μ l DNA (asi 50 ng) 8 μ l vody, 1,25 μ l každého z dvojice primerů a 12,5 μ l zásobního roztoku PPP Master Mix od firmy TopBio o následujícím složení: 0,05 μ l *Tag* DNA polymerasy, reakční pufr, 4 Mm MgCl₂, a 0,4 mM každého dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), celkový objem byl 25 μ l. Pro cytochrom b bylo u některých vzorků použito 5 μ l DNA namísto původních 3 μ l. Vyšší množství DNA bylo zvoleno kvůli nižší koncentraci této DNA v zásobním roztoku. Takto připravené reakční směsi byly vloženy do termocykleru, kde byl spuštěn program vhodný pro amplifikaci zvoleného fragmentu.

Tabulka č. 5: Složení reakčních PCR směsí (μ l)

Fragment	PPP master mix	DNA	Primery	PCR voda
Cytochrom b	12,5	3	1,25- L14724F 1,25- H15918R	8
Cytochrom b*	12,5	5	1,25- L14724F 1,25- H15918R	6
D-loop	12,5	3	1,25- LRBT-25 1,25- LRBT-1195	8

* vzorky s nižší koncentrací DNA po izolaci

3.2.3 Parametry cyklování

Teplotní a časový průběh reakcí je uveden v Tabulce č. 6. Byly využity termocykly PTC 200 od společnosti Major Sciences/BioRad. Pro optimalizaci průběhu PCR reakce bylo využito teplotního gradientu, který umožnil optimální nastavení annealingové teploty pro nasedání příslušných primerů. Výsledek této optimalizace po elektroforetické kontrole na agarosovém gelu je zobrazen v příloze na Obrázku č. 10.

Tabulka č. 6: Parametry cyklování při PCR reakcích

Fragment	Úvodní denaturace	Denaturace	Annealing	Elongace	Závěrečná elongace
Cytochrom b	95°C 300 s	2x94°C 60s 2x94°C 60s 2x94°C 60s 30x9 °C 60s	2x60°C 30s 2x58°C 90s 2x56°C 90s 30x54°C 90s	2x72°C 120s 2x72°C 120s 2x72°C 120s 30x72°C 120s	72°C 420s
D-loop	95°C 300 s	30x 94°C 60s	30x62°C 30s	30x72°C 120s	72°C 600s

3.3 Purifikace PCR produktu

Pro purifikaci PCR produktů bylo využito purifikačního kitu QIAquick[®] od firmy QIAGEN, který obsahuje kolonky s křemičitou filtrační membránou. PCR produkty byly nejprve naředěny 100 µl PBI pufru. Poté byla tato směs přepipetována do filtračních kolonek, které byly vloženy do centrifugy a odstředěny při 13000 ot/min. Dále byla filtrační membrána promyta 750 µl PE pufru opět pomocí centrifugy. Aby bylo dosaženo dostatečného odstranění PE pufru s ethanolem, byly kolonky opětovně odstředěny v centrifuze. V dalším kroku byly kolonky se zachycenou DNA na membráně vloženy do čistých mikrozkušavek a DNA byla vymyta pomocí 50 µl EB pufru v centrifuze. Výsledek celé purifikace byl kontrolován elektroforézou na agarosovém gelu.

3.4 Sekvenační reakce

Sekvenační reakce byla provedena podle instrukcí (návodu) firmy Applied Biosystems, Inc. Ke 4 µl sekvenačního kitu BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit a 4 µl pufru BigDye v1.1/1.3 Sequencing Buffer (5x) (oboje Applied Biosystems, Inc.) bylo přidáno 0,64 µl primeru, 1 µl přečištěného PCR produktu a 10,36 µl vody. Tato směs byla vložena do termocykleru BioRad PTC 200, kde proběhla reakce za následujících podmínek:

Denaturace	Annealing	Elongace
96 °C 10 s	50 °C 10 s	60 °C 240 s

3.5 Purifikace po sekvenační reakci

Tato purifikace byla provedena pomocí kitu DyeExTM od firmy QIAGEN. Součástí tohoto kitu jsou gelové filtrační kolonky. Tyto kolonky s filtračním gelem byly vloženy do mikrozku mávek, které jsou také dodávány v kitu. Poté byly kolonky vloženy do centrifugy, kde byl optimalizován počet otáček. Následně byla opatrně přidána DNA a tyto kolonky byly odstředěny při 2420 ot/min v centrifuze.

3.6 Denaturace a sekvenace

Denaturace byla provedena v termocycleru při teplotě 95 °C po dobu jedné minuty. Následně byly vzorky zchlazeny na šupinkovém ledu.

Sekvenace byla provedena ve čtyřkapilárovém automatickém sekvenátoru ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Tímto způsobem byla zpracována část vzorků. Zbylé vzorky byly jako PCR produkty odeslány do firmy Macrogen se sídlem v Jižní Koreji, kde byly vzorky purifikovány a sekvenovány.

3.7 Statistické zpracování

Výsledné sekvence nukleotidů daných fragmentů byly zpracovány pomocí programu BioEdit 7.0.9 (Hall 1999). Pro účely statistického zpracování byly oba fragmenty spojeny a analyzovány společně.

Pro výpočet fixačního indexu F_{ST} vyjadřujícího úroveň genetické diferenciace mezi populacemi byl použit program Arlequin 3.1 (Schneider et al. 2000). Ve stejném programu byla provedena také analýza molekulární proměnlivosti (AMOVA), která vyjadřuje hierarchické rozložení genetické proměnlivosti. Pro tuto analýzu byly vytvořeny skupiny podle zastoupení populací v jednotlivých povodích. Počty nalezených haplotypů, počty polymorfních míst a hodnoty haplotypové diverzity pro každou populaci byly vypočítány v programu DnaSP 4.90 (Rozas et al. 2003). Pro vytvoření haplotypové sítě byl použit algoritmus „median-joining“ v programu Network 4.5.1.0. (Bandelt et al. 1999). Tento program umožňuje v kombinaci s programem

Network Publisher (Bandelt et al. 1999) grafické zobrazení a následnou editaci haplotypové sítě. Barevně byla označena jednotlivá povodí.

4. Výsledky

PCR a následná sekvenace 2162 bp dlouhého fragmentu mitochondriální DNA pro cytochrom b a D-loop ze 137 jedinců z celkem 19 studovaných populací ukázala 17 mtDNA haplotypů a celkem 82 polymorfních míst. Počty jedinců příslušných haplotypů v jednotlivých populacích jsou uvedeny v Tabulce č. 7.

Nejpočetněji byl zastoupen haplotyp TH1, jehož výskyt se ukázal jako téměř universální. Tento haplotyp byl nalezen u 92 jedinců z celkem 17 populací. Nebyl zastoupen pouze u populace z řeky Vrbas (VR) v Bosně a u populace z řeky Turiec (TU) na Slovensku. Tyto populace byly reprezentovány haplotypy TH11-TH15, které nebyly zastoupeny u jiných jedinců a jedná se tedy s velkou pravděpodobností o výhradně dunajské haplotypy. U populací ze Vsetínské Bečvy (UV), ze Mže (TA), Morávky (MO), Svratky (SV) a Křetinky (KR) byl haplotyp TH1 jediný nalezený a u těchto populací byla tudíž nulová haplotypová diverzita. Haplotyp TH1 byl nalezen i v populacích z Jizery (JI) a Olše (OL). Zde však byl analyzován pouze jeden jedinec od každé populace, proto nemohla být u těchto populací stanovena haplotypová diverzita a vypovídací hodnota výsledků z těchto dvou populací je nízká a má pouze doplňující charakter. Při dalším vyhodnocování na tyto populace již nebyl brán zřetel.

Druhým nejčastěji zastoupeným haplotypem byl haplotyp TH7 zjištěný u 12 jedinců. Tento haplotyp byl zachycen ve všech třech studovaných povodích. Naopak celkem 12 haplotypů bylo zachyceno vždy jen na jediné lokalitě. Haplotypy TH2, TH3, TH9, TH16, TH17 byly nalezeny pouze na území České republiky. Co se vztahu mezi haplotypy a původem zkoumaných jedinců týče, u lipanů z ČR bylo zaznamenáno 8 haplotypů a 12 haplotypů bylo zastoupeno u jedinců ze Slovenska a Bosny. Celková distribuce haplotypů ukazuje na genetickou odlišnost populací z dunajského povodí, které vykazují vysoké hodnoty genetické diferenciace (F_{ST}) v porovnání s populacemi v ČR. Uvedené hodnoty haplotypové diverzity jednotlivých populací je nutné chápat jako orientační, protože jsou ovlivněny počty vzorků z jednotlivých lokalit.

Jak vyplývá z Tabulky č. 9, nejvyšší haplotypovou diverzitu měly populace z povodí Dunaje. Tyto populace vykazují dle očekávání nejvyšší genetickou variabilitu.

