

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

Možnosti využití molekulárních metod pro
studium populační genetiky raka říčního
Astacus astacus

Autor: Jakub Šabata

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

Konzultant bakalářské práce: Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D.

Studijní program a obor: Zootechnika, Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 4.

České Budějovice, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum: 6.5.2011

Podpis studenta:

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Pavlu Kozákovi Ph.D. a konzultantovi Ing. Vojtěchovi Kašparovi, Ph.D. za vedení bakalářské práce, odbornou a trpělivou pomoc, cenné rady a podporu při zpracování zadané práce a také Ing. Martinu Hulákovi, Ph.D. za pomoc a rady v laboratoři.

Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru VÚRH JU MSM6007665809 a grantu Mze QH71305.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	CÍL PRÁCE	7
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
3.1	Biologie a morfologie raka říčního	8
3.1.1	Výskyt raka říčního v Evropě a v ČR	8
3.2	Genetické markery	10
3.2.1	Morfologické markery	10
3.2.2	Cytogenetické a chromozómové znaky	10
3.2.3	Polymorfní bílkoviny	11
3.2.4	Molekulární genetické markery	11
3.2.4.1	Mitochondriální DNA	12
3.2.4.2	Mikrosatelity	13
3.3	Molekulární znaky a jejich analýza	16
3.3.1	Izolace DNA	17
3.3.2	Metody elektroforetické	17
3.3.2.1	Základní elektroforetické metody	18
3.3.3	Polymerázová řetězová reakce PCR (Polymerase Chain Reaction)	19
3.3.4	Sekvenování DNA	22
3.4	Mikrosatelitní markery pro raka říčního <i>Astacus astacus</i>	23
3.4.1	Přehled prací zabývajících se mikrosatelitními markery u raků	24
4	MATERIÁL A METODIKA	29
4.2	Odběr tkání a izolace DNA	30
4.3	Ověření izolátu DNA elektroforézou na agarózovém gelu	30
4.4	PCR	31
4.5	Fragmentační analýza, sekvenátor	33
5	VÝSLEDKY	35
6	DISKUZE	37
7	ZÁVĚR	41
8	POUŽITÁ LITERATURA	42
	SEZNAM OBRÁZKŮ	53
	SEZNAM TABULEK	53
	SEZNAM PŘÍLOH	53
9	PŘÍLOHY	54
	ABSTRAKT	56
	ABSTRACT	58

1 ÚVOD

Raci jsou na celém světě významnou součástí vodních ekosystémů. Rak říční (*Astacus astacus*) je jeden ze dvou původních druhů raků žijících u nás (Kozák a kol., 1998) a jeden z pěti původních druhů raků v Evropě (Koiv a kol., 2008a). Na počátku 20. století tento druh téměř vyhynul kvůli zavlečenému račímu moru. Za posledních několik let se zájem o raky zvyšuje z důvodu záchrany a zpětného navrácení do tekoucích vod a jezer jako indikátor kvality vody (Kozák a kol., 1998). V současnosti se rak říční vyskytuje v 39 zemích Evropy a je nejrozšířenějším původním evropským druhem raka v západní a střední Evropě (Holdich a kol., 2006; Kozák a kol., 2008a). I přesto je početnost raka říčního v Evropě výrazně nižší v porovnání s jeho přirozeným výskytem v evropských zemích na konci 19. století (Holdich a kol., 1999; Kozák a kol., 2008a). Pokles výskytu raka říčního zaznamenává organizace IUCN. Na listině „Red List of Threatened Species in Europe“ je uveden jako ohrožený druh vyžadující ochranný management (Baillie a Groombridge, 1996; Koiv a kol., 2008a). V České republice je v současné době označen za kriticky ohrožený druh naší fauny (Policar a Kozák, 2000). Přesto výsledky z posledního detailního monitoringu výskytu raků ukázaly, že rak říční je jedním z nejhojněji zastoupených raků ve vodách ČR (Chobot, 2006; Kozák a kol., 2008a). Na druhé straně je nutno podotknout, že monitorované populace raka říčního v ČR, jsou zbytkového charakteru a z hlediska početnosti jedinců malé bez možnosti dalšího postupu (Kozák a kol., 2007; Kozák a kol., 2008a). Genetický výzkum různých druhů raků, zejména vzácných a ohrožených druhů se v současnosti stal cílem výzkumu mnoha vědeckých pracovišť. Cílem genetických výzkumů je zjistit stupeň variability jak v rámci jednotlivých populací, tak i mezi různými populacemi navzájem (Busack, 1988; Fevolden a Hessen, 1989; Grandjean a Souty-Grosset, 1997; Grandjean a kol., 1997; Fetzner a Crandall, 1999; Krane a kol., 1999; Schulz, 2000; Schulz a kol., 2004, 2006; Alaranta a kol., 2006; Soroka 2008). Nicméně, doposud je velmi malé množství informací o struktuře populací a genetické variabilitě populací raka říčního, zejména kvůli nedostatku informativních molekulárně genetických markerů (Koiv a kol., 2008a).

2 CÍL PRÁCE

1) Vypracovat literární rešerši zaměřenou na využití molekulárních metod pro studium populační genetiky raků, zejména pak u raka říčního (*Astacus astacus*).

2) Na základě přehledu dosud publikovaných prací, jak pro raka říčního, tak pro ostatní druhy raků a koryšů, ověřit použitelnost některých metod a provést zmapování několika populací v rámci regionů výskytu tohoto druhu na území ČR.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

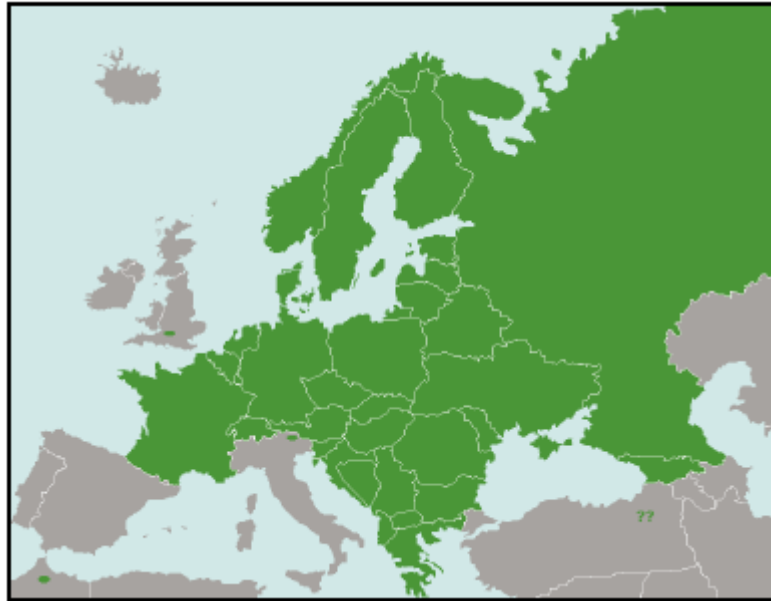
3.1 *Biologie a morfologie raka říčního*

Rak říční má mohutné svalnaté, jen slabě trnité tělo, středně až tmavě hnědého zbarvení. Hlavohrud' (*carapax*) začíná dlouhým, výrazně špičatým čelním trnem (*rostrum*). Povrch hlavohrudi před týlní (*cervikální*) rýhou je vybaven dvěma páry postorbitálních lišt. Zadní část hlavohrudi je širší než delší (tvar čtverce) a na jejím povrchu se vyskytují slabě roztroušené trny. Klepeta jsou široká a velká, na povrchu drsná a stejně barvená jako celé tělo. Na spodní straně jsou klepeta charakteristicky červená až červenooranžová a kůže kloubů je zářivě červená u pohyblivé části klepeta. Pohlavní zralosti dosahuje většinou ve třetím roce života při velikosti okolo 90 mm. Délkou a hmotností může předstihnout všechny ostatní druhy raků v Evropě. Samci mohou dosahovat délky těla bez klepet až 150 mm a hmotnosti 250 g. Rekord pro raka říčního je uváděn 350 g. Samice bývají poněkud menší a na základě menší velikosti klepet i znatelně lehčí než samci. Délka těla 150 mm a hmotnost 200 g je zřejmě maximum. Plodnost raka říčního se pohybuje okolo 70 – 200 vajíček. Ta jsou od října (listopadu) do června zavěšena na panožkách zadečku (*abdomenu*) samice. Raci říční dosahují stáří i více jak 15 let (Kozák a kol., 1998). Jako optimální letní teplota pro vývoj pohlavních orgánů se uvádí rozmezí 16 – 24 °C (Abrahamsson, 1971; Kozák a kol., 2008b).

Proti organickému zatížení prostředí je odolný, avšak citlivě reaguje na chemické znečištění (Skurdal a Taugbøl, 2002; Kozák a kol., 2008b). Obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě by neměl klesnout pod 7 mg.l⁻¹, kritickou hranicí je pro raka říčního obsah kyslíku 3-4 mg.l⁻¹ (Füreder a kol., 2006; Kozák a kol., 2008b). Dá se říci, že rak říční prosperuje v mírně zásaditých vodách (pH 7 – 8,7). Vůči račímu moru je rak říční velmi náchylný a může tak při nákaze dojít k totálním úhynům obsádek (Kozák a kol., 1998).

3.1.1 **Výskyt raka říčního v Evropě a v ČR**

Rak říční je původním evropským druhem raka a vyskytuje se ve 39 evropských zemích. Jeho výskyt hraničí na východě v Rusku, Bělorusku, Ukrajině a Gruzii, na západě ve Francii. Hranice jeho výskytu na jihu jsou v Řecku a Albánii a na severu ve Finsku (Pöckl a kol., 2006; Kozák a kol., 2008b).



Obrázek 1. Rozšíření raka říčního v Evropě (Holdich, 2002)

Rak říční obývá v tekoucích i stojatých vodách plošně celou republiku. Obývá především vodárenské a údolní nádrže, rybníky, menší a střední toky, které jsou méně hospodářsky a rekreačně využívané, nejsou intenzivně hnojeny, rybí obsádka je pestrá a o nižší hustotě. Optimální biotop pro raka říčního se vyznačuje přirozenou okolní vegetací. Toky a rybníky obklopené lesem, loukou, na březích s pásem porostů olší, vrb či keřů, které dané lokality zastíňují a kořeny těchto dřevin zasahují do vody a vytvářejí četné úkryty pro raky (Dyk, 1977; Policar a Kozák, 2000). Velmi vhodné jsou toky či nádrže, které mají pevné písčito kamenité dno a břehy či hráze obložené kameny, sloužící rakům jako úkryty (Troschel, 1997; Policar a Kozák, 2000). Naopak se rak říční vyhýbá vodám se silně bahnitým dnem (Krupauer, 1981; Policar a Kozák, 2000).

V rámci detailního monitoringu výskytu raků v ČR prováděného pod záštitou AOPK ČR bylo zjištěno celkem 681 lokalit s výskytem raka říčního (Chobot, 2006; Kozák a kol., 2008b). I přes poměrně velký počet lokalit, které jsou obsazeny rakem říčním, je zřejmé, že ve většině případů se na těchto lokalitách jedná o zbytkové či z hlediska jedinců početně malé populace raků. Snížení výskytu raků na území ČR v současnosti je patrné při porovnání historických záznamů o výskytu raků (Krupauer, 1968 a 1981; Kozák a kol., 2008b).

3.2 Genetické markery

Markery – znaky jsou základními pomůckami využívanými ke studiu genetické variability uvnitř populací a mezi populacemi. Za genetický znak můžeme považovat ten znak, který je geneticky determinovaný (Hulák, 2008).

Znaky můžeme rozdělit do několika typů a to v závislosti od metodiky, která je detekuje: morfologické znaky, cytogenetické znaky, polymorfní bílkoviny jako znaky a znaky na úrovni DNA – molekulární znaky (Hulák, 2008).

3.2.1 Morfologické markery

Morfologické znaky představovaly první znaky používané pro genetické analýzy. Umožňovali odhalovat pouze malou část genetické variability (Hulák, 2008). Tyto znaky jsou zahrnuty v genetice kvalitativních znaků a patří mezi ně např. geometrická morfologie, která může za pomoci matematické transformace měřených tělesných proporcí získat soubor důležitých dat (Petrtyl a kol., 2007; Flajšhans a kol., 2008). Mezi hlavní rozpoznávací morfologické znaky řadíme: tělo - barva těla, barva těla ze spodu, délka těla bez klepet, hmotnost; klepeta – tvar, povrch, barva ze spodu i z vrchu, barva kloubu klepet, špičky klepet; hlavohruď – povrch, postorbitální lišty, rostrum; zadeček (Kozák a kol., 1998).

3.2.2 Cytogenetické a chromozómové znaky

Cytogenetické a chromozómové znaky můžeme souhrnně označit jako znaky morfologicko genetické. Znaky, které nám souborně poskytují data o morfologii jednotlivých chromozómů resp. o ploidii analyzovaných jedinců a poskytují nám data o genetické informaci (Hulák, 2008). Chromozómy jsou specifické útvary, které se diferencují v buněčném jádru v průběhu jeho dělení a které slouží pro uložení a rovnoměrné rozdělení genetické informace při jaderném dělení. Jsou dobře pozorovatelné na cytologických preparátech po obarvení jadernými barvivy běžnými světelnými mikroskopy. Jsou základními strukturami buněčného jádra, které nesou genetickou informaci, tj. molekulu DNA (Řehout a kol., 2000). Každý živočišný a rostlinný druh, jeho tkáň i každou buňku je možné kromě tzv. chromozomálního počtu charakterizovat i určitým karyotypem, popřípadě idiogramem (Hulák, 2008). Počet chromozómů nalezených u různých druhů raků je velmi variabilní. Přestože počet zkoumaných druhů je stále velmi nízký, množství variací zjištěných mezi jednotlivými

druhy bylo překvapivě poměrně vysoké. V rámci čeledi Astacidae, počtem chromozómů se zdá být nejvíce variabilní, spektrum chromozómového počtu je od 116 až do 376 chromozómů. V rámci čeledi Cambaridae, rozdíly v chromozomálním počtu se zdají být mnohem méně výrazné, v rozmezí 192 až 200 chromozómů (Fetzner a Crandall, 2002).

3.2.3 Polymorfní bílkoviny

Jedná se o enzymy nebo strukturní proteiny, které je možné různými analytickými metodami, nejčastěji elektroforeticky separovat na škrobovém gelu (Brody a kol., 1979; Brody a kol., 1980; Paaver, 1983; Hulák, 2008). K nejpoužívanějším proteinovým markerům řadíme izoenzymy. Jsou to funkčně podobné enzymy (stejná substrátová specifita), ale s rozdílnou strukturou, které jsou často řazené v různých lokusech. Různé alely jednoho enzymu jsou označovány jako aloenzymy neboli alozomy (Brody a kol., 1976; Hulák, 2008). Pro praktickou aplikaci izoenzymů, je nevyhnutelné, aby mezi alelami byl vztah kodominance tzn., aby mohl být rozpoznán heterozygotní genotyp (Hulák, 2008). Mezi významné výhody těchto markerů patří poměrně nízká cena analýz a velká škála dostupných izoenzymů (Paaver, 1983; Kohlmann a Luczynski, 2000; Hulák 2008). Byl to první typ molekulárních dat používaných ke studiu genetické variability u raků. Alozomy jsou velice užitečné při studiu populační struktury a odhadování úrovně toku genů, ale méně použitelné při získávání zpětných fylogenetických vztahů vzhledem k otázkám homologie mezi předpokládanými lokusy (Swofford a kol., 1996; Fetzner a Grandall, 2002). Na základě proteinové elektroforézy se ukázal nízký stupeň variability mezi Evropskými populacemi sladkovodních raků (Busack, 1988; Fevalden a Hessen, 1989; Agerberg, 1990; Fevalden a kol., 1994; Soroka, 2008). Největší nevýhodou těchto biochemických markerů je, že odhalují jen malou část genetické variability v DNA (Hulák, 2008).

