

GENETICKÁ DIVERZITA A POZNÁMKY K VÝSKYTU OUKLEJKY PRUHOVANÉ *ALBURNOIDES BIPUNCTATUS* Genetic diversity of *Spiralin, Alburnoides bipunctatus*, with notes on its occurrence

Jan MENDEL¹, Stanislav LUSK¹, Karel HALAČKA¹, Věra LUSKOVÁ¹, Lukáš VETEŠNÍK¹,
Marko ČALET², Alexander RUCHIN³

¹ Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i., Ichtyologické oddělení, Květná 8, 603 65 Brno, Czech Republic

² Department of Zoology, University of Zagreb, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

³ Mordovian State University, Bolshevitskaya 68, 430000 Saransk, Russia

Úvod

Při výzkumu genetické diverzity chráněných druhů ryb byla věnována pozornost i ouklejce pruhované *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, 1872). V minulosti byla ouklejka pruhovaná rozšířena po celém území ČR v proudivých úsecích vodních toků, především charakteru parmového pásma. Výzkumy v posledních letech prokázaly, že tento druh v povodí Labe a Vltavy je možno hodnotit jako kriticky ohrožený. Výrazně hojnější je výskyt tohoto druhu v povodí Odry a Moravy (Hanel & Lusk 2005, Lusk et al. 2006). Ouklejka pruhovaná je významným bioindikátorem kvality vodního prostředí i čistoty vody a z hlediska ochrannářského je hodnocena jako „silně ohrožený druh“ (Vyhl. 395/1992 Sb.). V této studii jsou prezentovány poznatky o rozšíření tohoto druhu v ČR a předběžné výsledky genetických analýz v kontextu s dalšími lokalitami v Evropě. Pro identifikaci vnitropopulační a mezipopulační diverzity byly použity vhodné molekulární markery.

Materiál a metodika

Aktuální poznatky o výskytu ouklejky pruhované byly získány ichtyologickým výzkumem v průběhu posledních 10 let. Negativní faktory ovlivňující výskyt ouklejky pruhované dokumentují použité publikované studie z druhé poloviny 20. století.

Elektroforézou tkáňových extraktů (svaly, játra) na škrobovém gelu byla zkoumána genetická variabilita populací ouklejky pruhované z řek Bečva (29 ks), Vsetínská Bečva (23 ks) a Dyje (15 ks) spadajících do povodí Moravy (úmoří Černého moře). Tkáňové extrakty byly připraveny homogenizací alikvotu tkáně s pufrem (Valenta et al. 1971) v chladu, supernatanty po centrifugaci byly použity k elektroforéze. Detekce byla prováděna metodami podle: Valenta et al. (1971) – LDH, MDH, SOD, Buth & Murphy (1981) – GPI, PGM, Harris & Hopkinson (1976) a Pasteur et al. (1987) – ostatní enzymy. Názvosloví lokusů a alel bylo použito podle doporučení Shaklee et al. (1991). Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno programem „BIOSYS-1“ (Swofford & Selander 1981), který umožňuje výpočet základních genetických populačních parametrů (procento polymorfních lokusů, průměrný

Tab. 1. Studované taxony, lokalizace sběru vzorků, počet jedinců a přístupová čísla databáze GenBank (N, počet jedinců; H_1–17, označení haplotypů; CZ, Česká republika; FRA, Francie; GRE, Řecko; HR, Chorvatsko; Sk, Slovensko; RUS, Rusko).

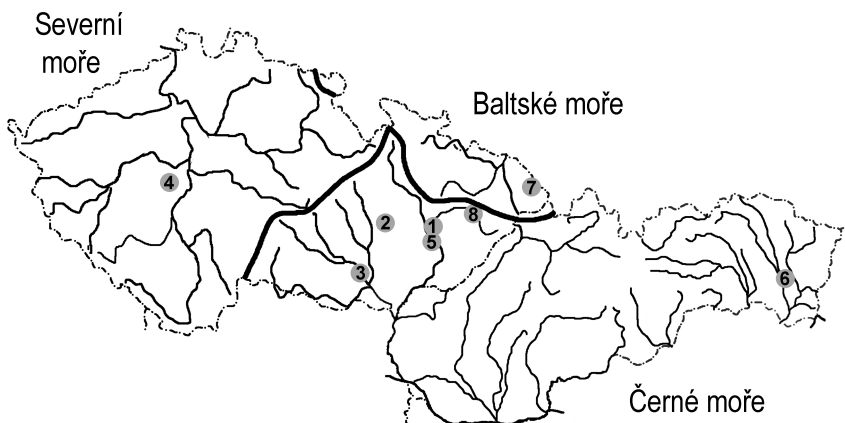
Linie/taxon	N	Řeka, povodí, stát, (č. haplotypu)	NCBI (příst. č.)
Linie_I	1	Bečva, Morava, CZ (H_5)	zasláno
<i>A. bipunctatus</i>	2	Jevíčka, Morava, CZ (H_6)	zasláno
	5	Jihlava, Morava, CZ (H_9)	zasláno
	2	Kocába, Vltava, CZ (H_2)	zasláno
	2	Morava, Morava, CZ (H_7)	zasláno
	1	Olšava, Hornád, SK (H_4)	zasláno
	2	Olše, Odry, CZ (H_3)	zasláno
	1	Vset. Bečva, Morava, CZ (H_8)	zasláno
	1	Saone, Loire, FRA (H_1)	Y10445
Linie_II	1	Korona, HR (H_11)	zasláno
<i>Alburnoides sp.</i>	1	Kupa, Sáva, HR (H_12)	zasláno
	1	Satla, HR (H_13)	zasláno
	1	Sáva, Sáva, HR (H_10)	zasláno
Linie_III	1	Aoos, GRE (H_17)	AF090740
<i>A. bipun.ohridanus</i>	1	Prespa jezero, GRE (H_16)	AF090741
Linie_IV	1	Strymon, GRE (H_14)	AF090742
<i>A. bipun.strymonicus</i>			
Linie_V	1	Las'va, Kama-Volga, RUS (H_15)	zasláno
<i>Alburnoides sp.</i>			

