

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Geologie

Studijní obor: Geobiologie



Bc. Tereza Doulíková

**Krasová polje východní Hercegoviny z perspektivy ryby rodu *Telestes***  
***Telestes* Perspective on the Karstic Poljes of Eastern Herzegovina**

Typ závěrečné práce:

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Jasna Vukić, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Kristýna Eliášová

Praha, 2019

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 7. 2019

---

Podpis

**Poděkování:**

Tímto chci poděkovat své školitelce RNDr. Jasně Vukić, Ph.D. za odborný dohled při psaní této práce a čas, který mi prostřednictvím konzultací věnovala. Děkuji také konzultantce Mgr. Kristýně Eliášové za vstřícnost a cenné rady. Velké díky patří Mgr. Dovidě Barcýtě za zaučení a pomoc při práci v laboratoři a děkuji také ostatním členům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Na závěr chci poděkovat své rodině a přátelům za veškerou podporu, trpělivost a pozitivní energii, kterou mi věnovali při psaní této práce i během celého studia.

## Abstrakt

Oblast Dinárského krasu na Balkáně patří mezi centra diverzity s vysokým počtem sladkovodních endemických ryb. Hlavním důvodem vysokého stupně endemismu jsou četné paleoklimatické a geologické události, které měly vliv na formování celé oblasti. Toky krasových poljí Dinárské oblasti tvoří specifický ekosystém, kterému se některé druhy ryb přizpůsobily. Polje bývají pravidelně zaplavována, což vede k aktivaci různých podzemních cest a propojení poljí. Tyto ryby tráví část roku v povrchových a část v podzemních vodách a mohou využívat podzemní toky k migraci.

Cílem této diplomové práce je zhodnotit genetickou variabilitu dvou endemických druhů ryb rodu *Telestes* žijících v krasových poljích v oblasti východní Hercegoviny a zjistit přítomnost genového toku mezi jednotlivými populacemi důsledkem spojení podzemních toků. Pro tento účel byla izolována DNA 102 jedinců z pěti různých lokalit. Pro analýzy byl použit mitochondriální marker cytochrom *b* a 16 mikrosatelitů.

Výsledky poukazují na velmi nízkou genetickou variabilitu mezi druhy a populacemi. Analýza mitochondriálního markeru neprokázala propojení populací jednotlivých druhů, s výjimkou možného propojení populace *Telestes metohiensis* z řeky Mušnica s populací z řeky Zalomka, které sdílely jeden haplotyp. Jednotlivé populace jsou pravděpodobně velmi malé, proto pozorovaná heterozygotnost populací byla nižší než očekávaná a  $F_{IS}$  koeficient odhalil přítomnost inbreedingu v populacích. Odhadnutá hodnota efektivní velikosti byla nízká a populace jsou náchylné k demografickým změnám. Druhy jsou ohroženy především stavbou přehrad a kanálů, které brání pravidelným záplavám v poljích, ale také znečištěním a introdukcí nepůvodních druhů.

Klíčová slova: *Dinárský kras, krasová polje, sladkovodní ryby, Telestes, cytochrom b, mikrosatelity, genetická diverzita*

## Abstract

The Dinaric karst region in the Balkans is one of the hot spots of biodiversity with a high number of endemic freshwater fish. The major cause of the high degree of endemism are numerous paleoclimatic and geological events that have affected the formation of the entire area. Flows of karst poljes represent a specific ecosystem to which some fishes have adapted. The poljes have been periodically flooded and these floods may activate different underground channels, which lead to interconnection of poljes. These fish species spend a part of the year in surface water and a part in groundwater and they may use the underground flows between poljes for migration.

The aim of this thesis is to evaluate the genetic variability of two endemic fish species of the genus *Telestes* living in karst poljes in the region of eastern Herzegovina, and to detect a possible current gene flow between populations of these species due to the connection of underground flows. For this purpose, the DNA from 102 individuals from five different localities was isolated. The mitochondrial marker cytochrom *b* and 16 microsatellite loci were used for the analyses.

The results point to very low variability between species and populations. Based on mitochondrial marker analysis, no link between populations of the species was detected, with the exception of a possible connection to the *Telestes metohiensis* populations from the rivers Zalomka and Mušnica, which shared one haplotype. The populations are likely to be very small, therefore the observed heterozygosity was lower than expected and the  $F_{IS}$  coefficient revealed the presence of inbreeding in the populations. Estimated effective population size was low and populations are prone to demographic changes. Species are particularly threatened by building dams and canals, which prevent periodical flooding of poljes, but also by pollution and the introduction of non-native species.

Key words: *Dinaric karst, karst polje, freshwater fishes, Telestes, cytochrome b, microsatellites, genetic diversity*

## Obsah

<b>Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>1 Problematika</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 Geologie a geografie oblasti</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2 Krasová polje a jejich hydrologický režim</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3 Rod <i>Telestes</i></b> .....	<b>14</b>
1.3.1 <i>Telestes</i> na Balkánském poloostrově .....	14
1.3.2 <i>Telestes</i> v krasových poljích .....	15
<b>1.4 Migrace ryb a propojení poljí</b> .....	<b>19</b>
<b>2 Metodika</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 Sběr a lokality</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2 Molekulární metody</b> .....	<b>25</b>
2.2.1 Izolace DNA .....	25
2.2.2 Mitochondriální DNA.....	25
2.2.2.1 PCR .....	26
2.2.2.2 Elektroforéza .....	27
2.2.2.3 Purifikace .....	28
2.2.3 Analýza pomocí mikrosatelitů.....	<b>28</b>
2.2.3.1 PCR .....	29
2.2.3.2 Elektroforéza .....	30
2.2.3.3 Příprava vzorků na fragmentační analýzu .....	30
<b>3 Analýzy</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1 Úvod do populační genetiky</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2 Mitochondriální DNA</b> .....	<b>34</b>
<b>3.3 Analýza mikrosatelitů</b> .....	<b>35</b>
3.3.1 Klastrovací analýza.....	35
3.3.2 Hodnocení genetické diverzity .....	36
3.3.3 Efektivní velikost populace .....	37
<b>4 Výsledky</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1 Mitochondriální DNA</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2 Analýza mikrosatelitů</b> .....	<b>44</b>
4.2.1 Klastrovací analýza.....	44
4.2.2 Genetická variabilita populací .....	46
4.2.3 Odhad efektivní velikosti populace .....	52
<b>5 Diskuse</b> .....	<b>53</b>
<b>Závěr</b> .....	<b>60</b>
<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>61</b>
<b>Přílohy</b> .....	<b>69</b>
<b>Příloha č. 1</b> .....	<b>69</b>
<b>Příloha č. 2</b> .....	<b>71</b>
<b>Příloha č. 3</b> .....	<b>74</b>
<b>Příloha č. 4</b> .....	<b>79</b>

## Úvod

Fylogeografie je hraniční vědecká disciplína, která zahrnuje jak vývoj linií v čase, tak i v prostoru a za použití molekulárních metod se snaží odhladit příbuznost jedinců na daném území. Jejím hlavním cílem je porozumění historickým procesům, které ovlivnily geografickou distribuci alel, populací a druhů (Avise et al., 1987).

Sladkovodní ryby představují ideální model pro studium biogeografie. V důsledku sníženého migračního potenciálu jsou většinou vázány na určité toky a povodí, a jelikož nemohou překonávat slanou vodu, spolehlivě odrážejí geologický vývoj pevniny (Durand et al., 2002). V oblasti mediteránu se vyskytuje vysoký počet endemických druhů a evoluce ryb a jejich disperze je intenzivně studována od Pyrenejského poloostrova (např. Doadrio & Elvira, 2007, Doadrio & Carmona, 2006, Zardoya & Doadrio, 1998) přes západní Balkán (např. Bogutskaya & Župančič, 2003, Marková et al., 2010, Marčič et al., 2011) až po Řecko (např. Apostidilis et al., 1997, Doadrio & Carmona, 1998, Zardoya et al., 1999). Dříve se druhy a příbuzenské vztahy popisovaly na základě morfologie. Vývojem molekulárních technik od 80. let 20. století došlo k upřesnění fylogeneze a taxonomických vztahů nejen u ryb, ale i dalších živočichů.

Rod *Telestes* Bonaparte, 1837 z čeledi Leuciscidae reprezentuje vhodný model pro zkoumání historické biogeografie sladkovodních ryb Evropy (Buj et al., 2017). **Cílem** této práce je za pomoci molekulárně-genetických metod studovat genetickou strukturu a polymorfismus dvou druhů rodu *Telestes* vyskytujících se v krasových poljích oblasti východní Hercegoviny. Druhy byly nedávno popsány na základě morfologie (Bogutskaya et al. 2012). Výsledky mohou vést k lepšímu porozumění daného ekosystému a geologickým procesům, které se v této oblasti odehrály v minulosti. Případné odhalení migračních tras na základě studia genetické variability ryb nám pomohou zjistit, zda podzemní propojení mezi polji mohou využívat tyto druhy ryb. Znalostí genetické populační struktury těchto druhů můžeme také přispět k jejich ochraně, jelikož ryby jsou ohroženy budováním hrází a vodních kanálů, kvůli kterým se jejich prostor pro život narušuje.

V molekulárně-genetické laboratoři Národního muzea byla izolována DNA ze 102 jedinců z pěti různých lokalit. První část práce zahrnovala analýzu mtDNA, PCR, elektroforézu, purifikaci a následnou sekvenaci. Jako fylogenetický marker byl použit gen kódující protein cytochrom *b*. Seřazením sekvencí mtDNA a převedením sekvencí mtDNA na haplotypovou síť bylo zjištěno, jaká je struktura a genetická variabilita populací a druhů

na úrovni mtDNA. Program DNASP byl použit k výpočtu haplotypové a nukleotidové diverzity, ke zjištění počtu segregačních míst, počtu haplotypů a jejich rozřazení a k výpočtům testů neutrality. V programu Arlequin byla provedena analýza molekulární variance (AMOVA). Vnitrodruhová a mezidruhová vzdálenost byla vypočtena v programu MEGA.

Druhou částí byla analýza pomocí mikrosatelitů zahrnující PCR, elektroforézu, fragmentační analýzu a určení délky mikrosatelitových alel v programu GeneMarker<sup>TM</sup> AFLP/Geneotyping software. Hodnocení neznámé populační struktury bylo provedeno v programu Structure, následné vyhodnocení dat proběhlo v programu Structure Harvester, výsledky byly zprůměrovány programem CLUMPAK a graficky upraveny v programu Structure Selector. Další populační analýzy byly provedeny v programech GenePOP, FSTAT, GenAlEx a efektivní velikost populace byla odhadnuta v programu NeEstimator. Přítomnost nulových alel a stuttering byly ověřeny v programu Micro-checker.



# 1 Problematika

## 1.1 Geologie a geografie oblasti

Oblast Balkánského poloostrova je považována za ichtyologický “hotspot” biodiverzity. Nachází se zde vysoký počet sladkovodních endemických ryb, z nichž nejvíce zástupců náleží do skupiny Cyprinidae (Oikonomou et. al., 2014). Vysoký stupeň endemismu je způsoben významnými paleogeologickými událostmi, které zapříčinily izolaci druhů a ovlivnily jejich evoluci a speciaci. Počet endemických druhů roste ze severu na jih a od východu k západu, což je dáno výskytem Dinárských hor a Helenid, které brání migraci druhů směrem na sever a tvoří biogeografickou bariéru pro mediteránní druhy (Oikonomou et. al., 2014).

Dinárský horský systém neboli Dinaridy, v celkové rozloze asi 700 km<sup>2</sup>, lemují celé pobřeží Jaderského moře. Horské pásmo se jihovýchodním směrem rozšiřuje až na 150 km. Dinaridy se rozdělují podle Bonacciho (2015) na vnější část, kde vládne mediteránní, vlhké klima, a vnitřní zalesněnou část, pro kterou je typické klima kontinentální. Celá oblast se rozkládá přes území 7 států a zaujímá plochu přibližně 60 000 km<sup>2</sup> (Gams, 1969).

Součástí Dinarid je Dinárský kras, který je považován za nejkompexnější krasovou oblast na světě. Průměrná hloubka karcifikace se pohybuje od 250 do 300 m (Milanović, 2015). V oblasti východní Bosny a Hercegoviny může tloušťka karbonátových sedimentů přesáhnout až 3000 m.

Vznik krasu započal v průběhu mezozoika, kdy se na území dnešního Balkánu rozkládal oceán Tethys. Tropické podmínky vedly k vytvoření podmořské karbonátové platformy (Vlahović et al., 2005), která byla během svrchní křídý vyzdvižena a rozpraskána důsledkem intenzivní tektonické činnosti. Tektonické pohyby podsouvající se Africké desky pod Euroasijskou vyvolaly tzv. alpínské vrásnění, které vedlo k vyvrásnění Dinarid a zároveň k uzavření oceánu Tethys. Karbonátovou sedimentaci vystřídala během oligocénu a miocénu akumulace flyšových sedimentů, které se společně s klastickými sedimenty zachovaly na dně tektonických depresí neboli poljí. Krasové jevy pravděpodobně vznikaly v průběhu paleogénu a neogénu (Gams, 1969). Na různých místech byly nalezeny důkazy zalednění z období kvartéru, kdy hladina moře byla nižší než dnes a náhorní plošiny byly pokryty ledovci. Oblast patří mezi seismicky aktivní (Milanović, 2015) a geologické struktury jsou důsledkem tektonických pohybů Jaderské desky, která se podsouvá pod Dinárské pohoří.

Dinaridy tvoří rozvodí mezi Jaderským a Černým mořem. Většina podzemních toků ústí do Jaderského moře. Ponorné řeky a toky, které končí jako podmořské vyvěračky,

tzv. vrluje, charakterizují vápencovou část Dinárského krasu. Neustále kolísající podzemní hladina vody určuje propojení jednotlivých částí krasu a vodních toků (Bonacci, 2015).

## 1.2 Krasová polje a jejich hydrologický režim

Krasová polje jsou typickým znakem Dinárského krasu. Podle Milanoviće (2015) se jich v této oblasti nachází asi 130. Vyznačují se specifickým ekosystémem a mají pro oblast ekonomický význam. Rozloha poljí se pohybuje od 500 m<sup>2</sup> do 500 km<sup>2</sup>. Tyto deprese s příkrými svahy vznikly v důsledku tektonických pohybů, které zapříčinily kaskádovitý výzdvih oblasti, a tak se tato polje vyskytují v nadmořských výškách od 60 metrů do 1000 metrů a mají směr souběžný s pobřežím. Jejich největší koncentrace je v jižním Chorvatsku a jižní Bosně a Hercegovině (Milanović, 2015), kde jsou rozšířeny druhy ryb, kterých se týká tato diplomová práce.

Polje mohou být dočasně zaplavena, suchá, nebo se z nich stávají přírodní jezera (Bonacci, 1987). Hydrologický režim bývá podobný u všech poljí s periodickým tokem. Voda na jednom místě vyvěrá tzv. vyvěračkou z podzemí, pokračuje poljem jako povrchový tok a na jiném místě se ponorem ztrácí a přechází v tok podzemní. Podzemní tok může na jiném polji opět vyvěrat na povrch (Radulović, 2013). Při dostatku srážek se objevují sezónní toky a dochází k pravidelným záplavám. Polje mohou být zaplavena tři až sedm měsíců, především od října do dubna (Bonacci et al., 2013). Záplavy obnovují funkci ekosystému a mají pozitivní vliv na ekologickou variabilitu, diverzitu i celkovou produktivitu oblasti (Bonacci, 2015).

Východní oblast Bosny a Hercegoviny patří mezi oblasti s největším úhrnem srážek v Evropě a hladina podzemní vody zde může kolísat až o 300 m (Milanović, 2015). Rozsáhlý podzemní systém puklin a kanálů umožňuje vodě proudit a aktivovat různé vodní cesty v závislosti na výšce vodní hladiny (Bonacci et al., 2013). Toho využívají i některé druhy ryb, které se tomuto režimu přizpůsobily a mezi polji migrují (Palandačić et al., 2012). Většina poljí spadá do odtokového systému řeky Neretvy a tvoří propojenou říční síť v podzemí. V rámci Neretvy náleží polje do povodí řeky Buna (Slato, Nevesinjsko), Bregava (Lukavačko, Dabarsko) a Trebišnjica (Gatačko, Fatničko a další). Momentálně žádné polje není přímo povrchově napojeno na Neretvu nebo její přítoky (Bogutskaya et al., 2012).

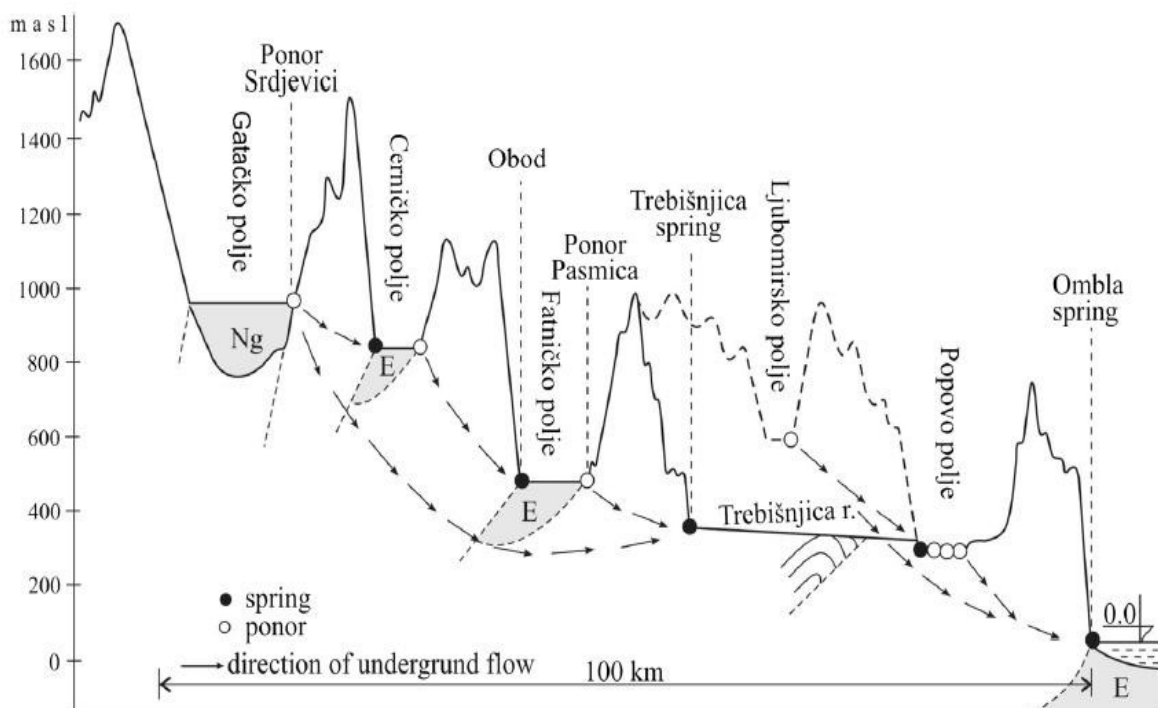
**Dabarsko polje** se nachází ve východní Hercegovině v nadmořské výšce od 470 do 560 metrů. Kolem 20 km dlouhé a 1–3 km široké polje leží přibližně 400 m pod poljem Nevesinjsko. V současné době je Dabarsko polje uzavřenou depresí, která nemá povrchový odtok. Všechny vody protékají podzemím směrem k řece Bregavě. Řeka Vrijeka je jediným permanentním tokem v polji. Tok měří jen 2,5 km a ztrácí se ponorem Ponikva, nejnižším bodem v polji, který leží ve výšce 471 m n. m. (Milanović 1981, 2006).

**Nevesinjsko polje** leží v jihovýchodní Hercegovině a s rozlohou 170 km<sup>2</sup> je největším v zemi. Nachází se ve výšce 800 až 870 m n. m. Řeka Zalomka pramení z polje Gatačko a protéká poljem Nevesinjsko, kde končí ponorem Biograd. Permanentní tok je přítomen pouze mezi vesnicí Fojnica a Črni Kuk. Podél řeky u Črniho Kuku se nachází mnoho ponorů. Nejvíce se voda ztrácí v oblasti Rilja, kde je aktivní 213 dní v roce (Milanović 1981, 2006). Během teplého období vodní tok Zalomky v polji mizí. Polje je propojeno s poljem Slato úzkým korytem, které je ale momentálně suché (Bogutskaya et al., 2012).

**Cerničko polje** patří mezi menší polje s rozlohou 5,5 km<sup>2</sup>. Leží 13–14 km jižně od polje Gatačko. Nejnižším bodem je ponor Jašovica v nadmořské výšce 810 metrů. Na severu se nachází prameny, které během léta značně redukují svoji kapacitu (Ballian, 2019). Poljem protéká řeka Ključka, známá pod názvem Cernica.

**Gatačko Polje**, o rozloze 37,6 km<sup>2</sup>, leží v severní Hercegovině v nadmořské výšce 840 metrů a zahrnuje dvě vzájemně propojené geomorfologické jednotky: samotné Gatačko polje a Malé Gatačko polje. Největší ponor leží v polji Malé Gatačko podél 8 km dlouhého tektonického zlomu ve výšce 936 m n. m. Téměř celá oblast, až na malou část na východě, náleží povodí řeky Trebišnjica. Nejdelší podzemní tok o délce 35 km je mezi ponorem Srdevići a pramenem řeky Trebišnjica. Hlavním tokem v polji je řeka Mušnica s přítokem Gračanica. Řeku Mušnica tvoří tři toky – Vrba, Uljinski Potok a Jesenički Potok, přitékající z hor Cermer a Lebršnik. Mušnica teče z východní části do západní, podél západní hranice teče jihovýchodně a poté přechází v podzemní tok ponorem Šabanov. Tok řeky Mušnica se znovu objevuje v polji Cerničko jako řeka Cernica. Pramení z jeskyně Vilina Pečina a po 300 metrech končí ponorem (Bogutskaya et al., 2012). Během srážkového období jsou řeky Mušnica a Zalomka kompletně propojeny (Milanović & Kukurić, 2013).

**Konavovsko polje** je ve výšce 60 m n. m. nejnižše položeným poljem v oblasti. Nachází se v jižním Chorvatsku. Má rozlohu 48 km<sup>2</sup> a leží jižně od ostatních zmíněných poljí. Nachází se podél významného zlomu. Hlavním tokem je řeka Ljuta s přítoky Konavočica a Opačica. Nejdělsím tokem je potok Konavoska Ljuta (Bogutskaya et al., 2012). Za přírodních podmínek docházelo k dočasné záplavě polje, ale v roce 1959 byl vybudován 1 944 m dlouhý tunel Popovići, který záplavám brání (Jelić & Jelić, 2015, Bogutskaya et al., 2012). Polje je tunelem přímo napojeno na Jaderské moře, ale momentálně je tunel mezi poljem a mořem vyschlý (Milanović, 2015).