3.2.4 Molekulární genetické markery

Postupnou implementací široké škály molekulárních markerů bylo a je možné podrobněji analyzovat rybí populace, studovat různé formy mezidruhové hybridizace, resp. velmi podrobně analyzovat geografické rozšíření a fylogenetický původ rybích populací (Paaver, 1983; Zardoya a Doadrio, 1999; Kohlmann a Luczynski, 2000; Hulák, 2008). V kombinaci s existujícími statistickými nástroji je možné dále využívat

molekulární markery k analýzám heterozygotnosti, efektivní velikosti populací, genetických vzdáleností, případně drastické redukci velikosti populací v její historii apod. (Nei, 1972; Nei a kol., 1975; Hulák, 2008).

Mezi charakteristické vlastnosti těchto genetických markerů patří:

1. tvoří je sekvence bází na specifickém fyzickém místě genomu (lokusu), tyto sekvence jsou mezi jedinci variabilní
2. jsou exaktně testovatelné
3. mohou, ale nemusí být částí genu
4. jsou hodnotitelné na úrovni zárodečného vývoje i zárodečných buněk
5. vysoce informativní, mohou se získat i z velmi malého množství materiálu a také v libovolné fázi ontogenetické vývoje jedince včetně embryí a tělesných pozůstatků (Hulák a kol., 2006).

Rozdělení molekulárně genetických markerů (Hulák a kol., 2006)

I. typ Kódující exprimované geny, nízká hladina polymorfismu, málo použitelné pro studie diverzity rodin a populací či určování identity. Využití mají v komparativním mapování (Hulák a kol., 2006).

II. typ Vysoce variabilní sekvence DNA, především mikrosatelity (STR, SSR) a minisatelity (VNTR). Vyznačují se vysokým polymorfismem, tj. velkým počtem alel. Mikrosatelity jsou krátké repetitivní úseky (2 až 6 bp), které se vyskytují v různých částech genomu (Fetzner a Crandall, 2002). Jsou vysoce informativní v populačních studiích a při určování rodičovství, identity a paternity. Vysoce variabilní sekvence jako mikrosatelity a minisatelity se také využívají pro vazbové mapování genů např. QTL (Hulák a kol., 2006).

III. typ Jednonukleotidové polymorfismy (SNP), jsou bodové polymorfismy (genové mutace) v kódujících částech genů nebo nekódujících částech genomu. Jsou ve srovnání s mikrosatelity v genomu častější (Řehout a kol., 2005). Vyskytují se v genomu přibližně každých 500 – 100 bp (Hulák a kol., 2006).

3.2.4.1 Mitochondriální DNA

Mitochondrie jsou orgány membránového charakteru o velikosti 1 – 2 μm , které jsou stálou strukturou cytoplazmy eukaryotické buňky. Vnitřní membránovou strukturu

mitochondrie dotváří ribozomy a 5 – 10 kruhových molekul DNA (mitochondriálních chromozómů) uložených v bezstrukturní matrix (Řehout a kol., 2000).

Mitochondriální DNA má cirkulární charakter stejně jako DNA prokaryotní (bakterií a sinic). V eukaryotní buňce tak fungují ve vzájemné souhře dva systémy – vlastní eukaryotní a prokaryotní. Neobsahuje žádné introny jako prokaryotní buňka. Také obsahuje dvě skupiny genů. Geny nutné pro vlastní existenci a geny, jejichž genové produkty jsou využívány hostitelskou buňkou. Mitochondriální DNA vykazuje asi 10 krát vyšší frekvenci bodových mutací než jaderná DNA. Důvodem je pravděpodobně nižší přesnost replikace a reparačních mechanismů. Přitom se však jednotlivé sekvence neliší frekvencí mutací. Většina z nich je však neutrálních a tak nedochází k jejich negativní ani pozitivní selekci. Jsou v mtDNA kumulovány. Mitochondriální DNA se jeví jako vhodný, snadno dostupný a poměrně přesný chronometr – mitochondriální hodiny (Řehout a kol., 2000). Analýza mitochondriální DNA je důležitá a informativní pro analýzu genetické diverzity a populační struktury (GrandJean a Souty-Grosset, 2000).

K analýze polymorfismu mitochondriálních genů jsou využívány např. metody PCR – RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism, délky polymorfismu restričních fragmentů po PCR) a přímé sekvenování jednotlivých částí (genů) mitochondriální DNA (Hulák, 2008). Studie na mitochondriální DNA prováděné v posledních desetiletí ukázaly vyšší míru variability mezi evropskými populacemi sladkovodních raků oproti proteinové elektroforéze, a proto jsou úspěšně používány v populačních studiích pro několik taxonů sladkovodních raků (Crandall a kol., 1995; Crandall a Fitzpatrick, 1996; Grandjean a Souty-Grosset, 1997; Souty-Grosset a kol., 1997; Fetzner a Crandall, 1999; Grandjean a kol., 2000; Soroka 2008).

3.2.4.2 Mikrosatelity

Mikrosatelity, neboli jednoduché sekvence s opakováním (SSRs, simple sequence repeats), představují unikátní typ tandemově se opakujících genomových sekvencí, které jsou hojně distribuovány napříč genomy a představují vysoký stupeň polymorfismu alel (Chistiakov a kol., 2005). Polymorfní jsou díky vysoké mutační rychlosti (Litt a Luty, 1989; Weber a May, 1989; Tautz, 1989; Hulák, 2008). Vysoký podíl mutací na mikrosatelitních lokusech vede k velkému počtu alelových variant a tím

pádem k vysokému stupni heterozygotnosti. Znamená to, že se nacházejí v různých variantách v rámci jedné populace (Hulák, 2008).

Např.

Alela A: CACACACA (4 opakování CA sekvence)

Alela B: CACACACACACA (6 opakování CA sekvence)

Existence mikrosatelitů v genomu eukaryot je známa od 70. let 20. století (Bruford a kol., 1996; Chistiakov a kol., 2005). Skládají se z krátkých (1 – 6 bazických párů, bp) tandemových řad (Tautz a Renz, 1984; Tautz, 1989; O'Connell a Wright, 1997). SSRs mají typický rozsah mezi dvaceti až několika stovkami bází (Beckman a Weber, 1992; Chistiakov a kol., 2005). V genomu obratlovců je nejčastější dinukleotidový motiv (AC)_n (Toth a kol., 2000; Chistiakov a kol., 2005). I když se mikrosatelity vyskytují v genomu nejrůznějších organismů ve velkém množství, přesto je jejich biologická funkce stále nejasná (Fornůsková, 2007). V některých organismech počet detekovaných alel na jednom lokusu překročil 40 a mohou tak dosáhnout vysoké heterozygotnosti 0,8 až 0,9. Mikrosatelity se velmi osvědčily při studiích populací (Wright a Bentzen, 1994; Xu a kol., 1999; Fetzner a Crandall, 2002). Mikrosatelity jsou kodominantní markery, o relativně malé velikosti, které mohou být snadno amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí. V rybářství a akvakultuře jsou využívány pro charakterizaci genetických rodů, selekci generačních ryb, mapování ekonomicky důležitých kvantitativních znaků a identifikaci genů odpovědných za tyto znaky a aplikaci markery-asistované selekci (Chistiakov a kol., 2005).

Struktura SSRs

Mikrosatelity se mohou dělit na různé typy podle opakující se sekvence na dokonalé, nedokonalé, přerušené nebo složené (Oliviera a kol., 2006). Dokonalé (perfect) obsahují jenom jeden motiv bez přerušení ...CACACACACACACA.... U nedokonalých (imperfect) mikrosatelitů je repetice přerušena jednou jinou bází ...CTCTCTGTCTCT.... Přerušené (interrupted) mikrosatelity, ve kterých se nachází inserce malého počtu bází, které nenásledují strukturu repetice ...CACACATTCACACATTCACACA.... Složené (compound) mikrosatelity skládají se ze dvou a více přiléhajících mikrosatelitů s odlišným typem repetice CACACATGTGTG (Goldstein a Schlötterer, 1999).

Podle délky repetice se mikrosatelity dělí na dinukleotidové (např. CACACACA), trinukleotidové (např. ATGATGATGATG), tetranukleotidové (např. CATGCATGCATGCATG), atd. U trinukleotidových mikrosatelitů jsou nejčastější sekvence (AAT)_n a (CAG)_n (Stallings, 1994; Hancock, 1995; Fornůsková, 2007). U tetranukleotidových mikrosatelitů se nejvíce vyskytují sekvence (GATA)_n a (GACA)_n (Jarne a Lagoda, 1996).

Distribuce v genomu

Mikrosatelity jsou všudypřítomné u prokaryotních a eukaryotních, současně i v nejmenších bakteriálních genomech (Gur-Arie a kol., 2000; Chistiakov a kol., 2005). Nejvíce se vyskytují v nekódujících oblastech (telomery, subtelomery, heterochromatin u centromer) (Metzgar a kol., 2000). V kódujících oblastech obratlovců se nachází pouze 9 – 15% mikrosatelitů (Moran, 1993; Jurka a Pethiyagoda, 1995; Van Lith a Van Zutphen, 1996; Fornůsková, 2007). Tato nízká frekvence mikrosatelitů v kódujících oblastech může být vysvětlena negativní selekcí posunových mutací při translaci (Metzgar a kol., 2000; Li a kol., 2004; Chistiakov a kol., 2005).

Dinukleotidové a tetranukleotidové motivy jsou většinou shromážděny v nekódujících oblastech. U obratlovců jsou distribuovány 42 krát a 30 krát méně často v exonech než v intronech a mezigenových oblastech (Toth a kol., 2000; Chistiakov a kol., 2005). Trinukleotidové repetice a hexanukleotidové repetice se vyskytují také v exonech, kde neporušují čtecí rámec (Toth a kol., 2000).

Aplikace mikrosatelitů

Mikrosatelity dosahují velmi vysokého stupně heterozygotnosti, uvádí se někdy až 90% (Baker a kol., 1999; Starcová, 2009). Proto jsou vhodné k použití v analýzách, kde je potřebné rozlišit jedince individuálně (Starcová, 2009).

Jednotlivé alely se snadno a rychle detekují metodou PCR použitím dvou oligonukleotidových primerů, které ohraničují mikrosatelitní lokus (Fornůsková, 2007). Izolace mikrosatelitních markerů pro nové organismy může být často obtížná, časově náročná a také finančně náročná. Nicméně, ve chvíli kdy jsou publikovány sekvence primerů pro PCR amplifikaci, využití mikrosatelitních markerů je dostupné pro široké spektrum aplikací a finanční náročnost analýz není v dnešní době vysoká. Schopnost amplifikovat mikrosatelitní lokusy, které byly v minulosti popsány pro blízce příbuzné

druhy (využití primerů popsaný pro více či méně příbuzný druh cross-priming) může pomoci zredukovat s tím spojené náklady (Fetzner a Crandall, 2002).

3.3 Molekulární znaky a jejich analýza

V posledních čtyřiceti letech nám oblasti molekulární genetiky výrazně pomohly porozumět mnoha sférám biologie včetně: systematiky, populační genetiky a biologie ochrany přírody. Studium genetické variability uvnitř a mezi jednotlivci, populacemi a druhy můžeme získat rozhodující informace o konkrétním organismu, nebo skupině organismů, které by nemohly být získány klasickými postupy (Fetzner a Crandall, 2002). V 60. a 70. letech 20. stol. byla pro studium jednotlivých druhů a populací používána analýza polymorfismu krevních skupin. Tu postupem času nahradila elektroforetická analýza alozymových markerů (Grant, 1980; Hulák, 2008). Analýza alozymových markerů se tak stala účinným nástrojem studia struktury a variability genetiky vzdálenějších populací (Davis a kol., 1999; Kohlmann a kol., 1999; Murakaeva a kol., 2003; Hulák, 2008). Dodnes je velmi frekventovaně používaná, někdy jako jediná metoda a to často v kombinaci s metodami molekulární biologie, např. s analýzou mtDNA, RFLP, RAPD nebo s analýzou vybraných nukleových markerů (Hulák, 2008). Další pokrok v molekulární genetice přinesla metoda sekvenování DNA schopná určit skutečný bazický pár sekvence genetického kódu (Maxam a Gilbert, 1977; Sanger a kol., 1977; Fetzner a Crandall, 2002).

Poslední dvě dekády 20. století přinesly mnoho technických a metodologických pokroků, které znamenaly průlom v molekulárně-genetických analýzách. Širokého uplatnění se tyto techniky dočkaly až po objevení PCR metody (1985 – 1988). Automatizace mnohých technologických postupů (syntéza požadovaných úseků DNA, analýza nukleotidových a proteinových sekvencí) umožnila aplikaci molekulárních metod v masovém měřítku (Hulák, 2008).

V posledním desetiletí bylo zaznamenáno rostoucí využití satelitní DNA při zkoumání genetické variability a divergence. Většina současných výzkumů se zaměřuje na jednu kategorii satelitní DNA a to mikrosatelity. Velký zájem o mikrosatelity je z důvodu jejich vysokého stupně variability, kterou lze zkoumat pomocí PCR (O'Connell a Wright, 1997).

3.3.1 Izolace DNA

Metod izolace DNA je ohromné množství a liší se podle toho, jaký typ DNA má být izolován (genomová DNA, plazmidová, virová, atd.), podle stupně požadované čistoty a kvality a i podle zdroje DNA (bakteriální, rostlinné či živočišné buňky, zaschlé kapky krve, muzejní preparáty) (Žurovec a kol., 1999).

Prvním krokem izolace nukleových kyselin je získání suspenze jednotlivých buněk. Suspenze buněk vzniká narušením buněčné stěny (fyzikálně, enzymaticky) a následným uvolněním roztoku s obsahem buněk. Po uvolnění buněčného obsahu je nevyhnutelné odstranit maximum nežádoucích komponentů vhodnými purifikačními metodami (vázání kationů kovů chelačními činidly, enzymatická degradace bílkovin proteinázou) z důvodů získání co nejčistší DNA (Hulák, 2008).

Pro izolaci různých typů DNA z nejrůznějších zdrojů existuje značné množství komerčních kitů. Výhodou těchto kitů je jednoduchost a rychlost provedení (Žurovec a kol., 1999). U izolované DNA je účelné ověřovat její čistotu (např. fotometricky v UV oblasti, spektroskopicky, fluorimetricky) a provádět kvantifikaci (stanovit množství izolované nukleové kyseliny) (Ipser, 2006). Izolovaná nukleová kyselina může být uchována buď v zředěné formě, resp. ve formě koncentrovaných zásobních roztoků. A to krátkodobě při 0 – 4°C, resp. dlouhodobě při -20 až -80°C (Hulák, 2008).

3.3.2 Metody elektroforetické

Separace nukleových kyselin (DNA)

Při elektroforetické separaci nukleových kyselin je využíváno záporného náboje fosfátové kostry nukleových kyselin (Hulák, 2008). Rychlost pohybu molekul DNA je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti, dále ji ovlivňuje koncentrace nanášeného gelu, konformace DNA, směr elektrického pole, aplikované elektrické napětí, složení bází, přítomná interkalační barviva a složení elektroforetických pufrů. Kladně nabitě molekuly migrují k záporné elektrodě a záporně nabitě molekuly migrují ke kladné elektrodě. Gelová elektroforéza separuje molekuly nukleových kyselin podle jejich molekulové hmotnosti (Clark, 2005) a velikosti náboje (Sambrook a kol., 1989; Hulák, 2008). K vizualizaci fragmentů DNA jsou využívána barviva, nejčastěji ethidium bromid u agarosy a stříbrné barvivo u polyakrylamidu, které jsou po přidání do gelu

vázány na DNA a vzniklé fragmenty je následně možné vizualizovat v UV světle pomocí transiluminátoru (Hulák, 2008).

