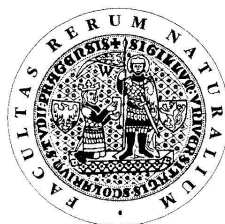


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Barbora Somerová

GENETICKÁ VARIABILITA OHROŽENÝCH ŽELV ORLITIA  
BORNEENSIS CHOVANÝCH V EVROPSKÝCH  
ZOOLOGICKÝCH ZAHRADÁCH

Genetic variability in a population of endangered turtle *Orlitia  
borneensis* kept in european zoos

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Daniel Frynta, Dr.

Praha 2011

Tato diplomová práce vznikla za podpory grantu GAUK 9873/2009.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 16. května 2011.

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli, Doc. RNDr. Danielu Fryntovi Dr., za všechny cenné rady, které mi poskytl a za pomoc při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kláře Palupčíkové za veškerou pomoc s laboratorní prací, trpělivý přístup při práci s použitým softwarem a za konzultace použitých metod.

## Abstrakt

*Orlitia borneensis*, jinak také nazývána Malajská obří želva, je velmi málo prozkoumaný druh želvy, jehož populace se v přírodě rapidně zmenšují. Většina zvířat chovaných v evropských zoologických zahradách a také v záchranných chovech pochází z konfiskátů, proto je místo původu a taxonomický status u těchto zvířat neznámý. Tato studie je zaměřena na posouzení genetické variability zakladatelských jedinců z této populace. Byl sekvenován mitochondriální úsek pro gen cytochrom b a bylo nalezeno 23 haplotypů. Maximální sekvenční divergence byla menší než 1,5% a fylogenetická struktura získaných haplotypů byla jen špatně podpořena. Blízká genetická příbuznost vzorkovaných želv byla potvrzena analýzou sekvencí jaderného genu R35. Není tedy důvod k rozdělení zkoumané populace *O. borneensis* na více konzervačních jednotek.

## Abstract

Malaysian Giant Turtle (*Orlitia borneensis*) is a poorly known turtle with rapidly declining numbers in nature. Most animals of this species kept in European zoos and included in captive breeding programs are confiscates of illegal trade and their locality of origin and taxonomic status are unknown. This study was aimed to assess genetic variation in founders of this population. We sequenced genes for the mitochondrial cytochrome b and found 23 haplotypes. The maximum sequence divergence was less than 1.5% and the phylogenetic structure of the haplotypes was only poorly supported. A close genetic similarity among sampled turtles was further confirmed by a sequencing of the nuclear R35 gene. Thus, the examined population of *O. borneensis* may be further treated as a single conservation unit.

<b>1. Úvod</b>	<b>7</b>
<b>2. Literární přehled</b>	<b>8</b>
2.1. <i>Orlitia borneensis</i>	8
2.2. Želví krize v Asii	10
2.3. Biogeografie	12
2.4. Jiné druhy žijící v JV Asii	17
<b>3. Metodická část</b>	<b>21</b>
3.1. Materiál	21
3.2. Použité chemikálie	23
3.3. Použité přístroje	24
3.4. Použité metody	24
3.4.1. Izolace DNA a následné měření koncentrace DNA	24
3.4.2. Vizualizace PCR produktů na agarózovém gelu	25
3.4.3. Přechištění PCR produktů a měření koncentrace DNA	26
3.4.4. Sekvence DNA	27
3.4.5. Vyhodnocení chromatogramu a tvorba alignmentu	28
3.4.6. Fylogenetické analýzy	29
<b>4. Výsledky</b>	<b>31</b>
4.1. Izolace DNA a následné měření koncentrace DNA	31
4.2. PCR a následná vizualizace PCR produktů na agarózovém gelu	33
4.3. Přechištění PCR produktů a měření koncentrace DNA	35
4.4. Sekvence DNA	35
4.5. Analýza mtDNA genu pro cyt b	36
4.6. Struktura R35 úseku	46
<b>5. Diskuze</b>	<b>47</b>
<b>6. Závěr</b>	<b>50</b>
<b>7. Použitá literatura</b>	<b>51</b>

## 1. Úvod

Populace volně žijících želv *Orlitia borneensis* se stále zmenšují, daří se je ovšem úspěšně chovat a rozmnožovat v lidské péči. Významnou roli v této péči hrají zoologické zahrady, v České republice zejména pražská zoologická zahrada. Vzhledem k výjimečné geologické historii jihovýchodní Asie (Meijaard, 2004), je ovšem důležité vědět, jak moc jsou jedinci v rámci tohoto druhu odlišní. Pokud by bylo možné vyloučit, že pocházejí z geneticky rozlišených populací či dokonce poddruhů, nebylo by nutné chovanou populaci pro účely záchranného chovu dále dělit, bylo by možné držet je jako jedinou ochránářskou jednotku. Pro kvalifikované rozhodnutí bylo ovšem zapotřebí nejen posoudit prostou sekvenční rozmanitost, ale také fylogenetickou strukturu a kongruenci výsledků získaných studiem mitochondriálních a jaderných genů.

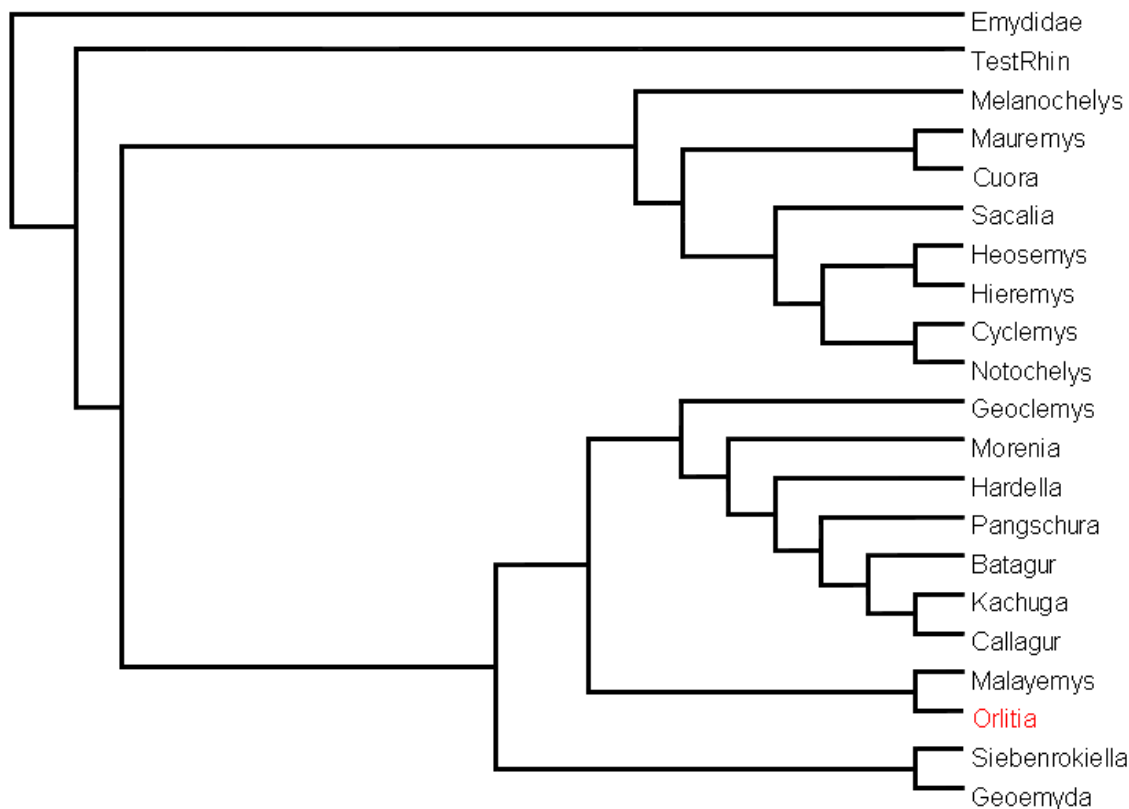
V této práci byl ke zjištění diverzity použit mitochondriální marker pro gen cyt b. Vzhledem k poměrně časté hybridizaci v čeledi Geoemydidae (Parham et al., 2001), byl také použit jaderný marker pro gen R35, díky kterému by bylo možné případné hybridní jedince odhalit. Shoda chování jaderného markeru s výsledky dosaženými studiem mitochondriální DNA umožnila posoudit, zda nebyl mitochondriální gen jednostranně ovlivněn selekcí a zda není důvodné podezření, že studovaní jedinci pocházejí z reprodukčně (např. geograficky) dlouhodobě izolovaných populací.

Cíle této práce o želvách *Orlitia borneensis* jsou:

1. Nashromáždít a zpracovat co největší množství vzorků z evropských chovů, popř. doplnit lokalizovanými vzorky z oblasti výskytu.
2. Zjistit genetickou variabilitu pomocí mitochondriálního a jaderného markeru u jedinců *Orlitia borneensis* chovaných v evropských chovech a zjistit, zda je víceméně homogenní nebo je třeba jí rozčlenit na konzervační jednotky.

## 2. Literární přehled

### 2.1. *Orlitia borneensis*

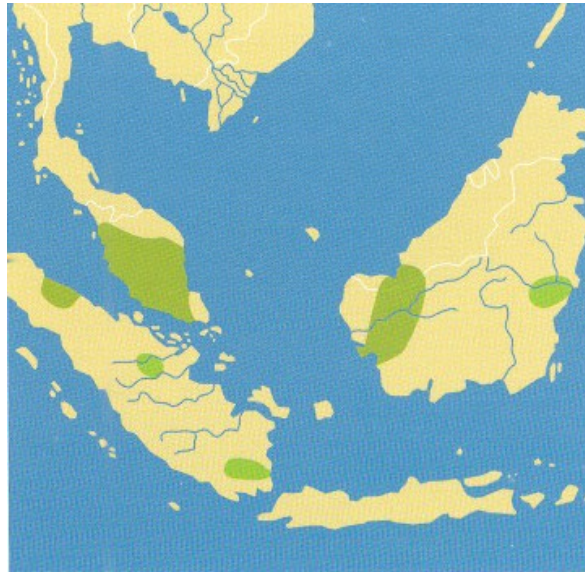


**Obr. 1:** Kladogram nakreslený podle topologie fylogenetických stromů z práce Spinkse et al. (2004) založený na ML analýze genů cyt b a 12S z mtDNA a rDNA a na analýze jednoho jaderného genu R35

*Orlitia borneensis* je jediný druh akvatické želvy, který patří do rodu *Orlitia*. Dostal své druhové jméno podle oblasti přirozeného výskytu, Bornea. Někdy je též nazývána Malaysian giant turtle (Ernst a Barbour, 1989), Bornean river turtle (Knotkova et al., 2005) nebo Asian giant river turtle (Jensen a Das, 2008).

Vyskytuje se v Malajsii (na jihu Malajského poloostrova), na Sarawaku (část Bornea patřící Malajsii), v malé oblasti na Kalimantanu (část Bornea patřící Indonésii) a na severovýchodě Sumatry (Iverson, 1992). Přirozeným prostředím jsou pro *O. borneensis* velké vodní plochy s hlubokou, pomalu tekoucí sladkou vodou, tedy jezera, mokřady, větší řeky a lze se s ní setkat dokonce i v ústích řek (Ernst a Barbour, 1989; Lim a Das, 1999; Iskandar, 2000).





**Obr. 2:** Mapa zobrazující oblast výskytu druhu *Orlitia borneensis* (převzato z Ernst a Barbour, 1989)

Poprvé byla v odborné literatuře popsána doktorem Grayem v roce 1873 (Gray, 1873). Nejprve se Gray domníval, že se jedná o zástupce druhu *Cuora amboinensis*, po přezkoumání však zjistil, že našel mládě nového druhu opravdu velké sladkovodní želvy. Tato želva může mít běžně krunýř velký až 80 cm (Ernst a Barbour, 1989), samecům může ale dorůst do ještě větších rozměrů. Dokonce byl zdokumentován i krunýř měřící výjimečných 117 cm (Iskandar, 2000).

Karapax je podlouhlý a úzký, v oblasti páteře mírně zvednutý (Gray, 1873). U mláďat je oblast mezi 2. a 3. vertebrálními štítky poměrně špičatá, ovšem toto vyvýšení u dospělých jedinců mizí. Margiální štítky (marginals) v zadní části karapaxu jsou poměrně malé v porovnání s frontálními a laterálními (Ernst a Barbour, 1989). Barva karapaxu se pohybuje od tmavě šedých odstínů až po hnědé, ale není výjimkou ani černé zbarvení (Gray, 1873). Plastron je dlouhý a úzký se středním análním zářezem, má celistvou žlutavou barvu. Karapax a plastron jsou spojeny tlustými a širokými můstky, které obkličují axiální a inguinální štítky (Ernst a Barbour, 1989).

Hlava je velká a široká s mírně zvednutým rostrem. Zbarvení hlavy seshora je spíše tmavé, pomalu přechází v dva tmavě žluté pruhy po stranách až v krémové zbarvení spodku hlavy a rovněž i krku. Nohy jsou opět tmavé, šedé nebo černé. Horní část hlavy a přední nohy jsou chráněny tvrdšími šupinami (Ernst a Barbour, 1989).

Je všežravá, většinou se živí rybami nebo menšími savci a plazy, ale nepohrdne ani vodními rostlinami nebo ovocem, například banány a papájou. Dokáže se krmit stejně dobře ve vodě jako i na souši (Ernst a Barbour, 1989). Pozorováním želv v zajetí se zjistilo, že dokáží sníst celou řadu potravin s vysokým obsahem proteinů, jako například hovězí srdce, koňské maso, konzervy pro psy a ryby. Snědly i zralé banány, ale další ovoce a zeleninu odmítaly (Mehrtens, 1970).

Ve věku 10-20 let dosáhnou sexuální zralosti. Samice klade snůšku o velikosti 12-15 vajec, zahrabává ji do písčitého říčního břehu. Vejce jsou podlouhlá s pevnou skořápkou, jejich velikost je zhruba 80x40 mm. Mláďata po vylíhnutí měří 60 mm (Ernst a Barbour, 1989; Moll, 1979).

V současné době populace *Orlitia borneensis*, stejně jako populace ostatních druhů želv v Asii, čelí nebezpečí vyhubení. Podle úmluvy CITES (the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) je tento druh zařazen do Appendixu II, toto zařazení je platné od 14. října 2010. Příloha II zahrnuje druhy, se kterými je obchodování na mezinárodní úrovni omezeno a podřízeno dozoru (www.cites.org). Organizací IUCN (International Union for Conservation of Nature, helps the world find pragmatic solutions to our most pressing environment and development challenges) je *Orlitia borneensis* označena jako ohrožená v Indonésii a zranitelná v Malajsii (EN - A1d+2d) (www.iucnredlist.org). Podle této definice hrozí populaci *Orlitia borneensis* v blízké budoucnosti vysoké riziko vyhynutí v přírodě.

## 2.2. Želví krize

Lidé používali plazy a obojživelníky jako zdroj své obživy po celou dobu své evoluční historie. V současné době je konzumace plazů, obzvláště tedy sladkovodních želv, soustředěna v Asii (Gibbons et al., 2000; Beebee a Griffiths, 2005), kde je jejich nadměrné využívání nejvýznamnější příčinou jejich klesajícího počtu (Gibbons et al., 2000; van Dijk, 2000; van Dijk et al., 2000; Moll and Moll, 2004). Většina z devadesáti druhů sladkovodních želv žijících v Asii čelí vyhynutí (van Dijk et al., 2000, Altherr a Freyer, 2000).

Největším, ale zdaleka ne jediným, spotřebitelem želv v Asii a zároveň i na celém světě je bezesporu Čína, kde se uskutečňuje obchodování se želvami už tisíce let (Gong et. al., 2009). Probíhají zde dva hlavní typy obchodu se živými želvami. Prvním je prodej želv jako surovin pro potřeby tradiční čínské medicíny a surovin pro přípravu jídel. Druhým typem obchodování je prodej želv jako domácích mazlíčků (Gong et. al., 2009). Největší

množství želv je prodáváno jako potraviny. Například na největší tržnici v Číně Yuehe Pet Market se ročně prodá více než 145 tisíc jedinců (Gong et. al., 2009). Ze 157 prodávaných druhů, které byly zdokumentovány v letech 2002 až 2003, téměř polovina patří mezi světově chráněné druhy a 77 druhů bylo dokonce v letech, kdy studie probíhala zařazeno do CITES dodatků I a II (Cheung a Dudgeon, 2006).

Situace se v devadesátých letech minulého století ještě zhoršila, když se stalo požívání želv módní záležitostí a rozšířilo se v provinciích Guangdong, Guangxi, Hainan a v některých jihovýchodních provinciích (Zhou a Jiang, 2008). Od roku 1998 významně vzrostl import želv nejčastěji ze zemí sousedících s Čínou, ale i z dalších zemí jihovýchodní Asie. Z těchto zemí mají pouze Malajsie a Indonésie nastavené kvóty pro export druhů na listině CITES. Zároveň v Číně celkově poklesl export, posunula se tedy z čistého vývoze na čistého dovozce. Ročně je do Číny dovezeno 400 tisíc až milion jedinců a její vývoz se pohybuje od 170 tisíc do 290 tisíc jedinců. V letech 1998 až 2004 tvořila *O. borneensis* šest procent z celkového počtu dovezených želv (Zhou a Jiang, 2008). V posledních letech se v Hongkongu podařilo zkonfiskovat velké množství ilegálně dovezených želv. Jedna z nejvýznamnějších konfiskací proběhla v roce 2001, kdy bylo zabaveno 10 000 želv. Z toho 6 000 bylo posláno lodí do Spojených Států Amerických a do Evropy (Zwaterpoorte, 2011).

V posledních letech dramaticky vzrostl i obchod s želvími mazlíčky (Gong et. al., 2009), kde jsou po Číně největšími dovozci USA, Japonsko a Evropa (Schappe, 2008; Altherr a Freyer, 2000).

Odchyt želv v jejich přirozeném prostředí je zpravidla prováděn organizovanou skupinou lidí, tzv. komerčními sběrači. Tito profesionálové dokáží vysbírat ohromné množství želv v dané oblasti. A se sběrem přestanou až tehdy, když je populace druhu redukována natolik, že se jim nevyplatí investovat čas kvůli malému zisku. Tomuto stavu populace se říká komerční vyhubnutí. Tehdy upouští profesionální sběrači od lovu daného druhu a svoji pozornost zaměří na druh jiný, jehož sběr jim bude víc vynášet (Salzberg, 2001).