počet alel na lokus, průměrnou heterozygotnost populace aktuální i teoreticky očekávanou, mezipopulační genetické vzdálenosti a podobnosti).

Pro molekulárně genetické analýzy byly použity vzorky ploutví získaných v letech 2004–2008 z 21 jedinců ouklejky pruhované z třinácti lokalit čtyř úmoří – Baltského moře, Černého moře, Kaspického moře a Severního moře (Tab. 1): Bečva (povodí Moravy, CZ), Jevíčka (povodí Moravy, CZ), Jihlava (povodí Moravy, CZ), Kocába (povodí Vltavy, CZ), Morava (povodí Moravy, CZ), Olšava (povodí Hornádu, SK), Olše (povodí Odry, CZ), Vsetínská Bečva (povodí Moravy, CZ), Korona (HR), Kupa (povodí Sávy, HR), Satla (HR), Sáva (povodí Sávy, HR) a Las'va (povodí Kama-Volhy, RUS).

DNA extrakce, PCR amplifikace a sekvenování

Celková genomová DNA byla izolována z části prsní ploutve metodou fenol-chloroform-isoamylalkohol (Sambrook et al. 1989). Pro amplifikaci kompletního genu cytochromu *b* (cyt *b*) byly použity primery GluDG.L a H16460 (Palumbi 1996, Perdices & Doadrio 2001). PCR reakce byla provedena v TGRADIENT Thermocycleru (Whatman Biometra) dle podmínek: 2 min 94 °C, následováno 5 cykly: 45 s 94 °C, 45 s 53 °C, a 1,5 min 72 °C, poté následovalo 29 cyklů: 45 s 94 °C, 45 s 58 °C, a 1,5 min 72 °C a na závěr jeden extenční krok 7 min 72 °C. PCR produkty byly přečištěny precipitací PEG/Mg/NaAc (26% Polyethylene glycol, 6,5 mM MgCl₂ · 6H₂O, 0,6 M NaAc.3H₂O). Čisté PCR produkty byly sekvenovány genetickým analyzátozem ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Všechny PCR amplikony byly opakovaně oboustranně sekvenovány. DNA sekvence byly upraveny pomocí Seqman modulu (Lasergene v. 6.0, DNASTAR Inc.). Zkoumaná sekvence byla ověřena porovnáním s databází GenBank.



Obr. 1. Lokality populací ouklejky pruhované na území České republiky a Slovenska (1 – Bečva, 2 – Jevíčka, 3 – Jihlava, 4 – Kocába, 5 – Morava, 6 – Olšava (SK, povodí Hornádu), 7 – Olše, 8 – Vsetínská Bečva).

Fylogenetická analýza

Pro porovnání byly do analýzy zařazeny i sekvence *Alburnoides* z databáze GenBank: Y10445, AF090740, AF090741, AF090742. Jako outgroup byla zvolena sekvence *Alburnus alburnus* (DQ350253).

Program ModelTest 3.8 byl použit pro zjištění nejvhodnějšího modelu nukleotidové substituce (Posada 2006). Fylogenetické vztahy byly zkoumány algoritmem neighbour-joining (NJ), kritéria optimality: maximum parsimony (MP) a maximum-likelihood (ML), a také pomocí Bayesovy analýzy (BI). Pro fylogenetickou analýzu byly sekvence cyt *b* importovány do programu PAUP* 4.0B.10 (Swofford 2002). V rámci NJ analýzy byla počítána DNA distance. Neparametrická bootstrap analýza s 1000 pseudoreplikacemi byla prováděna pro získání odhadu nodální podpory v NJ stromu. Pro konstrukci MP fylogramu byla použita analýza nevážené parsimonie s „branch-and-bound” vyhledáváním. Stupeň spolehlivosti výsledných vztahů byl odhadován bootstrap analýzou s 1000 replikacemi. ML analýza byla prováděna pod modelem GTR+ Γ s „branch-and-bound” algoritmem a 100 bootstrap replikacemi. Bayesovská analýza byla prováděna v programu MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelssenbeck 2005). Start byl zahájen z náhodného stromu a čtyři Markovovy řetězce byly počítány (1×10^6 generací se samplovací frekvencí 100). Nejvhodnější model byl specifikován.

Pro odhadnutí genealogických intraspecifických vztahů byla konstruována haplotypová síť s využitím statistické parsimonie (Templeton et al. 1992) implementované do programu TCS 1.21 (Clement et al. 2000). Byl použit 95% spojovací limit, k rozpojení dochází v případě deseti a více mutačních kroků.

