

UNIVERZITA KARLOVA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA ZOOLOGIE

**Využití cytonukleárních genetických markerů  
při studiu mezidruhového křížení palem  
(rod *Barbus*) v přírodní populaci**

Zdeněk Lajbner

Diplomová práce



Vedoucí práce:  
Mgr. Petr Kotlík, Ph.D.

Konzultanti:  
Ing. Věra Šlechtová, CSc.  
RNDr. Vlastimil Šlechta, CSc.  
RNDr. Miroslav Švátora, CSc.

Praha 2004

## Poděkování

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval Mgr. Petru Kotlíkovi, Ph.D., z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky (ÚŽFG) AV ČR za vedení diplomové práce a za všestrannou podporu při jejím vypracovávání.

Ing. Věře Šlechtové, CSc., a RNDr. Vlastimilu Šlechtovi, CSc., děkuji za četné konzultace, neocenitelné rady a pomoc při vyhodnocování dat.

Bc. Janě Pivoňkové, Mgr. Jitce Pospíšilové a slečně Šárce Pelikánové děkuji za veškerou pomoc v laboratoři i trpělivost s mou nešikovností.

Ing. M. Rábové, CSc., Ing. Petru Rábovi, DrSc., Mgr. Karlu Jankovi a Mgr. Vendule Šlechtové patří můj dík za cenné rady a podporu v průběhu práce.

RNDr. Miroslavu Švátorovi, CSc., děkuji za laskavé zhoštění se funkce katedrového konzultanta a cenné rady.

Mgr. Jitce Uhlíkové a Mgr. Magdě Rokosové děkuji za pomoc týkající se získání a obhajoby grantu FRVŠ.

Mgr. Josefu Bryjovi Ph.D., a Mgr. Pavlu Munclingerovi, Ph.D., za rady ohledně analýzy mikrosatelitu.

Nepopsatelný dík patří celé mé rodině a Janičce Potměšilové za podporu i pochopení v průběhu práce.

Dále bych velmi rád poděkoval všem, kteří mi jakkoli pomohli, včetně družiny: „Zlých hochů a těch holek“.

Tato práce byla financována z grantu FRVŠ 2264 / 2002 (nositelka Mgr. Jitka Uhlíková) a vnitroústavním grantem ÚŽFG AVČR, číslo IGA 06 / 03 (nositel Zdeněk Lajbner).



Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s použitím citované literatury.

V Praze, dne 20. 8. 2004

.....

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:</b> .....	<b>3</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1. Hybridizace, introgrese a jejich role v evoluci obratlovců</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2. Jednotlivé případy hybridizace západopalearktických palem podrodu <i>Barbus</i></b> .....	<b>8</b>
1.2.1. <i>Barbus caninus</i> Bonaparte, 1839 x <i>Barbus plebejus</i> Bonaparte, 1839.....	8
1.2.2. <i>Barbus haasi</i> Mertens, 1924 x <i>Barbus meridionalis</i> Risso, 1826.....	9
1.2.3. <i>Barbus meridionalis</i> Risso, 1826 x <i>Barbus barbus</i> (Linnaeus, 1758).....	10
1.2.4. <i>Barbus peloponnesius</i> Valenciennes, 1842 x <i>Barbus albanicus</i> Steindacher, 1870.....	11
1.2.5. <i>Barbus tauricus</i> Kessler, 1877 x <i>Barbus petenyi</i> Heckel, 1852.....	11
1.2.6. <i>Barbus barbus</i> (Linnaeus, 1758) x <i>Barbus carpathicus</i> Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb et Berrebi, 2002.....	13
1.2.6.1. <i>Barbus carpathicus</i> .....	14
1.2.6.2. <i>Barbus barbus</i> .....	17
1.2.6.3. Mezidruhová hybridizace.....	20
<b>2. MATERIÁL</b> .....	<b>23</b>
<b>3. METODY</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1. Detekce proteinové variability</b> .....	<b>25</b>
3.1.1. Postup.....	27
3.1.1.1. Příprava vzorků.....	27
3.1.1.2. Elektroforéza.....	27
3.1.1.3. Barvení.....	28
3.1.1.4. Nomenklatura alel.....	28
<b>3.2. Analýza DNA</b> .....	<b>29</b>
3.2.1. Jaderná DNA.....	29
3.2.1.1. Mikrosatelity.....	29
3.2.1.1.1. Postup.....	30
3.2.2. Mitochondriální DNA.....	30
3.2.2.1. Vlastnosti mitochondriální DNA.....	31
3.2.2.2. Postup.....	31
<b>3.3. Analýza populační struktury (F statistika)</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4. Detekce cytonukleární nerovnováhy</b> .....	<b>36</b>
<b>3.5. Odvození původu jedince</b> .....	<b>37</b>
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1. Nukleární znaky</b> .....	<b>38</b>
4.1.1. Analýza lokusů kódujících proteiny.....	38
4.1.1.1. Distribuce alel.....	38
4.1.2. Analýza mikrosatelitu.....	39

4.1.3. Genetická variabilita.....	40
4.1.3.1. Průměrný počet alel v polymorfních lokusech.....	42
4.1.3.2. Průměrná heterozygotnost v polymorfních lokusech.....	42
4.1.3.3. Vnitropopulační variabilita.....	42
4.1.3.4. Variabilita mezi subpopulacemi.....	44
4.1.3.5. Formální test náhodného páření mezi oběma druhy.....	44
<b>4.2. Mitochondriální DNA.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3. Cytonukleární nerovnováhy.....</b>	<b>46</b>
4.3.1. Povodí Popradu.....	46
4.3.2. Povodí Dunaje.....	48
4.3.3. Obě povodí dohromady.....	49
4.3.4. Interpretace dle Avise.....	51
<b>4.4. Hybridní genotypy.....</b>	<b>52</b>
<b>5. DISKUSE.....</b>	<b>54</b>
<b>5.1. Populačně-genetická charakteristika populací.....</b>	<b>54</b>
<b>5.2. Hybridní situace u palem rodu <i>Barbus</i>.....</b>	<b>56</b>
5.2.1. Scénář hybridizace <i>Barbus barbus</i> a <i>B. carpathicus</i> .....	56
5.2.1.1. Možné důvody zjištěné situace.....	56
5.2.1.1.1. Etologický.....	56
5.2.1.1.2. Ekologický.....	57
5.2.1.1.3. Fyziologický.....	58
5.2.1.2. Porovnání s předchozími zjištěními.....	59
5.2.1.3. Porovnání s ostatními případy mezidruhové hybridizace v rámci podrodu <i>Barbus</i> . .....	60
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>61</b>
<b>7. PERSPEKTIVY.....</b>	<b>62</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>63</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>75</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>75</b>
<b>PŘÍLOHY.....</b>	<b>76</b>

## Seznam použitých zkratek:

° ' “	.....stupně, minuty, vteřiny
♂ ♀	.....samec, samice
A	.....ampér
BMNH	.....Natural History Museum (dříve British Museum, Natural History), Londýn, Velká Británie
BFB	.....bromfenolová modř
bp	.....páry bazí
CMK	.....soukromá kolekce Maurice Kottelata
cyt <i>b</i>	.....gen pro cytochrom <i>b</i>
D	.....koeficient nerovnováhy
DNA	.....deoxyribonukleová kyselina
dNTP	.....směs deoxyribonukleotidů
ds	.....dvojláknová („double stranded“)
dsDNA	.....dvouřetězcová DNA
DT	.....délka těla ryby ( <i>longitudo corporis</i> ): vzdálenost od špičky rypce, nebo horní čelisti po bázi kaudální ploutve (styk mezi hypurálními kostmi a paprsky ocasní ploutve) (Holčík et Hensel 1972)
E	.....východní zeměpisná délka
EDTA	.....etylendiamintetraacetát disodný
EtBr	.....ethidium bromid
h.,hod.	.....hodina
H <sub>2</sub> O	.....deminalizovaná voda
kbp	.....1000 párů bazí
M (mM)	.....molární (milimolární) roztok
min.	.....minuta
MNHN	.....Muséum National d'Histoire Naturelle, Paříž, Francie
m.n.m.	.....metrů nad hladinou moře
mtDNA	.....mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
MsO SRZ	.....Miestna Organizácia Slovenského Rybárskeho Zväzu
N	.....severní zeměpisná šířka
nDNA	.....jaderná DNA
NMW	.....Naturhistorisches Museum, Vídeň, Rakousko
ot.	.....otáčky
PAN	.....Polska Akademia Nauk (Polská akademie věd)
PCR	.....Polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RFLP	.....délkový polymorfismus restrikčních fragmentů
s.,sec.	.....sekunda
s. l.	..... <i>sensu lato</i> (myšleno široce)
s. str.	..... <i>sensu stricto</i> (myšleno úzce)
TBE	.....Tris-borate-EDTA
TRIS	.....Tris-(hydroxymethyl)-aminometan
tzv.	.....takzvaný
V	.....volt

# 1. Úvod

Ryby a rybovití obratlovci jsou nejrozmanitější skupinou recentních obratlovců. V roce 1976 jich bylo známo 18 818 druhů (Nelson 1976). Roku 1994 to bylo více než 24 600 druhů (Nelson 1994). V roce 2001 již uvádí Kottelat (ústní sdělení) více než 26 880 druhů. V současnosti bude toto číslo jistě o poznání vyšší.

Kaprovití (*Cyprinidae*) patří k druhově nejpočetnějším čeledím ryb (i obratlovců vůbec) na světě. Jejich původní areál zahrnuje všechny kontinenty vyjma Jižní Ameriky a Austrálie (Nelson 1994). Jsou primárně sladkovodní a nemohou překonávat moře. Díky tomu jejich rozšíření reflektuje geologický vývoj pevniny (Durand et al. 2002). Parmy jsou řazeny do podčeledi *Cyprininae* v níž tvoří vlastní skupinu (tzv. „Barbin lineage“) (Howes 1991). Rod *Barbus* ustavili Cuvier a Cloquet roku 1816 pro druh *Cyprinus barbuis* popsáný Linnéem. Rod *Barbus sensu lato* je často zmiňován jako „monstrózní agregace“ (Myers 1960), a nepříliš dobře prozkoumán (Berrebi 1995; Berrebi et al. 1996). Se svými více než 800 druhy (Howes 1987), žijícími po celé Evropě, Africe i Asii, tvoří dominantní složku kaprovitých ryb starého světa (Tsigenopoulos et Berrebi 2000) a po nomenklatorické stránce se jedná pouze o „sběrný“ taxon bez systematické hodnoty.

Výsledky fylogenetických studií indikují rozštěpení výše zmíněného taxonu *Barbus* do pěti hlavních linií: I) rod *Barbus sensu stricto* (evolučně tetraploidní, dále členěn na podrody *Barbus* a *Luciobarbus*; Doadrio 1990), II) hexaploidní druhy, III) Etiopské tetraploidní druhy, IV) Africké diploidní druhy a V) Asijské diploidní druhy. Přiřazení „cizích“ rodů jako sesterských skupin k některým z těchto monofyletických soustav (např. rod *Aulopyge* k *Barbus* s. str., či *Varicorhinus* k hexaploidním parmám) ukazuje na polyfyletický původ celé takto pojímané taxonomické konstrukce, tj. *Barbus sensu lato* (Machordom et Doadrio 2001a) (Příloha 1.). Do podrodu *Luciobarbus* je zcela recentně řazen i rod *Capoeta* (Durand et al. 2002; Berrebi et Tsigenopoulos 2003).

Většina zástupců rodu *Barbus* s. str. se nachází v mediteránní oblasti, kde obývá značně omezené areály (Kotlík et Berrebi 2001).

Je zřejmé, že v evoluci palem hrála významnou roli polyploidizace. Příbuznost mezi jednotlivými liniemi poukazuje na homoplazický charakter genomových duplikací, k nimž muselo dojít alespoň ve třech oddělených periodách, či ve třech oddělených areálech (Machordom et Doadrio 2001a). K polyploidizaci nejspíš docházelo procesem alopoly-ploidizace, kdy dochází ke splynutí dvou buněk za zvýšení stupně ploidie (díky hybridizaci dvou, či více druhů), narozdíl od autopolyploidizace, kdy dochází ke zvýšení stupně ploidie

v důsledku mitózy, jíž nenásleduje buněčné dělení (Dowling et Secor 1997). Oellermann et Skelton (1990) se domnívají, že možnost počátku hexaploidní linie alopolyloidizací je pravděpodobnější. Alopolyloidizace nejspíš stála rovněž na počátku evropské tetraploidní linie (Chenuil et al. 1999).

Polyloidizace napomáhá hybridizační speciaci. Jestliže se mezi sebou zkříží např. dva tetraploidní organismy, obsahují jejich gamety již dvojice homologních chromozomů, takže se při mitóze může vytvořit zcela pravidelné dělicí vřetenko a chromosomy mohou být rozděleny do dceřinných buněk naprosto rovnoměrně. Předpokládá se, že polyploidi jsou tolerantnější vůči ekologickým výkyvům, protože duplikace genů přináší metabolickou flexibilitu (Uyeno et Smith 1972; Otto et Whitton 2000) a tím významnější evoluční plasticitu.

### **1.1. Hybridizace, introgrese a jejich role v evoluci obratlovců**

Hybridizace je definována jako křížení jedinců dvou populací nebo skupin populací, které jsou odlišitelné dle jednoho, či více dědičných znaků (Harrison 1990). Detekce a klasifikace hybridů pomocí tradičně využívaných morfologických znaků jsou často nepřesné a mohou vézt k chybným závěrům. Prudký rozvoj moderních biochemických a molekulárně-genetických metod umožnil rutinní využití genetických dat při studiu hybridizace. Často citovanými přednostmi využití molekulárních markerů jsou: 1. velký počet analyzovatelných nezávislých znaků, 2. přímá genetická kontrola, 3. nízká hladina nedědičné variability, 4. předpokládaná selektivní neutralita, 5. schopnost odlišit mateřského rodiče od otcovského (Rieseberg et Randall Linder 1999).

Bariéry zabraňující přirozené hybridizaci lze rozdělit do dvou hlavních kategorií: prezygotické a postzygotické (pre- a postkopulační; Mayr 1963). Prezygotické zahrnují různé typy chování v době rozmnožování, které působí především na výběr partnera, načasování a lokaci. Důležitou roli hraje i vzájemné rozpoznání gamet (Howard et al. 1998). Postzygotické zábrany jsou způsobeny vnitřními genomovými inkompatibilitami (endogenní selekce) a/nebo okolními interakcemi mezi fenotypem a prostředím (exogenní selekce) (Arnold 1997). Porozumění relativním rolím pre- a postzygotických procesů v evoluci reprodukční izolace je podstatnou součástí výzkumu speciace (Howard et al. 1998).

Hybridizace je běžná a často vede k introgresi (Turner 1999). Introgrese je trvalou inkorporací genů z jedné skupiny diferencovaných populací do jiné, neboli začlenění cizorodých variant genů do nového, reprodukčně izolovaného populačního systému (Rieseberg et Wendel 1993). Ačkoliv může k inkorporaci cizorodých genů docházet různými způsoby (například následkem vnitrobuněčné parazitace), budu se v následujícím textu zabývat výhradně introgresí v důsledku přirozené hybridizace.

Introgrese rozličných genetických znaků obvykle bývá interpretována jako neutrální difúze. Množství příkladů z populačně genetických analýz přírodních vzorků i experimentálních studií však naznačuje efekt pozitivní přírodní selekce na introgresivní hybridizaci. Na introgresivní hybridizaci a pozitivní selekci je rovněž nahlíženo jako na případné zprostředkovatele invaze do nového biotopu a prostorové expanze (Arnold 1997).

Jako hybridní taxon je možno označit nezávisle se vyvíjející, historicky stabilní populaci, nebo skupinu populací, obsahující unikátní kombinaci dědičných vlastností, vytvořenou křížením reprezentantů dvou, či více diskrétních taxonů (např. ras, poddruhů, druhů atd.). Historická stabilita vede nutně k závěru, že mozaika vlastností zděděných po nezávislých liniích je zachována v populaci, přenášena z rodičů na potomstvo (Dowling et Secor 1997).

I v současnosti role přírodní hybridizace v evoluci zůstává předmětem sporů (Plénet et al. 2000; Seehausen 2004). Již Anderson a Stebbins (1954) shrnuli důvody pro důležitost hybridizace v evoluci rostlin. Domnívali se, že introgrese a hybridizace mohou přenášet bloky genů mezi stabilizovanými, adaptovanými skupinami, umožnit rychlé přeskupování různých adaptací a komplexní modifikace systémů. Tímto způsobem může být velmi zvýšen počet variant a selekce by mohla působit při segregaci bloků genetického materiálu, odvozených z odlišných adaptivních systémů obsahujících jednu, či dvě nové alely generované mutací. Tato souhra okolností může být částečně prospěšná, pokud jsou změnou prostředí vytvářeny nové niky. Následná evoluce může proběhnout maximální měrou.

Jelikož je podíl úspěšných potomků u živočišných hybridů mnohem nižší (jednotlivé stupně vývoje jsou kontrolovány komplikovanějšími a integrovanějšími komplexy genů, než je tomu u rostlin), zoologové evoluční význam hybridizace dlouho podceňovali. Dle Templetona (1981) následuje po hybridizaci inbreeding a zhroucení hybridů, přežijí-li však životaschopní a plodní rekombinanti, mohou se reprodukčně izolovat od obou rodičovských forem a stát se odlišnými entitami. Již Stebbins (1966) konstatoval, že vzácné genové kombinace se mohou upevnit velmi rychle, tudíž hybridizace může hrát větší roli v evoluci živočichů, než se obvykle předpokládá.

Hybridní zóny jsou většinou omezené oblasti, kde se geneticky odlišné populace, nebo druhy setkávají, páří a produkují hybridy (Barton et Hewitt 1985). Harrison (1990) je nadneseně označuje jako „okna do evolučních procesů“, Barton et Hewitt (1985) zase jako „přírodní laboratoře“.

Existují dvě stanoviska, dle nichž lze posuzovat vliv přirozené hybridizace z hlediska konzervační biologie.

První považuje přirozenou hybridizaci za zhoubnou pro biodiverzitu. Parentální druhy, které se samostatně vyvíjely po miliony let a vytvořily si své odlišné lokální adaptace, je mohou díky hybridizaci ztratit (Allendorf et al. 2001). Dále hybridizace může vést k tzv. outbreední depresi, snížení plodnosti (fertility) a životaschopnosti (viability), možná kvůli chromozómovým odlišnostem nebo zrušení koadaptovaných genových komplexů (Templeton et al. 1986), či genetické asimilaci, kdy početnější taxon jednoduše vstřebá ten vzácnější.

Podle druhého naopak hybridizace mezi vzácným a početnějším taxonem může vyústit v genetické obohacení ohrožené formy. Vzácná forma je rovněž podporována zvýšením fitness díky nárůstu genetické variability. To podporuje prostorovou expanzi a hybridní populace funguje jako genetický rezervoár pro rekonstrukci rodičovských genotypů/fenotypů (Arnold 1997). Hybridizace a introgrese zvyšují genetickou diverzitu produkcí nových rekombinantních genotypů pravděpodobně mnohem rychleji, než mohou mutace (Dowling et Secor 1997).

U ryb je ve srovnání s ostatními obratlovci (Winfield et Nelson 1991) přirozená hybridizace relativně běžným jevem (Hubbs 1955; Schwartz 1981). Způsobuje to pravděpodobně souhra různých faktorů, které zahrnují vnější oplození, často nerovnoměrnou abundanci rodičovských druhů a kompetici o prostorově omezená trdliště. Mezidruhová hybridní ryby bývají méně často postiženy genomovými inkompatibilitami, než je tomu u jiných obratlovců. Lidé indukují introgresivní hybridizaci především introdukcemi exotických druhů ryb, nebo modifikacemi habitatů (Scribner et al. 2001).

V čeledi kaprovitých ryb včetně rodu *Barbus* je mezidruhová hybridizace častá a hybridní jsou často fertillní, i když jejich plodnost, ovlivněná mnoha faktory, může být snížena (Pethon 1978; Chevassus 1983; Wood et Jordan 1987; Berrebi et al. 1993; Štancl 1996).

