

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA**

**V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**Zemědělská fakulta**

---

**Diplomová práce**

**Studium historického rozšíření linií pstruha obecného v ČR a  
na Slovensku pomocí vybraných znaků mitochondriální DNA**

**Obor:** Rybářství

**Katedra:** rybářství a myslivosti

**Autor:** Iva Jašková

**Vedoucí práce:** doc. Ing. Petr Hartvich, CSc.

**České Budějovice**

---

**2009**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Studium historického rozšíření linií pstruha obecného v ČR a na Slovensku pomocí vybraných znaků mitochondriální DNA“ vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů, které uvádím v seznamu literatury.

V Českých Budějovicích

16. dubna 2009

.....

Děkuji doc. Ing. Petrovi Hartvichovi, CSc. za odborné vedení a umožnění vykonání této práce. Dále všem pracovníkům laboratoře genetiky ryb, sekce evoluční biologie a genetiky obratlovců, ÚŽFG AV ČR v Liběchově, zejména Ing. Janu Kohoutovi za poskytnutou literaturu, cenné rady a připomínky, ale hlavně za trpělivé konzultace, ochotu a pomoc při zpracování této práce a dále pak RNDr. Vlastimilovi Šlechtovi.

## Abstract

The brown trout (*Salmo trutta*) is an ecologically, economically, aesthetically fish species whose poor conservation status in the European countries calls for further attention and action. The continuing erosion of the genetic resources of brown trout populations by human activities calls for strategies to reverse the current trend. We studied a genetic diversity of brown trout populations in the territory of Czech Republic and in Slovakia using genetic markers. In the fragments of mitochondrial DNA (gen for ND-5/6) and nuclear DNA (gen for LDH1) amplified through PCR the differences were searched with the use of RFLP. In tested populations seven haplotypes were founded, four haplotypes were represented in almost of all populations. The “Danubian haplotypes” were strictly confined to the Danubian and Vistula drainages, the “Atlantic haplotypes” dominated in all populations, most of the total molecular variance (72 %) was attributed to differences within populations. Two alleles at LDHC1<sup>\*</sup> - the ancestral<sup>\*</sup>100 and<sup>\*</sup>90 (at a high frequency) were revealed. This genotypic replacement is considered to be due to anthropogenic activities.

# Obsah

1. Úvod.....	6
2. Literární přehled .....	8
2.1. Charakteristika druhu a současný stav populací pstruha obecného.....	8
2.2. Systematické zařazení a fylogeografické vztahy .....	11
2.3 Variabilita markeru LDH-C1 v populacích pstruha obecného .....	14
2.4. Genetické metody při studiu ryb.....	15
2.4.1. Biologická diverzita na genetické úrovni – základní informace.....	15
2.4.2. Genetické markery .....	16
2.4.3. Izolace DNA .....	17
2.4.4. Polymerázová řetězová reakce (polymerasa chain reaction, PCR) .....	17
2.4.5. Elektroforéza.....	19
2.4.6. Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP).....	19
3. Materiál a metodika .....	21
3.1. Sběr vzorků .....	21
3.2. Izolace DNA .....	22
3.3. PCR.....	23
3.4. RFLP .....	24
4.5. Elektroforéza.....	25
4.6. Zpracování dat .....	26
4. Výsledky .....	27
4.1. LDH-C1* .....	27
4.2. ND5/6.....	28
5. Diskuze .....	37
7. Použitá literatura .....	43
8. Seznam tabulek a obrázků .....	48

# 1. Úvod

Pstruh obecný (*Salmo trutta*) je ekologicky, ekonomicky a kulturně významný druh našich toků, jenž se stal oblíbeným objektem rybolovu. Právě vzhledem k silnému rybářskému tlaku je dobrý stav většiny pstružích populací podmíněn trvalým vysazováním odchovaného plůdku a násady. V posledních letech však dochází k neustálým poklesům úlovků, z čehož lze usuzovat na snižování počtu pstruhů v našich tocích. Z toho vyplývá, že v budoucnu bude vysazování pstruha probíhat přinejmenším ve stejné míře jako doposud, případně bude ještě intenzivnější.

Genetická struktura každé populace je jedinečná a optimální pro dané prostředí. Vzhledem k existenci interakce příslušného prostředí a genetického založení konkrétní populace je bezpochyby jedním z důvodů poklesu stavu pstruha změna genetické struktury populací vedoucí k narušení adaptability ke specifickým podmínkám prostředí. Hlavními mechanismy způsobujícími tyto nepřírozené změny je přemísťování genetického materiálu (jiker, ryb) mezi populacemi, udržování generačního hejna s malou efektivní velikostí, umělý výtěr a vysazování allochtoních jedinců do nepůvodního prostředí. Doposud nebyl brán zřetel na geografický původ ryb a příslušnost k různým povodím a úmořím, což nepříznivý vývoj ještě urychlilo. Lze očekávat, že rybářský tlak na pstruhové revíry, a tím požadavek na úlovky pstruha, bude nadále vysoký a umělý výtěr spojený s počátečním odchovem na líhních bude nedílnou součástí obhospodařování toků. Při sestavování zarybňovacích plánů vedoucích k udržení populací pstruha je proto nezbytná znalost genetické struktury, jelikož při neuvážlivém přemísťování jedinců by mohlo docházet k dalšímu mísení a oslabování populací. Ztráta místních populací může mít rovněž za následek zničení poměrně velké části genetických zdrojů tohoto významného druhu. Nejen v této souvislosti je velice důležité zmapovat populace pstruha v tocích, kde v minulosti nedocházelo k intenzivnímu hospodaření a pokusit se nalézt populace téměř nedotčené antropogenními vlivy. Podrobná genetická analýza populací pstruha obecného by tedy měla přispět nejen k efektivnějšímu obhospodařování pstruhových revírů, ale také k vědecky podložené cílené ochraně tohoto druhu.

Tato studie je nedílnou součástí projektu mapujícího genetickou strukturu populací pstruha obecného v České republice a na Slovensku. Aby bylo možné začít s vhodnějším managementem pstruha, bylo potřeba najít efektivní postup, který by umožňoval základní screening populací a nebyl zároveň tak ekonomicky náročný jako

jiné, i když více informativní, metody (např. sekvenční analýza). Cílem této práce bylo ověřit vhodnost použití analýzy polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) k popsanému účelu a provést základní analýzu struktury populací pstruha obecného na území České republiky. Součástí práce je i porovnání s populacemi ze Slovenska a z Rumunska a zhodnocení současného stavu populací ve vztahu k rybářskému obhospodařování toků.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Charakteristika druhu a současný stav populací pstruha obecného

Přirozený areál rozšíření pstruha obecného (*Salmo trutta*) je v podstatě omezen na Evropu. Na východě zasahuje oblast rozšíření až do Asie, jižní hranici areálu rozšíření tvoří pohoří Atlas v severní Africe (Elliott, 1994). Pstruh byl introdukován do nejméně 24 zemí mimo Evropu, včetně USA, Kanady a Austrálie, ale i do několika zemí Jižní Ameriky, Afriky a Asie. Většina těchto introdukcí byly uskutečňovány ke konci 19. století a v první polovině 20. století, kdy ještě nebyly známy rizika spojená s introdukcí nepůvodních druhů (Laikre, 1999).

Pstruh je ekologicky velmi různorodý. Tak byl druh *Salmo trutta* např. rozčleněn na migrující formu a nestěhovavé formy nebo žijící v jezerech (Sanford, 1990). Anadromní forma migruje z řek a potoků, ve kterých se narodila, do moře, kde žijí do své pohlavní dospělosti, a na výtěr se vracejí zpět do svých „rodných“ toků. Rovněž jezerní forma se na výtěr navrácí do toků, v nichž se narodila. Nemigrační forma stráví svůj život v řekách a potocích a k výtěru vytahují do malých přítoků dané oblasti (Elliott, 1994). Migrující i nemigrující forma pstruha mohou koexistovat a některé studie naznačují, že se tyto dvě formy kříží (Laikre, 1999). Pstruh obecný (*Salmo trutta*) se u nás v současné době vyskytuje ve dvou formách – forma potoční a jezerní (Lusk & Hanel, 2005).

Pstruh obecný forma potoční (*Salmo trutta morpha fario*) má protáhlé vřetenovité tělo ze stran zploštělé. Ústa jsou rozštěpená až pod oko. Zbarvení je proměnlivé a závisí na stáří ryby a na prostředí, v němž žije. Potoční forma žije v potocích, říčkách a řekách (pstruhové pásmo). K trvalému výskytu potřebuje dobrou kvalitu vody o nižší teplotě a dostatečným obsahem rozpuštěného kyslíku. Vyhovují mu toky s dostatkem úkrytů. Jedná se o stanovištní druh. Pstruzi mají teritoria rozčleněna mozaikovitě. Individualistické chování se projevuje výrazně v prostředí vodního toku od velikosti kolem 5 cm, kdy již jednotlivci začínají aktivně bránit svá teritoria. Pstruh se vyhýbá otevřenému vodnímu sloupci, své stanoviště volí v místech tzv. proudového stínu. Mladí jedinci žijí v mělké vodě, větší vyhledávají hlubší tůně. V průběhu dne stojí na svém stanovišti a pouze v podvečer a večer se vydává za potravou. Svá stanoviště opouští jen v době výtěru, příp. při kolísání vodního stavu nebo nedostatku potravy. Rychlost růstu ovlivňuje množství a kvalita potravy, kterou v mládí tvoří zooplankton,



později přijímají larvy vodního, v létě i suchozemského, hmyzu, červy, měkkýše, pak i drobné rybky. Tření začíná na podzim, případně až v zimě. Tehdy dospělci migrují proti proudu do míst tření. Pstruh je významným bioindikátorem kvality prostředí (Lusk & Hanel, 2005).

V mnoha evropských zemích (např. Švédsko, Německo, velká část Francie, Španělsko, Švýcarsko) je pstruh obecný jedním z nejvýznamnějších druhů pro sportovní rybolov a tím značně podporuje turismus, což je zvláště důležité v méně rozvinutých regionech (Laikre, 1999). Rovněž v České republice má pstruh značný význam. Pstruh obecný (*Salmo trutta morpha fario*) jako hospodářsky a sportovně nejvýznamnější druh pstruhového pásma je závislý na řízené reprodukci a následném odchovu plůdku. Umělé rozmnožování, výtěr a přesuny jiker či plůdku započalo již v 19. stol.. Při převozech jiker i plůdku nebyl brán zřetel na geografický původ ryb (Baruš a kol., 1995). Tato skutečnost vedla k promísení různých místních forem nebo populací, čímž došlo v mnoha případech k téměř úplnému setření rozdílů mezi nimi. Evoluční proces jednoznačně směřoval ke vzniku mechanismů vedoucích ke zvyšování proměnlivosti (Řehout a kol., 2005). Z dlouhodobého hlediska tak může vést nekontrolované promísení populací ke snížení životaschopnosti populace v daných podmínkách (Šlechtová a kol., 2001). Rybí populace byly často rozděleny do více či méně reprodukčně izolovaných populací (Carvalho, 1993). U druhů jako pstruh obecný je zřejmé, že jednotlivé skupiny jsou vázány na specifický vodní systém, ve kterém žijí/třou se. Bez zásahu člověka ryby nemohou mezi těmito systémy migrovat za předpokladu, že mezi těmito systémy není spojení. Význam zde má i silný „naváděcí“ instinkt, tzn. že pohlavně dospělí jedinci se na tření vrací do míst, kde se sami narodili (Laikre, 1999). Populace se tak dlouhodobě vyvíjely v daných podmínkách prostředí a adaptovaly se na ně. Jednotlivé populace reagují různě na přirozené i antropogenní vlivy. Snižováním jejich přirozené schopnosti vyrovnávat se s nimi poté vede k ohrožení přežití a existence populace nebo druhu (Carvalho, 1993). Jedincům přizpůsobeným jiným podmínkám než v lokalitě vysazení nemusí nové prostředí vyhovovat a jsou znevýhodněni. Populace z různých, ač blízkých lokalit, mohou mít odlišné životní projevy, takže nejen neposílí, ale někdy mohou snižovat přežitelnost posilované populace (Allendorf, 1991). Navzdory tomu je podpurné vysazování násad, nejvýznamnější hrozba pro původní vnitrodruhovou diverzitu, rybářskou veřejností chápáno jako podpora populací ryb (Hanel & Lusk, 2005). Vhodný

způsob ochranné a chovatelské práce by tedy měl vést k využívání místních zdrojů. Základním předpokladem pro zvyšování množství vyprodukovaných kvalitních násad pstruha obecného je vytvoření hejn generačních ryb pocházejících z místních populací, které budou chovány v kontrolovaných podmínkách, a následná produkce násadového materiálu při co největším zachování původních vlastností volně žijících ryb (Randák a Žlábek, 2004). Vysazování potomstva získaného od generačních ryb z místních zdrojů je tedy nejen ekologicky, ale rovněž ekonomicky mnohem účinnější než vysazování ryb z geneticky odlišných a zeměpisně vzdálených zdrojů (Šlechtová a kol., 2001).