To se shoduje se zjištěním, že jižní populace poskytují vyšší úroveň proměnlivosti než populace v severních oblastech, které byly ovlivněny snížením populační velikosti v průběhu Pleistocénu (Bernatchez and Wilson 1998). Toto bylo potvrzeno i dalšími hodnotami haplotypové diverzity pro jednotlivá povodí. Nejnižší hodnotu vykazovalo povodí Odry, tedy nejsevernější toky na našem území. Pokud bychom chtěli být konkrétní, tak nejvyšších hodnot haplotypové diverzity dosahovala populace z Bieleho potoka (BP) na Slovensku ($H_d = 0,8888$). V této populaci bylo zastoupeno celkem šest haplotypů a byl zde také největší počet polymorfních míst ($S = 60$). Populace z Bieleho potoka měla tedy největší genetickou variabilitu ze všech studovaných populací. Vysoké hodnoty H_d vykazovaly také populace ve Slovianském potoce (SD), z řeky Turiec (TU) na Slovensku a řeky Vrbas (VR) v Bosně, což jen potvrzuje předchozí tvrzení o vyšší genetické variabilitě dunajských populací. Z populací na území České republiky byla nejvyšší hodnota haplotypové diverzity $H_d = 0,7222$ u populace z řeky Jizery u Turnova, kde byly nalezeny celkem tři haplotypy. Dva haplotypy byly společné pouze s populacemi z Odry (TH7 a TH9) a jeden TH1 opět s většinou vzorkovaných populací. Průměrná hodnota haplotypové diverzity H_d byla 0,5480 napříč všemi populacemi.

Tabulka č. 8 udává hodnoty (F_{ST}), které vyjadřují genetickou diferenciaci jednotlivých populací. Hvězdičkou jsou označeny hodnoty statisticky významně vyšší než nula naopak pomlčkou hodnoty, které tuto podmínku nesplnily. Vysoce signifikantních hodnot bylo dosaženo u populace z Vrbasu (VR), a to při párovém porovnání ze všemi ostatními populacemi. Lze předpokládat že toto bylo způsobeno výraznou geografickou vzdáleností našich populací a populace z Vrbasu (VR) v Bosně. Zajímavé však je zjištění, že nejvyšší hodnotu (F_{ST}) vykazovali při párovém porovnání populace z Vrbasu (VR) a Svratky (SV), i když se obě tyto lokality nacházejí v dunajském povodí a měly by si být tedy geneticky bližší než například s populacemi v Labi či Odře. Signifikantních hodnot dosahovaly i populace z řeky Turiec (TU) ze Slovenska, a to v porovnání se všemi populacemi s výjimkou populací na území Slovenska, což bylo možné očekávat, ale také s výjimkou populace ze Mže, která je opět velmi výrazně geograficky vzdálená. Pokud se zaměříme pouze na párové

porovnání populací na našem území, bylo signifikantních hodnot (F_{ST}) dosaženo jen sporadicky, což ukazuje na podobnost našich populací skrze všechna povodí. Celková hodnota genetické diferenciace mezi populacemi (F_{ST}) byla 0,3826.

Tabulka č. 7: Četnost haplotypů, červeně jsou vyznačeny populace mimo území ČR

	TH1	TH2	TH3	TH4	TH5	TH6	TH7	TH8	TH9	TH10	TH11	TH12	TH13	TH14	TH15	TH16	TH17	Celkem
BL	7	2	1															10
BP	2			3	2	1	1	1										10
OD	7			2					1									10
SD	4			3	2					1								10
SH	9						1											10
JZ	4						3		2									9
TU											1	1						2
UV	7																	7
VR													1	3	1			5
JE	7						2			1								10
SE	6						4											10
TA	3															2		5
OL	1																	1
MO	3																	3
JI	1																	1
NE	5															1		6
SV	14																	14
KR	5																	5
TO	7						1										1	9
Celkem	92	2	1	8	4	1	12	1	3	2	1	1	1	3	1	3	1	137

Tabulka č. 8: Porovnání genetické diferenciace (F_{ST}) – pod úhlopříčkou a statistická významnost, červeně jsou vyznačeny populace mimo území ČR

	BL	BP	OD	SD	SH	JZ	TU	UV	VR	JE	SE	TA	OL	MO	JI	NE	SV	KR	TO
BL		*	-	*	-	*	*	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BP	0,255		*	-	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	*	-	*
OD	0,076	0,161		-	-	-	*	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SD	0,210	-0,094	0,132		*	*	-	-	*	*	*	-	-	-	-	-	*	-	*
SH	0,004	0,260	0,080	0,214		*	*	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JZ	0,179	0,245	0,109	0,209	0,238		*	*	*	-	-	*	-	-	-	-	*	-	-
TU	0,788	0,049	0,712	0,131	0,810	0,764		*	*	*	*	-	-	-	-	*	*	*	*
UV	0,001	0,203	0,046	0,161	-0,040	0,290	0,750		*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VR	0,892	0,435	0,829	0,489	0,910	0,879	0,488	0,892		*	*	*	-	*	-	*	*	*	*
JE	0,003	0,207	-0,045	0,170	-0,015	0,068	0,750	-0,021	0,861		-	-	-	-	-	-	-	-	-
SE	0,092	0,260	0,104	0,219	0,127	0,029	0,801	0,275	0,903	-0,003		*	-	-	-	-	*	-	-
TA	0,263	0,078	-0,039	0,047	0,372	0,317	0,610	0,331	0,827	0,049	0,364		-	-	-	-	-	-	-
OL	-0,911	-0,510	-0,813	-0,568	1,000	-0,333	-0,382	0,000	0,735	-0,960	-0,333	-0,500		-	-	-	-	-	-
MO	-0,146	0,048	-0,102	0,013	-0,184	0,138	0,501	0,000	0,827	-0,167	0,130	0,118	0,000		-	-	-	-	-
JI	-0,911	-0,510	-0,813	-0,568	-1,000	-0,333	-0,382	0,000	0,735	-0,960	-0,333	-0,500	0,000	0,000		-	-	-	-
NE	0,032	0,138	-0,065	0,100	0,063	0,200	0,679	0,028	0,855	-0,082	0,165	-0,067	-1,000	-0,154	-1,000		-	-	-
SV	0,085	0,324	0,140	0,272	0,035	0,415	0,864	0,000	0,934	0,058	0,393	0,499	0,000	0,000	0,000	0,153		-	-
KR	-0,046	0,146	-0,003	0,108	-0,084	0,232	0,669	0,000	0,867	-0,067	0,221	0,250	0,000	0,000	0,000	-0,034	0,000		-
TO	-0,004	0,240	0,064	0,197	-0,071	0,191	0,785	-0,031	0,898	-0,025	0,082	0,311	-1,000	-0,180	-1,000	0,033	0,052	-0,078	0,000

* = $p < 0,05$

Tabulka č. 9: Haplotypová diverzita

	n	S	h	Hd	K	S.E.	Povodí
BL	10	4	3	0,5111	0,9555	0,1640	Labe h = 11 S = 7 Hd = 0,5465
JZ	9	3	3	0,7222	1,3333	0,0900	
TA	5	4	1	0,6000	2,4000	0,1750	
NE	6	4	2	0,3333	1,3333	0,2150	
TO	9	2	3	0,4166	0,4444	0,1910	
BP	10	60	6	0,8888	22,8444	0,0750	Dunaj h = 12 S = 76 Hd = 0,6312
TU	2	47	2	1,0000	47,0000	0,5000	
UV	7	0	1	0,0000	0,0000	0,0000	
VR	5	12	3	0,7000	7,0000	0,2180	
SV	14	0	1	0,0000	0,0000	0,0000	
KR	5	0	1	0,0000	0,0000	0,0000	
SD	10	55	4	0,7777	20,6000	0,0910	Odra h = 4 S = 11 Hd = 0,3983
SH	10	1	2	0,2000	0,2000	0,1540	
MO	3	0	1	0,0000	0,0000	0,0000	
JE	10	10	3	0,5111	2,1555	0,1640	
SE	10	1	2	0,5333	0,5333	0,0950	
OD	10	11	3	0,5111	3,4444	0,1640	
Celkem	135	82	17	0,5480	7,1804	0,0500	