## 1.2. Jednotlivé případy hybridizace západopalearktických palem podrodu *Barbus*

Podrod *Barbus* tvoří monofyletická skupina palem, která se od podrodu *Luciobarbus* Heckel, 1843, fylogeneticky oddělila pravděpodobně před více než osmi miliony let (tzv. Rhodská tektogenní etapa, která reaktivovala latitudiální složku Alpinského orogenního pásu) (Machordom et Doadrio 2001b). Podrod *Barbus* se mimo jiné vyznačuje přítomností vyhloubených lžícovitých [*dentes exclavati cochleariformes*, dle Heckela (1843)] trojřadých požerákových zubů (*dentes pharyngei*: 2.3.5.-5.3.2.) na požerákové kosti pátého žaberního oblouku. Centrum rozšíření podrodu se nachází v severním mediteránu. Někteří autoři člení druhy podrodu *Barbus* na velké fluvio-lacustrinní jež se jeví jako skupina monofyletická, a malé rheofilní, jejichž původ se však zdá být polyfyletický (Tsigenopoulos et Berrebi 2000) (Příloha 2.). Drobné rheofilní druhy lze dále rozdělit do dvou skupin, na druhy spadající do okruhu *B. petenyi* a do okruhu *B. cyclolepis* (Berrebi et Tsigenopoulos 2003).

Mezidruhovú hybridizace těchto palem je zajímavý jev. Jednotlivé druhy jsou si značně podobné. Klasická taxonomie založená na morfologii nedokáže mnohdy s určitostí vyřešit fylogenetické vztahy mezi jednotlivými formami. Rozlišení, především následných generací, hybridů pouze na základě morfologie je rovněž dosti složité a nepříliš spolehlivé (Valenta et al. 1979), což se netýká pouze rodu *Barbus*, nýbrž i jiných skupin ryb s vysokým obsahem DNA (Wolf et al. 1969). Biochemické a molekulárně genetické metody jsou v tomto případě nezbytným nástrojem pro zjištění hybridního statutu jedinců a směrů introgrese v přírodě (Kocher et Stephien 1997).

### 1.2.1. *Barbus caninus* Bonaparte, 1839 x *Barbus plebejus* Bonaparte, 1839

*Barbus caninus* je malým rheofilním druhem, který dle Bianca (1995) původně obýval Pádsko - Benátskou ichtyogeografickou oblast severní Itálie. Introdikován byl do několika řek střední Itálie. Během 20. století byl různými autory, jako například Karamanem (1971), považován za poddruh *B. meridionalis* (details in Bianco 2003). Statut druhu mu navrátíl Bianco (1995) na základě morfologie.

*Barbus plebejus* je velkým fluvio-lacustrinním druhem. Bianco (1995) uvádí, že původně rovněž obýval Pádsko-Benátskou oblast. Introdikován byl do Toskánsko-Latinské ichtyogeografické oblasti, kterou již obýval *B. tyberinus*. Několika autory byl v minulosti považován za poddruh *B. barbuis*, nikoli však Karamanem (1971) (details in Bianco 2003).

Betti (1995) popsal pomocí morfologických znaků *B. plebejus* x *B. caninus* hybridní zónu v řece Adige. Tsigenopoulos et al. (2002) analýzou mitochondriální DNA (mtDNA) a alozymů zjistili introgresi genů *B. plebejus* do genomu *B. caninus*.

Dle těchto autorů je forma nazývaná *B. tyberinus* geneticky velmi blízká *B. plebejus*, protože nevykazuje žádné jasné rozdíly ani v alozymových, ani v mtDNA markerech. Bianco (2003) však tyto závěry odmítá.

Dle Tsigenopoulou et al. (2002) dva jedinci *B. caninus* z řeky Pellice (povodí Pádu, sever Itálie) ve svých genotypech nesli 6 alozymových alel, charakteristických pro populace *B. plebejus* / *B. tyberinus*. Pět z nich se nacházelo v heterozygotním stavu s alelou specifickou pro *B. caninus*. V řece Pellice žijí *B. caninus* společně s *B. plebejus* a tyto alely zde mohou být výsledkem introgrese. To je podpořeno i mtDNA daty. Tito dva jedinci obsahovali charakteristický haplotyp *B. plebejus*. Tento druh se nejspíš rozšířil do povodí řek, předtím obývaných pouze *B. caninus* (Tsigenopoulos et al. 2002).

Bianco (1995) mimo hybridů *B. caninus* x *B. plebejus* v Pádsko-Benátské oblasti upozorňuje na existenci hybridních jedinců *B. caninus* x *B. tyberinus* v centrální Itálii, kam byl *B. caninus* introdukovan. Žádná podrobnější práce se však tímto případem dosud nezabývala. V Itálii velmi často docházelo k rozsáhlým introdukcím ryb, aniž byl předem znám taxonomický statut forem jak nativních, tak introdukovaných (Bianco et Ketmaier 2001). Například v řece Omrone žijí spolu s původním druhem *B. tyberinus*, který je zde ohrožen vyhynutím, další tři pro toto povodí exotické druhy palem (Bianco 1995).

### 1.2.2. *Barbus haasi* Mertens, 1924 x *Barbus meridionalis* Risso, 1826

Jde o dva blízké příbuzné rheofilní druhy s parapatrickými areály rozšíření, o taxonomickém statutu *B. haasi* však přetrvávají pochybnosti. Nejprve byl popsán jako druh (*B. haasi* Mertens, 1924), poté přiřazen jako poddruh *B. barbuis* (*B. b. bocagei* Almaça, 1971), *B. capito* (*B. capito haasi*, Karaman 1971) a *B. plebejus* (*B. plebejus haasi* Almaça, 1982) (Machordom et al. 1990). Na základě studia externí morfologie a osteologie španělských palem rodu *Barbus* Doadrio (1984) navrátil *B. haasi* status druhu, jelikož se v mnoha znacích liší od *B. barbuis*, *B. plebejus* i *B. capito*. Naopak zjistil, že jej pouze minimum znaků odlišuje od *B. meridionalis*, což platí i u dat, získaných analýzou mtDNA (viz. Příloha 2.). Callejas et Ochando (2002) rovněž uvádějí, že *B. meridionalis* a *B. haasi* vykazují dle RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) divergenci, která bývá většinou přisuzována poddruhům.

Machordom et al. (1990) pomocí enzymové elektroforézy analyzovali pět populací parem z řek Matarraña, Ripoll, Tordera, Arbucias a Dourbie, aby ověřili hybridizaci těchto dvou druhů ve Španělsku. Populace z řeky Ripoll, která se nachází na hranici areálů mezi oběma druhy, je nejspíš hybridního původu, neboť obsahuje znaky charakteristické pro oba druhy. Nebyli zde chyceni jedinci ani jedné čisté linie, ani F1 generace. Výsledný genotyp této populace je patrně následkem hybridizace v minulosti a v současné době již zde ke kontaktu s rodičovskými druhy nedochází.

### 1.2.3. *Barbus meridionalis* Risso, 1826 x *Barbus barbatus* (Linnaeus, 1758)

*Barbus barbatus* lze zařadit do skupiny velkých fluvio-lacustrinních parem. Jde o široce rozšířený druh, jehož areál se rozkládá od jihovýchodní Anglie po černomořské úmoří. Chybí ve většině jižní Evropy (Kotlík et Berrebi 2001).

*Barbus meridionalis* je rheofilní. V minulosti byla různými autory tímto názvem označována velká část parem, obývajících evropskou část středozemního a černomořského úmoří. V současnosti jsou tak nazývány pouze parmy obývající řeky jihovýchodní Francie a severovýchodního Španělska (Doadrio et Perdices 2003).

Hybridizace *B. meridionalis* a *B. barbatus* byla pozorována v řece Lergue spadající do povodí řeky Hérault a zkoumána na základě genetických i morfologických znaků. Žádný z padesáti ulovených hybridů se neukázal být F1, objevili se zpětní kříženci i potomstvo kříženců. Plodní byli hybridní jedinci obojího pohlaví. Studovaná hybridní populace obsahovala větší množství alel *B. barbatus*, než *B. meridionalis*. Morfologické znaky korelují s genetickou introgresí (Berrebi et al. 1993; Daryus et Berrebi 1993; Chenuil et al. 2000).

Philippart et Berrebi (1990) experimentálně zjistili, že hybridní samci první filiální generace (F1) vzniklí křížením jikernačky *B. barbatus* a mlíčáka *B. meridionalis* jsou sterilní. Hybridní jedinci samičího pohlaví naopak již ve dvou letech věku pohlavně dospívají a jsou schopni výtěru. Do dvou let věku růstová rychlost i délkový pohlavní dimorfismus F1 hybridů odpovídá *B. barbatus*, chovaných za stejných podmínek. Berrebi et al. (1992) uvádějí až trojnásobně vyšší spotřebu kyslíku u některých hybridů.

Během experimentálních simulací přirozeného výtěru v akváriích, neobjevili Poncin et al. (1994) žádné kompletní behaviorální bariéry, které by společný výtěr těchto dvou druhů blokovaly.

#### 1.2.4. *Barbus peloponnesius* Valenciennes, 1842 x *Barbus albanicus* Steindacher, 1870

*Barbus albanicus*, endemit severozápadního Řecka, z fylogenetického hlediska patří mezi středně východní druhy podrodu *Luciobarbus* (Berrebi et Tsigenopoulos 2003) a proto se jím nebudu podrobněji zabývat.

*Barbus peloponnesius* je drobný rheofilní druh, který obývá sympatricky s druhem předchozím západ Řecka, na rozdíl od něj se však vyskytuje i na jihu Peloponéského poloostrova (Zardoya et Doadrio 1999). Karaman (1971) pod tímto názvem vytvořil polytypický druh, do nějž sloučil několik různých forem, například *B. petenyi* a *B. rebeli*, což má za následek různé nesrovnalosti až dodnes. Tohoto schématu se přidržuje, ačkoli pochybuje, i Kottelat (1997). Economidis et al. (2003) výše zmíněné druhy vytrvale považují za pouhé poddruhy.

Economidis et Herzig-Straschil (2003) uvádějí, že se tyto dvě formy kříží v řece Achelous, odkud byl v roce 1939 Stephanidisem popsán a zakreslen jeden jedinec. Ačkoliv je tento případ zajímavý, neboť zúčastněné druhy spadají do různých podrodů, nikdo jej zatím hlouběji nezkoumal.

#### 1.2.5. *Barbus tauricus* Kessler, 1877 x *Barbus petenyi* Heckel, 1852

Systematické postavení velké fluvio-lacustrinní formy z východu Bulharska, kterou v tomto případě nazývám *B. tauricus*, je zatím stále nejasné. Bogutskaya et al. (2003) uvádí pro tuto oblast endemický poddruh *B. tauricus bergi* původně popsáný jako *B. barbatus bergi* Chichkoff, 1935. Kotlík et Berrebi (2001) na základě porovnání mtDNA ukázali, že bulharské parmy byly geneticky nediferencované od *B. escherichii* Steindachner, 1897, z černomořských přítoků v severní Anatolii a současně evolučně blízké *B. barbatus* ze střední Evropy, a doporučili je proto považovat za poddruh *B. barbatus escherichi*. Následná podrobnější studie Kotlíka et al. (2004) ukázala, že *B. tauricus* z Krymského poloostrova byli geneticky velmi blízcí populacím ze severní Anatolie a z východního Bulharska, a provizorně proto Bulharskou formu označili jako *B. tauricus escherichii*. Tito autoři upozornili na nutnost taxonomické revize druhového komplexu *B. barbatus* a *B. tauricus* z celého povodí Černého moře (Kotlík et al. 2004).

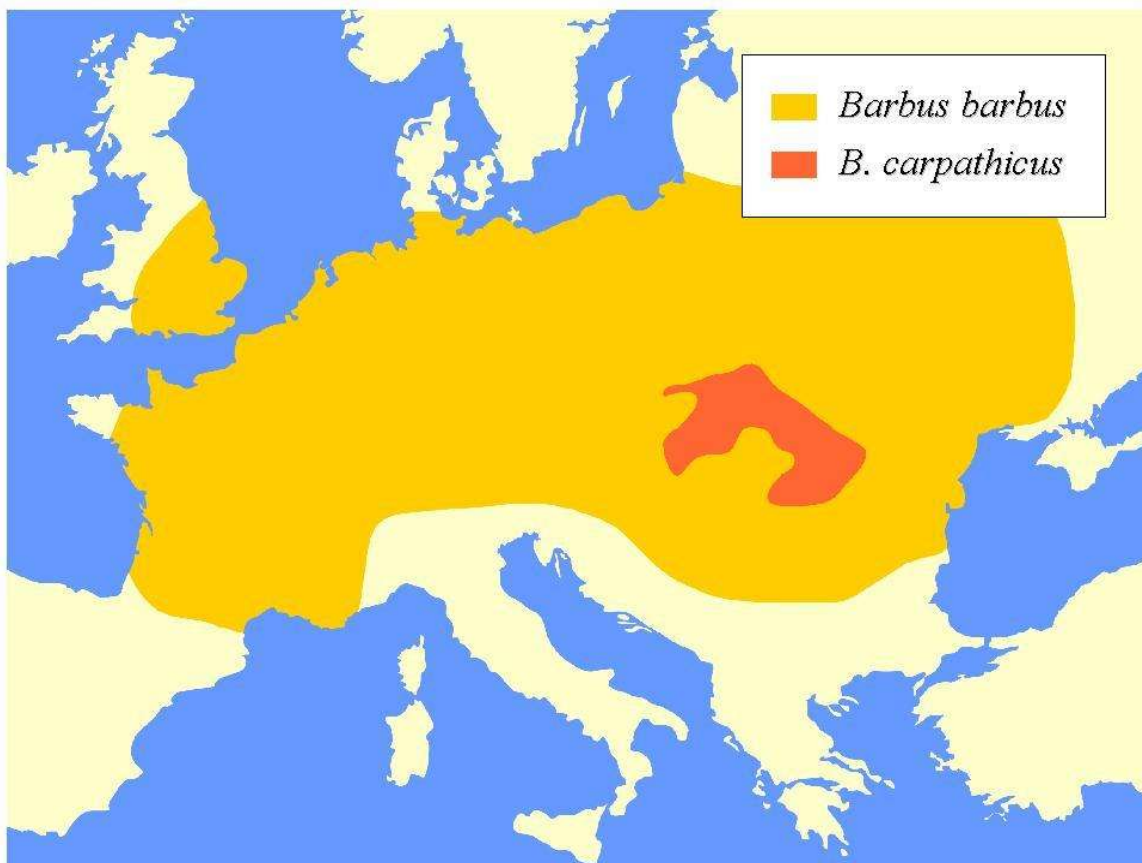
*Barbus petenyi* je malým rheofilním druhem. Ačkoli byla tato parma původně popsána jako druh (Heckel 1852), většina následujících autorů ji přiřazovala jako poddruh k *B. meridionalis* Risso, 1826 (Steindachner 1882; Berg 1949), nebo *B. peloponnesius* Valenciennes, 1842 (Karaman 1971). Samotný *B. peloponnesius* však např. Almaça (1984) přiřadil jako poddruh k *B. meridionalis*. Přesto například Starmach et Rosoľ (1961), či Rembiszewski et Rolik (1975) považovali druhový status *B. petenyi* za oprávněný. Taxonomie drobných rheofilních parem v průběhu 20. století lákala množství autorů, často doznávala radikálních změn a mezi různými vědci panují neshody i nadále. V současnosti se řada autorů na základě molekulárních dat přiklání k názoru, že *B. petenyi* je nutno považovat za samostatný druh (Karakousis et al. 1995; Tsigenopoulos et al. 1999; Tsigenopoulos et Berrebi 2000; Machordom et Doadrio 2001b; Kotlík et Berrebi 2002; Kotlík et al. 2002). Kotlík et Berrebi (2002) fylogenetickou analýzou mtDNA a porovnáním dostupných alozymových dat (Tsigenopoulos et al. 2002) identifikovali v rámci *B. petenyi* tři divergentní evoluční linie odpovídající druhům.

Kotlík et al. (2002) uvádějí, že tento druh obývá horské a podhorské potoky a říčky povodí střední Tiszy a dolního Dunaje ve Východních a Jižních Karpatech Rumunska. Nejsevernější známá populace se nachází v řece Mureş v Transylvánii. Dále se vyskytuje v povodí dolního Dunaje v pohoří Stará Planina Bulharska. Mimo povodí Dunaje je ještě znám z bulharské řeky Kamtchya na východě pohoří Stará Planina, která samostatně ústí do Černého moře a patrně tvoří jihovýchodní hranici jeho rozšíření.

Dobrovolov (1993; 1996) popsal přirozenou hybridizaci *B. tauricus* a *B. petenyi* pomocí izoelektrické fokusace (IEF) i škrobové horizontální elektroforézy sedmi proteinových systémů. V řece Eleshnitsa (povodí Kamtchyi) zjistil výskyt F1 generace a zpětných kříženců k *B. petenyi*. Tentýž autor se ve svých pracech rovněž okrajově zmiňuje o hybridizaci *B. petenyi* a *B. barbus* v povodí Dunaje. Bănărescu et al. (2003) uvádějí historickou masovou hybridizaci těchto dvou druhů v řece Bistriva Moldoveneacsa, indukovanou výstavbou vodních děl. Ionescu (1968) přiřadil hybridní jedince k *B. plebejus*. O několik let později parmy z tohoto povodí vymizely (Bănărescu et al. 2003).

1.2.6. *Barbus barbatus* (Linnaeus, 1758) x *Barbus carpathicus* Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb et Berrebi, 2002

**Obrázek 1.** Areál původního rozšíření *Barbus barbatus* a *B. carpathicus*.



Areály rozšíření obou druhů se překrývají (jsou sympatrické). V místech společného výskytu však *B. carpathicus* v jednotlivých tocích zaujímá vždy výše položené úseky (jejich distribuce v prostoru je parapatrická). Existují ale poměrně široké zóny, kde se oba dva druhy vyskytují současně (syntopicky). Geografický areál jejich rozšíření ukazuje mapka. (Obrázek 1.)

1.2.6.1. *Barbus carpathicus*

**Obrázek 2.** *Barbus carpathicus* ♀ z řeky Udava; ilustrativní foto (4.8.2004)



**Obrázek 3.** *Barbus carpathicus* ♂ z řeky Udava; ilustrativní foto (4.8.2004)



Na základě fylogeografické studie *B. petenyi*, pomocí sekvencí mitochondriálního (mtDNA) genu pro cytochrom *b* (cyt *b*) a analýzy alozymů, dospěli Kotlík et Berrebi (2002) k závěru, že se jedná o polyfyletický taxon, vyžadující revizi. Kotlík et al. (2002) jej rozdělili v tři linie, odpovídající druhům, které lze sice jen těžko rozlišit pomocí morfologie, ale mají odlišnou evoluční historii (tzv. cryptic, neboli sibling, species): *B. carpathicus*, *B. balcanicus* a *B. petenyi*. Předci nejen *B. carpathicus* a *B. balcanicus*, ale i například *B. caninus* a *B. meridionalis* se od linie vedoucí k *B. petenyi* (obsahující v té době ještě předky například *B. prespensis* a *B. rebeli*) oddělili pravděpodobně již před 5,6 - 6 miliony let, koncem miocénu. V průběhu pliocénu, před asi 4 miliony let, se od sebe odštěpily linie vedoucí k *B. carpathicus* a *B. balcanicus*.

Holotyp *B. carpathicus*, NMW-94604 (původně PK521, terénní číslo 7273), 110,0 mm, ulovili V. Šlechta a P. Kotlík 9. října 1998. Typovou lokalitou (*Terra typica*) je řeka Ublianka v Ubľe, která je přítokem Uhu v povodí Dunaje (48° 53' N, 22° 23' E).