**Obr. 1** Zjednodušený příčný profil jihovýchodní oblasti poljí (převzato z Milanović, 2015). Plná kolečka značí prameny, prázdná ponory. Šípkami jsou značeny směry podzemních toků. Jednotlivá polje se nachází v různých nadmořských výškách v oblasti Dinárského krasu. Nejvýše položeným poljem je Gatačko, které je podzemními toky přímo i nepřímě, přes polje Cerničko a Fatničko, napojeno na řeku Trebišnjica.



**Obr. 2** Jihovýchodní oblast poljí s vodním systémem řeky Trebišnjica (převzato z Milanović & Kukurić, 2013). Plná kolečka značí prameny, poloplná ponory, červená města, oblouky znázorňují přehrady a čtverce elektrárny. Šípkami s přerušovanou linií je naznačen směr podzemního toku. Řeky jsou značeny plnými liniemi, dočasné povrchové toky tenkými přerušovanými liniemi a silnějšími přerušovanými liniemi jsou značeny tunely.

### 1.3 Rod *Telestes*

Systematické zařazení rodu *Telestes*

Kmen: Chordata (strunatci)

Podkmen: Vertebrata (obratlovci)

Nadtřída: Osteichthyes (ryby)

Třída: Actinopterygii (paprskoploutví)

Nadřád: Teleostei (kostnatí)

Řád: Cypriniformes (máloostní)

Čeleď: Leuciscidae (jelcovití)

Rod: *Telestes* (jelec)

Rod *Telestes* Bonaparte, 1837 náleží do čeledi Leuciscidae a řádu Cypriniformes. Systematika rodu *Telestes* dlouho nebyla jasná a byla předmětem diskuse (Kottelat & Freyhof, 2007). Druhy dříve náležely do čeledi Cyprinidae a podčeledi Leuciscinae, ale v roce 2018 došlo k povýšení této podčeledi na čeleď Leuciscidae (Schonhuth et al, 2018). Většina druhů rodu *Telestes* byla dříve zařazena do rodu *Leuciscus* (Kottelat & Freyhof, 2007), v českém názvosloví se oba rody nazývají jelec. Původně byli někteří zástupci rodu *Telestes* spolu se zástupci dalších rodů řazeni do rodů *Phoxinellus* nebo *Paraphoxinus*. V roce 2006 se rozřešila taxonomie druhů z Balkánu dříve řazených do rodu *Phoxinellus* na základě výsledků molekulárního výzkumu založeného na mitochondriálním genu cytochromu *b* a morfologických studií. Bylo zjištěno, že rod *Phoxinellus* tedy zahrnuje tři evoluční linie. Tři druhy byly zařazeny do rodu *Telestes* a zbývajících sedm druhů do dalších dvou rodů (Freyhof et al., 2006). V roce 2010 bylo toto rozdělení potvrzeno další molekulárně fylogenetickou studií využívající i nukleární markery (Perea et al., 2010).

#### 1.3.1 *Telestes* na Balkánském poloostrově

Máloostní mají původ v Asii a jejich disperze byla umožněna pravděpodobně přes Balkánsko-anatólsko-iránskou plošinu, která vznikla na počátku oligocénu před 33 milióny let (Perea et al., 2010). Na vývoji druhů se podílely mladší paleogeografické události, především vznik rozlehlého jezerního systému během raného a středního miocénu (20–12 mil. let), vznik pevninských mostů a následný výzdvih Dinárských Alp před 12,5 mil. let (Perea et al., 2010).

Rod *Telestes* celkově zahrnuje 14 pojmenovaných druhů (Buj et al. 2017), avšak skutečná diverzita je vyšší (Buj et al. 2019). Většina druhů se vyskytuje na Balkánském poloostrově a jsou většinou endemické pro malé oblasti. Největší diverzita je v Dinárském krasu. Tvoří jednu monofyletickou skupinu, která pravděpodobně vznikla na jihovýchodním Balkáně a postupně se rozšířila do Dalmácie (Freyhof et al., 2006). Začátkem miocénu jižní Evropa tvořila souostroví. Odhaduje se, že rod *Telestes* mohl vzniknout na jednom z ostrovů, na který se jeho předek dostal dřívějším spojením s pevninou. Před 16 mil. let se některé ostrovy spojily kontinentálními mosty s pevninou a došlo ke kolonizaci východního Balkánu, čemuž odpovídá divergence některých druhů (*T. pleurobipunctatus*, *T. beoticus*). Současně došlo také k propojení severního Balkánu se střední Evropou, což umožnilo spojení druhu *T. souffia* s druhy mediteránními. Následná transgrese (15,9 až 13,8 mil. let) měla za následek izolaci druhů od zbytku Evropy. Během tohoto období došlo na jednom z jižních ostrovů k vysoké diverzifikaci a objevil se předek druhů *T. metohiensis*, *T. dabar* a *T. miloradi*. Vznik horské bariéry, lokální tektonická aktivita a další geologické procesy umožnily vznik druhů, které jsou i přes malou geografickou vzdálenost geneticky vzdáleny (Buj et al., 2017).

### 1.3.2 *Telestes* v krasových poljích

Některé druhy tohoto rodu, místními nazývané gaovice, se přizpůsobily hydrologickému režimu krasových poljí. *Telestes metohiensis* (Steindachner, 1901), *Telestes dabar* Bogutskaya, Zupančič, Bogut & Naseka, 2012 a *Telestes miloradi* Bogutskaya, Zupančič, Bogut & Naseka, 2012 v této oblasti dosahují velikosti maximálně 10 centimetrů a vyznačují se šupinami, které jsou hluboce zapuštěny v kůži a jsou redukovány (Bogutskaya, 1990, Harris, 2012). Je pro ně charakteristický černý pruh podél postranní čáry. Žijí v říčních chladnějších vodách a některé druhy, vzhledem k malému areálu výskytu, patří mezi vysoce ohrožené (Freyhof et al., 2006). Největší nebezpečí pro ně představuje budování kanálů, které mají zabránit záplavám a kvůli kterým dochází k vysychání poljí (Bogutskaya et al., 2012).

*Telestes metohiensis* (Steindachner, 1901) (dříve značen jako *Paraphoxinus*, *Phoxinellus metohiensis*) se vyskytuje v poljích Nevesinjsko, Gatačko a Cerničko ve východní Bosně a Hercegovině. Jeho velikost se pohybuje okolo 100 mm. Drobné šupiny po celém těle se nepřekrývají. Tmavý pruh je široký a prodloužený až k ocasnímu násadci, kde přechází do pigmentované části. Světlá část mezi pruhy se liší délkou i šířkou, nejmenší bývá u samiček.

Šupiny jsou u tohoto druhu dále od sebe a nepřekrývají se téměř po celém těle kromě postranní čáry. Šupiny pod a nad postranní čarou jsou značně menší než na ní a mají kulatý tvar na bocích a ocasním násadci. Dospělci i mladší jedinci mají zeleno-bronzově zbarvené celé tělo.

*Telestes metohiensis* žije v potocích s čistou vodou a v zimě se přemísťuje do podzemních vod (Kottelat & Freyhof, 2007). Mezinárodní organizací IUCN (International Union for Conservation of Nature) je tento druh zařazen do kategorie zranitelný (vulnerable).



**Obr. 3** *Telestes metohiensis* (převzato z Kottelat & Freyhof, 2007)

*Telestes dabar* Bogutskaya, Zupančić, Bogut & Naseka, 2012 se vyskytuje v řekách Vrijeka a Opačica v Dabarském polji ve východní Hercegovině. Dosahuje velikosti 45 mm. Nepřekrývající šupiny pokrývají téměř celé tělo kromě ocasního násadce a oblasti postranní čáry, která je neúplná a přerušovaná tmavým pruhem. Šupiny jsou nepravidelně rozmístěny, ale blízko u sebe. Na břišní straně se nachází tmavý pruh, který se táhne od oka až po řitní ploutev, někdy bývá prodloužen až k ocasnímu násadci v podobě teček. *Telestes dabar* se podobá druhu *T. metohiensis*, ale má užší hlavu. Také se liší přerušovanou postranní čarou se 24–69 šupinami (obvykle 54–65) (vs. nepřerušovaná čára s 58–65 šupinami). Liší se také černobílým zbarvením, pouze konce ploutví jsou nažloutlé a žlutá pigmentace se také objevuje u dospělých jedinců na duhovce. *Telestes dabar* se odlišuje od druhu *T. miloradi* šupinami na postranní čáře, které jsou větší na obou stranách (vs. stejně velké). Žije v čisté a mělké vodě a pravděpodobně přečkává v podzemí letní i zimní období (Bogutskaya et al., 2012).





**Obr. 4** *Telestes dabar* (foto Jasna Vukić)

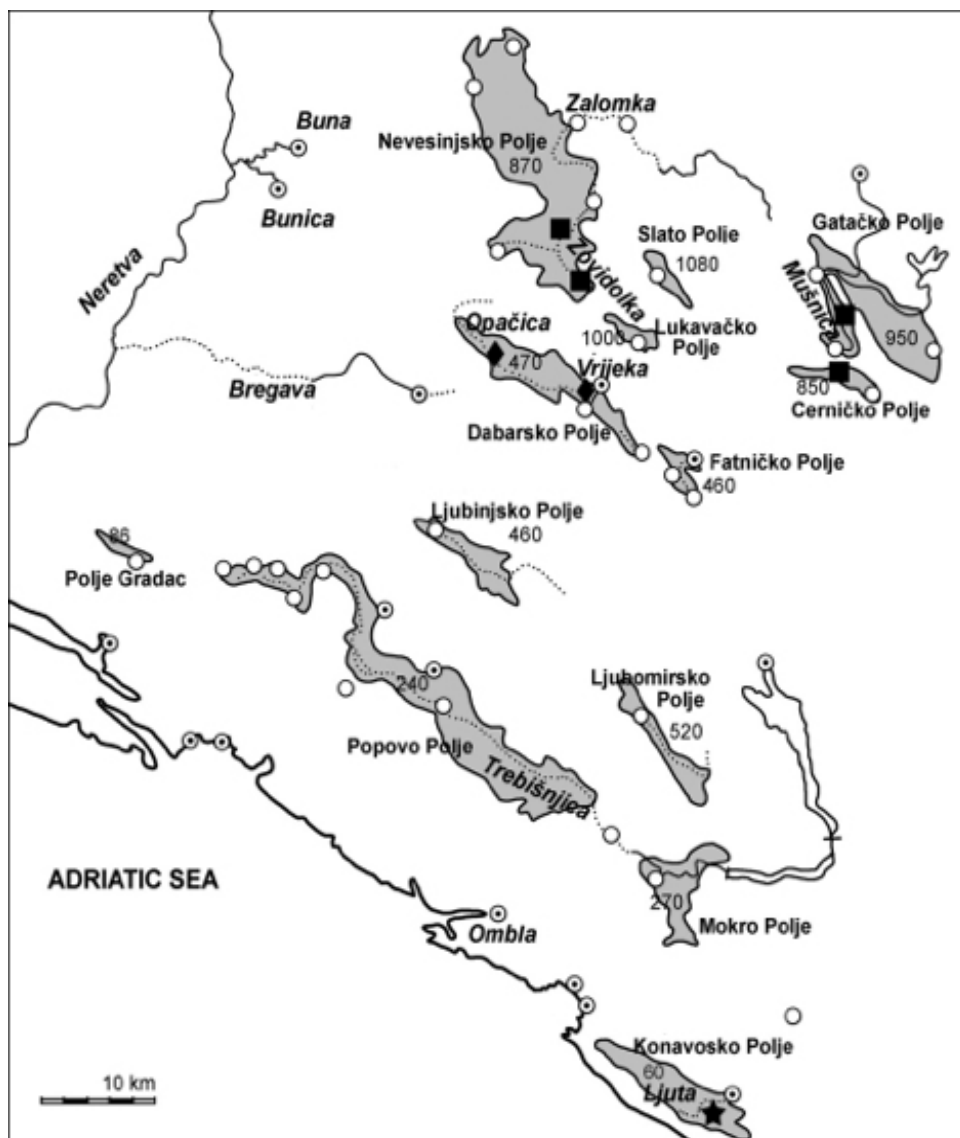
*Telestes miloradi* Bogutskaya Zupančič, Bogut & Naseka, 2012 byl nalezen pouze v řece Ljuta v Konavovském polji. Tento druh byl dříve popsán jako *T. metohiensis*. Bogutskaya et al. (2012) měli k dispozici exempláře z roku 1901 z Národního Muzea ve Vídni a na základě těchto exemplářů popsali *T. miloradi* jako nový druh. Tento druh byl dlouhou dobu považován za vyhynulý (Mrakovčić et al., 2004), ale v letech 2013 a 2014 probíhal intenzivní výzkum oblasti a *T. miloradi* byl znovu v polji objeven (Jelić & Jelić, 2015).

Jeho maximální délka dosahuje 66,7 mm (Bogutskaya et al., 2012). *Telestes miloradi* se dá rozlišit od druhů *T. metohiensis* a *T. dabar* mírně prohnutým, relativně úzkým tmavým pruhem na břišní straně táhnoucím se od hlavy až k ocasnímu násadci. Liší se od těchto dvou druhů také šupinami, které se pravidelně překrývají, především na přední straně boku a ocasním násadci. Šupiny jsou stejně velké na postranní čáře, pod ní i nad ní. Postranní čára je kompletní. Přítomnost překrývajících se šupin je typickým pleziomorfním znakem této skupiny (Bogutskaya 1990).



**Obr. 5** *Telestes miloradi* (převzato z Bogutskaya et al., 2012)

Další druhy rodu *Telestes*, které se vyskytují v krasových poljích Dinárského krasu, jsou: *T. croaticus*, *T. fontinalis*, *T. polylepis*, *T. turskyi* a *T. karsticus*. Nejsou blíže příbuzné druhům, o kterých pojednává má diplomová práce (Buj et al., 2017).



**Obr. 6** Mapa rozšíření druhu *T. dabar* (diamant), *T. miloradi* (hvězda) a *T. metohiensis* (čtverec) v krasových poljích východní Hercegoviny a okolí Dubrovníku, prázdná kolečka znázorňují ponory, „plná kolečka“ prameny (převzato z Bogutskaya et al., 2012).

#### 1.4 Migrace ryb a propojení poljí

Výše zmíněné druhy, spolu s některými zástupci rodů *Delminichthys* a *Phoxinellus*, žijí část roku v podzemních a část roku v povrchových vodách a mohou využívat pravidelně zaplavovaná místa krasu k migraci. U těchto druhů došlo k morfologické adaptaci, která se týká redukce šupin, a změně komplexnosti ošupení (Palandačić et al., 2012). Podzemní jezera, kde ryby přečkávají suché období, mohou být propojena přírodními sifony tzv. estavelami. Ty se během záplav otevřou a přebírají funkci toků a vytlačují vodu směrem do poljí (Milanović, 2015). Estavely mohou způsobit protiproud, a tím umožnit migraci i z nižších částí do vyšších (Palandačić et al., 2012).

Migrace byla potvrzena a nejvíce zkoumána u druhu *Delminichthys adspersus* obývajícím Červené jezero v jižním Chorvatsku, které je několika toky napojeno na říční systém řek Vrljika, Tihaljina a Matice, u dalších druhů zatím zkoumána nebyla (Zupančič & Bogutskaya, 2002). Je možné, že některé podzemní toky umožňovaly migraci ryb v minulosti, ale populace ryb se v průběhu času kompletně izolovaly a dnes už k migraci nedochází, příkladem je druh *Salmo obtusirostris* (Snoj et al. 2008).

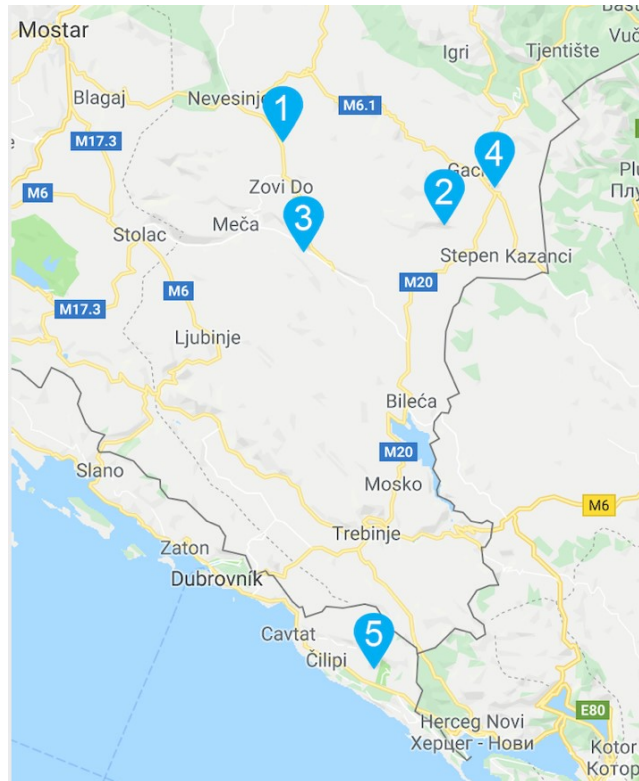
## 2 Metodika

### 2.1 Sběr a lokality

Odchyt ryb probíhal v letech 2006 a 2015 pomocí elektrolovu. Část levé prsní ploutve byla ustřižena a uložena do 96% ethyl-alkoholu. Lokality (obr. 7) odpovídaly běžnému rozšíření jednotlivých druhů (Bogutskaya et al., 2012).

V této práci byla izolována DNA ze 102 jedinců ryb třech druhů rodu *Telestes* (tab. 1). Druh *T. metohiensis* byl reprezentován 70 jedinci, z toho 30 jedinců pocházelo z řeky Zalomka v polji Nevesinjsko, 31 z řeky Cernica v polji Cerničko a 9 z řeky Mušnica v polji Gatačko. 28 jedinců druhu *T. dabar* pocházelo z řeky Vrijeka z polje Dabarsko. *Telestes miloradi* z řeky Ljuta v Konavovském polji byl zastoupen pouze 4 jedinci a byl přidán jen pro orientační srovnání, jelikož předběžné výsledky analýzy genomických nukleárních dat ukázaly, že je *T. miloradi* blízce příbuzný *T. dabar* (J. Vukić, osobní sdělení). Výsledky u tohoto druhu nejsou spolehlivé kvůli nedostatečnému počtu jedinců. Kousek pravé prsní ploutve ze čtyř jedinců byl poskytnut kolegy z Univerzity v Záhřebu. Nebylo možné získat více materiálu, jelikož se jedná o kriticky ohrožený druh.

Do analýz cytochromu *b* byly použity sekvence z 87 jedinců a do analýzy mikrosatelitů bylo zahrnuto 100 jedinců. Lokality výskytu a sběru materiálu jsou označeny na mapě (obr. 7). Seznam vzorků, přesné lokality, GPS souřadnice, datum sběru a haplotypy jsou uvedeny v tabulce č. 1.



**Obr. 7** Lokality výskytu a sběru materiálu. 1 – Zalomka, Nevesinjsko polje, 2 - Cernica, Cerničko polje, 3 – Vrijeka, Dabarsko polje, 4 – Mušnica, Gatačko polje, 5 – Ljuta, Konavovsko polje. Stáhnuto z Google maps a upraveno v programu Inkscape.

**Tab. 1** Seznam vzorků, haplotypy cytochromu *b*, jednotlivé lokality, kde byly ryby chyceny, datum sběru a GPS souřadnice. \* = chybí analýza mikrosatelitů.

Kód	Druh	Haplotyp	Lokalita-polje	Řeka	Datum sběru	Souřadnice
TMIL 1	<i>T. miloradi</i>	Hap 1	Konavovsko	Ljuta	18.9.2014	N 42°32'34" E 18°19'48"
TMIL 2	<i>T. miloradi</i>	Hap 1				
TMIL 3	<i>T. miloradi</i>	-				
TMIL 4	<i>T. miloradi</i>	-				
A1825	<i>T. metohiensis</i>	Hap 2	Gatačko	Mušnica	12.7.2006	N 43° 8'16" E 18°34'17"
A1826	<i>T. metohiensis</i>	Hap 3				
A1828	<i>T. metohiensis</i>	Hap 4				
A1827	<i>T. metohiensis</i>	Hap 5				
A1829	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
A1831	<i>T. metohiensis</i>	Hap 7				
A1832	<i>T. metohiensis</i>	Hap 8				
A1833	<i>T. metohiensis</i>	Hap 9				
A1834	<i>T. metohiensis</i>	Hap 10				
TEME 1	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
TEME 2	<i>T. metohiensis</i>	-				
TEME 3	<i>T. metohiensis</i>	-				
TEME 4	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
TEME 5	<i>T. metohiensis</i>	Hap 11				
TEME 6	<i>T. metohiensis</i>	Hap 12				
TEME 7	<i>T. metohiensis</i>	Hap 11				
TEME 8	<i>T. metohiensis</i>	-				
TEME 9	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
TEME 10	<i>T. metohiensis</i>	Hap 11				
H458	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6	Nevesinjsko	Zalomka	3.7.2015	N 43°12'5" E 18°12'22"
H459	<i>T. metohiensis</i>	Hap 11				
H460	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
H461	<i>T. metohiensis</i>	Hap 11				
H462	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
H463	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
H464	<i>T. metohiensis</i>	-				
H465	<i>T. metohiensis</i>	Hap 11				
H466	<i>T. metohiensis</i>	Hap 13				
H467	<i>T. metohiensis</i>	-				

H468	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
H469	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
H470	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
H471	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
H472	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
H473	<i>T. metohiensis</i>	Hap 14				
H474	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
H475	<i>T. metohiensis</i>	-				
H476	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
H477	<i>T. metohiensis</i>	Hap 6				
CERN 1	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
CERN 2	<i>T. metohiensis</i>	Hap 16				
CERN 3	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
CERN 4	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
CERN 5	<i>T. metohiensis</i>	Hap 16				
CERN 6	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
CERN 7	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
CERN 8	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
CERN 9	<i>T. metohiensis</i>	Hap 16				
CERN 10	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
CERN 11	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
CERN 12	<i>T. metohiensis</i>	Hap 16				
H512	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15	Cerničko	Cernica	5.7.2015	N 43° 5'31" E 18°29'5"
H513	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
H514	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
H515	<i>T. metohiensis</i>	Hap 17				
H516	<i>T. metohiensis</i>	Hap 16				
H517	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
H518	<i>T. metohiensis</i>	Hap 16				
H519	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
H520	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
H522	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
H523	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
H524	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
H525	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
H526	<i>T. metohiensis</i>	Hap 16				
H527	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
H528	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
H529	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				
H530	<i>T. metohiensis</i>	Hap 15				

H531	<i>T. metohiensis</i>	Hap 18				
TEDA 1	<i>T. dabar</i>	Hap 19				
TEDA 2	<i>T. dabar</i>	Hap 19				
TEDA 3	<i>T. dabar</i>	-				
TEDA 4	<i>T. dabar</i>	Hap 20				
TEDA 5	<i>T. dabar</i>	Hap 21				
TEDA 6	<i>T. dabar</i>	Hap 20				
TEDA 7	<i>T. dabar</i>	Hap 19				
TEDA 8	<i>T. dabar</i>	-				
TEDA 9	<i>T. dabar</i>	Hap 20				
TEDA 10	<i>T. dabar</i>	Hap 22				
A1776*	<i>T. dabar</i>	-	Dabarsko	Vrijeka	4.7.2015	N 43° 3'32" E 18°14'39"
A1777	<i>T. dabar</i>	Hap 22				
A1778*	<i>T. dabar</i>	Hap 22				
A1779	<i>T. dabar</i>	Hap 22				
H487	<i>T. dabar</i>	Hap 19				
H488	<i>T. dabar</i>	-				
H489	<i>T. dabar</i>	-				
H490	<i>T. dabar</i>	Hap 20				
H491	<i>T. dabar</i>	Hap 19				
H492	<i>T. dabar</i>	Hap 20				
H493	<i>T. dabar</i>	Hap 22				
H494	<i>T. dabar</i>	Hap 22				
H495	<i>T. dabar</i>	Hap 22				
H496	<i>T. dabar</i>	Hap 20				
H497	<i>T. dabar</i>	Hap 20				
H498	<i>T. dabar</i>	-				
H499	<i>T. dabar</i>	Hap 22				
H500	<i>T. dabar</i>	-				



## 2.2 Molekulární metody

V této diplomové práci byly použity tyto molekulárně-genetické laboratorní metody:

- Izolace DNA
- PCR (polymerázová řetězová reakce) – amplifikace úseků DNA (mtDNA a mikrosatelitů)
- Elektroforéza na agarózovém gelu
- Purifikace
- Sekvenace
- Fragmentační analýza

### 2.2.1 Izolace DNA

Postup izolace DNA proběhl standardním způsobem podle protokolu *Genomic DNA Mini Kit (Geneaid Biotech)*. Některé kroky byly mírně poupraveny (příloha 1). Vzorčky DNA byly uchovávány při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.2 Mitochondriální DNA

Mitochondriální (mtDNA) je kruhová molekula nacházející se v mitochondriích. Obsahuje kolem 16 500 párů bází (Brown et al., 1979) a kóduje 37 genů:

- 22 genů pro tRNA
- geny pro rRNA (12S a 16S-RNA)
- 13 různých proteinů

Má vysokou mutační rychlost, která je způsobena volnými radikály vznikajícími v důsledku energetického metabolismu (Wilson & Cowey, 1985). Chybí zde také opravné mechanismy pro chyby vznikající při replikaci a poškozené úseky DNA (Clayton, 1982). MtDNA je haploidní, nedochází u ní k rekombinaci a přenáší se pouze po mateřské linii, jedná se o tzv. maternální dědičnost (Kondo et al., 1990).