Příprava mikrosatelitových lokusů

Pro přípravu mikrosatelitových markerů bylo využito primerů designovaných z genomových knihoven *Cyprinus carpio*, *Luxilus cornutus* a *Labeo rohita*. Tyto byly otestovány na 61 jedincích ze 7 populací *A. bipunctatus* z úmoří Černého moře (Bečva, Vsetínská Bečva, Blata, Jevíčka, Jihlava, Morava a Olšava). Bylo testováno 23 párů primerů: sedm od *C. carpio* (Crooijmans et al. 1997), pět od *L. cornutus* (Turner et al. 2004), deset od *L. rohita* (Gheys, pers. comm.) a jeden od *B. barbus* (Chenuil et al. 1999). Pro identifikaci mikro-

Tab 2. Cross-species amplifikace pomocí primerů z *C. carpio* (MFW), *L. cornutus* (Lco) a *L. rohita* (Rohu). Primerové sekvence, opakující se motiv, N: počet jedinců; Ta: annealingová teplota, koncentrace Mg²⁺ iontů.

Lokus	Primerová sekvence (5'-3')	Motiv opakování	N	T _a (°C)	Mg ²⁺ (mM)
MFW1	F: GTCCAGACTGTCATCAGGAG R: GAGGTGTACACTGAGTCACGC	(CA) _n *	61	52	1,5
MFW5	F: GAGATGCCTGGGGAAGTCAC R: AAAGAGAGCGGGGTAAAGGAG	(CA) _n *	61	57	1,5
MFW17	F: CTCAACTACAGAGAAATTTTCATC R: GAAATGGTACATGACCTCAAG	(CA) _n *	61	50	1,5
MFW19	F: GAATCCTATCATGCAAAC R: GCACAAACTCCACATTGTGCC	(CA) _n *	61	55	1,5
Lco3	F: GCA GGA GCG AAA CCA TAA AT R: AAA CAG GCA GGA CAC AAA GG	(TG) ₉	14	57	1,5
Lco5	F: TTA CAC AGC CAA GAC TAT GT R: CAA GTG ATT TTG CTT ACT GC	(CAGA) ₂ (CA) ₁₄	61	57	1,5
Lco6	F: CCA CAC AGA GCA TTT GTA TT R: GTG GCT GAT TTC ATT ATT CA	(CA) ₁₂	57	47	2,5
Rohu4	F: AGGCCAAACGCTCACTCAG R: GACACCCGCAGAACCTCACT	(GT) ₁₉	14	50	1,5
Rohu5	F: TGACGCCGACGTGAATGTCAC R: CTGCTGATGACCGTCAACATGAC	(GTTT) ₃ ATTTAT (GT) ₁₅ AT(GT) _n	13	50	1,5
Rohu12	F: CAGCGCTGGAACGACACCA R: TGCTGCGGGTCATTAGTATTCATC	(GT) ₁₅	61	50	1,5
Rohu17	F: GGGGCCATTGAGACCAGCTTATCTAT R: GACCCATTGCTGAAATCAACCTGAGT	(GT) ₁₅	14	50	1,5
Rohu34	F: GCGTTGGTCTGGGGTGAA R: AGATAGACGGACGGGTTTACGA	(GT) ₁₈	32	50	1,5

* Podrobnější informace nebyly uvedeny ve studii Crooijmans et al. (1997).

satelitových lokusů bylo využito „tailed primer“ metody. Tato metoda využívá dvoudílný primer, standardní primerové sekvence a ocásku („tail“), který je přidáván na 5'- konec primerové sekvence (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'). „Tail“ sekvence koresponduje se standardním primerem jako M13 univerzální primer. Pro vizualizaci alelického polymorfismu je M13 univerzální primer označen Beckman-Coulter barvou (5'Dye-CACGACGTTGTAAAACGAC-3').

PCR amplifikace byla prováděna v celkovém objemu 15 µl obsahující 70–100 ng genomové DNA, 10x PCR reakční pufr (Buffer IV: 750mM Tris-HCl pH 8,8, 200mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20), 1,5mM MgCl₂, 150 µM každého dNTP, 5 pmol reverzního a M13-označeného primeru a 0,75 U *Taq* DNA polymerázy (ABgene). Amplifikace byla prováděna v TGRADIENT Thermocycleru (Whatman Biometra) s následujícími podmínkami: 3 min 95 °C a poté 35–38 cyklů 1 min 95 °C, 50 s Ta (Tab. 2), 1 min 72 °C, závěrečná elongace 10 min 72 °C. Pro předběžné zjištění vhodnosti vytipovaných primerů bylo využito identifikace fragmentů na 1,7% agarozovém gelu v elektroforetickém pufru SB (Sodium boric acid medium, 10mM NaOH a pH upraveno na 8,5 pomocí H₃BO₃). Amplifikované produkty byly analyzovány genetickým analyzačním systémem Beckman Coulter CEQTM 8800.