3.3.2.1 Základní elektroforetické metody

Elektroforetické metody se mohou rozdělovat podle několika kritérií, např. podle charakteru použitého nosného média nebo podle orientace a tvaru tohoto média. Rozlišována je například elektroforéza horizontální, vertikální, kapilárová, nebo podle charakteru nosného média, elektroforézu na škrobovém, polyakrylamidovém, agarosovém a acetylcelulóзовém gelu (Hulák, 2008).

AGE – Agarose Gel Electrophoresis (elektroforéza na agarosovém gelu)

Nejvíce DNA je separováno používáním elektroforézy na agarosovém gelu. Agarosa je polysacharid extrahován z mořských řas (Clark, 2005). Agarosové gely jsou připravovány podobně jako škrobové gely – zahřátá směs agarosy a pufru se nalije do formy a nechá se ztuhnout. Koncentrace agarosy bývá většinou 1 – 2 %, ve specifických případech může být použita i koncentrace 2 – 3x vyšší. Do formy je vnořen hřeben, který se po ztuhnutí gelu odstraní, přičemž se vytvoří jamky, do kterých jsou pipetovány vzorky (Hulák, 2008). Optimální velikost separovaných molekul na agarózovém gelu je 100 – 50000bp.



Obrázek 2 Elektroforéza

PAGE – Polyakrylamid Gel Electrophoresis (Polyakrylamidová gelová elektroforéza)

Kratší fragmenty DNA tak jako proteiny jsou často separovány na gelu z polyakrylamidu (Clark, 2005). Je to druhá nejčastější elektroforetická metoda v molekulární biologii. Polyakrylamidové gely vznikají katalytickou polymerací dvou monomerů, akrylamidu a N, N'-metylen bisakrylamidu (bis). Gel je tvořen dlouhými vlákny polymerizovaného akrylamidu, navzájem spojenými vlákny bisakrylamidu. Jedná se o vertikální elektroforézu, při které směs akrylamidu a bisakrylamidu je polymerizována v pufru (TAE) pomocí volných radikálů poskytovaných persulfátem amonným (APS), kterým je způsobováno homolytické štěpení vazeb O-O. K urychlení polymerizace je používána volná zásada TEMED (tetrametylendiamin), kterou je katalyzována tvorba volných radikálů persulfátu amonného. Polymerizace není uskutečňována při nízkém pH nebo při přítomnosti kyslíku. Použití koncentrace akrylamidu je rozlišováno podle velikosti separovaných částí fragmentů DNA od 3,5 % (fragmenty 1 – 2 kb) až po 20% gely pro separování malých fragmentů 10 – 100bp (Hulák, 2008). Tato metoda se dá využít ke genotypizaci mikrosatelitů, pokud není k dispozici sekvenátor (Řehout a kol., 2005)

3.3.3 Polymerázová řetězová reakce PCR (Polymerase Chain Reaction)

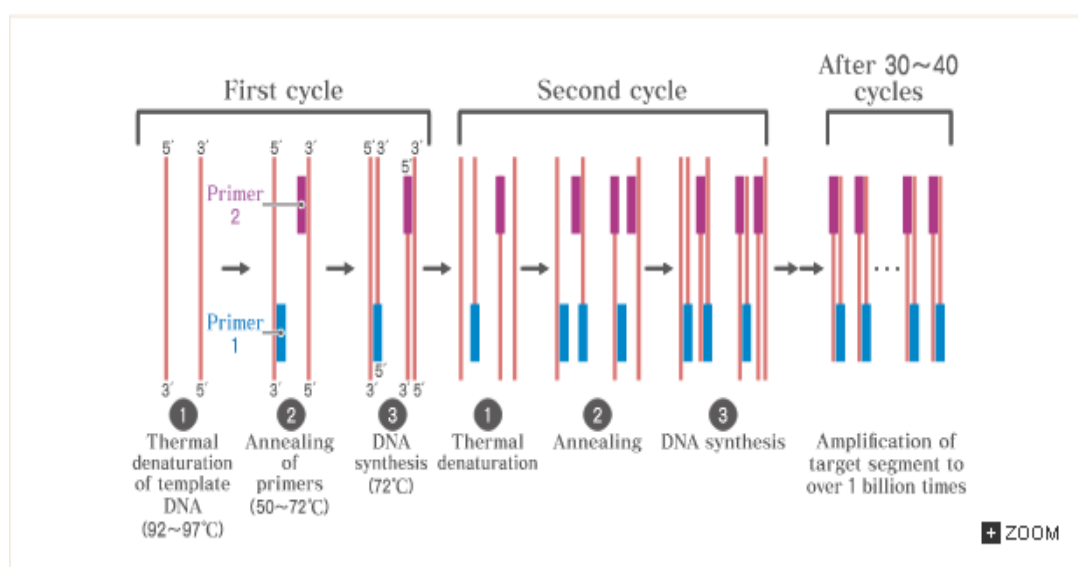
Objev PCR koncem 80. let 20. stol. znamenal obrovskou revoluci v oblasti molekulární biologie. Metoda byla objevena Kary B. Muliisem v dubnu 1983. Za svůj objev obdržel Nobelovu cenu za chemii v roce 1993 (Žurovec a kol, 1999).

PCR je metoda, která umožňuje selektivně namnožit (amplifikovat) požadovaný úsek DNA *in vitro*. Tato metoda je založená na mnohonásobné amplifikaci templátové molekuly DNA. Toho je dosaženo cyklickým opakováním třech kroků: denaturace templátu, hybridizace se syntetizovanými oligonukleotidy (primery) a prodlužováním primerů termostabilní DNA polymerázou (Hulák, 2008).

Základní princip PCR

Požadovaný úsek, který má být amplifikován, se vymezí pomocí dvou primerů. Primery jsou komplementární k sekvencím, které se nacházejí na okraji množeného úseku a leží na opačných vláknech DNA, tak že jsou orientovány svými 3'- konci

k sobě. První primer (forward primer) se váže na jedno vlákno a druhý (revers primer) je navázán na druhé komplementární vlákno denaturované DNA. Následně termostabilní DNA polymeráza prodlužuje syntetizované vlákno DNA. V jednom cyklu PCR se tak počet molekul zdvojnásobí (Innis a kol., 1988; Hulák, 2008). Prostřednictvím PCR lze tak namnožit fragmenty DNA na požadované množství volbou počtu cyklů (n). Počet amplifikovaných fragmentů je tak teoreticky roven 2^n , zvyšuje se exponenciálně s počtem cyklů (Ipser, 2006). Po 30 – 40 cyklech je možné dosáhnout amplifikace $10^5 - 10^6$. Zpočátku docházelo při tepelné denaturaci DNA také k denaturaci DNA polymerázy, proto bylo nevyhnutelné při každém cyklu tento enzym znovu dodávat. Významnou inovací bylo zavedení polymerázy z gram-negativní bakterie *Thermus aquaticus*, která je stabilní pro vysoké teploty, tzv. *Taq* polymerázy (Innis a kol., 1988; Hulák, 2008).



Obrázek 3. Schéma PCR (http://csls-text.c.u-tokyo.ac.jp/active/02_04.html)

Primery

Primery jsou syntetické jednovláknové oligonukleotidy o průměrné délce 17 – 30 bází (Hulák, 2008). Jsou komerčně snadno dostupné a mohou být syntetizovány během několika málo dní. Délka primerů je velmi důležitá. Primery by měly být dostatečně dlouhé, aby byly schopné stabilní hybridizace s cílovou sekvencí za optimální teploty pro připojení primerů. Tuto teplotu je nutné stanovit vždy pro příslušný pár primerů a daný PCR cycler. Jako vodítko poslouží teoretické určení T_m – melting temperature (teplota tání primerů), což je teplota, při které je 50 % molekuly DNA ve stavu

dvoušroubovice. T_m roste se zvyšujícím se obsahem G a C a zpravidla se pohybuje v rozsahu 55°C – 75°C. Důvodem, proč je nutné, aby byl primer dostatečně dlouhý je, že musí mít svou cílovou sekvenci přísně specifickou (Řehout a kol., 2005).

RT-PCR (Reverzně-Transkripční) a kvantitativní (q)PCR

RT-PCR představuje modifikaci PCR, při které je jako templát využívána RNA. V prvním kroku je RNA zpětně přepsaná enzymem reverzní transkriptáza do DNA. Ta je následně množena pomocí klasické PCR.

Nejčastěji se využívá ve spojení s *Real-Time* PCR k velmi přesné detekci a kvantifikaci konkrétní mRNA v různých tkáních a kvantifikacích genové exprese. *Real-Time* PCR vyžaduje použití speciálního cykleru, který dokáže změřit množství fluorescenčně značených sond navázaných na fragmenty DNA, které vznikají při amplifikačních cyklech (Hulák, 2008).

RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA)

Tato metoda je založena na PCR, ve které jsou neznámé úseky genomové DNA amplifikovány použitím primerů o 10bp, jež obsahují náhodné sekvence (Williams a kol., 1990; Fetzner a Crandall, 2002). Do reakční směsi pro PCR se přidává pouze jeden primer, který má mnoho komplementárních míst na různých částech genomu, z důvodu jeho malé délky. Tzn., že vznikne s velkou pravděpodobností směs fragmentů o různé délce, které je možné elektroforeticky analyzovat (Hulák, 2008). Výhodami RAPD je univerzálnost, nízká cena a poměrně jednoduché technické vybavení. Nevýhodami jsou: citlivost na nepatrné kontaminace a dominance, resp. recesivita fragmentů, což v konečné fázi znemožňuje rozlišit heterozygoty od dominantních homozygotů (Hulák, 2008).

RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

Variabilita velikosti restrikčních fragmentů, podléhajících v populaci mendelovské segregaci, se všeobecně označuje jako polymorfismus délky restrikčních fragmentů, zkráceně RFLP (Hulák, 2008). V PCR reakci je amplifikován polymorfní lokus DNA, amplifikát je poté štěpen restriktázou, která rozeznává svojí cílovou sekvenci (Řehout a kol., 2005). Existují doslova stovky těchto restrikčních enzymů dostupných od biotechnologických společností. Jednou vyrobené výsledné fragmenty jsou separovány na gelu páskovanými vzory zaznamenány a uloženy (Fetzner a Crandall, 2002).

Metoda RFLP se skládá ze dvou základních kroků. První je aplikace konkrétního úseku DNA pomocí primerů. Často jsou používány primery komplementární k začátkům a koncům kódujících genů okolo nekódujících intergenických oblastí. Druhým krokem je restrikce (nastříhání) – jedná se o nastříhání namnoženého úseku pomocí enzymů restrikčních endonukleáz, které specificky štěpí DNA.

Počet restrikčních míst na analyzované DNA je závislý na její velikosti, sekvenci a délce rozpoznávací sekvence. Kratší sekvence se vyskytují častěji než delší.

RFLP je využívána především na fylogenezi taxonů a je základem mnohých fylogenetických studií a ověřování mikrotaxonomického členění druhů (Hulák, 2008).

AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

Tato metoda používá PCR v kombinaci se štěpením produktů restrikčními enzymy. Narozdíl od RAPD, vzniká vysokou mírou opakovatelnosti. Nevýhodou je však vyšší cena a technická náročnost. Výhodou je schopnost rychle vygenerovat velké množství polymorfních markerů a to i u druhů, od kterých nemáme žádnou předchozí genetickou informaci (Hulák, 2008).

V prvním kroku je DNA štěpena dvěma restrikčními enzymy. Rozpoznávací místo jednoho z nich je krátké, naopak druhá restriktaza vyhledává delší sekvenci a štěpí méně často. Tímto způsobem je zaručeno, že vznikne dostatek fragmentů, které budou na jednom konci odstříhnuty jiným enzymem než na druhém konci (Hulák, 2008). Ve stejném kroku jsou na konce fragmentů enzymem ligázou připojeny krátké nástavce – adaptory. Jsou to krátké úseky DNA o známé sekvenci, které se vážou na konce fragmentů vytvořených příslušnou restrikční endonukleázou, od ní se odvozuje její název (např. *MseI* adapter). Restrikční štěpení a připojení adaptorů probíhá současně. Navázáním adaptorů se získají fragmenty, které mají na obou koncích známé sekvence. Ty se následně mohou amplifikovat pomocí PCR (Hulák, 2008).

3.3.4 Sekvenování DNA

Při sekvenování molekul DNA (nebo jejich fragmentů) se stanovuje pořadí jednotlivých nukleotidů v polydeoxyribonukleových řetězcích, tj. primární struktura. Dnešní automatizované systémy sekvenování vycházejí ze dvou základních metod: Sangerova nebo Maxam Gilbertova (Ipser, 2006). Shodou okolností byly nezávisle publikované ve stejném roce, 1977 (Hulák, 2008).

MAXAM-GILBERTOVA (chemická) metoda sekvenování

Je založena na specifické chemické degradaci řetězce DNA, který byl na konci označen. Jedno vlákno je ve čtyřech variantách vystaveno chemickému činidlu. To narušuje vazby u určitého nukleotidu (Ipser, 2006). Po uskutečnění reakce jsou produkty rozděleny v sekvenačním gelu s rozlišovací schopností jedné báze (Hulák, 2008) a sekvence nukleotidů analyzovaného řetězce DNA jsou odečteny na vizualizovaném elektroforetogramu (Ipser, 2006).

SANGEROVA enzymatická metoda

Založena na modifikované polymerázové reakci. Jsou čtyři reakční směsi; ve všech je obsažena ssDNA (denaturovaná dsDNA) s funkcí matrice, DNA polymeráza bez nukleázové aktivity, primery, směs dNTP a jeden – ovšem v každé směsi jiný – 2',3'-dideoxyrybonukleotidtrifosfát (ddNTP). Protože v molekule ddNTP je v poloze C3' místo skupiny OH atom vodíku, nemůže mezi 3'-koncem ddNTP a 5'-koncem následujícího dNTP vzniknout fosfodiesterová vazba a syntéza řetězce se vždy ukončí v místě inkorporace ddNTP. V důsledku toho se nasyntetizuje určité spektrum různě dlouhých komplementárních řetězců, zakončených na 3'-konci vždy tím ddNTP, který byl v dané variantě reakční směsi použit (Ipser, 2006).

Produkty polymerázové reakce jsou poté rozděleny elektroforeticky v sekvenačním gelu (tj. v polyakrylamidovém gelu s rozlišovací dělicí schopností jedné báze a obsahujícím močovinu jako denaturační činidlo). Sekvence nukleotidu v analyzované DNA je stanovena analýzou vizualizovaných elektroforetogramů: sekvence, přečtená ve směru od čela ke startu, je sekvencí 5' → 3' komplementární k matričnímu řetězci (Ipser, 2006).

Dalším pokrokem v sekvenování DNA bylo zavedení automatických sekvenátorů, které znamenaly podstatné zjednodušení a časovou úsporu analýz a tím i rozšíření možností experimentálních prací a analyzovaných sekvencí DNA (Hulák, 2008).

3.4 Mikrosatelitní markery pro raka říčního *Astacus astacus*

Alozymní markery selhaly v odhalování populační struktury kvůli nízkému stupni variací a malému počtu polymorfních lokusů (Agerberg, 1990; Felvoden, 1994; Koiv a kol., 2008a). Proto jsou nutné vysoce polymorfní mikrosatelity jako efektivní analytické nástroje. První mikrosatelity byly charakterizovány ze vzorků 172 dospělých jedinců

raka říčního. Pocházely ze sedmi různých populací z Estonska, Švédska, Norska a Finska. Vzorky byly z přírodních populací s výjimkou dvou švédských, které pocházely z račí farmy. Genomová DNA byla izolovaná ze svalové tkáně. Délka alel byla stanovena ALF express II DNA analyzárem. Z 30 mikrosatelitních lokusů bylo pouze 8 polymorfních (se 2 – 10 alelami). Ve studovaných populacích se počet alel na lokus pohyboval od jedné do sedmi a sledovaná heterozygotnost (H_o) byla od 0 do 0,80, zatímco očekávaná heterozygotnost (H_e) se pohybovala od 0 do 0,72 (Koiv a kol., 2008a).