Populace pstruha obecného jsou ohrožovány mnoha typy antropogenní činnosti. Z velké části jsou příčinami snížení vnitrodruhové variability pstruha obecného narušení životního prostředí, lov a vysazování ryb. Enviromentální degradace zahrnuje přímé i nepřímé vlivy, tj. např. změny chemismu vody, znečištění, překážky v migraci atd.. Rybolov vede k odstraňování jedinců z populace. To pak inklinuje k redukci velikosti populace, což může postupně zapříčinit snížení životaschopnosti populace a ztrátu vnitrodruhové diverzity. Vysazování jedinců z populací odchovaných na líhních nebo transportovaných z jiných lokalit je stále běžně využíváno (Laikre, 1999). V této souvislosti rozeznáváme tři hlavní procesy, které snižují vnitrodruhovou diverzitu – zánik populace, hybridizace a ztráta genetické variability mezi populacemi (Laikre & Ryman, 1996). Zachování genetické struktury je tedy velmi důležité. Několik důvodů, proč je ochrana pstruha obecného specifická (Laikre, 1999):

- 1) Studie genetické variability odhalily, že v taxonu *Salmo trutta* existuje genetická různorodost. Existuje několik linií, přičemž v rámci těchto linií je genetická rozdílnost mezi místními populacemi. Tato skutečnost je nezbytná pro ochranu a management soustředěný na místní populace.
- 2) V celém areálu rozšíření vlivem degradace životního prostředí došlo ke zničení nebo redukci mnoha místních populací. Následkem tohoto došlo k velké ztrátě vnitrodruhové diverzity ve srovnání s druhy s menší substrukturou.
- 3) Kvůli ekonomické hodnotě druhu jsou zbývající populace ohroženy aktivitami, jako jsou vysazování ryb a rybolov. Tyto aktivity bohužel jsou vnímány jako neškodné či prospěšné a ne jako devastující, jak to ukazují současné genetické studie.
- 4) Další znaky v souvislosti se pstruhem a jeho ochranou, které tento druh činí zajímavý jako modelový organismus:

- Doposud bylo mnohem více úsilí ochranných aktivit soustředěno na suchozemské organismy, ochrana biologické diverzity vodních organismů zaostává navzdory varovným zprávám.
- Pstruh obecný je předmětem řady aktivit, zahrnujících odchov na líhních, vysazování a přemísťování, avšak řada těchto programů nepracuje správně se stanovisky ochrany genetické diverzity.
- Vnitrodruhová struktura pstruha obecného se, do určité míry, mění v celém areálu výskytu, takže ochrana a management vyžadují rozdílný přístup v různých částech areálu výskytu.
- Ochrana přirozeného prostředí musí být komplexní, což obzvláště platí pro migrační formy – ochrana může být ovlivněna environmentálním statutem různých lokalit, politikou dotčených zemí, některými formami využívání.
- Skutečnost, že je pstruh druhem ekonomicky zajímavým pro oblast rybářství, ztěžuje v mnoha zemích účinnou ochranu jako výsledek komplexní legislativní situace.

## 2.2. Systematické zařazení a fylogeografické vztahy

Přestože je pstruh obecný jednou z nejznámějších a vědecky nejintenzivněji zkoumaných ryb Evropy, jeho taxonomická struktura je stále nejasná. V minulosti byly jednotlivé populace na základě morfologických znaků a ekologických nároků zařazeny do mnoha druhů, poddruhů a forem (Kottelat & Freyhof, 2007). Až genetické metody přinesly další poznatky, které vedly k přehodnocení dřívějšího členění. V současné době se pod anglickým názvem „brown trout“ skrývá, podle různých autorů, až několik desítek druhů (Kottelat & Freyhof, 2007).

Podle nynějších poznatků, založených na variabilitě sekvence kontrolní oblasti mitochondriální DNA, se komplex pstruha obecného skládá z pěti fylogeografických linií, které se od Pleistocénu vyvíjely v geografické izolaci (Bernatchez *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 2000; Bernatchez, 2001; Suárez *et al.*, 2001). První, „dunajská“, linie přirozeně obývá úmoří Černého a Kaspického moře a vyskytuje se i dále na východ. Původní areál druhé, „atlantické“, linie se rozprostírá od pohoří Atlas v severní Africe, přes západní Evropu, část střední Evropy, Island a Skandinávii, až po toky ústící do Bílého a Barentsova moře. Zbývající tři linie mají rozšíření omezené na okolí

Středozemního a Jaderského moře. Jedná se o linii „středomořskou“, „jadranskou“ a linii „marmoratus“, která odpovídá v současné době validnímu druhu *Salmo marmoratus*. Toto rozdělení dokazuje, že největší variabilita pstruha obecného je soustředěna právě do středomořské oblasti, která sloužila během poslední doby ledové jako významné refugium (Weiss *et al.* 2000, Suárez *et al.* 2001).

Zeměpisná oblast osídlená „dunajskou“ linií byla v minulosti nejméně zkoumána. Současné studium poskytlo nový pohled na existenci fylogeografických pododdělení uvnitř rodu *Salmo* a umožnilo nám vytvořit hypotézy týkající se jeho evoluční historie. Vlivem opakovaného převozu jiker a ryb mezi povodími však došlo k částečnému vytlačení „dunajské“ linie linií „atlantickou“. Nicméně, jsou určité předpoklady, že k introgresi „atlantické“ linie do linie „dunajské“ mohlo dojít přirozenou cestou již během pleistocenních událostí spojených s táním ledovců a změnou směru proudění některých toků (Weiss *et al.*, 2001). Pstruh obecný má značně vyšší migrační schopnosti než většina ostatních druhů sladkovodních a diadromních ryb a navíc často obývá nejvyšší úseky toků. Proto lze předpokládat, že se v případě událostí, jakými je např. „říční pirátství“, mohl častěji dostávat z jednoho povodí do druhého (Laikre *et al.*, 1999).

Vzhledem ke skutečnosti, že technologie chovu a převozu živých ryb a jiker byla v Evropě (zejména v západní a střední) zvládnuta velice brzy, došlo k rozšíření „atlantické“ linie na mnoho dalších, pro ni nepůvodních míst, včetně těch, které již obývali jedinci ostatních linií. Stalo se tak mnohem dříve, než byla známa možná rizika této činnosti, spojená s hybridizací a následným narušením odolnosti lokálních populací vůči specifickým podmínkám prostředí. Je zřejmé, že zavlečení „atlantické“ linie do pro ni nepůvodních oblastí může mít velice negativní vliv na místní populace, čehož důkazem je rychlý pokles početnosti pstruha obecného v posledních desetiletích (Laikre *et al.*, 1999). Původ a postglaciální historie pstruha obecného v tocích severního Atlantiku byl předmětem odlišných interpretací. Většina autorů souhlasila se skutečností, že severní Atlantik byl po ústupu ledovců rekolonizován různými evolučními liniemi pstruha. Výklady se podstatně lišily jejich počtem, centrem původu i načasováním rozšiřování (Bernatchez *et al.*, 2001).

V Rakousku byly provedeny rozsáhlé studie založené na proměnlivosti mitochondriální DNA. Přesto, že téměř celé území Rakouska pokrývá povodí Dunaje, téměř 44 % jedinců neslo některý z haplotypů „atlantické“ linie (Weiss *et al.*, 2001;

Duftner *et al.*, 2003). Tato skutečnost v první řadě odráží introgresi nepůvodních ryb odchovaných na líhních (Weiss *et al.* 2001). Stejně tak jako v Rakousku, také na území bývalého Československa převažuje „atlantická“ linie pstruha obecného (včetně povodí Dunaje). Jedinci „dunajské“ linie byli v České republice dosud zjištěni jen na dvou příhraničních lokalitách a u všech analyzovaných populací z povodí Dunaje a Visly na Slovensku bylo zjištěno vysoké zastoupení „atlantické“ linie (Kohout, ústní sdělení). Je pravděpodobné, že původní rozšíření „dunajské“ linie bylo ve střední Evropě mnohem větší.

Genetická struktura pstruha obecného narušená vlivy lidské činnosti byla ve střední Evropě pozorována také na úrovni populací. Pastrňáková (2000) zkoumala genetické rozdíly mezi 10 populacemi pstruha obecného v České republice studiem variability vybraných znaků mtDNA. V testovaných populacích našla celkem pět haplotypů, z nichž dva byly zastoupeny téměř na všech lokalitách. Tato skutečnost nasvědčuje dlouhotrvajícímu mísení populací vlivem intenzivního vysazování pstruha. V České republice byly dále na základě variability proteinů popsány například populace z oblasti Šumavy, které v porovnání s ostatními populacemi z území ČR vykazovaly vyšší genetickou variabilitu. Stojí za povšimnutí, že bez ohledu na intenzivní převozy materiálu a vysazování bylo stále ještě možno do určité míry navzájem odlišit některé populace nebo alespoň jejich skupiny. To by znamenalo, že vnesení „cizích“ variant bílkovin není tak intenzivní oproti původnímu předpokladu (Šlechtová *et al.*, 2001). Podobná situace byla zjištěna pomocí analýzy mikrosatelitů. Vysoká úroveň promísení populací byla pozorována jak mezi povodími, tak uvnitř jednotlivých povodí. Přesto byly rozdíly mezi populacemi ve většině případů statisticky významné a u několika populací byly nalezeny specifické znaky (mikrosatelitové alely, také haplotypy mtDNA), pomocí nichž je můžeme odlišit od ostatních populací (Kohout, ústní sdělení).

Za povšimnutí stojí studie Lahnsteinera & Jagsche (2005), kteří studovali v Rakousku fenotypy a genotypy jedinců z divokých populací a z populací odchovávaných na líhních a srovnávali je s muzejními vzorky z 19. století. Autoři našli statisticky významné rozdíly mezi populacemi z 19. století, divokými populacemi a populacemi odchovávanými na líhních, přičemž nebyl nalezen typický fenotyp a genotyp populací z 19. století v žádné ze současných populací. Tato fenotypová a genotypová změna je přičítána antropogenní činností.

## 2.3 Variabilita markeru LDH-C1 v populacích pstruha obecného

Gen pro laktátdehydrogenázu C1 je u pstruha obecného vysoce polymorfní a je jedním z nejdůležitějších genetických markerů používaných při genetických a fylogeografických studiích tohoto druhového komplexu (Hamilton et al., 1989). U pstruha obecného (*Salmo trutta*) byla nalezena odlišnost v sekvenci nukleotidů cDNA u alel laktátdehydrogenázy LDH-C1\*90 a \*100, a to na pozici 308 – nukleotid A je přítomný v alele \*100, zatímco v alele \*90 je přítomen nukleotid G. Tato záměna bází má za následek změnu kyseliny asparagové na pozici 82 v alozymu LDH-C1\*100 na glycin v alozymu 90, což bylo příčinou jejího odhalení již při alozymových studiích (označení alel odpovídá původnímu označení alozymových alel). Sekvenční analýza tohoto fragmentu potvrdila rozdíl mezi heterozygotními a oběma homozygotními jedinci. V závislosti na přítomnosti alel byly naštěpením produktu polymerázové řetězové reakce enzymem BstI získány jeden, dva nebo tři fragmenty. U homozygotů LDH-C1\*100/100 (CCACGGTCAGA) zůstal jeden nenaštěpený fragment o velikosti 440 bp. Naštěpením LDH-C1\*90/90 (CCACGGTCAGG) vznikly dva fragmenty, jeden z nich přibližně o velikosti 360 bp a druhý přibližně o velikosti 80 bp. U heterozygotů 90/100 došlo k naštěpení alely 90, zatímco alela 100 zůstala nenaštěpena. Vznikly tedy všechny tři fragmenty o délkách 440 bp, 360 bp a 80 bp (McMeel et al. 2001).

Na základě rozdílů ve frekvenci alel LDH-C1\*90 a \*100 například Ferguson a Fleming (1983) vyslovili hypotézu o kolonizaci Británie a Irska v postglaciální periodě dvěma skupinami pstruha obecného. První skupina („ancestral race“) byla charakterizována přítomností alely LDH-C1\*100. Na základě porovnání s dalšími druhy lososovitých byla tato alela označena jako původní. Druhá skupina („modern race“) byla charakterizována odvozenou alelou LDH-C1\*90, jež je jedinečná pro pstruha obecného.

Pomocí různých alel na alozymovém lokusu LDH-C1 bylo stanoveno, zda jedinci pochází z místních populací či líhní. Alela LDH-C1\*90 se vyskytuje téměř ve všech populacích odchovávaných v líhních. Pomocí tohoto genetického markeru bylo demonstrováno, že vysazovaní pstruzi se reprodukují a kříží s původními pstruhy (Laikre, 1999).

## 2.4. Genetické metody při studiu ryb

V minulosti bylo prováděno rozlišování populací na základě známých plastických a meristických znaků. Toto porovnání se však později projevilo jako nevhodné, neboť tyto znaky mohou být ovlivněny okolním prostředím (Ferguson et al., 1995). Proto se rozvoj metod v molekulární genetice v současné době stále více projevuje rovněž v oblasti genetiky ryb. Pokrok je umožněn rozvojem molekulárních metod, které umožňují mapovat, klonovat a sekvenovat řadu genů. V praxi je výhodou všech metod molekulární biologie, že pro samotnou analýzu je potřeba pouze malé množství DNA, jež lze získat neinvazivní metodou (např. ústřížky ploutve). Molekulární metody umožňují sledování genetické variability. Nevýhodou některých těchto metod je značná finanční náročnost (Hulák a kol., 2006).