n = počet jedinců

S = počet polymorfních míst

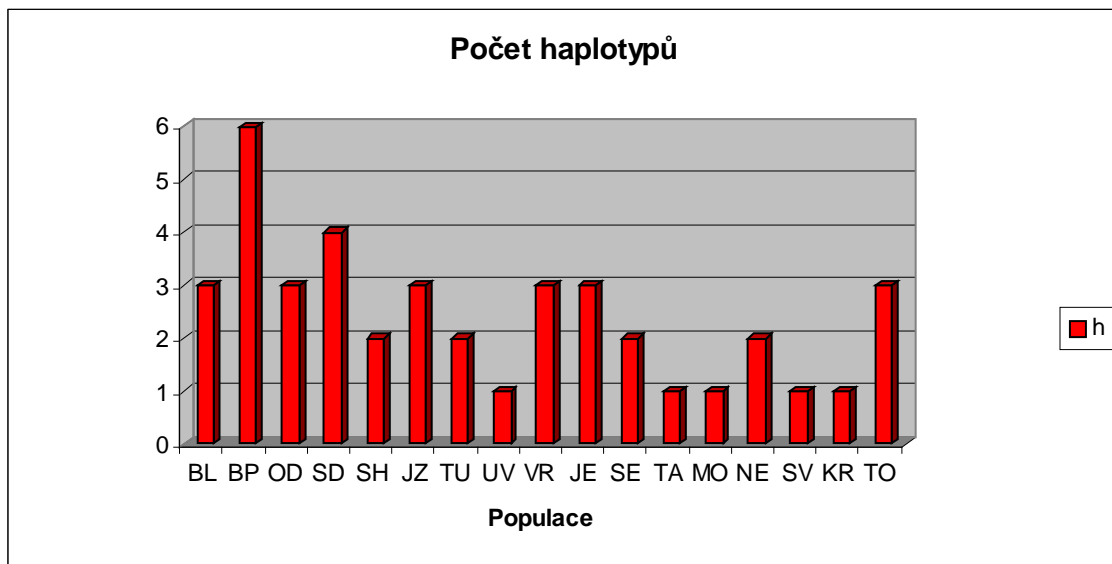
h = počet haplotypů

Hd = haplotypová diverzita

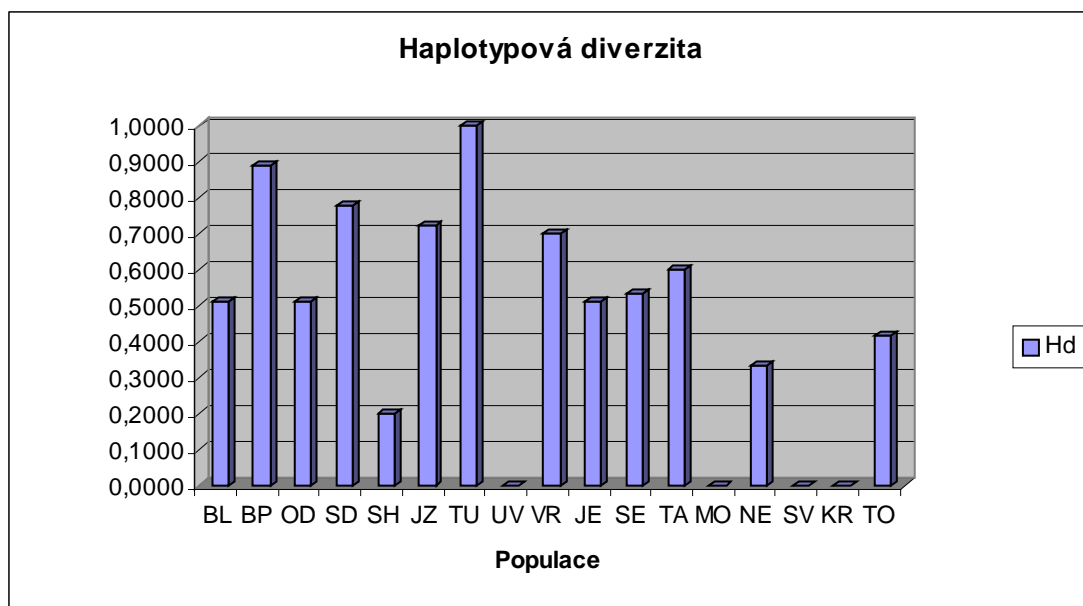
K = prům.počet diferencí

S.E. = směrodatná odchylka

Obrázek č. 2: Četnost haplotypů



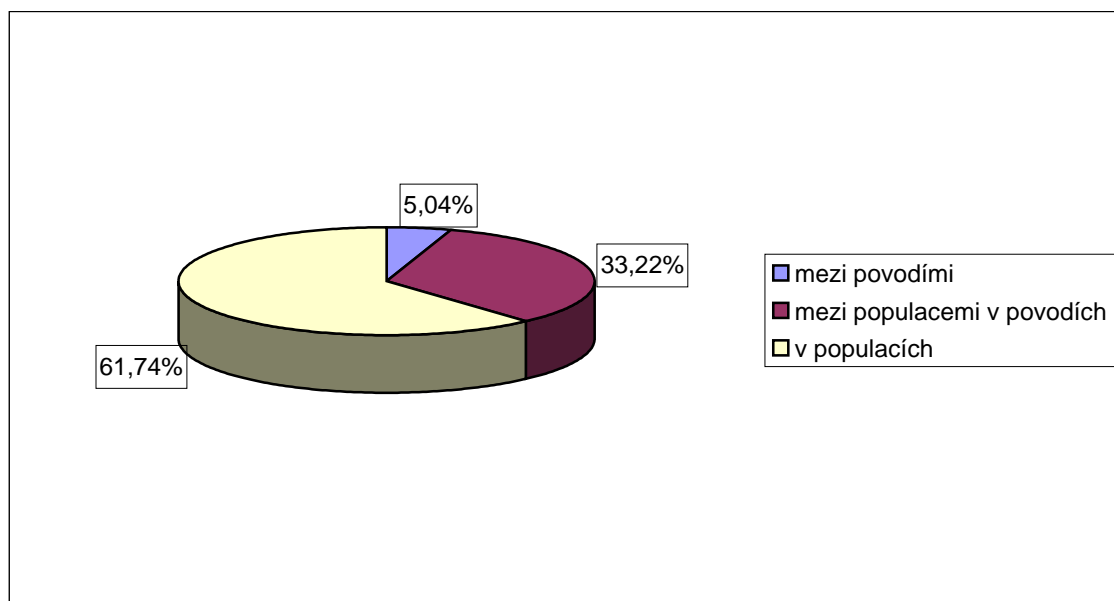
Obrázek č. 3: Haplotypová diverzita



Tabulka č. 10: Analýza genetické variance

AMOVA	%
mezi povodími	5,04
mezi populacemi v povodích	33,22
v populacích	61,73

Obrázek č. 4: Analýza genetické variance AMOVA



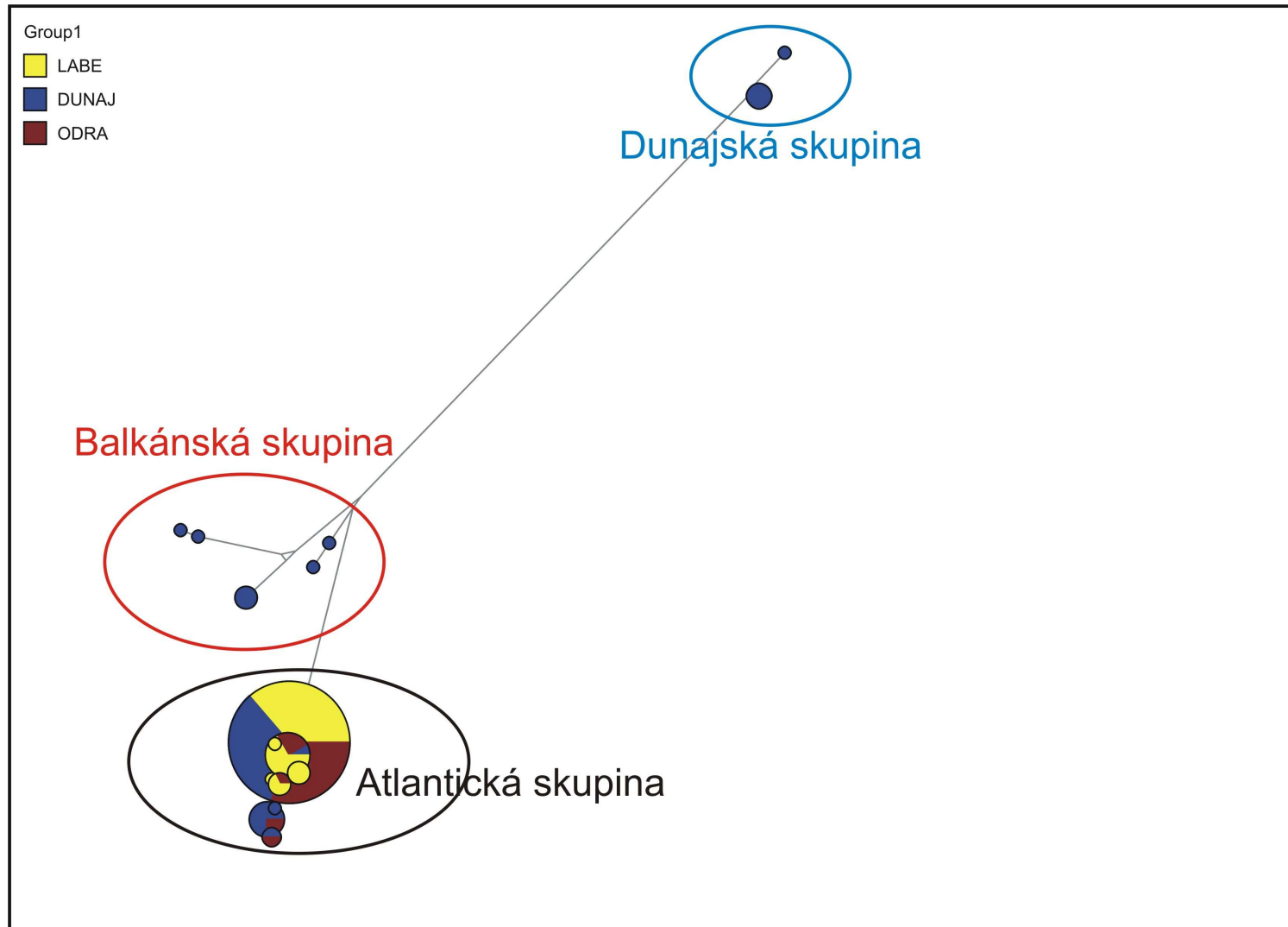
Analýza genetické variance AMOVA ukázala, že 61,73 % z celkové genetické variability bylo distribuováno v populacích, a pouze 5,04 % mezi jednotlivými povodími. Mezi jednotlivými povodími byly tedy zjištěny jen velmi malé geneticky podmíněné rozdíly. Oproti tomu výrazná genetická variabilita byla mezi jednotlivými jedinci uvnitř populací bez ohledu k jejich příslušnosti k určitému povodí. Na rozdíly mezi populacemi uvnitř jednotlivých povodí připadlo 33,22 % z celkové variability .