Tabulka 1. 8 izolovaných mikrosatelitních lokusů a jejich primerové sekvence (Koiv a kol., 2008)

Locus		Primer sequence 5'-3'	Repeat motif ^a	No. of alleles	Size range	GeneBank accession no.
Aas3666	Forward	M13-TTTTGCATCGTCAGCGAACAT	(GT) ₂₇	3	245–253 ^b	EU313796
	Reverse	TCTCAGCGACAAGGTACTGGAAGC				
Aas3040	Forward	M13-GTTGTGTGGTAACTCCTGACGA	(TA) ₂₀	3	255–259 ^b	EU313794
	Reverse	CAATCGTATCCCACATGCAG				
Aas3115	Forward	Cy5-GACTGTGCCCTGCGGTACAGTG	(GT) ₂₀	4	173–191	EU313795
	Reverse	GGGCTCCATCATCACACGTGGCAA				
Aas2489	Forward	M13-AGGTGAGTCAAATATGTG	(CA) ₁₃	2	243–245 ^b	EU313797
	Reverse	TTCCTTCCCGATATACCA				
Aas790	Forward	M13-CAAGTTCCTAAATGCCGTTCTT	(GT) ₁₅	2	145–149 ^b	EU313798
	Reverse	GGTGAGTACACACAGCCAAA				
Aas1198	Forward	M13-CGTTTATTTCTTCCCTTCA	(CT) ₂₄	4	193–201 ^b	EU313799
	Reverse	TGCATTGAGGTGGTGTCACT				
Aas3950	Forward	Cy5-ATCTAAGTCGTTCTCTGAAGACC	(CT) ₄₂	10	164–190	EU313800
	Reverse	TACTGGTGATTGTGGGTGGTACG				
Aas766	Forward	M13-CGTACTGCCTCTCTGCCACT	(GT) ₂₉	7	225–305 ^b	EU352853
	Reverse	AACACACTCCACACCATTCC				

^a Longest uninterrupted repeat

^b Size including a 19 bp M13 tail

Locus: mikrosatelitní lokus; Primer sequence 5'-3': sekvence primerů připojených na vlákno DNA od 5' konce ke 3'konci; Repeat motif: opakující se motiv dinukleotidových bází ; No. of alleles: počet alel na lokus; Size range: rozpětí délky alel;

3.4.1 Přehled prací zabývajících se mikrosatelitními markery u raků

Baker a kol. (2000) izolovali sedm mikrosatelitních markerů u raka modrého (*Cherax quadricarinatus*), z Austrálie, u kterého zjistili vyšší úroveň genetické variability, než dříve popsanou pomocí allozymů (Macaranas a kol., 1995). Fetzner a Crandall (2002) zkoumali možnost cross-priming amplifikace a využití markerů popsaných pro druh rodu *Cherax* (*C. eststructor*) a zjistili, že dva lokusy u tohoto druhu byly polymorfní. Pozorované stupně heterozygotnosti (H_o) se pohybovaly v rozmezí od 0,261 do 0,650 (průměr = 0,443), což jsou zřetelně vyšší než stupně zjištěné

alozymovými lokusy. Počet alel zjištěných na lokus byl také poměrně vysoký a pohyboval se od 10 do 22 (průměr = 14,4).

Belfiore a May (2000) izolovali a popsali 23 mikrosatelitních lokusů u raka červeného *Procambarus clarkii*. Jejich lokusy zahrnují dinukleotidové a tetranukleotidové repetice. Heterozygotnost (*Ho*) se pohybovala od 0,43 do 0,91, i když velikosti vzorku byly poměrně malé, což může tyto odhady zkreslovat. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 26 (průměr = 8,6) (Fetzner a Crandall, 2002).

Gouin a kol. (2000) popsali 6 mikrosatelitů izolovaných u druhu *Austropotamobius pallipes*. Počet alel zjištěných na těchto lokusech se pohyboval od 3 do 12 a pozorovaná heterozygotnost (*Ho*) se pohybovala od 0,0 do 0,72 u zkoumaných druhů rodu *Austropotamobius*. Dále zkoumali možnost amplifikovat tyto lokusy u dalších desetinochých korýšů (Decapoda). Ačkoliv ne všechny tyto lokusy fungovaly, alespoň pro každý druh fungoval jeden lokus (s výjimkou *Nephrops norvegicus*, kde nedošlo k žádné amplifikaci). Je zřejmé, že tyto lokusy mohou být použitelné u mnoha různých druhů a je ještě potřeba provádět testování v širokém měřítku.

Walker a kol. (2002) použili mikrosatelitní markery u druhu *Orconectes placidus* k určování rodičovství. Více než 900 kusů juvenilních jedinců z 15 lokalit bylo analyzováno za účelem určení rodičovství. Ukázalo se, že všechny samice byly matkami všech juvenilních jedinců nošených samicemi a většina samic se pářila dvakrát či vícekrát, přičemž navylíhnutá vajíčka stejně jako vylíhnutí potomci jednotlivých samců byli náhodně rozmístěni.

Genetickou strukturu populace raka *Austropotamobius pallipes* s pomocí pěti mikrosatelitních markerů studovali Gouin a kol. (2002), kteří studovali šest lokalit výskytu v rámci jednoho toku. Zjištěná úroveň genetické variability byla relativně vysoká a průměrná heterozygotnost v rámci těchto šesti lokusů činila 0,394 v rámci těchto šesti lokalit. Rozdíly v genetické struktuře mezi jednotlivými lokalitami nebyly zaznamenány.

Genetickou strukturu druhu *Austropotamobius pallipes* v rámci populací v italské i rakouské části Tyrolska studovali Baric a kol. (2005) na základě mitochondriální DNA a čtyřech mikrosatelitních markerů. Pomocí sekvencí mitochondriální DNA byla zjištěna extrémně nízká úroveň diference mezi populacemi i variability v rámci populací jižního Tyrolska. Mikrosatelitní data naproti tomu ukázala určitou strukturu

populací, ale také střední úroveň variability v rámci čtyřech ze šesti studovaných populací z jižního Tyrolska, přičemž další dvě populace byly víceméně uniformní a stejně jako populace z Rakouska vykazovaly fixaci alel v rámci tří lokusů.

Populační strukturu raka *Austropotamobius pallipes* v rámci 44 populací z Francie studovali Gouin a kol. (2006). Pět mikrosatelitních lokusů bylo genotypováno u celkem 44 populací pocházejících z různých částí Francie. Pozorovaná heterozygotnost se pohybovala od 0,000 po 0,564 a v rámci sledovaných populací bylo možné na základě odlišných frekvencí alel a také jejich délek odlišit dvě skupiny odpovídající populacím ze severní a jižní části země. Předpokládá se, že toto rozdělení vzniklo během poslední doby ledové v Pleistocenu. Na základě těchto dat byly navrženy dva různé celky pro strategie managementu populací tohoto druhu raka.

Partenogentický způsob rozmnožování raka označovaného jako „Marble crayfish“ nebo také „Marmorkrebs“ potvrdil pomocí mikrosatelitních markerů Martin a kol. (2007). Tento rak je rozšířen mezi akvaristy a předpokládá se, že jde o asexuálně se rozmnožující formu druhu *Procambarus fallax*. 19 jedinců tohoto raka z různých generací a jejich potomstvo bylo genotypováno v šesti mikrosatelitních lokusech. Všichni sledovaní jedinci byli identičtí ve složení alel, polovina všech sledovaných jedinců byla heterozygotní.

Koiv a kol. (2008a) izolovali prvních 8 mikrosatelitních markerů pro raka říčního *Astacus astacus*. Polymorfismus byl testován na 172 jedincích ze sedmi populací ze severní Evropy. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 10 (průměrně 4,4) a pozorovaná heterozygotnost jednotlivých mikrosatelitních lokusů se pohybovala od 0,000 do 0,800, heterozygotnost očekávaná se pak pohybovala od 0,000 do 0,720. Stejný kolektiv Koiv a kol. (2008b) publikoval dalších 11 nově izolovaných mikrosatelitních markerů pro raka říčního *Astacus astacus* v témže roce. Z celkem 35 mikrosatelitních lokusů na testovacím panelu složeném z 38 jedinců ze dvou populací. První z populací byla přírodní populace z Lake Aher, Estonsko a druhá pocházela z uzavřeného chovu ve Wielenbachu, Německo. Počet alel na lokus se pohyboval od jedné do sedmi a pozorovaná heterozygotnost pak od 0,000 do 0,737 zatímco heterozygotnost očekávaná byla v rozmezí od 0,000 do 0,757. Odchovávaná populace vykazovala v průměru mnohem vyšší polymorfismus než přírodní populace, což je v rozporu s teoretickými předpoklady (očekává se, že genetická diverzita klesá u

odchovávaných populací, důvodem je „founder effect“ a malá efektivní velikost populace).

Hulák a kol. (2010) testovali cross-priming amplifikaci lokusů raka signálního od dalších 5 druhů raků. Variabilitu 10 úspěšně amplifikovaných lokusů získanou ze 4 druhů poté testovali u 60 jedinců raka pruhovaného (*Orconectes limosus*) pocházejících z 3 přírodních populací: z řeky Dunaje v Bogyiszló, Maďarsko a z rybníka Starý Klíčov a z Černovického potoka, Česká Republika. Počet alel uvnitř populací se pohyboval od 4 do 10 alel na lokus. Sledovaná heterozygotnost (H_o) byla od 0,650 do 0,900 a heterozygotnost očekávaná (H_e) byla od 0,660 do 0,890. Významné odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy byly zjištěny pouze ve velmi malé míře. Účinnost cross-amplifikace byla závislá na fylogenetických vztazích druhů, pro které byly mikrosatelity původně vyvinuty.

Patnáct mikrosatelitních markerů pro *Cherax quadricarinatus*, endemický druh pro Austrálii a Novou Guineu izolovali Xie a kol. (2010). Mikrosatelitní markery byly testovány na panelu 66 nepříbuzných jedinců, přičemž třináct z mikrosatelitních lokusů bylo polymorfních. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 7, přičemž zjištěná heterozygotnost se pohybovala od 0,172 do 0,985 a heterozygotnost očekávaná pak od 0,373 do 0,778.

Populační strukturu šesti čínských populací invazního druhu *Procambarus clarkii* pomocí devíti polymorfních mikrosatelitních markerů sledovali Yue a kol. (2010). Nejvyšší počet alel v jednotlivých lokusech a nejvyšší variabilita byla zaznamenána v rámci populace z lokality Nanjing a tento fakt souvisí také s předpokladem, že právě do této lokality byl tento druh (s areálem původního výskytu v severovýchodním Mexiku a jihu až středu USA) introdukován z Japonska ve třicátých letech minulého století. V rámci všech lokalit byl zaznamenán deficit heterozygotnosti, který byl přisuzován „founder effectu“ a nenáhodnému páření.

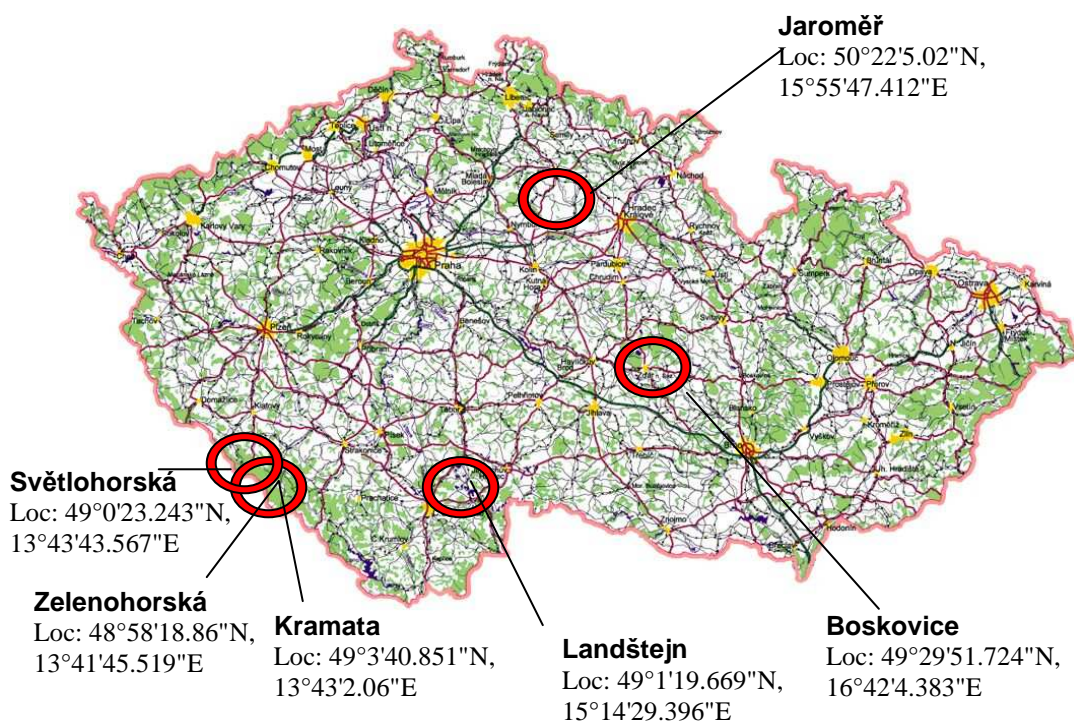
U korejského raka *Cambaroides similis* izolovali a popsali 8 mikrosatelitních markerů Ahn a kol. (2011). 8 mikrosatelitních lokusů bylo posáno na základě 49 jedinců ze čtyř lokalit z jižní Koreji. Počet alel na lokus se pohyboval v rozmezí 2 až 12, zjištěná heterozygotnost se pohybovala v rozmezí 0,000 až 0,833 a heterozygotnost očekávaná pak od 0,125 po 0,943. Na základě F_{st} byla zjištěna nejvyšší diferenciace

mezi populacemi z Mt. Gawanak a Mt. Bukhan (0,1789), tři populace z Mt. Gawanak se mezi sebou lišily výrazně méně (0,0454).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1. Studované populace raků

Vzorky zkoumaných raků říčních pocházely ze šesti lokalit: Jaroměř – malá populace raků z rybníka od jednoho chovatele, původem odloveni z neznámé přírodní lokality, Boskovice – přehradní nádrž s velkou populací raků čítající řádově tisíce až desetitisíce raků, která tu byla ještě před napuštěním přehrady na původním potoce; Landštejn – přehradní nádrž, populace čítá řádově stovky až možná tisíce dospělých jedinců; Světlohorská nádrž – nevypustitelná nádrž v CHKO Šumava, populace má několik set dospělých jedinců; Kramata – nádrž určená ke sportovnímu rybolovu v blízkosti CHKO Šumava, poměrně velká populace raků čítající několik stovek až tisíc jedinců; Zelenohorský potok – raci původem z Kramat držení v klecích v roce 2006 – 2007 za účelem jiného experimentu. Z každé lokality bylo odebráno 20 vzorků, kromě Zelenohorského potoka, odtud odebráno 10 jedinců. Z důvodu otestování použitelnosti metody mikrosatelitních markerů, byla v této první fázi v rámci bakalářské práce zkoumána pouze část vzorků: Jaroměř 14 vzorků, Boskovice 8 vzorků, Landštejn 8 vzorků, Světlohorská 9 vzorků, Kramata 7 vzorků a Zelenohorský potok 7 vzorků.