### 2.4.1. Biologická diverzita na genetické úrovni – základní informace

Genetická informace jedince je uložena především v molekulách DNA, které jsou obsaženy v jádře každé buňky. Každá tato varianta specifického genu je nazývána alela. Existence různých alel pak naznačuje existenci genetické variace. Rozdílné alely se vyskytují s různou frekvencí v různých populacích. Populace získávají nové alely především skrz imigraci jedinců z jiných populací, ale i skrz mutace (Laikre, 1999).

Rovněž mitochondrie, cytoplazmatické organely v eukaryotních buňkách, mají vlastní DNA. Molekula mitochondriální DNA (mtDNA) je jednořetězcová cirkulární (Carvalho et al., 1995). MtDNA je děděna téměř výhradně maternálně, jelikož jsou mitochondrie přenášeny cytoplazmou vajíčka (Laikre, 1999). Rozdíly v DNA sekvenci v mitochondriálním genomu podmiňují výskyt rozdílných variant, tzv. haplotypů. U ryb, stejně jako u většiny živočichů, akumuluje mtDNA mutace asi 5krát častěji než jaderná DNA (Awise et al., 1987). Poskytuje tak markery s větší variabilitou a senzitivitou na genetický drift a z toho důvodu je vhodnější na prokazování rozdílů mezi populacemi či druhy (Giuffra et al., 1994). Jelikož úseky mitochondriálního genomu se vyvíjely s různou rychlostí, jsou pro některé typy studií vhodnější určité oblasti mtDNA – např. geny pro NADH dehydrogenasu (ND) (Moritz, 1994).

### 2.4.2. Genetické markery

Jako genetický marker označujeme úsek DNA nesoucí určitý znak, vyskytující se ve více formách (ty se obecně nazývají alely) (Zima *et al.*, 2004). Genetické markery jsou jednoznačně a rychle detekovatelné vlastnosti organismů, které mohou být založeny na morfologicko-anatomických nebo biochemických vlastnostech organismů. Biochemické markery vycházejí z polymorfismu proteinů – zásobních, strukturních, enzymů (izoenzymů) nebo z variability nukleových kyselin. Pokrok v oblasti biochemie a molekulární biologie umožnil aplikaci markerů založených na polymorfismu DNA (Ferguson *et al.*, 1995). Jejich společným znakem je přímá schopnost detekce změn v sekvenci nukleotidů, které vznikají bodovými mutacemi projevujícími se většinou záměnou báze (Utter *et al.*, 1993). Variabilita daného znaku umožňuje provádět genetické analýzy různých druhů rostlin a živočichů. Jednotlivé alely je třeba spolehlivě odlišovat, k čemuž jsou využívány různé typy markerů, z nichž každý má své výhody i nevýhody. Mezi používané markery patří SNPs, RAPDs, RFLPs, AFLPs, DNA fingerprinting nebo alozymy. Existence molekulárně genetických (DNA) markerů je tedy dána předpokladem existence polymorfismu na úrovni DNA (Zima *et al.*, 2004). Mezi charakteristické vlastnosti těchto markerů patří (Hulák *et al.*, 2006):

- 1) jsou tvořeny sekvencemi bází na specifickém fyzickém místě genomu (lokusu), tyto sekvence jsou variabilní mezi jedinci,
- 2) jsou exaktně testovatelné a vykazují kodominantní dědičnost,
- 3) mohou, ale nemusí být částí genu,
- 4) lze je hodnotit na úrovni zárodečného vývoje nebo i zárodečných buněk a není třeba čekat až na fenotypový projev v dospělosti organismu,
- 5) jsou vysoce informativní, mohou být získány i z velmi malého množství materiálu a také v libovolné fázi ontogenetického vývoje jedince včetně embryí a tělesných pozůstatků.

Molekulární markery rozdělít dle charakteru jejich polymorfismu (Hulák *et al.*, 2006):

- a) *polymorfismus délky restrikčních fragmentů* (RFLP-*restriction fragment length polymorphism*),
- b) *polymorfismus v délce sekvence* (SSLP-*simple sequence length polymorphism*) - zahrnuje mikrosatelity označované též STR (*short tandem repeats*) nebo SSR (*simple sequence repeat*) a minisatelity (též ozn. VNTR- *variable number tandem repeat*),



c) *polymorfismus jednotlivých nukleotidů* ( SNP- *single nucleotide polymorphism* ) - jedná se o bodové mutace, které mohou být detekovány pomocí RFLP.

### **2.4.3. Izolace DNA**

Výběr izolační metody závisí jednak na povaze biologického materiálu, z něž má být DNA získána a rovněž na metodě následné analýzy získané DNA. Princip izolace obecně spočívá v rozrušení buněčných a jaderných membrán, enzymatickém rozštěpení proteinů, extraktivním odstranění balastních látek a precipitaci DNA. Po odstranění supernatantu a promytí je DNA rozpuštěna ve vhodném rozpouštědle (Zima *et al.*, 2004).

Pro izolaci DNA je používána celá řada různých protokolů a v současné době se rovněž často používají komerčně vyráběné soupravy (kity), jejichž nevýhodou je vyšší cena. Lze rovněž použít klasickou metodu využívající proteinázu K a organická rozpouštědla fenol a chloroform. Ve většině případů tato metoda spolehlivě funguje. Proteináza K má uplatnění proti širokému spektru proteinů, vůči nimž je aktivní a degraduje je. Digescce proteinázou K probíhá ve speciálním pufru, jehož složení brání degradaci DNA (Zima *et al.*, 2004).

### **2.4.4. Polymerázová řetězová reakce (*polymerasa chain reaction, PCR*)**

Využití PCR je velice široké, uplatňuje se prakticky ve všech oblastech molekulární biologie. Jedná se o jednoduchou metodu, pomocí níž je možné amplifikovat *in vitro* požadovaný specifický úsek DNA prakticky v neomezeném množství, ačkoliv množství původního vzorku DNA může být jen extrémně malé. Takto amplifikovaný úsek DNA pak obsahuje prakticky výhradně studovanou sekvenci, není ji zpravidla nutno dále purifikovat (Zima *et al.*, 2004).

Do polymerázové řetězové reakce je nutno vložit (Zima *et al.*, 2004):

- 1) DNA jako předlohu (templát) pro syntézu,
- 2) DNA polymerasu, která syntézu provede,
- 3) dva syntetické oligonukleotidy (primery), obvykle o délce cca 20 bází, které hybridizují s komplementární sekvencí opačných vláken templátové DNA a ohraničují tak amplifikovanou sekvenci; tyto oligonukleotidy jsou po hybridizaci na

3'-konci prodlužovány DNA polymerasou, která neumí začít syntézu komplementárního řetězce DNA *de novo*,

4) směs deoxynukleotidů (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) jako substrát pro syntézu DNA.

Typickou vlastností DNA-polymeráz je schopnost rozpoznávat jednořetězcovou DNA jako templát (matrici) a současně se vázat na deoxyribonukleozidtrifosfát (DTP). Jestliže je na jednořetězcovou DNA (ssDNA) navázán krátký nukleotid, polymeráza se naváže těsně za tento segment a za využití energie vázané v trifosfátech DTP katalyzuje syntézu komplementárního nukleotidového řetězce. Fragment určený k amplifikaci je vymezen dvěma primery (primer je krátký fragment jednořetězcové DNA, přibližně 8 – 30 bází, s volnou hydroxylovou skupinou na 3'-konci), komplementárními k sekvencím, které se nacházejí na okrajích množného úseku, a ležícími na opačných vláknech DNA tak, že jsou orientovány svými 3'-konci k sobě (Zima *et al.*, 2004).

Denuraci dvouřetězcové DNA docílíme jejím zahřáním na vysokou teplotu (zpravidla nad 90 °C). Primery jsou velmi krátké a navíc v nadbytku a díky tomu přisednou na jednořetězcovou DNA rychleji než komplementární vlákno. V posledním kroku jsou při teplotě 72 °C (optimální teplota Taq polymerázy) podle sekvence templátů syntetizovány nové řetězce. Princip PCR tkví v kopírování sekvence templátu v několika po sobě jdoucích cyklech, přičemž v každém cyklu se počet kopií zdvojnásobí, protože fragmenty nesyntetizované v předchozích cyklech slouží současně jako matrice v cyklech následujících a množství DNA tak geometricky narůstá (Zima *et al.*, 2004).

PCR reakce se tedy skládá ze tří periodicky se opakujících kroků (Vejl, 1997):

- 1) Denaturace - zahřátí směsi na teplotu 95°C, kdy se dvouvláknová DNA rozdělí na dvě jednovláknové molekuly DNA.
- 2) Přichycení primerů (annealing) – ochlazení směsi na teplotu, při níž se mohou primery specificky navázat na komplementární sekvenci templátového vlákna DNA. Teplota závisí na délce a nukleotidovém složení primerů.
- 3) Prodlužování primerů (elongace) – zahřátí směsi na teplotní optimum DNA polymerasy (obvykle 72°C), což umožní efektivní syntézu fragmentu požadované délky v daném čase.

Cyklus se periodicky opakuje 20 – 40 krát a množství zmnoženého zvoleného fragmentu exponenciálně roste. Aby nebylo nutno po každé denuraci opět přidávat enzym, využívá se termostabilní DNA polymerasa, která neztrácí svojí aktivitu ani po

zahřátí na 95°C. Nejčastěji používaná DNA polymerasa je získávána z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, jedná se o takzvanou Taq polymerasu.

#### **2.4.5. Elektroforéza**

Základní technikou dělení, identifikace a čištění nukleových kyselin je elektroforéza na gelu. Nukleové kyseliny se v mírně zásaditém prostředí ( $\text{pH} \approx 8,5$ ) chovají jako polyanionty a v elektrickém poli mohou být proto rozděleny podle své velikosti. Podle délky dělených fragmentů nukleových kyselin lze zvolit ze dvou druhů gelů. Pro delší fragmenty (500 bp – 25 kbp) se používají agarosové gely, pro kratší fragmenty gely polyakrylamidové. Dělicí schopnost agarosového gelu lze ovlivnit koncentrací agarosy (Zima *et al.*, 2004).

Po PCR obvykle provádíme kontrolu výsledku elektroforézou na agarózovém, příp. polyakrylamidovém gelu. Jelikož pentózofosfátová kostra všech nukleových kyselin nese stejně velký záporný náboj, budou fragmenty v elektrickém poli migrovat vždy k anodě a rychlost této migrace bude závislá výhradně na jejich velikosti. Kratší fragmenty putují rychleji a urazí větší vzdálenost než fragmenty delší. Mezi nejjednodušší způsoby vyhodnocení elektroforeticky separovaných DNA fragmentů patří stanovení tzv. relativní elektroforetické mobility (REM), která udává relativní vzdálenost (%), na kterou během dělení vyhodnocovaný „band“ dospěl. Pro stanovení velikosti (párů bází, bp) analyzovaných fragmentů je současně se vzorky separován velikostní standard. Jedná se o směs fragmentů molekul DNA o známé velikosti. Obvykle jsou to produkty restrikčního štěpení plazmidové nebo bakteriofágové DNA, případně ologonukleotidy připravené synteticky (Zima *et al.*, 2004).

#### **2.4.6. Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)**

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) je jednoduchá a dobře reprodukovatelná metoda založená na sekvenční specifice restrikčních endonukleáz. Na základě RFLP se identifikují alely na základě přítomnosti nebo absence specifického restrikčního místa (Hulák *et al.*, 2006).

Úseky DNA namnožené polymerasovou řetězovou reakcí jsou dále analyzovány restrikčními endonukleasami. Ty se používají ke štěpení DNA řetězce v místech, která jsou specifická pro jednotlivé enzymy. Část sekvence, kterou obvykle rozpoznávají, je

dlouhá od 4 do 8 nukleotidů a enzym ji rozštěpí pokaždé, když ji rozpozná, což se projeví zvětšením počtu DNA fragmentů. Jestliže v rozpoznávací sekvenci dojde k mutaci, příslušný restriční enzym ji již nerozezná a molekulu DNA v tomto místě nerozštěpí. V důsledku toho se na gelu objeví jeden dlouhý (pomalý) fragment místo původních dvou krátkých (rychlých). Lze si představit i obrácený proces vzniku nového restričního místa, které se projeví přítomností dvou kratších fragmentů na gelu místo jednoho dlouhého. Ke vzniku restričního místa dochází s nižší pravděpodobností. Ke změnám v délce restričních fragmentů však může dojít i inzercí či delecí jednoho nebo více nukleotidů, aniž by došlo ke změně rozpoznávací sekvence a tím ke vzniku či ztrátě restričního místa. Tento případ je častý u repetitivních sekvencí jako jsou mikrosatelity a minisatelity. Proměnlivost velikostí restričních fragmentů, podléhající v populaci mendelovské segregaci, se obecně označuje jako polymorfismus délky restričních fragmentů, zkráceně RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Zima et al., 2004).