Morfologicky se *B. carpathicus* od *B. balcanicus* a *B. petenyi* liší mírně delším rypcem, který je zašpičatělý a poněkud i zbarvením. Základní zbarvení horní poloviny těla je tmavohnědé, spodní část těla a břicho jsou bílé se žlutavým nádechem. Hřbet, boky a v menší míře i hlavu má pokryty drobnými tmavě hnědými skvrnami. Nažloutlé a jemně skvrnitě jsou i nepárové ploutve, narozdíl od párových ploutví, které jsou beze skvrn (Kotlík et al. 2002). Dle Peňáze (1995) jsou zejména na ocasní a hřbetní (dorzální) ploutvi patrné náznaky páskovité pigmentace. Dorzální ploutev je vyztužena 2(3) nebo 3(4) nevětvenými (poslední měkký, posteriorně neozubený) a 7(8) nebo 8(9) větvenými paprsky (*lepidotrichia*), z nichž poslední je v bázi rozštěpen. Její vnější okraj je rovný, nebo slabě konkávní. (Břišní ploutve [*pinnae ventrales*] tvoří 2 nevětvená a 9 větvených; prsní ploutve [*pinnae pectorales*] 1 nevětvené a 13-17 větvených lepidotrichií.) Řitní (anální) ploutev obsahuje 1(2) nebo 2(3) nevětvená a 4 (5) nebo 5 větvených lepidotrichií, poslední je rovněž bazálně rozštěpeno. Při sklopení dosahuje anální ploutev mezi střed ocasního násadce a střed ocasního ploutevního laloku. Počet perforovaných šupin (*squamae*) v postranní čáře (*linea lateralis*) dosahuje 51(52)-64 (57). Počet řad nad postranní čárou činí 8(10)-12(12), pod postranní čárou 8(6)-9(9). Pobřišnice (*peritoneum*) je černě pigmentovaná melanofory (Kotlík et al. 2002). U úst jsou 2 páry dosti dlouhých vousků, přední pár dosahuje po zadní nozdry, zadní pár do poloviny oka, nebo až k jeho zadnímu okraji. Hodnoty v závorkách uvádí Peňáz (1995).

Pohlavní dimorfismus není příliš výrazný. Dle Peňáze (1995) se většina autorů shoduje v rozdílné relativní délce řitní ploutve, která by měla být delší u samic. K odlišení lze použít rovněž charakteristické „stavění“ ploutví samců při stisknutí, podobně jako u většiny

kaprovitých ryb. Movchan et Smirnov (1981) uvádí, že se samci dožívají maximálně 4 let věku (DT  $\approx$  129 mm) a samice až 8 (DT  $\approx$  205 mm). Pekárik (2004) během tříletého výzkumu nezjistil v řece Udavě žádného jedince staršího 5 let (DT  $\approx$  170mm). Samci v řece Udava jsou schopni výtěru již ve stáří 1+, kdy měří kolem 70 mm (vlastní pozorování).

Výtěr je porcový (dávkový) a probíhá na mělčinách od června do srpna s odstupem 15-30 dnů. Tyto litofilní ryby vytvářejí skupinky o maximálně 10 jedincích a trou se do hnízd o průměru asi 50 cm, která je možno pozorovat, díky oranžovým jikrám, jimiž je šterkovité dno pokryto. Průměrná absolutní plodnost se pohybuje okolo 4000 jiker na jikernačku (Movchan et Smirnov 1981).

*Barbus carpathicus* obývá bystře tekoucí a nepřilíš hluboké úseky horských a podhorských toků Západních a Východních Karpat (Kotlík et al. 2002). Pravděpodobně zde v ichtyobiologické klasifikaci rybích pásem tato parma nahrazuje lipana podhorního [*Thymallus thymallus* (Linnaeus, 1758)], jelikož v místech jejího masového výskytu chybí (Kux et Weisz 1964). Většina areálu spadá do povodí horní Tisy a zahrnuje Slovensko, Polsko, Rumunsko, Ukrajinu a Maďarsko. Mimo povodí Dunaje jsou známy populace z povodí horní Visly Polska a Slovenska i horního Dněstru. Západní hranici souvislého rozšíření tvoří říčka Sikenica v povodí Hronu (Kotlík et al. 2002). Ačkoliv Kux (1964) zde hodnotil její výskyt jako masový, v současné době je místní populace na pokraji zániku v důsledku opakovaných otrav, necitlivých zásahů do říčního koryta, trvale vysokému znečištění a jistě i díky intenzivnímu zarybňování jinými druhy ryb (ústní sdělení předsedy MsO SRZ Levice a vlastní pozorování). Historické údaje o jejím výskytu v západněji položených řekách (Váh, Nitra) považuje Kux (1964) za mylné. Zauner (1998) informuje o opakovaných nálezech izolovaných jedinců rheofilní parmy v povodí horního Dunaje v Rakousku. Kotlík et al. (2002) pokládají za velmi pravděpodobné, že se jedná o rovněž o *B. carpathicus*. O jejich ojedinělém výskytu v hlavním toku Dunaje na Slovensku informuje i Peňáz (1995). Heckel et Kner (1858) píší, že největší exempláře *B. petenyi*, které měli k dispozici, pocházejí z Olše (povodí Odry) u Těšína. Zde se však nepodařilo výskyt rheofilních parmy potvrdit ani při speciálně zaměřených průzkumech (Balon 1963). Dle mého názoru se mohlo jednat o *B. carpathicus*, která se vyskytuje v nedaleké Visle. Heckel et Kner (1858) neuvádějí, jak ke zmíněným exemplářům přišli, je tedy možné o jejich skutečném původu pochybovat. Jižní hranici rozšíření tvoří povodí řeky Someș odvodňované jižní horní Tisou (Kotlík et al. 2002).

Druhy obývající horní úseky toků mají schopnost překonat rozvodí díky takzvanému říčnímu pirátství (river capture). To je proces, kdy v důsledku eroze, či zablokování původního koryta, řeka nebo její část změní směr svého toku tak, že následně teče do jiného povodí. Všechny organismy obývající tuto část řeky změní svou příslušnost k novému povodí společně s ní. K tomuto geologickému jevu zcela jistě docházelo ve zvýšené míře v postglaciálních obdobích, kdy masy vody z tajících horských ledovců způsobovaly zvýšenou erozi, vytváření příledovcových jezer, dočasných toků a nových říčních spojení, a tak umožnily migraci chladnomilné sladkovodní fauny do nových oblastí a genetický tok mezi dočasně izolovanými populacemi (Arkhipov et al. 1995). Právě tomuto jevu vděčí *B. carpathicus* za své současné rozšíření z toků jižních svahů severního Karpatského oblouku odvodňovaných horní Tisou, které patrně vytvořily refugium této formy během posledního glaciálního maxima před 18 000 lety (Kotlík et Berrebi 2002). Pro rheofilní parmy naopak tvoří nepřekonatelnou bariéru dolní toky řek.

#### 1.2.6.2. *Barbus barbuis*

**Obrázek 4.** *Barbus barbuis* z řeky Udava; ilustrativní foto (4.8.2004)



Linné založil svůj popis na Atredihio a Gronoviově a jako typovou lokalitu uvádí „*Europe australis*“. Kottelat (1997) stanovil lektotyp (Gronoviuv exemplář: BMNH 1853, 11, 12: 144) a tím i typovou lokalitu řeku Ijssel u Deventeru v Nizozemí, odkud tento jedinec s největší pravděpodobností pochází.

*Barbus barbuis* se od sympatrických drobných rheofilních palem liší především přítomností silně osifikovaného ozubeného trnu v dorzální ploutvi a vzrůstem až 85 cm, od fylogeneticky příbuznějších palem fluviolakustrinního typu pak hlavně uspořádáním spodního rtu, který má dva laloky a uprostřed je ztlustlý.

Zbarvení je značně variabilní. Peňáz (1995) považuje za typický olivově zelený hřbet, nazelenalé, nebo nazlátlé boky a běložluté břicho. Mladé tohoroční ryby bývají mramorovaně skvrnitě, výjimečně tmavě hnědé pigmentové skvrny přetrvávají do ranné dospělosti. Párové ploutve jsou načervenalé, nepárové bývají na okrajích tmavé.

*Barbus barbuis* je velmi plastický druh a jednotlivé subpopulace vykazují značné rozdíly ve velkém počtu meristických i plastických morfometrických znaků.

Vysoká *pinna dorsalis* je vyztužena 3(3) až 5(4) nevětvenými (poslední silně osifikované, jeho celý zadní okraj lemován dvěma řadami zoubků, jejichž počet se zvyšuje s délkou ryby) a 6(8) až 9 větvenými lepidotrichii. Její vnější okraj je silně konkávní. Každá *pinna ventralis* je tvořena 2 nevětvenými a 7(8)-9 větvenými; *pinna pectoralis* 1 nevětveným a 13(16)-18(18) větvenými lepidotrichii. *Pinna analis* obsahuje 1(2) až 4(3) nevětvená a 4(5) až 6 větvených lepidotrichií. Při sklopení nedosahuje anální ploutev k základně ploutve ocasní. *Linea lateralis* obsahuje 62(54)-66(66) perforovaných šupin. Počet řad nad postranní čárou činí 11(12)-16(14), pod postranní čárou 7(7)-12(9). Peritoneum je světlé. Homocerní hluboce vykrojená ocasní ploutev (*pinna caudalis*) se obvykle vyznačuje poněkud delším dolním lalokem (Bănărescu et al. 2003). Hodnoty v závorkách uvádí Peňáz (1995). U úst jsou 2 páry vousků, přední (rostrální) pár je kratší, než zadní (maxilární) a nedosahuje k nozdrám. Zadní pár vousků dosahuje k přednímu okraji oka (Peňáz 1995). Starší jedinci mohou mít vousky relativně delší (Bănărescu et al. 2003).

Pohlavní dvojtvárnost je nevýrazná. Krupka (1983) zjistil u populace z řeky Vlárky následující statisticky průkazné pohlavní rozdíly v morfologických znacích: samci se oproti samicím vyznačují nižším počtem žaberních tyčinek, větším průměrem oka, delším, vyšším a širším kořenem ocasu, nižší výškou těla a řitní ploutve. Jiní autoři uvádějí rozdíly v jiných znacích (viz. Bănărescu et al. 2003; Peňáz 1995). Krupka (1985) u téže populace zjistil, že samci pohlavně dospívají již v 1+ roce věku a dožívají se maximálně 10 let. Samice dospívají v 5+ roce věku, žijí až 15 let a rostou již od prvního roku rychleji, než samci. Výraznější rozdíl je v přírůstcích hmotnosti, než délky.

Výtěr probíhá v noci na kamenité dno, mírně až středně proudivých (0,2-0,5 m/s) a mělčích úseků řek v hloubce 0,5-0,7 m nejčastěji od dubna do července, při teplotě vody kolem 16-17°C (minimálně však 13,5°C; Baras et Philippart 1999), nejčastěji v 2-3 dávkách

po 10-15 dnech. Tyto litofilní ryby vytvářejí třecí hejna s převahou mlíčáků až 20:1 (Bănărescu et al. 2003), 4-6:1 (Krupka 1987) 15-130 (Baras 1994). Heckel et Kner (1858) uvádějí, že třecí hejno tvoří až 100 jedinců, kteří jsou seřazeni v pás. V předu jsou samice, za nimi větší samci a nakonec drobnější. Baras (1994) referuje o velkém počtu „příživných“ samečků (tzv. sneakers), kteří se samičkám sice nedvoří, ale ve vhodné chvíli oplodní jikry. Ti se vyskytují nejčastěji v poměru 5:2 dvořicím se samcům. Jikernačky po výtěru trdliště opouští a vrací se zpět až za již zmíněných 10-15 dní.

Absolutní plodnost samic o celkové délce 30-40 cm a hmotnosti 0,35-0,90 kg se pohybuje od 12 300 do 35 500 oocytů všech (většinou 4) generací (Krupka 1987; Poncin et al. 1996), přičemž množství jiker v první dávce může tvořit 37,6-54,4 % (Hochman 1965). Žluté jikry jsou mírně až středně lepkavé o průměru 1,9 před a 2,9 mm po úplném nabobtnání (Peňáz 1995). Bănărescu et al. (2003) uvádí hustotu jiker na trdlišti na 300-800 ks/cm<sup>2</sup> dna, 30% je neoplozených.

Chromozomové určení pohlaví je tzv. ZW typu (tzn. samičí heterogametické a samčí homogametické), jak zjistili metodou indukované gynogeneze Castelli et Philippart (1993).

*Barbus barbus* obývá proudivé a dobře prokysličené úseky podhorských i nížinných řek s tvrdým dnem (tzv. parmové ichtyobiologické pásmo). Areál výskytu se rozprostírá od Anglie po Dněpr, od jihu Baltu a Severního moře po sever Pyrenej a Alp. Na východě Anglie je původní v 7 povodích, ale postupně byla a stále je introdukována do dalších řek Anglie a Walesu (Wheeler et Jordan 1990). Chybí v Dánsku, Skandinávii, Litvě, Estonsku a Finsku (Bănărescu et al. 2003). Bianco (1995) uvádí úlovky introdukované *B. barbus* z řek Farma a Merse (povodí Omrone, Toskánsko) a z řeky Brenta na severovýchodě Itálie. Zdá se, že se zde kříží s jinými druhy palem.

Bănărescu et al. 2003 uvádí, že *B. barbus* je rybou spíše stanovištní. Pelz et Kästle (1989) pomocí radiotelemetrie zjistili periodické 60-200 m přesuny během dne. Nejaktivnější jsou za ranného rozbřesku a za pozdního soumraku. Během dne vyhledávají stinná místa, obvykle pod mosty. Lucas et Batley (1996) rovněž pomocí radiotelemetrie sledovali sezónní migrace palem. Potvrdili krátké jarní tahy na mělčí trdliště (2-20km) a podzimní na zimoviště. Za zmínku stojí údaje Steinmanna et al. (1937), kteří po 37 dnech v Dunaji ulovili značeného jedince parmy obecné 303 km od místa vypuštění.

Umělá reprodukce a transfery palem mezi různými povodími zatím nejsou ve většině Evropy příliš rozšířené (Bohlen et Nolte 1998; Šlechtová et al. 1998). Lze proto očekávat, že současná genetická strukturace přírodních populací není, v důsledku rybářského hospodaření, významně ovlivněna, ale že odráží přirozené demografické a biogeografické změny, ke

kterým docházelo například v souvislosti s čtvrtohorními klimatickými změnami (Hewitt 2004).

Kotlík et Berrebi (2001) zjistili největší diverzitu mtDNA haplotypů v povodí Dunaje, což podporuje představu Bănăresca (1991), že tento druh parmy kolonizoval Evropu z tohoto glaciálního refugia. Díky efektu „river capture“ se pravděpodobně *B. barbuis* šířil periglaciálními řekami napříč dnešními povodími během oteplování na konci posledního (Würmského) glaciálu, před přibližně 10 000 lety. Zajímavý je fakt, že ve Francii takřka chybí nejběžnější haplotyp Dunajského povodí. Tento nález může indikovat, že místní populace, které se sem z Dunaje rozšířily během předchozího interglaciálu (Riss/Würm) před 130-115 tisíci lety, přečkaly poslední glaciál zde. Díky tzv. průchodu hrdlem lahve (bottleneck effect) vymizel u těchto populací obvykle detekovaný polymorfismus. K sekundárnímu post-pleistocénnímu kontaktu mezi těmito liniemi pravděpodobně došlo v Rýně a Weseru (Kotlík et Berrebi 2001). Obdobný scénář expanze z Dunajského refugia ve dvou krocích navrhuji Durand et al. (1999) pro jelce tlouště [*Leuciscus cephalus* (Linnaeus, 1758)].

#### 1.2.6.3. Mezidruhová hybridizace

Ačkoli *B. carpathicus* patří k nejnověji popsaným druhům plem evropského kontinentu, hybridní jedinci právě této formy s *B. barbuis*, byli jako první analyzováni pomocí biochemických metod Valentou et al. (1979).

V sympatrických populacích plem se vyskytuje mnoho přechodných forem (Kux et Weisz 1958, 1964; Kux 1982; Valenta et al. 1979). Rolík (1970), na základě morfologického vyšetření 20 samčích a 20 samičích jedinců z řeky Oslava v povodí Sanu, který se následně vlévá do Visly, chybně popsala hybridní formy jako zvláštní poddruh *B. cyclolepis waleckii*, ačkoliv dříve (Rolík 1967) publikovala morfologickou charakteristiku 8 hybridů: 4 z Oslavy (sbírky Zoologického institutu PAN ve Varšavě) a 4 z povodí horní Visly (sbírky Moravského musea v Brně). Kotelat (1997) uvádí *B. cyclolepis walecki* jako synonymum k *B. peloponnesius*.

Krupka et Holčík (1976) považovali názor Rolík (1970) na existenci třetího druhu plem na Slovensku i v Polsku za správný, ale přiřadili jej k druhu *B. plebejus* ve smyslu Karamanovy revize (1971), který byl polytypický, neboť autor v něm směstnal mnoho do té doby oddělených druhů, včetně *B. cyclolepis*. K představě o existenci dalšího druhu na Slovensku je vedl fakt, že hybridní jedinci v některých znacích (například počet šupin v postranní čáře) nevykazují intermediální fenotyp, jak by se dalo očekávat (Holčík et Hensel

1972). Existenci mezidruhových hybridů všech tří forem nezamítli. [Dnes je známo, že hybridní jedinci (i F1) většiny druhů ve velké části morfologických znaků intermediální fenotyp nevykazují (Rieseberg et Randall Linder 1999).]

Nový druh pro tuto oblast byl dle Rolik (1970) charakterizován 3(3) až 4(4) nevětvenými (poslední středně osifikované, na jeho zadní straně sahá jemné zoubkování do 2 / 3 jeho celkové výšky) a 7(7) až 9(8) větvenými lepidotrichii v hřbetní ploutvi, jejíž vnější okraj je mírně konkávní až esovitý. Každá *pinna ventralis* je tvořena 2 nevětvenými a 8(8)-9 větvenými; *pinna pectoralis* 1 nevětveným a 15(14)-18(15) větvenými lepidotrichii. *Pinna analis* obsahuje 3(3) nevětvená a 5(5) větvených lepidotrichii. Při sklopení dosahuje anální ploutev samic k základně ploutve ocasní, samčí nikoliv. *Linea lateralis* obsahuje 55(53)-70 (68) perforovaných šupin. Počet řad nad postranní čárou činí 11(11)-13(13), pod postranní čárou 7(7)-10(9) (Rolik 1970). Údaje v závorkách uvádí Krupka et Holčík (1976). Přední pár vousků je krátký a výjimečně dosahuje k nozdram, zadní pár do poloviny oka.

Základní zbarvení hřbetu je hnědé, boky zlatožluté, velmi slabě skvrnité. Skvrny jsou přítomny i na hlavě dorzální a kaudální ploutvi; ventrální, pektorální a spodní lalok kaudální ploutve jsou oranžové (Rolik 1970).

Karyotypy *B. barbatus*, *B. carpathicus* i jejich hybridů jsou shodné (Valenta et al. 1979; Ráb 1980; Ráb et Collares-Pereira 1995). Valenta et al. (1979) však objevili, že lze odlišit rozdíly v elektroforetické mobilitě transferrinů (*Tf*) a izoenzymů, laktát dehydrogenázy (*LDH*) i malát dehydrogenázy (*MDH*), charakteristických pro druhy *B. barbatus* i *B. carpathicus*. Zároveň potvrdili existenci hybridů, pro jejichž identifikaci v budoucnu doporučují především plně diagnostické *Tf* a *MDH*.

Stratil et al. (1983) studovali značnou heterogenitu a polymorfismus *Tf* u 214 jedinců *B. barbatus*, 306 *B. carpathicus* a 14 hybridů, z nichž bylo na základě morfologických znaků určeno 5 jako *B. barbatus*, a 5 jako *B. carpathicus*, které byly během let (1976-1979) uloveny nedaleko Plavče (řeka Poprad). Bohužel, na základě studia pouze jednoho lokusu jsou s jistotou odhalování pouze příslušníci F1. Následné generace hybridů a zpětní kříženci již mohou nést alely pouze jednoho druhu.

Šlechtová et al. (1993) pomocí elektroforetické analýzy 12 enzymových systémů zjistili 15 polymorfních a 10 monomorfních lokusů, z nichž považovali 4 za plně druhově diagnostické (*LDH-C\**, *sMDH-4\**, *PGM-3\** a *Tf\**). Mezi 109 analyzovanými jedinci obou druhů, z řek Poprad, Torysa a Laborec, našli 6 hybridů, někteří obsahovali kombinace alel, jaké je možné očekávat u zpětných kříženců, nebo následných filiálních generací. Potvrdili tak existenci plodných přírodních hybridů.