Obrázek 4. Lokality vzorkování

4.2. Odběr tkání a izolace DNA

Vzorky tkání o velikosti cca 3mm³ byly vypreparovány z třetích kráčivých končetin raka říčního, které byly uloženy v 96 % lihu. Celkem byla izolovaná genomová DNA 53 jedinců ze šesti různých populací. Kousky tkáně byly zality 100μl lyzačního pufru, byly přidány 4μl proteinázy a vzorky byly inkubovány při teplotě 55°C na thermomixeru za neustálého protřepávání a udržování teploty. Po třech hodinách, kdy se vzorky tkání v roztoku rozpustily, se přešlo k izolaci DNA pomocí komerčního DNA Lego Kitu (Top Bio, CR).

Do každé zkumavky s lyzátem bylo přidáno 200μl vazebného pufru. Po přidání vazebného pufru byly vzorky znovu promíchány a inkubovány po dobu 3 min. Během inkubace byly na další sadu zkumavek nasazeny minikolonky, do kterých bylo nanášeno 100μl roztoku DNA bind particule (obsahující křemičité sklo). Minikolonky byly centrifugovány tak, aby v kolonce vzniknul křemičitý filtr, který sloužil k navázání DNA. Lyzát s vazebným pufrům pak byl po částech nanášen do jednotlivých kolonek a centrifugován 1 minutu při 1000 rpm (otáček za min) tak, aby celý obsah rozpuštěné tkáně prošel kolonkou. Kolonky byly poté vysušeny krátkou centrifugací při 6000 rpm. Kolonky byly poté dvakrát promyty, vždy 100μl promývacího pufru, aby se DNA navázaná v kolonce zbavila zbytků proteinů a nečistot. Po každém nanášení promývacího roztoku byly kolonky stočeny v centrifuze. Kolonky byly přemístěny do nových zkumavek a do kolonek bylo nanášeno 2 x 30μl elučního pufru, přičemž mezi nanášením byly kolonky zcentrifugovány po 1 min. při 1000 rpm. Po nanášení druhé části elučního pufru následovala centrifugace při 6000 rpm. Izolovaná DNA byla následně elektroforeticky testována, krátkodobě skladována v lednici při teplotě 4°C, dlouhodobě pak v mrazícím boxu při -20°C.

4.3 Ověření izolátu DNA elektroforézou na agarózovém gelu

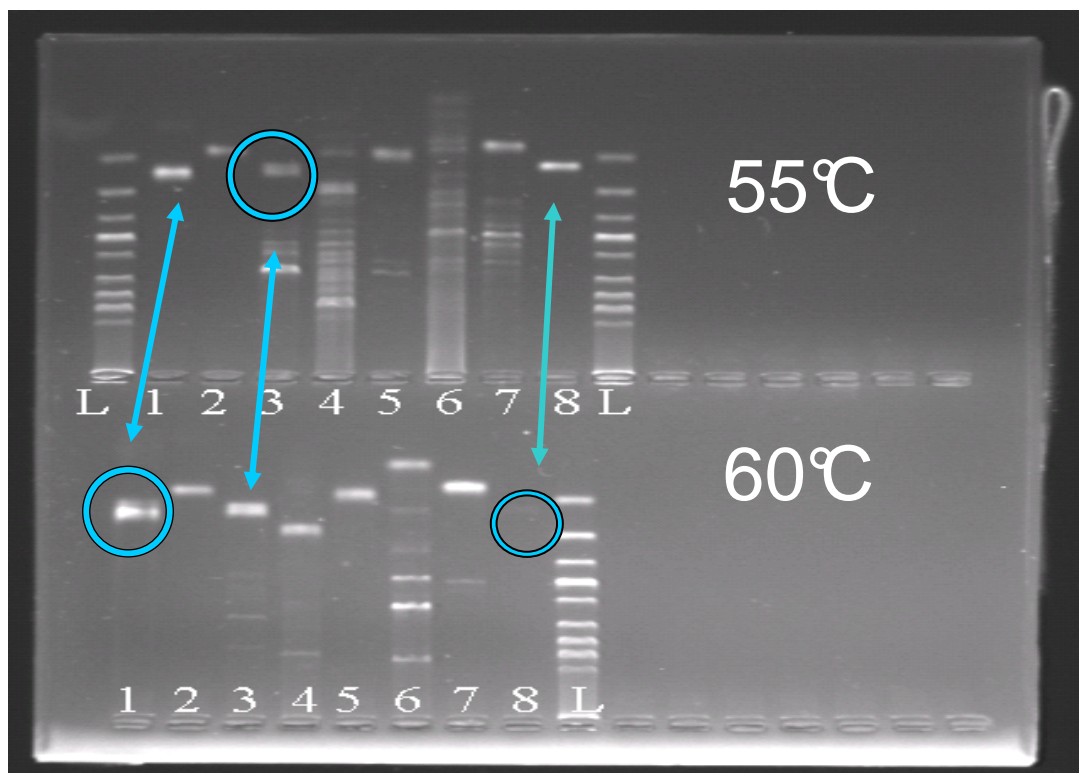
Po izolaci DNA z tkáně bylo nutné zkontrolovat kvalitu izolátu. Kvalita izolace byla ověřována elektroforézou na agarosovém gelu. Elektroforéza probíhala na 1,2% agarosovém gelu. K vizualizaci DNA bylo využito systému Gold View, kdy bylo do 100ml 1,2% agarosového roztoku přidáno 2,5μl barviva Gold View pro detekci nukleových kyselin v gelu. Do jamek v gelu bylo nanášeno 5μl templátové DNA a 3μl nanášecího roztoku Loading dye. Do jedné z jamky byl nanášen DNA marker (ladder)

sloužící k určení velikosti DNA. Elektroforetické dělení probíhalo po dobu 50 min při 60V a 50mA.

4.4 PCR

Testovali jsme použití osmi mikrosatelitních markerů popsaných Koivem a kol. (2008a), lokusy: *Aas 776*, *Aas 790*, *Aas 1198*, *Aas 2489*, *Aas 3040*, *Aas 3115*, *Aas 3666*, *Aas 3950*. Charakteristika těchto lokusů byla popsána spolu s rozsahem zaznamenaných alel a optimální teplotou annealingu (nasedání primerů) v originální publikaci. PCR probíhala v celkovém objemu 10 μ l. Samotná reakční směs obsahovala 1 μ l templátu, 0,3 μ l každého z primerů (koncentrace 10pm/ μ l), 3,4 μ l H₂O; a reakční směs byla doplněna 5 μ l PPPmaster mixu (Top Bio). Reakční směs tedy obsahovala: 75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 2,5 mM MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 200 μ M dATP, 200 μ M dCTP, 200 μ M dGTP, 200 μ M dTTP, 2,5 U Taq purple DNA polymerázy.

Po počátečním testování neznačených primerových párů jsme pro práci s primery fluorescenčně značenými zvolili následující dva programy. PCR program nazvaný *Asta55* kdy po počáteční denaturaci DNA při teplotě 95°C po dobu 3min. následovalo 35 cyklů zahájených denaturací při teplotě 95°C po dobu 40s, poté annealing primerů při 55°C po 40s a prodlužování amplifikovaného řetězce při teplotě 72°C po 40s. Závěrečná elongace DNA byla při teplotě 72°C po 20 min. Tato PCR reakce byla používána pro amplifikaci lokusů *Aas 2489* a *Aas 3040*, protože při annealingu primerů při teplotě 60°C, nebo jiné, se ukázaly velmi nespecifické produkty. Druhý PCR program *Asta60* probíhal následovně: počáteční denaturace DNA při 95°C po 3min. Poté následovalo 35 cyklů zahájených denaturací při 95°C po 40s, poté annealing primerů při 60°C po 40s a prodlužování řetězce při 72°C po 40s. Závěrečná elongace DNA byl při 72°C po 20 min. Tato PCR reakce byla používána pro amplifikaci zbývajících šesti lokusů.



Obrázek 5. Testování anealingu primerů při teplotách 55°C a 60°C.

(Obr. 4) Dráhy v gelu označené čísly 1 – 8 znázorňují jednotlivé amplifikované lokusy, na kterých bylo testováno připojení primerů při dvou různých teplotách. Pořadí lokusů : 1 – *Aas 3040*, 2 – *Aas1198*, 3 – *Aas 3666*, 4 – *Aas776*, 5 – *Aas 3950*, 6 – *Aas 790*, 7 – *Aas 3115*, 8 – *Aas 2489*. L – ladder sloužící pro porovnání kvality produktů. Na prvním lokusu *Aas 3040* bylo zjištěno, že vznikly nespecifické produkty při annealingu 60°C a při annealingu 55°C vznikly specifické produkty. Na třetím lokusu *Aas 3666* je to přesně naopak a na osmém lokusu *Aas 2489* vznikly specifické produkty při 55°C a při 60°C nedošlo k amplifikaci žádného PCR produktu.

Po ukončení reakce PCR cyklu byly produkty amplifikace testovány elektroforeticky na 1,2% agarosovém gelu. PCR reakce probíhaly na cycleru Bio Rad C1000 Thermal cycler.



Obrázek 6. Termocykler

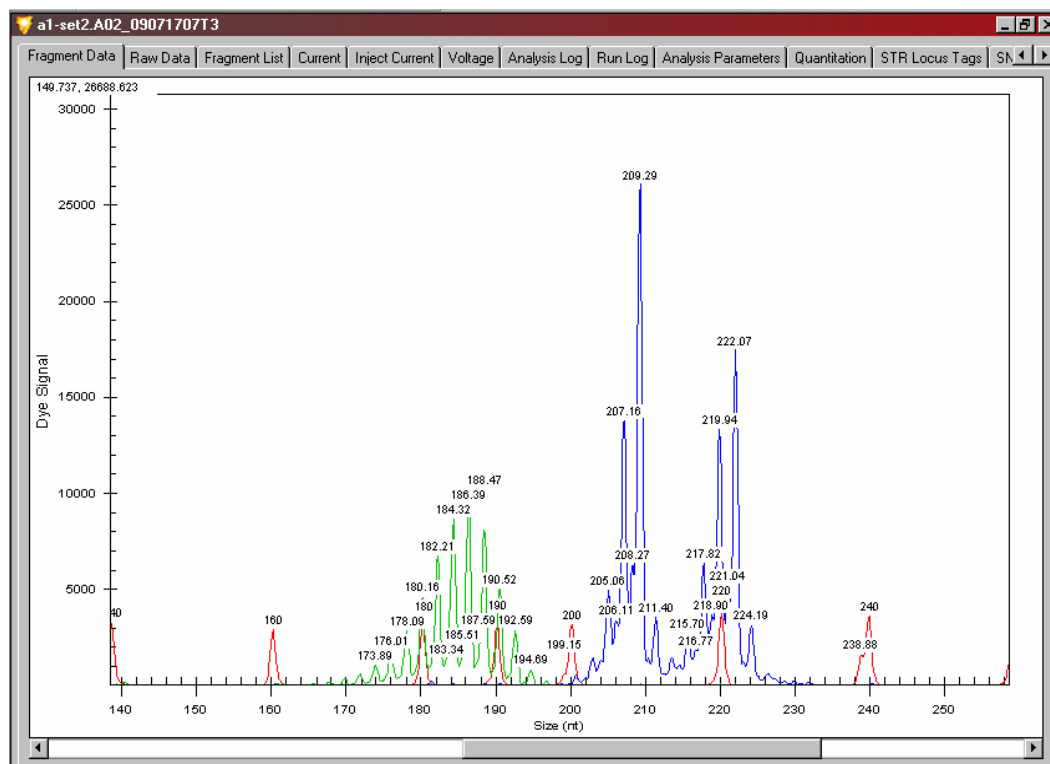
4.5 Fragmentační analýza, sekvenátor

PCR produkty byly po testování na agarosovém gelu analyzovány fragmentační analýzou na automatickém sekvenátoru. K tomu byl využit automatický sekvenátor Beckman Coulter CEQ 2000. Délky amplifikovaných produktů v bazických párech (bp) byly určovány kapilární elektroforézou na akrylamidovém gelu a pomocí fluorescenčního značení PCR produktů. Primery pro PCR primeru tedy byly navrženy tak, aby umožňovaly fragmentační analýzu několika lokusů v jediné kapiláře – aby mohly být PCR produkty skládány do tzv. multiplexu.

Podle očekávaných délek PCR produktů tedy bylo zvoleno fluorescenční značení jednotlivých primerů tak, aby celkem 8 lokusů mohlo být analyzováno v rámci 3 vzorků pro automatický sekvenátor. Ke fluorescenčnímu značení bylo využíváno barviv Beckman Coulter D2, D3 a D4. Přičemž vždy jeden z primerů z primerových párů pro každý lokus je značen tímto způsobem, což umožňuje elektroforetickou detekci amplifikovaných lokusů. Současně tedy můžeme analyzovat více fragmentů, pokud se výrazně liší délkou nebo barvou fluorescenčního značení. Pro usnadnění práce se 8 lokusů pro jednoho jedince rozdělilo do 3 setů. Set 1 obsahoval lokusy *Aas 790*, *Aas 3115*, *Aas 3040*. Set 2 lokusy *Aas 3950*, *Aas 1198*, *Aas 3666* a v setu 3 byly tyto lokusy *Aas 2489* a *Aas 776*. Reakční směs pro sekvenátor se skládala z 29,6 μ l SLS (sample

loading solution), 0,16 μ l standardu DNA (DNA Size Standard 400) a 0,16-0,30 μ l PCR produktu v závislosti na intenzitě výtěžku PCR reakce u konkrétního lokusu a barvivo použitému k fluorescenčnímu značení.

Fragmetační analýza probíhala podle metody Frag3 systému Beckman Coulter. Při fragmentační analýze byly fragmenty DNA v kapiláře rozděleny elektroforézou podle délky amplifikovaných fragmentů. DNA Size Standard 400 obsažený v každém vzorku umožňoval přepočít elektroforetické rychlosti na délku jednotlivých fragmentů. Získaná data o délkách alel byla zpracovávána pomocí programu GENALEX, vyhodnocovány byly počty alel na lokus *Na*, průměrný počet alel na lokus v rámci populace, čárka heterozygotnost: heterozygotnost sledovaná *Ho*, heterozygotnost očekávaná *He*.



Obrázek 7. Délky alel zobrazené fragmentační analýzou

5 VÝSLEDKY

Nejprve byl testován annealing primerů pro 8 lokusů při teplotách 55°C a 60°C. U lokusů *Aas 2489* a *Aas 3040* se ukázala jako optimální teplota pro annealing primerů 55°C. Pro zbývající lokusy *Aas 776*, *Aas 790*, *Aas 1198*, *Aas 3115*, *Aas 3666* a *Aas 3950* byla optimální teplota 60°C pro připojení primerů v PCR reakci.

Fragmentační analýzou na automatickém sekvenátoru byly určovány délky amplifikovaných alel v jednotlivých lokusech. Celkem bylo analyzováno 53 jedinců raka říčního pocházejících z 6 populací, přičemž bylo zkoumáno 14 vzorků z Jaroměře (nádrž), 8 vzorků z Boskovic (nádrž), 8 vzorků z Landštejna (nádrž), 7 vzorků z Kramat (nádrž), 9 vzorků ze Světlohorské (nádrž) a 7 vzorků ze Zelenohorského potoka. Z důvodu nízkého počtu analyzovaných vzorků byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu GENALEX pouze tři základní parametry a to počet alel na lokus a pozorovaná a očekávaná heterozygotnost a to pro porovnání s původní prací Koiva a kol. (2008a) popisující izolaci a základní charakteristiku těchto mikrosatelitních markerů. Pro větší efektivitu fragmentační analýzy byly dva až tři produkty amplifikace smíšeny do multiplexu, určení délek multiplexu bylo umožněno odlišným fluorescenčním značením a různou délkou alel.

V jednotlivých lokusech bylo v rámci našich 53 vzorků nalezeno od 1 do 13 alel – jeden z lokusů byl monomorfní v rámci všech analyzovaných vzorků. Heterozygotnost sledovaná byla v rozmezí od 0 do 1 a heterozygotnost očekávaná se pohybovala v rozmezí od 0 do 0,847.