Pojem komerční vyhubení má předpoklad, že nikdo už nenahradí komerční sběrače a ponechaný druh zůstane v péči ochránců zvířat, kteří mu pomohou se opětovně rozrůst. Bohužel v rozvojových zemích to není pravda a nikdy ani nebyla (Salzberg, 2001). Po ukončení práce komerčních sběračů nastoupí na jejich místo sběrači noví, takoví, kteří mají

„všechn čas na světě“ a mohou ho investovat do náročného hledání. Někteří z těchto sběračů pocházejí z jiné země, někteří jsou domácí a někteří jsou místní lidé, kteří jsou tak chudí, že sotva přežívají a výdělky z prodeje chycených želv jim umožňují uživit celou rodinu. Tito sběrači neopustí oblast, dokud nenajdou i tu poslední želvu, která na ní žije (Salzberg, 2001).

Avšak ani velké množství želv dovážených do Číny není dostačující k pokrytí poptávky po želvích produktech. Vzhledem k tomu, že poptávka za posledních dvacet let neustále rostla a populace volně žijících želv se stále zmenšovaly, rychle začaly přibývat želví farmy, které byly zakládány podnikateli za účelem zisku (Shi a Parham, 2001). Chov probíhá opravdu ve velkém, ročně je prodáno více než tři sta milionů želv pocházejících z šesti set osmdesáti čtyř farem, které ale tvoří jen zhruba 46% celkového počtu všech farem v Číně. Nejčastěji a nejhojněji pěstovanými druhy jsou v Číně *Pelodiscus sinensis*, *Mauremys reevesii*, *Mauremys sinensis* a čtvrtý nejvyšší počet chovaných želv je druhu *Trachemys scripta elegans*. Mezi další chované druhy patří *Mauremys mutica*, *Cuora trifasciata*, *Cuora moughtii*, *Palea steindachneri* a jiné méně obvyklé druhy (Shi et. al., 2008).

Kvůli své bezbrannosti vůči lidskému lovení, pomalé life-history tj. dlouhé délce života a nízké reprodukční míře (charakteristické pro K strategii) jsou želvy citlivější na drancování než ostatní taxony volně žijících zvířat (Zhou a Jiang, 2008).

Dalšími faktory, díky kterým se želví populace v Asii zmenšuje je třeba osídlování a odvodňování oblastí pro zemědělské nebo hospodářské účely, které provázejí nedávnou ekonomickou reformu v Číně (Parham et. al. 2001). Konkrétně v případě Indonésie probíhá vládou organizované přesídlování lidí z ostrovů hustě osídlených na řídké osídlené včetně Bornea (Kalimantan). Tímto procesem přicházejí želvy o své přirozené prostředí a svá kladiště.

Problémem je též časté užívání chemických hnojiv a pesticidů v zemědělství a jejich hromadění v půdě, což způsobuje kontaminaci prostředí, která má škodlivý vliv na želví populaci.

### **2.3. Biogeografie**

Ostrov Sumatra a Borneo a Malajský poloostrov leží v oblasti jihovýchodní Asie. Geologicky se nacházejí na Sundském šelfu, který je rozšířením pevninského šelfu z jihovýchodní Asie. Proto se jim někdy také říká „Sundaland“, tento termín se rovněž

vztahuje i na Jávu, Bali, Palawan a menší ostrovy (Whitmore, 1981, 1987).

Na Sundských ostrovech je velmi bohatá biodiverzita. Tato výjimečná rozmanitost má své kořeny ve zvláštní geologické historii této oblasti. Fylogenetické vztahy mezi suchozemskými druhy i v rámci jednotlivých druhů vznikly působením několika hlavních sil (Nater et al., 2011).

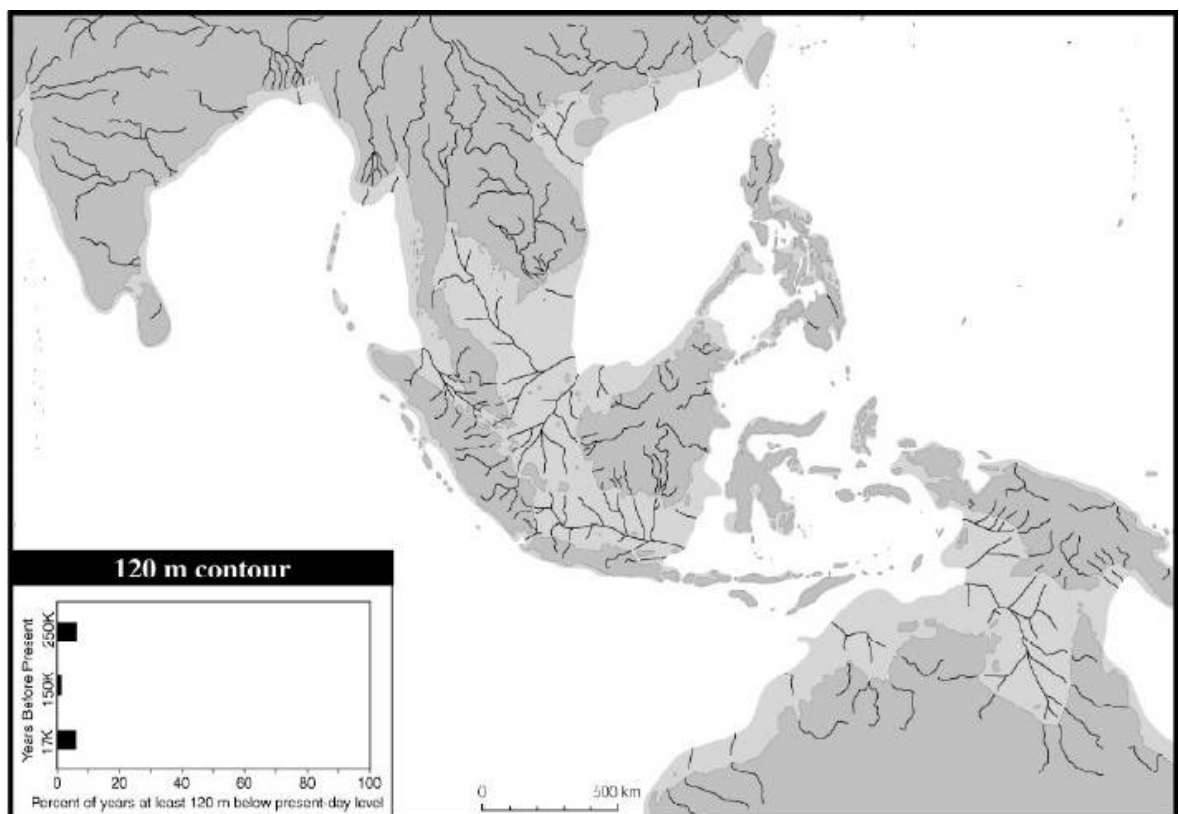
Prvním z těchto sil byl pohyb tektonických desek, který otevřel a následně zničil pevninské mosty mezi ostrovy i Malajským poloostrovem (Nater et al., 2011). To umožnilo velkému množství rostlinných i živočišných druhů kolonizovat souostroví z jihovýchodní části Asie (Meijaard, 2004). Následně ale byly ostrovní populace odděleny od pevninských. Pohyb tektonických desek byl zodpovědný za staré fylogenetické rozdělení před více než 2,5 milióny let. Přestal být důležitým, když Sundské ostrovy dosáhly v raném Pleistocénu dnešní podoby (Meijaard, 2004).

Další důležitou silou byla změna hladiny moře, která byla považována za zásadní pro pochopení rozdělení vodních i suchozemských organismů (Molengraaff & Weber, 1919; Darlington, 1957). Během ledových dob středního a pozdního Pleistocénu před 1,5 až 0,1 miliónů let (Meijaard, 2004) se měnila hladina moře, která postupně klesla až o 120 metrů oproti stavu hladiny moří dnes (viz obr. 3). Tyto změny měly svá maxima ve třech po sobě jdoucích obdobích, před 250 000, 150 000 a 17 000 lety (Voris, 2000). Při poklesu hladiny moře o 120 m vzniklo 32 kilometrů čtverečních nové pevniny, která spojovala Sundské ostrovy s Asijskou pevninou a zároveň byly propojeny ostrovy pevninskými mosty (Whitmore 1987, Voris 2000). Kromě těchto změn byly připojeny ostrovy Hainan a Tchaj-wan k Čínské pevnině a Srí-Lanka byla spojena s Indií (Voris 2000). Při poklesu hladiny moře o 100 a 75 metrů (viz obr. 4 a 5) zůstala plocha odhaleného mořského dna podobná jako při poklesu hladiny o 120 metrů, žádné hlavní pozemní spojení nebylo ztraceno. Při 75 m pod dnešní úrovní hladiny moře je pravděpodobné, že vzniklo jedno nebo více sladkovodních jezer nebo bažin (Emery a Nini, 1963; Biswas, 1973). V případě poklesu hladiny moře o 50 metrů (viz obr. 6) oproti hladině dnešní zůstaly stále ještě ostrovy Sumatra, Borneo a Jáva spojeny pevninskými mosty s Malajským poloostrovem. Tyto mosty se s největší pravděpodobností ztrácí až při poklesu moře o 30 metrů (viz obr. 7).

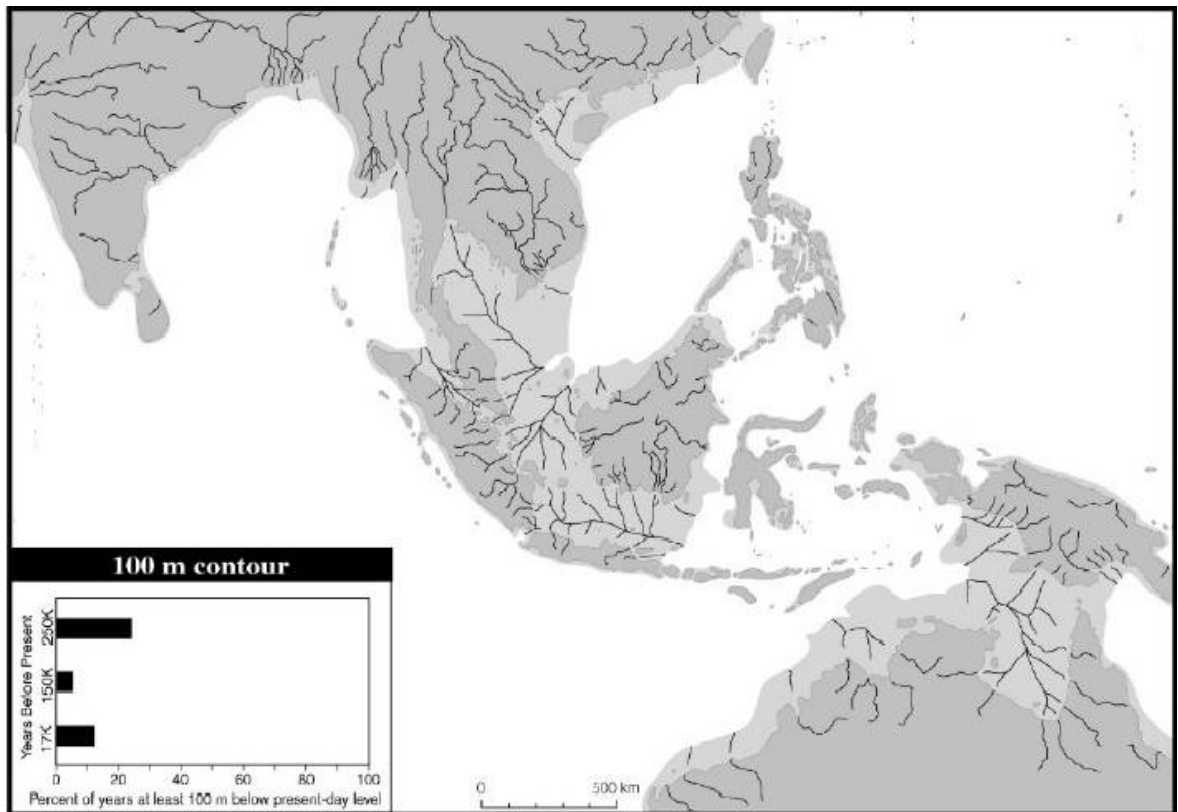
Tato nížinná spojení umožnila osídlování ostrovů z pevniny a pohyb organismů mezi ostrovy, dokonce i znovuosídlení pevniny z ostrovů. Borneo, které leží na východní straně Sundských ostrovů bylo na západě a jihu spojeno s Malajským poloostrovem (Lisiecky a Raimo, 2005).

K odvodňování nové pevniny vznikly říční systémy. Oblast mezi Malajským

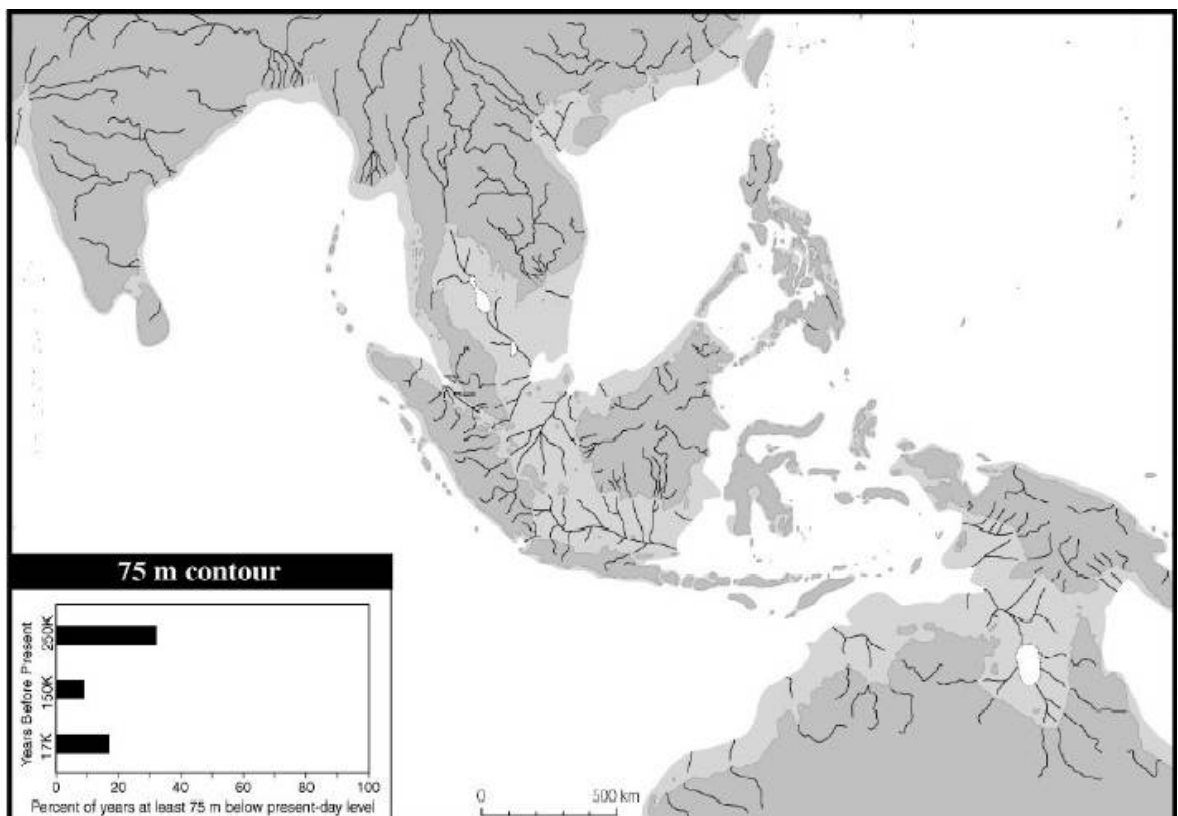
poloostrovem a Sumatrou byla odvodňována na severozápad do Andamanského moře. Ze současné hloubky kontury vyplývá, že sever byl odvodňován jedinou řekou ( vyznačeno na obr.3; Keller & Richards, 1967). Její přítoky tvořily i některé dnešní významné řeky Sumatry (například Sungai, Simpang Kanan, Sungai Panai, Sungai Rocan a Sungai Siak) nebo Malajského poloostrova (Sungai Perak, Sungai Bernam, Sungai Muar a Sungai Lenek) (Voris, 2000). Největší z významných řek Sundského šelfu byla North Sunda River flowage (Tjia, 1980), která směřovala na sever od severovýchodního pobřeží Sumatry, kde se do ní vlévaly řeky Sungai Indragiri, Sungai Hari a Sungai Musi. Před vstupem do moře na severovýchodě od ostrovu Natuna se tato řeka spojila s řekou Kapuas, která tekla z Bornea. Při poklesu hladiny moře o 75 nebo více metrů se do této řeky vlévalo mnoho řek z Bornea a Sumatry. To mělo hlavní vliv na rozšíření sladkovodních ryb (Inger & Chin, 1962) a pravděpodobně i jiných sladkovodních živočichů, jako je *Orlitia borneensis*. Zároveň řeky představovaly nepřekonatelnou izolační bariéru pro mnoho suchozemských druhů (Clutton-Brock 1992).