Kotlík et al. (2002) analyzovali sekvence mtDNA dvou jedinců, vzorky jejichž tkání získali od Dr. Alicí Boroń (viz. Boroń 2000) pod názvem *B. cyclolepis waleckii*. Jeden jedinec vykazoval mtDNA specifickou pro *B. barbuis*, druhý pro *B. carpathicus* (Kotlík et al. 2002). Dr. Nina Bogutskaya určila jiné 2 jedince, kteří podle jejího názoru nesli znaky *B. cyclolepis waleckii*, narozdíl od předchozích. Oba obsahovali mtDNA typickou pro *B. barbuis* (Kotlík -ústní sdělení).

Šlechtová et al. (1998) při studiu genetické variability *B. barbuis* v České republice odhalili nepatrnou introgresi privátních alel *B. carpathicus* do genomu *B. barbuis* v řece Dyji v povodí Moravy, která se sice vlévá do Dunaje, ale neexistují ani žádné mně známé historické záznamy, že by se tu alespoň v minulosti, byť sporadicky, *B. carpathicus* vyskytovala. Autoři článku se přiklánějí k názoru, že hybridní jedinci, kteří vznikli v místech syntopického výskytu obou druhů, mohli být splaveni během povodně do hlavního toku Dunaje, odkud po čase vytáhli do jiného říčního systému a obohatili místní populaci o cizí alely. Vzhledem k ojedinělým nálezům rheofilních palem i v hlavním toku Dunaje (viz. kapitola *B. carpathicus*) se domnívám, že tato možnost je pravděpodobná. Dle mého názoru výjimečný průnik ojedinělých kusů *B. carpathicus* na trdlišť *B. barbuis* rovněž není zcela vyloučen. Ve prospěch hybridů možná hraje vyšší mobilita, ve prospěch *B. carpathicus* však mnohem vyšší abundance.

Přestože byla hybridizace mezi *B. barbuis* a *B. carpathicus* studována řadu let s využitím morfologických a později genetických metod, zůstává mnoho důležitých otázek nezodpovězeno. Rozsah a směry hybridizace nebo míra introgrese mezi genofondy zúčastněných druhů zůstávají i nadále skryty pod rouškou tajemství, kterou chci ve své práci poodhalit. Oproti předchozím genetickým studiím využívám nejen šesti plně a tří částečně diagnostických izoenzymových lokusů, ale také mikrosatelitového lokusu a mitochondriální DNA, a to současně v několika přírodních populacích.

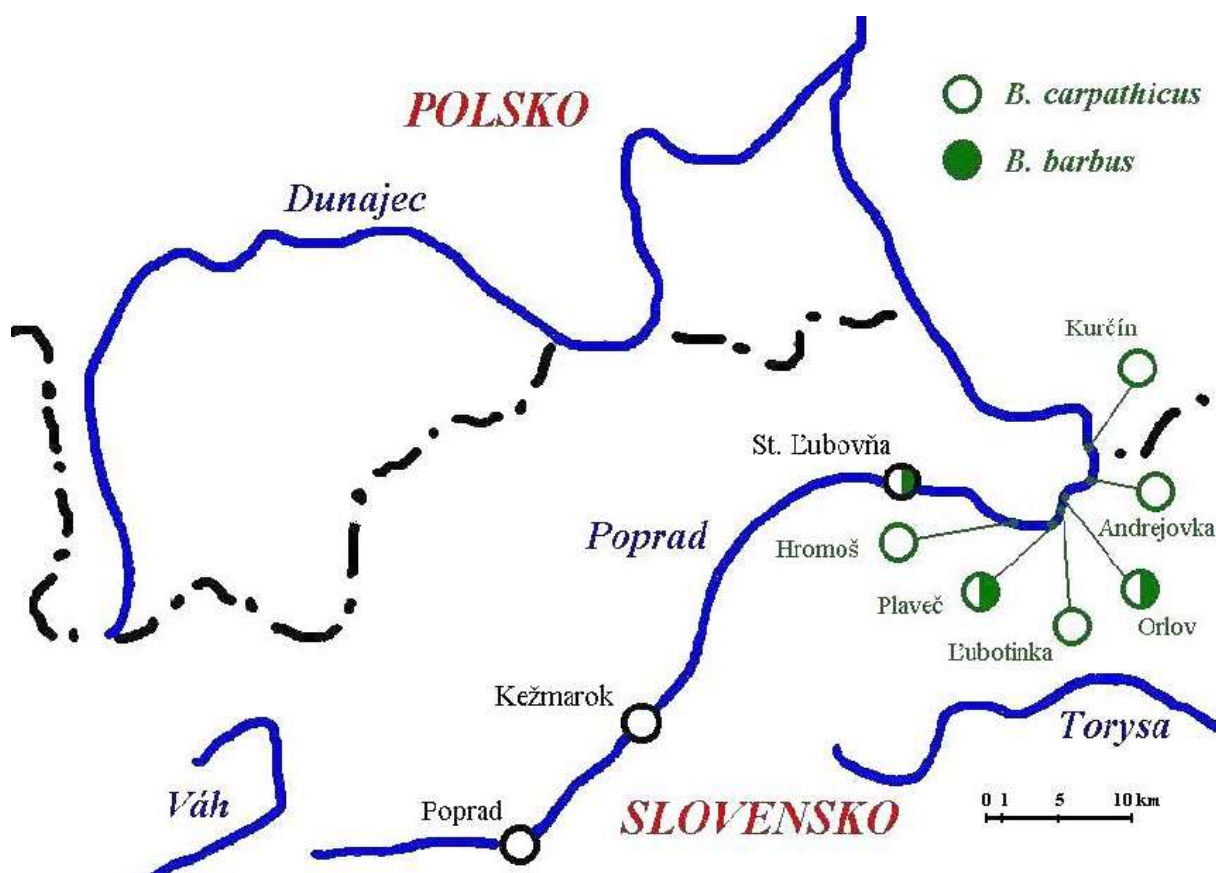
Ve svojí práci jako vůbec první používám kombinaci jaderných a cytoplazmatických markerů při studiu hybridizace těchto druhů. Takovéto cytonukleární markery představují nástroj s velmi vysokou vypovídací schopností (Avisé 2001), především jsou-li využity v kombinaci s etologickým a ekologickým studiem hybridizačních procesů (Asmussen et al. 1989; Arnold 1993).

Rozsah hybridizace i míru a směr mezidruhové introgrese hodnotím v řece Poprad z povodí Visly, kde charakterizují i početné vzorky populací obou rodičovských druhů. Obecnou platnost závěrů ověřuji na dalších lokalitách v řekách Laborec a Torysa z povodí Dunaje.

## 2. Materiál

Na řece Poprad byly odebrány vzorky ze 7 lokalit (Obrázek 5.), kde byl předpokládán syntopický výskyt obou druhů. Odběr byl proveden kvantitativně v absolutních četnostech P. Kotlíkem, V. Šlechtou a P. Rábem 21.-23.10.1997. Kolekce obsahuje i tkáně paratypů *B. carpathicus*: NMW -94607:1 -3, 3 ex., 140.0 -177.0 mm Hromoš; NMW -94608:1 -3, 3 ex., 142.1 -164.0 mm potok Ľubotínka; MNHN 2001 -2812, 3 ex., 108.0 -166.0 mm Orlov; MNHN 2001 -2813, 3 ex., 146.3 -181.0 mm Plaveč; CMK 17001 2 ex., 167.0 -186.0 mm, Andrejovka.

Obrázek 5. Lokality na řece Poprad



Poprad je jediným slovenským tokem, odvádějícím své vody do Baltského moře. *B. barbuis* i *B. carpathicus* zde dosahují maximální zaznamenané nadmořské výšky (650 m.n.m.) v rámci SR i ČR u obce Spišské Matejovce. Na téže lokalitě byli zároveň zjištěni i hybridi. Morfologie řečiště ještě výše položených úseků by sice oběma druhům stále vyhovovala, ale nevyhovují jim tamější teplotní poměry (Kux et Weisz 1960).

Úseky, z nichž byly odebrány vzorky, leží podstatně níž (viz. Tabulka 1.). Koryto řeky zde dosahuje šíře kolem 50ti metrů, převládají v něm proudivé až peřejovité úseky s oblázčitokamenitým dnem, místy vytváří tišiny s písčítobahnitými nánosy (Příloha 3.).

Poblíž Staré Ľubovni a Kurčina byl zaznamenán výskyt hybridů již v roce 1959 (Kux et Weisz 1960).

Pro srovnání jsou v práci použity též ryby z povodí Dunaje. Na těchto lokalitách však byli 11.-13.10.1998 Šlechtou a Kotlíkem přednostně vybírání jedinci, kteří se zdáli být hybridy. U obce Sabinov zjistili výskyt hybridů Kux et Weisz (1964) v roce 1962. V okolí Hankovců v r. 1958 sice Kux ichtyologický průzkum rovněž prováděl a zaznamenal oba druhy palem ve vysokých abundancích, ale s hybridy se zde nesetkal (Kux 1964).

Vzorky z byly získány standardním elektrolovem, ve spolupráci s rybáři místních organizací Slovenského Rybářského Zvazu se sídlem v Žilině. Použit byl benzínový elektrický agregát ML 3 (výrobce: Radomír Bednář) 300-600 V, 4 A, 2000 W, regulovatelný kmitočet 20-150 Hz.

Jedinci byli předběžně určeni dle hrubé morfologie v četnostech, zobrazených v tabulce (Tabulka 1.).

**Tabulka 1.** Seznam všech lokalit a jedinců.

povodí	řeka	lokalita	souřadnice (E / N)	nadmořská výška	datum sběru	<i>B. barbuis</i> (ks)	<i>B. carpathicus</i> (ks)	hybridi (ks)
Visla	Poprad	Orlov	20°53' / 49°16'	479 m.n.m.	21.10.1997	1	35	3
		Andrejovka	20°54' / 49°16'	474 m.n.m.	21.10.1997	0	37	0
		Kurčín	20°55' / 49°15'	470 m.n.m.	21.10.1997	0	1	0
		Plaveč	20°50' / 49°17'	488 m.n.m.	22.10.1997	2	5	1
		Ľubotinka	20°51' / 49°17'	485 m.n.m.	22.10.1997	0	9	0
		Stará Ľubovňa	20°42' / 49°19'	510 m.n.m.	23.10.1997	50	31	0
		Hromoš	20°48' / 49°16'	490 m.n.m.	23.10.1997	0	55	0
Dunaj	Ľaborec	Hankovce	21°57' / 49°02'	180 m.n.m.	11.10.1998	2	13	2
		Koškovce	21°58' / 49°03'	188 m.n.m.	12.10.1998	2	1	3
	Torysa	Sabinov	20°54' / 49°16'	320 m.n.m.	13.10.1998	6	10	4

## 3. Metody

### 3.1. Detekce proteinové variability

Proteinová variabilita byla detekována pomocí gelové elektroforézy. Jedná se o první široce použitelnou metodu studia genetické proměnlivosti a její vznik v 50. letech 20. století způsobil revoluci v chápání mikroevolučních a makroevolučních procesů, v porozumění genetické variabilitě uvnitř přírodních populací, fylogenetickým vztahům, tokům genů, hybridizaci, zkoumání druhových hranic a porozumění dalším problémům (Smithies 1959).

Tato metoda je založena na pohybu částic v elektrickém poli. Pohyb proteinů způsobují kladně (Arg, Lys, His) a záporně (Asp, Glu) nabitě postranní řetězce aminokyselin, přitahované k záporné katodě a kladné anodě. Pohyb makromolekuly je dále určován její konformací, celkovým nábojem a pH pufru použitého při elektroforéze.

Iontový pufr stabilizuje elektrický náboj prostředí, zprostředkovává iontová spojení mezi elektrodami a gelem a redukuje interakce mezi nabitými postranními řetězci proteinů s nabitými skupinami v gelu. Pufr je přidáván do samotného gelu již před jeho přípravou a rovněž tvoří prostředí elektrodového mostu. Při enzymové elektroforéze bývá využíváno velké množství různých pufrových systémů (Hillis et al. 1996). Ty jsou empiricky testovány pro efektivitu s jednotlivými organismy, typy tkání a enzymy (May 1993).

Aminokyselinové sekvence proteinů se mění v důsledku mutací v kódujících DNA sekvencích. Tyto mutace mohou pozměnit tvar a náboj, právě tak jako katalytickou schopnost a stabilitu proteinů (Shaw in Hillis et al. 1996). Předpokládá se, že všechny alely v lokusu jsou kodominantní, tzn. exprimované.

Základní metody elektroforézy jsou vertikální, horizontální (nejrozšířenější) a kapilárová. Dále je můžeme rozdělit na elektroforézy v kontinuálním pufru, v diskontinuálním pufru (multifázická), izotachoforézu, izoelektrickou fokusaci, denaturační elektroforézu v močovíně a SDS, dvourozměrnou (2 – D) (Hillis et al. 1996). Jako nosiče jsou používány škrob (pohyb závisí na velikosti částic a náboje) (Smithies 1955), celulózoacetát, agar, agaróza (pohyb závisí pouze na velikosti náboje), polyakrylamid (pohyb závisí na velikosti částic a náboje) (Hillis et al. 1996).

Barvicí metody lze rozdělit do šesti hlavních skupin: chromogenické, fluorogenické, radioaktivní, chemické detekce, barvy elektronového transferu, enzymového spojení (Hillis et al. 1996).

Aby byla dlouhodobě uchována aktivita jednotlivých enzymů (minimálně 3 roky), musí být vzorky uchovávány za stabilní teploty hluboko pod bodem mrazu (-70°C). Častější

rozmrazení a následné zmrazení vzorku mívá za následek nejen snížení aktivity analyzovaných enzymů, ale může narušit kompartmentaci buňky až do té míry, že se začnou tvořit i mezilokusové izozymové kombinace.

Elektroforéza enzymů i neenzymatických proteinů poskytuje dva typy dat – data získaná analýzou izozymů a data alozymová. Termín izozym (izoenzym) byl zaveden Markertem a Mollerem (1959) a vztahuje se k jakémukoli proužku daného enzymového systému na gelu. Označuje všechny funkčně podobné formy daného enzymu včetně všech polymerů složených z podjednotek, kódovaných buď různými lokusy, nebo různými alelami téhož lokusu. Pojem alozym byl zaveden později Prakashem et al. (1969) pro tu část izozymů, které jsou variantami polypeptidů představujícími různé alelické varianty jednoho lokusu (jsou kódovány různými alelami téhož genu). U heterozygotů jsou tedy jako alozomy označovány pouze extrémní proužky (nejrychlejší a nejpomalejší), tj. ty, které se objevují jako jeden pruh u homozygotů. Všechny proužky mezi nimi (u multimerních enzymů) jsou izozymy představující různé kombinace produktů obou alel (Powell 1994).

Tato metoda má několik omezení. Je zde problém s homologizací pruhů, neboť stejné elektromorfy nemusejí představovat ortologní proteiny. Pouhá třetina neredundantních substitucí vede k změně elektrického náboje. Nelze detekovat mutace, které nejsou translatovány. Nejsou zachyceny nekódující sekvence. Lze prokázat pouze rozdíly, nikoliv shody. Metoda je použitelná pouze pro rozpustné (většinou globulární) proteiny (Hillis et al. 1996). Na druhou stranu je však alozymová/ izozymová elektroforéza metodou poměrně levnou, rychlou, dobře fungující a s velmi nízkým rizikem kontaminace (Kocher et Stepien 1997).

Pro rozlišení jednotlivých alel se používají číselné hodnoty (v %) vyjadřující jejich relativní pohyblivost v gelu při elektroforéze. Tyto hodnoty se většinou vztahují k alele, která se objevuje u zkoumaného taxonu s nejvyšší frekvencí. Relativní pohyblivost této alely se označuje jako 100 % (Shaklee et al. 1990).

Při dostatečném úsilí většinou lze, díky novým mutacím, v populacích detekovat vzácné alely. Jejich význam pro evoluční změny je zanedbatelný, neboť bývají brzy eliminovány náhodným driftem nebo selekcí. Proto bylo zavedeno arbitrární kritérium, pomocí kterého je polymorfismu definován. Jako polymorfní označujeme takový lokus, u kterého frekvence nejpočetnější (obecné) alely dosahuje nejvýše 95% ( $p \leq 0,95$ ). V případě analýzy vzorků s vysokými počty jedinců bývá někdy aplikováno citlivější kritérium polymorfismu s frekvencí obecné alely 99% ( $p \leq 0,99$ )(Hartl et Clark 1997).

### 3.1.1. Postup

#### 3.1.1.1. Příprava vzorků

Vzorky jaterní a svalové tkáně byly odebrány z ryb čerstvě usmrcených předávkováním anestetikem a zamrazeny. Tyto vzorky jsou dlouhodobě uchovávány při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kadavery pak při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Přibližně 1 gram každého vzorku byl homogenizován homogenizátorem Ultra-Turrax (IKA-WERK) v Tris-NaCl ( $\text{pH} = 8,5$ ) homogenizačním pufru (Valenta et al. 1971). Po přidání cca 5  $\mu\text{l}$  Tetra-chlor methanu (navázání tuků) byly homogenáty protřepány vortexem MS1 Minishaker (IKA™ Works) a následně usazeny centrifugací v chlazené ( $-4^{\circ}\text{C}$ ) centrifuze Hettich 30 RF při 11 000 ot./min. po dobu 20 minut. Supernatant byl oddělen a uchováván při  $-70^{\circ}\text{C}$  pro pozdější elektroforézu, nebyl-li též den zpracován.

#### 3.1.1.2. Elektroforéza

Analyzováno bylo pět enzymových systémů kódovaných devíti strukturními genovými lokusy, které zahrnovaly glukosa 6-fosfát isomerasu (*GPI-2\**, E.C.5.1.3.9.), laktát dehydrogenasu (*LDH-A1\**, E.C.1.1.1.8.), malát dehydrogenasu (*sMDH-1\**, *sMDH-2\**, *sMDH-3\**, *sMDH-4\**, E.C.1.1.1.37.), fosfoglukomutasu (*PGM-1\**, *PGM-2\**, E.C.5.4.2.2.) a superoxid dismutasu (*SOD-2\**, E.C.1.15.1.1.).

Enzymy byly děleny horizontální elektroforézou (VN Zdroj, Vývojové dílny ČSAV) v 11% škrobovém gelu. Ten vznikl smísením 37,08 (40,44) g hydrolyzovaného škrobu a 300 (400) ml příslušného gelového pufru ve vakuové zábrusové baňce s kulatým dnem. Údaje v závorkách udávají množství potřebná pro vznik gelů o mocnosti 6 mm. Směs byla za stálého míchání ve vodní lázni ohřáta na  $85^{\circ}\text{C}$ , načež byla vodní vývěvou odvzdušněna. Tekutý gel byl nalit do předem připravených forem o rozměrech asi 260 x 120 x 4 (6) mm, tvořených skleněnou deskou, skleněnými postraňky na delších stranách a gumovými na kratších, a opatrně přiklopen druhou skleněnou deskou. Po ztuhnutí byla deska, která tvořila původně dno formy odstraněna a nahrazena plastovou folií, která má zamezit vysychání gelu. Vzorky byly do gelu, rozkrojeného 3,5 cm od okraje, který je během elektroforézy nejbližší zápornému pólu, vnášeny pomocí savého Whatmanova papírku (No. 3; 7,0 x 5,5 mm) v množství 11 kusů / gel. Pro kontrolu, zda elektroforéza běží správně, byla k některým vzorkům přidána bromfenolová modř (BFB). Elektroforéza probíhala za teploty  $5^{\circ}\text{C}$  v chladničce. Byl-li

používán zásaditý Tris-citrátový pufr (pH= 7,41 / 8,6 pro gelový / elektrodový pufr; Valenta et al. 1971) pro svalové *MDH*, *GPI* a *LDH* a jaterní *MDH* a *GPI*, trvala elektroforéza při napětí 180 V proudem 40mA (50mA) přibližně 14 hodin. Hodnoty udávají napětí a proud při použití gelů o mocnosti 4 mm, z nichž lze rozkrojením získat 2 barvicí plochy. Údaj v závorce vyjadřuje proud při použití gelů o mocnosti 6 mm, používaných při barvení 3 proteinů. Pro elektroforézu proteinů *PGM* a *SOD*, exprimovaných v jaterní tkáni byl použit alkalický tris-citrát-lithium-borátový pufr (pH= 7,41 / 8,6; ) dle Poulika (1957) při napětí 200 V a proudem 40mA (50mA). Alkalického Tris-citrát-lithium-borátového pufrového systému dle Fergusona a Wallace (1961) při napětí 350 V (po vyndání papírků 450 V), proudem 40mA (50mA), trvajícím 5-7 h., který je nutno chladit vodou, bylo použito na proteiny *GPI*, *LDH* a *PGM* exprimované ve svalech.