Výsledky a diskuse

Rozšíření v České republice

Výskytu ouklejky pruhované nebyla dosud věnována větší pozornost, neboť tento druh nebyl z rybářského hlediska zajímavý. V minulosti byla ouklejka pruhovaná považována za běžnou rybu menších vodních toků, charakteru parmového pásma. Dyk (1956) píše o výskytu ouklejky pruhované v ČR: „Počínaje lipanovým nebo dolní hranicí pstruhového pásma, nebude patrně chybět v žádné z našich řek“. Peňáz (1976), který se zabýval umělým výtěrem a raným vývojem tohoto druhu, rovněž považuje ouklejku pruhovanou za „hojného obyvatele proudivých úseků horských a podhorských oblastí Československa a typickým druhem pro řeky Českomoravské vysočiny“.

Až v souvislosti se zhoršováním kvality vod a technickými úpravami se projevil bioindikační význam tohoto druhu, který citlivě reaguje na kvalitu vody i změny teplotních poměrů. Vedle znečištění, především výstavba přehrad vedla k vymizení ouklejky pruhované z dlouhých říčních úseků, které byly zatopeny přehradními jezery i z částí toků pod i nad údolními nádržemi. Z oblasti údolní nádrže Lipno před výstavbou přehrady, tento druh uváděli Vostradovský & Novák (1959). Ouklejka se tam vyskytovala např. v přítocích ÚN Lipno Pestrice a Výtoňský (Vostradovský 1968). Obdobně se ouklejka pruhovaná vyskytovala v Malši v části později zatopené údolní nádrží Římov (Vostradovský 1978). Ve všech zmíněných případech populace ouklejky zanikly. V řece Svratce od Tišnova (ř.km 70) až po Herálec (ř.km 150) byla v období před vybudováním údolní nádrže Vír (1953) ouklejka pruhovaná jedním z nejhojnějších druhů (Libosvářský et al. 1954). Po vybudování přehrady tam tento druh téměř vymizel, když jsme jej zjistili při výzkumech v letech 1969–1975 pouze ojediněle na jediné lokalitě (ř.km 123), Lusk (1978, nepublikované výsledky). Obdobně ouklejka pruhovaná vymizela z dalších toků, kde byla před vybudováním přehrad hojným druhem; Jihlava – ÚN Mohelno a ÚN Dalešice (Lusk 1977), Oslava – ÚN Mostiště (Hochman & Jirásek 1969, Lusk 1978), Dyje ÚN Vranov a ÚN Znojmo (Hochman & Jirásek 1958, Lusk et al. 1999).

Současné poznatky nasvědčují, že výskyt tohoto druhu v jednotlivých úmořích v rámci České republiky je značně rozdílný. V povodí Labe a Vltavy je známý aktuální výskyt ouklejky pruhované v potoce Kocába, odkud jsou i vzorky pro genetické analýzy. Výskyt tohoto druhu tam vzpomíná již Oliva (1949). Z dalších záznamů lze odvodit, že se může vyskytovat v některých přítocích horní části Vltavy včetně přítoků údolní nádrže Lipno (Vostradovský 1965). Tam prozatím jediný pozitivní nález v roce 2008 učinil Dvořák (osobní sdělení) v potoce Pestrice, pravostranný přítok ÚN Lipno. V oblasti horního povodí Sázavy psal o výskytu ouklejky pruhované Bártík (1953). Podle něj se tento druh vyskytoval v toku Sázavy od Přibyslavi po Světlou nad Sázavou. Z přítoků se ouklejka pruhovaná vyskytovala v potocích Macourovský, Úsobský, Perlový a Lučický. V oblasti horní Sázavy je potvrzen výskyt ouklejky pruhované nad Přibyslaví v úseku mezi ř.km 187 až 200. Nepotvrzená je informace o výskytu tohoto druhu v říčce Modla (přítok Labe), Dr. J. Křížek (osobní sdělení). Další aktuální výskyt ouklejky pruhované z vodních toků v povodí Labe a Vltavy nebyl zjištěn a prezentován.

V povodí Moravy přes vymizení tohoto druhu z dlouhých úseků některých toků v důsledku výstavby přehrad (viz výše) je výskyt ouklejky pruhované výrazně četnější. Vyskytuje se především v řadě menších toků v částech, které mají charakter parmového a lipanového pásma, jako např. Rokytná, dolní část Jihlavy, Svratka pod Tišnovem, Loučka,

Bečva a další (přehled včetně odkazů viz Hanel & Lusk 2005). Ojedinele se s tímto druhem můžeme setkat i v dolním toku Moravy a v dolním toku Dyje nad jejich soutokem. Rovněž v povodí Odry je ouklejka pruhovaná místy hojným druhem (Lojkásek & Lusk 2004).

Ouklejka pruhovaná je zařazena v rámci zvláště chráněných druhů do kategorie „silně ohrožený druh“ (Vyhl. 395/1992 Sb.). V červených seznamech je pro území ČR zařazena do skupiny obecně ohrožených druhů – kategorie „ohrožený“ (Lusk et al. 2004, 2006). Rozdílné je dílčí hodnocení ouklejky pruhované v rámci hydrologických systémů podle úmoří: Severní moře (povodí Labe a Vltavy) – kriticky ohrožený, Baltické moře (povodí Odry) – ohrožený, Černé moře (povodí Moravy a Dyje) – zranitelný (Lusk et al. 2006).