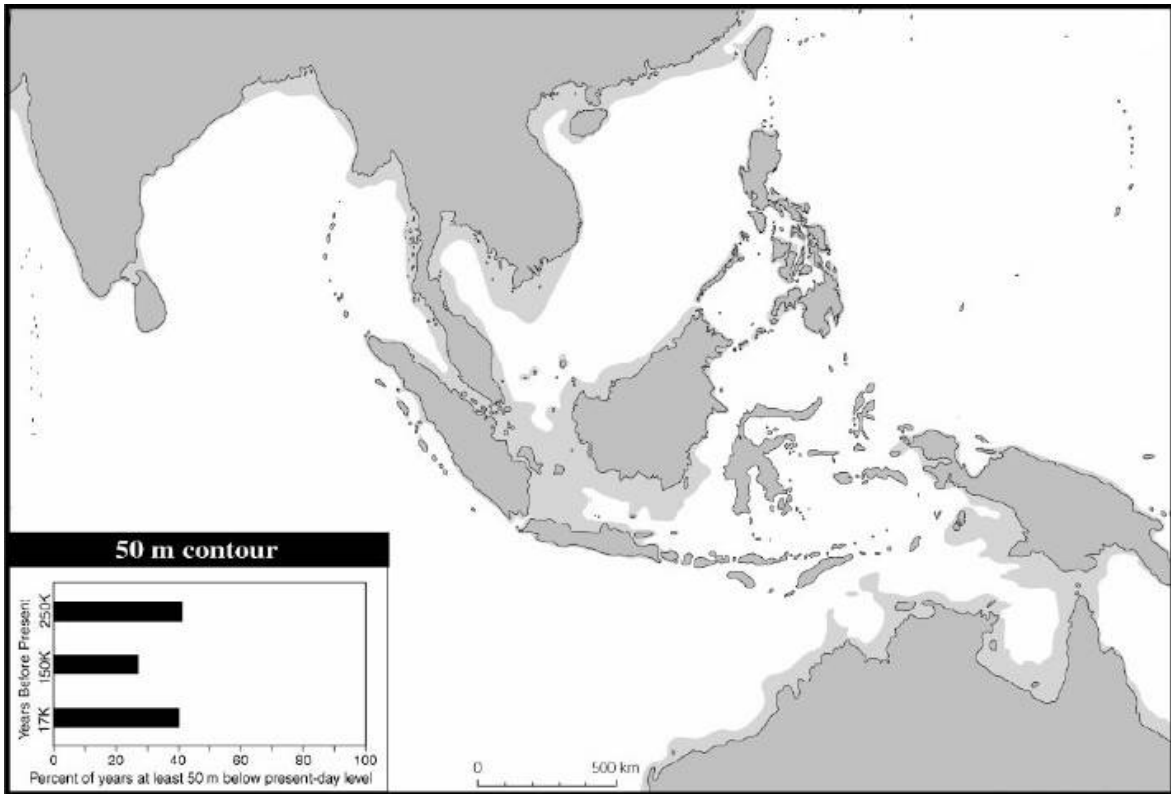
**Obr. 3:** Mapa oblasti jihovýchodní Asie a Austrálie znázorňující pevninu při poklesu hladiny moře o 120 metrů (převzato z Voris, 2000)



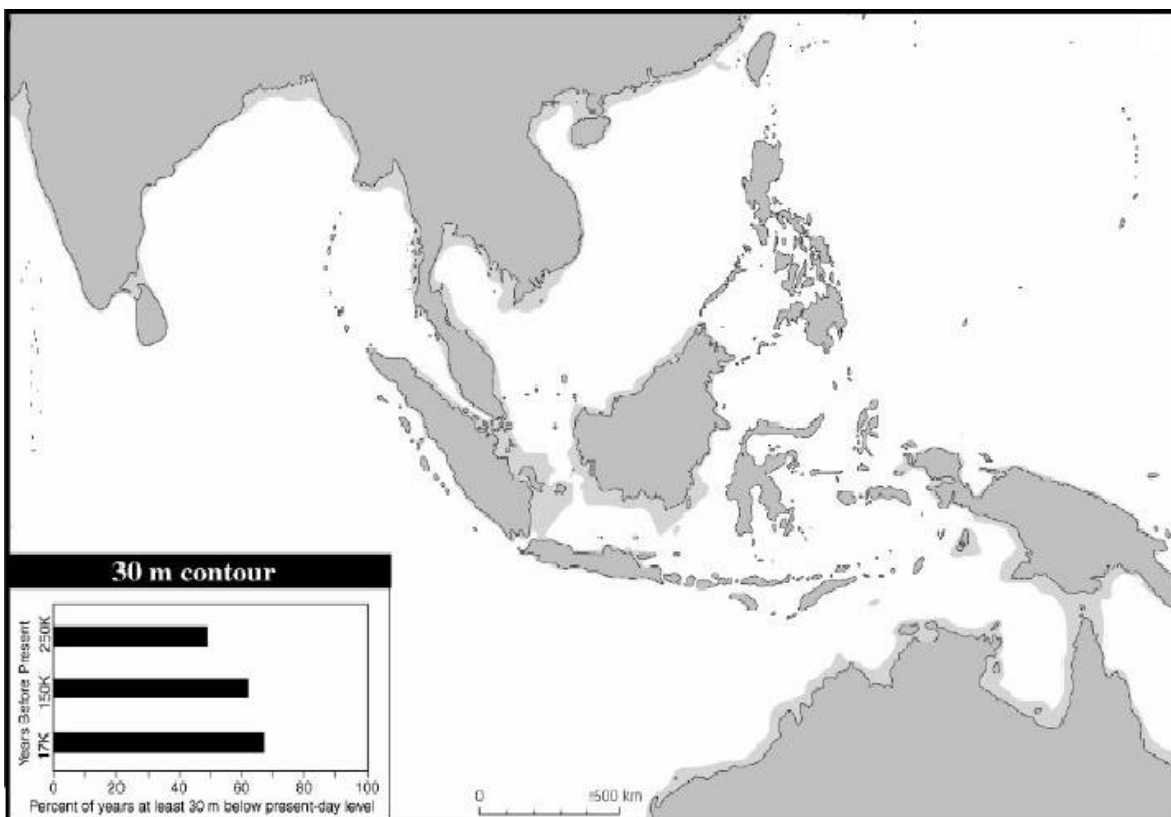
**Obr. 4:** Mapa oblasti jihovýchodní Asie a Austrálie znázorňující pevninu při poklesu hladiny moře o 100 metrů (převzato z Voris, 2000)



**Obr. 5:** Mapa oblasti jihovýchodní Asie a Austrálie znázorňující pevninu při poklesu hladiny moře o 75 metrů (převzato z Voris, 2000)



**Obr. 6:** Mapa oblasti jihovýchodní Asie a Austrálie znázorňující pevninu při poklesu hladiny moře o 50 metrů (převzato z Voris, 2000)



**Obr. 7:** Mapa oblasti jihovýchodní Asie a Austrálie znázorňující pevninu při poklesu hladiny moře o 30 metrů (převzato z Voris, 2000)



Významnou roli v evoluční historii druhů na Sundských ostrovech hrály také sopečné erupce (Nater et al., 2011). V jihovýchodní Asii došlo v minulosti k mnoha sopečným výbuchům (Hall 1996), které mohly vést k lokálnímu vymírání a následnému znovu osídlování oblastí zdevastovaných vulkanickou činností. To se týkalo i oblasti Toba na Sumatře, kde došlo zhruba před 73 tisíci lety k sopečnému výbuchu (Rampino a Ambrose, 2000), který je považován za jeden z nejsilnějších sopečných výbuchů v geologické minulosti (Chesner et al., 1991; Williams et al., 2009).

#### 2.4. Jiné druhy žijící v JV Asii

Populace některých druhů na těchto ostrovech jsou velmi divergentní, oproti tomu u jiných druhů jsou populace stejné.

Giboni z čeledi Hylobatidae jsou malí stromoví lidoopi, kteří obývají tropické a subtropické deštné pralesy jihovýchodní Asie a přilehlých oblastí (Moontrick, 2006). Druh gibbonů *Hylobates agilis* z rodu *Hylobates* se vyskytuje stejně jako *Orlitia borneensis* na Malajském poloostrově, Borneu a Sumatře. Divergence tohoto druhu na dvě barevné formy, později povýšené na poddruhy *H. agilis agilis* a *H. agilis unko*, je podle Bayesovské analýzy odhadována na dobu před 0,95 až 1,68 miliónů let (Thinh et al., 2010).

Dalšími lidoopy obývajícími tuto oblast jsou orangutani z rodu *Pongo*. Do tohoto rodu patří dva druhy orangutanů, druh *Pongo abelii* obývající stále zelené deštné lesy severní Sumatry a *Pongo pygmaeus* vyskytující se na Borneu (Wich et al., 2008). Oddělení dvou linií těchto druhů je podle Bayesovské analýzy předpokládáno na dobu před 2,31 až 4,75 miliónů let (Nater et al., 2011). Oproti Sumaterské populaci, kde je nejstarší divergence odhadována na období před 0,50 až 1,23 miliónů let, je divergence Bornejské populace mnohem mladší. Radiace na Borneu se udála před 75 až 305 tisíci let (Nater et al., 2011). Zvláštním případem je populace na Batang Toru (nejjižnější oblast obývaná orangutany na Sumatře), která je více příbuzná populaci na Borneu než populaci na Sumatře, její oddělení od Bornejské se pravděpodobně událo před 1,27 až 3,00 milióny lety (Nater et al., 2011). Podle dřívějších studií byla předpokládána migrace během poslední doby ledové před 10 000 lety (Muir et al., 2000; Kanthaswamy et al., 2006), ale v poslední dosud sepsané práci nebyly nalezeny žádné důkazy pro tuto migraci (Nater et al., 2011).

U orangutanů lze předpokládat, že řeky, které odvodňovaly nově vzniklou pevninu, byly pro ně nepřekonatelnými izolačními bariérami, které ovlivnily jejich fylogeografickou historii. Behaviorální studie uvádějí, že ani jedno z pohlaví nepřekračuje řeky v případě, že

nejsou oba břehy spojeny korunovou klenbou (Rijksen a Meijaard, 1999).

V oblasti jihovýchodní Asie se nachází i druhy kočkovitých šelem z rodu *Neofelis*, které obývají subtropické a tropické lesy (Corbett a Hill, 1992). V tomto rodu jsou dva druhy. *Neofelis nebulosa* obývající Malajský poloostrov a jiné oblasti pevniny jihovýchodní Asie. A *Neofelis diardi*, který se vyskytuje na ostrovech Sumatra a Borneo (Buckley-Beason et al., 2006). Podle výsledků analýzy mtDNA byly ostrovní populace izolovány od pevninské od středního až pozdního pleistocénu, tedy zhruba před 1,71 až 4,02 milióny lety (Wilting et al., 2007). Podle stejné publikace se odhadované rozdělení mezi Sumaterskou a Bornejskou populací *N. diardi* událo poměrně nedávno před 30 000 až 845 000 lety.

Populace levharta obláčkového byly během pleistocénu geograficky a nebo ekologicky izolovány a nedocházelo k migraci (Wilting et al., 2007).

Dalším druhem kočkovitých šelem vyskytujících se v jihovýchodní Asii je *Panthera tigris*. Tento druh zahrnuje osm poddruhů, z nichž pouze pět není vyhynulých (Luo et al., 2004). Ale genetická struktura populace by naznačovala existenci šesti taxonomických jednotek nebo poddruhů: Amurský tygr *P. t. altaica*, severní indočínský tygr *P. t. corbetti*, jižní čínský tygr *P. t. amoyensis*, malajský tygr *P. t. jacksoni*, sumaterský tygr *P. t. sumatrae* a bengálský tygr *P. t. tigris* (Luo et al., 2004). Poslední společný předek je odhadován na období před 72 000 až 108 000 lety, což je mnohem později než u leoparda nebo jaguára (Luo et al., 2004). Sumaterský tygr je nepochybně pevninského původu (Mazák a Groves, 2006).

Z velkých savců obývá oblast jihovýchodní Asie druh nosorožce *Dicerorhinus sumatrensis*. V rámci tohoto druhu jsou rozlišovány čtyři haplotypy podle oblasti výskytu. První se nachází na Malajském poloostrově a v Riau provincii na Sumatře. Druhý je z provincie Riau na východě Sumatry. Třetí haplotyp je z provincie Bengkulu na jihozápadě Sumatry a poslední haplotyp se nachází v oblasti Sabath na Borneu (Morales et al., 1997). Je předpoklad, že populace byly izolovány mnohem déle než jen 10 000 let od posledního glaciálního maxima, nejspíše říčními toky. Populace na Sumatře byla rozdělena na západní a východní obloukem hor vulkanického původu. Největší rozdíl je mezi populacemi na Sumatře a na Borneu, poté mezi populacemi na Borneu a na Malajském poloostrově. Nejmenší rozdíl je mezi populacemi ze Sumatry a z Malajského poloostrova (Morales et al., 1997).

Ze sladkovodních ryb vyskytujících se v dané oblasti je možné jmenovat druh *Pangasius kunyit*, který byl později překlasifikován na skupinu *Pangasius kunyit sensu*

*scritto* obsahující tři alopatrické druhy (Gustiano et al., 2001).

Ve studii Gustiano et al., 2001 nenalezli žádné rozdíly mezi populacemi *P. kunyit* žijícími na Sumatře a ve východním Kalimantanu na Borneu, proto je zařadili do jednoho druhu. Dalším druhem jsou populace vyskytující se na severu Bornea v Sabathu. Třetí druh se vyskytuje v řece Mekong ve Vietnamu.

Použitím evolučního měřítka pro 12S rDNA, které je 0,5 – 1,0% odlišnosti sekvencí na milion let (Simons et al., 1994), byly odhadnuty vztahy ve skupině *Pangasius kunyit sensu scritto*. Nejprve došlo před 1,4 – 2,0 milióny let k oddělení linie populace ze Sabathu. K odlišení zbylých dvou populací došlo až před 0,3 – 0,6 milióny lety, tedy nejpozději ve střením pleistocénu (Gusiano et al., 2001).

Dalším druhem sladkovodních ryb v dané oblasti je *Hemibagrus nemurus*, který se mimo jiné oblasti vyskytuje ve čtyřech provinciích na západě Malajského poloostrova (Perak, Kedah, Johor, UMP), v jedné provincii na východě tohoto poloostrova (Terengganu) a v provincii Sarawar na Borneu (Chong et al., 2000; Usmani et al., 2003). V případě tohoto druhu došlo k nedávné diferenciaci, která se odehrála počátkem pleistocénu (Dodson et al., 1995) a dala vznik třem skupinám obsahujícím 35 haplotypů. První z nich se nachází na východě Malajského poloostrova (v Malajsií a Thajsku) a obsahuje dvě mitochondriální linie. Druhá skupina je ze Sundských ostrovů (západ Bornea, Sumatra a západ Jávy), z této skupiny byly populace na západě Bornea (Kapuas), na východě Sumatry a na jihu Malajského poloostrova označeny jako nový druh *Hemibagrus hoevenii* (Kottelat a Lim, 1995). Poslední skupina se vyskytuje pouze v západní části Bornea na Sarawaku.

Oblast jihovýchodní Asie rovněž obývá rybí druh *Barbodes gonionotus*. Tento druh žije ve velkých říčních systémech v Thajsku, Laosu, Kambodži, Vietnamu, na Sumatře a Jávě (Kamonrat et al., 2002). Podle mikrosatelitových dat je naznačena existence dvou hlavních genetických linií, jedna odpovídá pevninské populaci a druhá populaci ostrovní (McConnell, 2004), toto oddělení se událo nejspíše počátkem pleistocénu v rozmezí stanoveném na dobu před 600 tisíci až 1,8 miliónem let. Stáří rozdělení bylo odhadnuto za předpokladu průměrné mutační rychlosti kontrolního regionu mtDNA u ryb 3,6 % za milión let (Donaldson a Wilson, 1999). U tohoto druhu patrně došlo k nedávnému toku genů, nejspíše během minulých 250 000 let, tedy v dobách ledových (McConnell, 2004).

Výsledky studie Yap (2002) ukazují, že oblast Sumatra-Jáva je úzce spojena s jihovýchodním Thajskem, jižní a západní Kambodžou, Malajským poloostrovem a

Borneem. Toto spojení bylo nejspíše způsobeno v pleistocénu, kdy byly západ Malajského poloostrova, Sumatra, Borneo a Jáva byly spojeny během tří glaciálních maxim (de Beaufort, 1951). Zoogeografická rekonstrukce založená na rozšíření vnitrodruhové genetické skupiny naznačuje, že populace západní oblasti Malajského poloostrova jsou více geneticky příbuzné se Sumaterskými populacemi, zatímco populace z východní části Malajského poloostrova mají blíže spíše k Indočínským populacím (Dodson et al. 1995). Západní a východní oblasti Malajského poloostrova jsou odděleny pohořím ve středu poloostrova, které zde působí jako izolační bariéra nejen pro sladkovodní živočichy (Dodson et al., 1995). Povodí Sundských ostrovů lze rozdělit do čtyř párů: Malajský poloostrov – severní Sumatra, střední Sumatra – západní Borneo, severní Borneo – východní Borneo – Sarawak, jižní Borneo – Jáva (Yap, 2002). Toto geografické rozdělení povodí je rovněž podpořeno podobným složením jejich ichtyofauny (Yap, 2002). Například u páru Malajský poloostrov – severní Sumatra: fauna v řece Perak a fauna v Sumaterských řekách jsou podobné (Yap et al., 1988). Nebo u páru střední Sumatra – západní Borneo je podobné zastoupení živočichů v Sumaterských řekách jako v řece Kapuas na západě Bornea (Rainboth, 1991). Stejně rozdělení rybí fauny na Borneu bylo zjištěno už v průkopnické zoogeografické studii týkající se Sundských ostrovů (Molengraaff a Weber, 1919).

### 3. Metodická část

#### 3.1. Materiál

V této práci je zahrnuta analýza vzorků od 73 jedinců sladkovodních želv druhu *Orlitia borneensis*. Většina vzorků pochází od zakladatelských jedinců populace chované v evropských zoologických zahradách: Česká Republika, Německo, Polsko, Dánsko, Maďarsko a Rakousko. Pro další vzorky byla podniknuta cesta přímo do místa výskytu zkoumaného druhu, Indonésie. Expedice vedená Danielem Fryntou získala vzorky dvou jedinců původem z Bornea a jednoho ze Sumatry. Většina vzorků pochází od živých zvířat, odebírán byl kousek drápy, který byl uchováván až do svého zpracování v mikrozkuhavce s 96% etanolem. Několik vzorků pocházelo i od mrtvých zvířat, jednalo se o tkáňové řezy zafixované parafínem. Podrobný přehled vzorků s informacemi o jejich původu je uveden v tabulce 1.