### 3.1.1.3. Barvení

Alozymy byly detekovány pomocí standardních chromogenických metod. *GPI*, *PGM* a *SOD* byly barveny dle Pasteura et al. (1987), *MDH* a *LDH* dle Harrise et Hopkinsona (1976) (Příloha 4.). Vzhledem k efektu tzv. elektrodekantace, při kterém se s postupujícím časem proteiny o vysoké molekulové hmotnosti postupně „propadají“ na spodní stranu gelu, což může způsobit jejich slabou či nedostatečnou koncentraci v horních vrstvách, byly pro slaběji se barvicí proteiny (*MDH*, *LDH*, *SOD*) použity spodní části gelů.

Každý obarvený gel byl vyfotografován, elektromorfy zakresleny a obarvený agarózový gel sloupnut na filtrační papír, usušen, vylisován i s podkladem nalepen do protokolu vedle nákresu.

### 3.1.1.4. Nomenklatura alel

Nomenklatura lokusů a alel použitá v této práci většinou odpovídá doporučení Shaklee et al.(1990). Relativní elektroforetická mobilita alel je vztažena k nejfrekventovanější alele, nebo lokusu u *B. carpathicus*. Výjimku tvoří lokus tetrasomický lokus *GPI-2\**, jehož alely byly pro zjednodušení označovány písmeny S (slow) F (fast) S<sup>f</sup> (faster slow) a F<sup>f</sup> (faster fast) a množství číslicí. Názvosloví je, pokud možno, sjednoceno s předchozími publikacemi, které na toto téma v minulosti vzešly.

## 3.2. Analýza DNA

Veškerá DNA byla izolována ze svalové tkáně, konzervované v 95% roztoku etanolu, pomocí Chelexu (viz. Kotlík et Berrebi 2001). Nespornými výhodami tohoto postupu jsou nízké náklady jak finanční, tak časové.

Vzorek tkáně jsem jsem promísil vortexem MS1 Minishaker (IKA<sup>TM</sup> Works) s 400  $\mu$ l 5% roztoku Chelexu 100 resin (Biorad) a 15  $\mu$ l proteinázy K (20 mg/ml) a nechal inkubovat při 55°C v termobloku MD-02 (Major Science) asi 12 hodin. Potom jsem směs vařil 15 min. ve stojánku s víčkem, neboť jinak se většina mikrozkmavek při vaření otevře, opět promísil vortexem, krátce stočil v minicentrifuze MPW-50 (Med Instruments) (max. 1600 ot./min.) a zmrazil, nezpracovával-li jsem hned dále. Důležité je nezapomenout vždy před použitím suspenzi krátce stočit v centrifuze (max. 1600 ot./min.).

### 3.2.1. Jaderná DNA

Polymorfismus jaderné DNA (nDNA) byl studován nejen nepřímo (alozymy), ale i přímo. Pomocí PCR byly selektivně amplifikovány fragmenty DNA, obsahující mikrosatelit se čtyřbázovým motivem. Přesná délka fragmentů byla zjišťována pomocí automatického sekvenátoru.

#### 3.2.1.1. Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou velice krátké, 2-6 párů bází dlouhé tandemové repetice se sklonem náhodně být rozmístěné v genomu a jsou často místem sklouznutí při replikaci (ssm – slipped-strand mispairing theory; Levinson et Gutman 1984). Jsou široce distribuované v nukleárním genomu a jsou vysoce polymorfní. Takzvaný stepwise mutation model předpokládá, že k inzerci nebo delecii nových nukleotidů nejčastěji dochází po celých motivech. Jednotlivé alely se tedy většinou liší právě o délku motivu (Kimura et Ohta 1978), nebo její násobek (Di Rienzo et al. 1994).

Mikrosatelity se široce používají při analýze systémů párování sexuálních partnerů a genetické struktury populací (Kocher et Stepien, 1997).

Studován byl mikrosatelitový lokus *Barb79* (Chenuil, 1997).

Sekvence: 5' (N)<sub>22</sub> (TACC)<sub>2</sub> (TATC)<sub>19</sub> (N)<sub>115</sub> 3'

(N)<sub>n</sub> ...značí nerepetivní sekvence o n nukleotidech

Tučně označená část je zdrojem polymorfizmu.

Sekvence primerů: F (Forward) 79: 5'-GAG TGA ATC ATT ACA TCC CT-3'

R (Revers) 79: 5'-GCT TTT CTT GTA TTA GTA TTT-3'

Primery byly na 5'konci fluorescenčně značené  $\beta$ -N-Acetylglukosaminidasou (HEX) (East Port Praha).

#### 3.2.1.1.1. Postup

Použito bylo upravených postupů dle Bruce et Hursta (1996). Dvouřetězcová DNA (dsDNA) byla amplifikována v 50  $\mu$ l reakční směsi obsahující 1,25  $\mu$ l pracovního roztoku každého primeru (10x zředěný zásobní roztok), 4  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l dNTP (10mM, Top-Bio), 5  $\mu$ l kompletního reakčního pufru (10x, Taq buffer, Top-Bio), 0,25  $\mu$ l Taq UniS polymerázy (5U/ $\mu$ l, Top-Bio), 27,25  $\mu$ l demineralizované H<sub>2</sub>O a 10  $\mu$ l roztoku DNA.

PCR reakce v Peltierově termálním cykleru PTC 200 (MJ Research) začala 3 minutovou fází předběžné denaturace při 94 °C, po níž následovalo 35 cyklů skládajících se ze tří kroků: fáze denaturace při 92 °C (35 s), annealing při 46 °C (35 s) a prodloužení při 72 °C (50 s). Takto namnožené úseky mtDNA byly okamžitě použity, nebo uchovány krátkodobě při 4°C či dlouhodobě při -20°C. Úspěšnost PCR byla zkontrolována standardní horizontální elektroforézou, obdobně jak je uvedeno v následující kapitole.

Délkový polymorfismus byl zjišťován kapilárovou elektroforézou pomocí sekvenátoru ABI-Prism™ 310-3 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), programového balíku ABI-Prism™ Data Collection Software v. 3.0.0 (Applied Biosystems) a ABI-Prism™ GeneScan Analysis Software v. 3.7 (Applied Biosystems) pro WindowsNT™ (Microsoft).

#### 3.2.2. Mitochondriální DNA

Mateřský původ hybridů i směr a míra cytoplazmatické introgrese byly hodnoceny na základě druhové příslušnosti mtDNA.

Alely parmy obecné byly od variant parmy karpatské odlišeny s využitím analýzy délky fragmentů získaných po rozštěpení mtDNA restrikcími enzymy (endonukleasami), které rozpoznávají specifické tetranukleotidové sekvence (Avisé 1994).

### 3.2.2.1 Vlastnosti mitochondriální DNA

Jedná se o jednořetězcovou cirkulární molekulu o velikosti 16 až 20 kbp (Carvalho et al. 1995). Amplifikace mtDNA profitují z mnohonásobných kopií tohoto kompaktního genomu v živočišných buňkách. Většina somatických buněk má tisíce kopií mtDNA; to poskytuje velké množství počátečních kopií pro PCR (Hillis et al. 1996).

Při analýze mtDNA se vychází z jednoho zásadního předpokladu. V naprosté většině případů nesou všichni potomci shodné kopie<sup>1</sup> haploidní mateřské<sup>2</sup> mtDNA (cytoplazma vajíčka pochází od samice), která nepodléhá rekombinaci. Toho lze využít pro stanovení mateřského druhu účastníků se hybridizací (Kocher et Stepien 1997). Rozdíly v sekvenci mtDNA podmiňují výskyt rozdílných haplotypů. Během mnoha generací se určité úseky mění přibližně konstantní rychlostí pouze díky mutacím, které však mtDNA u většiny organismů kumuluje rychleji, než jaderné geny. Některé úseky mtDNA jsou však vysoce konzervativní (Hillis et al. 1996).

Maternální dědičnost mtDNA může mít velmi zajímavý negativní dopad na životaschopnost malých populací. Fertilita spermií velmi úzce souvisí s dokonalou funkcí mitochondrií. Drobná mutace, která nemá téměř žádný vliv na životaschopnost samice, může samčí fertilitu výrazně redukovat (Gemmell et Allendorf 2001). Efektivní velikost populace mitochondriálního genomu je oproti jadernému pouze čtvrtinová. Mutace mtDNA jsou tedy mnohem senzitivnější ke genetickému driftu a efektu hrdla láhve (tzv. bottleneck effect), než je tomu u mutacích jaderných (Birky et al. 1983). Kumulace mtDNA mutací, které snižují samčí plodnost, v populaci, může hrát v přežívání malých populací významnou roli (tzv. cytoplazmatická samčí sterilita).

### 3.2.2.2. Postup

---

<sup>1</sup> Heteroplasmie u ryb viz. Brown et al. 1992; Nesbø et al. 1998; Ludwig et al. 2000.

<sup>2</sup> Obsah paternální mtDNA uvnitř buněk potomků viz. Gyllensten et al. 1991; Taanman 1999.

Fragment o velikosti 664bp, zahrnující část genu pro cytochrom b byl selektivně amplifikován pomocí standardní PCR s využitím primerů L15267 ( 5'-AAT GAC TTG AAG AAC CAC CGT-3') a H15891 ( 5'-GTT TGA TCC CGT TTC GTG TA-3') (Brioual et al., 1998). Písmena L (light strand) a H (heavy strand) značí pozici 3' konců primerů v kompletní sekvenci mtDNA kapra (*Cyprinus carpio*) (Chang et al. 1994).

PCR probíhala v Peltierově termálním cyklu (MJ Research) v 50 µl reakčních objemech, které vznikly smísením 1,25 µl pracovního roztoku každého primeru (10x zředěný zásobní roztok), 4 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTP (10mM, Top-Bio), 5 µl kompletního reakčního pufru (10x, Taq buffer, Top-Bio), 0,25 µl Taq UniS polymerázy (5U/µl, Top-Bio), 27,25 µl demineralizované H<sub>2</sub>O a 10 µl roztoku DNA.

Porovnáním souborů nukleotidových sekvencí pro parmu obecnou a parmu karpatskou (Kotlík et Berrebi 2001, 2002) byly s použitím programového balíku DNASIS™ for Windows™ (Hitachi Software) vybrány diagnostické restriční enzymy. Za diagnostické byly považovány endonukleázy, jejichž cílové sekvence se překrývaly s polymorfními pozicemi vykazujícími alternativně fixované nukleotidové stavy v mtDNA parmy obecné a parmy karpatské (Tabulka 2.).

**Tabulka 2.** Použité diagnostické endonukleázy.

			<i>Barbus carpathicus</i>			<i>Barbus barbus</i>		
RE	pufr	sekvence	N	Pozice	fragmenty	N	pozice	fragmenty
HaeIII	Y <sup>+</sup> /Tango	GG!CC	2	142/378	143/236/215	2	142/406	143/264/187
MboI	R <sup>+</sup>	!GATC	2	234/351	117/233/244	1	234	233/361
MspI	R <sup>+</sup>	C!CGG	2	140/210	70/140/384	1	140	144/454

Restrikce probíhala minimálně 5 hodin v termostatu za optimální reakční teploty 37°C, společně pro všechny tři enzymy, v 12 µl objemech, z nichž 4 µl tvořil PCR produkt; 6,3 µl H<sub>2</sub>O; 1,2 µl pufr (Y<sup>+</sup>/Tango; nebo R<sup>+</sup>) a 0,5 µl restriční enzym. Mikrozkušavky s reakční směsí byly před umístěním v termostatu promíseny vortexem MS1 Minishaker (IKA™ Works) a krátce stočeny v centrifuze Universal 32 R (Hettich)(1200 ot./min.).

Po rozštěpení těmito restričními enzymy se počet nebo délka fragmentů mtDNA obou druhů lišila a mohla být odečítána s využitím elektroforézy (zdroj: BioRad Power Pac 300) (napětí 90V, proud 30A, čas 20min.) v 2 % agarózovém gelu. Ten vznikl vařením 2g agarózy (Sigma) ve 100 ml pufru TBE 0,5x (40 mM Tris-HCl (pH 8,0) + 2 mM EDTA-NaOH (pH 8,0) + 90 mM HBO<sub>3</sub>) v mikrovlnné troubě. Zasunutí hřebene do tekuté agarózy, obohacené o 2 µl roztoku ethidium bromidu (10 mg EtBr/ ml H<sub>2</sub>O) (Serva), umožnilo vznik jamek pro

nanášení jednotlivých vzorků. Po utužení gelu a vyjmutí hřebene byla vanička umístěna do elektroforetické cely s 0,5x koncentrovaným TBE elektroforetickým pufrům, tak aby vrstva pufru nad gelem dosahovala přibližně 2 – 3 mm. K naštěpeným vzorkům byl přidán vždy 1  $\mu$ l nanášecího pufru (0,2 % BFB; 60 mM EDTA v 50 % glycerolu) a následně byly pomocí mikropipety vkládány do jamek pod hladinou pufru v cele Hu 10, nebo Hu 13 (Scie-Plas). Do krajních jamek bylo vždy nanášeno 1,5  $\mu$ l pracovního roztoku standardu, obsahujícího směs vkládacího pufru a fragmentů DNA o délce 100-1000 bp, lišících se přesně o 100 bp (GeneRuler).

EtBr navázaný na DNA při vystavení UV záření emituje světelné záření o vyšší vlnové délce, než má dopadající, čímž ji vizualizuje (tzv. fotoluminiscence). Výsledek byl snímán kamerou umístěnou v UV transiluminátoru MultiImage™ Light Cabinet (Alpha Inotech Corporation) vybaveném UV-B fluorescentní lampou (Ushio) a převáděn do digitální podoby programem Chemimager 4000i v. 3.36 Alpha Ease 1996 (Alpha Inotech Corporation).

### 3.3. Analýza populační struktury (F statistika)

Pro proteinovou analýzu byly vybírány přednostně lokusy, které jsou v rámci jednotlivých druhů monomorfní [frekvence nejčtenější alely dosahuje minimálně 95% (Hartl et Clark 1997)], ale vykazují mezidruhovou divergenci. Pro populačně genetickou charakteristiku jednotlivých populací obou druhů se tak hodil pouze mikrosatelitový lokus *Barb79*, který vykazoval variabilitu v populacích obou druhů. Z analyzovaných enzymových lokusů je za polymorfní (ne- monomorfní) v rámci *B. barbuis* možno považovat *Pgm1*, v rámci *B. carpathicus* pak *LdhA1*.

Z dat byly odhadnuty indexy fixace  $F$ , dle Wrighta (1969) postupy dle Weira et Cockerhama (1984), pomocí počítačového programu Genetix v.4.03 (Belkhir et al. 1998), který je volně přístupný na internetové adrese: [www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm](http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm)

Případné snížení heterozygotnosti jedinců způsobené nenáhodným pářením v jednotlivých subpopulacích bylo odhadnuto jako koeficient inbreedingu ( $F_{IS}$ ) (vysoké hodnoty mohou ukazovat na silný inbreeding, naopak záporné hodnoty naznačují, že v subpopulaci dochází k negativnímu výběrovému páření).

Dle Weira et Cockerhama (1984):

$$f = 1 - \frac{\sum(C_i)}{\sum_i(B_i + C_i)}$$

Tento koeficient je citlivý na odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

K odhadu fixačního indexu (Wright 1921) ( $F_{ST}$ ), kterým odhadují rozdíly mezi subpopulacemi, bylo použito jak modifikovaného postupu dle Weira et Cockerhama (1984):

$$\theta = \frac{\sum(A_i)}{\sum_i(A_i + B_i + C_i)}$$

tak podle Robertsona et Hilla (1984) (vážený odhad) (formalizováno Weirem et Cockerhamem 1984, 1363 p.):

$$F_{ST}(RH) = \sum_{i=1}^n \frac{A_i * (1 - P_i)}{(A_i + B_i + C_i)} * \frac{1}{n-1}$$

a jeho korekcí dle Raufaste et Bonhomme (2000), pro větší počet alel:

$$F_{ST}(RH') = F_{ST}(RH) + \frac{F_{ST}(RH)^2}{n_p(n-1)} \left( \sum_{i=1}^n \frac{1}{P_i} - 3n \right)$$

A<sub>i</sub>...interpopulační složka variance alelických frekvencí

B<sub>i</sub>...intrapopulační složka variance alelických frekvencí (mezi jedinci uvnitř každé populace)

C<sub>i</sub>...složka variance alelických frekvencí mezi gametami uvnitř každého jedince

P<sub>i</sub>...průměrná pozorovaná frekvence alely i

n...počet alel v lokusu

n<sub>p</sub>...počet lokalit

Rozdílné vypovídací schopnosti  $F_{ST}$  odhadnuté pomocí použitých metod jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 3.).

**Tabulka 3.** Srovnání použitých typů odhadu fixačního koeficientu.

	$0,00 < F_{ST} < 0,05$	$0,05 < F_{ST} < 0,10$	$F_{ST} > 0,10$
$F_{ST}(\theta)$	neodchýlen, variance silná	neodchýlen, variance střední	neodchýlen, variance slabá
$F_{ST}(RH)$	odchýlen, variance slabá	odchýlen, variance střední	odchýlen, variance silná
$F_{ST}(RH')$	neodchýlen, variance slabá	neodchýlen, variance střední	neodchýlen, variance silná

Testy významnosti sledovaných hodnot  $F_{IS}$  a  $F_{ST}$  byly uskutečněny provedením 20 000 permutací v souboru údajů.

Wright (1978) doporučil následující kvalitativní interpretaci  $F_{ST}$  (in Hartl et Clark 1997, 118 p.).

$0,00 < F_{ST} < 0,05$ ...nízká genetická diference

$0,05 < F_{ST} < 0,15$ ...střední genetická diference

$0,15 < F_{ST} < 0,25$ ...silná genetická diference

$F_{ST} > 0,25$ ... velmi silná genetická diference

Nutno podotknout, že způsoby výpočtu, které jsem použil se od původních značně liší. Stejně tak i získané výsledné hodnoty. Pro exaktní kvantifikaci míry diference by bylo nutné dané výsledky testovat, což v tomto případě není nezbytné.

Pomocí F statistiky byl proveden i formální test náhodného páření mezi oběma druhy, vyjádřený jako  $F_{IS}$ , do nějž byli zařazeni všichni analyzovaní jedinci, všechny lokusy (vyjma *GPI-2\**) a všechny lokality.

### 3.4. Detekce cytonukleární nerovnováhy

Pojmem cytonukleární nerovnováhy (disequilibria) rozumím nenáhodnou asociaci mezi jednotlivými genotypy diagnostických jaderných (nukleárních) lokusů a druhově specifickými variantami mitochondriálního (cytoplazmatického) genomu, jejíž kvantitativní a kvalitativní zhodnocení pomáhá charakterizovat hybridní populaci a odhalit zodpovědné evoluční procesy (Avisé 2001).

Dle Arnolda (1994) cytonukleární nerovnováhy představují nový nástroj k zjišťování: 1. hladin toku genů; 2. stáří reprodukčních bariér; 3. směrů hybridizace; 4. hladin výběrového páření (assortative mating); 5. mechanismů selekce hybridů.