Sedmnáct nalezených haplotypů bylo použito pro sestavení haplotypové sítě, která schématicky znázorňuje vztahy mezi jednotlivými haplotypy (Obrázek č. 5). Tuto síť lze rozdělit do tří skupin. Nejpočetnější Atlantická skupina skrývala haplotypy nalezené u jedinců ze všech tří povodí. Síť dále ukazuje, že Atlantická skupina obsahovala celkem 10 haplotypů a že nejčetnějším haplotypem byl v této skupině byl haplotyp TH1. Dunajská skupina byla reprezentována haplotypy nalezenými u jedinců z Bílého potoka (BP), dále ze Slovianského potoka (SD) a z řeky Turiec. Jedná se tedy o skupinu slovenských dunajských populací rozdělených do dvou odlišných haplotypů. Tyto populace jsou poměrně výrazně vzdáleny od dunajských populací na našem území. Poslední třetí skupina zahrnovala jedince z řeky Vrbas v Bosně a jde tedy o skupinu balkánských dunajských haplotypů. Z tohoto je zřejmé že obě dunajské skupiny neobsahovali žádný haplotyp z Odry ani z Labe. Oproti tomu Atlantická skupina byla směsí haplotypů nalezených u jedinců ze všech tří studovaných povodí.

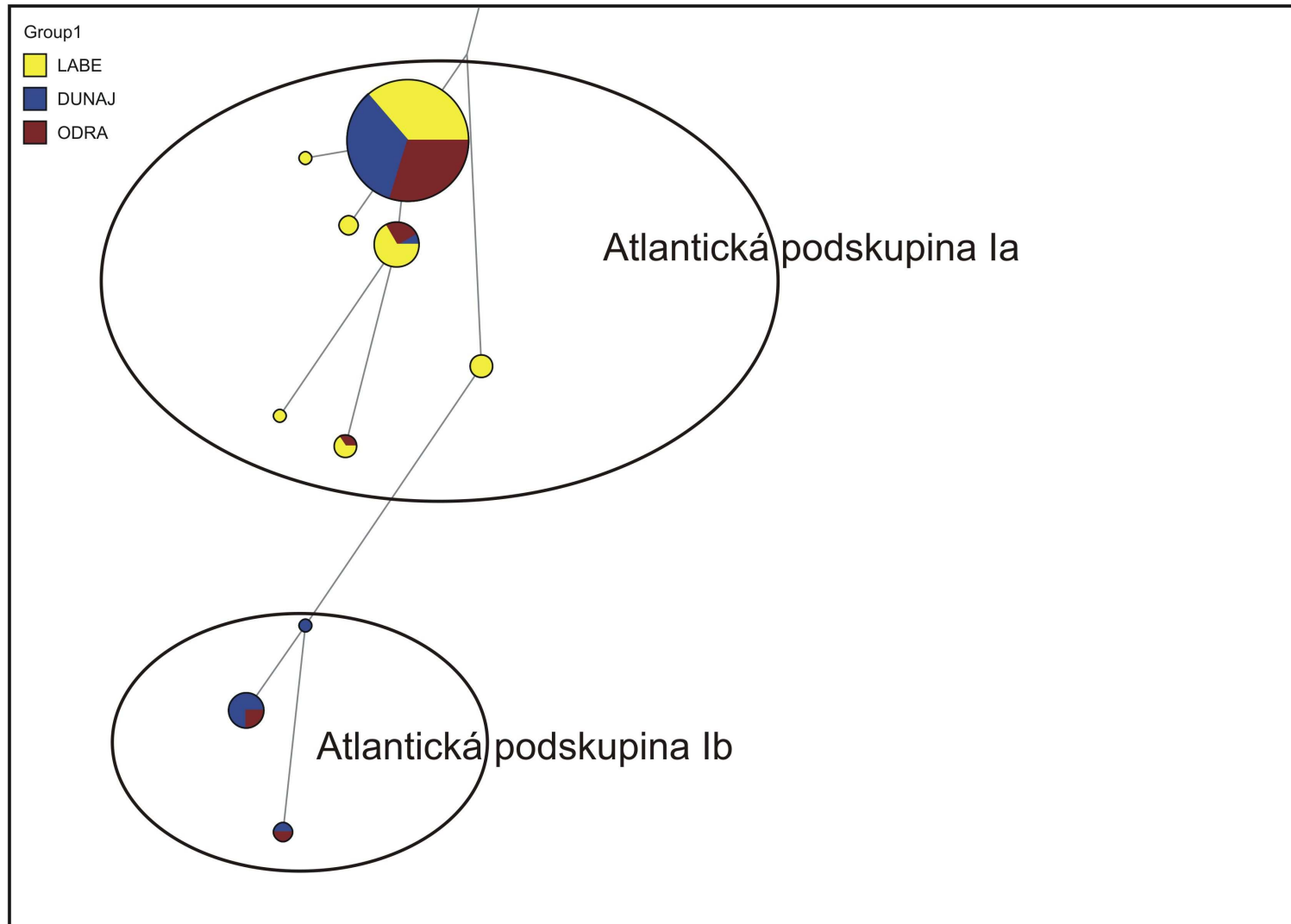
Při detailním pohledu na skupinu I (Obrázek č. 6) byly vytvořeny dvě podskupiny (Ia, Ib). V podskupině Ia se vyskytovaly všechny labské populace a genetické vzdálenosti mezi jednotlivými haplotypy byly malé (max. čtyři mutační kroky). Genetická variabilita mezi těmito populacemi tedy byla velice nízká.

Haplotypy podskupiny Ib byly výrazněji vzdáleny od haplotypů podskupiny Ia (sedm až deset mutačních kroků). Tato podskupina zahrnovala pouze haplotypy z dunajských a oderských populací.