**Tab. 1:** Seznam analyzovaných vzorků s jejich původem

Označení	Druh	Původ	Druh vzorku
29	<i>Orlitia borneensis</i>	Zoo Praha	drápy
30	<i>Orlitia borneensis</i>	Zoo Praha	drápy
31	<i>Orlitia borneensis</i>	Zoo Praha	drápy
47	<i>Orlitia borneensis</i>	Zoo Praha	drápy
48	<i>Orlitia borneensis</i>	Zoo Praha	drápy
58	<i>Orlitia borneensis</i>	Sumatra	drápy
59	<i>Orlitia borneensis</i>	Borneo (Panangkat)	drápy
60	<i>Orlitia borneensis</i>	Borneo (Singkawang)	drápy
61	<i>Orlitia borneensis</i>	Děčín	drápy
62	<i>Orlitia borneensis</i>	Dresden	drápy
63	<i>Orlitia borneensis</i>	Dresden	drápy
64	<i>Orlitia borneensis</i>	Brno	drápy
65	<i>Orlitia borneensis</i>	Brno	drápy
66	<i>Orlitia borneensis</i>	Brno	drápy
67	<i>Orlitia borneensis</i>	Brno	drápy
68	<i>Orlitia borneensis</i>	Brno	drápy
69	<i>Orlitia borneensis</i>	Brno	drápy
70	<i>Orlitia borneensis</i>	Vienna	drápy
71	<i>Orlitia borneensis</i>	Vienna	drápy
72	<i>Orlitia borneensis</i>	Vienna	drápy

73	<i>Orlitia borneensis</i>	Hauses des Meeres	drápy
74	<i>Orlitia borneensis</i>	Hauses des Meeres	drápy
75	<i>Orlitia borneensis</i>	Hauses des Meeres	drápy
76	<i>Orlitia borneensis</i>	Hauses des Meeres	drápy
77	<i>Orlitia borneensis</i>	Hauses des Meeres	drápy
78	<i>Orlitia borneensis</i>	Vienna	drápy
79	<i>Orlitia borneensis</i>	Vienna	drápy
80	<i>Orlitia borneensis</i>	Vienna	drápy
81	<i>Orlitia borneensis</i>	Vienna	drápy
82	<i>Orlitia borneensis</i>	Vienna	drápy
83	<i>Orlitia borneensis</i>	Budapest	drápy
84	<i>Orlitia borneensis</i>	Budapest	drápy
85	<i>Orlitia borneensis</i>	Gdansk	drápy
86	<i>Orlitia borneensis</i>	Gdansk	drápy
87	<i>Orlitia borneensis</i>	Gdansk	drápy
88	<i>Orlitia borneensis</i>	Gdansk	drápy
89	<i>Orlitia borneensis</i>	Gdansk	drápy
90	<i>Orlitia borneensis</i>	Gdansk	drápy
91	<i>Orlitia borneensis</i>	Leipzig	drápy
92	<i>Orlitia borneensis</i>	Poznan	drápy
93	<i>Orlitia borneensis</i>	Poznan	drápy
94	<i>Orlitia borneensis</i>	Poznan	drápy
95	<i>Orlitia borneensis</i>	Poznan	drápy
96	<i>Orlitia borneensis</i>	Poznan	drápy
97	<i>Orlitia borneensis</i>	Warszawa	drápy
98	<i>Orlitia borneensis</i>	Warszawa	drápy
99	<i>Orlitia borneensis</i>	Woburn	drápy
100	<i>Orlitia borneensis</i>	Woburn	drápy
101	<i>Orlitia borneensis</i>	Woburn	drápy
102	<i>Orlitia borneensis</i>	Wroclaw	drápy
103	<i>Orlitia borneensis</i>	Wroclaw	drápy
104	<i>Orlitia borneensis</i>	Wroclaw	drápy
105	<i>Orlitia borneensis</i>	Wroclaw	drápy
106	<i>Orlitia borneensis</i>	Dánsko	drápy
107	<i>Orlitia borneensis</i>	Dánsko	drápy
108	<i>Orlitia borneensis</i>	Dánsko	drápy
109	<i>Orlitia borneensis</i>	Dánsko	drápy
110	<i>Orlitia borneensis</i>	Dánsko	drápy
111	<i>Orlitia borneensis</i>	Dánsko	drápy
112	<i>Orlitia borneensis</i>	Dánsko	drápy
113	<i>Orlitia borneensis</i>	Arnhem	tkáňové řezy

114	<i>Orlitia borneensis</i>	Arnhem	tkáňové řezy
115	<i>Orlitia borneensis</i>	Arnhem	tkáňové řezy
116	<i>Orlitia borneensis</i>	Arnhem	tkáňové řezy
117	<i>Orlitia borneensis</i>	Arnhem	tkáňové řezy
118	<i>Orlitia borneensis</i>	Arnhem	tkáňové řezy
119	<i>Orlitia borneensis</i>	Arnhem	tkáňové řezy
120	<i>Orlitia borneensis</i>	Arnhem	tkáňové řezy
121	<i>Orlitia borneensis</i>	Zoo Dvůr Králové n. L.	drápy
122	<i>Orlitia borneensis</i>	Zoo Dvůr Králové n. L.	drápy
123	<i>Orlitia borneensis</i>	Zoo Dvůr Králové n. L.	drápy
124	<i>Orlitia borneensis</i>	Zoo Dvůr Králové n. L.	drápy
125	<i>Orlitia borneensis</i>	Zoo Dvůr Králové n. L.	drápy



**Obr. 8:** Mapa ukazující lokality původu vzorků z Bornea, Panangkat a Singkawang (59 a 60)

### 3.2. Použité chemikálie

Ke konzervaci odebraných vzorků byl použit 96% etanol, který byl objednan ze skladu Chemického ústavu PČF UK v Praze. Pro izolaci DNA ze vzorků byl použit DNeasy Blood

and Tissue Kit, jehož obsahem je pufr ALT, pufr AL, pufr AW1, pufr AW2, pufr AE a proteinasa K, vše od výrobce Qiagen.

Při polymerázové řetězové reakci byla použita komerčně vyráběná reakční směs Combi PPP Master Mix od výrobce Top-Bio a primery CytbG, THR-8, R35x1 a R35Ex2, všechny od výrobce Generi-biotech.

Při gelové elektroforéze byly použity následující chemikálie agaróza, TBE pufr, ethidiumbromid, délkový standard GeneRuler™ 100bp DNA Ladder a Barvivo Loading Dye objednané od firem Serva, Sigma, Quiagen a Fermentas.

Při přečištění DNA produktů byl použit QIAquick PCR Purification Kit, jenž obsahuje pufr PE, pufr PB, pH indikátor I a pufr EB, vše od výrobce Qiagen.

### **3.3. Použité přístroje**

Termocykler: TC-312 (TECHNE)

Centrifuga: minispin (Eppendorf)

Vortex: minishaker MC2 (Kika)

Nanodrop 1000 (Thermo SCIENTIFIC)

blokové lázně (Biotech, Labnet)

### **3.4. Použité metody**

#### **3.4.1. Izolace DNA a následné měření koncentrace DNA**

K izolaci celkové DNA byl použit komerčně dodávaný kit DNeasy Blood and Tissue Kit, izolace byla prováděna přesně podle návodu k němu přiloženému. Nejprve byly malé kousky drápků inkubovány v roztoku ze 180 µl pufru ALT a 20 µl proteinasy K při 56°C, aby se tkáň enzymaticky rozložila. Kvůli pomalému lyzování keratinu obsaženého v drápkách byla tkáň rozrušována i mechanicky pomocí vortexu. Poté, co byl vzorek dokonale rozložen, bylo přidáno 200 µl 96% EtOH a 200 µl pufru AL. Roztok byl přemístěn do speciálních zkumavek s membránou a centrifugován. DNA obsažená ve vzorku byla zachycena na membráně, následovalo postupné promývání pufrů AW1 a AW2, aby byla odstraněna proteinasa a pufr. Nakonec byla membrána promyta pufrům AE. Tímto krokem byla DNA vymyta z membrány a dostala se do roztoku pufru AE, což je obdoba ddH<sub>2</sub>O.

Zda izolace DNA ze vzorků proběhla úspěšně bylo ověřeno na přístroji Nanodrop 1000, kde byla změřena absorbance vzorku při 260 nm, tedy absorbance DNA a určena



koncentrace DNA v roztoku izolovaného vzorku (viz tabulka 5).

### 3.4.2. PCR a vizualizace PCR produktů na agarózovém gelu

Při reakci PCR byla použita reakční směs o celkovém objemu 25  $\mu$ l, její složení bylo následující:

Chemikálie	Objem
směs PPP Master Mix	12,5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	9,5 $\mu$ l
forvard primer	1 $\mu$ l
revers primer	1 $\mu$ l
templátové DNA	1 $\mu$ l

Primery byly dodány v koncentrované formě s informacemi o přesném látkovém množství primeru. Nejprve byly naředěny ddH<sub>2</sub>O na roztok o koncentraci 0,5 nmol/ $\mu$ l, který byl nejméně 12 hodin nechán v lednici. Tím byla připravena matrice primeru. Před použitím v reakci PCR je matrice ředěna s ddH<sub>2</sub>O v poměru 1:49 na roztok o koncentraci 10 pmol/ $\mu$ l.

V této práci byly použity dva páry primerů. Pomocí primerů CytbG a THR-8 (Spinks et al., 2004) byl amplifikován zhruba 1100 bp dlouhý úsek mtDNA pro gen cytochrom b. Pomocí druhého páru primerů R35Ex1 a R35Ex2 (Fujita et al., 2004) byl amplifikován zhruba 1200 bp dlouhý úsek nuDNA pro části intronu 1 proteinu R35.

#### Primery použité při PCR reakcích:

Název	Sekvence
CytbG	5' - AACCATCGTTGTWATCAACTAC - 3'
THR-8	5' - GGTTTACAAGACCAATGCTT - 3'
R35Ex1	5' - ACGATTCTCGCTGATTCTTGC - 3'
R35Ex2	5' - GCAGAAAACCTGAATGTCTCAAAGG - 3'

**Tab. 2:** Schéma programů PCR pro cytochrom b

Krok programu	Teplota	Doba trvání
1 - počáteční denaturace	94 °C	5 min
2 - denaturace	94 °C	45 s
3 - nasedání primerů	46 °C	45 s
4 - elongace	72 °C	1 min 20 s
5	Zpět ke kroku 2	35x
6 - závěrečná elongace	72 °C	7 min
7 - zchlazení	10 °C	

**Tab. 3:** Schéma programu PCR reakce pro R35

<b>Krok programu</b>	<b>Teplota</b>	<b>Doba trvání</b>
1 - počáteční denaturace	94 °C	5 min
2 - denaturace	94 °C	45 s
3 - nasedání primerů	50 - 60 °C	45 s
4 - elongace	72 °C	1 min 20 s
5	Zpět ke kroku 2	35x
6 - závěrečná elongace	72 °C	7 min
7 - zchlazení	10 °C	

Zda vzorky DNA skutečně obsahují DNA amplifikovaného úseku bylo ověřeno pomocí rozdělení na agarózovém gelu. Na přípravu 1% agarózového gelu byla potřeba: 0,3 g agarózy a 30 ml pufru TBE, který byl před použitím zředěn ddH<sub>2</sub>O v poměru 1:9. Tento roztok byl střídavě zahříván a promícháván, dokud nebyla agaróza plně rozpuštěna. Do gelu byl při teplotě 52°C, tedy ještě před tuhnutím, zamíchán 1 µl ethidiumbromidu, který umožňuje vizualizovat DNA pod UV světlem. Poté byl gel ponechán ve vaničce ke ztuhnutí zhruba 20 minut.

Délkový standard byl smíchán s barvivem Loading Dye zhruba v poměru 1:5. U vzorků byl tento postup vynechán vzhledem k tomu, že reakční směs pro PCR již obsahovala nanášecí barvivo. Vzorky byly nanášeny na gel, v každé řadě vzorků byl jednou nanesen i délkový standard. Vzhledem k tomu, že bylo nutné zjistit délku amplifikovaného úseku s přesností na 100 bází, bylo nastaveno nižší napětí při elektroforéze a zároveň byly vzorky rozdělovány delší dobu. Napětí bylo použito 70 mV a doba rozdělování byla alespoň 30 minut.

Gel byl následně pozorován pod UV lampou. Díky tomuto postupu bylo zjištěna úspěšnost proběhlé PCR reakce. Tedy jestli byl amplifikován námi požadovaný úsek a zda se v jeho okolí nevyskytuje vedlejší produkt.

### **3.4.3. Přečištění PCR produktu a měření koncentrace DNA**

Přečišťování vzorků bylo prováděno dvěma způsoby. Prvním z nich bylo přečištění pomocí komerčně dodávaného QIAquick PCR Purification Kit. Nejprve musel být připraven pufr PE k použití, byl k němu přidán 96% etanol. Prvním krokem samotného přečištění bylo přidání pufru PB k PCR reakční směsi v poměru 5:1, tedy 125 µl pufru k 25µl reakční směsi. Tato směs byla řádně promíchána na vortexu a přemístěna do 2 ml mikrozkušavek s kolonkou. DNA z PCR směsi byla navázána na membránu kolony,

zbytek směsi byl centrifugován po dobu 60 s při otáčkách 13,000 rpm. K promytí kolonky bylo přidáno 750  $\mu$ l pufru PE a opět centrifugováno 60 s při otáčkách 13,000 rpm. Kolonka byla přemístěna do sterilní 2 ml mikrozkušavky a přidáno 21,4  $\mu$ l pufru EB. Kolonka byla ponechána zhruba minutu, aby se vtiskl pufr EB. Poté byla provedena centrifugace po dobu 4 min při otáčkách 13,000 rpm. Tímto krokem se eluovala DNA, která byla zachycena na membráně.

Podle výrobce je možné tímto způsobem přečistit až 95% z celkového obsahu DNA v délkovém rozsahu 100 bp až 10 kb.

Postup u druhého způsobu přečišťování byl následující. Na 15  $\mu$ l reakční PCR směsi bylo přidáno 37  $\mu$ l 96% EtOH a 2  $\mu$ l 3M NaOAc (pH 5,4). Směs byla důkladně promíchána na vortexu a ponechána 15 minut při pokojové teplotě stát. Poté byla centrifugována 15 minut při otáčkách 10,500 rpm. Následně byl supernatant odstraněn pipetou. K peletu bylo přidáno 180  $\mu$ l 70% EtOH a opět byl centrifugován po dobu 5 minut při otáčkách 10,500 rpm. Tento krok byl opakován ještě jednou. Na závěr byl odebrán supernatant a byl řádně vysušen.

#### **3.4.4. Sekvence DNA**

Sekvence DNA byla prováděna na zakázku buď v Laboratoři sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě UK v Praze a nebo v laboratoři firmy MacroGen, Korea.

V případě, že byly vzorky posílány do Korey, nebylo nutné je zvlášť připravovat. Bylo posíláno 20  $\mu$ l přečištěné DNA amplifikovaného úseku od každého vzorku a 10  $\mu$ l primeru o koncentraci 10 pmol/  $\mu$ l na každý vzorek. Jak vzorky DNA tak primery, byly doporučené umístit do 1,5 ml zkumavek.

V případě sekvenace vzorků přímo ve škole, bylo nutné připravit reakční směsi, které byly použity přímo při sekvenční reakci. Vzorky byly připravovány do 0,2 ml tenkostěnných mikrozkušavek. Celkový objem reakční směsi byl 14  $\mu$ l. Ve směsi bylo obsaženo 3,2 - 5 pmol primeru, DNA 5 - 10 ng/100 bp a zbytek objemu byl doplněn ddH<sub>2</sub>O.

Bylo potřeba osekvenovat co nejdelší možný úsek, tedy 800 bp. Proto musela směs obsahovat 40 – 80 ng DNA. Pro lepší výsledek bylo do směsi dáno maximální množství DNA, tedy 80 ng.

**Tab. 4:** Příklad složení reakční směsi na sekvenaci úseku mtDNA úseku cyt b

Vzorek	c(primer)	V(primer)	c(DNA)	V(DNA)	V(ddH <sub>2</sub> O)
121	10,0 pmol/μl	0,5 μl	13,7 ng/μl	5,5 μl	8,0 μl
123	10,0 pmol/μl	0,5 μl	13,5 ng/μl	5,9 μl	7,6 μl
125	10,0 pmol/μl	0,5 μl	30,1 ng/μl	2,6 μl	10,9 μl

### 3.4.5. Vyhodnocení chromatogramu a tvorba alignmentu

Oba zkoumané úseky DNA (mitochondriální i jaderný) byly sekvenovány v obou směrech, pomocí forward i reverse primeru. Původní chromatogramy byly zkontrolovány pro možné chybné přiřazení bází k píkům pomocí programu ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). Díky sekvenaci úseku oběma směry bylo možné případně doplnit chybějící nebo špatně interpretovatelné sekvence z jednoho směru sekvenace z informacemi z druhého směru. Sekvence byly převedeny do formátu FASTA. V programu BioEdit 7.0.0 (Hall, 1999) byly sekvence navázány. Pomocí programu ClustalX 1.81 (Thompson et al., 1997) byly zhotoveny všechny alignmenty. Ty byly ořezány pomocí nástrojového balíčku FaBox (<http://www.birc.au.dk/software/fabox>), aby byla délka všech sekvencí stejná.

### 3.4.6. Fylogenetické analýzy

Pro vyhledávání optimálních fylogenetických stromů byly použity metody maximální úspornosti (MP – Maximum Parsimony), maximální věrohodnosti (ML – Maximum likelihood), distanční metodou (NJ – Neighbor-joining) a metodou Monte Carlo (BA – Bayesovská analýza).

Také byla podle sekvenovaných úseků sestavena haplotypová síť v programech TCS 1.21 (<http://darwin.uvigo.es/software/tcs.html>) a Network 4.600 (<http://www.fluxus-engineering.com>). Vstupní soubory byly ve formátu TCS. Vizualizace vztahů mezi haplotypy byla provedena pomocí metody median-joining. Byly také zjištěny p distance mezi jednotlivými haplotypy pomocí programu PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002), viz tabulka 8.

### Distanční metoda (Neighbor-joining, NJ)

Distanční metoda je další metodou pro rekonstrukci fylogenetických stromů a výpočet délek větví těchto stromů. V každé fázi jsou dva nejbližší uzly stromu vybrány a definovány jako sousedé. Toto je prováděno rekurzivně, dokud nejsou všechny uzly spolu spárovány. Algoritmus byl původně napsán Saitou a Nei, 1987. V roce 1988 byla

provedena jeho korekce Studier a Keppeler.

Opět s pomocí programu PAUP \* 4.0b10 (Swofford, 2002) byly vypočteny a zhotoveny všechny stromy distanční metodou Neighbor-joining (Saitou a Nei, 1987). Použité vzdálenosti byly vypočtené pomocí modelu Jukes – Cantorova. Pro odhad relevantní topologie větví byla použita metoda 10 000 bootstraps pseudoreplicates (Felsenstein, 1985). Rovněž byla použita Kimurova dvouparametrová distance (Kimura, 1980), vzhledem k tomu, že Chí-kvadrát test na homogenitu frekvence bází ,mezi jednotlivými taxony nevyšel statisticky průkazný ( $p = 1,0000$ ).

### **Metoda maximální úspornosti (Maximum parsimony, MP)**

Metoda maximální parsimonie je jedna z nejoblíbenějších metod používaných při rekonstrukci fylogenetických stromů. Zjednodušeně řečeno je tato metoda založena na předpokladu, že "evoluce je parsimoní", nejlépe tedy vstupní alignment vystihuje strom s minimálním počtem evolučních kroků (Jin et al., 2007).

Kritérium MP je úspěšně používáno ke studii evoluce téměř 30 let. Začátkem 90. let Hein (1993) představil rozšíření kritéria MP na model evoluční historie ze souboru sekvencí v přítomnosti rekombinace. V roce 2005 a 2006 Nakleh a kolektiv matematicky formulovali kritéria MP pro fylogenetické sítě a vymysleli výpočetně efektivní řešení (Nakleh et al., 2005; Jin et al., 2006a).