Vztah mezi jadernými a cytoplazmatickými markery byl kvantifikován pomocí počítačového programu CND (Asmussen et Basten 1994, 1996; Basten et Asmussen 1997), který je volně přístupný na adrese: [http://statgen.ncsu.edu/brcwebsite/software\\_BRC.php](http://statgen.ncsu.edu/brcwebsite/software_BRC.php)

Provedeny byly výpočty koeficientů alelických nerovnováh:  $D^A_M = P^A_M - P^A P_M$  a analogicky i výpočty tří koeficientů genotypických nerovnováh:

$$D^{AA} = P^{AA}_M - P^{AA} P_M$$

$$D^{Aa} = P^{Aa}_M - P^{Aa} P_M$$

$$D^{aa} = P^{aa}_M - P^{aa} P_M$$

obdobně vyjadřujících nenáhodné asociace mezi každým nukleárním genotypem a oběma cytotypy (Asmussen et Basten 1994). Pro úplnost rovněž uvádím výsledky testu Hardy-Weinbergovy rovnováhy dle Weira (1990):  $D^A = P^{AA} - P^{A^2}$ . Písmeno  $D$  označuje koeficient nerovnováhy (disequilibrium),  $P$  označuje frekvenci. Horním indexem jsou označeny jaderné geny a dolním cytoplazmatické alely (cytotypy).

Vnitrodruhově polymorfní a plně diagnostické lokusy *Barb79* a *PGM-2\** byly upraveny dle doporučení Avisé (2001) tak, že alely specifické pro každý druh byly sdruženy, a lokusy byly zpracovány jako dialelické.

K interpretaci zjištěných cytonukleárních kombinací je rovněž použito jejich vynesení do 3x2 tabulky dle Avisé (2001).

### 3.5. Odvození původu jedince

U jedinců 1. filiální generace (F1) očekáváme heterozygotní stav alel ve všech plně diagnostických autozomálních lokusech. Zpětní kříženci (tzv. backcross; BC) mají některé plně diagnostické lokusy, specifické pro jeden ze zúčastněných druhů, v homozygotním stavu. Lze předpokládat, že při každém zpětném křížení, s tímtéž rodičovským druhem, se sníží počet alel v heterozygotním stavu o 50%. Následné generace hybridů (F) naopak mohou obsahovat homozygotní lokusy obou druhů. Jedinec vždy nese mateřskou mtDNA (Avisé 2001).

Procentická vyjádření podílů rodičovských genotypů ve výsledném hybridním genotypu, se kterými se lze často setkat v podobně zaměřených pracech, považují za zavádějící. Jedinec může snadno splňovat procentické kritérium pro očekávání F1 (0,5) a přitom nebýt heterozygotní ve všech plně diagnostických lokusech. Z tohoto důvodu se při klasifikaci hybridů o tento údaj opírat nebudu.

Boecklen et Howard (1997) dospěli k přesvědčení, že kombinace minimálně 4-5 plně diagnostických znaků (markerů) stačí k hrubé klasifikaci genotypové kompozice v hybridní zóně, ale více než 70 jich je nutných k odlišení čistých druhů od pokročilejších BC (4-5 generace) s relativně nízkým rizikem chyby (10%). Mnou zvolený počet markerů dle těchto autorů stačí, abych s 10% chybovostí odlišil BC 2 od rodičovských druhů. Riziko záměny BC 1 za F1, či rodičovský druh je mizivé ( $P=0,0039$ ).

Rieseberg et Randall Linder (1999) na základě experimentálního křížení různých druhů slunečnic (rod *Helianthus*) zjistili, že díky rozsáhlým chromozomovým přestavbám a následné silné endogenní i exogenní selekci na hybridní potomstvo, se zjišťované genotypy často výrazně liší od očekávaných. Většinou dochází k eliminaci nejvíce rekombinantních genotypů. Odvození rodokmenu pokročilých generací hybridů a zpětných kříženců je tedy obtížné až nemožné, bez ohledu na množství užitých molekulárních markerů.

## 4. Výsledky

### 4.1. Nukleární znaky

#### 4.1.1. Analýza lokusů kódujících proteiny

Celkem bylo analyzováno 5 enzymových systémů v 9 lokusech ve vzorcích somatické svaloviny a jaterní tkáň 273 jedinců parem (rod *Barbus*) z celkem 10 lokalit na Východním Slovensku, náležejících k úmořím Baltského a Černého moře.

##### 4.1.1.1. Distribuce alel

Z výsledných 9 lokusů je 5 plně diagnostických, monomorfních pro každý druh (*sMDH-2\**, *sMDH-3\**, *sMDH-4\**, *sMDH-5\**, *SOD-2\**), u *B. barbus* je polymorfní *PGM-1\**, a u *B. carpathicus* *LDH-A1\** (Šlechtová et al. 1993). Lokus *GPI-2\** je monomorfní u *B. carpathicus*, ale polymorfní u *B. barbus*, jelikož je však zároveň tetrasomický a často se v něm vyskytuje i alela, za stávajících podmínek elektroforeticky neodlišitelná od *B. carpathicus*, musel být z většiny analýz vyloučen. Vzácně se jako tetrasomický u obou druhů jeví i lokus *PGM-2\**.

Podíl polymorfních lokusů  $P = N_{0,95}/n$  činí u *B. carpathicus*: 0,11 u *B. barbus*: 0,33. Za účelem snadné detekce, co možná největšího množství introgredovaných alel, byly přednostně vybírány monomorfní plně diagnostické lokusy.

*GPI-2\** (dimer)

*B. carpathicus*: monomorfní, pouze alela 100 (F)

*B. barbus*: polymorfní, tetrasomický, 4 alely, z nichž nejčastější je za stávajících podmínek neodlišitelná od 100 (F).

*LDH-A1\** (tetramer)

*B. carpathicus*: polymorfní, vedle alely 100, která se vyskytovala častěji, se na většině lokalit objevovala i alela 200.

*B. barbus*: monomorfní, alela za stávajících podmínek neodlišitelná od 100.

*sMDH-1\** (dimer)

*B. carpathicus*: monomorfní, pouze alela 100

*B. barbus*: monomorfní, pouze alela 85

*sMDH-2\** (dimer)

*B. carpathicus*: monomorfní, pouze alela 100

*B. barbuis*: monomorfní, pouze alela 98

*sMDH-3\** (dimer)

*B. carpathicus*: monomorfní, pouze alela 100

*B. barbuis*: monomorfní, pouze alela 106

*sMDH-4\** (dimer)

*B. carpathicus*: monomorfní, pouze alela 100

*B. barbuis*: monomorfní, pouze alela 102

*PGM-1\** (monomer)

*B. carpathicus*: monomorfní, pouze alela 100

*B. barbuis*: polymorfní, 3 alely, z nichž jedna je za stávajících podmínek neodlišitelná od 100.

*PGM-2\** (monomer)

*B. carpathicus*: monomorfní ( $P_{0,05}$ ), alela 100, vzácná alela 70, pokud bychom vzali v úvahu celý vzorek (7 z 201 jedinců). V samotném povodí Dunaje je mnohem častější (4 z 24 jedinců). Na 1 % hranici ( $P_{0,01}$ ) jej lze považovat za polymorfní.

*B. barbuis*: polymorfní, alely 80, 90. V povodí Dunaje i 70, jako tetrasomická (2 jedinci- 1. hybrid, 1. v ostatních lokusech *B. barbuis*).

*SOD-2\** (dimer)

*B. carpathicus*: monomorfní, pouze alela 100

*B. barbuis*: monomorfní, pouze alela 50

#### 4.1.2. Analýza mikrosatelitu

Mikrosatelitový lokus *Barb79*

Čísla vyjadřují absolutní velikost fragmentu (bp). Mimo počtu repetic se druhy mohou lišit i v délce nerepetitivní sekvence. K ověření tohoto tvrzení by však bylo nutné jeho osekvenování.

*B. carpathicus*: polymorfní, 4 alely. Privátní alela povodí Dunaje 204. Alely společné oběma povodím: 208, 212, 216.

*B. barbuis*: polymorfní, 14 alel. Privátní alely povodí Dunaje: 223, 251, 255, 291. Exkluzivní alely v povodí Visly: 231, 235, 243, 259, 267, 275. Alely společné oběma povodím: 203, 227, 279, 283.

### 4.1.3. Genetická variabilita

Údaje charakterizující genetickou variabilitu jsou uvedeny v tabulkách 4. a 5.

**Tabulka 4.** Alelické frekvence polymorfních lokusů *Barbus carpathicus*.

Populace	Orlov	Andrejovka	Kurčín	Plaveč	Lubotinka	Stará Lubovňa	Hromoš	Hankovce*	Koškovce*	Sabinov*	
(N)	38	37	1	6	9	31	55	13	1	10	
<i>LDH-AI*</i>	100	0,4474	0,5135	0,0000	0,4167	0,5000	0,5806	0,4364	0,8846	1,0000	0,9500
	200	0,5526	0,4865	1,0000	0,5833	0,5000	0,4194	0,5636	0,1154	0,0000	0,0500
	H exp.	0,4945	0,4996	0	0,4861	0,5000	0,4870	0,4919	0,2041	0,0000	0,0950
	H n.b.	0,5011	0,5065	0,0000	0,5303	0,5294	0,4950	0,4964	0,2123	0,0000	0,1000
	H obs.	0,4211	0,4865	0,0000	0,5000	0,7778	0,3226	0,5455	0,2308	0,0000	0,1000
<i>Barb79</i>	204	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0385	0,5000	0,4000
	208	0,5789	0,6216	0,5000	0,5000	0,6667	0,7742	0,5909	0,8462	0,5000	0,5500
	212	0,3026	0,2973	0,5000	0,2500	0,2222	0,1935	0,2727	0,0769	0,0000	0,0500
	216	0,1184	0,0811	0,0000	0,2500	0,1111	0,0323	0,1364	0,0385	0,0000	0,0000
	H exp.	0,5592	0,5186	0,5000	0,6250	0,4938	0,3621	0,5579	0,2751	0,5000	0,5350
	H n.b.	0,5667	0,5257	1,0000	0,6818	0,5229	0,3681	0,5630	0,2862	1,0000	0,5632
	H obs.	0,6316	0,3784	1,0000	0,3333	0,6667	0,3871	0,5636	0,2308	1,0000	0,2000
celk.	H exp.	0,5268	0,5091	0,2500	0,5556	0,4969	0,4246	0,5249	0,2396	0,2500	0,3150
	H n.b.	0,5339	0,5161	0,5000	0,6061	0,5261	0,4315	0,5297	0,2492	0,5000	0,3316
	H obs.	0,5263	0,4324	0,5000	0,4167	0,72	0,3548	0,5545	0,2308	0,5000	0,1500
	P(0.95)	1,0000	1,0000	0,5000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,5000	1,0000
	P(0.99)	1,0000	1,0000	0,5000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,5000	1,0000
	Alel/lokus	2,5000	2,5000	1,5000	2,5000	2,5000	2,5000	2,5000	3,0000	1,5000	2,5000

\*) Lokality z povodí Dunaje

N .....počet jedinců

H exp. ....heterozygotnost očekávaná v případě, že se populace nachází v Hardy-Weinbergově rovnováze

H n.b. ....očekávaná heterozygotnost (H exp.) korigovaná (non biased) pro šikmost vzorkování (zvyšuje významnost haploidních hodnot:  $(2n-1)/(2n-2)$ )

H obs. ....pozorovaná heterozygotnost (vyjadřuje relativní zastoupení heterozygotů v jednotlivých populacích)

P .....poměr polymorfních lokusů, kde nejčastější alela dosahuje frekvence maximálně 95% (99%)

**Tabulka 5.** Alelické frekvence polymorfních lokusů *Barbus barbus*.

Populace	Orlov	Plaveč	Stará Ľubovňa	Hankovce*	Koškovce*	Sabinov*	
(N)	1	2	46	1	2	6	
<i>PGM-1*</i>	94	1,0000	0,7500	0,5326	0,0000	0,5000	0,0833
	96	0,0000	0,0000	0,2174	0,5000	0,0000	0,5833
	100	0,0000	0,2500	0,2500	0,5000	0,5000	0,3333
	H exp.	0,0000	0,3750	0,6066	0,5000	0,5000	0,5417
	H n.b.	0,0000	0,5000	0,6132	1,0000	0,6667	0,5909
	H obs.	0,0000	0,5000	0,5435	1,0000	1,0000	0,6667
<i>Barb79</i>	203	0,0000	0,5000	0,3261	0,5000	0,0000	0,0833
	223	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,3333
	227	0,0000	0,0000	0,0543	0,0000	0,2500	0,0000
	231	0,0000	0,0000	0,0435	0,0000	0,0000	0,0000
	235	0,0000	0,0000	0,0109	0,0000	0,0000	0,0000
	243	0,0000	0,0000	0,0326	0,0000	0,0000	0,0000
	251	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,0000
	255	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,3333
	259	0,0000	0,0000	0,0109	0,0000	0,0000	0,0000
	267	0,0000	0,0000	0,0109	0,0000	0,0000	0,0000
	275	0,5000	0,2500	0,1196	0,0000	0,0000	0,0000
	279	0,0000	0,0000	0,0435	0,0000	0,2500	0,0000
	283	0,5000	0,2500	0,3478	0,0000	0,0000	0,1667
	291	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0833
	H exp.	0,5000	0,6250	0,7502	0,5000	0,7500	0,7361
	H n.b.	1,0000	0,8333	0,7585	1,0000	1,0000	0,8030
H obs.	1,0000	1,0000	0,8261	1,0000	1,0000	0,1667	
celk.	H exp.	0,2500	0,5000	0,6784	0,5000	0,6250	0,6389
	H n.b.	0,5000	0,6667	0,6859	1,0000	0,8333	0,6970
	H obs.	0,5000	0,7500	0,6848	1,0000	1,0000	0,4167
	P(0.95)	0,5000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	P(0.99)	0,5000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Alel/lokus	1,5000	2,5000	6,5000	2,0000	3,0000	4,0000

\*) Lokality náležící do povodí Dunaje

N .....počet jedinců

H exp. ....očekávaná heterozygotnost

H n.b. ....korigovaná (non biased) heterozygotnost (H exp.)

H obs. ....pozorovaná heterozygotnost

P .....poměr polymorfních lokusů

#### 4.1.3.1. Průměrný počet alel v polymorfních lokusech

Průměrný počet alel na polymorfní lokus se v rámci jednotlivých populací u *B. barbus* pohyboval v rozmezí hodnot 1,5 - 6,5 v závislosti především na množství vzorků z populace. V rámci srovnatelně početných kolekcí je patrný větší počet alel u populací z povodí Dunaje. Relativně vysoký průměrný počet alel na lokus je způsoben mikrosatelitovým lokusem, který je u tohoto druhu vysoce variabilní. (Tabulka 5.)

Průměrný počet alel na polymorfní lokus se v rámci jednotlivých populací u *B. carpathicus* pohyboval v rozmezí hodnot 1,5 - 3. V povodí Dunaje je vyšší díky výskytu privátní mikrosatelitové alely o velikosti 204 bp. (Tabulka 4.)

#### 4.1.3.2. Průměrná heterozygotnost v polymorfních lokusech

Průměrná pozorovaná heterozygotnost v polymorfních lokusech *B. barbus* dosahovala hodnot 0,4167 - 1,0000. V nejpočetněji zastoupené populaci ze Staré Ľubovni (Poprad) takřka odpovídá očekávání (viz. test  $F_{IS}$  níže). Silný deficit pozorovaných heterozygotů oproti očekávaným byl detekován v mikrosatelitovém lokusu *Barb79* na lokalitě Sabinov v řece Torysa (Tabulka 5.; viz. také test  $F_{IS}$ ).

Průměrná pozorovaná heterozygotnost v polymorfních lokusech u *B. carpathicus* dosahovala hodnot 0,2308 - 0,7222. Nižší hodnoty vykazovaly lokality z povodí Dunaje, kde je rovněž nižší frekvence výskytu alely 200 lokusu *LDH-A1\**. Silný deficit pozorovaných heterozygotů oproti očekávaným byl detekován v mikrosatelitním lokusu *Barb79* na lokalitě Sabinov (Torysa). (Tabulka 4.)

#### 4.1.3.3. Vnitropopulační variabilita

Vnitropopulační variabilitu charakterizuje koeficient inbreedingu  $F_{IS}$  (dle Weira et Cockerhama 1984). Ačkoliv v řece Poprad nelze zamítnout nulovou hypotézu ( $H_0$ ), že se populace nachází v Hardy-Weinbergově rovnováze, pro lokality z povodí Dunaje to neplatí. Jak u *B. carpathicus* tak u *B. barbus* je evidentní, že je tato situace způsobil především silný deficit heterozygotů v kolekci z lokality Sabinov (viz. tabulky 4. a 5.). Celkové  $F_{IS}$  u *B. barbus* sice není signifikantní, ale pro lokus *Barb79* je dokonce na 0,1% hladině významnosti. (Tabulka 6.)

**Tabulka 6.** Charakteristika populací rodičovských druhů pomocí F statistiky. Hvězdičky udávají hladinu významnosti u statisticky průkazných hodnot.

		$F_{ST}(\theta)$	$F_{ST}(RH)$	$F_{ST}(RH')$	$F_{IS}(f)$	jedinců	lokali	alel
Poprad- <i>B. carpathicus</i>	<i>LDH-A1*</i>	-0,0009	-0,0009	-0,0009	0,0529	177	7	2
	<i>Barb79</i>	0,0006	0,0006	0,0006	0,0316	177	7	3
	celk.	-0,0002	0,0001	0,0001	0,0420	177	7	
Poprad- <i>B. barbuis</i>	<i>PGM-1*</i>	-0,0580	-0,0551	-0,0532	0,1238	49	3	3
	<i>Barb79</i>	-0,0696	-0,1472	2,5900	-0,0995	49	3	10
	celk.	-0,0644	-0,1305	2,1094	-0,0006	49	3	
Dunaj- <i>B. carpathicus</i>	<i>LDH-A1*</i>	-0,0462	-0,0462	-0,0462	-0,0436	24	3	2
	<i>Barb79</i>	0,1234	0,0355	0,06	0,4200**	24	3	4
	celk.	0,0832	0,0151	0,0334	0,2947*	24	3	
Dunaj- <i>B. barbuis</i>	<i>PGM-1*</i>	0,1434	0,1674	0,1844	-0,3023	9	3	3
	<i>Barb79</i>	-0,1675	-0,0699	0,0492	0,5362***	9	3	8
	celk.	-0,0247	-0,0171	0,0793	0,2143	9	3	
<i>B. barbuis</i>	<i>PGM-1*</i>	0,1028*	0,0910*	0,0923*	0,0665	58	6	3
	<i>Barb79</i>	0,0841*	0,0683*	0,6196	0,0001	58	6	14
	celk.	0,0924**	0,0713*	0,5493	0,0294	58	6	
<i>B. carpathicus</i>	<i>LDH-A1*</i>	0,0888***	0,0888***	0,0888***	0,0525	201	10	2
	<i>Barb79</i>	0,0306**	0,1317***	0,2089***	0,0699	201	10	4
	celk.	0,0591***	0,1210***	0,1788***	0,0617	201	10	
<i>B. barbuis</i> –Poprad versus Dunaj	<i>PGM-1*</i>	0,1306*	0,1076*	0,1129*	0,0679	58	6	3
	<i>Barb79</i>	0,1313***	0,0993***	3,5966***	-0,0066	58	6	14
	celk.	0,1310***	0,1004***	3,1321***	0,0264	58	6	
<i>B. carpathicus</i> –Poprad versus Dunaj	<i>LDH-A1*</i>	0,2865***	0,2865***	0,2865***	0,0488	201	10	2
	<i>Barb79</i>	0,0768**	0,2010***	1,0991***	0,0776	201	10	4
	celk.	0,1890***	0,2224***	0,8960***	0,0640	201	10	

\*) $P \leq 0,05$

\*\*)  $P \leq 0,01$

\*\*\*)  $P \leq 0,001$

$F_{ST}(\theta)$  ..... fixační koeficient (odhad dle Weira et Cockerhama 1984)

$F_{ST}(RH)$  ..... fixační koeficient (odhad dle Robertsona et Hilla 1984)

$F_{ST}(RH')$  ..... fixační koeficient (odhad dle Raufaste et Bonhomme 2000)

$F_{IS}(f)$  ..... koeficient inbreedingu (odhad dle Weira et Cockerhama 1984)

Poprad versus Dunaj ..... porovnání populací Popradského a Dunajského povodí, vzniklých smíšením vzorků ze všech lokalit daných povodí

#### 4.1.3.4. Variabilita mezi subpopulacemi

Variabilitu mezi subpopulacemi jsem hodnotil pomocí fixačního koeficientu  $F_{ST}$ , odhadovaného 3 různými způsoby, které však poskytly velmi podobné výsledky. Jednotlivé populace v rámci povodí se signifikantně neliší. Populace *B. carpathicus* z řeky Poprad je takřka uniformní. Naopak, na 0,1% hladině významnosti jsou vzájemně odlišné populace reprezentující různá povodí. Dle Wrighta (1978) by bylo možné populace *B. carpathicus* z Popradu charakterizovat jako silně diferenciované od populací dunajského povodí. Popradské populace *B. barbuis* lze označit jako středně diferenciované od populací povodí dunajského (Tabulka 6.). V případě podrobnější populačně genetické studie by bylo nutné tato tvrzení týkající se stupně diferenciace testovat. Pro účely této práce to však nepokládám za nezbytné.