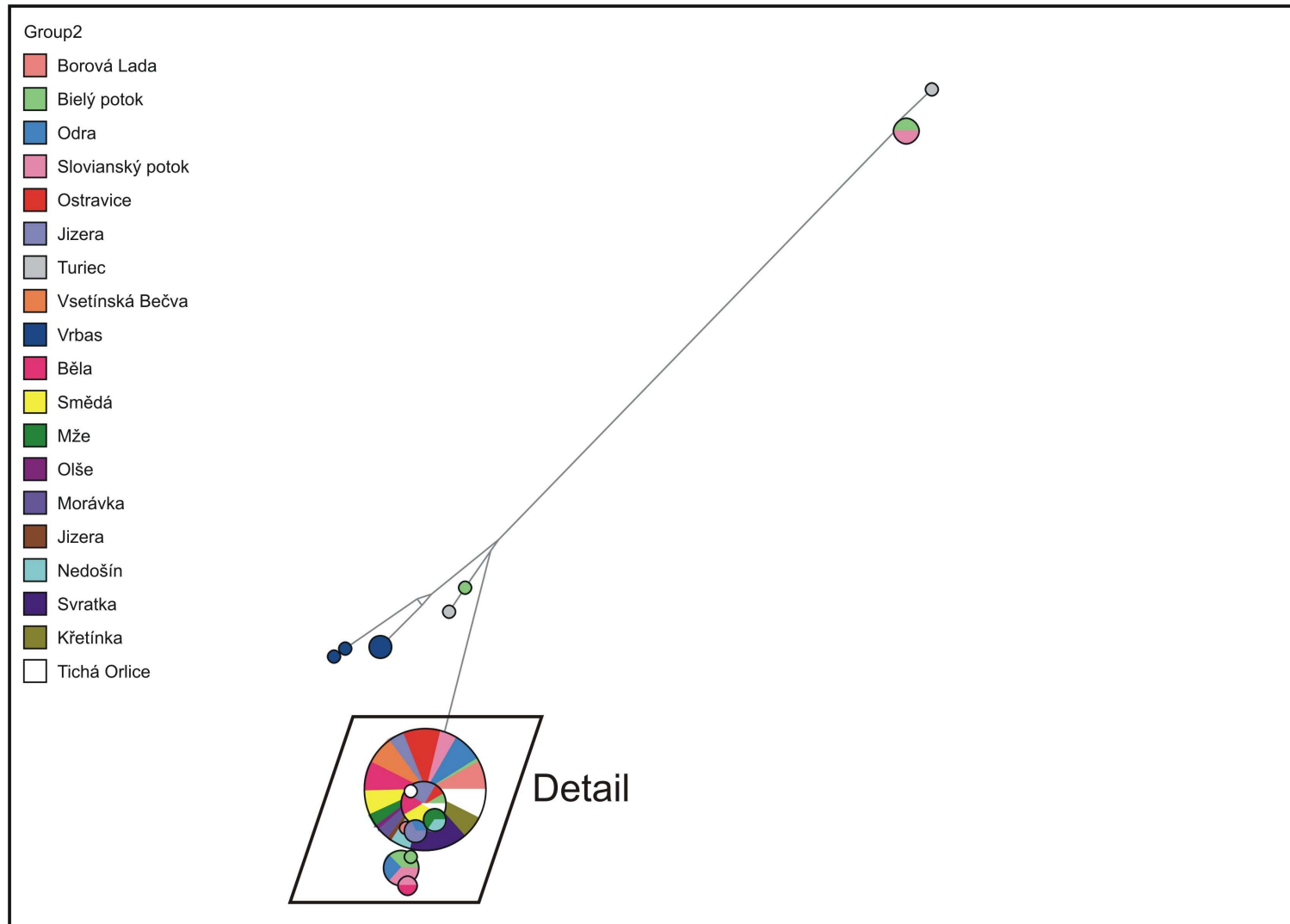
Obrázek č. 5: Haplotypová síť



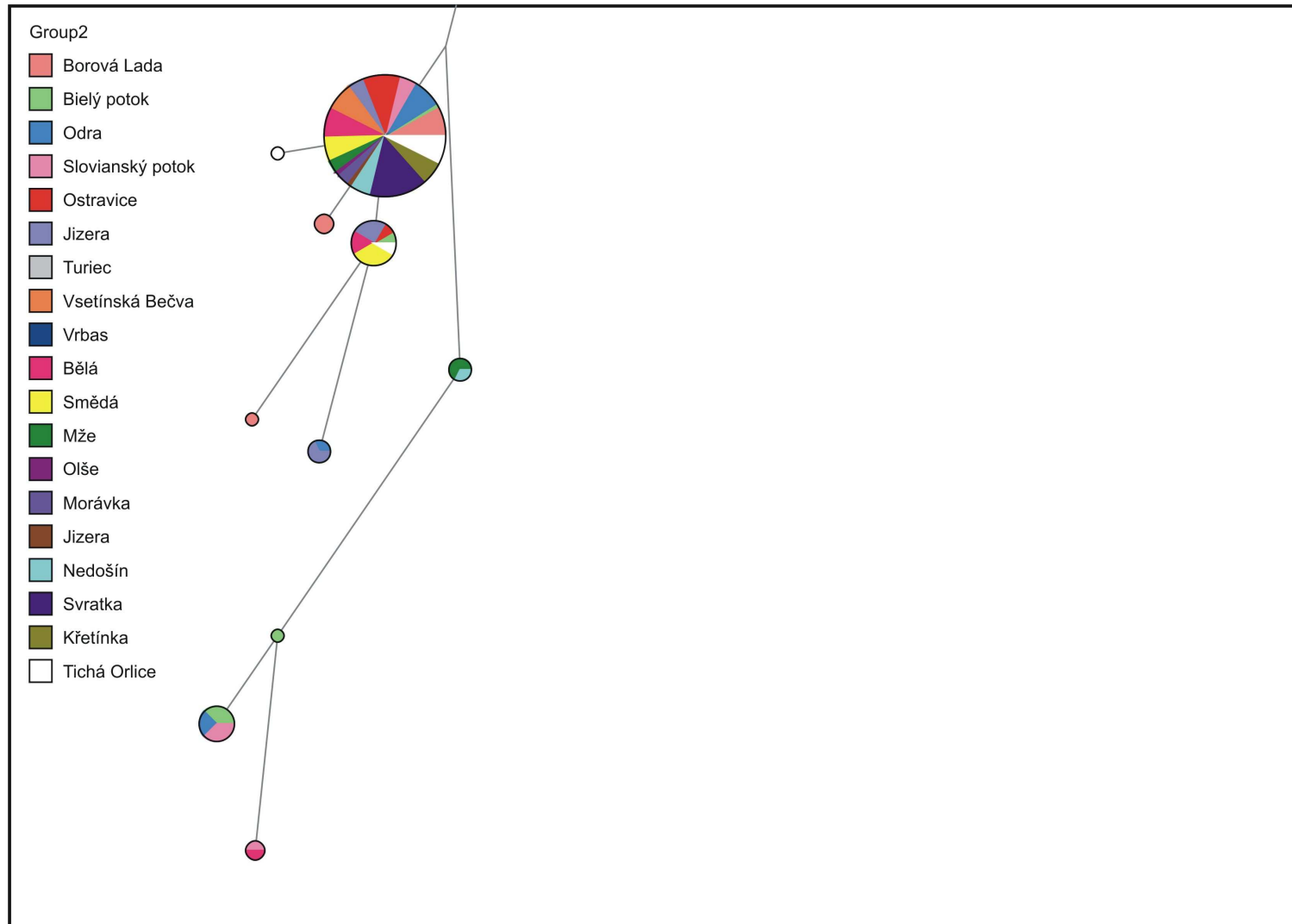
Obrázek č. 6: Haplotypová síť – detail



Obrázek č. 7: Haplotypová síť – jednotlivé haplotypy jsou rozděleny podle populací, které zahrnovaly



Obrázek č. 8: Haplotypová síť – detail, jednotlivé haplotypy jsou rozděleny podle populací, které zahrnovaly



5. Diskuse

Genetická variabilita populací je důsledkem řady přírodních faktorů, do kterých během posledních sta let stále více zasahuje člověk a mění přirozenou rovnováhu, která vznikala miliony let. Na našem území má rybářské obhospodařování volných vod dlouholetou tradici. První rybářské spolky vznikaly již na konci 19 století. Tyto organizace mají nesporný přínos pro udržení a rozvoj ichtyofauny volných vod. Avšak pro udržení přirozené genetické variability má rybářské obhospodařování spíše negativní dopad. Intenzivní převozy ryb sloužící pro zarybňování mezi jednotlivými povodími a úmořmi mohou mít negativní vliv na genetickou rozmanitost jedinců i celých populací.

Jedním z hlavních procesů, které tvořily přirozenou genetickou diferenciaci populací byly doby ledové v průběhu Pleistocénu. Po ústupu ledovců došlo k expanzi populací z jejich glaciálních refugií a v případě lipana byla jednou z hlavních cest rozšiřování populací na sever střední Evropa (Weiss et al. 2002). Dokonce byla vyslovena i hypotéza několikanásobných glaciálních refugií ve střední Evropě (Gross et al. 2001). Toto vše nasvědčuje tomu, že genetická variabilita populací na území ČR by měla být velmi vysoká.

Na našem území byl nejčastěji zastoupen haplotyp TH1. Byl nalezen ve všech povodích a u všech studovaných populací. Tento haplotyp byl dokonce nalezen i ve všech studovaných populacích ze Slovenska s výjimkou řeky Turiec. Je to pravděpodobně důsledkem toho, že je tento haplotyp velice rozšířený mezi generačními rybami na rybářských líhních. Tomu nasvědčuje i výskyt tohoto haplotypu na líhni NP Šumava v Borové Ladě (celkem u sedmi jedinců z deseti). Tento haplotyp je poté dále rozšiřován do toků spolu s násadovým materiálem. Je zajímavé že tento haplotyp nenalezli ve svých studiích Weiss et al. (2002) ani další autoři citovaní v literárním přehledu, kteří se zabývali fylogeografií a genetickou variabilitou populací lipana podhorního v Evropě. Tento haplotyp je tedy pravděpodobně již dlouho dobu uměle rozšiřován po všech povodích na našem i slovenském území a určit jeho původ je téměř nemožné.

Druhý nejpočetnější haplotyp TH7 již zahrnoval pouze 12 jedinců a pouze jeden byl z povodí Dunaje - a to ze Slovenska, ostatní jedinci již byli z povodí Labe (4 jedinci) a Odry (7 jedinců). Všechny lokality, kde se tento haplotyp vyskytl, jsou situovány v severní části našeho území a tento haplotyp byl tedy s velkou pravděpodobností distribuován pouze v tocích při severní hranici České republiky. Bylo by jistě vhodné zachovat tuto částečnou geografickou izolaci tohoto haplotypu i nadále. Tento haplotyp našli i Gum et al. (2005) ve své studii a zařadili ho do velké skupiny atlantických haplotypů. S tímto se shoduje i výše uvedené zjištění o výskytu tohoto haplotypu na našem území. Haplotypy TH11-TH15 z Vrbasu (VR) v Bosně byly geneticky velmi vzdálené od ostatních haplotypů nalezených na našem území (36-38 mutačních kroků). Vysvětlení toho zjištění může spočívat ve výrazné geografické vzdálenosti této jižní lokality. Těmto haplotypům byl velice blízký haplotyp Da24 (6 mutačních kroků) z povodí balkánských řek Soča a Sáva (Weiss et al. 2002).

Očekávání nejvyšší genetické diverzity dunajských populací se potvrdilo jen částečně. Pokud se podíváme na celkovou haplotypovou diverzitu všech vzorkovaných populací z dunajského povodí, zde byla hodnota haplotypové diverzity opravdu nejvyšší. Ale pokud stanovíme haplotypovou diverzitu pouze pro dunajské populace z našeho území, je tato hodnota nulová, což pravděpodobně svědčí o snížené genetické proměnlivosti vlivem rybářského obhospodařování. Dala by se zvážit i možnost, že jsou tyto populace v dunajském povodí původní a nebyly nijak ovlivněny umělou introdukcí. Tuto hypotézu však naprosto vyvrací fakt, že tyto dunajské populace nesly pouze haplotyp TH1, který byl nalezen ve všech třech studovaných povodích v České republice i na Slovensku a ve srovnání s haplotypy ze studie Weiss et al. (2002) je tento haplotyp geneticky nejbližší haplotypu At9 (dva mutační kroky) z povodí Rýna a také Skandinávie. Blízká genetická vzdálenost haplotypu TH1 a haplotypu At9 nalezeného Weissem et al. (2002) ve Skandinávii může podporovat závěr, že povodí Labe sloužilo jako zdroj pro postglaciální expanzi lipana podhorního do severní Evropy (Koskinen et al. 2002; Weiss et al. 2002), a také že v Pleistocénu existovalo více středoevropských glaciálních refugií (Gum et al. 2005).

Co se týče povodí Labe, i zde byly hodnoty haplotypové diverzity vysoké. Avšak zeměpisná distribuce haplotypů ani zde neodrážela příslušnost daného haplotypu k určitému povodí a i zde lze usuzovat na výrazné promíchání populací. Stejně lze nahlížet i na povodí Odry.

Pokud se nyní zaměříme pouze na jednotlivé populace, největší hodnotu haplotypové diverzity a tedy nejvyšší genetickou variabilitu ze všech studovaných populací měla populace z Bieleho potoka (BP) na Slovensku. Je to pravděpodobně zapříčiněno tím, že se jedná o populaci ze pstruhové líhně, kde se každoročně vytírá velké množství lipana. Proto, aby byl zabezpečen dostatek genetického materiálu pro tyto masivní výtěry, jsou generační ryby loveny a dováženy z celého území Slovenska (Kohout, ústní sdělení). Zde je vhodné podotknout, že z Bieleho potoka nakupuje násadový materiál i Český rybářský svaz pro zarybňování našich toků (autorovo osobní zjištění). U populace z řeky Jizery byly nalezeny dva haplotypy, které sdílela tato populace pouze s populacemi z povodí Odry (vyjma jednoho jedince z Bieleho potoka nesoucího tentýž haplotyp). Toto a zároveň vysoká hodnota haplotypové diverzity opět nasvědčuje převozům populací mezi povodím Odry a Labe na našem území.