Pro vyhodnocení fylogenetických stromů metodou maximální parsimonie byl použit program PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002). Bylo použito heuristické hledání s 10 000 náhodnými přidáními sekvencí (hsearch nreps = 1000 addseq = random swap=TBR). Podpora jednotlivých nodů byla vyhodnocena užitím 10 000 (bootstrap nreps = 10 000) pseudoreplikací (Felsenstein, 1985).

### **Metoda maximální věrohodnosti (Maximum likelihood, ML)**

Další z používaných kritérií je, jedno z nejpřesnějších a běžně používaných kritérií pro rekonstrukci fylogenetických stromů, metoda maximální věrohodnosti (ML) (Felsenstein, 1981). Stručně řečeno toto kritérium z hlediska pravděpodobnosti považuje fylogenetický strom jako generativní model a hledá model (tj. strom), který maximalizuje pravděpodobnost pozorování daného souboru sekvencí na listy stromu (Jin et al., 2006b).

Nejprve byl v programu Modeltest 3.7 (Posada a Crandall, 1998) heirarchickým testem zvolen vhodný evoluční model pro sledované sekvence mtDNA. Tento model byl přidán do vstupního souboru dat pro výpočet fylogenetického stromu. Při této metodě byl rovněž

použit program PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002). Bylo zadáno heuristické vyhledávání s 1000 náhodně přidanými sekvencemi (hsearch addseq=random nrep=1000 swap=TBR). Počet zadaných pseudoreplikací byl 1000 (bootstrap=1000).

### **Bayesovská analýza (Bayesian analysis, BA)**

Bayesovská analýza je metoda založená na vyhledávání nejvhodnějších stromů pomocí Markov chain Monte Carlo algoritmu (Larget & Simon 1999). Tato analýza byla počítána pomocí programu MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Nejprve ale byly opět v programu Modeltest 3.7 (Posada a Crandall, 1998) vybrány vhodné evoluční modely a obdobně jako u metody ML byly dodány do vstupního souboru. Byly použity příkazy: lset applyto=(1) nst=6 Rates=equal; lset applyto=(2) nst=6 Rates=equal; lset applyto=(3) nst=6 Rates=equal; unlink revmat=(all) statefreq=(all) shape=(all) pinvar=(all); prset ratepr=variable; mcmc ngen=10000000 printfreq=100 samplefreq=100 nchains=4 savebrlens=yes. Pro odstranění prvních 1 500 000 generací a pro vytvoření konsenzuálního stromu byl zadán příkaz: sumt filename=BAOrlitie burnin=15000 contype=allcompat.

### **Grafická úprava stromů**

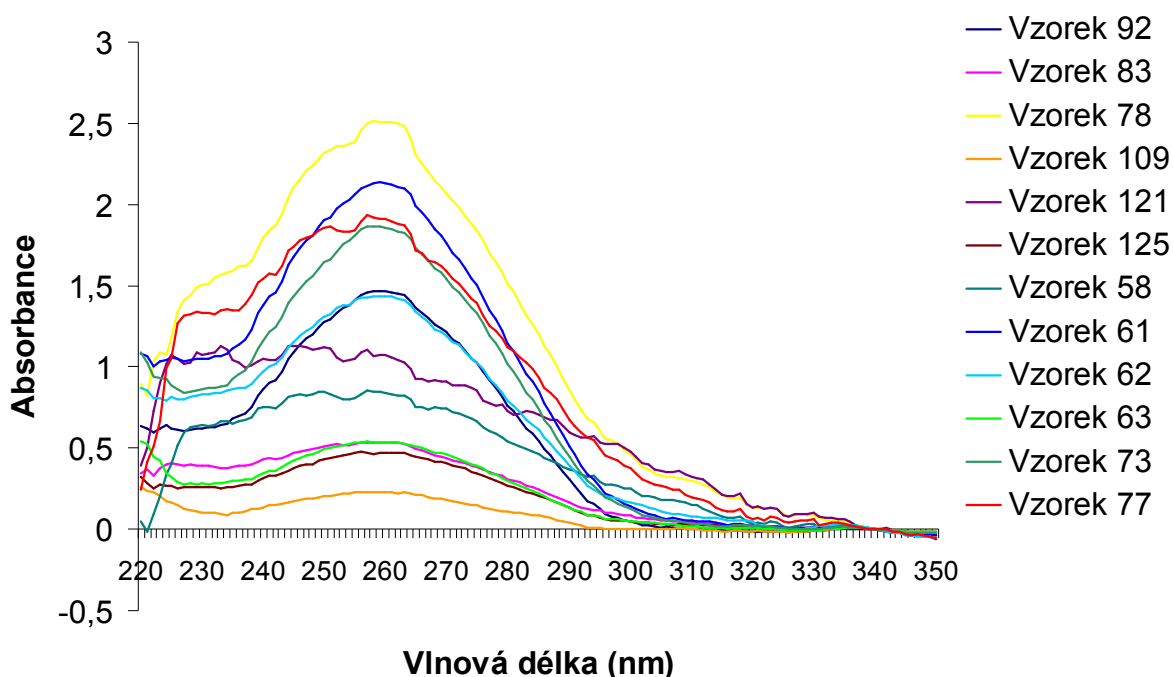
Všechny fylogenetické stromy, které byly získány výše uvedenými metodami, byly zobrazovány pomocí programu TreeView 1.6.6 (Page, 1996) a upravovány byly v programech Microsoft Office PowerPoint 2003, Malování 5.1 a Corel Draw 8.0.

## 4. Výsledky

### 4.1. Izolace DNA a následné měření koncentrace DNA

Koncentrace izolované genomické DNA byla měřena v oblasti UV/VIS v rozmezí vlnových délek 220 nm až 350 nm. Jako blank byla použita ddH<sub>2</sub>O.

Získané křivky by měly správně obsahovat maxima při vlnové délce 260 nm (při této vlnové délce absorbuje DNA). V případě, že tomu tak nebylo, bylo pravděpodobné, že byl vzorek kontaminován nežádoucí chemikálií.



**Obr. 9:** Graf ukazující křivky získané při měřeních koncentrace DNA (měření koncentrace úseku nuDNA genu pro R35)

Izolace DNA neproběhla u některých vzorků úspěšně. Důvodem tohoto neúspěchu byly špatně konzervované vzorky, které byly několik let staré. Koncentrace templátové DNA úspěšně izolovaných vzorků jsou uvedeny v tabulce 5.

**Tab. 5:** Přehled změřených koncentrací

Označení	c(templát. DNA)	c(PCR produktu cyt b)	c(PCR produktu R35)
29	12.1 ng/μl	55,4 ng/μl	13,6 ng/μl
30	42.3 ng/μl	121,3 ng/μl	39,3 ng/μl
31	10.1 ng/μl	76,2 ng/μl	

47	5.3 ng/μl	36,0 ng/μl	
48	neúspěšná izolace	-----	
58	5.5 ng/μl	41,4 ng/μl	41,9 ng/μl
59	9.5 ng/μl	66,5 ng/μl	20,0 ng/μl
60	35.4 ng/μl	126,4 ng/μl	72,1 ng/μl
61	62.7 ng/μl	127,9 ng/μl	106,6 ng/μl
62	4.7 ng/μl	112,6 ng/μl	71,7 ng/μl
63	9.0 ng/μl	88,6 ng/μl	26,7 ng/μl
64	8.1 ng/μl	54,5 ng/μl	
65	12.6 ng/μl	63,5 ng/μl	10,8 ng/μl
66	46.5 ng/μl	108,2 ng/μl	
67	36.6 ng/μl	155,5 ng/μl	
68	19.9 ng/μl	94,7 ng/μl	
69	25.9 ng/μl	188,1 ng/μl	
70	2.2 ng/μl	13,1 ng/μl	
71	11.2 ng/μl	155,4 ng/μl	
72	6.1 ng/μl	84,7 ng/μl	
73	19.9 ng/μl	120,2 ng/μl	92,2 ng/μl
74	16.7 ng/μl	118,6 ng/μl	
75	50.0 ng/μl	109,6 ng/μl	
76	9.0 ng/μl	90,4 ng/μl	
77	53.1 ng/μl	128,3 ng/μl	95,5 ng/μl
78	77.7 ng/μl	105,9 ng/μl	125,5 ng/μl
79	97.3 ng/μl	129,6 ng/μl	72,3 ng/μl
80	25.8 ng/μl	89,0 ng/μl	
81	50.6 ng/μl	106,4 ng/μl	
82	56.5 ng/μl	133,7 ng/μl	
83	112.1 ng/μl	85,7 ng/μl	26,7 ng/μl
84	35.5 ng/μl	121,5 ng/μl	
85	56.3 ng/μl	91,4 ng/μl	
86	30.7 ng/μl	106,3 ng/μl	
87	39.5 ng/μl	95,4 ng/μl	
88	12.5 ng/μl	83,1 ng/μl	
89	13.0 ng/μl	92,0 ng/μl	
90	10.7 ng/μl	81,6 ng/μl	
91	32,1 ng/μl	126,0 ng/μl	
92	35,3 ng/μl	112,3 ng/μl	73,2 ng/μl
93	10,6 ng/μl	120,1 ng/μl	
94	7,0 ng/μl	74,6 ng/μl	
95	9,5 ng/μl	100,9 ng/μl	
96	10,7 ng/μl	229,8 ng/μl	
97	9,1 ng/μl	41,7 ng/μl	
98	107,0 ng/μl	87,1 ng/μl	
99	15,8 ng/μl	128,3 ng/μl	
100	6,3 ng/μl	43,4 ng/μl	
101	12,8 ng/μl	134,6 ng/μl	
102	12,9 ng/μl	45,6 ng/μl	
103	28,9 ng/μl	77,9 ng/μl	
104	26,6 ng/μl	62,3 ng/μl	
105	9,6 ng/μl	7,2 ng/μl	



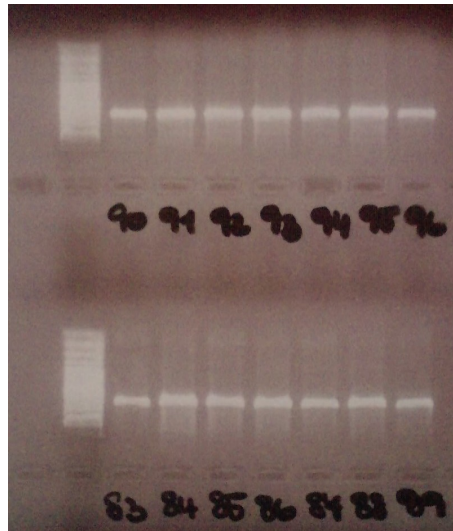
106	19,8 ng/μl	52,2 ng/μl	
107	2,3 ng/μl	19,6 ng/μl	
108	3,4 ng/μl	25,7 ng/μl	
109	4,5 ng/μl	33,7 ng/μl	11,5 ng/μl
110	4,7 ng/μl	18,4 ng/μl	
111	13,1 ng/μl	48,3 ng/μl	
112	10,5 ng/μl	12,7 ng/μl	
113	neúspěšná izolace	-----	
114	neúspěšná izolace	-----	
115	neúspěšná izolace	-----	
116	neúspěšná izolace	-----	
117	neúspěšná izolace	-----	
118	neúspěšná izolace	-----	
119	neúspěšná izolace	-----	
120	neúspěšná izolace	-----	
121	8,2 ng/μl	13,7 ng/μl	53,3 ng/μl
122	8,6 ng/μl		
123	5,8 ng/μl	13,5 ng/μl	
124	6,3 ng/μl		
125	12,9 ng/μl	30,1 ng/μl	23,6 ng/μl

#### 4.2. PCR a vizualizace PCR produktů na agarózovém gelu

Amplifikace mtDNA úseku pro cyt b byla u všech izolovaných vzorků úspěšně prováděna při teplotě nasedání primerů 46 °C. Úsek nuDNA pro R35 nebylo nutné amplifikovat u všech vzorků, proto byla tato reakce provedena jen pro jeden vzorek z většiny haplotypů. U nich byly teploty nasedání stanoveny experimentálně. Teploty se pohybovaly v rozpětí 50 °C až 60 °C .

Produkty všech prováděných PCR reakcí byly nanášeny na agarózový gel, elektroforeticky rozděleny a vizualizovány pod UV lampou.

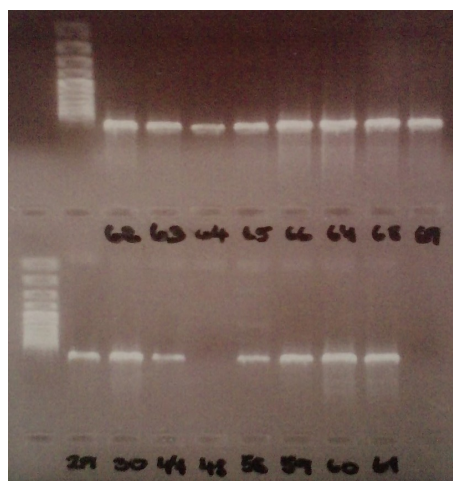
V případě, že PCR produkty vypadaly jako na obr. 10, byly všechny vzorky ihned přečištěny a maximálně do jednoho měsíce odeslány k sekvenaci. V případě, který je vidět na obr. 11, bylo nutné zvýšit teplotu nasedání primerů. V posledním uvedeném případě (obr. 12) bylo možné některé vzorky dále zpracovávat, ovšem u jiných bylo nutné provést PCR reakci znovu s nižší teplotou nasedání primerů.



**Obr. 10:** Fotografie gelu úspěšně proběhlé PCR reakce u všech vzorků



**Obr. 11:** Gel zobrazující vzorky s velkým počtem vedlejších produktů



**Obr. 12:** Fotografie vzorků gelu, na kterém nevyšly všechny vzorky

### 4.3. Přečištění PCR produktů a měření koncentrace DNA

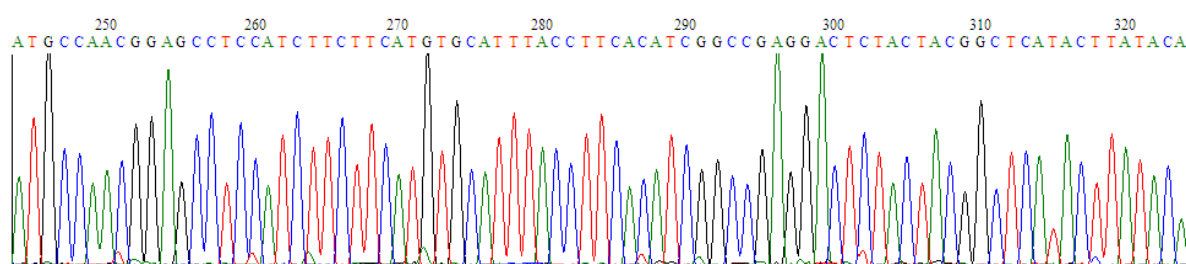
Koncentrace úspěšně amplifikovaných úseků mtDNA i nuDNA, jsou uvedeny u jednotlivých vzorků v tabulce 5.

U vzorků 122 a 124 se nepodařilo optimalizovat podmínky PCR reakce pro úsek mtDNA.

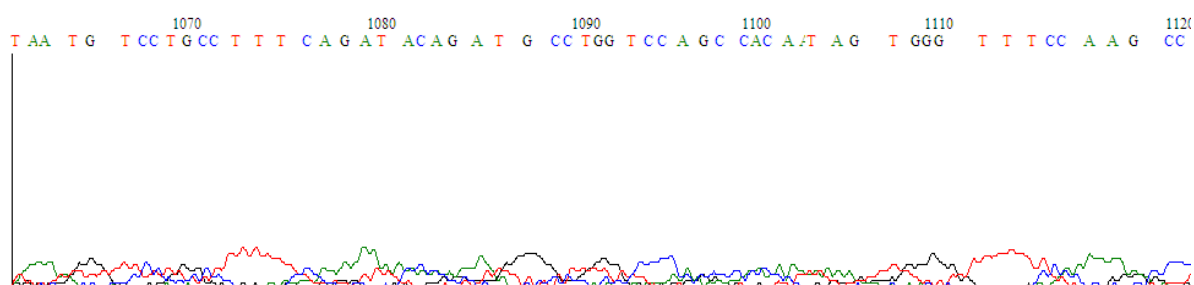
### 4.4. Sekvence DNA

Ze sekvenačních laboratoří byl zaslán email s výsledky. Výsledky byly soubory ukazující chromatogramy a počítačem přiřazené báze k jednotlivým píkům. Nejprve bylo nutné zkontrolovat správnost přiřazení bází, zda nedošlo při automatickém přiřazování k chybě. Poté byly u sekvencí ořezány začátky a konce, kde často dochází ke špatnému nasedání primerů při sekvenační reakci a sekvence jsou tedy nečitelné.

Celkem tedy bylo získáno 62 sekvencí úseku mtDNA pro gen cyt b a 18 sekvencí úseku nuDNA pro gen R35.



**Obr. 13:** Ukázka jasně čitelného úseku sekvenované DNA



**Obr. 14:** Úsek se slabým signálem a nečitelnou sekvencí

Takto přečištěné a ořezané sekvence byly zalignovány. K tomuto alignmentu byly poté přidány sekvence mtDNA pro cyt b jedinců, kteří byli použiti jako outgroupy. Tyto sekvence byly staženy z databáze GenBank. Sekvence alignmentu a sekvence outgroup byly ořezány na stejnou délku.

Tento soubor byl použit jako vstupní data pro všechny fylogenetické analýzy s výjimkou haplotypové sítě. V tomto případě byl jako vstupní soubor použit alignment bez sekvencí outgroup.