Pro analýzu DNA byl vybrán mitochondriální marker cytochrom *b*. Protein cytochrom *b* je součástí dýchacího řetězce v mitochondriích eukaryotických buněk, kde se podílí na vytváření protonového gradientu. Cytochrom *b* je velmi vhodný genetický marker používaný především pro fylogenetické studie (Perea et al., 2010).

### 2.2.2.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je molekulární metoda, při které dochází k rychlému zmnožení, tzv. amplifikaci, specifických úseků DNA. Metoda je založena na stejném principu, při kterém dochází k replikaci DNA v buňce. Zmnožený úsek DNA je na každém konci ohraničen tzv. primery, což jsou krátké fragmenty DNA nejčastěji o délce 20–25 nukleotidů. Tato metoda využívá cyklické střídání teplot, které umožňují denaturaci, nasednutí primeru a syntézu DNA. Pro syntézu DNA se využívá termostabilní *Taq* polymeráza, která je izolována z bakterie *Thermus aquaticus* a která odolává vysokým teplotám při reakci.

Při první fázi, kdy probíhá denaturace, je dvouvláknová DNA zahřívána na teplotu 94–98 °C. Dochází tak k narušení vodíkových můstků a z dvouvláknové šroubovice se stává jednovláknová. Během další fáze, tzv. annealingu, nasedají primery ke koncům amplifikovaného úseku a začíná probíhat syntéza DNA ve směru od 5' ke 3' konci, tzv. elongace. Vzniká nové vlákno, které komplementárně přirůstá k původnímu vláknu DNA. Tyto kroky se neustále opakují. V každém cyklu z jednoho úseku DNA vznikají dvě nové kopie. Po 35 cyklech vzniká 235 molekul DNA.

Při každé PCR byla použita negativní kontrola, tzv. blank, kdy nebyla do reakční směsi přidána DNA, aby se odhalila případná kontaminace. PCR probíhala v objemu 25 µl reakční směsi.

Obsah reakční směsi:

- *PPP Master Mix (Top-Bio)*.....12,5 µl
- *PCR H<sub>2</sub>O*.....9,2 µl
- *od každé z dvojice primerů*.....0,65 µl
- *DNA*.....2 µl

Pro amplifikaci cytochromu *b* byly použity primery GluF a ThrR (tab. 2). V případě neúspěšné PCR reakce byly pro amplifikaci použity tyto primery v kombinaci s vnitřními Cb4-Glu a PhoxThr. Reakční podmínky PCR jsou uvedeny v tabulce č. 3. Pro amplifikaci byl použit GeneQ™ Thermal Cycler.

**Tab. 2** Přehled použitých primerů pro amplifikaci a sekvenaci cytochromu b

primer	směr	5'→ 3'	publikace
GluF	F	AAC CAC CGT TGT ATT CAA CTA CAA	Machordom & Doadrio (2001)
ThrR	R	AAC CAC CGT TGT ATT CAA CTA CAA	Machordom & Doadrio (2001)
CB4-Glu	F	AAC CAC CGT TGT ATT CAA CTA CAA	nepublikováno
Phox-Thr	R	AGG AGG AAR TGR AAT GCG AA	nepublikováno

\*F=forward/přímý, R=revers/zpětný

**Tab. 3** Program PCR pro amplifikaci cytochromu b

reakce	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	94°C	3 min	1
denaturace	92°C	45 s	35
nasednutí primerů (annealing)	48°C*	1 min 30 s	
syntéza DNA (elongace)	72°C	1 min 45 s	
konečná elongace	72°C	7 min	1
zchlazení	4°C		

\*vnitřní primer PhoxThr při 52°

#### 2.2.2.2 Elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda, která využívá k dělení látek jejich odlišnou pohyblivost ve stejnosměrném elektrickém poli. Záporně nabitě molekuly DNA se pohybují směrem k anodě a jsou separovány podle rychlosti a velikosti molekul na gelu, tzn. malé fragmenty putují dále, jelikož se pohybují rychleji. Kontrola PCR proběhla v 1% agarózovém gelu. K určení velikosti byl použit 100 bp Plus DNA Ladder. Pro zviditelnění DNA byl použit ethidium bromid (C<sub>21</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>Br) nebo GelRed®. Elektroforéza byla nastavena na hodnoty 400 mA a probíhala při 110 V po dobu 35 minut. Poté byl gel přemístěn do UV-transluminátoru, kde byl pod UV zářením vizualizován. Pro následné zachycení a úpravu získaného obrazu byl použit program GelCapture.

### 2.2.2.3 Purifikace

Po úspěšné PCR reakci byly vzorky vyčištěny ethanolovou precipitací. V prvním kroku se PCR produkty doplnily o příslušné množství vody do 100  $\mu\text{l}$ . Do každé zkumavky bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  octanu sodného. V dalším kroku bylo přidáno dvojnásobné množství (200  $\mu\text{l}$ ) 99% vymraženého ethanolu. Vzorky se protřepaly a vložily na 10 minut do centrifugy při 14 000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl supernatant opatrně odsát. Poté bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  75% ethanolu a vzorky byly po protřepání opět centrifugovány 10 minut při 14 000 otáčkách za minutu. Tekutina byla opět odsáta a zkumavky byly vysušeny ve vakuové centrifuze při teplotě 40 °C během 15–20 minut.

Následně byla získaná DNA rozpuštěna v příslušném množství ddH<sub>2</sub>O (10-25  $\mu\text{l}$ , podle vizualizace produktů na elektroforéze). Koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop. Sekvenační reakce provedla firma Macrogen a sekvenace byla provedena od obou konců 5' a 3' (forward i revers).

### 2.2.3 Analýza pomocí mikrosatelitů

Mikrosatelity jsou v dnešní době hojně využívané genetické markery. Jedná se o jednoduché opakující se sekvence o délce šesti a více nukleotidů nacházející se především v nekódujících oblastech genomu (Eisen, 1999), mohou se však objevit i v kódujících oblastech (Toth et al., 2000). V jaderné DNA se u každého diploidního organismu nalézají dvě kopie každého mikrosatelitu a u každého jedince můžeme odhalit dvě alely. Jsou vysoce polymorfní a jednotlivé alely se mohou lišit počtem opakování repetitivního motivu. Nejčastěji se nacházejí v genomech živočichů dinukleotidové repetice s motivy AC nebo AT (Toth et al., 2000).

Tyto repetitivní sekvence vznikají při replikaci sklouzáváním enzymu DNA polymerázy po vlákně DNA, tzv. polymerase slippage nebo slipped strand mispairing (Sehn, 2015). Enzym má tendenci sklouzávat po templátu zpět, především na krátkých, opakujících se sekvencích, a tak může dojít k delecí či insercím části sekvence. Tento proces je považován za hlavní zdroj mikrosatelitové variability (Schlötterer & Tauz, 1992).

Analýza mikrosatelitů našla uplatnění v populačně-genetických studiích při sledování genetické variability v rámci jednoho druhu i při rekonstrukci fylogeneze blízkých příbuzných druhů (Zhu et al. 2000). Velkou výhodou je jejich kodominantní povaha, která umožňuje snadno detekovat heterozygoty, a tím i frekvenci alel v populaci. Využívají se i ke zjišťování

příbuznosti a při určování paternity. V ichthyologii jsou využívány pro zjišťování genetického toku a míry migrace, genetického původu a selekci potomstva (Chistiakov, 2006).

Mikrosatelity mají ovšem tu nevýhodu, že jsou často druhově specifické a jeden primer fungující u jednoho druhu nemusí fungovat u blízce příbuzného. Je tedy často potřeba mikrosatelity izolovat pro daný druh *de novo*, což je časově i finančně náročné (Primmer et al., 2011).

### 2.2.3.1 PCR

Seznam použitých primerů se nachází v tabulce č. 5. Vždy jeden primer z každého páru (forward) byl označen některým z fluorochromů – barvy 6-FAM, VIC, NED a PET (tab. 5). Sekvence reversních primerů byly před označením ještě upraveny přidáním sekvence GT, GTT, nebo GTTT k 5' konci (tab. 6). Primery bylo potřeba před použitím naředit na koncentraci 50  $\mu\text{M}$ . Množství primerů pro jednotlivé multiplexy je uvedeno v tabulce č. 5. Primery byly uchovány v mrazáku a při práci byly chráněny před světlem, aby nedošlo k degradaci značení fluorochromy.

Byly sestaveny tzv. multiplexy PCR (tab. 6), při kterých se amplifikuje více mikrosatelitových lokusů najednou. Jde o běžnou PCR reakci, do které se přidá více primerových párů, a tak dochází k amplifikaci více lokusů v jedné PCR reakci. Byly použity 4 multiplexy (AD, B, C, E) po 4 mikrosatelitových lokusech. Protože byly jednotlivé mikrosatelity označeny různými fluorochromy, mohla fragmentační analýza probíhat současně se všemi lokusy jednoho multiplexu.

Před PCR reakcí bylo nejdříve potřeba vzorky DNA naředit na koncentraci nepřesahující 20  $\mu\text{M}$ . Reakce probíhala v Master cycleru (Eppendorf) za použití programu v tabulce č. 4.

Obsah reakční směsi:

- *Type-it Microsatellite PCR Kit (QUIAGEN)* ..... 5  $\mu\text{l}$
- *RNase-Free Water* ..... 3  $\mu\text{l}$
- *Primer mix pro každý multiplex* ..... 1  $\mu\text{l}$
- *DNA* ..... 1  $\mu\text{l}$

**Tab. 4** Program pro amplifikaci mikrosatelitů

reakce	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95°C	15 min	1
denaturace	94°C	1 min	40
nasednutí primerů (annealing)	60°C	1 min 30 s	
syntéza DNA (elongace)	72°C	1 min	
konečná elongace	60°C	45 s	1
zchlazení	22°C		

### 2.2.3.2 Elektroforéza

Po dokončení PCR byla úspěšnost amplifikace otestována na 1% agarózovém gelu. Použil se délkový standard DNA ladder. Elektroforéza probíhala při 110 V po dobu 30 minut. Vizualizace proběhla pod UV světlem v transluminátoru a zachycení obrazu v programu GelCapture.

### 2.2.3.3 Příprava vzorků na fragmentační analýzu

Po úspěšně proběhnuté reakci se vzorky připravily na fragmentační analýzu. Ke každému vzorku byl přidán fluorescenčně značený standard (Gene Scan<sup>TM</sup> 500 LIZ Size Standard, Applied Biosystems), který obsahuje fragmenty DNA o známé délce. Podle něj je možné identifikovat délku každého fragmentu (alely) a srovnat jej s jinými.

Obsah reakční směsi:

- *Formamid*.....8,75  $\mu$ l
- *LIZ 500*.....0,25  $\mu$ l
- *PCR produkt*....1  $\mu$ l

Vzorky byly vloženy do cycleru, kde došlo k denaturaci při 95 °C během pěti minut, a následně byly zchlazeny. Vzorky byly poté zmrazeny a převezeny na fragmentační analýzu. Fragmentační analýza probíhala v Laboratoři sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty na sekvenátoru ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer. Pomocí této metody byla zjištěna délka alely.

**Tab. 5** Přehled primerů, fluorescenční značení, sekvence, motivy, délka, teplota PCR, množství primeru potřebné pro sestavení jednotlivých multiplexů a publikace.

Lokus	Fluorofor	Sekvence primeru 5' - 3'	Motiv	Multiplex	Délka	teplota	μl	Publikace
<b>BL1-98</b>	PET	F: ATTTGTTTTTCATTTTGTGCAG R: CCGAGTGTCCAGAGTTATT	(CA) <sup>9</sup> CTAA(CA) <sup>3</sup> N <sub>50</sub> (CA) <sup>4</sup>	C	278-280	60°	3	Dubut et al. 2009
<b>Lsou08</b>	NED	F: GCGGTGAACAGGCTTAACTC R: TAGGAACGAAGAGCCTGTGG	(GT) <sup>17</sup>	C	191-207	60°	1	Muenzel et al. 2007
<b>Lsou34</b>	VIC	F: CCAGACAGGGTGATGATCC R: GTAGCGACGTTTCAGGTCTCG	(GT) <sup>15</sup>	C	230-256	60°	1	Muenzel et al. 2007
<b>BL12b</b>	6-FAM	F: TTGCACTAGTAACGAGCATCA R: CAGCACAGTTTCTCCATCCA	(TG) <sup>12</sup>	C	149-151	60°	1	Dubut et al. 2009
<b>CypG24</b>	PET	F: CTGCCGCATCAGAGATAAACACTT R: TGGCGGTAAAGGGTAGACCAC	(CAGA) <sup>19</sup>	E	133-141	60°	3,75	Baerwald & May 2004
<b>LceC1</b>	6-FAM	F: AGGTGTTGGTTCCCTCCCG R: TGTTATCTCGGTTTCACGAGC	(CA) <sup>16</sup>	E	89-103	60°	1,25	Larno et al. 2005
<b>N7K4</b>	NED	F: ACGAGCATCAGTATCCAGAGACAC R: CATGTTTCCACATCTGAGCTAAAA	(TG) <sup>16</sup>	E	150-162	60°	1,25	Mesquita et al. 2003
<b>Rser10</b>	VIC	F: TGCATAATCGTGAAAGCGGTG R: GCCACTAAAGCGCAGAAGCC	(GT) <sup>12</sup>	E	185-205	60°	1	Dawson et al. 2003
<b>BL1-61</b>	6-FAM	F: GACTCGCAGAGCTCCTTCCAC R: GGCGTTTGATTCAGTCTTTC	(CA) <sup>8</sup>	B	197	60°	1	Dubut et al. 2009
<b>BL1-153</b>	VIC	F: GCACAGCTCTAATCGGTCACT R: TATGGTCAAACACGGGTCAA	(AC) <sup>20</sup>	B	220-222	60°	0,75	Dubut et al. 2009
<b>Lsou19</b>	NED	F: TCCCGTGGAGAAAACACTACAGG R: TTCTTCGGTGAGTGTGATG	(GT) <sup>32</sup>	B	178-182	60°	1	Muenzel et al. 2007
<b>Lsou29</b>	PET	F: AAAATGATGCTGTGCAATGG R: CCATCTTTGTCCCCATAACG	(GT) <sup>10</sup>	B	312-322	60°	1	Muenzel et al. 2007
<b>BL1-84</b>	VIC	F: CATTACTACGGCAACCACAT R: GCGAAAAGGAAAAGAGACTGA	(AC) <sup>4</sup> N <sub>24</sub> (CA) <sup>9</sup>	AD	181	60°	1	Dubut et al. 2009
<b>Lsou05</b>	PET	F: CTGAAGAAGACCCTGGTTCG R: CCCACATCTGCTGACTCTGAC	(CA) <sup>17</sup>	AD	185-207	60°	2	Muenzel et al. 2007
<b>BL1-30</b>	6-FAM	F: GCGATGGCACTGATGGA R: TAAAAGAGCTCGTTTTGAAGCG	(AC) <sup>11</sup>	AD	85-89	60°	1	Dubut et al. 2009
<b>BL1-44</b>	NED	F: AAGACCAGCATGTGCTT R: ACATAGACTAACGAGTTTCACTT	(CA) <sup>13</sup>	AD	122-130	60°	1	Dubut et al. 2009

**Tab. 6** *Sekvence přidáné na konec primerů*

**Multiplex B**

BL1 61	R	GTTT
Lsou19	R	GT
BL1 153	R	GTT
Lsou29	R	GTTT

**Multiplex E**

LceC1	R	GTT
N7K4	R	GTTT
CypG24	R	GTT
Rser10	R	GTTT

**Multiplex C**

BL1 2b	R	GTTT
Lsou08	R	GTT
Lsou34	R	GTTT
BL198	R	GTTT

**Multiplex AD**

Lsou05	R	GTTT
BL1 84	R	GTTT
BL1 44	R	GTTT
BL1 30	R	GTT



## 3 Analýzy

### 3.1 Úvod do populační genetiky

Je známo několik základních mechanismů, které populaci ovlivňují a které se staly nezbytným nástrojem při hodnocení populační struktury. Tyto mechanismy tvoří základ oboru populační genetiky a jsou důležité při samotném zpracování statistických dat.

**Hardyho-Weinbergův princip** je pilířem populační genetiky. Slouží k výpočtu četnosti genotypů (heterozygotů a homozygotů) v populaci pomocí frekvence alel a předpovídá, jaká bude četnost genotypů v populaci následující.

Tento zákon musí splnit osm základních podmínek: organismy jsou diploidní, rozmnožování probíhá pohlavní cestou, generace se nepřekrývají, oplození je náhodné, velikost populace se blíží nekonečnu, migrace je zanedbatelná, k mutacím dochází minimálně a alely nejsou ovlivněny selekcí. Pokud populace splní tyto podmínky, ocitá se v tzv. Hardy-Weinbergově rovnováze a četnost jejích genotypů z generace na generaci se tedy nemění. Pokud četnost jednotlivých genotypů neodpovídá Hardyho-Weinbergově rovnováze, pravděpodobně to znamená, že populace není panmiktická, tzn. je tvořena více než jednou izolovanou subpopulací, křížení mezi jedinci není náhodné, nebo se na některých lokusech nachází nulové alely.

Pokud se velká populace fragmentuje na několik subpopulací, dojde vlivem genového posunu k úbytku heterozygotů, tzv. **Wahlundovu efektu**. Pokud dojde ke zrušení bariéry, obnoví se genový tok a opět narůstá počet heterozygotů. **Genetický drift** je náhodný posun ve frekvenci jednotlivých alel v rámci genofondu dané populace. Je významný v malých populacích, kde dochází častěji k fixaci jedné z alel a vymizení alely druhé, což má za následek pokles genetické diverzity. Čím je drift silnější, tím méně se uplatňuje přírodní výběr, ve velkých populacích je tomu naopak. Při nepříznivých podmínkách může dojít k efektu hrdla láhve, tzv. **bottleneck effect** (Nei et al., 1975). Jedná se o drastický pokles velikosti populace, kdy dochází k poklesu celkového počtu alel, ovšem populace se při zlepšení podmínek opět dostává do původního stavu. **Efekt zakladatele** (Mayr, 1954) vzniká oddělením malé subpopulace a osídlením nové lokality. Četnost alel se tak liší od původní populace vlivem genového posunu. **Genový tok** je významný pro změnu ve frekvenci alel v populaci. Migrace může vést ke kombinaci různých genofondů, a tím redukovat genetické rozdíly mezi populacemi. Genový tok brání vzniku reprodukčních bariér, což může vést

k oddálení speciace. Modely toku genů předurčují, jak se bude četnost alel vyvíjet v následujících generacích.

### 3.2 Mitochondriální DNA

Výsledné chromatogramy byly vizuálně zkontrolovány v programu **Chromas** (verze 2.6.2). Srovnání sekvencí se nazývá alignment. Sekvence byly seřazeny v programu **BioEdit** (verze 7.2.5) (Hall, 1999) a **Geneouis (11.0.5)**. Následně byly všechny sekvence zkráceny na obou koncích tak, aby začínaly a končily ve stejné pozici a zároveň byl zachován čtecí rámeček. Převod alignmentů na různé formáty proběhl v online programu **Alter** (Glez-Peña et al., 2010). Síť byla vytvořena v programu **TCS** (verze 1.21) (Clement et al., 2000) a následně upravena v online programu **TCS Beautifier** (Santos et al., 2015). Program využívá principu parsimonie (maximální úspornosti) (Templeton et al., 1992). Počet kroků byl nastaven na 30. Finální grafická úprava sítě proběhla v programu **Inkscape** (Harrington et al., 2004–2005) (<http://www.inkscape.org/>). Haplotypová síť je graf, který znázorňuje historii genového toku mezi druhy a populacemi (Ings et al. 2009). Haplotyp reprezentuje stejnou sekvenci, počet jednotlivých bodů mezi haplotypy vyjadřuje počet mutací mezi sekvencemi.