Analýza alozymů

Elektroforetickou analýzu jsme provedli u 14 proteinových systémů ve 28 lokusech. Variabilita byla nalezena celkem v 10 lokusech; tři lokusy nebylo možné vyhodnotit pro nedostatečně jasné elektroforetické rozdělení. Ostatní lokusy (celkem 15) byly monomorfní. Přehled výskytu polymorfních lokusů ve zkoumaných populacích s uvedením frekvencí jednotlivých alel v těchto lokusech udává Tab. 3

Všechny tři zkoumané populace měly téměř shodné charakteristiky: stejný průměrný počet alel 1,2 na lokus, procento polymorfních lokusů činilo 16, u populace z Bečvy 20. Průměrná heterozygotnost byla u Bečvy 0,050, u Vsetínské Bečvy 0,039 a u Dyje 0,044. Genetická podobnost Nei (1972) byla velmi vysoká: Bečva/Vs. Bečva 99,5%, Bečva/Dyje 99,3%, Vs.Bečva/Dyje 99,7%. Značná genetická podobnost populací z ČR je velmi zajímavé a překvapující zjištění, protože uvedený druh tvoří relativně izolované lokální populace, neuskutečňuje migrace na větší vzdálenosti (na rozdíl od ostroušky stěhovavé, podoustve říční, případně i parmy obecné). Bylo by tedy možné předpokládat, že tato izolace může vést vlivem genetického driftu k postupnému genetickému rozrůznění jednotlivých populací alespoň podle hlavních povodí. Bečva a Dyje, ačkoliv obě patří do povodí Moravy jsou z hlediska možného kontaktu dlouhodobě separovány a přesto zjištěné mezipopulační rozdíly jsou minimální.

Základní charakteristiky mikrosatelitových lokusů

Polymorfismus amplifikovaných mikrosatelitových lokusů byl testován na 7 populacích obývajících území České republiky. Ze setu 23 párů primerů, 12 úspěšně amplifikovalo PCR produkt a u 11 se objevil buď směr, nebo se nevytvořil žádný PCR produkt. Další analýzy ukázaly, že z 12 amplifikovaných mikrosatelitových lokusů bylo 10 polymorfních s průměrným počtem alel 6,3/lokus (rozmezí 2–12 alel/lokus) a dva byly monomorfní. Nejvíce polymorfní lokusy byly MFW19, MFW1, MFW5, MFW17 a Rohu12, každý vykazoval 12, resp. 10, 9, 8 a 8 alel (Tab. 5). Charakteristika primerů, opakující se motiv, Ta (annealing temperature), počet analyzovaných jedinců, atd. uvádí Tab. 2. Všechny polymorfní lokusy prokázaly dialelickou heterozygotitu. Rozmezí velikostí některých mikrosatelitových fragmentů se ukázalo být vhodné pro sestavení PCR multiplexu vedoucího k dalšímu urychlení a zlevnění populačních analýz. Výsledky naší studie potvrzují závěry uváděné v Tong et al. (2005) o vhodnosti mikrosatelitového markeru MFW1 pro populační studii cyprinidů. Marker MFW1 ukázal vysokou konzervovanost okrajových oblastí a zároveň dostatečnou délkovou variabilitu v opakující se oblasti.

Genotypová data byla použita k výpočtu Hardy-Weinbergové očekávané (H_E) a pozorované (H_O) heterozygotity v každém polymorfním lokusu pomocí populačního genetic-

Tab. 3. Frekvence alel v polymorfních lokusech ve zkoumaných populacích *Alburnoides bipunctatus* (N-počet hodnocených jedinců).

Lokus	Alela	Dyje	Vset. Bečva	Bečva
<i>ADH*</i>	(N)	1	1	29
	A	1	1	0,741
	B	0	0	0,259
	C	0	0	0
<i>GPI-1*</i>	(N)	10	23	29
	A	1	0,978	1
	B	0	0	0
	C	0	0	0
	D	0	0	0
	E	0	0,022	0
<i>G3PDH-1*</i>	(N)	10	20	29
	A	1	0,875	1
	B	0	0,125	0
<i>sMDH-1*</i>	(N)	10	20	29
	A	0,900	0,825	0,690
	B	0,100	0,175	0,310
	C	0	0	0
<i>sMDH-2*</i>	(N)	10	23	28
	A	0,400	0,174	0,161
	B	0,600	0,826	0,839
	C	0	0	0
<i>6PGH*</i>	(N)	10	20	23
	A	0,900	0,913	
	B	0	0	0
	C	0,100	0	0,087
<i>PGM-1*</i>	(N)	10	18	29
	A	0	0	0
	B	0	0	0
	C	0,950	0,917	0,948
	D	0,050	0,083	0,052

Monomorfní lokusy:

*sAAT**, *mAAT-1**, *mAAT-2**, *GPI-2**, *AK**, *mIDHP**, *LDH-C**, *mMDH**

kého softwaru GenAlEx 6 (Peakall & Smouse 2005). Očekávaná heterozygotita (H_E) pro 10 polymorfních lokusů varírovala v rozmezí 0,23–0,80. Pozorovaná heterozygotita (H_O) kolísala od 0,21 do 0,73 (Tab. 5). Většina polymorfních mikrosatelitových lokusů uváděných v této studii se ukázaly být dostatečně variabilní a vhodné pro aplikace v populační a ochranářské biologii.