**Tab. 6:** Sekvence použité jako outgroupy

<b>Druh</b>	<b>Délka sekvence</b>	<b>GenBank (Accession no.)</b>	<b>Citace</b>
<i>Geoemyda japonica</i>	1140 bp	AY434602.1	(Spinks et al., 2004)
<i>Geoemyda splengleri</i>	1140 bp	AY434586.1	(Spinks et al., 2004)
<i>Malayemys subtrijugata</i>	1140 bp	AY434591.1	(Spinks et al., 2004)
<i>Malayemys subtrijugata</i>	1135 bp	AJ519502.1	(Barth et al., 2003)

#### 4.5. Analýza mtDNA genu pro cyt b

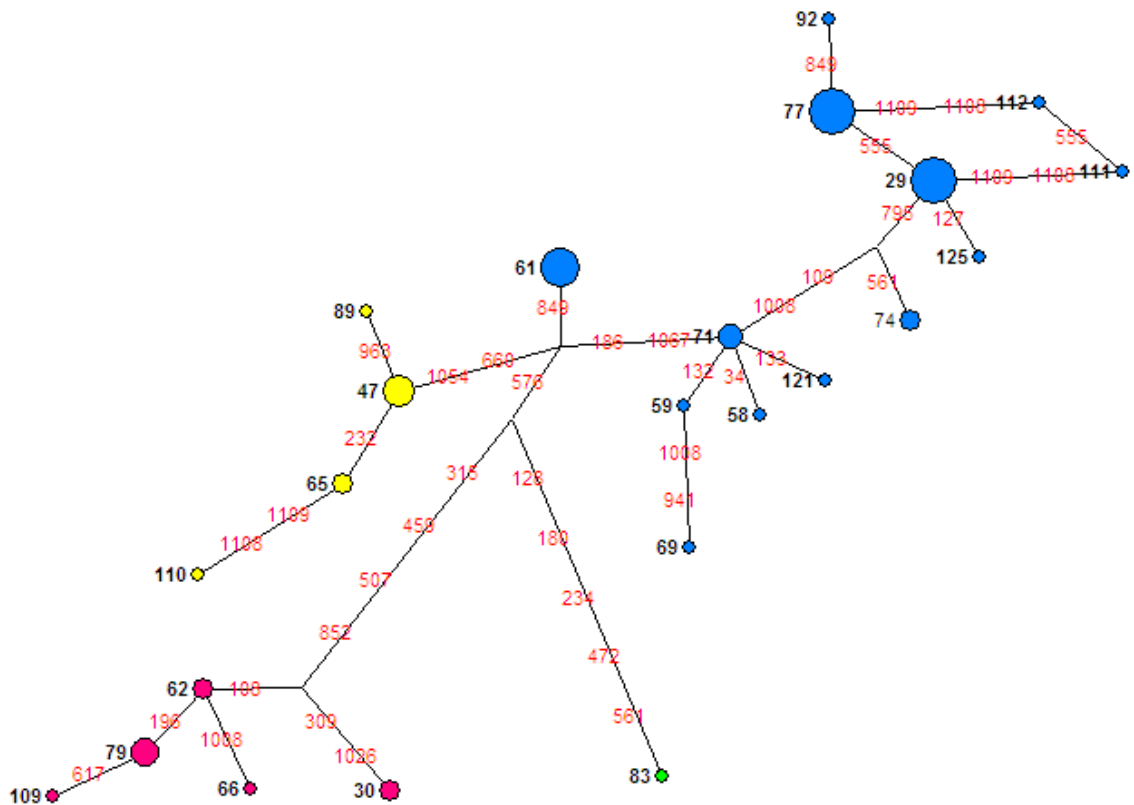
Analýzou 1119 bp dlouhého úseku mtDNA pro gen cyt b u 62 vzorků bylo získáno 23 odlišných haplotypů. Ze všech vzorků byl vytvořen alignment, který byl dále použit k vytváření haplotypových sítí. V tomto alignmentu bylo 35 variabilních míst (3,13%).

**Tab. 7:** Rozdělení vzorků do haplotypů

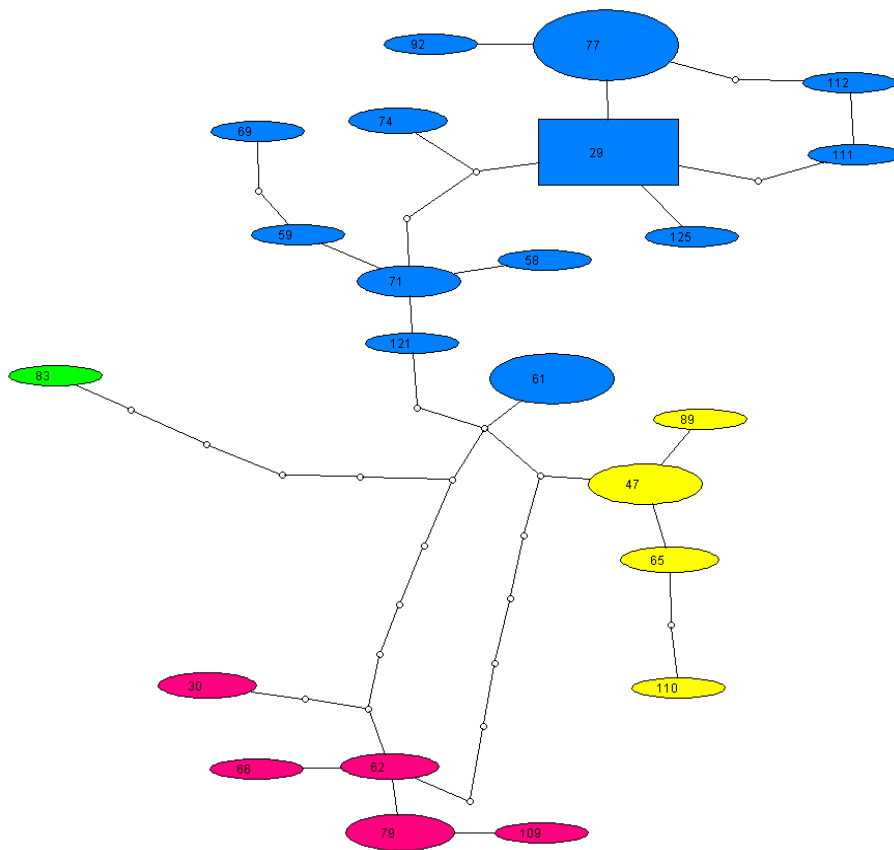
<b>Číslo haplotypu</b>	<b>Vzorek označující haplotyp</b>	<b>Počet sekvencí v haplotypu</b>	<b>Délka haplotypu (bp)</b>	<b>Sekvence vzorků patřících do haplotypu</b>
1	29	10	1119	29 31 60 70 72 76 95 97 98 107
2	30	2	1119	30 90
3	58	1	1119	58
4	59	1	1119	59
5	61	7	1119	61 75 88 99 103 104 108

6	62	2	1119	62 68
7	47	5	1119	47 63 64 67 84
8	65	2	1119	65 73
9	66	1	1119	66
10	69	1	1119	69
11	71	3	1119	71 81 96
12	74	2	1119	74 78
13	77	11	1119	77 80 82 86 87 91 94 100 101 102 123
14	79	4	1119	79 85 93 106
15	83	1	1119	83
16	89	1	1119	89
17	92	1	1119	92
18	109	1	1119	109
19	110	1	1119	110
20	111	1	1119	111
21	112	1	1119	112
22	121	1	1119	121
23	125	1	1119	125

Pomocí online nástrojového balíčku FaBox, který slouží pro práci se sekvencemi ve FASTA formátu, bylo formálně nalezeno 24 haplotypů. Vzorek 47 byl shodný s haplotypem 7, avšak lišil se přítomností tří nukleotidů, pozice 453, 852, 883, které nebyly čitelné. Dále jsme proto pracovali jen s 23 haplotypy.



**Obr. 15:** Haplotypová síť vytvořená pomocí programu Network 4.6.0.0 (Median-joining)



**Obr. 16:** Haplotypová síť vytvořená v programu TCS 1.21 (gaps=missing)

Získané haplotypové sítě se navzájem až na detaily shodují a umožňují vymezit čtyři haplotypové skupiny, které jsou v haplotypových sítích barevně odlišeny. Skupina jedna je označena růžovou barvou, skupina 2 zelenou, skupina 3 žlutou a skupina 4 modrou. Nejvíce se odlišuje haplotypová skupina 1 (haplotypy 30, 62, 66, 79, 109; 10 jedinců) a skupina 2 zastoupená jediným haplotypem i jedincem s číslem 83. Do haplotypové skupiny 3 spadají následující haplotypy 47, 65, 89 a 110 (9 jedinců). Nejvíce je zastoupena skupina 4, do které spadají zbylé haplotypy číslo 29, 58, 59, 61, 69, 71, 72, 92, 111, 112, 121 a 125 (42 jedinců). Posledně jmenovaná skupina odpovídá logice haplotypových sítí, z hlediska fylogenetických metod je však vymezena převážně negativně a jako celek není statisticky podpořena (viz níže).

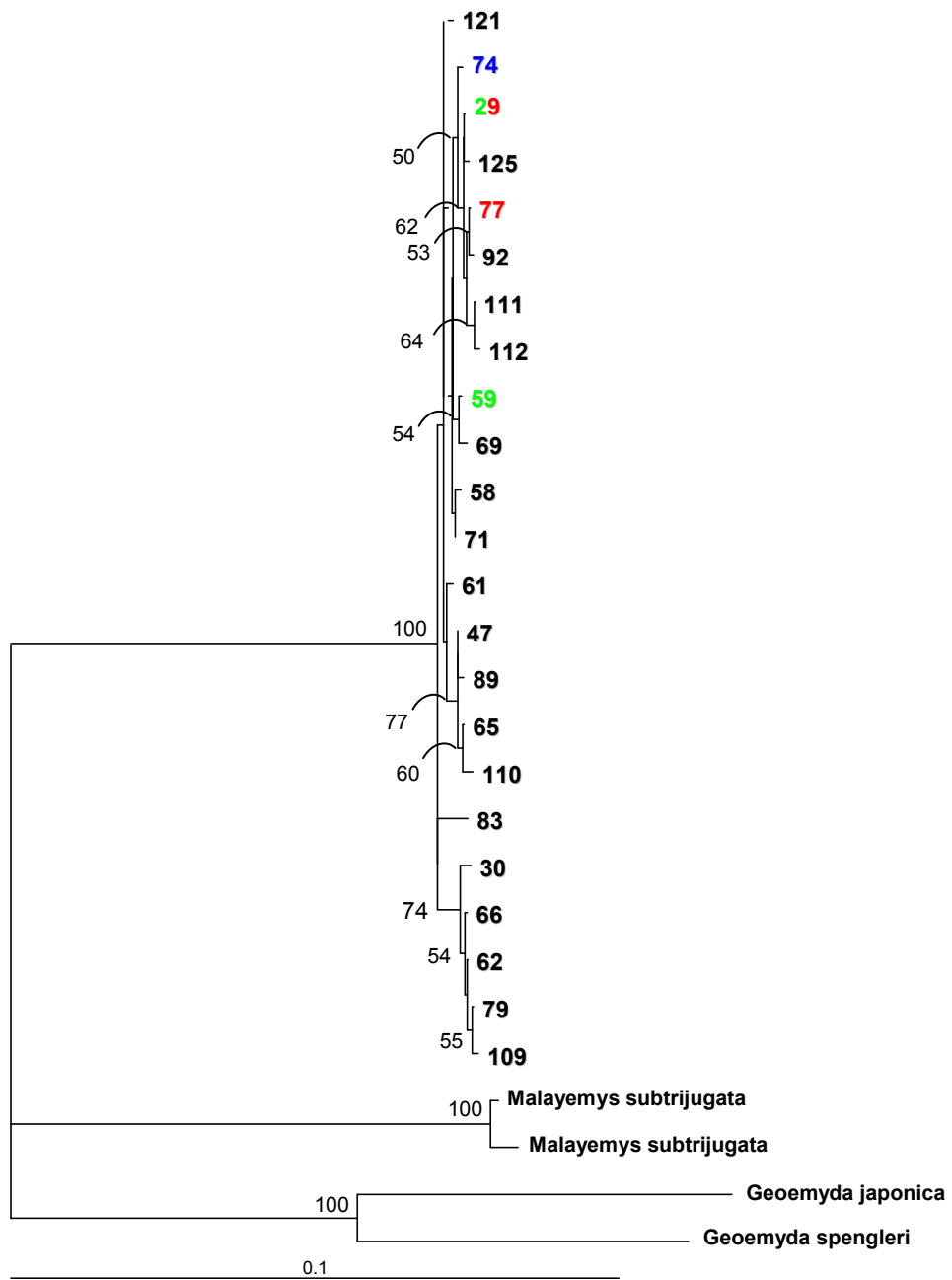
**Tab. 8:** Přehled hodnot pro nekorigované p distance mezi všemi 23 haplotypy (H vyjadřuje název haplotypu)

	H	1	2	3	4	5	6	7	8
1	29	-							
2	30	0,01072	-						
3	47	0,00627	0,00718	-					
4	58	0,00357	0,00894	0,00448	-				
5	59	0,00357	0,00894	0,00448	0,00179	-			
6	61	0,00536	0,00715	0,0027	0,00357	0,00357	-		
7	62	0,00983	0,00268	0,00628	0,00804	0,00804	0,00626	-	
8	65	0,00715	0,00894	0,00089	0,00536	0,00536	0,00357	0,00804	-
9	66	0,00894	0,00357	0,00718	0,00894	0,00894	0,00715	0,00089	0,00894
10	69	0,00357	0,01072	0,00628	0,00357	0,00179	0,00536	0,00983	0,00715
11	71	0,00268	0,00804	0,00359	0,00089	0,00089	0,00268	0,00715	0,00447
12	74	0,00179	0,01072	0,00627	0,00357	0,00357	0,00536	0,00983	0,00715
13	77	0,00089	0,01162	0,00716	0,00447	0,00447	0,00626	0,01072	0,00804
14	79	0,01072	0,00357	0,00718	0,00894	0,00894	0,00715	0,00089	0,00894
15	83	0,00983	0,00983	0,00718	0,00804	0,00804	0,00626	0,00894	0,00804
16	89	0,00715	0,00894	0,00089	0,00536	0,00536	0,00357	0,00804	0,00179
17	92	0,00179	0,01251	0,00806	0,00536	0,00536	0,00536	0,01162	0,00894
18	109	0,01251	0,00454	0,00908	0,01139	0,01133	0,01025	0,00226	0,01139
19	110	0,00894	0,01072	0,00268	0,00715	0,00715	0,00536	0,00983	0,00179
20	111	0,00179	0,01251	0,00806	0,00536	0,00536	0,00715	0,01162	0,00894
21	112	0,00268	0,01340	0,00895	0,00626	0,00626	0,00804	0,01251	0,00983
22	125	0,00089	0,01162	0,00716	0,00447	0,00447	0,00626	0,01072	0,00804
23	121	0,00412	0,00914	0,00307	0,00205	0,00204	0,00307	0,00812	0,00409

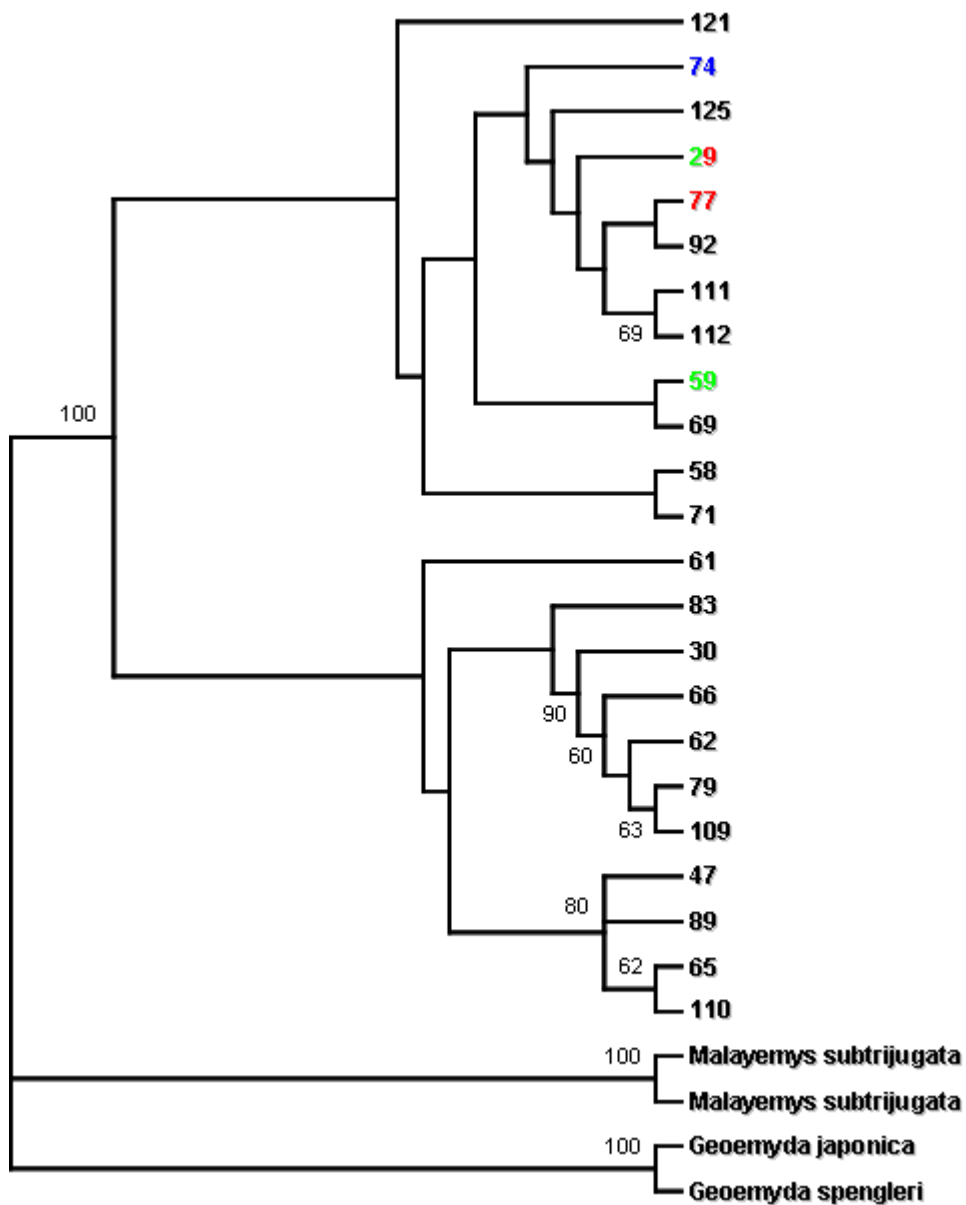
	H	9	10	11	12	13	14	15	16
1	29								
2	30								
3	47								
4	58								
5	59								
6	61								
7	62								
8	65								
9	66	-							
10	69	0,00894	-						
11	71	0,00804	0,00268	-					
12	74	0,00894	0,00357	0,00268	-				
13	77	0,00983	0,00447	0,00357	0,00268	-			
14	79	0,00179	0,01072	0,00804	0,01072	0,01162	-		
15	83	0,00983	0,00983	0,00715	0,00804	0,01072	0,00983	-	
16	89	0,00894	0,00715	0,00447	0,00715	0,00804	0,00894	0,00804	-
17	92	0,01072	0,00536	0,00447	0,00357	0,00089	0,01251	0,01162	0,00894
18	109	0,00225	0,01130	0,01020	0,01251	0,01370	0,00119	0,01369	0,01021
19	110	0,01072	0,00894	0,00626	0,00894	0,00983	0,01072	0,00983	0,00357
20	111	0,01072	0,00536	0,00447	0,00357	0,00268	0,01251	0,01162	0,00894
21	112	0,01162	0,00626	0,00536	0,00447	0,00179	0,01340	0,01251	0,00983
22	125	0,00983	0,00447	0,00357	0,00268	0,00179	0,01162	0,01072	0,00804
23	121	0,00916	0,00409	0,00102	0,00412	0,00515	0,00916	0,00813	0,00408