Hodnocení genetické variability a testy neutrality byly provedeny v programu **DNASP** (verze 5.1.) (Rozas et al., 2003). Byly zjištěny hodnoty nukleotidové ( $\pi$ ) a haplotypové ( $H_d$ ) diverzity, počet haplotypů ( $N_h$ ) a počet variabilních míst ( $S$ ). Dlouhodobá rozsáhlá velikost populace je určena vysokou hodnotou haplotypové i nukleotidové diverzity, pokud je haplotypová diverzita ve srovnání s nukleotidovou vyšší, došlo k nedávnému růstu populace.

Testy neutrality (Tajima, 1989, Fu & Li 1993) se používají ke zjištění převahy selekce nebo genetického driftu. Byly spočítány pro jednotlivé populace a druhy *T. dabar* a *T. metohiensis*. Tajima's D test je založen na porovnání haplotypové a nukleotidové diverzity, indikuje expanzi populace nebo bottleneck. Fu & Li test porovnává výskyt singletonů (mutace vyskytující se pouze jednou), které by se měly v případě neutrálního modelu rovnat.

Analýza molekulární variance (AMOVA) byla provedena v programu **Arlequin (3.5.2.2)** (Excoffier & Lischer, 2010) (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>), kde byl také spočítán  $F_{ST}$  index. Pro výpočet vnitrodruhové a mezidruhové vzdálenosti (p-distance) byl použit program **MEGA** (verze 7.0.25) (Kumar et al., 2016).

### 3.3 Analýza mikrosatelitů

Výsledky z fragmentační analýzy byly vyhodnoceny v programu **GeneMarker™ AFLP/Genotyping software** (SoftGenetics products) a odečtení alel bylo zapsáno do tabulky v Excelu. Zaokrouhlení odečtených alel bylo provedeno programem **AutoBin** ([https://www6.bordeaux-aquitaine.inra.fr/biogeco\\_eng/Scientific-Production/Computer-software/Autobin](https://www6.bordeaux-aquitaine.inra.fr/biogeco_eng/Scientific-Production/Computer-software/Autobin)) pracujícím s využitím funkce Makra (Microsoft Visual Basic) v Excelu.

#### 3.3.1 Klastrovací analýza

Pro výpočet a charakterizaci neznámé populační struktury byl použit program **Structure (2.2.)** (Pritchard et al., 2000). Nastavení parametrů bylo následující: počet opakování MCMC = 10 000, burn-in-perioda = 10 000, admixture model, počet K = 1–5, počet opakování (iteration) pro jednotlivá K = 5.

Program Structure využívá principu bayesiánské klastrovací analýzy. Je postaven na algoritmu MCMC (Markov Chain Monte Carlo) a umožňuje rozdělení jedinců do populací (klastrů), značených K. Existují dva modely: no-admixture model, který určuje pravděpodobnost příslušnosti jedinců k jedné z populací a je založen na předpokladu, že veškerý genetický materiál pochází z jedné populace, nebo admixture model, který určuje pravděpodobnost příslušnosti k více populacím a bere v úvahu možnost, že jedinci mohou být smíšeného původu a jejich genetický materiál je odvozen z několika populací.

Výsledky programu Structure byly následně vyhodnoceny programem **Structure Harvester** (Earl & von Holdt, 2012) (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>). Tento program vyhodnocuje data vygenerovaná programem Structure pro jednotlivá K. S využitím grafické metody Evanno (Evanno et al., 2005), která pracuje s hodnotou  $\Delta K$ , odhaduje reálný počet populací. Určuje pravděpodobnosti  $L(K)$  zařazení jedince do určitého klastru a vypočítává  $\Delta K$  statistiku. Výsledky pro jednotlivá K byly zprůměrovány v programu **CLUMPAK – Cluster Markov Packager acrosss K** (<http://clumpak.tau.ac.il/index.html>), který také umožňuje graficky zobrazit výsledky v Distruct formátu. Distruct (Rosenberg, 2004) seřazuje jednotlivá K a barevně je odlišuje. Pro grafickou úpravu distruct formátu byl použit **Structure Selector** dostupný online (<http://lmme.qdio.ac.cn/StructureSelector/>).

### 3.3.2 Hodnocení genetické diverzity

Program **GenAlEx 6.5** (Peakall & Smouse, 2006, 2012) byl použit pro výpočet očekávané a pozorované heterozygotnosti všech populací a pro zjištění počtu a frekvence privátních alel (alely přítomné pouze v jedné populaci). V programu **FSTAT (2.9.3.2)** (Weir & Cockerham, 1984) byly zjištěny charakteristiky jednotlivých lokusů – hodnoty očekávané ( $H_e$ ) a pozorované ( $H_o$ ) heterozygotnosti, koeficient inbreedingu  $F_{IS}$  a fixační index  $F_{ST}$ . Byl vypočten koeficient inbreedingu  $F_{IS}$  i pro jednotlivé populace. Po odebrání populace z řeky Ljuta kvůli nedostatečnému počtu jedinců byla vypočtena allelic richness (alelická bohatost) pro čtyři populace. V programu **GenePop** (<ftp://ftp.cefe.cnrs.fr/PC/MSDOS/GENEPOP>) (Rousset, 2008) byl vypočten párový  $F_{ST}$  (genetická distance) jednotlivých populací a frekvence genotypů. Přítomnost nulových alel a stutteringu byla zjištěna v programu **Micro-checker** (van Oosterhout et al., 2004). Do analýzy nebyla zahrnuta populace z řeky Ljuta s nízkým počtem vzorků. Po zjištění nízké variability dvou lokusů BL184 a BL198, na kterých byla zjištěna přítomnost nulových alel, byly tyto lokusy vyřazeny z následujících analýz. Na lokusu BL198 byl navíc zjištěn stuttering, který nadhodnocuje heterozygotnost.

Snížená hodnota očekávané heterozygotnosti ( $H_e$ ) je indikátorem bottlenecku, který zapříčiňuje vymizení vzácných alel a snížení diverzity. Snížená hodnota pozorované heterozygotnosti ( $H_o$ ) může mít negativní dopad na fitness jedince.

Allelic richness je indikátorem evolučního potenciálu pro adaptaci. Slouží k odhadu počtu alel na lokus. Snížení počtu alel vede k redukci potenciálu populace přizpůsobit se budoucím změnám. Vysoký počet alel, dokonce i počet neutrálních alel, vytváří větší genotypový prostor, a tím dochází k méně mutačním událostem. Slouží ke zjištění procesů v minulosti, např. bottlenecku a poklesu velikosti populace.

$F_{IS}$  vypočítává pokles heterozygotnosti způsobené příbuzenským křížením, tzv. inbreeding. Inbreeding nemění frekvenci alel v populaci, ale zvyšuje podíl homozygotů na všech lokusech, čímž dochází ke snížení genetické diverzity jedince. Jedná se o porovnání poklesu heterozygotnosti jedince vůči heterozygotnosti, které by dosahoval v panmiktické populaci. Hodnoty se pohybují od  $-1$ , kdy se v populaci nenachází žádní homozygoti, do  $1$ , kdy nejsou přítomni heterozygoti a inbreeding je stoprocentní. U hodnoty  $0$  k inbreedingu nedochází. Pokud je hodnota  $F_{IS}$  signifikantně větší než  $0$  pro některé lokusy, může to být vysvětleno přítomností nulových alel. Jde o alelu na lokusu, která se během PCR neamplifikuje. Pokud šlo tedy o heterozygota, je chybně určen jako homozygot. Navyšuje se

tak podíl homozygotů a dochází k odchylce od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Za hlavní příčinu tohoto jevu se považuje mutace DNA v místě pro navázání primeru, tzv. flanking region (Chapuis & Estoup, 2007).

Hodnota fixačního indexu  $F_{ST}$  vyjadřuje míru genetické vzdálenosti jednotlivých populací. Vychází z předpokladu, že průměrná heterozygotnost všech populací je menší než očekávaná heterozygotnost v panmiktické populaci, a testuje tím tedy vliv genetického driftu. Dosahuje hodnoty 0, pokud jsou alely v populaci vyrovnané, a hodnoty 1, pokud jsou alely fixované a genový tok je omezený. Bližší určení hodnoty  $F_{ST}$  je následující: 0–0,05 velmi malá diferenciace, 0,05–0,15 mírná diferenciace, 0,15–0,25 velká diferenciace, >0,25 extrémně velká diferenciace (Reifová, 2017).

### 3.3.3 Efektivní velikost populace

Program **NeEstimator V2.01** (Do et al., 2014) byl použit k odhadu efektivní velikosti populace. Využívá metodu, která je založena na principu vazebné nerovnováhy (LD) mezi nevázanými lokusy (Hill 1980, Waples 2006). Program byl nastaven na model náhodného páření.

Efektivní velikost populace  $N_e$  vyjadřuje velikost panmiktické populace, ve které by genetické procesy probíhaly stejnou rychlostí jako v dané reálné populaci. Hodnota  $N_e$  je většinou menší než reálná velikost populace  $N_c$ . Hodnota  $N_e$  je nezbytná k predikci životaschopnosti populace. Hlavní roli hraje genetický drift, který působí na malý genový fond za účelem zvýšení pravděpodobnosti náhodných asociací mezi alelami z různých lokusů, tzn. působí na zvýšení vazebné nerovnováhy. Populace s nižší hodnotou má nižší evoluční potenciál a není schopna se adaptovat na měnící se přírodní podmínky.

## 4 Výsledky

### 4.1 Mitochondriální DNA

Tab. 7 Základní charakteristika datasetu

Délka sekvence (bp)	1140
Počet polymorfních pozic (počet mutací)	50
Počet singletonů	13
Parsimonně informativní pozice	37

Z počtu 102 sekvencí bylo do dalších analýz použito 87 sekvencí o celkové délce 1 140 párů bází, zbylé sekvence nebyly použity, jelikož nebyly dostatečně dlouhé. *Telestes metohiensis* je reprezentován 64 sekvencemi, 21 sekvencí náleží druhu *T. dabar* a 2 sekvence druhu *T. miloradi*. Dataset obsahuje 50 polymorfních pozic, z toho 37 parsimonně informativních a 13 singletonů, což jsou variace v jediném nukleotidu na dané pozici (tab. 7). Celková haplotypová diverzita Hd vyšla jako relativně vysoká  $Hd = 0,881$ , ale haplotypy se odlišovaly jen v málo substitucích a hodnota nukleotidové diverzity byla nízká  $\pi = 0,00367$ . Nejvyšší hodnota nukleotidové diverzity byla zaznamenána u populace z řeky Mušnica a u druhu *T. metohiensis* byla vyšší ve srovnání s druhem *T. dabar*. Testy neutrality, Tajimův test D a Fu & Li, byly provedeny pro každou populaci a druh zvlášť a dále byly společně analyzovány dvě populace z řek Zalomka a Mušnica. Všechny hodnoty vyšly negativně. Tajima's D vyšel signifikantně jen pro populace z řek Zalomka + Mušnica a druh *T. metohiensis*, výsledek Fu & Li testu byl signifikantní jen pro druh *T. metohiensis*. Celkový výsledek Tajimova testu D vyšel signifikantně  $p < 0,05$  v záporné hodnotě  $-1,86438$ . Hodnota Fu & Li testu byla  $-0,62999$ , ale nebyla signifikantní. V tabulce č. 8 jsou uvedeny hodnoty pro jednotlivé populace a druhy *T. dabar* a *T. metohiensis*. Pro *T. miloradi* nebyl dostatečný počet vzorků.

**Tab. 8** Genetická variabilita uvnitř populací,  $N$  = počet vzorků,  $N_h$  = počet haplotypů,  $H_d$  = haplotypová diverzita,  $\pi$  = nukleotidová diverzita,  $S$  = počet polymorfních pozic.  $p$ -hodnota  $<0,05$ , signifikantní hodnoty jsou zvýrazněny tučně.

Populace	N	h	H <sub>d</sub>	$\pi$	S	Tajima D	Fu & Li D
Zalomka	24	5	1	0,00175	5	-1,12397	-1,12397
Cernica	31	4	1	0,00132	3	-0,75445	-0,75445
Vrijeka	21	4	1	0,00234	5	-0,21249	-0,21249
Mušnica	9	9	1	0,00307	13	-1,27992	-1,3003
Zalomka + Mušnica	33	13	1	0,00286	18	<b>-1,86106</b>	-2,13129
<i>T. metohiensis</i>	64	18	1	0,00507	44	<b>-2,24659</b>	<b>-3,1698</b>
<i>T. dabar</i>	21	4	1	0,00234	5	-0,21249	-0,21249

Z 87 sekvencí mitochondriální gen cytochrom *b* obsahuje 22 haplotypů (tab. 1, obr. 8). Nejdominantnějším haplotypem je haplotyp 15, následovaný haplotypem 6. Haplotyp 15 zahrnuje dvacet dva jedinců druhu *T. metohiensis* nacházející se v řece Cernica v polji Cerničko. Do haplotypu 6 náleží šestnáct jedinců druhu *T. metohiensis*. Patnáct jedinců pochází z řeky Zalomka a jeden (A1829) z řeky Mušnica. 14 haplotypů je unikátních, 8 z nich pochází z řeky Mušnica, 3 ze Zalomky, 2 z řeky Cernica a 1 z Vrijeky.

Pro všechny tři druhy byla vytvořena haplotypová síť (obr. 8). Jedinci druhu *T. metohiensis* z řek Zalomka a Cernica nesdílí mezi sebou žádný haplotyp. Populace z řeky Zalomka je reprezentována pěti haplotypy, z nichž tři jsou zastoupeny pouze jedním jedincem, a populaci z řeky Cernica reprezentují čtyři haplotypy, z nichž dva jsou zastoupeny jedním jedincem. Haplotypy se v rámci každé z těchto dvou populací od sebe liší maximálně třemi (Zalomka) a dvěma (Cernica) mutačními kroky, zatímco nejbližší haplotypy z těchto dvou lokalit dělí pouhý jeden mutační krok. Z řeky Mušnica bylo analyzováno pouze devět jedinců, avšak každý měl jiný haplotyp. Jeden z nich byl sdílen s nejčastějším haplotypem z populace z řeky Zalomka a většina byla o jeden mutační krok vzdálena od některého z haplotypů z populace řek Cernica nebo Zalomka. Maximální vzdálenost od haplotypů





dosahovala mezi populacemi v řekách Vrijeka a Ljuta. Nejvyšší vnitropopulační variabilita 0,31 % byla zjištěna v řece Mušnica, což se odráží ve vysokém počtu unikátních haplotypů (tab. 1), následovaná populací ze Zalomky s hodnotou 0,06 %. V populaci z řeky Ljuta nebyla zjištěna žádná variabilita, což je dáno malým počtem jedinců sdílících stejný haplotyp. V tabulce č. 9 jsou uvedeny všechny genetické vzdálenosti jednotlivých populací a jejich vnitřní variabilita.

**Tab. 9** *Výsledky (%) průměrné genetické vzdálenost (p-distance) mezi jednotlivými populacemi a jejich vnitřní variabilita (zvýrazněno) zjištěné v programu MEGA.*

Populace	Ljuta	Mušnica	Zalomka	Cernica	Vrijeka
Ljuta	<b>0</b>				
Mušnica	2,4	<b>0,31</b>			
Zalomka	2,4	0,2	<b>0,06</b>		
Cernica	2,3	0,2	0,1	<b>0,04</b>	
Vrijeka	2,5	0,6	0,5	0,4	<b>0,021</b>

Pomocí analýzy molekulární variance (AMOVA) byl zjištěn podíl odlišnosti mezi populacemi a v rámci populací a byl zjištěn pairwise  $F_{ST}$  mezi populacemi (tab. 11, 13). Populace byly analyzovány nejdříve každá zvlášť (tab. 10) a poté na základě zobrazení haplotypové sítě byly dvě populace Mušnica a Zalomka analyzovány dohromady (tab. 12). Při analýze všech populací byla zjištěna nejvyšší hodnota genetická diferenciace 0,98203 mezi populacemi z řek Ljuta a Cernica. Nejnižší hodnoty 0,16885 dosáhla mezi populacemi z řek Mušnica a Zalomka (tab. 11). Při druhé analýze byla největší genetická diferenciace 0,98203 mezi populacemi z řek Ljuta a Vrijeka a nejnižší 0,46277 mezi populacemi z řek Zalomka + Mušnica a Cernica (tab. 13). U obou analýz bylo zjištěno, že genetická variabilita mezi populacemi činí přibližně 75 %, zatímco rozdíly v rámci populace přispívají k celkové variabilitě 25 % (tab. 10, 12). Variabilita mezi populacemi je tedy vyšší než v rámci populace. Fixační indexy 0,74879 a 0,75425 značí velmi vysokou diferenciaci (tab. 10, 12). Výsledky byly signifikantní u obou analýz s p-hodnotou od 0 až do 0,00901.

**Tab. 10** AMOVA – Analýza molekulární variance. Procento vysvětlené variability odráží míru vysvětlené odlišnosti mezi jednotlivými populacemi a v rámci populací. d.f. = degrees of freedom.

Zdroj variability	d.f.	Suma čtverců	Variance komponentů	Variabilita (%)
Mezi populacemi	4	126,355	1,95507	<b>74,88</b>
Uvnitř populací	82	53,783	0,65590	<b>25,12</b>
Celková	86	180,138	2,61096	
Fixační index FST:		<b>0,74879</b>	p-value=0	

**Tab. 11** Párový  $F_{ST}$  index mezi populacemi zjištěný v programu Arlequin (AMOVA). Všechny výsledky vyšly signifikantně,  $p$ -hodnota < 0,01.

	Lj	Muš	Zal	Cer
Ljuta	0			
Mušnica	0,88952			
Zalomka	0,97482	0,16885		
Cernica	0,98203	0,35992	0,65025	
Vrijeka	0,92176	0,60183	0,75564	0,71865

**Tab. 12** AMOVA. Procento variability mezi 4 populacemi a v rámci populací. d.f.=degrees of freedom.

Zdroj variability	d.f.	Suma čtverců	Variance komponentů	Variabilita (%)
Mezi populacemi	3	123,718	2,08633	<b>75,43</b>
Uvnitř populací	83	56,420	0,67976	<b>24,57</b>
Celková	86	180,138	2,76609	
Fixační index FST:		<b>0,75425</b>	p-value=0	

**Tab. 13** Párový  $F_{ST}$  index mezi 4 populacemi zjištěný v programu Arlequin (AMOVA). Výsledky vyšly signifikantně, p-hodnota < 0,01.

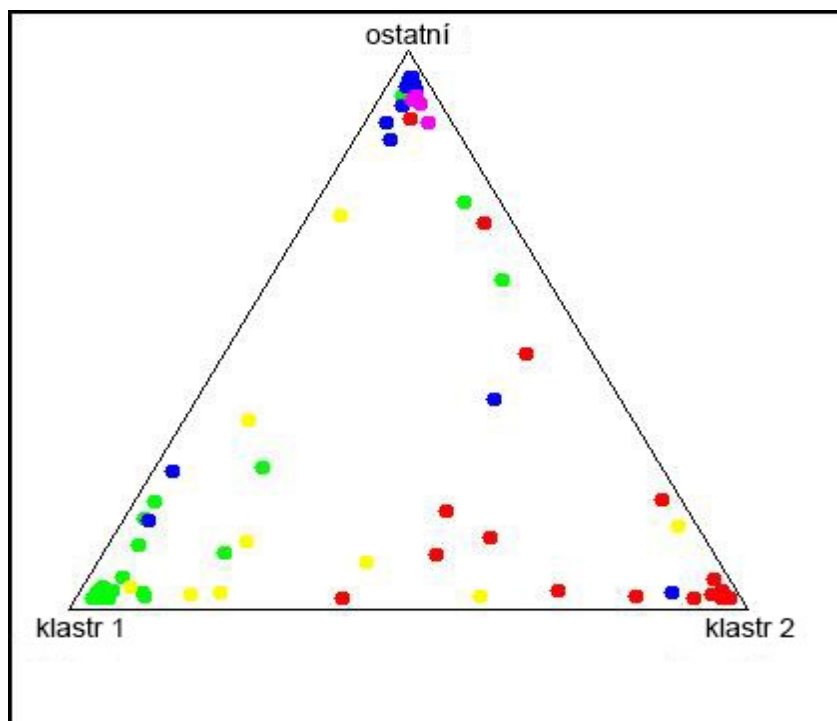
	Lj	Zal+Muš	Cer
Ljuta	0		
Zalomka+Mušnica	0,94558		
Cernica	0,98203	0,46277	
Vrijeka	0,92176	0,70307	0,71865

## 4.2 Analýza mikrosatelitů

Pro mikrosatelitové analýzy byly použity výsledky ze 100 jedinců z 5 lokalit. První populace zahrnovala 30 jedinců *T. metohiensis* z řeky Zalomka, druhá 31 jedinců z řeky Cernica, třetí populaci tvořil *T. dabar* s 26 jedinci, čtvrtou populaci reprezentovalo 9 jedinců druhu *T. metohiensis* z řeky Mušnica a pátou 4 jedinci *T. miloradi* z řeky Ljuta. Tento druh byl přidán do analýz jen pro orientační srovnání, jelikož předběžné výsledky analýzy genomických dat ukázaly, že je *T. miloradi* blízké příbuzný druhu *T. dabar*. Větší počet jedinců se nepodařilo získat, výsledky tedy nejsou průkazné.