Tabulka 2. Počet a délka alel na jednotlivých lokusech u českých populací

Lokus	Motiv	Na	Rozpětí
Aas 3666	(GT) ₂₇	?	209-230
Aas 3040	(TA) ₂₀	5	237-245
Aas 3115	(GT) ₂₀	5	160-188
Aas 2489	(CA) ₁₃	1	223
Aas 790	(GT) ₁₅	2	129-150
Aas 1198	(CT) ₂₄	5	172-185
Aas 3950	(CT) ₄₂	13	170-196
Aas 766	(GT) ₂₉	5	284-292

(Na: počet alel; Motiv: dinukleotidový motiv bází; rozpětí: rozpětí délky alel)

Počet alel pro lokus *Aas 3666* prozatím nebyl určen, PCR cyklus pro amplifikaci tohoto lokusu by si zasloužil další optimalizaci podle výsledků fragmentační analýzy na automatickém sekvenátoru. Na lokusu *Aas 2489* byla zjištěna jedna monomorfní alela pro všechny populace o délce 223 bází. Naopak nejvíce alel bylo zjištěno na lokusu *Aas 3950*, celkem 13 alel o délkách v rozmezí 170 – 196 bází. Počet a délky ostatních alel jsou uvedeny v tabulce (viz. tab. 2).

Tabulka 3. Průměrný počet alel na jeden lokus

Pop	BOS	JAR	KRA	SH	ZH	LAN
N	8	14	7	9	7	8
PpNa	3,86	3,43	3,43	2,57	3	2,43

Pop: populace; BOS – Boskovice; JAR – Jaroměř; KRA – Kramata; SH – Světlohorská; ZH – Zelenohorská; LAN – Landštejn; N: počet analyzovaných jedinců; PpNA: průměrný počet alel na jeden lokus

Tabulka 4. Genetická variabilita zkoumaných vzorků populací raka říčního na osmi lokusech

Pop		Aas 3666	Aas 3040	Aas 3115	Aas 2489	Aas 790	Aas 1198	Aas 3950	Aas 766
BOS	<i>N</i>	-	8	8	8	8	8	8	8
	<i>Na</i>	-	5	2	1	2	5	7	5
	<i>Ho</i>	-	1	1	0	0,625	0,875	1	1
	<i>He</i>	-	0,758	0,117	0	0,375	0,609	0,828	0,727
JAR	<i>N</i>	-	12	13	14	13	14	7	13
	<i>Na</i>	-	5	2	1	1	5	7	3
	<i>Ho</i>	-	1	0,308	0	0,538*	0,929	1	1
	<i>He</i>	-	0,667	0,074	0	0*	0,26	0,816	0,607
KRA	<i>N</i>	-	7	6	7	6	7	7	7
	<i>Na</i>	-	3	3	1	5	2	7	3
	<i>Ho</i>	-	1	0,5	0	0,833	1	1	1
	<i>He</i>	-	0,622	0,292	0	0,611	0,133	0,786	0,602
SH	<i>N</i>	-	9	9	8	8	8	8	8
	<i>Na</i>	-	3	2	1	1	1	6	4
	<i>Ho</i>	-	1	1	0	0,875*	0,25*	1	1
	<i>He</i>	-	0,611	0,105	0	0*	0*	0,758	0,648
ZH	<i>N</i>	-	6	6	7	7	7	7	7
	<i>Na</i>	-	5	2	1	2	1	8	2
	<i>Ho</i>	-	1	0,833	0	0,143	0,143	1	1
	<i>He</i>	-	0,694	0,153	0	0,133	0	0,847	0,5
LAN	<i>N</i>	-	7	8	8	8	7	6	6
	<i>Na</i>	-	3	2	1	2	1	6	2
	<i>Ho</i>	-	1	0,75	0	0,25	1	1	1
	<i>He</i>	-	0,561	0,469	0	0,117	0	0,75	0,5

N: počet jedinců; *Na*: počet detekovaných alel u daného lokusu; *Ho*: heterozygotnost sledovaná; *He*: heterozygotnost očekávaná; BOS – populace Boskovice; JAR – populace Jaroměř; KRA – populace Kramata; SH – populace Světlohorská; ZH – populace Zelenohorská; LAN – populace Landštejn; *Ho* a He**: genotyp nebyl určen u všech analyzovaných jedinců

6 DISKUZE

Pro raka říčního bylo popsáno 8 mikrosatelitních markerů. V původní práci Koiva a kol. (2008a) bylo pomocí nově popsaných mikrosatelitních markerů studováno 7 populací raka říčního (celkem 172 jedinců). Jednalo se o 3 populace z Estonska, 2 ze Švédska, 1 z Finska a 1 z Norska. Počet alel na lokus se u těchto populací pohyboval od 2 do 10. Heterozygotnost sledovaná byla v rozmezí od 0 do 0,80, zatímco heterozygotnost očekávaná byla v rozmezí od 0 do 0,72 (Koiv a kol., 2008a).

Tabulka 5. 5 Porovnání evropských populací (Estonsko, Finsko, Švédsko, Norsko) podle Koiva a kol. (2008a) s českými populacemi

Evropa		Evropa		ČR	
Lokus	Motiv	Na	rozpětí	Na	rozpětí
Aas 3666	(GT) ₂₇	3	226-234	?	209-230
Aas 3040	(TA) ₂₀	3	236-240	5	237-245
Aas 3115	(GT) ₂₀	4	173-191	5	160-188
Aas 2489	(CA) ₁₃	2	224-226	1	223
Aas 790	(GT) ₁₅	2	126-130	2	129-150
Aas 1198	(CT) ₂₄	4	174-182	5	172-185
Aas 3950	(CT) ₄₂	10	164-190	13	170-196
Aas 766	(GT) ₂₉	7	206-286	5	284-292

Na: počet alel; Motiv: dinukleotidový motiv bází; rozpětí: rozpětí délky alel

Na lokusu *Aas 3666* u evropských populací byly zjištěny 3 alely v délkovém rozsahu 226 – 234 bp, zatímco u našich vzorků a populací nebyl celkový počet alel určen, jelikož podle výsledků fragmentační analýzy by si PCR cyklus pro amplifikaci tohoto lokusu zasloužil další optimalizaci, jak již bylo zmíněno výše. Rozlišovací schopnost automatického sekvenátoru společně s velmi malými rozdíly mezi zaznamenanými alelami znemožnila přesné určení alel. Zvýšení počtu vzorků a snaha o další optimalizaci PCR amplifikace by však měly umožnit korektní určování alel i v tomto lokusu. U lokusu *Aas 3040* byly u evropských populací zaznamenány 3 alely v délkovém rozsahu 236 – 240 bp, kdežto u našich populací u tohoto lokusu bylo zjištěno 5 alel s rozsahem délek 237 – 245 bp. V dalším lokusu *Aas 3115* u evropských populací byly zjištěny celkem 4 alely s délkami 173 – 191 bp a u našich populací to

bylo 5 alel s délkami 160 – 188 bp. Pro lokus *Aas 2489* byla u naší populace zjištěna pouze jedna monomorfní alela o délce 223 bp, zatímco u evropských populací byly zjištěny alely 2 s délkami 224 – 226 bp na tomto lokusu. U dalšího lokusu *Aas 790* byly zjištěny u obou populací 2 alely, avšak rozsah délek alel u evropských byl 126 – 130 bp a v rámci našeho testování byly zaznamenány alely délek 129 – 150 bp. Na lokusu *Aas 1198* byly zjištěny 4 alely s délkami 174 – 182 bp u evropských populací a v rámci našeho testování bylo zjištěno 5 alel s délkami 172 – 185 bp. Lokus *Aas 3950* se ukázal jako velice polymorfní pro obě populace. U evropské měl 10 alel s délkami 164 – 190 bp a u našich populací bylo 13 alel s délkami 170 – 196 bp. Osmý lokus *Aas 766* byl také velmi polymorfní, u evropských populací měl 7 alel s délkami 206 – 286 bp a u našich populací zde bylo 5 alel s délkami 284 – 292 bp. V populaci raků uměle odchovaných v rybníce u Jaroměře byla sledována podobná heterozygotnost jako u populace raků říčních jako v Boskovické nádrži. V počtu alel na lokus se liší pouze ve dvou případech. Na lokusu *Aas 790* má boskovická populace 2 alely, kdežto v populaci jaroměřické byla nalezena pouze 1 z těchto alel. Na lokusu *Aas 766* má boskovická populace 5 alel a populace z Jaroměře alely 2. Na ostatních lokusech je počet alel shodný. Původ Jaroměřické populace je z přírodní lokality, která ovšem není známa.

Podle počtu alel v jednotlivých lokusech se výrazně lišily populace Zelenohorská a populace z Kramat. Počet zjištěných alel na lokus se výrazně lišil v pěti lokusech ze sedmi. Přitom raci navzorkovaní v Zelenohorském potoce byli odchyceni v nádrži Kramata. Rozdíly mohly být způsobeny velmi malým počtem analyzovaných vzorků nebo samotným vzorkováním.

Největší variabilitu ukázala moravská populace na Boskovické nádrži, průměrný počet alel na lokus 3,86, poté severočeská populace z Jaroměře 3,43 alel na lokus. Zelenohorská populace 3 alely na lokus a Světlohorská populace 2,57 alel na lokus. Nejnižší průměrný počet alel na lokus měla populace z Landštejna 2,43.

Na základě zjištěných dat můžeme obecně porovnávat stupeň variability mezi jednotlivými populacemi, které jsme zkoumali, avšak celkový počet analyzovaných jedinců je nedostatečný pro statisticky robustní analýzu dat. Cílem práce do budoucna bude analyzovat více jedinců z těchto populací a také zkoumat více různých populací, ať už přírodních či vysazených nebo uměle chovaných. Dále se znovu zaměřit na další optimalizaci podmínek PCR amplifikace u některých lokusů.

Zjištěním genetické variability jednotlivých populací v ČR můžeme vyvodit konkrétní ochranářský management pro raka říčního. V České republice byl nedávno proveden rozsáhlý monitoring původních a nepůvodních druhů raků. Bylo zjištěno, že rak říční se vyskytuje na mnoha lokalitách, bohužel populace jsou většinou zbytkového charakteru. Zájmem vědců a ochranářů je znovu posílit tyto slabé populace a introdukovat původní druhy raků na lokality, které dříve byly raky obývány. Jak uvádí Souty – Grosset a Reynolds (2009), raci určené pro repatriaci a introdukci by měli původem pocházet ze stejných nebo sousedních povodí. Dárcovská populace, tj. ta, ze které by měli být raci odebráni a vysazeni, musí být dostatečně velká, aby jí odběr raků nijak neublížil. Odebráno by nemělo být více jak 10% populace. Vysazování raci musí pocházet z lokalit bez potvrzeného výskytu račího moru. Genetické analýzy populací nám mohou v tomto ohledu dát velice užitečné informace, které můžeme zúročit právě při reintrodukci raků. Studium vysazených raků a jejich nově vzniklých populací se více dozvíme o posunu genetické variability a to nám poskytne další nezbytně důležité informace pro další kroky v ochraně původních druhů raků. Zakládání tzv. arch pro udržení genetické variability a konzervaci jednotlivých populací je dalším důležitým krokem v ochraně raků.

Další možností odkud brát raky, určené pro vysazování, jsou umělé chovy a s tím roste i hospodářský význam chovu raků. Raci uměle odchovávaní za účelem vysazování by taktéž měli pocházet ze stejných populací nebo z populací sousedních povodí s ohledem na jejich genetický původ. Chov raků za účelem repatriace je důležitou součástí jeho ochrany. Pro chovatele je mnohdy výhodnější produkovat raky za účelem reintrodukce. Ve skandinávských zemích je důležité pokrytí poptávky po racích na domácím trhu, to umožňují právě umělé odchovy. Ve střední a západní Evropě mají odchovy a vysazování především ochranářský význam, protože raci jsou důležitou součástí potravního řetězce. Rozsáhlé reintrodukce zaměřené na raky říční probíhaly v posledních letech např. v Polsku (Smietana a kol., 2004), Rakousku (Sint a Füreder, 2004), Francii (Laurent a kol., 1993) a Norsku (Taugbøl, 2004a,b). Taugbøl a Pay (2004) uvedli, že vysazování raků může být vhodné v případech recentně zaniklé populace, při zájmu rozšíření původních druhů raků na lokality, kde byly historicky potvrzeny jejich výskyt a může být vhodné pro vytvoření nových nebo izolovaných populací k ochraně a konzervaci genetické diverzity (Kozák a kol., 2009). V České republice vysazování raků provádí pouze několik subjektů a to většinou pouze pro

získání vědeckých poznatků (VÚRH JU) nebo za účelem vzdělávání mládeže (aktivity ČSOP). Ostatní aktivity ohledně raků jsou v současné době spíše tlumeny. Naproti tomu chovem raka říčního se v Evropě zabývá 13 zemí (Kozák a kol., 2009). Do budoucna je však třeba se zaměřit na management chovů s ohledem na udržení genetické variability. Prozatím není absolutně jasné, jaký minimální počet generačních raků je nutný pro udržení genetické variability v chovu, jaký význam přikládat tzv. osvěžení krve v chovu a jaký počet jedinců je nutný pro založení nové populace raků na lokalitě. Cílem pokračování další naší práce by mělo být otestování většího počtu jedinců z výše zmíněných lokalit v rámci ČR a dále analyzovat populace uměle vysazované se známou historií původní zdrojové populace a počtu vysazených jedinců.

7 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala molekulárními metodami, které jsou využitelné při studiu populační genetiky raků a některé z nich byly ověřeny a použity v praxi. Práce vycházela z objevu prvních 8 mikrosatelitních lokusů u raka říčního. Cílem bylo ověřit tyto mikrosatelity v naší laboratoři na několika vybraných populacích. Ověřením funkčnosti a použitelnosti publikovaných mikrosatelitních markerů pro raka říčního jsme tak dosáhli optimalizace této metodiky. Nyní je možné pomocí této metody produkovat rozsáhlá data, která nám budou užitečná při zkoumání struktury populací a nebo při ochraně raků a jejich zpětnému navrácení do přírody.

8 POUŽITÁ LITERATURA

Abrahamsson, S.A.A., 1971. Density, growth and reproduction in populations of *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus* in an isolated pond. *Oikos* 22, 373 – 380.

Ahn, D.H., Park, M.H., Jung, J.H., Oh, M.J, Kim, S., Jung, J., Min, G.S., 2011. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Korean crayfish, *Cambaroides similis* and application to natural population analysis. *Anima Cells and Systems* 15, p. 37-43.

Agerberg, A., 1990. Genetic variation in three species of freshwater crayfish *Astacus astacus* L., *Astacus leptodactylus* Aesch. and *Pacifastacus leniusculus* (Dana), revealed by isozyme alectrophoresis. *Hereditas* 113:101 – 108.

Alaranta, A., Henttonen, P., Jussila, J., Kakko, H., Prestegard, T., Edsman, L., Halmekytö, M., 2006. Genetic differences among noble crayfish (*Astacus astacus*) stocks in Finland, Sweden and Estonia based on the ITS1 regio. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 380 – 381: 965 – 975.

Baillie, J., Groombridge, B. (compilers and eds), 1996. 1996 IUCN red list of threatened animals. IUCN, Gland, Switzerland.

Baker, R.J., Makova, K.D. & Chesser, R.K., 1999. Microsatellites indicate a high frequency of multiple paternity in *Apodemus* (Rodentia). *Molekular Ecology* 8: 107 – 111.

Baker, N., Byrne, K., Noore, S. & Mather, P., 2000. Characterization of microsatellite loci in the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Molecular Ecology* 9, 494.

Baric, S, Holrigl, A, Furender, L, Dalla Via, J., 2005. Mitochondrial and microsatellite DNA analyses of *Austropotamobius pallipes* populations in South Tyrol (Italy) and Tyrol (Austria) *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture* 376-37, p. 599-612.