	H	17	18	19	20	21	22	23
1	29							
2	30							
3	47							
4	58							
5	59							
6	61							
7	62							
8	65							
9	66							
10	69							
11	71							
12	74							
13	77							
14	79							
15	83							
16	89							
17	92	-						
18	109	0,01489	-					
19	110	0,01072	0,01139	-				
20	111	0,00357	0,01251	0,00715	-			
21	112	0,00268	0,01370	0,00804	0,00089	-		
22	125	0,00268	0,01371	0,00983	0,00268	0,00357	-	
23	121	0,00619	0,01234	0,00409	0,00412	0,00515	0,00515	-

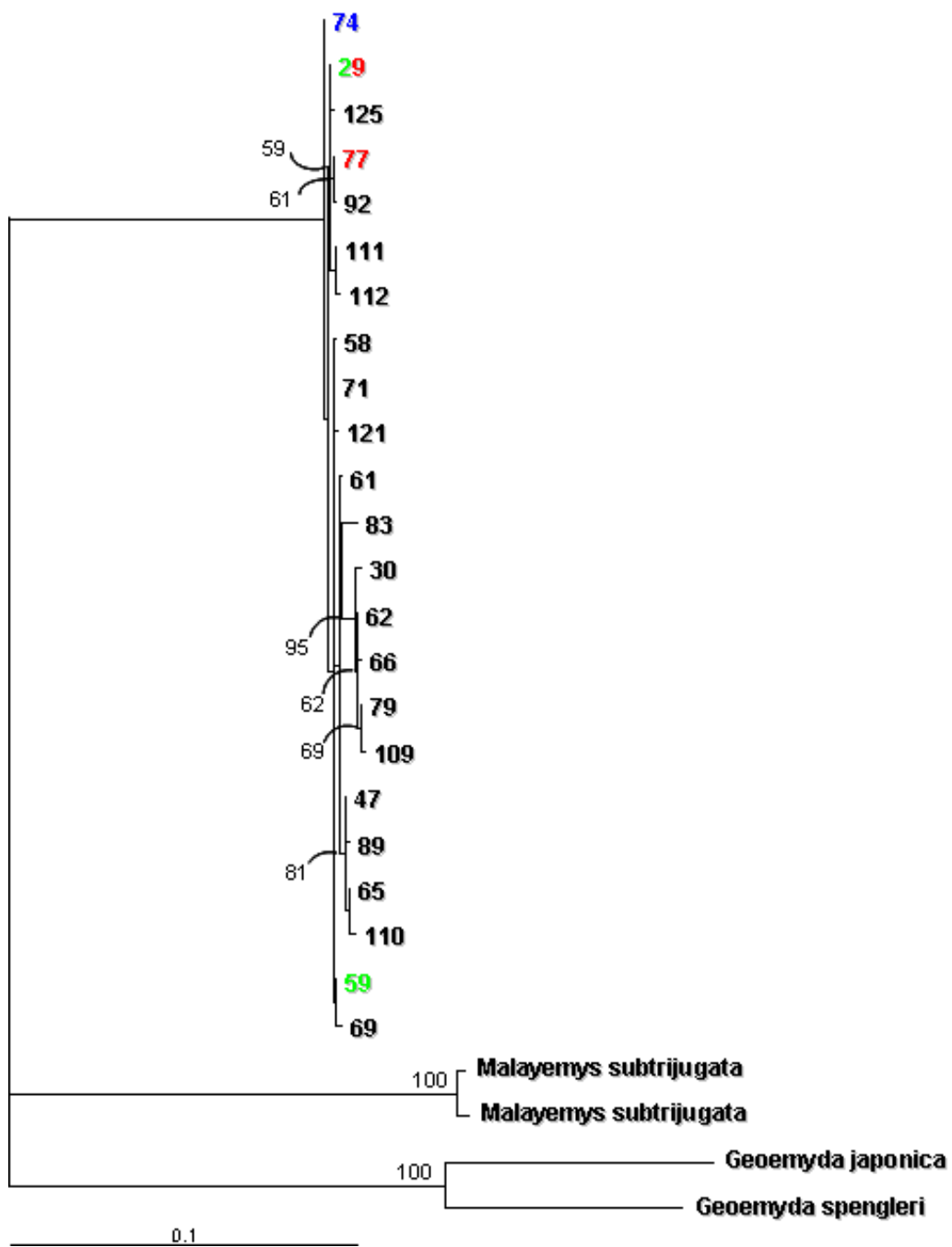




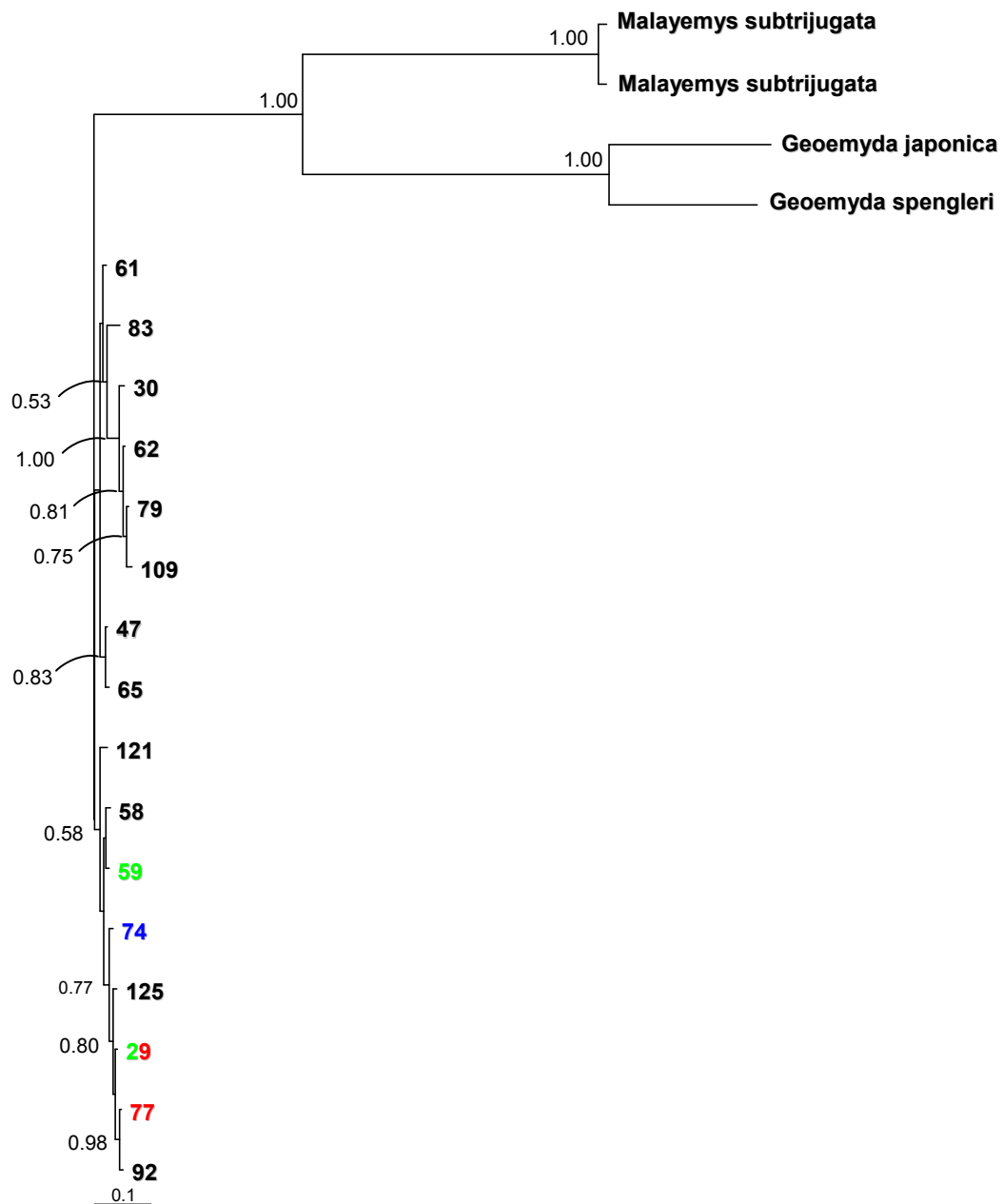
**Obr. 17:** Fylogenetický strom sestavený metodou NJ (čísla udávají hodnoty bootstrapu, zobrazeny pouze hodnoty vyšší než 50)



**Obr. 18:** Fylogenetický strom sestavený metodou MP (čísla udávají hodnoty bootstrapu, zobrazeny pouze bootstrapy s hodnotou vyšší než 50)



**Obr. 19:** Fylogenetický strom sestavený metodou ML (čísla udávají hodnoty bootstrapu, zobrazeny pouze hodnoty vyšší než 50)



**Obr. 20:** Fylogenetický strom sestavený metodou Bayesovské analýzy (čísla ukazují hodnoty posteriorních pravděpodobností správné topologie, zobrazeny pouze hodnoty vyšší než 0,5)

Všechny fylogenetické metody se shodují v tom, že dobře podpořeny jsou haplotypové skupiny 3 (bootstrapy NJ: 77%; MP: 80%; ML 81%; avšak BA tuto skupinu nepodporuje) a 1 (bootstrapy NJ: 74%; MP: 90%; ML: 95%; posteriorní pravděpodobnost BA:1,00). Haplotypová skupina 4 zůstala ve většině případů nepodpořená. NJ a MP vedou k topologii s monofyletickou skupinou tvořenou haploskupinou 4 bez haplotypu 61, avšak i tato skupina postrádá statistickou podporu (bootstrapy ML < 50%, MP = 35%). Haplotyp 61 se řadí jako sesterský skupině 3 (NJ) nebo kladu tvořeného skupinami 1,2 a 3 (MP) avšak ani tato pozice není podpořena. ML a BA řadí haplotypy ze skupiny 4 jako více samostatných větví na bázi stromu *O.borneensis*, skupina 4 je tak v těchto analýzách vzhledem k ostatním skupinám parafyletická..

### Demografické charakteristiky

Parametry pro různým způsobem upravená sekvenční data cyt b u druhu *O. borneensis* byly vypočítány programem DnaSP V5 (Rozas et al. 2003) a jsou uvedeny v tabulce 9. Vysoká haplotypová diverzita a současná nízká nukleotidová diverzita, stejně jako vyšší hodnoty expanzního koeficientu jakožto i hodnoty dalších charakteristik naznačují možnost, že zkoumaná populace prošla nedávnou expanzí. Nicméně žádná z testových statistik není průkazná ( $P > 0,10$ ).

**Tab. 9:** Sekvenční polymorfismus a demografické charakteristiky populace *O. borneensis* na základě sekvencí mtDNA úseku pro gen cyt b. Výsledky všech testů populační expanze (resp. selekce) jsou statisticky neprůkazné ( $P > 0,10$ ). Vysvětlivky: N – počet jedinců, S – počet segregáčních míst,  $N_h$  – počet haplotypů, h – haplotypová diverzita,  $\pi$  – nukleotidová diverzita, exp – expanzní koeficient.

	N	S	$N_h$	h	$\pi$	Fu & Li's $F^*$	Fu & Li's $D^*$	Fu's $F_s$	Tajima's $D$	Exp
<i>O.b.</i> ( s gapy)	61	24	17	0,904	0,00552	-0,91062	-0,95161	-2,523	-0,43303	5,422503
<i>O.b.</i> (bez 109,121)	59	30	21	0,916	0,00529	-0,42756	-0,40581	-3,592	-0,27646	5,077861
<i>O.b.</i> (doplňené sekvence)	61	32	23	0,921	0,00539	-0,79751	-0,82924	-4,835	-0,39203	5,320918

#### 4.6. Struktura R35 úseku

Byl sestaven alignment ze šestnácti sekvencí získaných vybraných jedinců, nositelů různých mitochondriálních haplotypů. V tomto aligmentu byly nalezeny tři unikátní mutace. První byla na pozici 502 (T→C), druhá na pozici 573 (A→G) a třetí na pozici 846 (A→G). Z důvodu nízkého počtu mutací nemělo smysl sestavovat fylogenetické stromy. Nositelé mutantních R35 jsou bez výjimky jedinci s mitochondriálním genomem patřícím k haplotypové skupině 4 a jsou barevně odlišeni ve fylogenetických mtDNA stromech. Mutace na pozici 502 (zeleně) u nositelů haplotypu 29 a 59; mutace na pozici 573 (modře) u vzorku 78 (haplotyp 74), na pozici 846 (červeně) u haplotypu a vzorku 77 a dále vzorku 60 (haplotyp 29).

## 5. Diskuze

Celkově je jasné, že sekvence cyt b jsou velmi podobné, divergence je výrazně menší než bylo lze očekávat, pokud by zkoumaný druh byl rozlišen na vznikající poddruhy či dokonce druhy. Standardní substituční rychlost evoluce genu pro cytochrom b je u savců odhadována na 2 % za milión let (Brown et al., 1997). Rozdíly mezi těmito sekvencemi *O.borneensis* zjištěné v této práci činí nejvýše 1,5 % (nekorigované p distance viz tab. 8). Při použití savčího odhadu lze dedukovat, že nejstarší divergence mezi haplotypy je zjevně pleistocénního stáří. Můžeme sice namítnout, že velké želvy mohou vzhledem k dlouhé generační době vykazovat nižší substituční rychlosti, ale i konzervativnější odhady substituční rychlosti spíše svědčí ve prospěch pleistocénní datace nabízející souvislost s přírodními procesy doprovázejícími glaciální poklesy hladiny oceánu.

Počet sekvenovaných jedinců je sice poměrně vysoký, otázkou ovšem zůstává, na kolik bylo provedené vzorkování populací *Orlitia borneensis* dostatečně reprezentativní. Všichni vzorkovaní jedinci byli zjevně původně odchyceni v přírodě a nepocházejí tedy z odchovů v lidské péči, u drtivé většiny z nich však lokalita odchyty zůstává neznámá. Je však málo pravděpodobné, že by všichni studovaní jedinci pocházeli z odchytů z jedné oblasti. Většina zvířat chovaných v evropských zoologických zahradách a tudíž i našich vzorků sice pochází z Hongkongského konfiskátu z roku 2001, ten ovšem sám o sobě obsahoval příliš mnoho jedinců na to, aby mohli být odchyceni v jediné oblasti, mnohem spíše byli shromážděni sítí překupníků z různých lokalit Sumatry, Bornea a možná i Malajského poloostrova. Z tohoto pohledu jsou významná zvířata ze zoo Drážďany (vzorek 62, haplotyp 62, haplotypová skupina 1 a vzorek 63, haplotyp 47, haplotypová skupina 3), která pocházejí z nezávislého dovozu. Navíc byly tři vzorky získány přímo z Indonésie a to dva prokazatelně ze známé lokality na západě Bornea (vzorky číslo 59, haplotyp 59 a vzorek 60, haplotyp 29, oba patřící do haplotypové skupiny 4; lokalita viz mapa Obr. 8) a jeden vzorek pravděpodobně ze Sumatry (vzorek číslo 58, haplotyp 58 a haplotypová skupina 4). Všechny lokalizované vzorky patří k haplotypům, které se buď přímo a nebo s malými modifikacemi vyskytují ve vzorcích z Hongkongského konfiskátu, což svědčí buď ve prospěch původu konfiskovaných jedinců ze stejné oblasti Indonésie, nebo pro domněnku, že populace *O. borneensis* přinejmenším v rozsáhlých oblastech Sumatry a Bornea (soubor vzorků neobsahuje jedince s prokazatelným původem z Malajského poloostrova) je geneticky málo diversifikovaná. V kontextu všech informací se hypotéza o nízké genetické diverzitě *O. borneensis* jeví jako přijatelnější. Svědčí pro to jak nedávná

geografická historie zahrnující propojení povodí Sumatry, Bornea a Malajského poloostrova v době glaciálních maxim během pleistocénu, a také analogická fylogeografická historie populací některých dalších (ale nikoli všech) živočišných druhů (viz níže). Pro vyřešení tohoto problému je však bezpodmínečně nutné získat větší počet lokalizovaných vzorků a to i z území Malajsie.

Fylogenetická struktura haplotypů není příliš zřetelná a statistickou podporu mají pouze dvě odvozené haplotypové skupiny. Tento výsledek je ovšem do značné míry způsoben již samotnou nízkou sekvenční divergencí. Celkový pattern haplotypové sítě není výrazně hvězdicovitý. Případnou nedávnou expanzi či selekci nelze vyloučit, vypočítané popisné statistiky ji sice naznačují, avšak tato hypotéza nemá statisticky významnou podporu.

Nejblíže příbuzným druhem z čeledi Geoemydidae, u kterého bylo sekvenováno větší množství vzorků, je *Cuora trifasciata*. Ve srovnání s *O. borneensis* je variabilita mtDNA úseku genu pro cyt b i nuDNA úseku genu pro R35 větší a obsahuje v obou úsecích zhruba třikrát více mutací. Divergence nuDNA úseku pro R35 je u *O. borneensis* menší než u *C. trifasciata* a v zásadě to znamená, že u *O. borneensis* není žádné hlubší rozdělení než haplotypové.

U *O. borneensis* by se vzhledem k jejímu přirozenému prostředí dalo předpokládat obdobné rozdělení jako u ryb druhu *Hemibagrus nemurus* (Dodson et al., 1995), kde jsou oblasti JV Asie geneticky odlišeny na čtyři skupiny. Jedna z těchto skupiny se vyskytuje ve střední části Sumatry a na západě Bornea. Lokalizované vzorky ze Sumatry i ze západního Bornea spadají do stejné haplotypové skupiny, což jen potvrzuje domněnku tohoto způsobu šíření. Zároveň se u ryb objevuje odlišení pevninských populací od ostrovních (druh *Barbodes gonionotus*), což bohužel vzhledem k absenci lokalizovaného vzorku z Malajského poloostrova není možné u *O. borneensis* ani potvrdit ani vyvrátit. Nikde v literatuře však není zmínka o morfologické odlišnosti populací žijících a Malajském poloostrově.

Populace *O. borneensis* z evropských chovů nemusí být rozděleny do více konzervačních jednotek, vzhledem k tomu že struktura populace je velmi malá. U evropských zvířat bylo zjištěno mnoho mtDNA haplotypů a je tedy zřejmé, že nepochází z jedné linie, avšak diverzita jednotlivých haplotypových skupin je mělká. Z toho lze soudit, že s nimi můžeme bez problémů zacházet jako s jednou konzervační jednotkou.