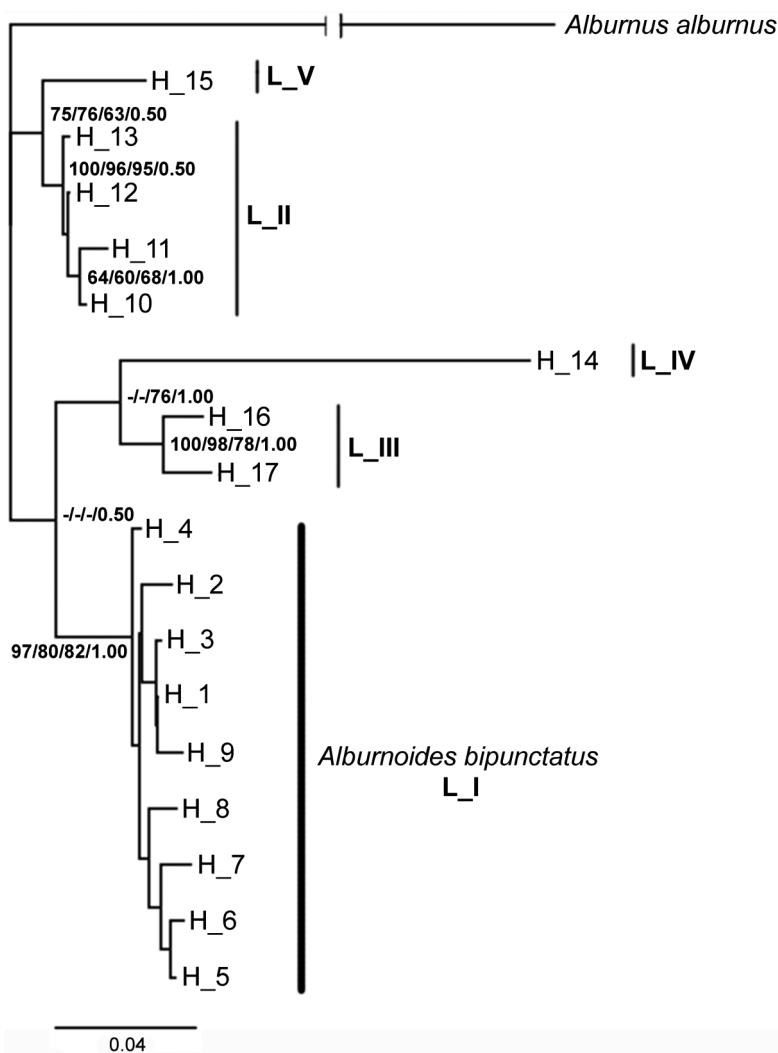
Fylogeografie rodu *Alburnoides* na základě sekvence cyt *b*

Pro prvotní náhled na druhovou diverzitu rodu *Alburnoides* na území ČR a SR jsme vybrali osm lokalit ze tří úmoří (Obr. 1). Analýzy mitochondriálního genu cyt *b* (791 bp) odhalily u zkoumaných jedinců devět haplotypů (H_{1-9}) lišící se v 1–5 nukleotidových pozicích (tj. až 0,63% z celkové analyzované sekvence; Obr. 2). Tyto mitochondriální haplotypy tvoří

Tab. 4. Porovnání jednotlivých mitochondriálních haplotypů a jejich sekvenčních divergencí (DNA distance v procentech). Haplotypy vyskytující se na území ČR a SR jsou zvýrazněny.

	H_1	H_2	H_3	H_4	H_5	H_6	H_7	H_8	H_9	H_10	H_11	H_12	H_13	H_14	H_15	H_16
H_1 Saone	-															
H_2 Kocába	0.173	-														
H_3 Olše	0.173	0.347	-													
H_4 Olšava	0.175	0.348	0.175	-												
H_5 Bečva	0.175	0.349	0.175	0.354	-											
H_6 Jevíčka	0.349	0.530	0.349	0.528	0.173	-										
H_7 Morava	0.897	1.087	0.897	1.091	0.710	0.898	-									
H_8 Vset. Bečva	0.527	0.709	0.704	0.719	0.348	0.528	1.089	-								
H_9 Jihlava	0.349	0.530	0.524	0.527	0.536	0.719	1.286	0.901	-							
H_10 Sáva	4.930	5.148	5.167	4.573	5.390	5.463	5.576	5.642	4.884	-						
H_11 Korona	5.148	5.375	5.387	4.791	5.609	5.692	5.817	5.868	5.109	0.173	-					
H_12 Kupa	4.705	4.920	4.931	4.349	5.015	5.233	5.347	5.643	4.656	0.173	0.347	-				
H_13 Satla	4.327	4.542	4.323	3.994	4.622	4.840	4.972	5.224	4.289	0.350	0.524	0.175	-			
H_14 Strymon	12.829	13.254	13.147	12.341	13.335	13.767	13.176	13.518	13.509	19.278	18.850	18.899	17.916	-		
H_15 Las`va	5.751	6.009	5.995	6.167	6.069	6.330	7.322	6.725	5.739	4.297	4.540	4.076	3.778	21.1388	-	
H_16 Prespa	6.930	7.182	7.180	6.500	7.315	7.568	6.657	8.077	6.873	7.587	7.851	7.331	6.846	14.767	7.955	-
H_17 Aaos	7.246	7.494	7.505	6.802	7.652	7.900	6.991	8.426	7.168	6.093	6.352	5.847	5.469	15.564	7.328	1.692