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1. Sběr vzorků

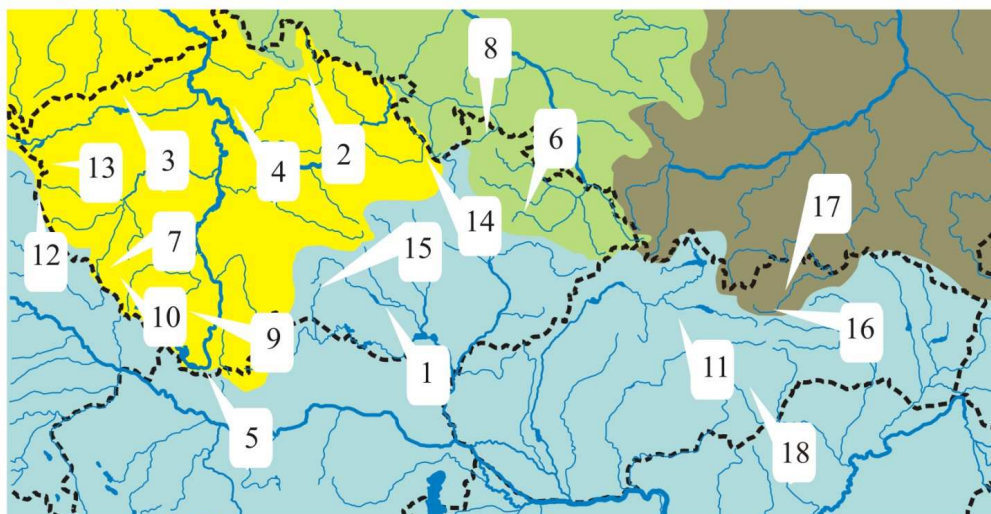
Výběr lokalit byl volen tak, aby byla pokryta všechna tři hlavní povodí na území České republiky (Labe, Odra, Dunaj), neboť vzhledem k odlišné geografické historii různých oblastí můžeme předpokládat i odlišnou genetickou strukturu populací. Do studie byly zahrnuty rovněž lokality z povodí Dunaje a Visly na Slovensku z důvodu opakovaných transferů ryb v rámci celého bývalého Československa a pro porovnání byla dále připojena jedna lokalita z Rumunska. Seznam lokalit uvádí tab. 1, na obr. 1 jsou lokality vyznačeny v mapě.

**Tab. 1. Seznam lokalit zahrnutých do studie**

<i>Č. lokality</i>	<i>Vodní tok</i>	<i>Lokalita</i>	<i>Povodí/úmoří</i>	<i>N</i>
1	Jihlava	Hrubšice	Dunaj/Černé m.	21
2	Kamenice	nad Železným Brodem	Labe/Severní m.	15
3	Jiřetínský potok	Horní Jiřetín	Labe/Severní m.	23
4	Liběchovka	Želízy	Labe/Severní m.	11
5	Mlýnský potok		Dunaj/Černé m.	48
6	Odra	1 km pod pramenem	Odra/Baltské m.	12
7	Zelenský potok	Podjezí	Labe/Severní m.	19
8	Vrchovištní potok	Jeseník	Odra/Baltské m.	15
9	Zlatý potok		Labe/Severní m.	24
10	Laka	Šumava – 200 m pod jezerem Laka	Labe/Severní m.	21
11	Biely potok - líheň	Revúca	Dunaj/Černé m.	24
12	Celní potok	Josefovo údolí	Dunaj/Černé m.	29
13	Pramenský potok		Dunaj/Černé m.	18
14	Tichá Orlice	uč. Králíky	Labe/Severní m.	16
15	Mor. Dyje	Dyjice u silnice	Dunaj/Černé m.	21
16	Poprad	Svit	Visla/Baltské m.	15
17	Kežmarská Biela voda	nad Kežmarkom	Visla/Baltské m	15
18	Muráň	Ľubeník	Dunaj/Černé m.	14
19	Olt	Timis de Jos	Dunaj/Černé m.	4

N – počet jedinců v populaci

**Obr. 1** Mapa lokalit na území České republiky a Slovenska zahrnutých do studie



**Lokalita:**

- |                     |                      |                          |
|---------------------|----------------------|--------------------------|
| 1) Jihlava          | 7) Zelenský potok    | 13) Pramenský potok      |
| 2) Kamenice         | 8) Vrchovištní potok | 14) Tichá Orlice         |
| 3) Jiřetínský potok | 9) Zlatý potok       | 15) Moravská Dyje        |
| 4) Liběchovka       | 10) Laka             | 16) Poprad               |
| 5) Mlýnský potok    | 11) Biely potok      | 17) Kežmarská Biela voda |
| 6) Odra             | 12) Celní potok      | 18) Muráň                |

Vzorky byly získávány ve spolupráci s ČRS, rovněž byly využity vzorky, které byly dříve odebrány pracovníky ÚŽFG v Liběchově a zde také uchovány. Pstruzi byli odloveni pomocí elektrického agregátu a poté jim byla odstřižena část ploutve. Do doby izolace byly vzorky ploutví uchovávány v 96% etanolu.

### 3.2. Izolace DNA

Odebraný vzorek tkáně byl rozstříhán na malé kousky a vložen do termobloku nastaveném na 37 °C, aby se odpařil zbývající etanol. Po vysušení bylo přidáno 500 µl pufru a 15 µl proteinázy K. Tato směs byla za občasného vortexování ponechána v termobloku při 55 °C po tak dlouhou dobu, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění tkáně. DNA byla izolována pomocí extrakčního kitu DNeasy Blood & Tissue Kit podle instrukcí výrobce (Qiagen). U některých vzorků byla DNA izolována standardní metodou fenol-chloroform-isoamylalkohol. Po rozpuštění tkáně byl ke směsi přidán fenol (300 µl). Tato směs byla odstředěna v centrifuze, čímž se vytvořily dvě fáze – odebrána byla pouze horní fáze, ke které byla přidána směs chloroform:isoamylalkohol (500 µl). K horní fázi byl přidán octan sodný a vymražený 96% EtOH, směs se nechala vysrážet v mrazáku a poté byla stočena v centrifuze. EtOH z mikrokumavky byl slit.

Po osušení stěn byl přidán vymražený 70% EtOH (200  $\mu$ l), který byl po centrifugování slit. Vzniklý sediment byl po osušení rozpuštěn v TE pufru.

### 3.3. PCR

Pomocí PCR byly namnoženy úseky mitochondriální DNA (gen pro ND-5/6) a jaderné DNA (gen pro LDH1).

Vlastní reakce probíhala v roztoku, který obsahuje všechny komponenty nezbytné pro amplifikaci. Konkrétní složení reakční směsi bylo optimalizováno pro každou PCR reakci zvlášť. Vstupní množství DNA činilo 5  $\mu$ l. Složení PCR směsi uvádí tab. 2.

**Tab. 2 Složení PCR reakční směsi**

<i>fragment</i>	<i>DNA (<math>\mu</math>l)</i>	<i>master mix PPP (<math>\mu</math>l)</i>	<i>primer (<math>\mu</math>l)</i>	<i>PCR (<math>\mu</math>l)</i>	<i>voda</i>	<i>celkový objem (<math>\mu</math>l)</i>
ND 5/6	5	25	0,5 + 0,5	19		50
LDH 1	5	12,5	1,25 + 1,25	5		25

Pro amplifikaci úseku mtDNA ND-5/6 byly použity primery ND5/6L a ND5/6H (Nielsen *et al.*, 1998), amplifikace úseků LDH1 probíhala za použití primerů Ldhxon3F a Ldhxon4R (McMeel *et al.*, 2001). Sekvenci bází použitých primerů uvádí tab. 3.

**Tab. 3 Sekvence bází použitých primerů**

<i>název primeru</i>	<i>sekvence</i>
Ldhxon3F	GGCAGCCTCTTCCTCAAACGCCCAA
Ldhxon4R	CAACCTGCTCTCTCCCTCCTGCTGACGAA
ND5/6L	AATAGCTCATCCATTGGTCTTAGG
ND5/6H	TAACAACGGTGGTTTTTCAAGTCA

PCR probíhala v tepelně a chemicky inertních mikrozkuvkách. Reakční směsi byly připravovány na ledu. PCR pak probíhala v termocykleru – speciálním termostatu s regulací teploty, rychlosti změn teploty a doby působení konstantní teploty. Parametry teplotního a časového průběhu PCR byly zadány formou jednotlivých programů. Teplotní a časový průběh nejdůležitějších reakcí je uveden v tab. 4. Namnožené úseky DNA byly okamžitě použity pro následné analýzy nebo krátkodobě uchovávány při 4  $^{\circ}$ C, případně dlouhodobě při -20  $^{\circ}$ C.

**Tab. 4 Teplotní a časový průběh PCR**

<i>fragment</i>	<i>délka produktu (bp)</i>	<i>úvodní denaturace</i>	<i>počet cyklů</i>	<i>denaturace</i>	<i>annealing</i>	<i>elongace</i>	<i>závěrečná elongace</i>
ND 5/6	2500	95 <sup>0</sup> C/10 min	35	94 <sup>0</sup> C/30 s	52 <sup>0</sup> C/30 s	72 <sup>0</sup> C/2 min	72 <sup>0</sup> C/10 min
LDH 1	440	94 <sup>0</sup> C/10 min	33	94 <sup>0</sup> C/30 s	65 <sup>0</sup> C/1 min	72 <sup>0</sup> C/1 min	72 <sup>0</sup> C/10 min

### 3.4. RFLP

Pro naštěpení PCR produktu mtDNA bylo nejprve testováno osm enzymů – XbaI, HaeIII, TaqI, HinfI, AluI, AvaII, DdeI, PstI. Čtyři z nich odhalily polymorfismus. Z toho důvodu byly namnožené úseky DNA dále štěpeny těmito čtyřmi restrikčními endonukleázami:

ND 5/6: AluI

AvaII

HinfI

TaqI

LDH 1: BslII

Celkový objem reakční směsi činil 10  $\mu$ l. Složení reakční směsi je uvedeno v tab. 5.

**Tab. 5 Složení reakční směsi pro RFLP**

<i>fragment</i>	<i>PCR produkt (<math>\mu</math>l)</i>	<i>enzym (<math>\mu</math>l)</i>	<i>pufř (<math>\mu</math>l)</i>	<i>voda (<math>\mu</math>l)</i>
ND 5/6	5	0,3	1	3,7
LDH 1	5	0,7	1	3,3

Štěpení probíhalo v termostatu. Inkubační teplota jednotlivých enzymů a jejich rozpoznávací místa nutná ke štěpení uvádí tab. 6.



**Tab. 6 Inkubační teplota a poznávací místa**

<i>enzym</i>	<i>poznávací místo</i>	<i>inkubační teplota (°C)</i>
AluI	AG↓CT	37
AvaII	G↓GWCC	37
HinfI	G↓ANTC	37
TaqI	T↓CGA	65
BslI		55

W = A nebo T

## 4.5. Elektroforéza

Pro vizualizaci produktů štěpení byla provedena horizontální agarózová elektroforéza. Nejprve byl připraven gel s danou koncentrací agarózy v elektroforetickém pufru (TBE). Volba koncentrace agarózy byla závislá na velikosti separovaných fragmentů. Pro RFLP byl použit 1,6% agarózový gel, pro kontrolní elektroforézu PCR produktů 0,8%. Gel byl připraven rozvařením agarózy (lineární polysacharid) v TBE pufru. Tekutá agaróza byla nalita do gelové vaničky a byly do ní zasunuty hřebeny pro vytvoření jamek pro nanášení jednotlivých vzorků. Po ztuhnutí gelu a vyjmutí hřebenů byla gelová vanička umístěna do elektroforetické cely s elektroforetickým pufrům. Vrstva pufru nad gelem činila cca 2 – 3 mm. Před nanášením na gel byl vzorek smíchán s nanášecím pufrům (loading buffer), sloužícím ke zvýšení hustoty směsi a tím usnadnění aplikace do jamky. Nanášecí pufr obsahuje navíc i barvivo, které vlivem elektrického pole migruje stejným směrem jako nukleové kyseliny a poskytuje tak možnost odhadnout pozici dělených fragmentů. Pro určení délek analyzovaných fragmentů byl se vzorky současně nanesen na gel také velikostní standard. Po nanášení vzorků se elektroforetická nádoba připojila k elektrickému zdroji stejnosměrného napětí. Elektroforéza probíhala při konstantní hodnotě napětí (100 V). Rozdělené fragmenty byly vizualizovány pomocí fluorescenčního barviva GoldView, které bylo do gelu přidáno již při jeho přípravě (k 100 ml tekuté agarózy bylo přidáno 5 µl GoldView). Po prosvícení gelu pod UV lampou byla provedena fotodokumentace.

## 4.6. Zpracování dat

Nejprve byly vypočteny absolutní a relativní četnosti haplotypů pro jednotlivé populace. Následně byly sestaveny endonukleázové profily pro každý enzym. Molekulární data byla statisticky zpracována pomocí programu ARLEQUIN 3.1. Arlequin může pracovat s RFLP haplotypy libovolné délky. Každé restriční místo je považováno za samostatný lokus. Přítomnost restričního místa může být kódováno jako „1“ a jeho absence jako „0“. Pro určení rozložení genetické proměnlivosti bylo využito metody AMOVA (Analyses of MOlecular VAriance). AMOVA je významná, relativně nová statistická metoda, která dovoluje hierarchické rozdělení genetické variace mezi populacemi a regiony a odhad širokého užití F-statistik a/nebo jejich analogů. Systém AMOVA je důležitý, neboť dovoluje analýzy pro mnoho typů genetických markerů a nabízí tak statistické testování náhodných permutací.  $F_{ST}$  (pairwise genetic distances) je fixační index udávající úroveň diferenciace mezi dvojicí populací (Peakall & Smouse, 2007). Pro zhodnocení úrovně genetické diferenciace mezi jednotlivými dvojicemi populací byl stanoven fixační index  $F_{ST}$ .

Pomocí programu NETWORK 4.5.1.0 (Bandelt *et al.*, 1995) byla vytvořena haplotypová síť znázorňující vztahy mezi nalezenými haplotypy a v programu Network Publisher byla haplotypová síť následně graficky zpracována.