Celková hodnota genetické diferenciace (F_{ST}) byla takřka shodná s hodnotami uváděnými pro celý evropský areál rozšíření lipana podhorního na základě analýzy mikrosatelitů (Weiss et al. 2002; Gum et al. 2005). Nejvyšší dosažená hodnota F_{ST} byla mezi populacemi z Vrbasu a Svatky z dunajského povodí. Můžeme pouze usuzovat, proč jsou tyto dvě populace tak výrazně vzdáleny. Vzhledem k tomu, že populace z Vrbasu je velmi blízce příbuzná s balkánskými populacemi ze Soči a Sávy, je nepravděpodobné, že by se jednalo o introdukovanou populaci. Mnohem pravděpodobnější je to, že populace ze Svatky není vůbec původní v dunajském povodí a byla sem introdukována odjinud. Tomu nasvědčuje i výše uvedený fakt, že populace ze Svatky nesla pouze haplotyp TH1, který byl zařazen jako atlantický. Nízký počet signifikantních hodnot F_{ST} v povodích České republiky ukazuje na podobnost našich populací a na jejich nízkou genetickou diferenciaci. Signifikantních hodnot dosahovaly populace z Odry a z Labe pouze při porovnání s dunajskými populacemi mimo naše

území. Toto opět jen potvrzuje tvrzení o vysoké genetické vzdálenosti těchto populací od oderských a labských.

Výsledky analýzy genetické variance AMOVA ukázaly, že největší část genetické variability byla distribuována mezi jednotlivými jedinci v populacích a naopak nejméně této variability bylo zjištěno mezi povodími. Toto je v rozporu se zjištěním Guma et al. (2005) Koskinena et al. (2000), kteří zjistili, že největší podíl genetické variability je distribuován mezi skupinami (povodími) a naopak nejmenší podíl připadá na genetickou variabilitu uvnitř populací. Z těchto zjištění vyvodili tito autoři závěr, že genetické rozdíly mezi povodími v Evropě jsou jasné a zřetelné (Gum et al. 2005). Je nutné si ovšem uvědomit, že rozsah lokalit, které vzorkovali, pokryl takřka celou Evropu - na rozdíl od této práce, která pokryla jenom nepatrnou část starého kontinentu. Vysoký podíl genetické variability v populacích a velmi malý podíl této variability mezi povodími opět ukazuje na značné promíchání studovaných populací. Z tohoto zjištění vyplývá, že vysoká variabilita uvnitř populací není zapříčiněna přirozenou genetickou variabilitou jedinců, ale spíše jejich intenzivními převozy mezi jednotlivými populacemi a bezesporu i mezi povodími. Tomuto nasvědčuje i nízká variabilita mezi jednotlivými povodími. Pokud by se totiž jednalo o populace, které nebyly ovlivněny rybářským obhospodařováním a umělou vnitrodruhovou introdukcí, byla by pravděpodobně hodnota genetické variability mezi povodími vyšší a uvnitř populací nižší než zjištěné hodnoty. Vlivem přirozeného výběru a konkurence by totiž došlo v takovýchto izolovaných populacích k homogenizaci genetické variance a snížení variability (Simpson 1953). Hodnota podílu genetické variability mezi populacemi v povodí ukazovala na to, že populace jsou v rámci svých povodí do jisté míry diferencované, stejně jako je tomu u populací v severní Evropě (Koskinen et al. 2000). Naopak Gum et al. (2005) uvádějí tuto hodnotu nižší na úkor genetické variability v populacích.

Pro porovnání haplotypů popsaných v této práci byly využity sekvence z databáze GenBank. (Pro toto porovnání bylo využito pouze fragmentu D-loop, jelikož sekvence genu pro cytochrom b nebyly zatím publikovány.) Tyto sekvence představují jednotlivé haplotypy nalezené autory studií zabývajících se obdobnou problematikou. Tito jsou

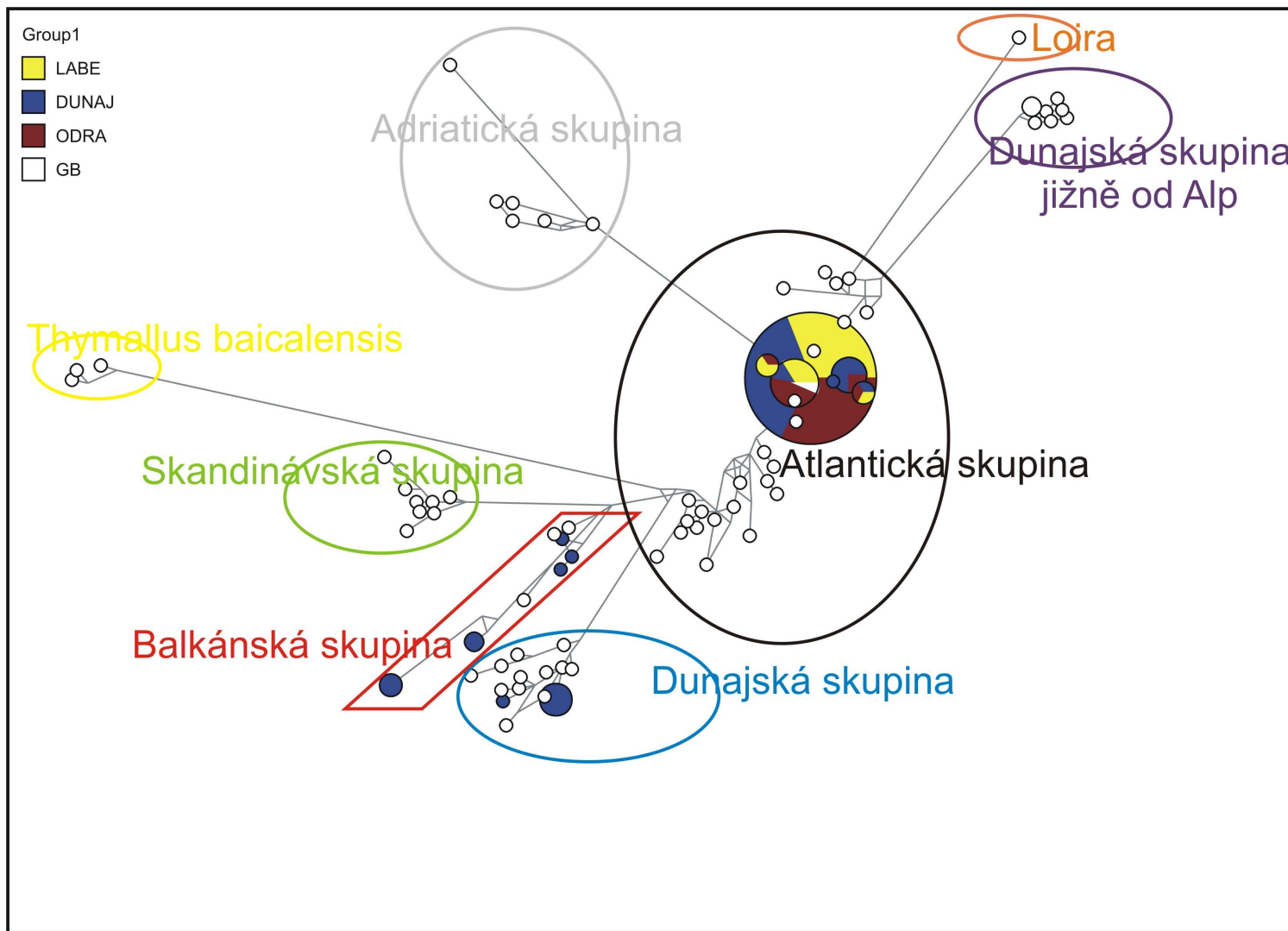
citování v přehledu literatury. Samotné sekvence z GenBanku jsou znázorněny v Obrázku č. 9 jako bílé kruhy. Ve shodě s Weissem et al. (2002) lze rozlišit ve studovaných povodích tři skupiny haplotypů. Atlantická skupina obsahovala haplotypy ze všech tří povodí. Lze předpokládat, že se jedná pravděpodobně o původně výhradně atlantické haplotypy, které byly později uměle rozšiřovány v dunajském a zřejmě i oderském povodí a dnes je můžeme v populacích z těchto povodí poměrně často nalézt. Weiss et al. 2002 zařadili do této skupiny i haplotypy z povodí Rýna a Róny, avšak tyto haplotypy nebyly v povodích na našem území nalezeny. Pravděpodobně tedy nedochází k toku genu mezi těmito povodími (a to ani lidmi zprostředkovanou introdukcí) a povodími Labe, Odry a Dunaje. Tento stav by bylo velmi vhodné zachovat i do budoucna.

Dunajská skupina již zahrnovala pouze haplotypy zahrnující jen jedince z dunajských populací. Jedná s tedy pravděpodobně o původní dunajské haplotypy, což se shoduje i s Weissem et al. (2002), kteří tuto skupinu definovali obdobným způsobem a našli zde velmi podobné haplotypy vzdálené max. 6 mutačních kroků.