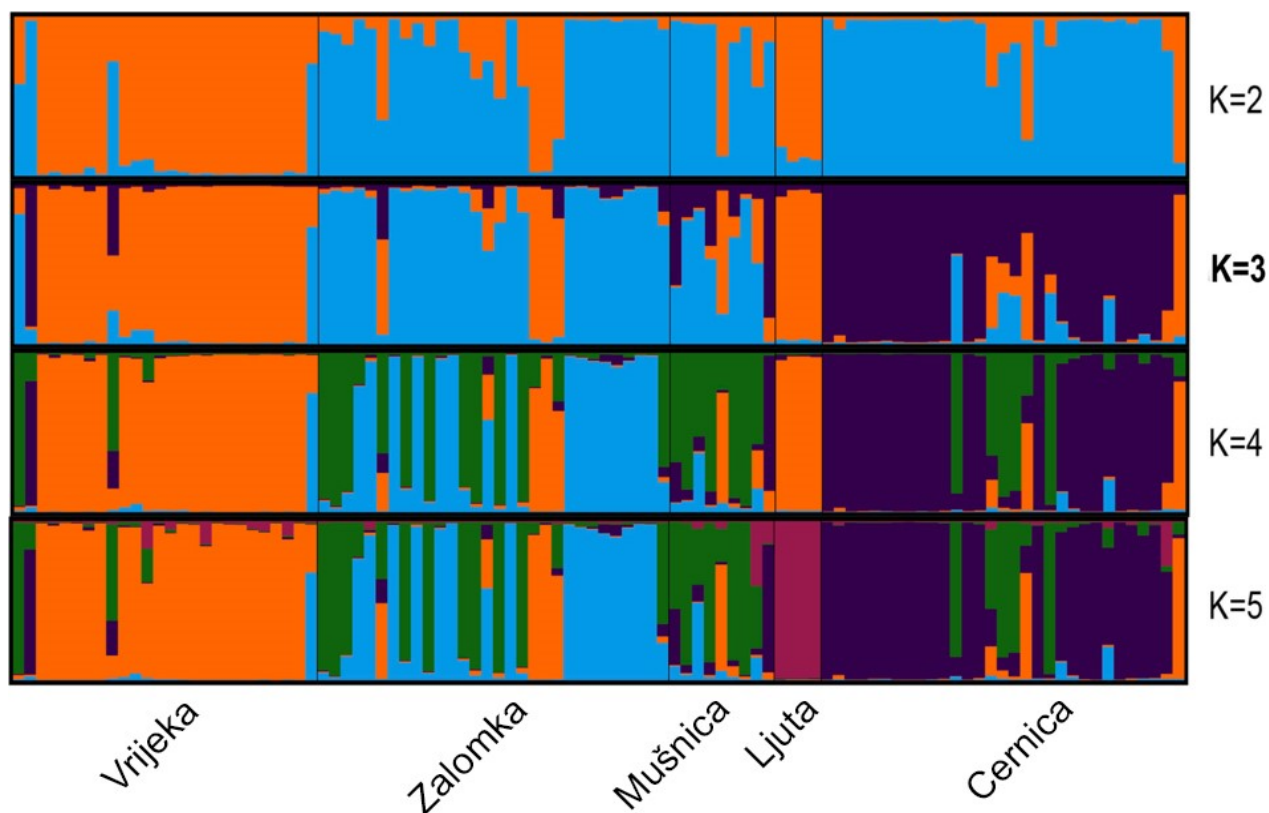
### 4.2.1 Klastrovací analýza

Program Structure zařadil jedince ze všech populací do jednotlivých klastrů. Nejvyšší hodnota byla získána pro  $K = 3$ , došlo tedy k rozdělení datasetu na 3 skupiny, viz trojúhelníkový graf (obr. 10). První klastr tvořili převážně jedinci z řeky Zalomka, druhý z řeky Cernica a třetí z řeky Vrijeka a Ljuta, avšak někteří jedinci z těchto populací se objevovali i v jiných klastrech. Několik jedinců z populace z řeky Mušnica klastrovalo s jedinci z řeky Zalomka. *Telestes miloradi* klastroval společně s jedinci z řeky Vrijeka.



**Obr. 10** Trojúhelníkový graf zobrazující rozřazení jedinců do jednotlivých klastrů pomocí programu Structure. Zelená – Zalomka, žlutá – Mušnica, červená – Cernica, modrá – Vrijeka, fialová – Ljuta.

V populaci z řeky Cernica několik jedinců tvoří přechod mezi třemi populacemi a pár jedinců je geneticky podobnější jedincům z řeky Vrijeka. Několik jedinců z řeky Vrijeka mělo blíže k jedincům z populace z řeky Cernica. V řece Zalomka bylo přítomno několik jedinců, kteří mají blíže jedincům z populace z řeky Cernica, a někteří jedinci z řeky Zalomka se shodovali s jedinci z řeky Vrijeka. Jedinci z řeky Mušnica tvoří přechod mezi těmito třemi populacemi a nejblíže mají k jedincům z řeky Zalomka, což je znázorněno i na trojúhelníkovém grafu (obr. 10). Jedinci z řeky Ljuta klastrovali společně s jedinci z řeky Vrijeka, což ale někdy může být i z důvodu vysoké odlišnosti od ostatních. Při rostoucím počtu  $K$  (2–5) se mění genetická struktura populací. Došlo k oddělení jedinců z řek Mušnica a Ljuta od ostatních. Rozdělení jednotlivých genotypů do klastrů při rostoucím počtu  $K$  (2–5) je znázorněno na obrázku 11.



**Obr. 11** Rozdělení subpopulací pro rostoucí počet  $K$  (2–5) vygenerované v programu Structure. Jednotlivé segmenty odpovídají posteriorní pravděpodobnosti zařazení jedinců do subpopulací. Největší podpora byla pro  $K = 3$ .

#### 4.2.2 Genetická variabilita populací

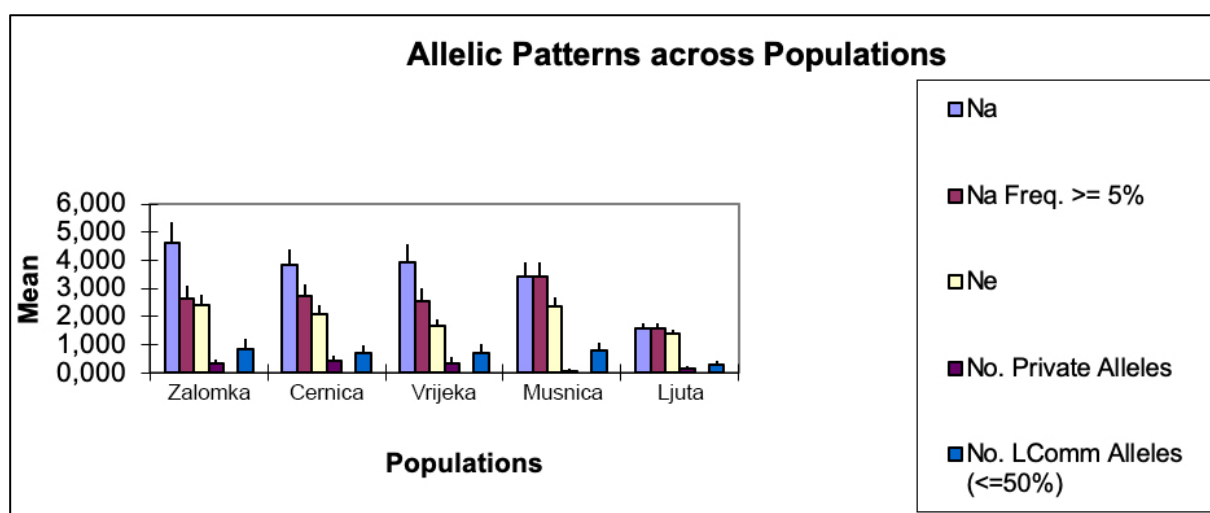
Nejvyšší počet alel byl zaznamenán v populaci ze Zalomky, nejnižší pak v populaci z řeky Ljuta (obr. 12). Počet privátních alel v populacích kolísal od 1 v populaci Mušnica do 6 v populaci Cernica. Populace ze Zalomky a z Vrijeky měly shodný počet privátních alel, v populaci z Ljuty byly zjištěny dvě privátní alely (tab. 14, obr. 12). Největší procento (100 %) polymorfních lokusů měla populace z řeky Cernica. Nejmenší počet polymorfních lokusů bylo zjištěno u populace z Ljuty a Vrijeky (tab. 15). Nejvíce variabilní byl lokus Lsou34. Přítomnost nulových alel v některých lokusech je zobrazena v tabulce č. 16. Počet a distribuce frekvencí jednotlivých alel v mikrosatelitových lokusech vypočítané v programu FSTAT a frekvence genotypů vygenerované programem Genepop jsou uvedeny v příloze č. 2 a 3.

**Tab. 14** *Frekvence privátních alel v každé populaci.*

Populace	Lokus	Alela	Frekvence
Zalomka	BL161	199	0,017
Zalomka	Lsou08	209	0,036
Zalomka	LceC1	99	0,150
Zalomka	RSer10	201	0,019
Zalomka	CypG24	145	0,017
Cernica	BL144	126	0,054
Cernica	BL161	195	0,017
Cernica	Lsou19	182	0,150
Cernica	BL12B	149	0,048
Cernica	BL12B	152	0,016
Cernica	RSer10	199	0,019
Vrijeka	Lsou05	177	0,042
Vrijeka	Lsou34	250	0,188
Vrijeka	Lsou34	256	0,021
Vrijeka	N74K	150	0,019
Vrijeka	N74K	160	0,058
Mušnica	Lsou05	207	0,111
Ljuta	Lsou05	195	0,625
Ljuta	Lsou34	242	0,250

**Tab. 15** Procento polymorfních lokusů v každé populaci vyhodnocené programem GenAlEx.

Zalomka	85,71%
Cernica	100,00%
Vrijeka	71,43%
Mušnica	78,57%
Ljuta	42,86%



**Obr. 12** Graf znázorňuje počet různých alel v jednotlivých populacích. Na – počet alel, frekvence alely  $\geq 5\%$ , Ne – počet efektivních alel, No. private alleles – počet privátních alel, počet sdílených alel nalezených v  $\leq 50\%$  populací s frekvencí  $\geq 5\%$ .

Pozorovaná heterozygotnost jednotlivých lokusů se pohybovala v rozmezí 0,006–0,576. Nejnižší hodnota byla zjištěna na lokusu BL12B a nejvyšší na Lsou34. Průměrná hodnota byla 0,301. Hodnoty očekávané heterozygotnosti byly v rozmezí 0,020–0,691. Fixační index  $F_{ST}$  a inbrední koeficient  $F_{IS}$  byly použity ke zhodnocení genetické rozdílnosti mezi jednotlivými lokusy. Rozsah hodnot  $F_{ST}$  se pohyboval od 0 v lokusu BL12B a BL161 až po 0,428 v lokusu BL130 a průměrná hodnota byla 0,236, což značí vysokou diferenciaci. Hodnoty  $F_{IS}$  se pohybovaly v rozmezí 0,026 pro lokus BL1153 do 0,679 pro lokus BL12B. Průměrná hodnota 0,201 potvrzuje výskyt inbreedingu. Charakteristiky jednotlivých lokusů jsou uvedeny v tabulce č. 16.

**Tab. 16** Charakteristiky jednotlivých lokusů.  $F_{st}$  – fixační index,  $F_{is}$  – index inbreedingu odhadnutý programem FSTAT.  $H_o$  – pozorovaná heterozygotnost,  $H_e$  – očekávaná heterozygotnost, \*= pravděpodobný výskyt nulových alel.

Lokus	$H_o$	$H_e$	$F_{st}$	$F_{is}$
BL130*	0,247	0,360	0,428	0,313
BL144	0,119	0,140	0,114	0,149
Lsou05*	0,368	0,553	0,325	0,335
BL161	0,013	0,014	0	0,032
BL1153	0,185	0,190	0,063	0,026
Lsou19	0,136	0,174	0,125	0,221
Lsou29	0,356	0,368	0,336	0,033
BL12B	0,006	0,020	0	0,679
Lsou34*	0,576	0,679	0,175	0,152
Lsou08*	0,563	0,691	0,052	0,185
LceC1*	0,476	0,635	0,197	0,250
RSer10*	0,397	0,482	0,347	0,176
N7K4*	0,447	0,516	0,258	0,132
CypG24*	0,328	0,460	0,155	0,287
<b>Celkově</b>	<b>0,301</b>	<b>0,377</b>	<b>0,236</b>	<b>0,201</b>

Hodnota  $F_{IS}$  koeficientu  $-0,5$  byla nejnižší v lokusech N74K a Lsou29 v populaci z řeky Ljuta, nejvyšší hodnoty  $0,659$  dosáhla v lokusu BL12B v populaci z řeky Cernica (tab. 17). Ve všech populacích kromě Ljuty byly hodnoty pozitivní, což naznačuje přítomnost inbreedingu v populacích. Nejnižší průměrné hodnoty  $-0,263$  dosahoval u populace z řeky Ljuta a nejvyšší  $F_{IS}$  s hodnotou  $0,342$  byl zjištěn u populace z řeky Vrijeka. Výsledky z populace z řeky Ljuta ovšem mohou být zkreslené kvůli malému počtu jedinců. Druhá nejnižší hodnota  $0,202$  byla zjištěna u populace z řeky Zalomka následována populací z řeky Mušnica s hodnotou  $0,276$  a populací z řeky Cernica s hodnotou  $F_{IS}$   $0,276$ . Všechny uvedené hodnoty jsou shrnuty v tabulce č. 17.



**Tab. 17** FIS index – koeficient inbreedingu vypočítaný zvlášť pro všechny lokusy i populace v programu FSTAT. NA – data nejsou k dispozici.

Lokus	Zalomka	Cernica	Vrijeka	Mušnica	Ljuta
BL130	0,036	0,150	0,577	0,582	NA
BL144	NA	0,223	-0,116	NA	NA
Lsou05	0,308	0	0,551	0,616	-0,286
BL161	0	0	NA	NA	NA
BL1153	0,028	0,143	NA	-0,143	NA
Lsou19	0,169	0,308	NA	0	NA
Lsou29	-0,018	0,169	0,375	0,190	-0,500
BL12B	NA	0,659	NA	NA	NA
Lsou34	0,081	0,192	0,251	0,391	-0,286
Lsou08	0,146	0,241	0,506	0,024	-0,200
LceC1	0,349	0,301	0,265	0,143	0,143
RSer10	0,272	0,293	0,389	-0,161	NA
N7K4	0,348	0,631	-0,011	0,280	-0,500
CypG24	0,288	0,286	0,634	0,054	NA
<b>Celkově</b>	<b>0,202</b>	<b>0,276</b>	<b>0,342</b>	<b>0,222</b>	<b>-0,263</b>

Všechny populace vykazovaly sníženou pozorovanou heterozygotnost oproti očekávané, kromě populace z řeky Ljuta, u které výsledky nejsou spolehlivé. Nejnižší hodnota pozorované heterozygotnosti 0,206 dosáhla v populaci z řeky Vrijeka, očekávaná hodnota byla 0,304. Nejvyšší hodnota pozorované heterozygotnosti 0,376 byla zjištěna v populaci z řeky Mušnica, hodnota očekávané heterozygotnosti byla 0,442. Druhá nejnižší hodnota pozorované heterozygotnosti 0,286 byla zjištěna v populaci z řeky Ljuta s očekávanou hodnotou 0,205. Následovala populace z řeky Cernica s hodnotou 0,292, u které hodnota očekávané heterozygotnosti byla 0,390. Pro populaci ze Zalomky měla pozorovaná heterozygotnost hodnotu 0,362 a hodnota 0,444 očekávané heterozygotnosti byla u této populace nejvyšší. Na 5 lokusech bylo zjištěno vyšší číslo pozorované heterozygotnosti než očekávané. Pozitivní hodnoty reflektují přemíru homozygotů v populacích, což může být způsobeno genetickým driftem nebo příbuzenským křížením. Hodnoty očekávané a pozorované heterozygotnosti pro všechny lokusy a populace jsou uvedeny v tabulce č. 18.

**Tab. 18** Hodnoty pozorované a očekávané heterozygotnosti pro každý lokus a populaci z programu GenAlEx. *Ho* – pozorovaná heterozygotnost, *He* – očekávaná heterozygotnost.

Pop	Zalomka		Cernica		Vrijeka		Mušnica		Ljuta	
Lok	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He
<b>BL130</b>	0,607	0,618	0,300	0,346	0,080	0,183	0,250	0,539	0,000	0,000
<b>BL144</b>	0,000	0,000	0,357	0,450	0,240	0,211	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Lsou05</b>	0,429	0,605	0,034	0,034	0,292	0,628	0,333	0,790	0,750	0,531
<b>BL161</b>	0,033	0,033	0,033	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>BL1153</b>	0,379	0,383	0,214	0,245	0,000	0,000	0,333	0,278	0,000	0,000
<b>Lsou19</b>	0,367	0,433	0,200	0,283	0,000	0,000	0,111	0,105	0,000	0,000
<b>Lsou29</b>	0,100	0,097	0,214	0,253	0,269	0,419	0,444	0,512	0,750	0,469
<b>BL12B</b>	0,000	0,000	0,065	0,122	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Lsou34</b>	0,667	0,712	0,419	0,509	0,542	0,704	0,500	0,750	0,750	0,531
<b>Lsou08</b>	0,714	0,820	0,613	0,791	0,320	0,629	0,667	0,625	0,500	0,375
<b>LceC1</b>	0,500	0,751	0,600	0,801	0,240	0,318	0,714	0,735	0,500	0,500
<b>RSer10</b>	0,538	0,722	0,423	0,584	0,167	0,265	0,857	0,694	0,000	0,000
<b>N74K</b>	0,300	0,449	0,143	0,376	0,615	0,597	0,429	0,541	0,750	0,469
<b>CypG24</b>	0,433	0,596	0,467	0,639	0,115	0,305	0,625	0,617	0,000	0,000
<b>Průměr</b>	<b>0,362</b>	<b>0,444</b>	<b>0,292</b>	<b>0,390</b>	<b>0,206</b>	<b>0,304</b>	<b>0,376</b>	<b>0,442</b>	<b>0,286</b>	<b>0,205</b>
<b>SE</b>	0,065	0,080	0,052	0,067	0,053	0,069	0,075	0,081	0,094	0,066

Po vyloučení populace z řeky Ljuta byla vypočtena allelic richness. Hodnoty allelic richness byly v rozsahu od 1 v několika lokusech do 5,955 v lokusu Lsou08 v populaci z řeky Zalomka. Nejnižší průměrná hodnota 2,66 byla v populaci z řeky Cernica, následovaná populací z řek Vrijeka s hodnotou 2,538 a Zalomka s hodnotou 2,963. Nejvyšší průměrná hodnota 3,161 byla zjištěna u populace z řeky Mušnica. Hodnoty allelic richness pro jednotlivé lokusy a populace jsou uvedeny v tabulce č. 19.

**Tab. 19** Allelic richness vypočítané programem FSTAT pro 4 populace.

Lokus	Zalomka	Cernica	Vrijeka	Mušnica
BL130	3,210	2,812	1,919	2,986
BL144	1,000	2,502	1,826	1,000
Lsou05	3,538	1,207	4,680	5,445
BL161	1,200	1,200	1,000	1,000
BL1153	1,983	1,875	1,000	1,975
Lsou19	1,994	2,087	1,000	1,667
Lsou29	1,600	2,168	2,604	3,544
BL12B	1,000	1,482	1,000	1,000
Lsou34	4,402	3,253	4,719	4,693
Lsou08	5,955	5,069	3,722	4,000
LceC1	4,649	5,286	2,805	4,571
RSer10	4,856	2,893	2,574	5,549
N7K4	3,022	2,453	4,067	3,835
CypG24	3,085	2,958	2,627	2,993
<b>Celkově</b>	<b>2,963</b>	<b>2,660</b>	<b>2,538</b>	<b>3,161</b>

Pairwise  $F_{ST}$  pro dvojice studovaných populací odhalil signifikantní genetickou diferenciaci mezi populacemi (tab. 20). Hodnoty nabývaly rozsahu od 0,1043 mezi populacemi z řek Zalomka a Mušnica, což značí mírnou genetickou diferenciaci, do 0,3958 mezi populacemi z řek Cernica a Ljuta, což značí extrémně velkou genetickou diferenciaci. Mírná diferenciaci byla dále zjištěna mezi populacemi z řek Cernica a Mušnica. Populace z řeky Ljuta vykazovala s ostatními populacemi extrémně velkou diferenciaci, stejně tak populace z řek Cernica a Vrijeka. Mezi ostatními populacemi byla zjištěna velká diferenciaci.

**Tab. 20** Celková hodnota párového  $F_{ST}$  (genetické distance) mezi populacemi z programu GenePop.

	Zalomka	Cernica	Vrijeka	Mušnica
Cernica	0,2256			
Vrijeka	0,2388	0,3418		
Mušnica	0,1043	0,1357	0,2367	
Ljuta	0,3393	0,3958	0,2999	0,3213

#### 4.2.3 Odhad efektivní velikosti populace

Efektivní velikost populace z řeky Zalomka byla odhadnuta na 19 jedinců, z řeky Cernica na 25 jedinců, odhad pro populaci z Vrijeky byl 46 jedinců a pro populaci z řeky Mušnica 32 jedinců. Odhad efektivní velikosti populace z řeky Ljuta nebylo možné určit z důvodu nedostatečného počtu vzorků. V tabulce č. 21 jsou uvedeny odhady efektivní velikosti populace s 95% konfidenčním intervalem (neznámý parametr leží v konfidenčním intervalu s 95% pravděpodobností). Hodnota infinite znamená nekonečno, ale data nejsou spolehlivá v případě nízkého počtu analyzovaných jedinců (řeka Mušnica).

**Tab. 21** *Odhad efektivní velikosti populace vypočítané v programu NeEstimator. 95% CIs znamená konfidenční interval. Hodnota infinite značí nekonečno, ale v případě nedostatečného počtu jedinců (Mušnica) nejsou data spolehlivá.*

Populace	Odhad $N_e^{\wedge}$	95% CIs
Zalomka	19	10–46,8
Cernica	25,1	11–130,7
Vrijeka	45,9	16,4–infinite
Mušnica	31,6	3,0–infinite

## 5 Diskuse

Tato práce se zaměřila na studium populačně-genetické struktury, ve které byla zhodnocena genetická variabilita druhů ryb rodu *Telestes* – *T. metohiensis* a *T. dabar* z pěti lokalit v oblasti krasových poljí východní Hercegoviny. Dostupný materiál blízce příbuzného druhu *T. miloradi* byl rovněž zařazen do analýz. Práce zahrnovala analýzu cytochromu *b* a mikrosatelitů. Celkem byla izolována DNA ze 102 jedinců. Pro analýzy mitochondriální DNA bylo použito celkem 87 sekvencí o délce 1140 bp. Do analýzy mikrosatelitů bylo použito 100 jedinců a do následných analýz zahrnuto 14 lokusů z 16 amplifikovaných. Jednotlivé druhy ryb byly dříve popsány jen na základě morfologických odlišností (Bogutskaya et al., 2012).

Genetická variabilita je důležitá z hlediska vhodné adaptace na změnu podmínek a slouží k zajištění dlouhodobého přežívání populace. Míra genetické variability je ovlivněna působením driftu, který způsobuje ztrátu variability z důvodu náhodné fixace alel. Proti genetickému driftu působí selekce, která prosazuje výhodné varianty genů a jejich fixací zvyšuje rozmanitost. Výsledky obou analýz poukazují na obecně nízkou genetickou variabilitu jednotlivých populací, mezi kterými je ale signifikantní diferenciace.