## 4. Výsledky

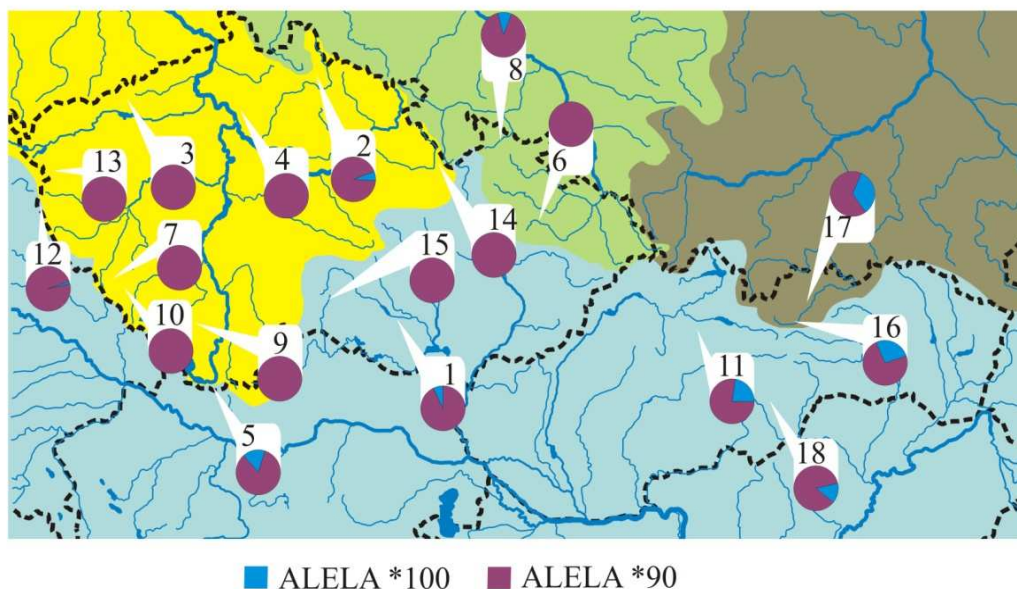
### 4.1. LDH-C1\*

Elektroforéza fragmentu LDH-C1\* po digesci enzymem BslI odhalila 3 genotypy: většina jedinců byla homozygotní pro alelu \*90, zatímco pro alelu \*100 bylo homozygotně založeno pouze šest jedinců, z čehož čtyři pocházeli z lokality z Rumunska, zbývající jedinci byli heterozygotně založeni. Výskyt homozygotů a heterozygotů a frekvence alel \*100 a \*90 v jednotlivých populacích jsou zaznamenány v tab. 7. Graficky jsou frekvence výskytu obou alel zakresleny v mapě na obr. 2.

**Tab. 7 Počty homozygotních a heterozygotních jedinců a frekvence alel \*100 a \*90 v jednotlivých populacích**

<i>Lokalita</i>	<i>Počet jedinců</i>			<i>Frekvence alel</i>	
	<i>90/90</i>	<i>90/100</i>	<i>100/100</i>	<i>90</i>	<i>100</i>
Jihlava	18	3	0	0,93	0,07
Kamenice	13	2	0	0,93	0,07
Jiřetínský potok	23	0	0	1	0
Liběchovka	11	0	0	1	0
Mlýnský potok	32	16	0	0,83	0,17
Odra	12	0	0	1	0
Zelenský potok	19	0	0	1	0
Vrchovištní potok	12	3	0	0,90	0,10
Zlatý potok	24	0	0	1	0
Laka	21	0	0	1	0
Biely potok	14	9	1	0,77	0,23
Celní potok	28	1	0	0,98	0,02
Pramenský potok	18	0	0	1	0
Tichá Orlice	16	0	0	1	0
Moravská Dyje	21	0	0	1	0
Poprad	7	8	0	0,73	0,27
Kežmarská Biela voda	6	8	1	0,67	0,33
Muráň	10	4	0	0,86	0,14
Olt	0	0	4	0	1
$\Sigma$	<b>305</b>	<b>54</b>	<b>6</b>		

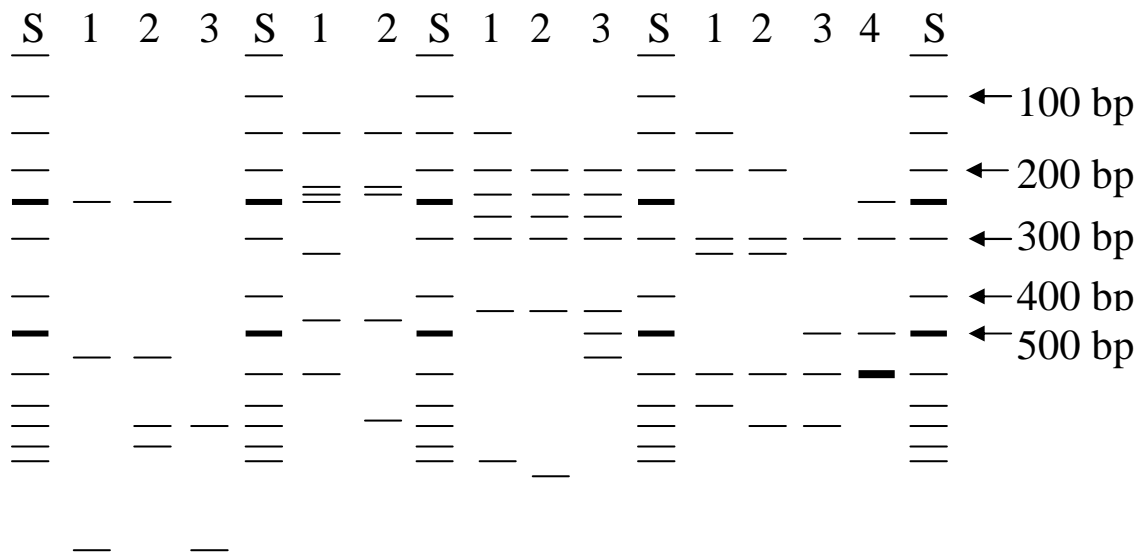
**Obr. 2 Zastoupení alel LDH-C1\*100 a LDH-C1\*90 v jednotlivých populacích**



#### 4.2. ND5/6

Amplifikované úseky ND5/6 byly štěpeny čtyřmi restrikčními endonukleázami – TaqI, AluI, HinfI, AvaII. Vzhledem k tomu, že u některých vzorků zahrnutých do studie neposkytla PCR reakce fragmentu ND5/6 dostatek produktu a tudíž nemohla být provedena restrikce enzymy, nebyly tyto vzorky zahrnuty do výpočtů – jednalo se o 6 jedinců z Celního potoka, 3 z Tiché Orlice a 1 z Mlýnského a Jiřetínského potoka. Rozdílné endonukleázové profily každého enzymu pak byly číselně označeny. Štěpením enzymem TaqI byly zjištěny čtyři různé profily, AluI poskytl dva profily a HinfI a AvaII zjistily tři odlišné profily lišící se navzájem přítomností nebo absencí jednoho nebo více restrikčních míst. Na obr. 3 jsou znázorněny všechny profily vzniklé digesí fragmentu ND5/6 jednotlivými enzymy. Tab. 8 uvádí matici binárních čísel v závislosti na přítomnosti či absenci štěpného místa. Na základě profilů získaných štěpením úseku ND5/6 bylo sestaveno sedm haplotypů jako kombinace všech profilů nalezených u konkrétního jedince. Tyto haplotypy jsou zaznamenány v tab. 9. Zastoupení jednotlivých haplotypů v populacích a jejich celkový počet uvádí tab. 10.

**Obr. 3 Profily vzniklé digescí jednotlivými enzymy v pořadí AvaII, AluI, HinfI, TaqI, vždy v porovnání se standardem (S)**



**Tab. 8 Matice binárních čísel v závislosti na přítomnosti či absenci štěpného místa**

TAQI	ALUI	HINF I	AVAI I
1 1100	1 1	1 10	1 01
2 0100	2 0	2 00	2 10
3 0000		3 11	3 00
4 0001			

**Tab. 9 Haplotypy sestavené na základě profilů získaných štěpením úseku ND5/6 restričními endonukleázami**

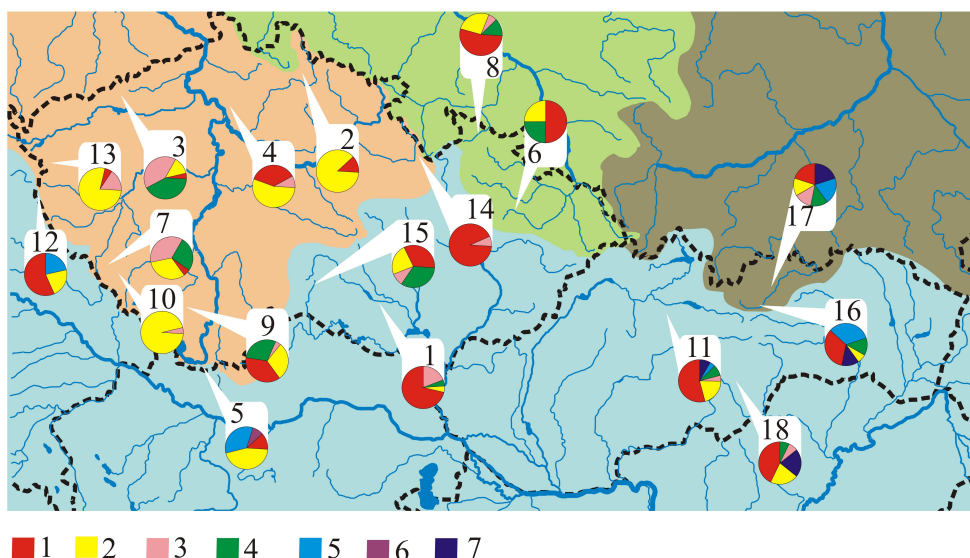
HAPLOTYP	TAQ	ALU	HINF	AVA
1	2	1	2	1
2	1	1	1	2
3	1	1	1	1
4	1	1	1	3
5	3	2	3	3
6	3	2	3	1
7	4	2	3	3

**Tab. 10 Zastoupení nalezených haplotypů a jejich celkový počet v jednotlivých populacích**

<i>Lokalita</i>	<i>Haplotyp</i>						
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
Jihlava	15	1	4	1			
Kamenice	2	13					
Jiřetínský potok	1	3	9	9			
Liběchovka	4	6	1				
Mlýnský potok	6	21			16	4	
Odra	6	3		3			
Zelenský potok	1	6	7	5			
Vrchovištní potok	8	4	1	2			
Zlatý potok	9	7	1	7			
Laka		20	1				
Biely potok	13	5	1	2	1		2
Celní potok	13	5			5		
Pramenský potok	1	14	3				
Tichá Orlice	12		1				
Moravská Dyje	7	5	2	7			
Poprad	5	1		2	5		2
Kežmarská Biela voda	3	2	2	2	3		3
Muráň	6	3	1	1			3
Olt							4
<b>Σ</b>	<b>112</b>	<b>119</b>	<b>34</b>	<b>41</b>	<b>30</b>	<b>4</b>	<b>14</b>

Nejpočetněji byl zastoupen haplotyp 2, který byl nalezen u 119 jedinců ze 17 lokalit, nevyskytoval se pouze v populaci z Tiché Orlice a z Oltu. V populaci z Oltu byl nalezen pouze jeden haplotyp, haplotyp 7. U této populace byla tudíž nulová haplotypová diverzita. Tuto skutečnost však mohl ovlivnit počet testovaných jedinců z této populace, tedy pouze čtyři jedinci. Druhým nejčastějším haplotypem byl haplotyp 1, který se nevyskytoval v populaci z Laky. Výskyt haplotypů 1 a 2 se tedy jeví jako takřka univerzální, vyskytovaly se ve všech sledovaných povodích. Haplotyp 6 se vyskytoval pouze v populaci z Mlýnského potoka, byl nalezen u čtyř jedinců. Haplotypy 5, 6 a 7 se vyskytovaly pouze v povodí Dunaje a Visly. Zastoupení haplotypů v populacích je graficky znázorněno na obr. č. 4. Vypočtené relativní četnosti výskytu jednotlivých haplotypů ve studovaných populacích uvádí tab. 11, přičemž červeně jsou označeny haplotypy s nejvyšší frekvencí výskytu v příslušné populaci.