Balkánská skupina zahrnovala tři haplotypy reprezentované pouze populací z Vrbasu, dále haplotypy z řeky Sávy a Soči (Weiss et al. 2002) a zajímavé je, že i tři haplotypy nalezené u jedinců z dunajských populací ve střední Evropě. Z tohoto zjištění lze usuzovat na to, že se jedinci z některé balkánské populace dostali i do dunajského povodí ve střední Evropě. V případě řeky Sávy, která je pravostranným přítokem Dunaje, by se mohlo jednat i o přirozený artefakt společného glaciálního refugia.

Ve studovaných povodích nebyl nalezen žádný haplotyp shodující se s haplotypy pro druh *Thymallus baicalensis* a nelze tedy potvrdit ani vyvrátit přítomnost mezidruhových hybridů s *Thymallus thymallus*. Je tedy možné, že došlo k úplnému vymizení populací *Thymallus baicalensis*, které byly do bývalého Československa introdukovány v roce 1959 (Lukeš 1960).

Obrázek č. 9: Haplotypová síť pro fragment D-loop spolu s haplotypy z serveru GenBank (označeny bílými kruhy)



6. Závěr

Intenzivní rybářské obhospodařování volných vod během posledních sta let mělo výrazný dopad na snížení přirozené genetické variability populací, která byla tvořena desítky tisíc let. Došlo ke značnému snížení přirozené genetické diferenciaci v jednotlivých povodích a k výraznému promíchání populací skrze všechna povodí na našem území. Otázkou zůstává, zda je ještě vůbec možné obnovit alespoň část této přirozené genetické rozmanitosti populací lipana podhorního.

Jak je patrné ze zjištěných výsledků, jsou populace na území České republiky značně promíchány. Nelze s určitostí konstatovat, která populace je původní v daném povodí. Plošný výskyt haplotypu TH1 naznačuje, že je tento haplotyp rozšířen na pstruhových líhních a díky tomu je dále intenzivně rozšiřován prostřednictvím vysazování a zarybňování rybářských revírů. Tento haplotyp byl nejbližší atlantickým haplotypům a bylo by do budoucna vhodné omezit vysazování jedinců z populací, u kterých byl tento haplotyp nalezen, do povodí Dunaje a Odry. Stejně tak by bylo vhodné zamezit převozům jedinců mezi jednotlivými povodími.

Pro obnovení genetické variability populací dunajského povodí na našem území lze doporučit využití populací z řeky Turiec, u kterých byly nalezeny pouze dunajské haplotypy. Naopak velice nevhodná se pro tento účel jeví populace ze pstruhové líhně Biely potok, která je značně promíchána a obsahuje haplotypy nalezené ve všech studovaných povodích.

Dále je zřejmé, že nedošlo ke kontaktu populací ze západní Evropy a populací z území České republiky a Slovenska. Populace v povodí Rýna a Rhóny jsou dosti geneticky odlišné od studovaných populací. Tuto určitou izolaci je nezbytné zachovat i do budoucna.

Severní část našeho území také do jisté míry vykazuje částečnou genetickou diferenciaci. I když se zde nejedná o přímou diferenciaci mezi povodími Labe a Odry, jsou tyto severní populace odlišné od labských populací ze Šumavy a západních Čech. Do jaké míry je tento fakt dán přirozenou genetickou a zároveň geografickou diferenciací se nedá s určitostí konstatovat.

Také se nepodařilo nalézt žádného jedince nesoucího haplotyp shodný s *Thymallus baicalensis*. Tento introdukovaný druh tedy pravděpodobně opravdu vymizel, což může mít příznivý vliv na budoucí stabilizaci našich původních populací. S jistotou nelze do budoucna doporučit žádnou introdukci jiného druhu rodu *Thymallus*.

Bylo by vhodné rozšířit tuto studii o data z analýzy jaderné DNA a zahrnout také více studovaných populací, aby bylo více porozuměno genetické struktuře populací na našem území, které je rozvodím tří významných evropských úmoří.

7. Seznam použité literatury

- Allendorf FW., Waples RS., 1996: Conservation and genetics of salmonid fishes. Conservation Genetics: Case Histories From Nature. Chapman & Hall, New York.
- Avise JC., 2000: Phylogeography: the History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge.
- Bandelt H-J., Forster P., Röhl A., 1999: Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37-48.
- Baruš V., Oliva O. et al., 1995: Fauna ČR a SR / Mihulovci a ryby (1, 2). Praha: Academia.
- Bernatchez L., 2001: The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta L.*) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution* 55, 351-79.
- Bernatchez L., Wilson CC., 1998: Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular Ecology* 7, 431-452.
- Boom R., 1990: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology* 28, 495-503.
- Carvalho G. R. et al., 1995: Molecular genetics in fisheries.
- Darwin CR., 1859: On the Origin of Species by Means of Natural Selection. John Murray, London.
- DeWoody J.A., Avise J.C., 2000: Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56, 461-473.
- Dyk V., 1956: Naše ryby. SZN, Praha.
- Dyk V., 1984: The characteristic of greyling biotops. *Acta Veterinaria Brno* 53, 71-80.
- Englbrecht CC., Freyhof J., Nolte A., Schliewen U., Tautz D., 2000: Phylogeography of the bullhead *Cottus gobio* (Pisces: Teleostei: Cottidae) suggests a pre-Pleistocene origin of the major central European populations. *Molecular Ecology* 9, 709-722.
- Eschmeyer W.N., Fricke R., Catalog of Fishes electronic version (updated 18 Dec. 2008) <http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog/fishcatsearch.html>

- Fabricius E. et Gustafson K. J., 1955: Observations of spawning behavior of the greyling, *Thymallus thymallus*. Report of the Institute of Freshwater Research, Drottningholm, 36, 75-103.
- Falconer D.S., Mackay T.F.C., 1996: Introduction to Quantitative Genetics, 4th ed. Longman, New York.
- Ferguson A. et al., 1995: Population and conservation. Journal of Fish Biology 47, 103-126.
- Fisher R.A., 1930: The Genetical Theory of Natural Selection. Oxford University Press, Oxford.
- Grant P.R., Grant B.R., 2002: Unpredictable evolution in a 30-year study of Darwin's finches. Science 296, 707-711.
- 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., Kühn 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., 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.
- Hall T.A., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Hansen M.M., Mensberg K-L.D., Berg S., 1999: Postglacial recolonization patterns and genetic relationships among whitefish (*Coregonus sp.*) populations in Denmark, inferred from mitochondrial DNA and microsatellite markers. Molecular Ecology 8, 239–252.
- Hantke R., 1993: Flußgeschichte Mitteleuropas. Ferdinand Enke-Verlag, Stuttgart.
- Hänfling B., Brandl R., 1998: Genetic and morphological variation in a common European cyprinid, *Leuciscus cephalus* within and across Central European drainages. Journal of Fish Biology 52, 706–715.

- Hänfling B., Hellemans B., Volckaert F.A., Carvalho G.R., 2002: Late glacial history of the cold-adapted freshwater fish *Cottus gobio*, revealed by microsatellites. *Molecular Ecology* 11, 1717–1729.
- Hewitt G.M., 2000: The genetic legacy of quaternary ice ages. *Nature* 405, 907-913.
- Holčík J., 1998: *Ichtyilogia*. Bratislava.
- Kimura M., 1995: Limitations of Darwinian selection in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92, 2343-2344.
- Koskinen M.T., 2002: Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Thymallus spp.* (grayling) provides evidence of ice-age mediated environmental perturbations in the worlds oldest body of fresh water, Lake Baikal. *Molecular Ecology* 11, 2599-2611.
- 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., Primmer C.R., 2001: High throughput analysis of 17 microsatellite loci grayling (*Thymallus spp.* Salmonidae). *Conservation Genetics* 2, 173–177.
- Koskinen M.T., Ranta E., Piironen J., 2000: Genetic lineages and postglacial colonization of grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) in Europe, as revealed by mitochondrial DNA analyses. *Molecular Ecology* 9, 1609–1624.
- Kubíček F., 1971: Potravní zdroje a potrava pstruha a lipana. *Vertebrata zprávy* 2, 89-94.
- Lelek A., 1984: Threatened fishes of Europe. In: *The Freshwater Fishes of Europe* 9. AULA Verlag, Wiesbaden.
- Lu G., Basley D.J., Bernatchez L., 2001: Contrasting patterns of mitochondrial DNA and microsatellite introgressive hybridization between lineages of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*); relevance for speciation. *Molecular Ecology* 10, 965-985.
- Lukeš V., 1960: Poznatky z chovu lipana bajkalského v ČSR. *Čkoslovenské rybářství* 3, 38-39.
- Lusk S., Skácel L., 1978: *Lipeň*. Příroda, Bratislava.