Analýza cytochromu *b* jednoznačně oddělila pouze druh *T. miloradi* z řeky Ljuta od ostatních druhů. Struktura haplotypové sítě druhu *T. metohiensis* ze třech lokalit – Zalomka, Cernica, Mušnica a nízká hodnota *p*-distance naznačuje velkou genetickou podobnost těchto populací. Jedinci pocházející z řeky Mušnica měli velmi různorodé haplotypy. Pouze jeden haplotyp byl sdílený s populací z řeky Zalomka, ostatní byly unikátní. Haplotypy z populace řeky Mušnica se od sebe lišily o sedm mutačních kroků, proto byla hodnota vnitropopulační genetické distance vyšší (0,2) než genetická distance mezi populacemi z řek Zalomka a Cernica (0,1). Výsledky analýzy molekulární variance (AMOVA) i pairwise  $F_{ST}$  však ukázaly velkou až extrémní míru genetické diferenciace mezi těmito populacemi. Míru diferenciace vyjadřuje  $F_{ST}$  index, který signalizuje omezený genový tok mezi jednotlivými populacemi a odráží tak vliv genetického driftu.

Nejvyšší *p*-distance byla zjištěna mezi populacemi z řek Ljuta a Vrijeka, nejvyšší míra diferenciace na základě  $F_{ST}$  u cytochromu *b* byla však prokázána mezi populacemi z řek Cernica a Ljuta. Populace z řeky Ljuta ukázala extrémní míru genetické diferenciace oproti ostatním populacím, jak na mitochondriálním markeru, tak na mikrosatelitech.

Nízká hodnota p-distance a mírná genetická diference mezi třemi populacemi Zalomka, Mušnica a Cernica potvrdila velkou podobnost populací. Řeka Mušnica leží v polji Gatačko mezi oběma lokalitami. Při záplavách dochází k propojení řek Zalomka i Mušnica (Bogutskaya et al., 2012) a výsledky naznačují, že by mohlo docházet k migraci ryb mezi těmito lokalitami. Zda se jedná pouze o propojení nadzemních toků v období záplav nebo i o podzemní propojení, není jasné. V oblasti je přítomný vysoký počet estavel, které umožňují migraci z nižších částí do vyšších, migrace tedy může probíhat z polje Nevesinjsko do polje Gatačko, které leží ze všech uvedených poljí v nejvyšší nadmořské výšce. Gatačko polje a jižněji položené Cerničko polje jsou mezi sebou též propojeny podzemním tokem a ryby mohou využívat i tohoto propojení. Případná migrace by byla vázána na výšku podzemní vody a nemusí se vztahovat na každou generaci. Dabarsko polje i Konavovsko polje jsou momentálně uzavřené deprese. Populace z obou lokalit vykazují silnou genetickou diferenciaci jak mezi sebou, tak i s ostatními lokalitami, což je důsledkem jejich izolace, není však možné zjistit, kdy k izolaci došlo.

Buj et al. (2017) se ve své práci zabývali molekulární diverzitou rodu *Telestes*, což vedlo k lepšímu porozumění geologické historie mediteránní oblasti a pomohlo odhalit lokální příčiny distribuce druhů. Výsledky odhadnutého času divergence založené na analýzách cytochromu *b* a nukleárního markeru RAG1 korespondovaly s událostmi, které v této oblasti v minulosti nastaly. Haplotypová diverzita byla u druhů *T. metohiensis* a *T. dabar* relativně vysoká, u *T. metohiensis* vyšší. Průměrná p-distance mezi těmito druhy byla 0,7 %, tedy vyšší než u mých výsledků, kde se pohybovala v rozmezí 0,4–0,6 %. U obou druhů byl zpozorován nízký počet haplotypů (6 – *T. metohiensis* a 7 – *T. dabar*). U *T. miloradi* byl v obou případech zjištěn pouze jeden a ten samý typ haplotypu, což odráží jeho izolaci, byl ovšem k dispozici malý počet vzorků. V další práci Buj et al. (2019) porovnávali genetickou strukturu dvou větví druhu *Telestes pleurobipunctatus* na území Řecka a Albánie. Byly popsány dvě větve – severní a jižní a hlavní příčinou rozdělení byl výzdvih pohoří Pindos. Genetická vzdálenost mezi oběma větvemi byla vysoká s hodnotami mezi 2,8–4 %. Hodnoty vnitřní variability se pohybovaly od 0,1 do 0,9 %, hodnoty byly vyšší než u mých výsledků. Byla zjištěna silná genetická diference a nepřítomnost genového toku a výsledky poukázaly na vysokou diverzitu mezi jednotlivými populacemi. Je možné, že v řekách žije několik různých druhů, pro další výzkum je však potřeba i morfologická studie.

V mé práci byly nejvyšší hodnoty nukleotidové a haplotypové diverzity zaznamenány u druhu *T. metohiensis*, což značí, že velikost populace je dlouhodobě rozsáhlejší. Populace z řeky Mušnica vykazovala nejvyšší nukleotidovou diverzitu, což korespondovalo s výsledky

vnitřní variability, která byla u této populace také nejvyšší, a výsledky odpovídaly centrální poloze mezi dvěma lokalitami. Výsledky testů neutrality vyšly negativně. Negativní výsledky obou testů neutrality mohou dokládat selektivní sweep, který vede ke snížení genetické diverzity, nebo recentní expanzi populace po bottlenecku. Negativní hodnota Tajima's D může být dokladem dávného bottlenecku, který vede ke ztrátě heterozygotnosti a vymizení vzácných alel. Je pravděpodobné, že dochází k lokální izolaci v krasových oblastech relativně často díky velké proměnlivosti prostředí, která je důsledkem evorze a lokální tektonické aktivity.

Tato teorie odporuje výsledkům autorů Palandačić et al. (2012), kteří zkoumali a potvrdili migraci v podzemí u druhu *Delminichthys adspersus* v jižním Chorvatsku. Výzkum byl založený na analýze cytochromu *b* a osmi mikrosatelitových lokusech. Recentní populační expanze byla vyloučena a žádný bottleneck zpozorován nebyl, což podporuje teorii, že geologická oblast byla v době glaciálů refugiem. Výsledky genetické studie v kombinaci s hydrologickými daty doložily opakující, i když limitovanou, podzemní migraci. Nízká diferenciacce rovněž mohla být důsledkem nedávné izolace populací. Hvězdicovitá struktura haplotypové sítě a nízká nukleotidová diverzita poukazují na druhou možnost, ovšem mikrosatelitová data podporují možnost nepravidelné migrace.

Pozitivní hodnoty koeficientu inbreedingu naznačují přemíru homozygotů v populaci. Signifikantní hodnota  $F_{IS}$  byla zaznamenána u všech populací, což může být teoreticky vysvětleno nenáhodným párováním mezi jedinci, které vede k inbreedingu. Toto není pravděpodobné, spíše jde o velmi nízkou genetickou diverzitu malé populace po bottlenecku. Inbreeding snižuje genetickou variabilitu a má negativní dopad na fitness jedinců, kteří se hůře adaptují na změny. Může být ovlivněn sníženou hodnotou efektivní velikosti populace, která byla u většiny populací prokázána. Pozitivní hodnoty koeficientu inbreedingu se také můžou objevovat u populací, které prodělaly bottleneck (Boessenkool et al., 2007, Lambert et al., 2005). Snížená genetická diverzita v důsledku bottlenecků se objevuje především u podzemních druhů, které se izolují a adaptují na nové stabilní podmínky (Poulson & White, 1969). Příčinou nízké diverzity by také mohl být founder effect (efekt zakladatele), kdy malý počet jedinců dal vzniknout nové populaci, ale v tomto případě šlo spíše o izolaci subpopulace druhu, který byl v minulosti široce rozšířený v dané oblasti, a následnou speciaci.

Malá populace je obecně náchylnější k výskytu inbreedingu a je vystavena působení genetického driftu. Populace je také citlivější k demografickým změnám a adaptivní potenciál populace je redukován. Hodnoty snížené pozorované heterozygotnosti oproti očekávané

taktéž potvrdily nízkou diverzitu a snížené fitness jedinců. Odhad nulových alel byl použit ke zjištění ztráty heterozygotnosti, např. Wahlundovým efektem. Přítomnost nulových alel byla zaznamenána na některých lokusech, ale jen dva lokusy, které vykazovaly současně i nízkou variabilitu, byly z následujících analýz vyřazeny. Ostatní vyloučeny nebyly, aby nedošlo k větší ztrátě dat. Dabrowski et al. (2014) srovnávali různé programy na detekci nulových alel a došli k závěru, že tyto programy nejsou spolehlivé, pokud je analyzován menší počet jedinců a pokud populace není v Hardy-Weinbergově rovnováze.

Druh *Telestes miloradi* byl do této práce zařazen jen pro orientační srovnání, bylo k dispozici málo jedinců a výsledky je třeba brát s rezervou. Na základě nepublikovaných výsledků genomických nukleárních dat pomocí metody ddRADSeq bylo zjištěno, že je druh *T. miloradi* velmi podobný *T. dabar* (J. Vukić, osobní sdělení).

Analýza mitochondriálního markeru cytochromu *b* jasně ukázala, že *T. miloradi* a *T. dabar* si na mitochondriální DNA nejsou tak podobní, a *T. dabar* a *T. metohiensis* jsou příbuznější. Na haplotypové síti cytochromu *b* se *T. miloradi* liší od *T. dabar* o více než 25 mutačních kroků a p-distance mezi druhy *T. miloradi* a *T. dabar* byla nepatrně vyšší (2,5 %) než mezi druhem *T. miloradi* a populacemi druhu *T. metohiensis* (2,3–2,4 %), zatímco na základě analýzy mikrosatelitů program Structure tyto dvě populace sloučil, a až při větším počtu  $K = 5$  je oddělil. Pro srovnání, p-distance na základě cytochromu *b* mezi *T. dabar* a populacemi druhu *T. metohiensis* se pohybovala mezi 0,4–0,6 %. Ačkoliv výsledky z analýzy mikrosatelitů u druhu *T. miloradi* je třeba brát s rezervou, shodují se s analýzou genomových nukleárních dat a společně ukazují na neshodu mezi mitochondriální a nukleární DNA. Je možné, že v případě *T. dabar* mohlo dojít k dávné mitochondriální introgresi předka druhu *T. dabar* s druhem příbuzným s *T. metohiensis* nebo jeho předkem a následně došlo ke speciaci. Hybridizace hraje velkou roli ve fylogenezi a speciaci a je možné ji odhalit pouze kombinací mitochondriálních a nukleárních markerů. Jedná se o velmi častý jev, který se objevuje u blízkce příbuzných druhů (Allendorf et al., 2001, Arnold, 1997, Arnold et al., 1999), ale může se objevit i u druhů geneticky vzdálenějších (Freyhof et al., 2005). Nejčastěji byla hybridizace prokázána právě u kaprovitých ryb (Scribner et al., 2001). Mitochondriální introgrese je specifický případ hybridizace, který v extrémních případech vede k nahrazení mitochondriálního genomu dvou druhů (mitochondriální past). Objevuje se, pokud je přítomný genetický tok mezi dvěma populacemi, mezi kterými dochází k hybridizaci. Hybridi se poté opětovně zkříží s parentální populací (Rhymer et al., 1996). Zjištění mitochondriální introgrese může být jediná cesta k odhalení hybridizace v minulosti u druhů, u kterých došlo



k alopatrické speciaci (Weisrock et al., 2005). Introgrese je ovlivněna selekcí a genetickým driftem. Za určitých okolností může introgresi ovlivňovat drift, který umožňuje fixaci mírně škodlivých alel v malých populacích. Pokud se v mtDNA v jedné populaci fixuje dostatek těchto alel, průměrné fitness může být nižší než u příbuzného druhu ve stejné oblasti. Selektce by poté zapříčinila introgresi mtDNA z populace s vyšší fitness do populace s fitness nižší (Ballard & Whitlock, 2004).

Mitochondriální introgresí u dvou druhů rodu *Squalius* na Balkánském poloostrově se zabývali Perea et al. (2016). Byla zjištěna mitochondriální introgrese druhu *Squalius keadicus* u dvou populací druhu *Squalius peloponensis* z povodí Miras a Pamissos v Řecku (jih Peloponéskeho poloostrova). Nukleární analýza odhalila příslušnost jedinců z těchto dvou populací k druhu *S. peloponensis*, zatímco mitochondriální genom klastroval s druhem *S. keadicus*. K introgresi pravděpodobně došlo důsledkem sekundárního kontaktu mezi populacemi. Recentní paleogeografické události měly pravděpodobně vliv na divergenci mitochondriální linie. Během pleistocénu docházelo k mnoha tektonickým pohybům, které zapříčinily výzdvih a formování řek v oblasti Peloponésu. Pravděpodobně k podobné situaci došlo i u druhu *T. miloradi*. Krasová oblast je dynamické prostředí, voda si nachází cestu různými puklinami a rozšiřuje prostor nebo mění směr. Dochází k propojení různých toků nebo jejich izolaci, často může dojít k jejich opětovnému spojení a populace, které byly dlouhou dobu izolovány, se opět zkříží.

Další případ mitochondriální introgrese byl zjištěn u druhu *Scardinius dergle* žijícího v Bosně a Hercegovině (Freyhof et al., 2005). *Scardinius dergle* je morfologicky jasně identifikovatelný jako člen rodu *Scardinius*, ale analýza mitochondriálního genu cytochromu *b* odhalila podobnost sekvencí s druhem *Squalius tennelus*, se kterým žije sympatricky. Ani u jednoho jedince se neobjevily morfologické znaky rodu *Squalius* nebo znaky společné pro oba druhy. *Squalius tennelus* byl nasbírán v povodí jezera Buško, které bylo vytvořeno v 60. letech stavbou přehrady na řece Ričina. *Scardinius dergle* byl chycen v jezírkách pod přehradou. V dnešní době se druhy v jezírkách společně nevyskytují, ale žijí společně v jezeře Buško (Freyhof et al., 2005). Mitochondriální introgrese byla dále zjištěna např. u cichlid z jezera Victoria (Meyer et al., 1990) nebo u koljušek z šesti jezer v Britské Kolumbii (Taylor & McPhail, 2000).

Oblast krasu byla vždy nejvíce studována z hlediska podzemní fauny, tzv. troglobiontů (Sket, 1999, Sket & Zakšek, 2009, Fišer et al., 2002). V ponorných řekách se vyskytuje velké množství živočichů, kteří jsou přizpůsobeni k životu v podzemních vodách, tzv. stygobiontů.

Nízká genetická variabilita je typická pro mnoho vodních živočichů žijících v podzemí, např. *Gammarus minus* (Culver, 1982). V Mexiku byla na základě analýzy cytochromu *b* a mikrosatelitů zhodnocena genetická diverzita jeskynní ryby *Astyanax* (Strecker et al., 2003). Byly porovnány čtyři jeskynní populace (Pachon, Sabinos, Tinaja, Chica) se čtyřmi populacemi druhu *Astyanax fasciatus* žijícího v řekách v oblasti Yucatánu. Analýza mikrosatelitů odhalila, že tři ze čtyř jeskynních populací (kromě Chica) vykazovaly velmi nízkou variabilitu a mezi jednotlivými populacemi nebyl zjištěn genový tok. Nízká variabilita může být zapříčiněna efektem zakladatele, nízkou velikostí populace nebo několika bottlenecky, které jsou odrazem environmentálních podmínek jako jsou přísun živin či kolísání hladiny podzemní vody. Byla také zjištěna mitochondriální introgrese. Na základě mitochondriální analýzy jeskynní populace Pachon klastrovala společně s populací žijící v povrchových vodách, ale mikrosatelity odhalily příslušnost k podzemním populacím. Autoři se ovšem domnívají, že introgresi zapříčinila zatím ještě neobjevená jeskynní populace, která je přizpůsobená životu v podzemí. Další molekulární výzkum jeskynních ryb rodu *Lucifuga* probíhal na Kubě a Bahamách. Výsledky naznačily rychlou evoluci během posledních pár miliónů let, kdy paleogeografické události měly vliv na formování soustroví. Byla zjištěna silná geografická struktura linií a druhů z důvodu dlouhodobé izolace (García-Machado et al., 2011). Distribuce haplotypu ukazuje, že v několika případech byly u jeskynních ryb zjištěny jedinečné haplotypy mtDNA, což svědčí o velmi omezeném nebo žádném toku genů mezi relativně blízkými geografickými lokalitami (Slatkin & Maddison, 1989; Martin a Birmingham, 2000). Na základě metody RAPD byla zkoumána nukleotidová diverzita čtyř druhů jeskynních ryb v Thajsku. Výzkum vychází z předpokladu, že živočichové žijící v podzemí mají nižší populační velikost než populace žijící na povrchu (Borowsky et al., 2001).

Výsledky mé práce ukázaly, že populace druhů *T. dabar* i *T. metohiensis* mají nízký počet jedinců, populace nejsou geneticky variabilní a areál jejich výskytu je velmi malý. Z toho vyplývá, že oba druhy jsou značně zranitelné a ohrožené. V současnosti je v databázi IUCN veden pouze druh *T. metohiensis*, který je zařazen do kategorie zranitelný, avšak podle mapy IUCN jeho areál chybně zahrnuje nejen areál druhů *T. metohiensis*, *T. dabar* a *T. miloradi*, ale i mnohem větší území.

Krasová polje patří mezi oblasti, které jsou vysoce ohroženy antropogenní činností. Výstava přehrad a tunelů brání záplavám, čímž dochází k narušení celého ekosystému.

Čerpání podzemní vody, zemědělství a znečištění ohrožují nejen podzemní živočichy. Neméně důležitým faktorem je i introdukce nepůvodních druhů. Například *Telestes* v řece Mušnica nebyl v posledních letech nalezen, jelikož se na místě rozmnožily oukleje (*Alburnus neretvae*) (J. Vukić, osobní sdělení). Klimatické změny a oteplování mohou mít rovněž negativní dopad na život ryb, jelikož zmíněné druhy žijí v chladnějších vodách.

## Závěr

- Byla zhodnocena genetická variabilita druhu *Telestes dabar*, *T. metohiensis* a orientačně i *T. miloradi*.
- Celkem bylo analyzováno 102 jedinců z 5 lokalit v oblasti krasových poljí ve východní Hercegovině a jižním Chorvatsku.
- Pro analýzy byl použit mitochondriální marker cytochrom *b* a 14 mikrosatelitových lokusů.
- Bylo získáno 87 sekvencí cytochromu *b* o délce 1140 bp a byla zjištěna délka mikrosatelitových alel u 100 jedinců.
- Genetická variabilita jednotlivých populací byla velmi nízká.
- Negativní výsledky testů neutrality na základě analýzy cytochromu *b* poukazují na selektivní sweep, nebo recentní expanzi populací po bottlenecku.
- Analýzou cyt *b* byl jednoznačně oddělen pouze druh *T. miloradi* od ostatních dvou druhů.
- Výsledky u druhu *T. dabar* mohou naznačovat mitochondriální introgresi.
- Pomocí  $F_{IS}$  koeficientu byla potvrzena přítomnost inbreedingu v populacích.
- Populace mají nízkou efektivní velikost, jsou náchylnější k demografickým změnám a jejich adaptační potenciál je redukován.
- Ryby jsou ohroženy budováním kanálů a hrází, které mají bránit záplavám a které způsobují vysychání poljí.
- Pro další výzkum by bylo vhodné získat vyšší počet vzorků především druhu *T. miloradi* a provést analýzu současné a minulé migrace na základě genetických dat.

## Seznam použité literatury

- \***Bogutskaya, N. G. (1990).** Morphological fundamentals in classification of the subfamily Leuciscinae (Cyprinidae). *Journal of Ichthyology*, 30 (3), 63–77.
- \***Mayr, E., (1954).** Change of genetic environment and evolution. Evolution as a proces. Allen & Unwin, London. *American journal of physical anthropology*, 13 (1), 156–180.
- \***Mesquita, N. et al. (2003).** Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the endangered Portugese freshwater fish *Squalius aradensis* (Cyprinidae), 3 (4), 572–574.
- \***Milanović P. (2006)** *Karst istocne Hercegovine i dubrovackog priobalja (Karst of Eastern Herzegovina and Dubrovnik littoral)*. In: Serbian. ASOS, Belgrade, 362.
- \***Mrakovčić, M, Brigic, A., Buj I, et al. (2004).** Crvena knjiga sladkovodnih riba hrvatske (Red book of freshwater fish of Croatia). Ministrstvo kulture, Drzavni zavod za zastitu prirode, Republika Hrvatska, 246.
- Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spurell, P., Wenburg, J.K. (2001).** The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Tree*, 16, 613–622.
- Apostodilis, A. P., Triantaphyllidis, C., Kouvatsi, A., and Economidis, P. S. (1997).** Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta L.* (Greek brown trout) populations. *Molecular Ecology*, 6, 531–542.
- Arnold, M.L. (1997).** Natural Hybridization and Evolution. Oxford Series in Ecology and Evolution. *Biodiversity and Conservation*, 18(6), 1435–1439.
- Arnold, M.L., Bulger, M.R., Burke, J.M., Hempel, A.L., Williams, J.H., (1999).** Natural hybridization: how low can you go? (and still be important), *Ecology*, 80, 371–381.
- Avise, C.J., Arnold, J., Ball, M.R, Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, E.J., Reeb, A.C., Saunders, C.N. (1987).** Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18 (1), 489–522.
- Baerwald, R.M., May, B. (2004).** Charcterization of microsatellite loci for five members of the minnow family Cyprinidae found in the Sacramento-San Joaquin Delta and its tributaries. *Molecular Ecology Notes*, 4, 385–390.
- Ballian, D. (February, 2019).** Malo polje u istočnoj Hercegovini – Cerničko polje. Retrieved from <http://www.svjetlorijeci.ba/content/malo-polje-u-isto%C4%8Dnoj-hercegovini-cerni%C4%8Dko-polje>
- Boessenkool, S., Taylor, S. T., Tepolt, K.C., Komdeur, J., Jamieson, G.I. (2007).** Large mainland populations of South Island robins retain greater genetic diversity than offshore island refuges, *Conservation Genetics*, 8 (3), 705–714.
- Bogutskaya, N., Zupančić, P., Bogut, I., Naseka, M. (2012).** Two new freshwater fish species of the genus *Telestes* (Actinopterygii, Cyprinidae) from karst poljes in Eastern Hercegovina and Dubrovnik littoral (Bosnia and Hercegovina and Croatia). *ZooKey*, 180, 53–80.