**Obr. 4 Zastoupení jednotlivých haplotypů mtDNA v testovaných populacích**



**Tab. 11 Relativní četnosti haplotypů v populacích**

Lokalita	Relativní četnost haplotypů						
	1	2	3	4	5	6	7
Jihlava	0,7143	0,0476	0,1905	0,0476	-	-	-
Kamenice	0,1333	0,8667	-	-	-	-	-
Jiřetínský potok	0,0455	0,1364	0,4091	0,4091	-	-	-
Liběchovka	0,3636	0,5455	0,0909	-	-	-	-
Mlýnský potok	0,1277	0,4468	-	-	0,0699	0,0851	-
Odra	0,5000	0,2500	-	0,2500	-	-	-
Zelenský potok	0,0526	0,3158	0,3684	0,2632	-	-	-
Vrchovištní potok	0,5333	0,2667	0,0667	0,1333	-	-	-
Zlatý potok	0,3750	0,2917	0,0417	0,2917	-	-	-
Laka	-	0,9524	0,0476	-	-	-	-
Biely potok	0,5417	0,2083	0,0417	0,0833	0,0417	-	0,0833
Celní potok	0,5652	0,2174	-	-	0,2174	-	-
Pramenský potok	0,0556	0,7778	0,1667	-	-	-	-
Tichá Orlice	0,9231	-	0,0769	-	-	-	-
Moravská Dyje	0,3333	0,2381	0,0952	0,3333	-	-	-
Poprad	0,3333	0,0667	-	0,1333	0,3333	-	0,1333
Kežmarská Biela voda	0,2000	0,1333	0,1333	0,1333	0,2000	-	0,2000
Muráň	0,4286	0,2543	0,0714	0,0714	-	-	0,2143
Olt	-	-	-	-	-	-	1,0000

Pomocí programu NETWORK byla vytvořena haplotypová síť znázorňující pravděpodobné fylogenetické vztahy mezi sedmi haplotypy, nalezenými ve studovaných populacích. Na jednotlivých ramenech je dále naznačena teoretická

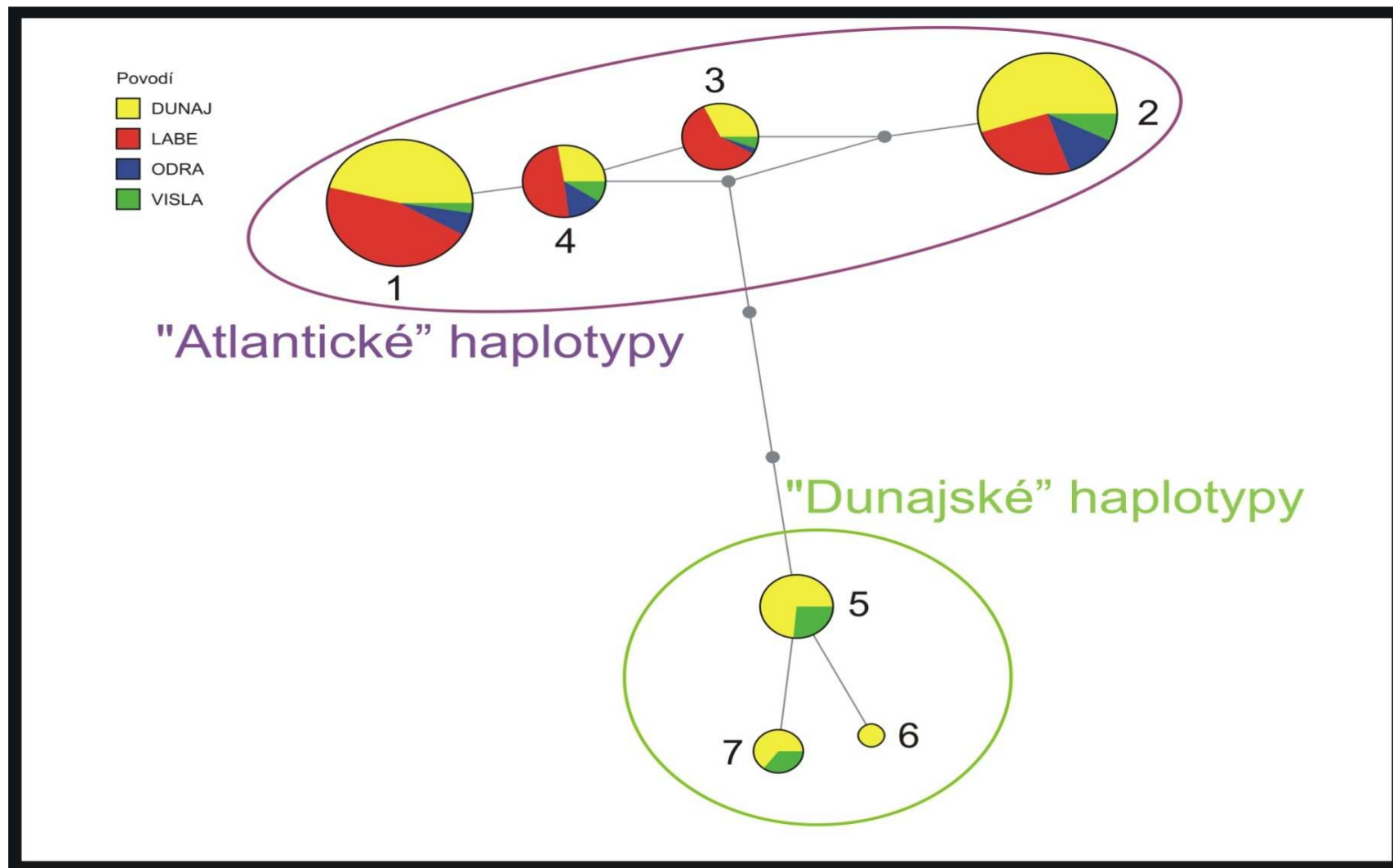
pozice haplotypů, které se v populacích buď mohly v minulosti vyskytovat, nebo se v populacích vyskytují a nám se je nepodařilo nalézt. Tyto hypotetické haplotypy jsou označeny malými šedými kruhy. Haplotypovou síť můžeme rozdělit do dvou skupin, které pravděpodobně odpovídají linii „dunajské“ a „atlantické“. První skupina byla nejpočetnější a zahrnovala 4 haplotypy, které se vyskytovaly ve všech povodích, přičemž nejpočetněji byl zastoupen haplotyp 2. Druhá skupina je reprezentována haplotypy nalezenými u jedinců pocházejících z povodí Dunaje a Visly. Na obr. 5 je barevně odlišeno zastoupení haplotypů v jednotlivých povodích a na obr. 6 v jednotlivých populacích.

Analýza genetické variance (AMOVA) prokázala, že 71,50 % z celkové genetické variability bylo distribuováno v populacích, 23,16 % mezi nimi a pouze 5,34 % bylo dáno rozdíly mezi povodími. Z toho vyplývá, že mezi povodími jsou jen velmi malé geneticky podmíněné rozdíly. Rozložení genetické proměnlivosti je vyznačeno na obr. 7.

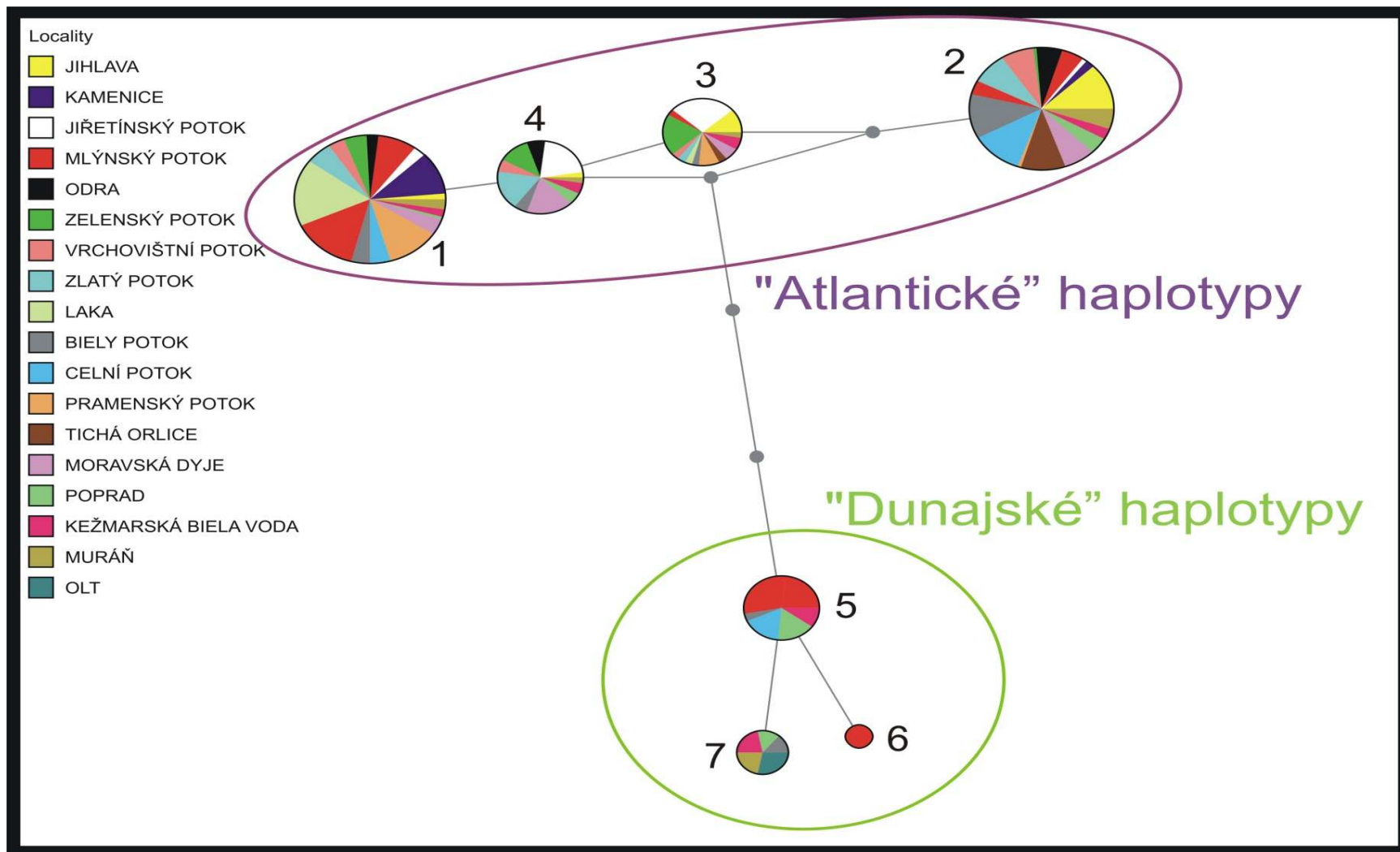
Tab. 12 udává hodnoty  $F_{ST}$ , které vyjadřují genetickou vzdálenost jednotlivých populací. Testování nulové hypotézy, zda nejsou mezi dvojicemi populací signifikantní rozdíly, bylo provedeno při třech různých hladinách významnosti ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  a  $p < 0,001$ ). Hvězdičkami jsou označeny hodnoty statisticky významně vyšší než nula při těchto různých hladinách významnosti, NS (not significant) jsou označeny hodnoty, které tuto podmínku nesplnily. Vysoce signifikantní rozdíly byly nalezeny u populace z Oltu.



Obr. 5 Fylogenetické vztahy mezi haplotypy nalezenými v studovaných populacích (znázorněno pro jednotlivá povodí)



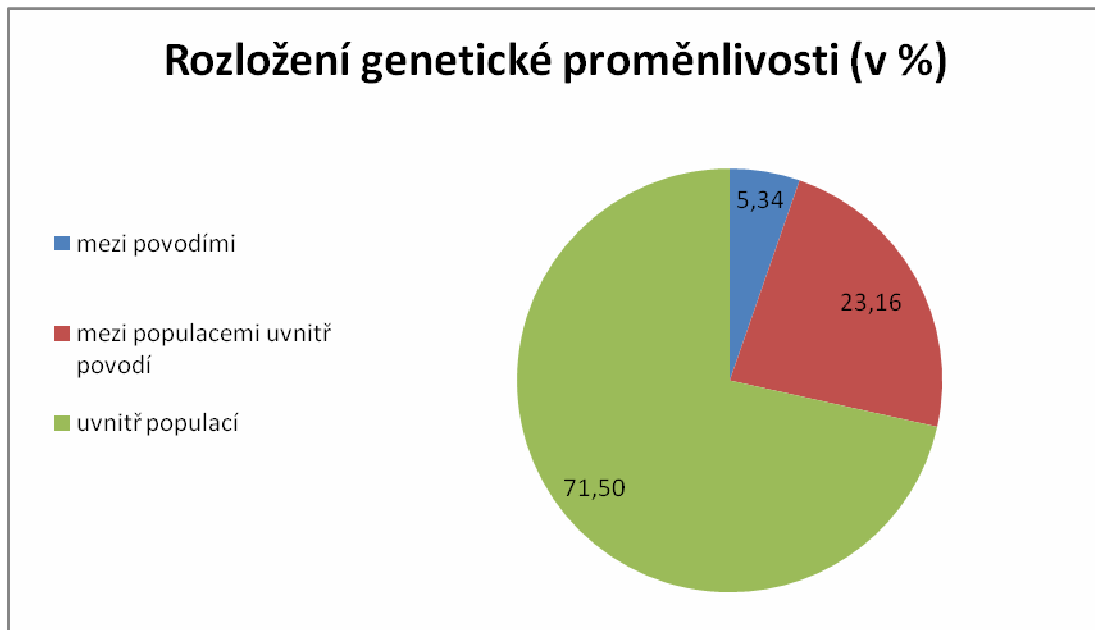
Obr. 6 Fylogenetické vztahy mezi haplotypy nalezenými v studovaných populacích (znázorněno pro jednotlivé populace)



**Tab. 12** Hodnoty  $F_{ST}$  vyjadřující genetickou vzdálenost jednotlivých populací. Hodnocení, zda mezi dvojicemi populací jsou signifikantní rozdíly, bylo stanoveno při třech různých hladinách významnosti (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  a \*\*\* $p < 0,001$ ), NS označuje nesignifikantní rozdíly mezi dvojicemi populací