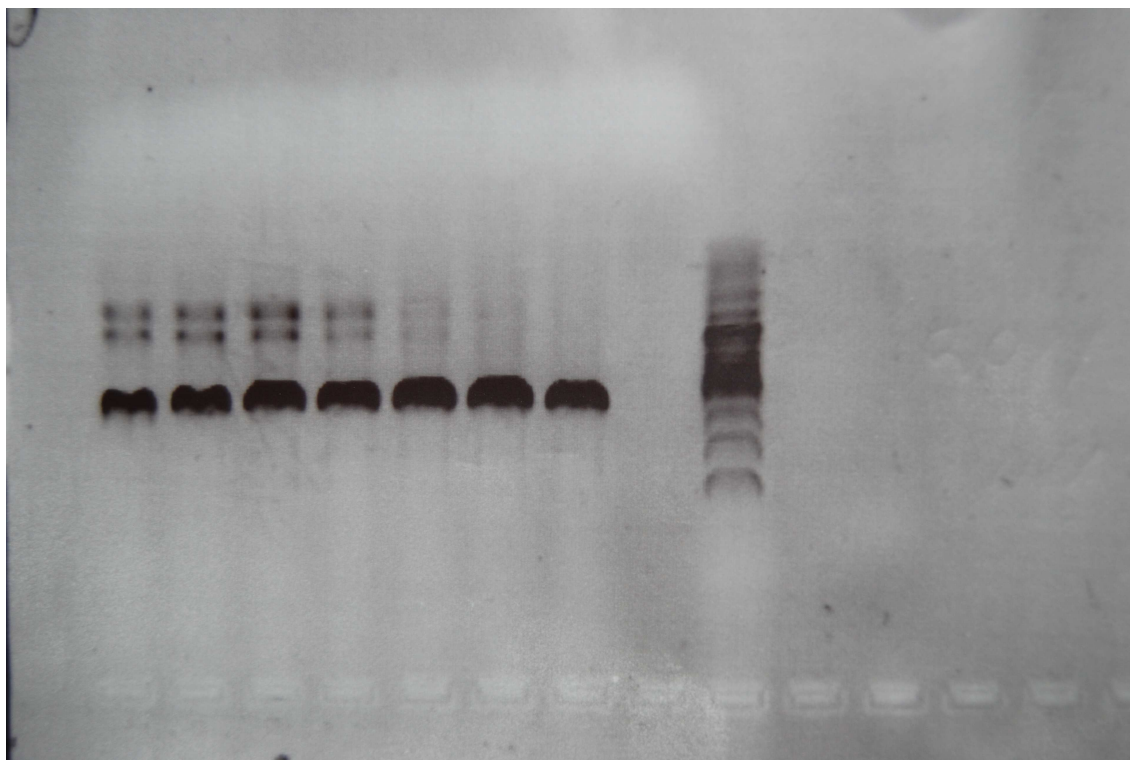
- Maitland P.S., Campbell R.N., 1992: Freshwater Fishes of the British Isles. Butler & Tanner, Somerset.
- Melzak K.A., 1996: Driving forces for DNA absorption to silica in perchlorate solutions. *Journal of Colloid Interface Science* 181, 635-644.
- Merilä J., 1997: Quantitative trait and allozyme divergence in the Greenfinch (*Carduelis chloris*, Aves: Fringillidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 61, 243-266.
- Moritz C., 1994: Defining evolutionary significant units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9, 373-375.
- Nesbø C.L., Fossheim T., Vøllestad L.A., Jakobsen K.S., 1999: Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. *Molecular Ecology* 8, 1387-1404.
- Nieslanik J., 1959: Rast a formy tela lipňov v slovenských tokoch. *Poľovníctvo a rybárstvo* 8, 14-15.
- Northcote T.G., 1995: Comparative biology and management of Arctic and European grayling (Salmonidae, *Thymallus*). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5, 141-194.
- Nykänen M., Huusko A., 1999: Harjuksen elinympäristövaatimukset virtavesissä. Riistaja Kalatalouden Tutkimuslaitos, Kalatutkimuksia 156. Helsinki.
- Papadopoulos D., Schneider D., Meier-Eiss J., Arber W., Lenski R.E., Blot M., 1999: Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 3807-3812.
- Remold S.K., Lenski R.E., 2001: Contribution of individual random mutations to genotype by environment interactions in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98, 11388-93.
- Rozas J., Sánchez-DelBarrio J.C., Messeguer X., Rozas R., 2003: DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496-2497.

- Schluter D., 2000: The Ecology of Adaptive Radiation. Oxford University Press, Oxford.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L., 2000: Arlequin, Version 3.1 Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- Simpson G.G., 1953: The Major Features of Evolution. Columbia University Press, New York.
- Slatkin M., 1993: Isolation by distance equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47, 264-279.
- Song Ch. B., Near T.J., Page L. M., 1998: Phylogenetic relations among percid fishes as inferred from mitochondrial cytochrome b DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10, 343–353.
- Stein H., Baars M., Mathes E., Steinhörster U., 2001: Die Äsche: *Thymallus thymallus*. 1. Aufl. Die Neue Brehm-Bücherei Bd. 640, Westarp Wissenschaften, Hohenwarsleben, Germany.
- 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.
- Šimek Z., 1959: Ryby našich vod. Nakld. Orbis, Praha.
- Templeton A.R., Routman E., Phillips C.A., 1995: Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140, 767-782.
- Turgeon J., Bernatchez L., 2001: Clinal variation at microsatellite loci reveals historical secondary intergradation between glacial races of *Coregonus artedi* (Teleostei: Coregoninae). *Evolution* 55, 2274-2286.
- 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.

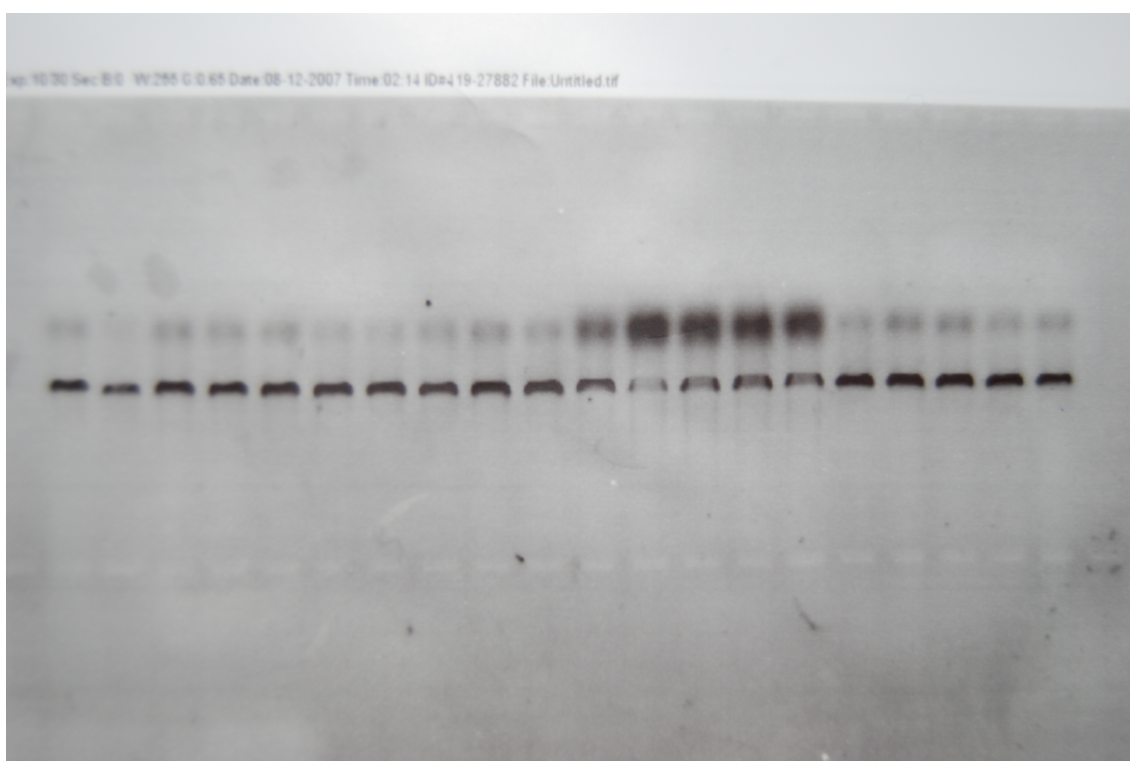
- Weiss S., Persat H., Eppe R., Schlötterer C., Uiblein F., 2002: Complex patterns of colonization and refugia revealed for European grayling *Thymallus thymallus*, based on complete sequencing of the mitochondrial DNA control region. *Molecular Ecology* 11, 1393–1407.
- Wright S 1931: Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16, 97-159.
- Zima J., Macholán M., Munclinger P., Piálek J., 2004: Genetické metody v zoologii. UK v Praze, 240s.
- Žurovec M., 1999: Soubor materiálů k předmětu molekulární biologie. Jihočeská univerzita, Entomologický ústav AVČR, České Budějovice .

8. Příloha

Obrázek č. 10: Výsledek optimalizace PCR



Obrázek č. 11: Výsledek PCR po elektroforéze na agarózovém gelu



Seznam tabulek:

Tabulka č. 1: Seznam vzorkovaných lokalit

Tabulka č. 2: Seznam vzorkovaných lokalit (Mgr. Ivo Papoušek Ph.D.)

Tabulka č. 3: Použité primery pro fragment cytochrom b

Tabulka č. 4: Použité primery pro fragment d-loop

Tabulka č. 5: Složení reakčních PCR směsí

Tabulka č. 6: Parametry cyklování při PCR reakcích

Tabulka č. 7: Četnost haplotypů

Tabulka č. 8: Porovnání genetické diferenciace (F_{ST})

Tabulka č. 9: Haplotypová diverzita

Tabulka č. 10: Analýza genetické variance

Seznam obrázků:

Obrázek č. 1: Mapa vzorkovaných lokalit

Obrázek č. 2: Četnost haplotypů

Obrázek č. 3: Haplotypová diverzita

Obrázek č. 4: Analýza genetické variance AMOVA

Obrázek č. 5: Haplotypová síť

Obrázek č. 6: Haplotypová síť – detail

Obrázek č. 7: Haplotypová síť – rozdělení podle populací

Obrázek č. 8: Haplotypová síť – detail, rozdělení podle populací

Obrázek č. 9: Haplotypová síť pro fragment D-loop spolu s haplotypy ze serveru GenBank

Obrázek č. 10: Výsledek optimalizace PCR

Obrázek č. 11: Výsledek PCR po elektroforéze na agarózovém gelu