- Bogutskaya, N.G., and Zupančič P. (2003).** *Phoxinellus pseudalepidotus* (Teleostei: Cyprinidae), a new species from the Neretva basin with an overview of the morphology of *Phoxinellus* species of Croatia and Bosnia-Herzegovina. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 14, 369–383.
- Bonacci, O. (1987).** *Karst Hydrology, with special reference to the Dinaric karst*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 184.
- Bonacci, O. (2015).** Karst hydrogeology/hydrology of dinaric chains and isles. *Environmental Earth Sciences*, 74, 37–55.
- Bonacci, O., Galić, A., Željковиć, I. (2013).** Karst rivers' particularity: an example from Dinaric karst (Croatia/Bosnia and Herzegovina). *Environmental Earth Sciences*, 70, 963–974.
- Borowsky, L.R., Vidthayanon, C. (2001).** Nucleotide diversity in populations of balitorid cave fishes from Thailand. *Molecular Ecology*, 10, 2799–2805.
- Brown W. M., George M., Wilson A. C. (1979).** Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 (4), 1967–1971.
- Buj, I., Marčić, Z., Čaleta M., Šanda, R., Geiger, M.F., Freyhof, J. (2017).** Ancient connections among the European rivers and watersheds revealed from the evolutionary history of the genus *Telestes* (Actinopterygii; Cypriniformes, *Plos One*, 12, 1–21.
- Buj, I., Marko, C., Mar, Z. (2015).** Different Histories, Different Destinies - Impact of Evolutionary History and Population Genetic Structure on Extinction Risk of the Adriatic Spined Loaches (Genus *Cobitis*; Cypriniformes, Actinopterygii). *Plos One*, 10(7), 1–17.
- Buj, I., Šanda, R., Zogaris, S., Freyhof, J., Geiger, F.M., Vukić, J. (2019).** Cryptic diversity in *Telestes pelurobipunctatus* (Actinopterygii, Leuciscidae) as a consequence of historic biogeography in the Ionian Freshwater Ecoregion (Greece, Albania), *Hydrobiologia*, 835, 147–163.
- Buj, I., Marčić, Z., Čaleta, M., Šanda, R., Geifer, F. M., Freyhof, J., Machordom, A., Vukić, J. (2017).** Ancient connections among the European rivers and watersheds revealed from the evolutionary history of the genus *Telestes* (Actinopterygii; Cypriniformes). *Plos One*, 12 (12), 1–21.
- Chapuis, M.P., Estoup, A. (2007).** Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 621–631.
- Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Volckaert, F. A. M. (2006).** Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 1–29.
- Chung, H.J., Kim, M.J., Lim, J.Y., Park S.M., Cha, B.J., Kim Y.H., Yang, M.S., Kim, D.H.(2006)** A gene encoding phosphatidyl inositol – specific phospholipase C from *Cryphonectria parasitica* modulates the *lac1* expression. *Fungal Genet Bio*, 43(5). 326–36.
- Clayton D. A. (1982).** Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28, 693–705.
- Culver, D.C. (1982).** *Cave Life: Evolution and Ecology*. Harvard University Press, Cambridge and London.

- Culver, D.C. & B. Sket, (2000).** Hotspots of subterranean biodiversity in caves and wells. *Journal of Cave and Karst Studies*, 62 (1), 11–17.
- Dabrowski, J.M., Pilot, M., Kruczyk, Zmihorski, M., Umer, M. H., Gliwics, J. (2014).** Reliability assessment of null allele detection: inconsistencies between and within different methods, *Molecular Ecology Resources*, 14, 361–373
- Dawson, A., D., Burland, M., T., Douglas, A., Le Comber, C., S., Bradshaw, M. (2003).** Isolation of microsatellite loci in the freshwater fish, the bitterling *Rhodeus sericeus* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Ecology Notes*, 3, 199–202.
- Do, C., Waples, R.S., Peel, D., Macbeth, G.M., Tillet, B.J., Ovenden, J.R. (2014),** NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 14 (1), 209–214.
- Doadrio, I. & Elvira, B. (2007).** A new species of the genus *Achondrostoma* Robalo, Almada, Levy & Doadrio, 2007 (Actinopterygii, Cyprinidae) from western Spain. *Graellsia*, 63(2), 295–304.
- Doadrio, I. & Carmona, J. A. (1998).** Genetic divergence in Greek populations of the genus *Leuciscus* and its evolutionary and biogeographical implications. *Journal of Fish Biology*, 53, 591–613.
- Doadrio, I. & Carmona, J. A. (2006).** Phylogenetic overview of the genus *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae) in the Iberian Peninsula, with description of two new species. *Cybum* 30 (3). 199–214.
- Dubut, V. Martin, J., Costedoat., C. Chappaz, R., Gilles, A., (2009),** Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the freshwater fishes *Telestes souffia* and *Telestes muticellus* (Teleostei: Cyprinidae), *Molecular Ecology Resources*, 9, 1001–1005
- Earl, D. A., Von Holdt, B. M. (2012).** STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361.
- \*Eisen, J.A. (1999).** Mechanistic basis for microsatellite instability. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, 34–48.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., (2010).** Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.
- Fišer, C., Zakšek, V., Zagmajster, M., Sket, B. (2007).** Taxonomy and biogeography of *Niphargus steueri* (Crustacea: Amphipoda). *Limnology*, 8, 297–309.
- Freyhof, J., Licekfeldt, D., Pitra, Ch., Ludwig, A. (2005).** Molecules and morphology: Evidence for introgression of mitochondrial DNA in Dalmatian cyprinids, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37, 347–354.
- Freyhof, J., Lieckfeldt, D., Bogutskaya, N. (2006).** Phylogenetic position of the Dalmatian genus *Phoxinellus* and description of the newly proposed genus *Delminichthys* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38, 416–425.
- Fu, Y., Li, W. (1993).** Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133 (3), 3693–709.

- Gams, I. (1969).** Some Morphological Characteristics of Dinaric Karst. *The Geographic Journal*, 135, 563–572.
- Glez-Peña D., Gómez-Blanco D., Reboiro-Jato M., Fdez-Riverola F., Posada D. (2010).** ALTER: program-oriented format conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Research*, 38(2), 14–18.
- Goldstein, D. B. and Schlötterer, C. (1999).** *Microsatellites Evolution and Applications*. Oxford University Press, Inc., New York, 352.
- Google Maps (2019).** Google, <https://www.google.cz/maps/> [cit. 2019-06-11].
- Goudet, J. (1995).** FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86(6), 485–486.
- Harrington, B. et al (2004-2005).** Inkscape. <http://www.inkscape.org/>.
- Harris, P. M. (2012).** Comparative genetics of postembryonic development as a means to understand evolutionary change. *Journal of Applied Ichthyology*, 28, 306–315.
- Holsinger, K. E., Weir, B.S. (2009).** Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting  $F_{ST}$ . *Nat. Rev. Genet.* 10, 639–650.
- Jakobsson, M. & Rosenberg, N. A. (2007).** CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801–1806.
- Jelić, D., Jelić, M. (2015),** *Telestes miloradi* Bogutskaya, Župančić, Bogut & Naseka, 2012 and *Delminichthys ghetaldii* (Steindachner, 1882) re-discovered in Croatia, requiring urgent protection, *J. Appl. Ichthyology*, 31, 1133–1136.
- Ketmaier, V., Bianco, P., Cobolli, M., Krivokapic M., Caniglia R., Matthaes E. (2004).** Molecular phylogeny of two lineages of Leuciscinae cyprinids (*Telestes* and *Scardinius*) from the peri-Mediterranean area based on cytochrome *b* data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32, 1061–1071.
- Kondo R., Satta Y., Matsuura E. T., Ishiwa H., Takahata N., Chigusa S. I. (1990).** Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*, *Genetics*, 126(3), 657–663.
- Kopelman et al. (2015).** Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure interferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1179–1191.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., Mayrose, I.** "CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K". *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1179–1191, doi: 10.1111/1755-0998.12387.
- Kottelat, M., Freyhof, J. (2007).** *Handbook of European Freshwater Fishes*. Publications Kottelat, 647.
- Kulijer, D., De Knifj, G., Franković (2012).** Review of the Odonata of Bosnia and Hercegovina, *Odonatologica*, 42 (2), 109–123.



- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016).** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870–1874
- Lambert, D.M, King, T., Shepherd, D.L, Livingston, A., Anderson, S., Craig, L.J (2005).** Serial population bottlenecks and genetic variation: Translocated populations of the New Zealand Saddleback (*Philesturnus carunculatus rufusater*). *Conservation Genetics*, 6 (1), 1–14.
- Larno, V., Launey, S. Devaux, A., Laroche, J. (2005).** Isolation and characterization of microsatellite loci from chub *Leuciscus cephalus* (Pisces: Cyprinidae). *Molecular Ecology Notes*, 5, 752–754.
- Machado-García, E., Hernandez, D., García-Debrás, Monteagudo-Chevalier, P., Metcalfe, C., Bernatchez, L., Casane, D. (2011).** Molecular phylogeny and phylogeography of the Cuban cave-fishes of the genus *Lucifuga*: Evidence for cryptic allopatric diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61, 470–483.
- Machordom A., Doadrio I. (2001).** Evidence of a cenozoic betic-kabilian connection based on freshwater fish phylogeography (Luciobarbus, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18(2), 252–263.
- Marčić, Z., Buj, I., Duplić, A., Čaleta, M., Mustafić, P., Zanella, D., Zupančič, P. & Mrakovčić, M., (2011).** A new endemic cyprinid species from the Danube drainage. *Journal of Fish Biology*, 79 (2), 418–430.
- Marková, S., Šanda, R., Crivelli, A., Shumka, S., Wilson, I.F, Vukić, J., Berrebi, P., Kotlík, P. (2010).** Nuclear and mitochondrial DNA sequence data reveal the evolutionary history of Barbus (Cyprinidae) in the ancient lake systems of the Balkans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 488–500.
- Martin, A.P., Bermingham, E., (2000).** Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of Neotropical catfish. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, 267, 1135–1141.
- Meyer, A., Kocher, T.D., Basasibwaki, P., Wilson, A.C. (1990).** Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, 34, 550–553.
- Milanović, P. (2015).** Karst of Eastern Hercegovina, the Dubrovnik littoral and Western Montenegro. *Environmental Earth Sciences*, 74, 15–35.
- Milanović, P.T. (1981).** *Karst Hydrogeology*. Water Resources Publications, Littleton, Colorado, 434.
- Muenzel, F.M., Sanetra, M., Salzburger, W., Meyer, A. (2007).** Microsatellites from the vairone *Leuciscus souffia* (Pisces: Cyprinidae) and their application to closely related species. *Molecular Ecology Notes*, 7, 1048–1050.
- Nei, M., Maruyama, T., Chakraborty, R., (1975).** The Bottleneck effect and genetic variability in populations. *International Journal of Organic Evolution*, 29, 1–10.
- Oikonomou, A., Leprieur, F., Leonardos, I. (2014).** Biogeography of freshwater fishes of the Balkan Peninsula. *Hydrobiologia*, 738, 205–220.
- Palandačić, A., Matschiner, M., Zupančič, P., Snoj, A. (2012).** Fish migrate underground: the example of *Delminichthys adspersus* (Cyprinidae). *Molecular Ecology*, 5, 1658–1671.

- Peakall, R. and Smouse P.E. (2006).** GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288–295.
- Perea, S., Böhme, M., Zupančič, P., Freyhof, J., Šanda, R., Ozulug, M., Abdoli, A., Doadrio, I. (2010).** Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 265.
- Perea, S., Vukić, J., Šanda, R., Doadrio, I. (2016).** Ancient Mitochondrial Capture as Factor Promoting Mitonuclear Discordance in Freshwater Fishes: A Case Study in the Genus *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae) in Greece. *PLoS ONE*, 11(12). 1–26.
- Poulson, T.L, White, W.B. (1969).** The cave environment. *Science*, 165, 971–981.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. J. (2000).** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- Radulović, M. (2013).** A new view on karst genesis. *Carbonates Evaporites*, 28, 383–397.
- Reifová, R., (2017).** Populační genetika, presentation at Charles University in Prague, Faculty of Science, Prague, Czech Republic.
- Rhymer, J.M, Simberloff, D. (1996).** Extinction by hybridization and introgression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27: 83–109.
- Rosenberg, N. A. (2004).** DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology*, 4, 137–138.
- Rousset, F. (2008).** GENEPOP 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–106.
- Rozas, J., Sánchez-Del Barrio, J.C., Messeguer, X. and Rozas, R. (2003).** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Santos A. M., Cabezas M. P., Tavares A. I., Xavier R., Branco M. (2015):** tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. *Bioinformatics*, btv636.
- Schlötterer, C., Tautz, D. (1992).** Slippage synthesis of simple sequence DNA, *Nucleic Acids Res.*, 20, 211-215.
- Schönhuth, A., Vukić, J., Šanda, R., Yang, L., Mayden L., R. (2018).** Phylogenetic relationships and classification of the Holarctic family Leuciscidae (Cypriniformes: Cyprinoidei). *Molecular genetics and evolution*, 127, 781-799
- Scribner, K.T., Page, K.S., Bartron, M. (2001).** Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10, 293–323.
- Sehn, K.J. (2015).** Insertions and Deletions (Indels). *Clinical Genomics*, <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/slipped-strand-mispairing>.
- Sharma, O. P., Bambawale, O. M., Gopali, J. B., Bhagat, S., Yelshetty, S., Singh, S. K., Anand, R.,**

- Singh, O.M. (2011).** Field guide Mung bean and Urd bean. Government of India, Department of agricultural and co-operation, NCIPM, ICAR, New Delhi, India.
- Slatkin, M., Maddison, W.P., (1989).** A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Genetics*, 123, 603–613.
- Snoj, A., Bogut, I., Sušnik, S. (2008).** Evidence of a genetically distinct population of Vrljika softmouth trout *Salmo obtusirostris* Heckel evolved by vicariance. *Journal of Fish Biology*, 72, 1945–1959.
- Strecker, U., Bernatchez, L., Wilkends, H. (2003).** Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Ecology*, 12, 699 – 710.
- Symonds, V., Lloyd, A. (2003).** An Analysis of Microsatellite Loci in *Arabidopsis thaliana*: Mutational Dynamics and Application, *Genetics*, 165, 1475–1488.
- Tajima, F. (1989).** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123 (3), 585–595.
- Taylor, E B, & J. D. McPhail. (2000).** Historical contingency and ecological determinism interact to prime speciation in sticklebacks, *Gasterosteus*. *Proceedings. Biological sciences*, 267, 1460.
- Templeton A. R., Crandall K. A., Sing C. F. (1992).** A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132(2), 619–633.
- Toth, G., Gaspari, Z., Jurka, D. (2000).** Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.*, 10, 967–981.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, F. W., Wills, P.M.D., Shipley, D. (2004).** MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology*, 4 (3), 535–538.
- Vlahović, I., Tišljarić, J., Velić, I., Matičec, D. (2005).** Evolution of the Adriatic Carbonate Platform: Paleogeography, main events and depositional dynamics. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 55, 333–360.
- Waples, S. R.(2006).** A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci, *Conservation Genetics*, 7, 167.
- Weir, B.S., Cockerham, C., (1984).** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38 (6), 1358–1370.
- Weir, B.S., Hill, W.G. (1980).** Effect of mating structure on variation in linkage disequilibrium. *Genetics*, 95, 477–488.
- Weisrock, D.W.K, Hozak, H., Larson, A. (2005).** Phylogeographic analysis of mitochondrial gene flow and introgression in the salamander *Plethodon shermani*. *Mol. Ecol.* 14, 1457–1472
- Wilson, R.P., Cowey, C.B., (1985).** Amino acid composition of whole body tissue of rainbow trout and Atlantic salmon. 48, *Aquaculture*, 373–376.

**Zardoya, R., Doadrio, I. (1998).** Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: systematic and biogeographical implications. *Proc Biol Sci.*; 265(1403), 1365–1372.

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

**Zardoya, R., Economidis, P.S., and Doadrio, I. (1999).** Phylogenetic relationships of Greek Cyprinidae: molecular evidence for at least two origins of the Greek cyprinid fauna. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13, 122–131.

Vysvětlivka: \* přejatá primární citace

# Přílohy

Příloha č. 1 Protokol pro izolaci DNA-Genomic DNA Mini Kit, převzato z [www.geneaid.com](http://www.geneaid.com)

## Genomic DNA Mini Kit (Tissue)

*For research use only*

**Sample:** up to 30 mg of tissue (tailnips, liver, kidney, brain, adipose tissue, earpunches, insects etc.)

**Yield:** 10-20 µg (0.5 cm of mouse tail, 20 mg of mouse liver), 20-50 µg (20 mg of mouse kidney)

**Format:** spin column

**Time:** within 30 minutes

**Elution volume:** 30-200 µl

**Storage:** dry at room temperature (15-25°C)

**Geneaid**



ISO 9001:2008 QMS

### Introduction

The Genomic DNA Mini Kit (Tissue) was designed specifically for purifying total DNA (including genomic, mitochondrial and viral DNA) from a variety of tissue and insect samples. The provided micropestle can efficiently homogenize tissue samples to shorten the time in the Lysis Step. Proteinase K and chaotropic salt are used to lyse cells and degrade protein, allowing DNA to be easily bound by the glass fiber matrix of the spin column. Once any contaminants have been removed, using a Wash Buffer (containing ethanol), the purified DNA is eluted by a low salt Elution Buffer, TE or water. The entire procedure can be completed without phenol/chloroform extraction or alcohol precipitation. The purified DNA (approximately 20-30 kb) is suitable for use in PCR or other enzymatic reactions.

### Quality Control

The quality of the Genomic DNA Mini Kit (Tissue) is tested on a lot-to-lot basis by isolating genomic DNA from a 20 mg mouse liver sample. The purified DNA (more than 10 µg with an A260/A280 ratio of 1.8-2.0) is quantified with a spectrophotometer and analyzed by electrophoresis.

### Kit Contents

Component	GT004	GT050	GT100	GT300
GT Buffer	3 ml	30 ml	30 ml	75 ml
GBT Buffer	4 ml	40 ml	40 ml	75 ml
W1 Buffer	2 ml	45 ml	45 ml	130 ml
Wash Buffer* (Add Ethanol)	1 ml (4 ml)	25 ml (100 ml)	25 ml (100 ml)	50 ml (200 ml)
Proteinase K** (Add ddH <sub>2</sub> O)	1 mg (0.1 ml)	11 mg (1.1 ml)	11 mg x 2 (1.1 ml x 2)	65 mg (6.5 ml)
Elution Buffer	1 ml	30 ml	30 ml	75 ml
GS Columns	4	50	100	300
2 ml Collection Tubes	8	100	200	600
Micropestle	4	50	100	300

### Order Information

Product	Package Size	Catalogue Number
Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell)	100/250 preps	GB100/300
Genomic DNA Maxi Kit (Blood/Cultured Cell)	10/25 preps	GDM010/25
Genomic DNA Mini Kit (Tissue)	50/200/300 preps	GT050/200/300
gSYNC™ DNA Extraction Kit	50/100/300 preps	GS050/100/300
Genomic DNA Mini Kit (Plant)	100 preps	GP100
Genomic DNA Maxi Kit (Plant)	10/25 preps	GPM010/25
Geneaid™ DNA Reagent Plant	100/200 runs	GR100/200
Presto™ Mini gDNA Yeast Kit	100/300 preps	GBY100/300
Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit	100/300 preps	GMB100/300/300
Geneius™ Micro DNA Extraction Kit	100/300 preps	GMB100/300
Presto™ Baccal Swab gDNA Extrac. on Kit	100/300 preps	GS0100/300
Presto™ 96 Well Blood gDNA Extraction Kit	4/10 x 96 preps	96GBP04/10
Presto™ 96 Well Plant gDNA Extraction Kit	4/10 x 96 preps	96GPP04/10

\*Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to the Wash Buffer prior to initial use

\*\*Add ddH<sub>2</sub>O (see the bottle label for volume) to prepare Proteinase K (vortex to dissolve and spin down) and store at 4°C

### Caution

GBT Buffer contains guanidine hydrochloride. During operation, always wear a lab coat, disposable gloves, and protective goggles.

### Genomic DNA Mini Kit (Tissue) Functional Test Data

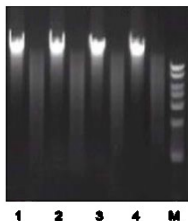


Figure 1. Genomic DNA from a variety of tissue samples was extracted using the Genomic DNA Mini Kit (Tissue). The purified genomic DNA (30-40 kb) was EcoRI digested and analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel.