Belfiore, N.M. & May, B., 2000. Variable microsatellite loci in re swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, and their characterization in other crayfish taxa. *Molecular Ecology* 9, 2231 – 2234.

Beckmann, J.S., Weber, J.L., 1992. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12, 627 – 631.

- Brody, T., Moav, R., Abramson, Z.V., Hulata, G., Wohlfarth, G., 1976. Application of electrophoretic markers to fish breeding. II. Genetic variation within maternal half – sibs in carp. *Aquaculture* 9, 351 – 365.
- Brody, T., Kirsht, D., Parag, G., Wohlfarth, G., Hulata, G., Moav, R., 1979. Biochemical genetic comparison of the Chinese and European races of the common carp. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 10, 141 – 149.
- Brody, T., Storch, N., Kirsht, D., Hulata, G., Wohlfarth, G., Moav, R., 1980. Application of electrophoretic markers to fish breeding. III. Dialle analysis of growth rate in carp. *Aquaculture* 20, 371 – 379.
- Bruford, M.W., Cheesman, D.J., Coote, T., Green, H.A.A., Haines, S.A., Oryan, C., 1996. Microsatellites and their application to conservation genetics. In: Smith, T.B., Wayne, R.K., (Eds.), *Molecular Genetic Approaches in Conservation*, Oxford University Press, pp. 278 – 297.
- Busack, C.A., 1988. Electrophoretic variation in the red swamp (*Procambarus clarkii*) and white river crayfish (*P. acutus*) (Decapoda: Cambaridae). *Aquaculture* 69: 211 – 226.
- Clark, D., 2005. *Molecular Biology*, 570 – 573.
- Crandall, K.A., Lawler, S.H., Austin, C., 1995. A preliminary examination of the molecular phylogenetic relationships of the crayfish genera of Australia (Decapoda: Parastacidae). *Freshwater Crayfish* 10: 18 – 30.
- Crandall, K.A., Fitzpatrick, J.F., 1996. Crayfish molecular systematic: Using a combination of procedures to estimate phylogeny. *Systematic Biology* 45: 1 – 26.
- Davis, K.M., Dixon, P.I., Harris, J.H., 1999. Allozyme and mitochondrial DNA analysis of carp *Cyprinus carpio* L., from south-eastern Australia. *Marine. Freshwater Research* 50, 253 – 260.
- Dyk, V., 1977. Rak říční jako ukazatel čistoty vod. *Památky a příroda* 10: 632 – 635.
- Fetzner, J.W., Crandall, K.A., 1999. Genetic variability within and among populations of the golden crayfish (*Orconectes luteus*): A comparison using amplified fragment length

polymorphisms (AFLPs) and mitochondrial 16S gene sequences. *Freshwater Crayfish* 12: 396 – 412.

Fetzner, J.W., Crandall, K.A., 2002. *Biology of Freshwater Crayfish*, Department of Zoology, USA, Chapter 8, 291 – 326.

Fevolden, S.E., Hessen, D.O., 1989. Morphological and genetic differences among recently founded populations of noble crayfish (*Astacus astacus*). *Hereditas* 110: 149 – 158.

Fevolden, S.E., Taugbøl, T., Skurdal, J., 1994. Allozymic variation among populations of noble crayfish, *Astacus astacus* L., in southern Norway: implications for management. *Aquaculture and Fisheries Management* 25: 927 – 935.

Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Šlechta, V., Linhart, O., 2008. Genetika a šlechtění ryb, VÚRH JU Vodňany, 28 – 65.

Fornůsková, A., 2007. Mikrosatelity a jejich využití při studiu genetické struktury populací netopýrů. Masarykova Univerzita v Brně, s. 3 – 8.

Füderer, L., Edsman, L., Holdich, D.M., Kozák, P., Machino, Y., Pöckl, M., Renai, B., Reynolds, J.D., Schulz, H., Schulz, R., Sint, D., Taugbol, T., Trouilhé, M.C., 2006. Indigenous crayfish habitat and threats. *Atlas of Crayfish in Europe*. Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P., Reynolds, J.D., Haffner, P. (eds), 25 – 48. Publications Scientifiques du MNHN, Paris.

Goldstein, D. B., Schlötterer, Ch., 1999. *Microsatellites, Evolution and Applications*, Oxford University Press 336.

Gouin, N., Grandjean, F. & Souty-Grosset, C., 2000. Characterization of microsatellite loci in the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Astacidae) and their potential use in other decapods. *Molecular Ecology* 9, 636.

Gouin, N., Souty-Grosset, C., Ropiquet, A., Grandjean, F., 2002. High dispersal ability of *Austropotamobius pallipes* revealed by microsatellite markers in a French brook. *Bulletin Francais De La Peche et de la Pisciculture* 367, p.681-689.

- Gouin, N., Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 2006. Population genetic structure of the endangered crayfish *Austropotamobius pallipes* in France based on microsatellite variation: biogeographical inferences and conservation implications. *Freshwater Biology* 51, 1369-1387.
- Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 1997. Preliminary results on the genetic variability of mitochondrial DNA in the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana. *C. R. Academie des Sciences Paris. Sciences de la vie/ Life Sciences* 320: 551 – 556.
- Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 2000. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes pallipes*. *Conservation Genetics* 1: 309 – 319.
- Grandjean, F., Souty-Grosset, C., Raimond, R., Holdich, D.M., 1997. Geographical variation of mitochondrial DNA between populations of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Fresh. Biol* 37: 493 – 501.
- Grandjean, F., Harris, D.J., Souty-Grosset, C., Crandall, K.A., 2000. Systematics of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae). *J. Crustacean Biology* 20: 522 – 529.
- Grant, W.S., 1980. Use of biochemical genetic-variants for identification of sockeye salmon (*Oncorhynchus-nerca*) stocks in cook inlet, Alaska. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science* 37, 1236.
- Gur-Arie, R., Cohen, C., Eitan, L., Shelef, E., Hallerman, E., Kashi, Y., 2000. Abundance, non-random genomic distribution, nucleotide composition, and polymorphism of simple sequence repeats in *E. coli*. *Genome Res.* 10, 61 – 70.
- Hancock, J.M., 1995. The contribution of slippage-like processes to genome evolution. *J. Mol. Evol.* 41(6): 1038 – 1047.
- Holdich, D.M., Ackefors, H., Gherardi, F., Rogers, W.D. & Skurdal, J., 1999. Native and alien crayfish in Europe: Some conclusions. In: *Crayfish in Europe as Alien Species. How to Make the Best of a Bad Situation?* Gherardi, F., Holdich, D.M. (eds), 281 – 292. A.A. Balkema, Rotterdam.

Holdich, D. M., 2002. Distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries. Bull. Fr. Pêche Piscic. 367: 611 – 650.

Holdich, D.M., Haffner, P., Noël, P., Carral, J., Füderer, L., Gherardi, F., Machino, Y., Madec, J., Pöckl, M., Smietana, P., Taugbol, T., Vigneux, E., 2006. Species files. Atlas of crayfish in Europe. Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P., Reynolds, J.D., Haffner, P. (eds), 49 – 130. Publications Scientifiques du MNHN, Paris.

Hulák, M., Kašpar, V., Flajšhans, M., Linhart, O., 2006. Využití molekulárních metod a DNA markerů v genetice ryb – přehled, Bulletin VÚRH JU, Vodňany, 69 - 73.

Hulák, M., 2008. Molekulární základy biologie a genetiky v rybářství, VÚRH JU, Vodňany, 80 – 110.

Hulák, M., Kašpar, V., Kozák, P., Buřič, M., Filipová, L., Petrušek, A., 2010. Cross-species amplification of microsatellite markers in the invasive spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*): assesment and application. J Appl Genet 51(1) pp. 73 – 78.

Chistiakov, D., Hellemans, B., Volckaert, F., 2005. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. Aquaculture 255: 1 – 29.

Chobot, K., 2006. Mapování raků v AOPK ČR. Ochrana přírody 61 (2), 57 – 59.

Ipsier, J., 2006. Genetika. UJEP, Ústí nad Labem, s. 185 – 189.

Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H., Brow, M.A.D., 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 9436 – 9440.

Jarne, P., Lagota, P.J.L., 1996. Microsatellites, from molecule to populations and back. Trends in Ecology and Evolution 11 (10), 424 – 429.

Jurka, J., Pethigoda, C., 1995. Simple repetitive DNA sequences from primates: compilation and analysis. *J. Mol. Evol.* 40, 120 – 126.

- Kohlmann, K., Kersten, P., 1999. Genetic variability of German and foreign common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Aquaculture* 173, 435 – 445.
- Kohlmann, K., Luczynski, M., 2000. Genetic control of Glucosephosphate Isomerase (GPI) in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Heredity* 91, 400 – 402.
- Koiv, K., Gross, R., Paaver, T., Kuehn, R., 2008a. Isolation and characterization of first microsatellite markers for the noble crayfish, *Astacus astacus*. *Conserv Genet.*
- Koiv, K., Gross, R., Paaver, T., Hurt, M., Kuehn, R., 2008b. Isolation and characterization of 11 novel microsatellite DNA markers in the noble crayfish, *Astacus astacus*. *Animal Genetics* 40, 124-126.
- Kozák, P., Pokorný, J., Polícar, T., Kouřil, J., 1998. Základní morfologické znaky k rozlišení raků v ČR. *Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany č. 56, 20.*
- Kozák, P., Buřič, M., Polícar, T., 2007. Metodika lovu raků. *Edice Metodik (Technologická řada), VÚRH JU, Vodňany č. 81, 24.*
- Kozák, P., Buřič, M., Kouba, A., Polícar, T., 2008a. Metodika chovu raka říčního. *Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany č. 83.*
- Kozák, P., Polícar, T., Buřič, M., Kouba, A., 2008b. Základní morfologické znaky k rozlišení raků v ČR. *Edice Metodik, Vodňany, VÚRH JU, č. 18.*
- Kozák, P., Polícar, T., Kouba, A., Buřič, M., Ďuriš, Z., 2009. Problematika reintrodukcí a hospodářského využití původních druhů raků v Evropě, realita a perspektivy v ČR. *Bulletin VÚRH JU, Vodňany 25 – 33.*
- Krane, D.E., Sternberg, D.C., Burton, G.A., 1999. Randomly amplified polymorphic DNA profile-based measures of genetic diversity in crayfish correlated with environmental impacts. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 : 504 – 508.
- Krupauer, V., 1968. Zlatý rak. Nakladatelství České Budějovice. 108 s.
- Krupauer, V., 1981. Raci. ČRS, Pardubice. 67s.

- Laurent, P.J., Nicolas, J., Paris, L., 1993. Five years of action in Lorraine nad Morvan (France) to restore the noble crayfish, *Astacus astacus*. *Freshwater Crayfish* 9: 380 – 389.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Nevo, E., 2004. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol. Biol. Evol.* 21, 991 – 1007.
- Litt, M. and Luty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44, 397 – 401.
- Macaranas, J.M., Mather, P.B., Hoeben, P. & Capra, M.F., 1995. Allozyme and RAPD-DNA variation in the redclaw crayfish. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 46, 1217 – 1228.
- Martin, P, Kohlmann, K., Scholtz, G., 2007. The parthenogenetic Marmorkrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform offspring. *Naturwissenschaften* 94, p. 843-846.
- Maxam, A.M. & Gilbert, W., 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Science* 74, 560 – 564.
- Metzgar, D., Bytof, J., Wills, C., 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Res.* 10, 72 – 80.
- Moran, C., 1993. Microsatellite repeats in pig (*Sus domestica*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes. *Journal Heredity* 84, 274 – 280.
- Murakaeva, A., Kohlmann, K., Kersten, p., Kamilov, B., Khabibulin, D., 2003. Genetic characterization of wild and domesticated common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations from Uzbekistan. *Aquaculture* 218, 153 – 166.
- Nei, M., Maruyama, T., Chakraborty, R., 1975. Bottleneck effect variability in populations. *Evolution* 29, 1 – 10.
- Oliveira E. J., Pádua J. G., Zucchi M. I., Venkovsky R. & Carneiro Vieira M. L., 2006. Origin, evolution and geonome distribution of microsatellites. *Genetics nad Molecular Biology* 29, 294-307.

- O'Connell, M., Wright, J., 1997. Microsatellite DNA in fishies. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, 331 – 363.
- Paaver, T., 1983. Biochemical genetics of the common carp (*Cyprinus carpio*L.) Valgus, Tallinn.
- Petrýl, M., Kalous, L., Šlechta, V., 2007. Differentiation of breeds and lineages of common carp (*Cyprinus carpio*) with usage of geometric morphometry. European Congress of Ichthyology, ECI XII, Cavtat, Croatia, 9 – 13 September Book of Abstracts p. 9.
- Polícar, T., Kozák, P., 2000. Výskyt raků v ČR, Bulletin VÚRH JU, Vodňany, Biologie, ochrana a chov raků 36, 18 – 22.
- Pöckl, M., Holdich, D.M., Pennerstorfer, J., 2006. Identifying native and alien crayfish species in Europe. European Project CRAYNET 47s.
- Řehout, V., Čítek, J., Sáková, L., 2000. Genetika I. (Úvod do studia genetiky), JCU, České Budějovice, 128 – 168.
- Řehout, V., Čítek, J., Hradecká, E., 2005. Genetika II. JCU, České Budějovice, 119 – 129.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Vols. 1,2 and 3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science* 74, 5463 – 5467.
- Schulz, R., 2000. Status of the noble crayfish *Astacus astacus* (L.) in Germany: monitoring protocol and the use of RAPD markers to assess the genetic structure of populations. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 356: 123 – 138.
- Schulz, H., Smietana, P., Maiwald, T., Oidtmann, B., Schulz, R., 2004. Case studies on the Co-occurrence of *Astacus astacus* (L.) and *Orconectes limosus* (Raf.), Snapshpts of a Slow Displacement. *Freshwater Crayfish* 15: 212 – 219.

- Schulz, K.H., Smietana, P., Schulz, R., 2006. Assessment of DNA variations of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) in Germany and Poland using Inter-Sample sequence repeats (ISSRS). Bull. Fr. Pêche Piscic. 372 – 373: 387 – 399.
- Sint, D., Füreder, L., 2004. Reintroduction of *Astacus astacus* L. in East Tyrol, Austria. Bull. Fr. Pêche Piscic. 372 – 373: 301 – 314.
- Skurdal J., Taugbøl T., 2002. *Astacus*. In: Biology of Freshwater Crayfish. Holdich D.M. (ed.), 467 – 510. Blackwell Science Ltd., London.
- Smietana, P., Krzywosz, T., Strużyński, W., 2004. Review of national restocking programme „Active protection of native crayfish in Poland“ 1999 – 2001. Bull. Fr. Pêche Piscic. 372 – 373: 289 – 299.
- Soroka, M., 2008. Application of mitochondrial DNA in the identification of diverse crayfish species. Polish Journal of Natural Sciences, Vol. 23(3), 624 – 634.
- Souty-Grosset, C., Grandjean, F., Raimond, R., Frelon, M., Debenest, C., Bramard, M., 1997. Conservation genetics of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*: The usefulness of the mitochondrial DNA marker. Bull. Fr. Pêche Piscic. 347: 677 – 692.
- Souty-Grosset, C., Reynolds, J.D., 2009. Current ideas on methodological approaches in European crayfish conservation and restocking procedures. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems 394 – 395, 01.
- Starcová, M., 2009. Zjišťování paternity u hlodavců pomocí molekulárních metod, Přírodovědecká fakulta University Karlovy, 27 s.
- Stallings, R.L., 1994. Distribution of trinucleotide microsatellites in different categories of mammalian genomic sequence: implications for human genetic diseases. Genomics 21, 116 – 121.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J. & Hillis, D.M., 1996. Phylogenetic inference. In: *Molecular Systematics*, (eds D.M. Hillis, C.T. Moritz & B.K. Mabel), pp. 407 – 514. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- Taugbøl, T., 2004a. Exploitation is a prerequisite for conservation of *Astacus astacus*. Bull. Fr. Pêche Piscic. 372 – 373: 275 – 279.
- Taugbøl, T., 2004b. Reintroduction of noble crayfish *Astacus astacus* after crayfish plague in Norway. Bull. Fr. Pêche Piscic. 372 – 373: 315 – 328.
- Taugbøl, T., Pay, S., 2004. Rountable Session 3. Reintroduction of native crayfish and habitat restoration. Bull. Fr. Pêche Piscic. 372 – 373: 465 – 471.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res. 17, 6463 – 6471.
- Tautz, D. and Renz, M., 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Res. 12, 4127 – 4138.
- Tóth, G., Gáspari, Z., Jurka, J., 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and Analysis. Genome Research 10, 967 – 981.
- Troschel, H.J., 1997. In Deutschland vorkommende Flusskrebse: Biologie Verbreitung und Bestimmungsmerkmale. Fischer & Teichwirt 9: 370 – 376.
- Van Lith, H.A., Van Zutphen, L.F., 1996. Characterization of rabbit DNA microsatellites extracted from the EMBL nucleotide sequence database. Anim. Genet. 27, 387 – 395.
- Walker, D, Porter, B.A., Avise, J.C., 2002. Genetic parentage assessment in the crayfish *Orconectes placidus*, a high-fecundity invertebrate with extended maternal brood care. Molecular Ecology 11, p.2115-2122.
- Weber, & May, 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal of Human Genetic. 44, 388 – 396.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are usefull as genetic markers. Nucleic Acid Research 18, 6531 – 6535.