Tyto závěry jsou podpořeny i výsledky analýzy jaderného úseku DNA genu pro R35. Divergence mezi jednotlivými sekvencemi svědčí pro totéž jako mitochondriální genom a



nevzbuzují žádné pochybnosti.

## 6. Závěr

Výsledky této diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

- Podařilo zpracovat poměrně vysoký počet jedinců *O. borneensis* z evropských chovů.
- Bylo zjištěno 23 velmi málo se lišících haplotypů. Vzorky se známým původem se začlenily do haplotypů, které byly tvořeny jedinci z evropské populace.
- Ze zjištěné nízké genetické variability i fylogenetické struktury vyplývá, že není nutné držet evropskou populaci *O. borneensis* jako více konzervačních jednotek.

## 7. Použitá literatura

1. Altherr, S.; Freyer, D. (2000). The decline of Asian turtles. Pro Wildlife, Munich, Germany, 23 pp.
2. Beaufort, L.F. De (1951). Zoogeography of the land and inland waters. 208 pp. Sidgwick and Jackson, London.
3. Beebee, T.J.C.; Griffiths, R.A. (2005). The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biological Conservation* 125: 271–285
4. Biswas, B. (1973). Quaternary changes in sea-level in the South China Sea. *Bulletin of the Geological Society of Malaysia*, 6, 229–256.
5. Brown, W.M.; George, M.; Wilson, C.A. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1967–1971
6. Buckley-Beason, V.A.; Johnson, W.E.; Nash, W.G.; Stanyon, R.; Menninger, J.C.; Driscoll, C.A.; Howard, J.G.; Bush, M.; Page, J.E.; Roelke, M.E.; Stone, G.; Martelli, P.P.; Wen, C.; Ling, L.; Duraisingam, R.K.; Lam, P.V.; O'Brien, S.J. (2006). Molecular evidence for species-level distinctions in clouded leopards. *Curr Biol*, 16:2371-2376.
7. CITES species database. Dostupné z URL:  
<<http://www.cites.org/eng/resources/species.html> >
8. Clutton-Brock, T.H.; Parker, G. A. (1992). Potential reproductive rates and the operation of sexual selection. *Quarterly Review of Biology* 67, 437–456.
9. Corbett, G.B.; Hill, J.E. (1992). Family Felidae – Cats. In *The Mammals of the Indo-Malayan Region: A systematic review* Oxford University Press for British Museum (Natural History), London; 219-228.
10. Darlington, P. J. (1957). *Zoogeography: the geographical distribution of animals*. Wiley, New York.
11. van Dijk, P.P. (2000). The status of turtles in Asia. In *Asian Turtle Trade: Proceedings of a Workshop on Conservation and Trade of Freshwater Turtles and Tortoises in Asia*, van Dijk PP, Stuart BL, Rhodin AGJ (eds). Chelonian Research Foundation: Lunenburg; 15–23.
12. van Dijk, P.P.; Stuart, B.L.; Rhodin, A.J.G. (2000). Executive summary. In *Asian Turtle Trade: Proceedings of a Workshop on Conservation and Trade of Freshwater Turtles and Tortoises in Asia*, van Dijk PP, Stuart BL, Rhodin AGJ (eds). Chelonian Research Foundation: Lunenburg; 13–14.

13. Dodson, J. J.; Colombani, F.; Ng, P. K. L. (1995). Phylogeographic structure in mitochondrial DNA of a South-east Asian freshwater fish, *Hemibagrus nemurus* (Siluroidei; Bagridae), and Pleistocene sea-level changes on the Sunda shelf. *Mol. Ecol.* 4:331.
14. Donaldson, K. A.; Wilson Jr, R. R. (1999). Amphi-Panamic geminates of snook (Percoidei: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rate in the mitochondrial DNA control region of fishes, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13, 208–213.
15. Emery, K. O.; Nino, H. (1963). Sediments of the Gulf of Thailand and adjacent continental shelf. *Geological Society of America Bulletin*, 74, 541–554.
16. Ernst, C.H.; Barbour, R.W. (1989). *Turtles of the World*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
17. Felsenstein J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*;17:368-376.
18. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogeny: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-789.
19. Fujita, M.K.; Engstrom, T.N.; Starkey, D.E.; Shaffer, H.B. (2004). Turtle phylogeny: insights from a novel nuclear intron. *Molecular phylogenetics and evolution* 31: 1031-1040.
20. Gibbons, J.W.; Scott, D.E.; Ryan, T.J.; Buhlman, K.A.; Tuberville, T.D.; Metts, B.S.; Greene, J.L.; Mill, T.; Leiden, V.; Poppy, S.; Winne, C.T. (2000). The global decline of reptiles, de'ja' vu amphibians. *Bioscience* 50: 653–666.
21. Gong, S.; Chow, A.T.; Fong, J.J.; Shi H. (2009). The chelonian trade in the largest pet market in China: scale, scope and impact on turtle conservation. *Oryx* 43(2), 213-216.
22. Gray, J. E. (1873). On a new freshwater tortoise from Borneo (*Orlitia borneensis*). *Ann. Mag. Natur. Hist. (London)*.
23. Gustiano, R.; Teugels, G.G.; Pouyaud, L. (2001). Revision of the *Pangasius kunyit* catfish complex, with description of two new species from South-East Asia (Siluriformes; Pangasiidae). *Journal of natural history*, 37, 357-376.
24. Hall, R. (1996). Reconstructing Cenozoic SE Asia. In: R Hall, D Blundell, editors. *Tectonic Evolution of Southeast Asia*. London: The Geological Society. p. 153-184.
25. Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor

- and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Series 41: 95-98.
26. Heaney, L. R.; Rickart, E. A. (1990). Correlation of clades and clines: geographic, elevation, and phylogenetic distribution patterns among Philippine mammals. Pp. 321-332 in G. P. a R. Hutterer, ed. Vertebrates in the Tropics. Zool. Forsch. Mus. Alex. Konig, Bonn.
  27. Hein, J. (1993). A heuristic method to reconstruct the history of sequences subject to recombination. J Mol Evol 1993;36:396-405.
  28. Huelsenbeck, J. P.; Ronquist, F. (2001). MRBAYES. Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics 17, 754–755.
  29. Chesner, C.A.; Rose, W.I.; Deino, A.; Drake, R.; Westgate, J.A. (1991). Eruptive History of Earths Largest Quaternary Caldera (Toba, Indonesia) Clarified. Geology 19:200-203.
  30. Cheung, S.M.; Dudgeon, D. (2006). Quantifying the Asian turtle crisis: market surveys in southern China, 2000-2003. Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst. 16: 751-770.
  31. Chong, L.K.; Tan, S.G.; Yusoff, K.; Siraj, S.S. (2000). Identification and characterization of Malaysian river catfish, *Mystus nemurus* (C&V): RAPD and AFLP analysis. Biochemical genetics, 38.
  32. Inger, R. F.; Kong, Ch.P. (1962). The fresh-water fishes of North Borneo. Fieldiana Zoology, 45, 1–268.
  33. Iskandar, D.T. (2000). Turtles and Crocodiles of Insular Southeast Asia and New Guinea. Bandung, Indonesia: PALMedia Citra, 191 pp.
  34. IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. Dostupné z URL <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 22 March 2011.
  35. Iverson, J.B. (1992). A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world. Privately printed, Richmond, IN.
  36. Jensen, K.A.; Das, I. (2008). Cultural exploitation of freshwater turtles in Sarawak, Malaysian Borneo. Chelonian Conservation and Biology 7(2): 281-285.
  37. Jin, G.; Nakhleh, L.; Snir, S.; Tuller, T. (2006a). Forthcoming. Maximum likelihood of phylogenetic networks. Bioinformatics; 22(21):2604-2611.
  38. Jin, G.; Nakhleh, L.; Snir, S.; Tuller, T. (2006b) Maximum likelihood of phylogenetic networks. Bioinformatics 22(21): 2604-2611
  39. Jin, G.; Nakhleh, L.; Snir, S.; Tuller, T. (2007). Inferring Phylogenetic Networks by

- the Maximum Parsimony Criterion: A Case Study. *Mol. Biol. Evol.* 24(1): 324-337.
40. Kamonrat, W.; McConnell, S.K.J.; Cook, D.I. (2002). Polymorphic microsatellite loci from the southeast Asian cyprinid, *Barbodes gonionotus* (Bleeker). *Mol Ecol Notes*, 2(2):89-90.
  41. Kanthaswamy, S.; Kurushima, J.D.; Smith, D.G. (2006). Inferring Pongo conservation units: a perspective based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *Primates* 47:310-321.
  42. Keller, G. H.; Richards, A. F. (1967). Sediments of the Malacca Strait, Southeast Asia. *Journal of Sedimentary Petrology*, 37, 102–127.
  43. Kimura M. (1980). A simple model for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
  44. Knotkova, Z.; Mazanek, S.; Hovorka, M.; Sloboda, M.; Knotek, Z. (2005). Haematology and plasma chemistry of Bornean river turtles suffering from shell necrosis and haemogregarine parasites. *Vet. Med – Czech*, 50(9): 421-426.
  45. Kottelat, M.; Lim, KKP (1995). *Hemibagrus hoevenii*, the valid name of the Sundaic black-tailed catfish (Teleostei:Bagridae). *The Malayan Nature Journal* 49: 41-47.
  46. Larget, B.; Simon, D.L. (1999). Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 16: 750-759.
  47. Lim, B.L.; Das I. (1999). *Turtles of Borneo and Peninsular Malaysia*. Natural History Publications, Borneo, 151pp.
  48. Lisiecki, LE, ME Raymo. 2005. A Pliocene-Pleistocene stack of 57 globally distributed benthic delta O-18 records (vol 20, art no PA1003, 2005). *Paleoceanography* 20:-.
  49. Luo, S. J.; Kim, J. H.; Johnson, W. E.; van der Walt, J.; Martenson, J.; Yuhki, N.; Miquelle, D. G.; Uphyrkina, O.; Goodrich, J. M.; Quigley, H. B.; Tilson, R.; Brady, G.; Martelli, P.; Subramaniam, V.; McDougal, C.; Hean, S.; Huang, S. Q.; Pan, W. S.; Karanth, U.; Sunquist, M.; Smith, J. L. D.; O'Brien, S. (2004): Phylogeography and genetic ancestry of tigers (*Panthera tigris*). *PLoS Biol.* 2, 2275–2293.
  50. Mazák, J.H.; Groves, C.P. (2006). A taxonomic revision of the tigers (*Panthera tigris*) of Southeast Asia. *Mamm. Biol.* 71, 268–287.
  51. McConnell, S.K.J. (2004). Mapping aquatic faunal exchanges across the Sunda

- shelf, South-East Asia, using distributional and genetic data from the cyprinid fish *Barbodes gonionotus* (Bleeker, 1850). *Journal of natural history*, 38, 651-670.
52. Mehrtens, J. M. (1970). *Orlitia* the Bornean terrapin. *International Turtle and Tortoise Society Journal* 5:6-33.
  53. Meijaard, E. (2004). Solving mammalian riddles: a reconstruction of the Tertiary and Quaternary distribution of mammals and their palaeoenvironments in island South-East Asia: Australian National University.
  54. Molengraaff, G. A. F.; Weber, M. (1919) Het verband tusschen den plistoceenen ijstijd en het ontstaan der Soenda-zee (Java- en Zuid-Chineesche Zee) en de invloed daarvan op de verspreiding der koraalriffen en op de land-en zoetwater-fauna. *Verslag Van de Gewone Vergaderingen der Wis-En Natuurkundige Afdeeling*, 28, 497–544.
  55. Moll, E. O. (1979). Reproductive cycles and adaptations. Pages 305–331 in M. Harless and H.
  56. Moll, D.; Moll, E.O. (2004). *The Ecology, Exploitation, and Conservation of River Turtles*. Oxford University Press: Oxford.
  57. Mootnick, A.R. (2006). Gibbon (Hylobatidae) species identification recommended for rescue or breeding centers. *Primate Conserv*, 21:103-138. Morlock, editors. *Turtles: perspectives and research*. Wiley, New York.
  58. Morales, J.C.; Andaus, P.M.; Supriatna, J.; Zainuddin, Z.; Melnick, D.J. (1997). Mitochondrial DNA variability and conservation genetics of the Sumatran rhinoceros. *Conservation Biology*, 11:539-543.
  59. Muir, C.C.; Galdikas, B.M.F.; Beckenbach, A.T. (2000). mtDNA sequence diversity of orangutans from the islands of Borneo and Sumatra. *Journal of Molecular Evolution* 51:471-480.
  60. Nakhleh, L.; Jin, G.; Zhao, F.; Mellor-Crummey, J. (2005). Reconstructing phylogenetic networks using maximum parsimony. In: Markstein V, editor. *Proceedings of the 2005 IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference (CSB2005)*. p. 93–102.
  61. Nater, A.; Nietlisbach, P.; Arora, N.; van Schaik, C.P.; van Noordwijk, M.A.; Willems, E.P.; Singleton, I.; Wich, S.A.; Goossens, B.; Warren, K.S.; Verschoor, E.J.; Perwitasari-Farajallah, D.; Pamungkas, J. a Krützen, M. (2011). Sex-biased dispersal and volcanic activities shaped phylogeographic patterns of extant orangutans (genus: *Pongo*). *Molecular Biology and Evolution*. in press

62. Page R. D. M. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comparative and Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
63. Parham, J.F.; Simison, W.B.; Kozak, K.H.; Feldman, C.R.; Shi, H. (2001). New Chinese turtles: endangered or invalid? A reassessment of two species using mitochondrial DNA, allozyme electrophoresis and known-locality specimens. *Anim. Conserv.* 4, 357-367.
64. Posada D. & Crandall K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
65. Rainboth, W.J. (1991). Cyprinid fishes of Southeast Asia. Cyprinid fishes: systematics, biology and exploitation (eds I.J. Winfield and J.S. Nelson), pp. 156–210. Chapman & Hall, London.
66. Rainboth, W. J. (1996a). Fishes of the Cambodian Mekong, 265 pp. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
67. Rampino, M.R.; Ambrose, S.H. (2000). Volcanic winter in the Garden of Eden: The Toba supereruption and the late Pleistocene human population crash. In: FW McCoy, G Heiken, editors. Volcanic Hazards and Disasters in Human Antiquity. Boulder: Geological Society of America.
68. Rijksen, HD, E Meijaard. 1999. Our Vanishing Relative: The Status of Wild Orangutans at the Close of the Twentieth Century: Springer Netherlands.
69. Ronquist, F.; Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
70. Rozas, J., Sa´nchez-DelBarrio, J.C.; Messeguer, X.; Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496–2497.
71. Saitou, N.; Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406-425.
72. Shi, H.; Parham, J.F.; Zhiyong, F.; Meiling, H.; Feng, Y. (2008). Evidence for the massive scale of turtle farming in China. *Oryx* 42(1): 147-150.
73. Salzberg, A. (2001). An examination of the concept of „Commercial Extinction“. *Turtle and Tortoise Newsletter* 3: 14-15.
74. Shi, H. a Parham J.F. (2001). Preliminary Observations of a Large Turtle Farm in Hainan Province, People’s Republic of China. *Turtle and Tortoise Newseller*, 3.
75. Schoppe, S. (2008). Science in CITES: The biology and ecology of the southeast Asian box turtle and its uses and trade in Malaysia. A traffic southeast Asia report.



76. Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Liu, H.; Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers, *Annals of the Entomological Society*, 87, 651–701.
77. Spinks, P.Q.; Shaffer, H.B.; Iverson, J.B.; McCord, W.P. (2004). Phylogenetic hypotheses for the turtle family Geoemydidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32:164–182.
78. Studier, J. A.; Keppler, K. J.. (1988). A note on the neighbor-joining method of Saitou and Nei. *Mol. Biol. Evol.* 5:729-731.
79. Swofford, D. L. (2002). PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
80. Thinh, V.N.; Moontrick, A.R.; Geissmann, T.; Li, M.; Ziegler, T.; Agil, M.; Moisson, P.; Nadler, T.; Walter, L.; Roos, Ch. (2010). Mitochondrial evidence for multiple radiations in the evolutionary history of small apes. *BMC Evolutionary Biology* 10:74.
81. Thompson, D. J.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. (1997). The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignments aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
82. Tjia, H. D. (1980). The Sunda shelf, Southeast Asia. *Zeitschrift für Geomorphologie N. F.*, 24, 405–427.
83. Usmani, S.; Tan, S.G.; Siraj, S.S.; Yusoff, K. (2003). Population structure of the Southeast Asian river catfish *Mystus nemurus*. *International Society for Animal Genetics*, 34, 462-464.
84. Voris, H. K. (2000). Maps of Pleistocene Sea Levels in South East Asia: Shorelines, River Systems, Time Durations. *Journal of Biogeography* 27:1153-1167.
85. Whitmore, T. C. (1981). Palaeoclimate and vegetation history. Wallace's Line and Plate Tectonics (ed. by T. C. Whitmore), pp. 36–42. Clarendon Press, Oxford.
86. Whitmore, T. C. (1987). Biogeographic evolution of the Malay archipelago. Clarendon Press, Oxford.
87. Wich, S.A.; Meijaard, E.; Marshall, A.J. (2008). Distribution and conservation status of the orangutan (*Pongo* spp.) on Borneo and Sumatra: how many remain? *Oryx* 42:329-339.

88. Williams, M.A.J.; Ambrose, S.H.; van der Kaars, S.; Ruedemann, C.; Chattopadhyaya, U.; Pal, J.; Chauhan, P.R. (2009). Environmental impact of the 73 ka Toba super-eruption in South Asia. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 284:295-314.
89. Wilting, A.; Buckley-Beason, V. A.; Feldhaar, H.; Gadau, J.; O'Brien, S. J.; Linsenmair, K. E. (2007). Clouded leopard phylogeny revisited: support for species recognition and population division between Borneo and Sumatra. *Frontiers in Zoology* 4:1–10.
90. Yap, S.Y.; Ong, H.T.; Kidam A.R. (1988). Formulation of aquaculture development at an ox-bow lake in Malaysia, I: Technical evaluations of site suitability. *Aquacultural Engineering*, 7, 245–261.
91. Yap, S.Y. (2002). On the distributional patterns of Southeast-East Asian freshwater fish and their history. *Journal of biogeography*, 29, 1187-1199.
92. Zhou, Z.; Jiang, Z. (2008). Characteristics and risk assessment of international trade in tortoises and freshwater turtles in China. *Chelonian Conservation and Biology*, 7(1): 28-36.
93. Zwartepoorte, H. (2011). TSA Europe assists with illegal turtle confiscations. Dostupné z URL: <<http://www.turtlesurvival.org/blog/1-blog/130-tsa-europe-assists-with-illegal-turtle-confiscations>>