1 = Mouse Liver  
2 = Mouse Tail  
3 = Fish Muscle  
4 = Fruit Fly (Drosophila)  
M = Geneaid 1 Kb DNA Ladder



## Genomic DNA Mini Kit (Tissue) Protocol

### IMPORTANT BEFORE USE

- Add ddH<sub>2</sub>O (see the bottle label for volume) to prepare Proteinase K (vortex to dissolve and spin down) and store at 4°C
- Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to the Wash Buffer prior to initial use
- Additional requirements: microcentrifuge tubes, absolute ethanol, (optional) RNase A (10 mg/ml), ddH<sub>2</sub>O

Tissue Dissociation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cut up to <b>30 mg of animal tissue</b> (or 0.5 cm of mouse tail) then transfer it to a 1.5 ml microcentrifuge tube.</li> </ul> <p>NOTE: If tissue has a higher number of cells (e.g. spleen or liver), reduce the starting material to 10 mg.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Use the provided <b>Micropestle</b> to grind the tissue to a pulp.</li> <li>• Add <b>200 µl of GT Buffer</b> to the tube and homogenize the sample tissue by grinding.</li> <li>• Add <b>20 µl of Proteinase K</b> to the sample mixture then shake vigorously and incubate at 60°C for 30 minutes.</li> </ul> <p>NOTE: During incubation, invert the tube every 5 minutes.</p>
Step 1 Lysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Add <b>200 µl of GBT Buffer</b> then shake vigorously for 5 seconds.</li> <li>• <b>Incubate at 60°C for at least 20 minutes to ensure the lysate is clear. Inkubace na 56°C přes celou noc</b></li> </ul> <p>NOTE: During incubation, invert the tube every 5 minutes. If insoluble material is present following incubation, centrifuge for 2 minutes at 14-16,000 x g then transfer the supernatant to a new 1.5 ml microcentrifuge tube.</p> <p>At this time, preheat the required <b>Elution Buffer</b> (200 µl per sample) to 60°C (for Step 4 DNA Elution).</p> <p><b>Optional Step: RNA Degradation</b> (If RNA free gDNA is required, perform this optional step)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Following 60°C incubation, add 4 µl of RNase A (10 mg/ml) to the sample lysate then shake vigorously.</li> <li>• Incubate at room temperature for 5 minutes.</li> </ul>
Step 2 DNA Binding	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Add <b>200 µl of absolute ethanol</b> to the lysate then immediately shake vigorously for 10 seconds.</li> </ul> <p>NOTE: If precipitate appears, break it up as much as possible with a pipette.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Place a <b>GS Column</b> in a <b>2 ml Collection Tube</b>.</li> <li>• Transfer the mixture (including any precipitate) to the <b>GS Column</b> then centrifuge at 14-16,000 x g for 2 minutes.</li> <li>• Discard the <b>2 ml Collection Tube</b> then transfer the <b>GS Column</b> to a new <b>2 ml Collection Tube</b>.</li> </ul>
Step 3 Wash	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Add 400 µl of W1 Buffer to the GS Column then centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds.</b></li> <li>• <b>Discard the flow-through then place the GS Column back in the 2 ml Collection Tube.</b></li> <li>• <b>Add 600 µl of Wash Buffer (make sure ethanol was added) to the GS Column.</b></li> <li>• <b>Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds.</b></li> <li>• <b>Discard the flow-through then place the GS Column back in the 2 ml Collection Tube.</b></li> <li>• <b>Centrifuge for 3 minutes at 14-16,000 x g to dry the column matrix.</b></li> </ul>
Step 4 DNA Elution	<p>Standard elution volume is 100 µl. If less sample is to be used, reduce the elution volume (30-50 µl) to increase DNA concentration. If higher DNA yield is required, repeat the DNA Elution step to increase DNA recovery and the total elution volume to approx. 200 µl.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Transfer the dried <b>GS Column</b> to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.</li> <li>• Add <b>100 µl of pre-heated Elution Buffer</b> or TE to the CENTER of the column matrix. <b>přidáno 75µl Elution Buffer, 5 min absorpce, centrifuga</b></li> <li>• Let stand for at least 5 minutes to ensure the <b>Elution Buffer</b> or TE is completely absorbed. <b>2x opakováno</b></li> <li>• Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds to elute the purified DNA.</li> </ul>

### Troubleshooting

Problem	Possible Reasons/Solution
Clogged Column	<p><b>Too much tissue was used</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• If using more than 30 mg of tissue, separate into multiple tubes.</li> </ul>
	<p><b>Sample tissue was not lysed completely</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Add additional Proteinase K and extend the incubation time in the Lysis Step.</b></li> <li>• <b>Following the Lysis Step, centrifuge for 2 minutes at 14-16,000 x g to remove sample debris. Transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube and proceed with the DNA Binding Step.</b></li> </ul>
Low Yield	<p><b>Precipitate was formed at DNA Binding step</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduce the sample material.</li> <li>• Following ethanol addition, break up any precipitate as much as possible prior to loading GS Column.</li> </ul>
	<p><b>Sample tissue was not lysed completely</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Add additional Proteinase K and extend the incubation time in the Lysis Step.</li> </ul> <p><b>Column was clogged at DNA Binding step</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Following the Lysis Step, remove the insoluble debris by centrifugation.</li> <li>• Prior to loading the column, break up the precipitate in the ethanol-added lysate.</li> </ul>
	<p><b>Incorrect DNA Elution Step</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ensure that the Elution Buffer or TE is added to the center of the GS Column matrix and is absorbed completely.</li> </ul> <p><b>Incomplete DNA elution</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Elute twice to increase the DNA recovery.</li> </ul>
Eluted DNA does not perform well in downstream applications	<p><b>Residual ethanol contamination</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Following the Wash Step, dry the GS Column by centrifuge at 14-16,000 x g or incubate at 60°C for 5 minutes.</li> </ul> <p><b>RNA/Protein contamination</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Perform optional RNA Degradation step/reduce the sample amount.</li> </ul>
	<p><b>Genomic DNA was degraded</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Use fresh samples or freeze fresh samples in liquid nitrogen immediately and store at -80°C.</b></li> </ul>

**Příloha č. 2** *Frekvence alel v jednotlivých populacích vygenerované programem FSTAT.*

Populace: Zalomka Cernica Vrijeka Mušnica Ljuta

Locus: **BL130**

N	28	30	25	8	4
p: 79	0.393	0.017	0.000	0.000	0.000
p: 85	0.107	0.100	0.900	0.188	1.000
p: 87	0.464	0.800	0.080	0.625	0.000
p: 89	0.018	0.033	0.020	0.188	0.000
p: 93	0.018	0.050	0.000	0.000	0.000

Locus: **BL144**

N	28	28	25	7	4
p: 122	1.000	0.696	0.880	1.000	1.000
p: 126	0.000	0.054	0.000	0.000	0.000
p: 130	0.000	0.250	0.120	0.000	0.000

Locus: **Lsou05**

N	28	29	24	9	4
p: 177	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000
p: 185	0.536	0.000	0.083	0.000	0.000
p: 187	0.036	0.000	0.583	0.278	0.000
p: 189	0.000	0.000	0.063	0.167	0.000
p: 191	0.321	0.983	0.104	0.278	0.000
p: 193	0.000	0.017	0.063	0.000	0.125
p: 195	0.000	0.000	0.000	0.000	0.625
p: 201	0.036	0.000	0.063	0.000	0.000
p: 203	0.036	0.000	0.000	0.111	0.250
p: 205	0.036	0.000	0.000	0.056	0.000
p: 207	0.000	0.000	0.000	0.111	0.000

Locus: **BL161**

N	30	30	26	9	4
p: 195	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000
p: 197	0.983	0.983	1.000	1.000	1.000
p: 199	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000

Locus: **BL1153**

N	29	28	26	9	4
p: 220	0.741	0.857	1.000	0.833	1.000
p: 222	0.259	0.143	0.000	0.167	0.000

Locus: **Lsou19**

N	30	30	26	9	4
p: 178	0.683	0.833	1.000	0.944	1.000
p: 180	0.317	0.017	0.000	0.056	0.000
p: 182	0.000	0.150	0.000	0.000	0.000

Locus: **Lsou29**

N	30	28	26	9	4
p: 312	0.000	0.036	0.000	0.056	0.000
p: 314	0.950	0.857	0.731	0.667	0.000
p: 316	0.017	0.107	0.000	0.167	0.000
p: 318	0.017	0.000	0.000	0.111	0.000
p: 320	0.000	0.000	0.212	0.000	0.625
p: 322	0.000	0.000	0.019	0.000	0.375
p: 324	0.017	0.000	0.038	0.000	0.000

Locus: **BL12B**

N	30	31	26	7	4
p: 149	0.000	0.048	0.000	0.000	0.000
p: 151	1.000	0.952	1.000	1.000	1.000

Locus: **Lsou34**

N	30	31	24	8	4
p: 230	0.450	0.016	0.083	0.125	0.000
p: 232	0.200	0.032	0.146	0.313	0.000
p: 234	0.017	0.016	0.021	0.000	0.000
p: 236	0.100	0.661	0.479	0.313	0.000
p: 240	0.183	0.226	0.000	0.000	0.625
p: 242	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250
p: 246	0.000	0.000	0.000	0.063	0.125
p: 248	0.033	0.016	0.000	0.188	0.000
p: 250	0.000	0.000	0.188	0.000	0.000
p: 252	0.000	0.032	0.021	0.000	0.000
p: 254	0.017	0.000	0.042	0.000	0.000
p: 256	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000

Locus: **Lsou08**

N	28	31	25	6	4
p: 191	0.089	0.081	0.000	0.000	0.000
p: 193	0.018	0.081	0.000	0.000	0.000
p: 195	0.054	0.129	0.060	0.333	0.000
p: 197	0.250	0.323	0.520	0.500	0.750
p: 199	0.089	0.194	0.300	0.083	0.250
p: 201	0.089	0.194	0.080	0.083	0.000
p: 203	0.089	0.000	0.020	0.000	0.000
p: 207	0.286	0.000	0.020	0.000	0.000
p: 209	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000



Locus: **LceC1**

N	30	30	25	7	4
p: 87	0.033	0.083	0.020	0.071	0.000
p: 89	0.317	0.117	0.820	0.000	0.000
p: 93	0.333	0.250	0.060	0.571	0.500
p: 95	0.017	0.133	0.040	0.214	0.000
p: 97	0.017	0.067	0.060	0.000	0.000
p: 99	0.150	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 101	0.117	0.033	0.000	0.071	0.500
p: 103	0.017	0.317	0.000	0.071	0.000

Locus: **RSer10**

N	26	26	24	7	4
p: 183	0.077	0.000	0.042	0.000	0.000
p: 185	0.250	0.077	0.854	0.000	1.000
p: 187	0.038	0.000	0.000	0.071	0.000
p: 189	0.096	0.423	0.042	0.500	0.000
p: 191	0.038	0.481	0.000	0.143	0.000
p: 193	0.442	0.000	0.042	0.071	0.000
p: 197	0.038	0.000	0.000	0.143	0.000
p: 199	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000
p: 201	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000
p: 205	0.000	0.000	0.021	0.071	0.000

Locus: **N7K4**

N	30	28	26	7	4
p: 150	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000
p: 152	0.183	0.054	0.058	0.000	0.000
p: 154	0.717	0.179	0.596	0.643	0.000
p: 156	0.033	0.000	0.192	0.071	0.375
p: 158	0.033	0.768	0.058	0.143	0.625
p: 160	0.000	0.000	0.058	0.000	0.000
p: 162	0.033	0.000	0.019	0.143	0.000

Locus: **CypG24**

N	30	30	26	8	4
p: 133	0.083	0.450	0.077	0.313	0.000
p: 137	0.017	0.000	0.058	0.000	0.000
p: 139	0.500	0.333	0.827	0.500	1.000
p: 141	0.383	0.217	0.038	0.188	0.000
p: 145	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000

**Příloha č. 3** *Frekvence genotypů v jednotlivých populacích vygenerované programem GenePop, dvě řady čísel představují určitou kombinaci alel, např. 79/79, 79/85, 85/85 atd.*

Locus: **BL130**

Pop Genotypes:

	79	79	85	79	85	87	87	89	85	87	89	Total
	79	85	85	87	87	87	89	89	93	93	93	
Zalomka	4	2	1	12	1	6	1	0	1	0	0	28
Cernica	0	0	1	1	4	20	1	0	0	2	1	30
Vrijeka	0	0	22	0	1	1	1	0	0	0	0	25
Mušnica	0	0	1	0	1	4	1	1	0	0	0	8
Ljuta.	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Total:	4	2	29	13	7	31	4	1	1	2	1	95

Locus: **BL144**

Pop Genotypes:

	122	122	122	126	130	Total
	122	126	130	130	130	
Zalomka	28	0	0	0	0	28
Cernica	15	2	7	1	3	28
Vrijeka	19	0	6	0	0	25
Mušnica	7	0	0	0	0	7
Ljuta	4	0	0	0	0	4
Total:	73	2	13	1	3	92

Locus: **Lsou05**

Pop Genotypes:

	177	185	185	187	189	185	187	189	191	187	191	193	193	195	185	189	191	201	195	203	185	Total		
	191	207	177	185	187	187	189	191	191	191	191	193	193	193	195	195	201	201	201	201	203	203	205	
Zalomka	0	10	0	1	0	8	0	0	4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	28
Cernica	0	0	0	0	0	0	0	0	28	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29
Vrijeka	1	0	4	11	1	0	1	0	2	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	24
Mušnica	0	0	0	2	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	9
Ljuta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	4
Total:	1	10	4	14	2	8	2	1	35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1	94

Locus: **BL161**

Pop	Genotypes:			Total
	195	197	197	
	197	197	199	
Zalomka	0	29	1	30
Cernica	1	29	0	30
Vrijeka	0	26	0	26
Mušnica	0	9	0	9
Ljutaa	0	4	0	4
Total:	1	97	1	99

Locus: **BL1153**

Pop	Genotypes:			Total
	220	220	222	
	220	222	222	
Zalomka	16	11	2	29
Cernica	21	6	1	28
Vrijeka	26	0	0	26
Mušnica	6	3	0	9
Ljuta.	4	0	0	4
Total:	73	20	3	96

Locus: **Lsou19**

Pop	Genotypes:					Total
	178	178	180	178	182	
	178	180	180	182	182	
Zalomka	15	11	4	0	0	30
Cernica	22	1	0	5	2	30
Vrijeka	26	0	0	0	0	26
Mušnica	8	1	0	0	0	9
Ljuta	4	0	0	0	0	4
Total:	75	13	4	5	2	99

Locus: **Lsou29**

Pop	Genotypes:											Total
	312	312	314	314	314	318	314	320	320	314	322	
Zalomka	0	0	27	1	1	0	0	0	0	1	0	30
Cernica	1	0	21	6	0	0	0	0	0	0	0	28
Vrijeka	0	0	16	0	0	0	5	3	0	1	1	26
Mušnica	0	1	4	3	0	1	0	0	0	0	0	9
Ljuta	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	4
Total:	1	1	68	10	1	1	5	4	3	2	1	97

Locus: **BL12B**

Pop	Genotypes:			Total
	149	149	151	
Zalomka	0	0	30	30
Cernica	1	1	29	31
Vrijeka	0	0	26	26
Mušnica	0	0	7	7
Ljuta	0	0	4	4
Total:	1	1	96	98

Locus: **Lsou34**

Pop	Genotypes:																							Total			
	230	230	232	230	230	232	234	236	230	232	236	240	240	240	230	240	246	248	232	236							
Zalomka	7	4	1	1	0	3	0	1	6	3	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	30	
Cernica	0	0	1	0	0	0	1	15	1	0	10	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	31
Vrijeka	1	0	1	1	1	1	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	1	1	0	1	1	1	24	
Mušnica	0	0	2	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8	
Ljuta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	
Total:	8	4	5	2	3	5	1	25	7	3	10	3	2	1	2	1	1	1	2	4	1	1	1	2	1	1	97

Locus: **Lsou08**

Pop Genotypes:

191 193 193 195 191 193 195 197 191 195 197 199 193 197 199 201 197 201 203 191 197  
 199 201 203 207 207  
 191 193 195 195 197 197 197 197 199 199 199 199 201 201 201 201 203 203 203 207 207  
 207 207 207 207 209 Total

Zalomka	0	0	0	0	2	1	3	2	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	3	1	1	1	2	3	2	28	
Cernica	2	1	2	0	0	0	5	3	1	1	0	5	1	9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31	
Vrijeka	0	0	0	0	0	0	3	10	0	0	2	6	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	25	
Mušnica	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	
Ljuta	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	
Total:	2	1	2	1	2	1	13	18	1	1	6	12	1	11	2	3	1	1	1	3	2	1	1	2	3	2	94

Locus: **LceC1**

Pop Genotypes:

87 87 89 87 93 89 93 95 89 93 95 93 99 93 97 99 101 93 95 97 101 103  
 87 89 89 93 93 95 95 95 97 97 97 99 99 101 101 101 101 103 103 103 103 103 Total

Zalomka	0	2	8	0	6	1	0	0	0	0	0	5	1	3	1	2	0	0	0	0	1	0	30
Cernica	1	3	2	0	4	0	2	1	0	2	1	0	0	0	0	0	3	3	1	2	5	30	
Vrijeka	0	1	18	0	1	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	
Mušnica	0	0	0	1	2	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	7	
Ljuta	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	4	
Total:	1	6	28	1	14	3	3	2	2	3	1	5	1	6	1	2	1	4	3	1	3	5	96

Locus: **RSer10**

Pop Genotypes:

183 185 187 185 187 189 189 191 183 185 189 191 193 189 193 191 191 189 197  
 185 185 187 189 189 189 191 191 193 193 193 193 197 197 199 201 205 205 Total

Zalomka	1	5	1	1	0	0	0	0	3	1	4	1	6	0	2	0	1	0	0	26
Cernica	0	2	0	0	0	6	10	7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	26
Vrijeka	2	19	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	24
Mušnica	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	7
Ljuta	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Total:	3	30	1	2	1	7	12	7	3	1	5	1	7	1	2	1	1	1	1	87

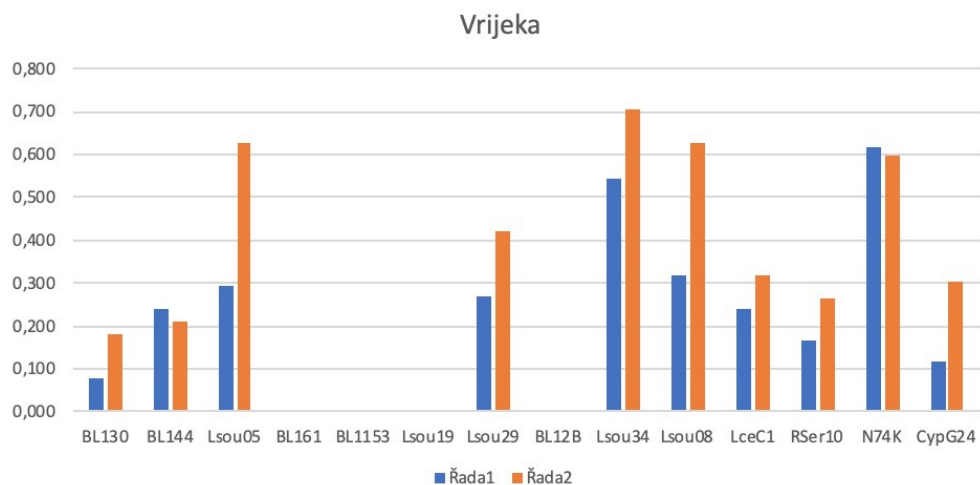
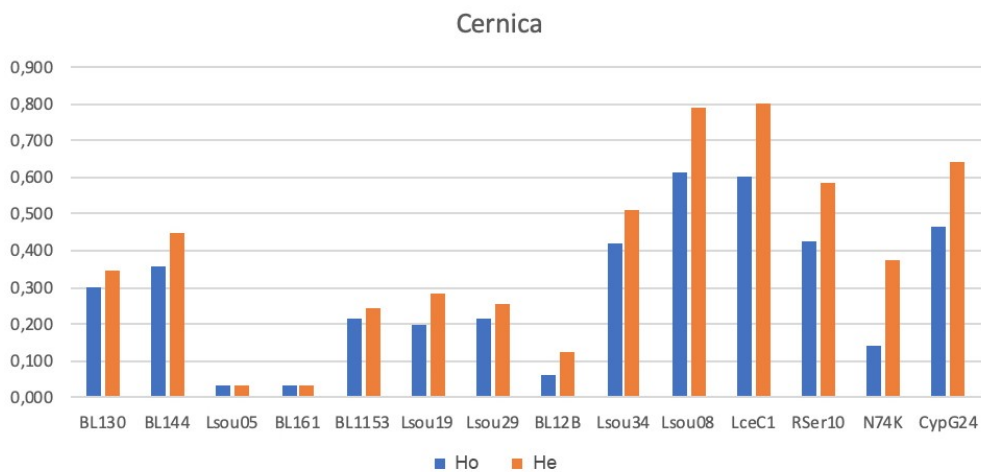
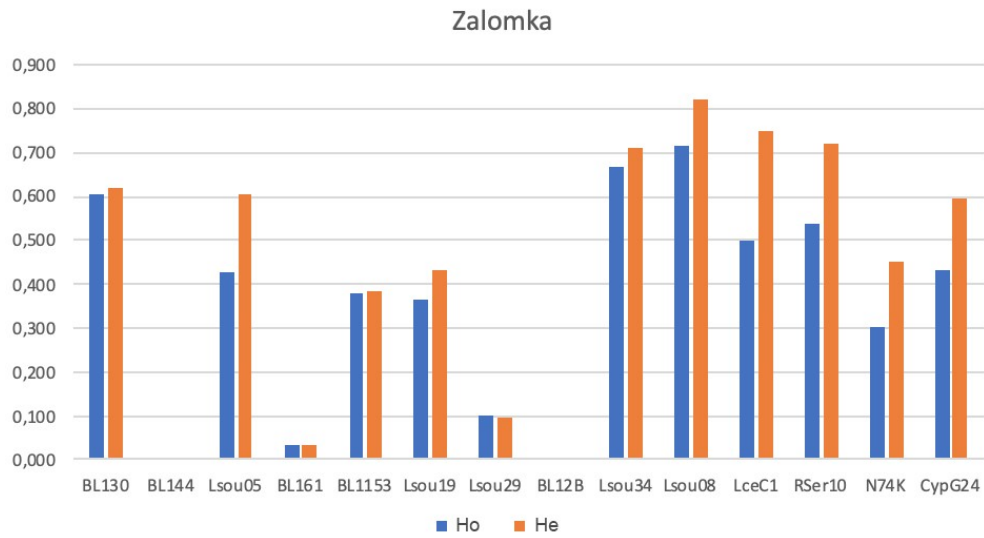
Locus: **N7K4**

Pop	Genotypes:													Total
	152	154	154	156	152	154	156	158	154	156	154	160	162	
Zalomka	3	0	5	17	0	1	0	2	0	0	0	0	2	30
Cernica	1	0	1	3	0	0	0	3	0	20	0	0	0	28
Vrijeka	0	1	2	9	6	1	1	2	0	0	1	2	1	26
Mušnica	0	0	0	3	1	0	0	0	0	1	0	0	2	7
Ljuta	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	4
Total:	4	1	8	32	7	2	1	7	3	22	1	2	5	95

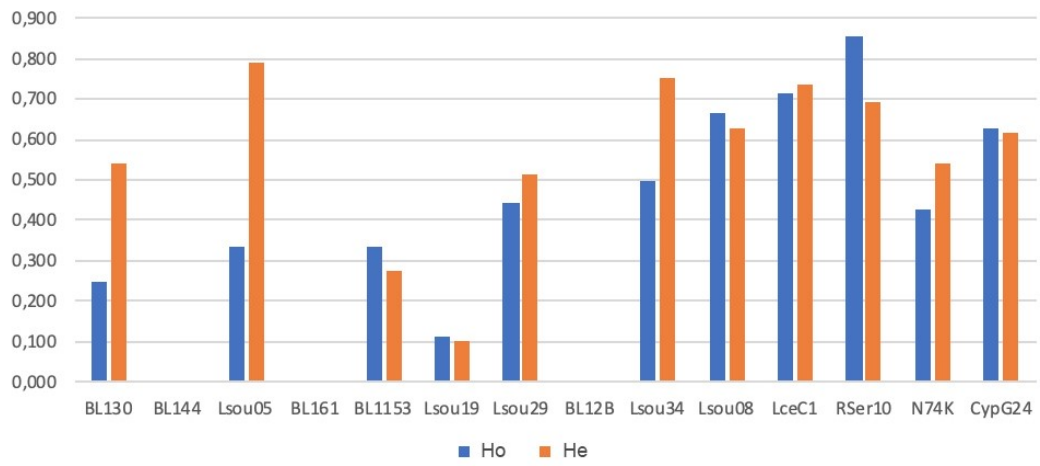
Locus: **CypG24**

Pop	Genotypes:									Total
	133	133	133	137	139	133	139	141	139	
Zalomka	0	1	4	0	9	0	7	8	1	30
Cernica	8	0	5	0	6	6	3	2	0	30
Vrijeka	2	0	0	3	20	0	0	1	0	26
Mušnica	1	0	2	0	2	1	2	0	0	8
Ljuta	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4
Total:	11	1	11	3	41	7	12	11	1	98

**Příloha č. 4** Grafy znázorňující pozorovanou a očekávanou heterozygotnost v lokusech jednotlivých populací spočítané v programu GenALEx a zpracované v programu Microsoft Excel.  $H_o$  = pozorovaná,  $H_e$  = očekávaná.



### Mušnica



### Ljuta