takto: L_I vs. L_II (3,99% – 5,87%), L_I vs. L_III (6,50% – 8,43%), L_I vs. L_IV (12,34% – 13,77%) a L_I vs. L_V (5,74% – 7,32%). Všem pěti liniím bychom mohli přisoudit druhovou úroveň, a tedy výsledky potvrzují naznačenou hypotézu (Kottelat & Freyhof 2007), že počet druhů v tomto rodu je velmi podhodnocen. Autoři naznačují, že molekulární studie *Alburnoides* z Černé Hory, Řecka, Bulharska, Krymu a Kavkazu pravděpodobně reprezentují odlišné druhy. Toto tvrzení navíc rozšiřujeme o výskyt odlišných linií s druhovou úrovní na území Chorvatska a v povodí řeky Volhy. Bayesovský konsenzuální strom konstruovaný pomocí čtyř statistických metod (NJ/MP/ML/BI) zobrazuje pět monofyletických skupin většinou se silnými bootstrap podporami a posteriorními probabilitami (Obr. 3).



Obr. 3. Bayesovský konsenzuální strom sestavený na základě sekvencí cyt *b*. Čísla v uzlech stromu reprezentují NJ/MP/ML bootstrap podpory a bayesovské posteriorní probability při 1000 opakování; pouze hodnoty nad 50% jsou zobrazeny. Linií příslušnost i haplotypy *A. bipunctatus* jsou zvýrazněny.

Summary

In the waters of the Czech Republic, the Spirlin (*Alburnoides bipunctatus*) is among the heavily endangered species under legal protection (Intimation no. 395/1992). In the 2005 version of the Red List, the species is listed in the “endangered” category. The status of this species differs in the different sea-drainage areas. In the drainage area of the river Labe (North Sea), covering 62.5% of the territory of this country, the status of spirlin is critical. At present, its occurrence has been confirmed in only four localities! A considerably better situation is found in the drainage area of the river Morava where the species occurs in most streams of the barbel and grayling zones. Similarly, it is locally abundant in the drainage area of the river Odra. The most important factors limiting the occurrence of spirlin in the Czech Republic include dams and dam reservoirs, followed by local water pollution in smaller streams. In incidental attempts at restoring the occurrence of spirlin in a stream it is essential to consider the genetic characteristics of the stock population to be used within a particular hydrological region (Lusk et al. 2002).

Protein electrophoresis has indicated that the three spirlin populations under study in the Morava drainage area show almost identical genetic characteristics ($n_a = 1.2$; $P = 16\text{--}20\%$; $H_o = 0.039\text{--}0.050$). They also show considerable genetic similarity (Nei 1972), varying between 99.3 and 99.7 %.

Analyses of 16 specimens taken from eight localities in the sea-drainage areas of the Baltic, Black, and North Sea have yielded the following preliminary results. Sequential analysis of the mitochondrial gene cytochrome *b* indicates the presence of a single line (L I) in the Czech Republic and Slovakia. We have identified nine haplotypes (H 1 – 9) differing in 1–5 nucleotide positions. Intraspecific divergence varied between 0.17 and 1.29 %. The territories of Croatia and Russia have been found to comprise considerably different lines, L II and L V respectively, which could be considered to be different on the species level. We have tentatively denoted these lines as *Alburnoides* sp. This observation is at variance with the hitherto statement of a single range of *A. bipunctatus*, reaching from France to Afghanistan. A phylogram constructed using four different statistical methods (NJ/MP/ML/BI) divided the specimens under study into five monophyletic groups, most of which showed heavy bootstrap supports and posterior probabilities: L I (*A. bipunctatus*, France, Czech Rep., Slovakia), L II (*Alburnoides* sp., Croatia), L III (*A. bipunctatus ohridanus*, adopted from GenBank database, Greece), L IV (*A. bipunctatus strymonicus*, the subspecific name from GenBank database, Greece), and L V (*Alburnoides* sp., Russia).

Poděkování

Studie byla zpracována v rámci řešení projektu r.č. VaV-SM/6/3/05 finančně podporovaného Ministerstvem životního prostředí ČR.

LITERATURA

- Bártík M. 1953: Rybí biocenosis Sázavy a jejích přítoků v okolí Havlíčkova Brodu. *Časopis nár. musea, odd. přír.* 122: 52–56.
- Buth D. G., Murphy R. W. 1980: Use of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase in enzyme staining procedures. *Stain Technol.* 55: 173–176.