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1		***	***	*	***	NS	***	NS	**	***	NS	*	***	NS	**	***	***	*	***
2	0.63626		***	NS	**	*	**	**	*	NS	***	***	NS	***	**	***	***	**	***
3	0.50441	0.38254		*	***	*	NS	**	*	***	***	***	***	***	NS	***	***	***	***
4	0.28988	0.11950	0.17454		*	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	**	NS	**	*	NS	***
5	0.37062	0.23322	0.26789	0.15674		**	***	**	***	***	***	**	***	***	***	NS	NS	NS	***
6	0.12135	0.31679	0.20553	-0.02686	0.18541		*	NS	NS	***	NS	NS	**	**	NS	*	*	NS	***
7	0.49286	0.23316	-0.01770	0.08402	0.23133	0.16962		**	NS	***	**	***	*	***	NS	***	***	**	***
8	0.07521	0.34801	0.24218	-0.00229	0.21326	-0.07390	0.20818		NS	***	NS	NS	**	*	NS	**	*	NS	***
9	0.22810	0.22043	0.10981	-0.03393	0.18653	-0.04396	0.07718	-0.01098		***	NS	*	**	***	NS	***	**	NS	***
10	0.79342	0.03801	0.58297	0.39334	0.32739	0.57376	0.43940	0.57977	0.41931		***	***	NS	***	***	***	***	***	***
11	0.06113	0.33569	0.25293	0.05346	0.16066	-0.02595	0.23265	-0.02359	0.04398	0.50707		NS	***	*	NS	*	NS	NS	***
12	0.09917	0.37167	0.31906	0.10507	0.13182	0.02645	0.29496	0.02780	0.10353	0.53709	-0.02610		***	*	*	NS	NS	NS	***
13	0.63297	-0.03345	0.30515	0.12453	0.24419	0.32132	0.15406	0.35153	0.21171	0.06754	0.34481	0.38715		***	**	***	***	***	***
14	0.05423	0.79998	0.71709	0.49999	0.44504	0.33715	0.69509	0.26849	0.40914	0.93728	0.16609	0.17563	0.79540		***	***	***	**	***
15	0.24584	0.24350	0.07560	-0.01917	0.18944	-0.03474	0.05430	0.00088	-0.04296	0.45105	0.05438	0.11691	0.22513	0.44294		***	**	NS	***
16	0.33933	0.44251	0.39704	0.24115	0.04514	0.19089	0.37396	0.21381	0.24276	0.60145	0.10457	0.05386	0.45883	0.41390	0.24547		NS	NS	*
17	0.32576	0.34454	0.27894	0.16147	0.00715	0.13627	0.25643	0.16554	0.16585	0.50720	0.08278	0.06098	0.35252	0.42178	0.16256	-0.04486		NS	*
18	0.14506	0.30605	0.23803	0.04992	0.07889	-0.00126	0.21036	0.01321	0.05167	0.49993	-0.03690	-0.02896	0.31834	0.25807	0.05767	0.01527	-0.01308		*
19	0.84236	0.86895	0.85809	0.74599	0.41602	0.73875	0.83227	0.73937	0.72820	0.97262	0.60182	0.56507	0.86994	0.95941	0.74143	0.34861	0.35870	0.49023	

**Obr. 7 Rozložení genetické proměnlivosti (AMOVA)**



## 5. Diskuze

Vzhledem k tomu, že genetické složení populace je výsledkem dlouhodobé interakce genomu populace a konkrétního prostředí, lze s velkou pravděpodobností předpokládat, že na jedné straně výsledné genetické složení je optimálně danému prostředí přizpůsobeno a na druhé straně genetická variabilita populace jí zajišťuje přežití ve smyslu možnosti reagovat na běžné výkyvy tohoto prostředí. Avšak umělé rozmnožování pstruha obecného na našem území je praktikováno již od 19. století, přičemž od počátku dochází k intenzivním převozům materiálu nejen v rámci jednotlivých povodí, ale i mezi povodími, což má nesporný negativní vliv na genetickou různorodost jedinců a tedy i ovlivnění celé populace.

Jedním z hlavních procesů, které tvořily přirozenou genetickou diferenciaci populací, byly doby ledové v průběhu pleistocénu. Studie z posledních let popisují pět fylogenetických skupin v druhovém komplexu *Salmo trutta*, které se vyvinuly v geografické izolaci v průběhu pleistocénu a od té doby velkou měrou zůstaly alopatrické. Tyto skupiny byly označeny jako základní evoluční jednotky, avšak byla zjištěna i jemnější fylogeografická strukturace uvnitř hlavních linií (Bernatchez, 2001). Podle předpokladu alopatrického vývoje linií (Bernatchez, 2001) by tedy měly být zejména výrazné rozdíly mezi populacemi úmoří Černého moře, kde je rozšířena dunajská linie, a populacemi Atlantického bazénu (zahrnujícího také úmoří Severního a Baltského moře), kde se nachází atlantická linie. Severní oblast atlantického regionu byla během posledního glaciálního období téměř celá zaledněna, a tak populace, jejichž areál byl v době ledové omezený na glaciální refugia, osídlily tuto oblast až v postglaciálním období, tj. během posledních 10.000 – 18.000 let. Současné populace pstruha v severozápadní Evropě tedy mají původ v jednom nebo více „atlantických“ refugiích, která pravděpodobně existovala na okrajích pevninských ledových příkrovů (Laikre, 1999). Je rovněž možné, že docházelo k druhotnému kontaktu s „dunajskou linií“ (Osinov & Bernatchez, 1996). Z těchto informací lze předpokládat, že genetická variabilita populací na území ČR by měla být velmi vysoká.

V této studii jsem se zabývala proměnlivostí úseku jaderné DNA na lokusu LDH-C1. U tohoto lokusu byly nalezeny dvě alely - \*90 a \*100. Alela \*100, která je označována jako původní, je nalézána v celé oblasti výskytu pstruha, zatímco alela \*90, označována jako více moderní, se přirozeně vyskytuje v severozápadní části Evropy. Zde se

pravděpodobně pstruh obecný vyvíjel v průběhu poslední doby ledové v jednom refugiu a po ústupu ledovců došlo v této oblasti k jeho rozšíření společně s alelou \*90 (Hamilton *et al.*, 1989). Alozymová data tak posloužila k detekci různých fylogeografických skupin v druhovém komplexu *Salmo trutta* v řadě studií. Například pomocí dvou alozymových lokusů – LDH-C1\* a MEP-1\*, byl prokázán druhotný kontakt (přirozený i umělý) mezi „atlantickou“ a „dunajskou“ skupinou v horních přítocích Dunaje (Bernatchez & Osinov, 1995; Osinov & Bernatchez, 1996). Změny ve frekvenci výskytu alel \*90 a \*100 také potvrdily, že se v populacích ve Španělsku přirozeně vyskytovala alela \*100 (García – Marín *et al.*, 1991). Avšak oslabení nebo extinkce přirozených populací byly nahrazovány vysazováním ryb z líhní z Německa nebo Dánska a alela \*90, která zřejmě chyběla ve Španělsku v přirozených populacích před introdukcemi, byla tímto způsobem rozšířena (Machordon, 2000). Ve všech studovaných populacích z České republiky a Slovenska, tedy jak v atlantickém, tak v dunajském povodí, byla prokázána vysoká frekvence výskytu alely \*90. Tato skutečnost není překvapující vzhledem k tomu, že na území bývalého Československa má rybářské obhospodařování volných vod dlouholetou tradici a je známo, že pstruzi odchovávaní na líhních a vysazovaní do toků, jsou charakterizováni výskytem alely \*90 (McMeel *et al.*, 2001). Tímto způsobem dochází k rozšiřování této alely dále do toků spolu s násadovým materiálem. Analýza PCR-RFLP fragmentu LDH-C1 je tedy vhodným markerem pro průkaz původu pstruhů z líhní v oblastech, kde nepředpokládáme přirozené rozšíření alely \*90. Analýzy prokázaly, že tato alela dominovala rovněž v povodí Dunaje, kde je pravděpodobně nepůvodní, což nasvědčuje převozům ryb mezi povodími. Alela \*90 se rovněž vyskytovala ve vysoké frekvenci v populaci Biely potok, kde se nachází velkokapacitní líheň, a napomáhá tak rozšiřování této alely v povodí Dunaje. Alela \*100 se ve studovaných populacích na území České republiky a Slovenska vyskytovala v nízké početnosti. V České republice byla nejvyšší frekvence výskytu (0,17) alely \*100 zaznamenána v populaci z Mlýnského potoka, na území Slovenska se vyskytovala ve všech sledovaných populacích, avšak rovněž s nevelkou frekvencí výskytu (od 0,14 do 0,33). Stojí však za povšimnutí, že alela \*100 byla detekována v severní části České republiky, tedy v populacích z Kamenice a Vrchovištního potoka, kde se tato alela pravděpodobně nevyskytuje přirozeně, a její výskyt v této oblasti je nejspíše zapříčiněn importem ryb z povodí Dunaje. V populaci řeky Olt v Rumunsku, která byla použita jako referenční, byla frekvence výskytu alely

\*100 rovna jedné, všichni jedinci byli tedy pro tuto alelu homozygotně založeni. Toto zjištění nasvědčuje tomu, že převozy pstruhů z Atlantického úmoří do dolních přítoků Dunaje pravděpodobně byly a jsou velice omezené nebo nulové. Mimo tuto populaci byli nalezeni pouze dva jedinci s homozygotním výskytem alely \*100, a to v populaci z Bieleho potoka a z Kežmarské Biele vody. V ostatních případech se alela \*100 vyskytovala v heterozygotním stavu společně s alelou 90\*, což dokazuje, že docházelo ke křížení jedinců různých fylogeografických skupin, které odpovídají „atlantické“ a „dunajské“ linii.

Při zobrazení fylogeografických vztahů mezi nalezenými haplotypy mtDNA je zřejmé, že sedm nalezených haplotypů je možné rozdělit do dvou skupin, které odpovídají „dunajské“ a „atlantické“ linii. U všech jedinců nesoucích některý z domnělých „dunajských“ haplotypů byly výsledky analýzy mtDNA porovnány s výsledky analýzy sekvencí kontrolní oblasti mtDNA a bylo zjištěno, že tyto haplotypy skutečně nesou jedinci „dunajské“ linie. Podobné porovnání bylo provedeno u dvaceti jedinců s některým z „atlantických“ haplotypů a ve všech případech se opravdu jednalo o „atlantickou“ linii. Tímto byla potvrzena spolehlivost metody PCR-RFLP pro odlišení obou linií.

„Atlantická“ linie zahrnovala haplotypy 1 až 4. Tyto haplotypy nesla převážná část jedinců. Na rozdíl od „dunajských“ haplotypů se haplotypy „atlantické“ vyskytovaly ve všech povodích a dokonce na všech lokalitách, s výjimkou referenční populace z řeky Olt. Na území České republiky a Slovenska byl nejčteněji zastoupen haplotyp 2, který byl nalezen u 119 jedinců. Nevyskytoval se pouze u populace z Tiché Orlice. Druhý nejpočetnější haplotyp, haplotyp 1, zahrnoval 112 jedinců a byl zjištěn ve všech populacích, kromě populace Laka. Tyto dva haplotypy se tedy vyskytovaly ve všech povodích. „Dunajská“ linie zahrnovala haplotypy 5,6 a 7, které se vyskytovaly pouze v populacích z Mlýnského potoka, Bieleho potoka, Celního potoka, Popradu, Kežmarské Biele vody, Muráně a Oltu. Jejich výskyt byl tedy omezen na povodí Dunaje a Visly. Haplotyp 6, nalezený v populaci z Mlýnského potoka, se nevyskytoval v žádné jiné populaci. Tento haplotyp byl velice blízký nejčastějšímu haplotypu dunajské linie, haplotypu 5, který se od něj lišil absencí jednoho štěpného místa enzymu AvaII. V populaci z Oltu se vyskytoval pouze jeden haplotyp, haplotyp 7 („dunajský“ haplotyp). Haplotypová diverzita v této populaci byla nulová, což ovšem mohlo být ovlivněno malým počtem analyzovaných jedinců.

Při porovnání zjištěných četností haplotypů lze konstatovat, že haplotyp 1 se vyskytoval s nejvyšší četností u většiny populací a frekvence haplotypu 2 byla rovněž vysoká v mnoha populacích. Mohlo by to být způsobeno tím, že jsou tyto haplotypy velice početné u generačních ryb na líhních a jsou dále rozšiřovány spolu s násadovým materiálem. Této hypotéze odpovídá i zjištění, že v povodí Dunaje neslo 81,5 % jedinců některý z „atlantických“ haplotypů. Weiss et. al (2001) v Rakousku studovali populace v horních tocích Dunaje a přestože 44 % jedinců neslo „atlantické“ haplotypy, usoudili autoři, že přinejmenším v některých izolovaných populacích nedošlo k úplné erozi genetické struktury, a tak se tu mohou stále vyskytovat původní genotypy. Tato skutečnost nasvědčuje tomu, že v porovnání s Rakouskem docházelo v minulosti a stále dochází v České republice a na Slovensku k ještě intenzivnějším převozům a vysazování ryb. Je zajímavé, že žádný „dunajský“ haplotyp se nevyskytoval v jiném než dunajském povodí nebo na nepřiliš vzdálené lokalitě v povodí Visly, přestože alozymová data a výsledek analýzy LDH-C1 naznačila, že pravděpodobně docházelo k převozům ryb a následné introgresi genotypů „dunajské“ linie do západnějších populací. Mohlo by to být způsobeno tím, že pravděpodobnost vymizení haplotypu mtDNA je vyšší, než změny v jaderné DNA.