#### 4.1.3.5. Formální test náhodného páření mezi oběma druhy

Výsledek formálního testu náhodného páření (random mating) mezi *B. carpathicus* a *B. barbuis*, který je jinak intuitivně patrný, je vyneseno v následující tabulce (Tabulka 7). Deficit heterozygotů (průkazné a kladné  $F_{IS}$ ) v řece Poprad, signifikantní na 5% hladině významnosti ( $P=0,019$ ), a těsně i na všech lokalitách dohromady ( $P=0,54$ ), je způsoben nízkým počtem hybridů. Naopak na kontrolních lokalitách v povodí Dunaje, kde byli selektivně vybíráni jedinci s morfologicky intermediálním fenotypem, nejen, že nemůžeme vyloučit, že populace leží v Hardy-Weinbergově rovnováze, ale dokonce je zde naznačen deficit homozygotů (záporné, leč neprůkazné  $F_{IS}$ ). V tomto případě jde však spíše o zhodnocení kvality vzorkování. Velmi významné rozdíly mezi subpopulacemi (průkazné  $F_{ST}$ ), jsou způsobeny různým procentuelním zastoupením obou druhů na jednotlivých lokalitách. (Tabulka 7.)

**Tabulka 7.** Formální test náhodného páření mezi *Barbus carpathicus* a *B. barbuis*.

populace	$F_{IS} (f)$	$F_{ST} (\theta)$	$F_{ST}(RH)$	$F_{ST}(RH^c)$	jedinců	lokalit
Poprad	0,0739*	0,6927***	0,3550***	1,0834***	230	7
Laborec	-0,1406	0,5648***	0,3179***	0,5609**	23	2
povodí Dunaje	-0,0338	0,5231***	0,2359***	0,3665*	43	3
všechny	0,0443*	0,6566***	0,2963***	1,3726*	273	10

\*) $P \leq 0,05$

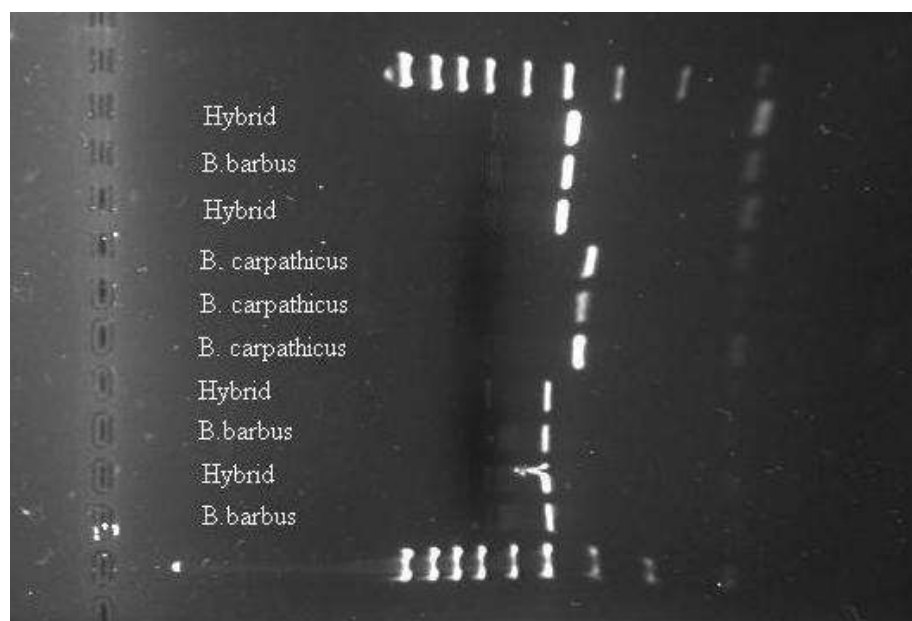
\*\*) $P \leq 0,01$

\*\*\*) $P \leq 0,001$

## 4.2. Mitochondriální DNA

Introgrese druhově specifické mtDNA nebyla detekována ani v jednom směru. Všichni hybridní jedinci nesli mtDNA *B. barbus*. Z diagnostických restričních endonukleáz se z technických důvodů nejlépe osvědčil Msp I (Obrázek 6.)

**Obrázek 6.** Výsledky štěpení mtDNA *Barbus carpathicus*, *B. barbus* a všech hybridních jedinců z řeky Poprad diagnostickým restričním enzymem Msp I.



### 4.3. Cytonukleární nerovnováhy

Hodnoty jednotlivých koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) a výsledky testů významnosti jsou uvedeny v tabulkách. Jako normalizovaná ( $D$ ) v nich označuji ( $\tilde{D}$ ) upravená s využitím marginálních hodnot (maximálních teoretických hodnot vzhledem k genotypovým frekvencím v souboru) a jsou konečným výstupem testu (Asmussen et Basten 1994). Střední chybou ( $H_0$ ) mám na mysli střední chybu odhadu za předpokladu, že platí nulová hypotéza ( $D = 0$ ; populace se nachází v cytonukleární rovnováze). Střední chybou ( $H_1$ ) je střední chyba odhadu za předpokladu, že platí alternativní hypotéza ( $D \neq 0$ ). Testová statistika ( $n\tilde{r}^2$ ) je tradičně užívána při zjišťování průkaznosti koeficientů nerovnováhy. Má přibližně distribuci  $\chi^2$  (Asmussen et Basten 1994). V testu na 0,05 hladině významnosti tedy zamítáme  $H_0$  ( $D = 0$ ), je-li  $n\tilde{r}^2 > 3,84$  (získanou hladinu významnosti ukazuje kolonka Pravděpodobnost). Exaktní pravděpodobnost udává hladinu pravděpodobnosti  $H_0$  ( $D = 0$ ) zjištěnou na základě Fischerova exaktního testu. Kolonky MSSa ( $\beta = 0,1$ ) / MSSa ( $\beta = 0,5$ ) vyjadřují minimální velikosti vzorku (Minimal Sample Size) při  $\alpha = 0,05$ ; přičemž  $\alpha$  = pravděpodobnost výskytu chyby I.druhu (zamítnutí  $H_0$  za předpokladu, že platí),  $\beta$  = pravděpodobnost výskytu chyby II.druhu (nezamítnutí  $H_0$ ).

#### 4.3.1. Povodí Popradu

Hodnoty jednotlivých koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) a výsledky testů významnosti jsou uvedeny v tabulkách 8-10.

Vzorek tvoří 230 jedinců. Frekvence alely A (plně diagnostické pro *B. barbuis*) (pA) je u lokusů *MDH-1\**, *MDH-2\**, *MDH-3\**, *SOD-2\** rovna 0,23. U *MDH-4\**, *PGM-2\** a *Barb79* je rovna 0,22. Frekvence (pM) cytotypu charakteristického pro *B. barbuis* označovaného zde jako M je rovna 0,23. Zhruba 21% všech palem ulovených v řece Poprad tvoří zástupci čisté *B. barbuis*, nebo pokročilé generace hybridů (více než třetí generace), které takřka není možné zachytit. Asi 2% jsou zachycení hybridy s mtDNA *B. barbuis* a konečně 77% jsou zástupci *B. carpathicus*, patrně pouze čisté linie.

Hodnoty všech koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) jsou signifikantní ( $P \leq 0,05$ ). Patrně jsou drobné odlišnosti mezi lokusy, způsobené přítomností BC. Minimální počty jedinců s příslušným genotypem nezbytné k detekci nerovnováh byly dodrženy na hladině  $\beta = 0,5$ . Zjištěné hodnoty jednotlivých cytonukleárních nerovnováh ukazují, že hybridizace je

jednosměrná, ovlivněná pohlavím (viz. interpretace níže). Dochází k introgresi alel *B. carpathicus* do genofondu *B. barbuis*.

**Tabulka 8.** Hodnoty koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) v povodí Popradu pro lokusy *MDH-1\**, *MDH-2\**, *MDH-3\**, *SOD-2\** a mtDNA s výsledky testů významnosti.

Koeficient nerovnováhy	$D^A$	$D^{AA}_M$	$D^{Aa}_M$	$D^{aa}_M$	$D^A_M$
Odhadnuté ( $\tilde{D}$ )	0,1706	0,1706	0,0067	-0,1773	0,1740
Normalizované ( $D$ )	0,9752	1,0000	1,0000	-1,0000	1,0000
Střední chyba ( $H_0$ )	0,0115	0,0115	0,0026	0,0117	0,0183
Střední chyba ( $H_1$ )	0,0151	0,0151	0,0047	0,1497	0,0149
Testová statistika ( $n\tilde{r}^2$ )	218,7000	218,8000	6,7380	230,0000	90,8400
Pravděpodobnost	0,0000	0,0000	0,0344	0,0000	0,0000
Exaktní pravděpodobnost	-0,0100	0,0000	0,0523	0,0000	0,0000
MSSa ( $\beta = 0.1$ )	14	14	626	13	23
MSSa ( $\beta = 0.5$ )	4	4	131	4	10

AA:Aa:aa = 51:2:177

**Tabulka 9.** Hodnoty koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) v povodí Popradu pro lokusy *MDH-4\**, *Barb79* a mtDNA s výsledky testů významnosti.

Koeficient nerovnováhy	$D^A$	$D^{AA}_M$	$D^{Aa}_M$	$D^{aa}_M$	$D^A_M$
Odhadnuté ( $\tilde{D}$ )	0,1673	0,1673	0,0100	-0,1773	0,1723
Normalizované ( $D$ )	0,9625	1,0000	1,0000	-1,0000	1,0000
Střední chyba ( $H_0$ )	0,0115	0,0115	0,0032	0,0117	0,0181
Střední chyba ( $H_1$ )	0,0152	0,0152	0,0057	0,0150	0,0148
Testová statistika ( $n\tilde{r}^2$ )	213,1000	213,4000	10,1500	230,0000	90,6500
Pravděpodobnost	0,0000	0,0000	0,0062	0,0000	0,0000
Exaktní pravděpodobnost	-0,0100	0,0000	0,0117	0,0000	0,0000
MSSa ( $\beta = 0.1$ )	14	14	414	13	23
MSSa ( $\beta = 0.5$ )	4	4	87	4	10

AA:Aa:aa = 50:3:177

**Tabulka 10.** Hodnoty koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) v povodí Popradu pro lokus *PGM-2\** a mtDNA s výsledky testů významnosti.

Koeficient nerovnováhy	$D^A$	$D^{AA}_M$	$D^{Aa}_M$	$D^{aa}_M$	$D^A_M$
Odhadnuté ( $\tilde{D}$ )	0,1639	0,1640	0,0134	-0,1773	0,1706
Normalizované ( $D$ )	0,9496	1,0000	1,0000	-1,0000	1,0000
Střední chyba ( $H_0$ )	0,0114	0,0114	0,0036	0,0117	0,0179
Střední chyba ( $H_1$ )	0,0153	0,0153	0,0065	0,0150	0,0148
Testová statistika ( $n\tilde{r}^2$ )	207,4000	207,9000	13,5900	230,0000	90,4700
Pravděpodobnost	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000
Exaktní pravděpodobnost	-0,0100	0,0000	0,0026	0,0000	0,0000
MSSa ( $\beta = 0.1$ )	15	15	308	13	23
MSSa ( $\beta = 0.5$ )	4	4	65	4	10

AA:Aa:aa = 49:4:177

#### 4.3.2. Povodí Dunaje

Hodnoty jednotlivých koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) a výsledky testů významnosti jsou uvedeny v tabulkách 11-12.

Vzorek tvoří 43 jedinců. Frekvence alely A (plně diagnostické pro *B. barbuis*) (pA) je u lokusů *MDH-1\**, *MDH-3\**, *PGM-2\**, *SOD-2\** a *Barb79* rovna 0,33. U *MDH-2\** a *MDH-4\** je rovna 0,34. Frekvence cytotypu M (charakteristického pro *B. barbuis*) (pM) je rovna 0,44.

Hodnoty všech koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) jsou signifikantní ( $P \leq 0,01$ ). Patrné jsou drobné odlišnosti mezi lokusy, způsobené přítomností BC. Minimální počet vzorků byl dodržen na hladině  $\beta = 0,5$ . Pro lokusy *MDH-2\**, *MDH-4\** byl dodržen dokonce na hladině  $\beta = 0,1$ . Zjištěné koeficienty ( $D$ ) ukazují, že hybridizace je jednosměrná, ovlivněná pohlavím a vede k introgresi alel *B. carpathicus* do genofondu *B. barbuis*.

**Tabulka 11.** Hodnoty koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) v povodí Dunaje pro lokusy *MDH-1\**, *MDH-3\**, *PGM-2\**, *SOD-2\**, *Barb79* a mtDNA s výsledky testů významnosti.

Koeficient nerovnováhy	$D^A$	$D^{AA}_M$	$D^{Aa}_M$	$D^{aa}_M$	$D^A_M$
Odhadnuté ( $\tilde{D}$ )	0,1033	0,1168	0,1298	-0,2466	0,1817
Normalizované ( $D$ )	0,4704	1,0000	1,0000	-1,0000	1,0000
Střední chyba ( $H_0$ )	0,0335	0,0308	0,0320	0,0376	0,0329
Střední chyba ( $H_1$ )	0,0341	0,0286	0,0286	0,0088	0,0155
Testová statistika ( $n\tilde{r}^2$ )	9,5170	14,3800	16,4600	43,0000	30,4700
Pravděpodobnost	0,0086	0,0008	0,0003	0,0000	0,0000
Exaktní pravděpodobnost	-0,0100	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000
MSSa ( $\beta = 0.1$ )	48	30	25	5	9
MSSa ( $\beta = 0.5$ )	17	11	10	4	5

AA:Aa:aa = 9:10:24

**Tabulka 12.** Hodnoty koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) v povodí Dunaje pro lokusy *MDH-2\**, *MDH-4\** a mtDNA s výsledky testů významnosti.

Koeficient nerovnováhy	$D^A$	$D^{AA}_M$	$D^{Aa}_M$	$D^{aa}_M$	$D^A_M$
Odhadnuté ( $\tilde{D}$ )	0,1188	0,1298	0,1168	-0,2466	0,1882
Normalizované ( $D$ )	0,5318	1,0000	1,0000	-1,0000	1,0000
Střední chyba ( $H_0$ )	0,0341	0,0320	0,0308	0,0376	0,0340
Střední chyba ( $H_1$ )	0,0336	0,0286	0,0286	0,0088	0,0156
Testová statistika ( $n\tilde{r}^2$ )	12,1600	16,4600	14,3800	43,0000	30,6100
Pravděpodobnost	0,0023	0,0003	0,0008	0,0000	0,0000
Exaktní pravděpodobnost	-0,0100	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000
MSSa ( $\beta = 0.1$ )	37	25	30	5	9
MSSa ( $\beta = 0.5$ )	14	10	11	4	5

AA:Aa:aa = 10:9:24

### 4.3.3. Obě povodí dohromady

Hodnoty jednotlivých koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) a výsledky testů významnosti jsou uvedeny v tabulkách 13-16.

Vzorek tvoří 273 jedinců. Frekvence alely A (plně diagnostické pro *B. barbuis*) ( $p_A$ ) je u všech lokusů rovna 0,24. Plně diagnostickou alelu *B. carpathicus* označují „a“. Frekvence cytotypu M (charakteristického pro *B. barbuis*) ( $p_M$ ) je rovna 0,26. Přibližně 22% analyzovaných jedinců tvoří zástupci čisté *B. barbuis*, nebo pokročilé generace hybridů (více než třetí generace), které takřka není možné zachytit. Zhruba 4% jsou zachycení hybridy s mtDNA *B. barbuis* a konečně 74% jsou zástupci *B. carpathicus*, patrně pouze čisté linie.

Hodnoty všech koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) jsou průkazně odlišné od nuly ( $P \leq 0,01$ ). Patrně jsou drobné odlišnosti mezi lokusy v normalizovaném  $D^A$ , způsobené přítomností BC. Minimální počet vzorků byl dodržen na hladině  $\beta = 0,1$ . Zjištěné hodnoty koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) ukazují, že přirozená hybridizace je jednosměrná, ovlivněná pohlavím. Patrně dochází k introgresi pouze alel *B. carpathicus* do genofondu *B. barbuis*.

**Tabulka 13.** Hodnoty koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) pro lokus *Barb79* a mtDNA s výsledky testů významnosti.

Koeficient nerovnováhy	$D^A$	$D^{AA_M}$	$D^{Aa_M}$	$D^{aa_M}$	$D^A_M$
Odhadnuté ( $\tilde{D}$ )	0,1586	0,1591	0,0351	-0,1942	0,1766
Normalizované ( $D$ )	0,8694	1,0000	1,0000	-1,0000	1,0000
Střední chyba ( $H_0$ )	0,0110	0,0110	0,0057	0,0118	0,0161
Střední chyba ( $H_1$ )	0,0137	0,0136	0,0091	0,0126	0,0123
Testová statistika ( $n\tilde{r}^2$ )	206,4000	210,1000	38,1100	273,0000	120,5000
Pravděpodobnost	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Exaktní pravděpodobnost	-0,0100	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
MSSa ( $\beta = 0.1$ )	17	16	115	11	20
MSSa ( $\beta = 0.5$ )	5	5	28	4	9

AA:Aa:aa = 59:13:201

**Tabulka 14.** Hodnoty koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) pro lokus  $MDH-2^*$  a mtDNA s výsledky testů významnosti.

Koeficient nerovnováhy	$D^A$	$D^{AA}_M$	$D^{Aa}_M$	$D^{aa}_M$	$D^A_M$
Odhadnuté ( $\tilde{D}$ )	0,1641	0,1645	0,0297	-0,1942	0,1793
Normalizované ( $D$ )	0,8907	1,0000	1,0000	-1,0000	1,0000
Střední chyba ( $H_0$ )	0,0112	0,0111	0,0052	0,0118	0,0163
Střední chyba ( $H_1$ )	0,0136	0,0135	0,0085	0,0126	0,0124
Testová statistika ( $n\tilde{r}^2$ )	216,6000	219,2907	31,9976	273,0000	120,8000
Pravděpodobnost	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Exaktní pravděpodobnost	-0,0100	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
MSSa ( $\beta = 0.1$ )	16	15	138	11	19
MSSa ( $\beta = 0.5$ )	5	5	33	4	9

AA:Aa:aa = 61:11:201

**Tabulka 15.** Hodnoty koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) pro lokusy  $MDH-1^*$ ,  $MDH-3^*$ ,  $MDH-4^*$ ,  $SOD-2^*$  a mtDNA s výsledky testů významnosti.