- Clement M., Posada D., Crandall K. 2000: TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9(10): 1657–1660.
- Crooijmans R., Bierbooms V. A. F., Komen J., VanderPoel J. J., Groenen M. A. M. 1997: Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animal Genetics* 28: 129–134.
- Dyk V. 1956: Naše ryby. *SZN Praha*, 339 pp.
- Hanel L., Lusk S. 2005: Ryby a mihule České republiky. Rozšíření a ochrana. *ZO ČSOP Vlašim*, 448 pp. ISBN 80-86327-49-3.
- Harris H., Hopkinson D. A., 1976: Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. *North-Holland Publ. Co., Amsterdam*.
- Hochman L., Jirásek J. 1958: Příspěvek k současnému stavu zarybnění řeky Dyje. *Sb. VŠZL v Brně ř. A* (2): 245–265.
- Hochman L., Jirásek J. 1969: Zarybnění horní části řeky Oslavy a růst hlavních druhů ryb před ovlivněním řeky údolní nádrží u Mostiště. *Sb. VŠZ v Brně, ř. A* 18 (2): 413–423.
- Chenuil A., Galtier N., Berrebi N. 1999: A test of the hypothesis of an autopolyploid vs allopolyploid origin of a tetraploid lineage. Applications to the genus *Barbus* (Cyprinidae). *Heredity* 82: 373–380.
- Kottelat M., Freyhof J. 2007: Handbook of European freshwater fishes. *Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, German*, 646 pp.
- Libosvářský J., Bilík L., Jirásek J., Zikmund A. 1954: Zpráva o ichtyologickém průzkumu řeky Svratky. *Československé rybářství* 1954 (8, 9): 122–123, 132–133.
- Lojkásek B., Lusk S. 2004: Ichthyofauna dorzecza górnego biegu Odry na terenie republiki Czeskiej. *Arch. Pol. Fish.* 12 (2): 73–89.
- Lusk S. 1977: The ichthyofauna of the middle course of the Jihlava River in relation to the water reservoir at Dalešice. *Folia Zool.* 26: 255–269.
- Lusk S. 1978: Fish stock and angling in the middle course of the Svratka River. *Folia Zool.* 27: 71–84.
- Lusk S., Hanel L., Lusková V. 2004: Red list of the ichthyofauna of the Czech Republic. Development and present status. *Folia Zool.* 53: 215–226.
- Lusk S., Hanel L., Lusková V., Lojkásek B., Hartvich P. 2006: Červený seznam mihulí a ryb České republiky – verze 2005. *Biodiverzita ichthyofauny ČR (VI)*: 7–16.
- Lusk S., Lusková V., Dušek M. 2002: Biodiverzita ichthyofauny České republiky a problematika její ochrany. *Biodiverzita ichthyofauny ČR (IV)*: 5–22.
- Lusk S., Lusková V., Halačka K. 1999: Development and status of the ichthyofauna in the waters of the Podyjí national park. *Thayensia (Znojmo)* 1999 (2): 108–119.
- Oliva O. 1949: K rozšíření ouklejky pruhované, *Alburnoides bipunctatus* (Bloch 1782), v našich vodách. *Akvaristické listy* 21 (4): 41–43.
- Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J., Britton-Davidian J. 1987: Manuel Technique de Genetique par electrophorese des Proteines. *Technique et Documentation (Lavoisier), Paris*, 217 pp.
- Palumbi S. R. 1996: Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis D. M., Moritz C., Mable B. K. (eds): Molecular systematics. 2nd ed. *Sinauer Associates, Sunderland, MA*: 205–247.
- Peakall R., Smouse P. E. 2005: GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6 (1): 288–295.
- Peňáz M. 1976: Raný vývoj ouklejky pruhované, *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, 1782). *Sb. přírodověd. kl. západomor. muz. v Třebíči* 10: 25–34.
- Perdices A., Doadrio I. 2001: The molecular systematics and biogeography of the European cobitids based on mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 19: 468–478.
- Posada D. 2006: ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Research* 34, Web Server issue. Available from: <http://darwin.uvigo.es/software/modeltest_server.html>.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2005: Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. In: Nielsen R. (eds), Statistical Methods in Molecular Evolution. *Springer, New York*.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989: Molecular Cloning. A laboratory Manual. Second Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Shaklee J. B., Allendorf F. W., Morizot D. C., Whitt G. S. 1990: Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 119: 2–15.
- Swofford D.L. 2002: PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). *Sinauer Associates, Sunderland, MA*.

- Swofford D. L., Selander R. B. 1981: BIOSYS-1: A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.* 72 (4): 281–283.
- 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: 619–633.
- Turner T. F., Dowling T. E., Broughton R. E., Gold J. R. 2004: Variable microsatellite markers amplify across divergent lineages cyprinid fishes (subfamily Leuciscinae). *Conservation Genetics* 5: 279–281.
- Valenta M., Hyldgaard-Jensen J., Jensen E. S. 1971: Interaction of veronal, pyrophosphate, citrate and protein with lactate dehydrogenase isozyme determination and kinetics. *Acta Vet. Scand.* 12: 15–35.
- Vostradovský J. 1965: Ryby povodí Vltavy: I. Výsledky orientačního průzkumu Hornomlýnského potoka. *Sb. Jihočeského muzea v Českých Budějovicích, př. vědy V*: 61–66.
- Vostradovský J. 1968: Příspěvek k poznání formování ichtyofauny údolní nádrže Lipno. *Zpravodaj CHKO Šumava* 7: 4–29.
- Vostradovský J. 1978: Prognóza vývoje rybářských poměrů ve vodárenské nádrži Římov. *Vertebratologické zprávy, ÚVO ČSAV Brno*, 1978: 61–65.
- Vostradovský J., Novák M. 1959: Několik poznatků z lipenské údolní nádrže v roce 1958. *Sb. ČSAZV, Živočišná výroba* 4 (12): 877–888.