Výsledky analýzy genetické variance (AMOVA) prokázaly, že největší část genetické variability je distribuována mezi jedinci v populacích a naopak nejmenší podíl variability byl zjištěn mezi povodími. Tento fakt opět nasvědčuje značné míře promíchání studovaných populací, což potvrdily rovněž studie prováděné na základě mikrosatelitů u populací z České republiky i Slovenska (Kohout, ústní sdělení). Vysoká variabilita uvnitř populací tak není způsobena přirozenou genetickou variabilitou jedinců, ale především intenzivními převozy mezi jednotlivými populacemi, ale také mezi povodími, o čemž svědčí právě velmi nízká variabilita mezi povodími. Nízký počet signifikantních hodnot  $F_{ST}$  na našem území poukazuje na vzájemnou podobnost populací a na jejich nízkou genetickou diferenciaci. Vysoce signifikantní hodnoty dosahovaly dvojice populací z České republiky a Slovenska s populací z Oltu v Rumunsku. Při porovnání s populacemi z České republiky dosahovala signifikantních hodnot vždy. Tato skutečnost dokazuje velkou genetickou vzdálenost těchto populací, která by ovšem mohla být podmíněna také značnou geografickou vzdáleností. U našich populací byly vysoce signifikantní hodnoty zjištěny u populace z Laky ve srovnání s takřka všemi populacemi na našem území.



Ze získaných dat je zřejmé, že intenzivní vysazování a transport pstruha obecného, probíhající již řadu desetiletí, způsobil silné promísení a narušení struktury jednotlivých populací, což by mohlo být jedním z důvodů úbytku pstruha v posledních letech. Přestože mezi studovanými populacemi byly zjištěny pouze malé rozdíly v rámci povodí i mezi nimi, lze konstatovat, že přesto existuje určitá strukturace. Jelikož nelze předpovědět, jak se určitá populace bude v novém prostředí chovat, je nezbytné dodržovat pravidlo předběžné opatrnosti – tedy nepřevážet další materiál mezi geograficky vzdálenými a/nebo hydrologicky izolovanými oblastmi. Pro chov a obnovu populací je proto vhodné používat jako výchozí materiál jedince z pokud možno co nejbližší možné lokality (nebo alespoň povodí), nebo ještě lépe – „zachraňované“ populaci poskytnout na lokalitě takové podmínky, aby se byla schopna sama udržet a dlouhodobě prosperovat. V neposlední řadě je třeba podotknout, že, každá manipulace s populacemi by měla být pečlivě zvážena. Je tedy nejprve nutné seznámit rybářskou veřejnost s negativy spojenými s převozy ryb, neboť bez pochopení těchto souvislostí a bez dobrovolného přičinění by i legislativní normy byly zbytečné.

## 6. Závěr

Území České republiky náleží z hydrologického hlediska do úmoří Severního, Baltského a Černého moře. Rozdílná příslušnost více či méně geograficky izolovaných populací k jednotlivým úmořím se odrazila i v biodiverzitě, což bylo potvrzeno u různých druhů organismů. Tato práce podhaluje genetickou strukturu 19 populací pstruha obecného z území České republiky a Slovenska na základě proměnlivosti úseku mitochondriální DNA (ND5/6) a jaderné DNA (LDH1), s využitím metody PCR-RFLP. Výsledky ukazují, že geografická distribuce jednotlivých skupin haplotypů ani výskyt alel neodpovídá jednotlivým povodím. Byla zjištěna také vysoká úroveň promísení populací, a to jak uvnitř jednotlivých povodí, tak mezi nimi. Počet jedinců s alelou LDH-C\*90 a s některým z „atlantických“ haplotypů mtDNA, které jsou charakteristické pro většinu „domestikovaných“ chovů, byl značný, a to i na lokalitách v dunajském povodí. To svědčí o velkém efektu lidských aktivit spojených s převozem a vysazováním nepůvodních ryb. Tyto výsledky do určité míry souhlasí s výsledky prací založených na proměnlivosti alozymů a mtDNA či mikrosatelitů u populací pstruha obecného v Rakousku, České republice a na Slovensku. Na základě porovnání s výsledky sekvenčních analýz byla potvrzena vhodnost použití metody PCR-RFLP pro základní screening populací (jedinců). Tato metoda by tedy měla být v budoucnu využívána při sestavování managementu pstruha obecného a výsledky by měly poskytovat užitečné informace pro rozvíjení vhodných strategií ochrany pstružích populací. Tento předpoklad je však podmíněný spoluprací rybářských a ochrannářských organizací v oblasti střední Evropy.

## 7. Použitá literatura

Allendorf, F. W., 1991. Ecological and genetic effects of fish introductions: synthesis and recommendation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48: 179 – 181.

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M. et al., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.

Bandelt, H.J., Forster, P., Sykes, B.C., Richards, M.B., 1995. Mitochondrial portraits of human populations. *Genetics* 141:743-753

Baruš, V. et al., 1995: Mihulovci a ryby (1). Academia. Praha.

Bernatchez, L. et al., 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology* 1: 161 – 173.

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, 351-379 USA, 76: 1967 – 1971.

Bernatchez, L. and Osinov, A.G., 1995. Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Molecular Ecology* 4:285-297.

Carvalho, G. R., 1993: Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology* 43: 53 – 73.

Carvalho, G. R., 1995: Molecular genetics in fisheries.

Duftner N., Weiss S., Medgyesy N., Sturmbauer C., 2003. Enhanced phylogeographic information about Austrian brown trout populations derived from complete mitochondrial control region sequences, *Journal of Fish Biology* 62: 427–435.

Elliott, J.M., 1994. Quantitative ecology and the brown trout. Oxford Series in Ecology and Evolution. Oxford University Press, Oxford, Great Britain, 286 pp.

Ferguson, A., Taggart, J.B., Prodöhl, P.A., McMeel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, P. and Hynes, R.A., 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special referenceto *Salmo*. *Journal of Fish Biology* 47 (Supplement A):103-126.

Ferguson, A., Fleming, C. C., 1983. Evolutionary and taxonomic significance of protein variation in the brown trout (*Salmo trutta* L.). In Oxford, G.S. and Rollinson, D. (eds.). Protein Polymorphism: Adaptive and Taxonomic Significance. London Academic Press 24:85-99.

Garcia-Marin, J.L., Jorde, P.E., Ryman, N., Utter, F. and Pla, C., 1991. Management implications of genetic differentiation between native and hatchery populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Aquaculture* 95:235-249.

Giuffra, E., Bernatchez, L., Guyomard, R., 1994. Mitochondrial control region and protein coding genes semence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from Northern Italy. *Molecular Ecology* 3:161-172.

Hamilton, K.E., Ferguson, A., Taggart, J.B., Tomasson, T., Walker, A., Fahy, E., 1989. Postglacial colonization of brown trout, *Salmo trutta* L.: Ldh-5 as a phylogeographical marker locus. *Journal of Fish Biology* 35:651-664.

Hanel, L., Lusk, S., 2005. Ryby a mihule České republiky – rozšíření a ochrana. Český svaz ochránců přírody Vlašim.

Hulák, M., Kašpar, V., Flajšhans, M., Linhart, O., 2006: Využití molekulárních metod a DNA markerů v genetice ryb – přehled. *Bulletin VÚRH Vodňany*: 42 (2).

Kottelat, M., Freyhof, J., 2007: Handbook of European Freshwater Fishes. By authors, 416-417.

Lahnsteiner, F. & Jagsch, A., 2005: Changes in phenotype and genotype of Austrian *Salmo trutta* populations during the last century. *Environmental Biology of Fishes* 74:51–65.

Laikre, L. and Ryman, N., 1996. Effects on intraspecific biodiversity from harvesting and enhancing natural populations. *Ambio* 25:504-509.

Laikre et al., 1999. Conservation genetic management of brown trout (*Salmo trutta*) in Europe. Report by the Concerted action on identification, management and exploitation of genetic resources in the brown trout (*Salmo trutta*) („TROUTCONCERT“; EU FAIR CT97-3882).

Machordom, A., Suárez, J., Almodóvar, A., Bautista, J. M., 2000. Mitochondrial haplotype variation and phylogeography of Iberian brown trout populations. *Molecular Ecology* 9:1325-1338.

McMeel, O. M., Hoey, E. M., Ferguson, A., 2001. Partial nucleotide sequences, and routine typing by polymerase chain reaction–restriction fragment length. *Stránka: 45 Molecular Ecology* 10:29–34.

Moritz, C., 1994 Applications of mitochondrial DNA analysis in the conservation: a critical review. *Molecular Ecology* 3:401-411.

Nielsen, E.E., Hansen, M. M., Loeschcke, V., 1998. Improved primer sequences for the mitochondrial ND1, ND3/4 and ND5/6 segments in salmonid fishes: application to RFLP analysis of Atlantic salmon. *J. Fish Biol.* 53: 216–220.

Osinov, A. and Bernatchez, L., 1996. Atlantic and Danubean phylogenetic groupings of brown trout (*Salmo trutta* L.) complex: genetic divergence, evolution, and conservation. *Journal of Ichthyology* 36:762-786.

Pastrňáková, Š., 2000: Genetické rozdíly mezi populacemi pstruha obecného f. potoční (*Salmo trutta* m. *fario*) v ČR ve vybraných úsecích mtDNA. Diplomová práce.

Peakall, R., Smouse, P., 2007. Appendix 1 – Methods and statistics in GenAIEx6.1.

Randák, T. & Žlábek, V., 2004: Možnosti zvyšování produkce násad původních populací pstruha obecného (*Salmo trutta* m. *fario*) v oblasti Šumavy. *Aktuality šumavského výzkumu* II, 224 – 229.

Řehout a kol., 2005: Genetika II. Jihočeská univerzita, České Budějovice.

Sanford, C. P. J., 1990. The phylogenetic relationships of salmonid fishes. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Zool.* 56: 145–153.

Suárez, J., Bautista, J. M., Almodóvar, A., Machordom, A., 2001. Evolution of mitochondrial control region in Palaearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula, *Heredity* 87: 198–206.

Šlechtová, V., Šlechta, V., Pokorný, J., 2001. Genetická charakterizace pstruha potočního (*Salmo trutta* m. *fario*) v oblasti Šumavy. *Aktuality šumavského výzkumu*, 213 – 217.

Utter, F., Ryman, N., 1993. Genetic markers and mixed stock fisheries. *Fisheries* (Bethesda) 18:11-21.

Weiss, S., Antunes, A., Schlötterer, C., Alexandrino, P., 2000. Mitochondrial haplotype diversity among Portuguese brown trout *Salmo trutta* L. populations: relevance to the post-Pleistocene recolonization of northern Europe. *Molecular Ecology* 9:691-698.

Weiss, S., Schlöttere, C., Waidbacher, H., Jungwirth, M., 2001: Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmo trutta* in tributaries of the Austrian Danube: massive introgression of Atlantic basin fis — by man or nature? *Molecular Ecology* 10:1241–1246.

Vejl, P., 1997. Polymerázová řetězová reakce. Česká zemědělská univerzita, Praha.

Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P., Piálek, J., 2004. Genetické metody v zoologii - učební texty UK. Karolinum. Praha.

## 8. Seznam tabulek a obrázků

**Tab. 1.** Seznam lokalit zahrnutých do studie

**Tab. 2** Složení PCR reakční směsi

**Tab. 3** Sekvence bází použitých primerů

**Tab. 4** Teplotní a časový průběh PCR

**Tab. 5** Složení reakční směsi pro RFLP

**Tab. 6** Inkubační teplota a poznávací místa

**Tab. 7** Počty homozygotních a heterozygotních jedinců a frekvence alel \*100 a \*90 v jednotlivých populacích

**Tab. 8** Matice binárních čísel v závislosti na přítomnosti či absenci štěpného místa

**Tab. 9** Haplotypy sestavené na základě profilů získaných štěpením úseku ND5/6 restrikcími endonukleázami

**Tab. 10** Zastoupení nalezených haplotypů a jejich celkový počet v jednotlivých populacích

**Tab. 11** Relativní četnosti haplotypů v populacích

**Tab. 12** Hodnoty  $F_{ST}$  vyjadřující genetickou vzdálenost jednotlivých populací. Hodnocení, zda mezi dvojicemi populací jsou signifikantní rozdíly, bylo stanoveno při třech různých hladinách významnosti (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  a \*\*\* $p < 0,001$ ), NS označuje nesignifikantní rozdíly mezi dvojicemi populací

**Obr. 1** Mapa lokalit na území České republiky a Slovenska zahrnutých do studie

**Obr. 2** Zastoupení alel LDH-C1\*100 a LDH-C1\*90 v jednotlivých populacích

**Obr. 3** Profily vzniklé digescí jednotlivými enzymy v pořadí AvaII, AluI, HinfI, TaqI, vždy v porovnání se standardem (S)

**Obr. 4** Zastoupení jednotlivých haplotypů mtDNA v testovaných populacích

**Obr. 5** Fylogenetické vztahy mezi haplotypy nalezenými v studovaných populacích (znázorněno pro jednotlivá povodí)

**Obr. 6** Fylogenetické vztahy mezi haplotypy nalezenými v studovaných populacích (znázorněno pro jednotlivé populace)

**Obr. 7** Rozložení genetické proměnlivosti (AMOVA)