Wright, J.M. & Bentzen, P., 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4, 384 – 388.

Xie, Y.N., He, L., Sun, J.L., Chen, L.L., Zhao, Y.L., Wang, Y.P., Wang, Q., 2010. Isolation and characterization of fifteen microsatellite loci from the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Aquatic Living Resources* 23, p.321-234.

Xu, Z., Dhar, A.K., Wyrzykowski, J. & Alcivar-Warren, A., 1999. Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome. *Animal Genetics* 30, 150 – 156.

Yue, G.H., Li, J.L., Wang, C.M., Xia, J.H., Wang, G.L., Feng, J.B., 2010. High prevalence of multiple paternity in the invasive crayfish species, *Procambarus clarkii*. *International Journal of Biological Sciences* 6, 107-115.

Zardoya, R., Doadrio, I., 1999. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European Cyprinids. *Journal of Molecular Evolution* 49, 227 – 237.

Žurovec, M., a kol., 1999. Soubor materiálů k předmětu metody molekulární biologie, JCU, České Budějovice, 1 – 60.

Elektronické zdroje

http://csis-text.c.u-tokyo.ac.jp/active/02_04.html

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Rozšíření raka říčního v Evropě (Holdich, 2002)	9
Obrázek 2 Elektroforéza	18
Obrázek 3. Schéma PCR (http://csls-text.c.u-tokyo.ac.jp/active/02_04.html)	20
Obrázek 4. Lokality vzorkování	29
Obrázek 5. Testování anealingu primerů při teplotách 55°C a 60°C.	32
Obrázek 6. Termocykler	33
Obrázek 7. Délky alel zobrazené fragmentační analýzou.....	34

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. 8 izolovaných mikrosatelitních lokusů a jejich primerové sekvence (Koiv a kol., 2008).....	24
Tabulka 2. Počet a délka alel na jednotlivých lokusech u českých populací.....	35
Tabulka 3. Průměrný počet alel na jeden lokus	36
Tabulka 4. Genetická variabilita zkoumaných vzorků populací raka říčního na osmi lokusech	36
Tabulka 5. 5 Porovnání evropských populací (Estonsko, Finsko, Švédsko, Norsko) podle Koiva a kol. (2008) s českými populacemi.....	37

SEZNAM PŘÍLOH

Tabulka 1. Počet analyzovaných alel na mikrosatelitních lokusech zkoumaných populací.....	54
Tabulka 2. Zpracovaný dataset ze sekvenátoru	54

9 PŘÍLOHY

Tabulka 1. Počet analyzovaných alel na mikrosatelitních lokusech zkoumaných populací

Pop	BOS	JAR	KRA	SH	ZH	LAN
N	8	14	7	9	7	8
Aas 3666	-	-	-	-	-	-
Aas 3040	5	5	3	3	5	3
Aas 3115	2	2	3	2	2	2
Aas 2489	1	1	1	1	1	1
Aas 790	2	1	5	1	2	2
Aas 1198	5	5	2	1	1	1
Aas 3950	7	7	7	6	8	6
Aas 766	5	3	3	4	2	2

BOS – populace Boskovice; JAR – populace Jaroměř; KRA – populace Kramata; SH – populace Světlohorská; ZH – populace Zelenohorská; LAN – populace Landštejn N – počet analyzovaných jedinců; Aas 3666 – Aas 766...mikrosatelitní lokusy na kterých byl určován počet alel

Tabulka 2. Zpracovaný dataset ze sekvenátoru

vz	Pop.	Aas790		Aas3115		Aas3040		Aas3950		Aas3666		Aas1198		Aas2489		Aas776	
a1	BOS	129	150	171	173	239	243	186	193			183	185	223	223	284	290
a3	BOS	129	150	171	173	237	239	186	191			183	185	223	223	288	290
a4	BOS	129	150	171	173	239	241	182	193			183	185	223	223	284	290
a5	BOS	129	0	171	173	243	243	186	192			178	185	223	223	288	292
a6	BOS	129	150	173	188	241	245	184	192			185	189	223	223	288	290
a7	BOS	129	129	171	173	239	241	178	182			183	185	223	223	284	290
a8	BOS	129	129	171	173	241	243	180	190			185	187	223	223	288	290
a9	BOS	129	129	171	173	237	239	184	190			183	185	223	223	284	286
j10	JAR	129	0	171	173	239	241	0	0			172	185	223	223	284	290
j11	JAR	129	129	173	173	239	245	0	0			183	185	223	223	284	290
j13	JAR	129	129	173	173	241	243	189	192			183	185	223	223	284	290
j14	JAR	129	129	171	173	239	241	0	0			185	193	223	223	288	290
j15	JAR	129	129	171	173	239	241	172	178			183	185	223	223	289	290
j1	JAR	129	129	171	173	241	243	191	197			183	185	223	223	284	290
j2	JAR	129	129	171	173	239	241	180	199			183	185	223	223	288	290
j3	JAR	129	129	173	180	239	241	189	193			183	185	223	223	288	290
j4	JAR	129	129	173	173	239	243	185	193			183	185	223	223	288	290
j5	JAR	129	129	171	173	239	241	189	193			183	185	223	223	288	290

j6	JAR	129	129	173	173	239	241	0	0			183	185	223	223	288	290
j7	JAR	0	0	0	0	0	0	184	191			183	185	223	223	288	290
j8	JAR	129	129	173	173	237	239	0	0			179	185	223	223	272	290
j9	JAR	129	129	173	173	243	256	180	0			183	185	223	223	288	290
k2	KRA	150	150	173	175	239	241	176	185			183	185	223	223	288	290
k4	KRA	0	0	173	173	239	243	184	186			183	185	223	223	288	290
k5	KRA	129	150	171	173	239	241	182	186			183	185	223	223	288	290
k6	KRA	136	150	159	173	239	243	178	182			183	185	223	223	288	290
k7	KRA	146	175	173	173	239	241	182	195			183	185	223	223	286	290
k8	KRA	129	150	171	173	239	243	181	183			183	185	223	223	286	290
k9	KRA	150	150	173	175	239	243	182	184			183	185	223	223	288	290
s10	SH	150	150	160	173	239	241	180	184			183	185	223	223	288	290
s1	SH	150	150	171	173	239	241	183	192			183	185	223	223	288	292
s2	SH	150	150	171	173	237	239	179	183			183	185	223	223	290	292
s4	SH	150	150	171	173	239	241	79	88			183	185	223	223	286	290
s5	SH	150	150	171	173	237	239	179	185			183	185	223	223	288	290
s6	SH	150	150	171	173	237	239	182	184			112	117	190	190	270	274
s7	SH	150	150	171	173	237	239	178	191			183	185	223	223	288	290
s8	SH	0	0	171	173	237	239	178	185			183	185	223	223	288	290
s9	SH	150	150	171	173	237	239	184	190			183	185	223	223	288	290
z1	ZH	129	150	171	173	0	0	187	196			183	185	223	223	288	290
z2	ZH	150	150	0	0	241	243	179	183			183	185	223	223	288	290
z3	ZH	150	150	171	173	239	243	179	187			183	185	223	223	288	290
z4	ZH	150	150	171	173	237	239	177	183			183	185	223	223	288	290
z5	ZH	150	150	171	173	239	243	183	187			183	185	223	223	288	290
z6	ZH	150	150	171	173	239	243	181	187			183	185	223	223	288	290
z7	ZH	150	150	171	173	240	246	176	184			183	185	223	223	288	290
l1	LAN	129	129	186	188	0	0	191	197			183	185	223	223	291	295
l2	LAN	129	150	188	188	237	239	186	195			283	285	323	323	389	391
l6	LAN	129	129	173	173	239	241	191	193			183	185	223	223	288	290
l11	LAN	129	129	171	173	239	241	191	193			183	185	223	223	288	290
l10	LAN	129	129	186	188	239	241	180	191			183	185	223	223	288	290
l22	LAN	129	129	173	188	239	241	281	284			183	185	223	223	288	290
l23	LAN	129	129	173	188	239	241	193	199			183	185	223	223	288	290
l26	LAN	129	129	186	188	239	241	191	195			183	185	223	223	288	290

vz: vzorek; Pop: populace; Aas 790 – Aas 776: mikrosatelitní lokusy;. Zde jsou uvedeny délky jednotlivých alel v počtu bází. Kde jsou zapsány nuly, tam jsme blíže neurčili délku alely.

ABSTRAKT

Možnosti využití molekulárních metod pro studium populační genetiky raka říčního *Astacus astacus*

Rak říční (*Astacus astacus*) je jeden ze dvou původních druhů raků žijících u nás, kteří jsou na celém našem území přísně chráněni, protože jsou označeni za kriticky ohrožený druh. V Evropě je to jeden z pěti původních druhů raků, zaznamenaný organizací IUCN jako ohrožený druh, který potřebuje ochranný management. Jeho populace byly rapidně sníženy kvůli račímú moru, který přenášejí nepůvodní druhy raků ze Severní Ameriky, kteří byli v minulosti zavléčeni do Evropy a posléze i do České republiky. V minulosti byly izolovány a popsány mikrosatelitní markery pro raka říčního (Koiv a kol., 2008a). V rámci této práce bylo testováno použití těchto osmi mikrosatelitních markerů na vzorcích získaných z českých populací raka říčního. Testování jsme provedli na 53 vzorcích raků ze šesti populací. Testování vzorků bylo provedeno izolací DNA z tkáně třetí kráčivé končetiny pomocí DNA Lego Kitu. Následným ověřením izolátu DNA elektroforézou na agarózovém gelu. Testování teplotního cyklu PCR amplifikace vycházelo z původní publikace Koiva a kol. (2008a), následně byl PCR cyklus upravován podle kvality PCR produktů získaných v naší laboratoři. Jako nejvýhodnější byla zvolena teplota annealing primerů 60°C pro šest testovaných lokusů tj. Aas 3666, Aas 3115, Aas 790, Aas 1198, Aas 3950 a Aas 766, pro další dva lokusy Aas 2489 a Aas 3040 byla zvolena teplota annealingu 55°C. Výsledné produkty PCR byly testovány na agarózovém gelu a následně byly fragmentační analýzou na automatickém sekvenátoru Beckman Coulter CEQ8000 určovány délky PCR produktů v multiplexech složených z několika lokusů.

V jednotlivých lokusech bylo v rámci našich 53 vzorků nalezeno od 1 do 13 alel – jeden z lokusů byl monomorfní v rámci všech analyzovaných vzorků. Největší variabilitu ukázala moravská populace na Boskovické nádrži, průměrný počet alel na lokus 3,86, poté severočeská populace z Jaroměře 3,43 alel na lokus. Zelenohorská populace 3 alely na lokus a Světlohorská populace 2,57 alel na lokus. Nejnižší průměrný počet alel na lokus měla populace z Landštejna 2,43.

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši o metodách molekulární biologie využívaných při studiu raků a zároveň ověřit možnost využití 8 dosud

popsaných mikrosatelitních markerů pro raka říčního. V laboratorních podmínkách se podařilo úspěšně optimalizovat použití sedmi mikrosatelitních markerů z osmi popsanych. Tyto mikrosatelitní markery by měly být použitelné pro populační studie, a nebo pro určování rodičovství (otcovství) v reprodukčních experimentech. V rámci ověřování použitelnosti mikrosatelitních markerů byly vyhodnocovány i některé základní populační charakteristiky, optimalizace a testování použitelnosti mikrosatelitních markerů však bylo prováděno jen na velmi nízkém počtu vzorků, proto tyto charakteristiky mají pouze velmi omezenou vypovídací schopnost.

Klíčová slova: mikrosatelit, alela, primer, PCR, fragmentační analýza, management ochrany

ABSTRACT

Possibility of utilization of molecular methods for study of population genetics of noble crayfish *Astacus astacus*

The noble crayfish (*Astacus astacus*) is one of two native species of crayfish living in this country who are all over our country strictly protecte, because they are identified as critically endangered species. In Europe it is one of five native species of crayfish, reported by IUCN as an endangered species that needs protection management. Its population was dramatically reduced due to crayfish plagues, which carry non-native crayfish species from North America, who were introduced in the past in Europe and later to the Czech Republic. In the past, have been isolated and described microsatellite markers for crayfish (Koiv et al., 2008a). As part of this work was tested using the eight microsatellite markers on samples obtained from the czech population of crayfish. Testing was performed on 53 samples from six populations of crayfish. Test samples were subjected to isolation of DNA from tissues of the third walking legs using DNA Lego Kit. Then test isolate DNA electrophoresis on agarose gel. Testing the temperature cycle of PCR amplification based on the original publication Koiv et al., (2008a), followed by PCR cycles were adjusted according to the quality of PCR products obtained in our laboratory. Primer annealing temperature 60°C was chosen as the best for six tested loci i.e. Aas 3666, Aas 3115, Aas 790, Aas 1198, Aas 3950 and Aas 766, for two other loci Aas 2489 and Aas 3040 was chosen 55°C annealing temperature. The resulting PCR products were tested on agarose gel and subsequently fragment analysis on an automatic sequencer Beckman Coulter CEQ8000 determining the lenght of PCR products in multiplex consisting of several loci.

In the individual loci were in our 53 samples found from 1 to 13 alleles – one of the loci was monomorphic in all samples analyzed. The moravian population in the Boskovice tank showed the greatest variability, the average number of alleles per locus 3.86, then the north bohemian population from Jaroměř 3.43 alleles per locus. Zelenohorská population of 3 alleles at a locus and Světlohorská population of 2.57 alleles per locus. The lowest average number of alleles per locus had a population from Landštejn 2.43.

The aim of this bachelor thesis was to develop a literature search of methods use in molecular biology studies of crayfish and also validate the use of eight microsatellite markers have described for the noble crayfish. In laboratory conditions were succesfully optimized using seven microsatellite markers from the eight described. These microsatellite markers should be used for population studies, or for determining parentage (paternity) in breeding experiments. The verification of the applicability of microsatellite markers have been evaluate and some fundamental characteristics of the population, usability testing and optimization of microsatellite markers, however, was done only on a very small number of samples, because these characteristics have only a very limited explanatory power.

Key words: microsatellite, allele, primer, PCR, fragment analysis, protection management