Koeficient nerovnováhy	$D^A$	$D^{AA}_M$	$D^{Aa}_M$	$D^{aa}_M$	$D^A_M$
Odhadnuté ( $\tilde{D}$ )	0,1613	0,1618	0,0324	-0,1942	0,1780
Normalizované ( $D$ )	0,8801	1,0000	1,0000	-1,0000	1,0000
Střední chyba ( $H_0$ )	0,0111	0,0110	0,0055	0,0118	0,0162
Střední chyba ( $H_1$ )	0,0136	0,0135	0,0088	0,0126	0,0123
Testová statistika ( $n\tilde{r}^2$ )	211,5000	214,6831	35,0402	273,0000	120,6000
Pravděpodobnost	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Exaktní pravděpodobnost	-0,0100	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
MSSa ( $\beta = 0.1$ )	16	16	126	11	19
MSSa ( $\beta = 0.5$ )	5	5	30	4	9

AA:Aa:aa = 60:12:201

**Tabulka 16.** Hodnoty koeficientů nerovnováhy ( $D$ ) pro lokus  $PGM-2^*$  a mtDNA s výsledky testů významnosti.

Koeficient nerovnováhy	$D^A$	$D^{AA}_M$	$D^{Aa}_M$	$D^{aa}_M$	$D^A_M$
Odhadnuté ( $\tilde{D}$ )	0,1558	0,1564	0,0378	-0,1942	0,1753
Normalizované ( $D$ )	0,8587	1,0000	1,0000	-1,0000	1,0000
Střední chyba ( $H_0$ )	0,0110	0,0109	0,0059	0,0118	0,0160
Střední chyba ( $H_1$ )	0,0137	0,0136	0,0094	0,0126	0,0123
Testová statistika ( $n\tilde{r}^2$ )	201,3000	205,6000	41,2000	273,0000	120,4000
Pravděpodobnost	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Exaktní pravděpodobnost	-0,0100	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
MSSa ( $\beta = 0.1$ )	17	17	106	11	20
MSSa ( $\beta = 0.5$ )	5	5	25	4	9

AA:Aa:aa = 58:14:201

#### 4.3.4. Interpretace dle Avise

Výsledek zakreslený do 3x2 tabulky (Tabulka 17.) dle Avise (2001), je společný všem plně diagnostickým lokusům pro obě povodí. Pozornost si zasluhuje absence genotypu  $M^{aa}$  (tj. jaderného genotypu homozygotního pro alelu *B. carpathicus* v kombinaci s mtDNA specifickou pro *B. barbuis*) ve všech lokusech, což znamená nepřítomnost F2 generace. Tento stav bývá interpretován jako důkaz pro sterilitu jednoho pohlaví hybridů zamezující křížení hybridů F1 generace mezi sebou. Stejně tak i absence  $m^{AA}$ , která navíc v kombinaci s absencí  $m^{Aa}$  značí striktní jednosměrnost hybridizace.

**Tabulka 17.** 3x2 tabulka dle Avise (2001) společná všem plně diagnostickým jaderným lokusům pro obě povodí.

	AA	Aa	aa
M	++	++	<b>0</b>
m	<b>0</b>	<b>0</b>	++

$$D_M^{AA}; D_M^{Aa}; D_M^{aa}; D_M^A \neq 0$$

++ .....pozorovaných genotypů je více než předpokládaných (průkazná kladná D)

0 .....absence genotypu v této buňce

#### 4.4. Hybridní genotypy

Pomocí cytonukleárních genetických markerů bylo celkem detekováno 14 hybridních jedinců. Zastoupení hybridů i rodičovských druhů na jednotlivých lokalitách ukazuje Tabulka 18.

**Tabulka 18.** Počty jedinců *Barbus carpathicus*, *B. barbuis* a hybridů dle zjištěných genotypů na jednotlivých lokalitách.

povodí	řeka	lokalita	<i>B.barbus</i> (ks)	<i>B.carpathicus</i> (ks)	hybridi
Visla	Poprad	Orlov	1	38	0
		Andrejovka	0	37	0
		Kurčín	0	1	0
		Plaveč	2	6	0
		Ľubotinka	0	9	0
		Stará Ľubovňa	46	31	4
		Hromoš	0	55	0
Dunaj	Laborec	Hankovce	1	13	3
		Koškovce	2	1	3
	Torysa	Sabinov	6	10	4

Tyto výsledky se poněkud liší od předpokladů založených na hrubé morfologii (Tabulka 1.). Na lokalitě Orlov byli 3 jedinci, jejichž fenotyp v cytonukleárních markerech odpovídá očekávání pro *B. carpathicus*, určení podle hrubé morfologie jako hybridi. Na lokalitě Plaveč je situace u jednoho jedince obdobná. Pomocí diagnostických jaderných markerů byli zjištěni 4 hybridi, dle hrubé morfologie určení jako *B. barbuis*, na lokalitě Stará Ľubovňa. Jeden hybrid v Hankovcích, jehož kombinace jaderných znaků splňuje očekávání pro F1, byl určen dle hrubé morfologie jako *B. barbuis*. Na lokalitách Koškovce a Sabinov se předpoklady hrubé morfologie shodují se zjištěným genotypem.

Konkrétní elektroforetické fenotypy, z nichž lze usuzovat genotyp, všech zjištěných hybridů na jednotlivých lokalitách ukazuje Tabulka 19. Celkově sice výrazně převažují hybridi 1. filiální generace (11 jedinců F1: 2 BC1: 1 BC2), na samotné řece Poprad je však situace mnohem vyrovnanější (2 F1: 1 BC1: 1 BC2).

**Tabulka 19.** Konkrétní elektroforetické fenotypy všech zjištěných hybridů ve všech analyzovaných nukleárních lokusech. Tučně jsou vyneseny alely specifické pro *Barbus carpathicus*. Plně diagnostické lokusy jsou označeny zkratkou P.D.

Lokalita	Hybrid	Izoenzymové lokusy									Mikrosatelit
		<i>LDH-A1</i> *	<i>sMDH-1</i> *	<i>sMDH-2</i> *	<i>sMDH-3</i> *	<i>sMDH-4</i> *	<i>GPI-2</i> *	<i>PGM-1</i> *	<i>PGM-2</i> *	<i>SOD-2</i> *	<i>Barb79</i>
			P.D.	P.D.	P.D.	P.D.			P.D.	P.D.	P.D.
Stará Lubovňa (Poprad)	BC1	100/100	85/85	98/98	106/106	<b>100/102</b>	2F2S	94/100	<b>90/100</b>	50/50	203/ <b>212</b>
	BC2	100/100	85/85	98/98	106/106	102/102	2F2S	96/100	<b>90/100</b>	50/50	275/283
	F1	100/ <b>200</b>	85/ <b>100</b>	98/ <b>100</b>	<b>100/106</b>	<b>100/102</b>	2F2S	100/100	<b>90/100</b>	50/ <b>100</b>	<b>208/275</b>
	F1	100/ <b>200</b>	85/ <b>100</b>	98/ <b>100</b>	<b>100/106</b>	<b>100/102</b>	2F2F <sup>f</sup>	100/100	<b>90/100</b>	50/ <b>100</b>	<b>212/284</b>
Hankovce (Laborec)	F1	100/ <b>200</b>	85/ <b>100</b>	98/ <b>100</b>	<b>100/106</b>	<b>100/102</b>	1S3F	96/100	<b>90/100</b>	50/ <b>100</b>	<b>212/223</b>
	F1	100/100	85/ <b>100</b>	98/ <b>100</b>	<b>100/106</b>	<b>100/102</b>	1S3F	100/100	<b>90/100</b>	50/ <b>100</b>	203/ <b>208</b>
	BC1	100/100	85/ <b>100</b>	98/98	<b>100/106</b>	102/102	1S3F	94/94	<b>90/100</b>	50/ <b>100</b>	<b>212/223</b>
Koškovce (Laborec)	F1	100/100	85/ <b>100</b>	98/ <b>100</b>	<b>100/106</b>	<b>100/102</b>	1Sf3F	96/100	<b>90/100</b>	50/ <b>100</b>	203/ <b>208</b>
	F1	100/100	85/ <b>100</b>	98/ <b>100</b>	<b>100/106</b>	<b>100/102</b>	4F	94/100	<b>90/100</b>	50/ <b>100</b>	<b>212/223</b>
	F1	100/100	85/ <b>100</b>	98/ <b>100</b>	<b>100/106</b>	<b>100/102</b>	1S3F	96/100	<b>90/100</b>	50/ <b>100</b>	<b>216/255</b>
Sabinov (Torysa)	F1	100/100	85/ <b>100</b>	98/ <b>100</b>	<b>100/106</b>	<b>100/102</b>	1S3F	100/100	<b>90/100</b>	50/ <b>100</b>	203/ <b>208</b>
	F1	100/100	85/ <b>100</b>	98/ <b>100</b>	<b>100/106</b>	<b>100/102</b>	1S3F	96/100	<b>90/100</b>	50/ <b>100</b>	<b>204/247</b>
	F1	100/100	85/ <b>100</b>	98/ <b>100</b>	<b>100/106</b>	<b>100/102</b>	4F	94/100	<b>90/100</b>	50/ <b>100</b>	<b>204/259</b>
	F1	100/100	85/ <b>100</b>	98/ <b>100</b>	<b>100/106</b>	<b>100/102</b>	1S3F	96/100	<b>90/100</b>	50/ <b>100</b>	<b>208/259</b>

## 5. Diskuse

### 5.1. Populačně-genetická charakteristika populací

U populací obou druhů parem z řeky Poprad nelze zamítnout, že se nachází v Hardy-Weinbergově rovnováze. Nejsou průkazné rozdíly mezi jednotlivými subpopulacemi. Formální test potvrdil, že tok genů mezi oběma druhy je omezený. Zastoupení hybridních jedinců v popradské populaci parem je mizivé (1,74%). Odhady nerovnováh mezi jadernými a cytoplazmatickými znaky ukázaly, že hybridizace je pouze jednosměrná. Přestože tedy k mezidruhovému křížení dochází, mé výsledky ukazují, že hybridizace nenarušuje integritu jednotlivých druhů. Zdá se, že k introgresi do genomu *B. carpathicus* vůbec nedochází.

Populace obou druhů parem z řeky Poprad se průkazně liší ( $F_{ST} > 0$ ) od konspecifických populací z povodí Bodrogu (Dunaje). Rozdíly jsou patrné nejen v různých frekvencích výskytu jednotlivých alel. Výskyt privátní mikrosatelitové alely v populacích *B. carpathicus* z povodí Bodrogu může být interpretován jako důsledek průběhu kolonizace povodí Visly tímto druhem z povodí Dunaje (Kotlík et Berrebi 2002). Ačkoliv populace *B. barbuis* obou povodí obsahují privátní alely, ve vzorcích z povodí Bodrogu srovnatelné velikosti je jich detekováno větší množství. Tento fakt rovněž podporuje výše zmíněnou představu postglaciální kolonizace povodí Visly (Kotlík et Berrebi 2001).

Pouze na základě formálního testu, který porovnává alelické frekvence jaderných genů, nelze zamítnout  $H_0$  (absenci reprodukčně izolačních mechanismů) na lokalitách z povodí Bodrogu, což je pravděpodobně způsobeno cíleným obohacením vzorku o hybridní jedince (viz. Materiál).

Na většině lokalit nelze zamítnout, že populace obou druhů leží v Hardy-Weinbergově rovnováze. Nadbytek homozygotů obou druhů, v mikrosatelitovém lokusu *Barb79*, na lokalitě Sabinov způsobil signifikantní kladný koeficient inbreedingu  $F_{IS}$ , který ukazuje na nenáhodné páření s velmi blízkými příbuznými jedinci.

1. Tento jev mohl být vyvolán nedávným drastickým zásahem do místní populace, který rapidně snížil její velikost (například otrava). Nasvědčuje tomu obdobná situace u obou druhů. K redukci populace by muselo dojít nedávno, neboť jinak by se obnovila rovnováha. Obdobně krátkodobě by také mohla zapůsobit fragmentace populace vybudováním nepřilíh vzdálených vodních staveb.

2. Může jít o artefakt vzorkování, celkově nepříliš vysoké počty jedinců a současně vysokou variabilitu mikrosatelitového lokusu. Na ostatních lokalitách, kde byly vzorky vybírány stejným způsobem, se ale s takovýmto efektem neseťkávám. Proto nepokládám toto vysvětlení za příliš pravděpodobné.

3. Pozitivní výběrové páření, které by mohlo mít podobný efekt (Nei 1987; Hartl et Clark 1997), mi v kontextu charakteristik třetího systému páření (Baras 1994; Poncin et al. 1994) a výskytu hybridů přijde nepravděpodobné.

4. Odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy může způsobit i selekce (Nei 1987; Weir 1996). Mikrosatelitové lokusy, jakožto nekódující sekvence však bývají považovány za neutrální markery, na něž selekce příliš nepůsobí. Jejich frekvenci ale může ovlivňovat molekulární tah genů, s nimiž jsou ve vazbě (Rieseberg et Randall Linder 1999). Situace na ostatních lokalitách však představuje negativní selekce proti heterozygotům, ani pozitivní selekce ve prospěch homozygotů nijak nepodporují.

5. Mohlo by jít rovněž o výskyt tzv. „nulové alely“ jejíž přítomnost by vizuálně způsobila exces homozygotů, neboť jedinci u nichž by byla v heterozygotním stavu by byli mylně považováni za homozygoty pro druhý lokus. Vzhledem k tomu, že se u žádného jedince nevyskytla v homozygotním stavu a zároveň by byla přítomna u obou druhů, nepokládám za nutné tuto hypotézu testovat a považuji ji za nepravděpodobnou.

## 5.2. Hybridní situace u parem rodu *Barbus*

Nejpodrobněji se obdobným případem hybridizace, který nese spoustu společných rysů, zaobírali ve Francii, kde se kříží *B. barbuis* a *B. meridionalis*, což vedlo k nahromadění množství údajů o zodpovědných evolučních procesech (Berrebi et al. 1993; Daryus et Berrebi 1993; Chenuil et al. 2000). Berrebi et al. (1993), přestože nepoužili cytoplazmatický marker, ve své studii zjistili, že se v hybridní populaci nevyskytoval žádný jedinec ani jednoho čistého druhu nebo F1, ale obsahovala mnohem víc alel specifických pro *B. barbuis*. Toto zjištění splňuje předpoklady asymetrické hybridizace a introgrese do *B. barbuis* a podporují její morfologická data (Daryus et Berrebi 1993; Crespin et Berrebi 1999).

Rheofilní parma *B. meridionalis* je fylogeneticky relativně blízce příbuzná *B. carpathicus*. Kotlík et Berrebi (2002) uvádí, že se jejich předci oddělili na přelomu Pliocénu a Miocénu, před asi 5ti miliony let. Proto budu své výsledky podrobněji srovnávat s údaji publikovanými pro hybridní populace *B. barbuis* a *B. meridionalis* ve Francii.

### 5.2.1. Scénář hybridizace *Barbus barbuis* a *B. carpathicus*

Jelikož všichni hybridi obsahovali mtDNA specifickou pro *B. barbuis*, je možný pouze jeden způsob vzniku F1: 1. *B. carpathicus* ♂ + *B. barbuis* ♀. Naskýtají se však dvě možnosti vzniku zjištěných BC k *B. barbuis*: 1. F1 ♂ + *B. barbuis* ♀; 2. *B. barbuis* ♂ + F1 ♀. Zjištěná situace je společná oběma povodím.

#### 5.2.1.1. Možné důvody zjištěné situace

##### 5.2.1.1.1. Etologický

Mezidruhovému křížení *B. carpathicus* ♀ + *B. barbuis* ♂ mohou bránit silné behaviorální bariéry.

Gougnard et al. (1987) popsal specifické třetí chování francouzských *B. barbuis* v akváriu: „Jikernačka se zvedá od šterkovitého dna, pohybuje genitální papilou v substrátu, okázale roztahuje pektorální a ventrální ploutve, protahuje hubu a rozevívá skřele. Obdobně se chovající samci nedaleko uvolňují sperma.“ Toto chování se může mnohokrát opakovat. Poncin et al. (1994) udávají pozorované maximum 284 během 11 hod. Dle těchto autorů, tomuto popisu přesně odpovídá i chování francouzských *B. meridionalis*. Během výtěru se však u *B. barbuis* vyskytuje i zvláštní typ chování, kdy jedinci opačného pohlaví, ale i pouze samci, plavou vysokou rychlostí hlavami proti sobě (Gougnard et al. 1987). Tento typ chování

u *B. meridionalis* Poncin et al. (1994) nepozorovali, ani když se samci *B. barbuis* snažili toto chování u samic *B. meridionalis* indukovat. Přesto v akváriích úspěšně docházelo k výtěrům ve všech kombinacích.

Co se týče interpretace jejich výsledků, musím však podotknout, že všechny ryby byly k výtěru hormonálně stimulovány. Rovněž byli vybíráni nadstandardně velcí jedinci *B. meridionalis* (DT  $\approx$  205 ♀; 112 ♂).

Z tohoto důvodu pokládám existenci **silných** behaviorálních bariér, které by bránili mezidruhovému křížení *B. carpathicus* ♀ + *B. barbuis* ♂, za nepřilíš pravděpodobnou.

Situace v přírodě se ale může od experimentálních podmínek velmi lišit (Wirtz 1999). U obou druhů se vyskytuje délkový pohlavní dimorfismus. Velká *B. barbuis* ♀ může na drobného *B. carpathicus* ♂ působit jako superatraktant a malé rozměry mu mohou pomoci proniknout k samici, již okupované dvořícími se samci, a prosadit se tak oproti rozměrnějším „příživným“ samcům *B. barbuis*. U *B. barbuis* je délkový pohlavní dimorfismus ještě mnohem markantnější. Je tedy možné, že samce *B. barbuis* relativně malá *B. carpathicus* ♀ nepřitahuje, neboť srovnatelně velké *B. barbuis* ♀ ještě nedosáhly pohlavní dospělosti.

#### 5.2.1.1.2. Ekologický

Předpokládám-li, že druhy mají primárně oddělená trdlišť, znamená to, že *B. carpathicus* ♂ pronikají na trdlišť *B. barbuis* a úspěšně se zde vytírají. Oproti tomu pohlavně dospělí *B. barbuis* ♂ na trdlišť *B. carpathicus* asi nepronikají, čemuž by nasvědčovala i například data Pekárika (2004) z řeky Udava. Vyloučit to ovšem jednoznačně nelze.

Situaci by bylo nutné zhodnotit v kontextu konkrétních řek a trdlišť. Je nutné podotknout, že takřka ve všech řekách Slovenska dlouhodobě probíhá těžba šterku. Tím dochází k permanentní disturbanci přirozeného habitatu těchto ryb, které se tak mohou dostávat do užšího kontaktu, než by tomu bylo přirozeně (Černý - ústní sdělení; vlastní pozorování).

Poncin et al. (1994) uvádějí, že jikernačky *B. meridionalis* jsou, ohledně vhodného substrátu, podstatně méně vybíravé, než *B. barbuis*, k čemuž je patrně vedou nestabilní podmínky horních toků. Dokonce jsou schopny se vytířit i ve volné vodě.

### 5.2.1.1.3. Fyziologický

Mnou získané výsledky by mohli nasvědčovat i existenci kompletní postkopulační bariéry pro tento směr hybridizace. V celém datovém souboru se nenašla ani jedna výjimka. Zjištěné schéma cytonukleárních nerovnováh dle Avise (2001) rovněž ukazuje na nepřítomnost, nebo neplodnost jednoho z pohlaví F1, díky absenci F2.

Philippart et Berrebi (1990) objevili funkční sterilitu F1 ♂, vzniklých umělým výtěrem *B. meridionalis* ♂ + *B. barbuis* ♀. Opačně bohužel experiment neprováděli. F1 ♂ vznikali častěji (2 ♂: ♀). Vykazovali mnohem pomalejší růst než samice, podobně jako je tomu u rodičovských druhů. Tito autoři rovněž zjistili, že rychlostí růstu ani množstvím jiker F1 ♀ (*B. barbuis* x *meridionalis*) za *B. barbuis* ♀ příliš nezaostávají, ale dříve dospívají. Jak je to však s jejich fertilitou a viabilitou potomstva, nezkoumali.

#### 1. Chromozómová úroveň

Heterogametické pohlaví *B. barbuis* je samice (ZW; typ „Abraxas“) (Castelli et Philippart 1993). Pokud však patří *B. meridionalis* rovněž k typu „Abraxas“, zjištěná situace odporuje tzv. Haldaneově hypotéze (1922): „Je-li jedno pohlaví neplodné, nebo chybí, jedná se vždy o to heterozygotní.“ Chromozómové určení pohlaví *B. carpathicus*, ani *B. meridionalis* bohužel zatím nikdo nezjišťoval. Je-li tomu naopak (XY; typ „Drosophila“), čemuž neodporuje zjištěný směr hybridizace, mohli být nedaleko objevu velmi zajímavé situace. Potomstvo by mohlo být: XW, XZ, YW a YZ.

U ryb se často liší typ chromozómové determinace pohlaví i v rámci čeledi u velmi příbuzných druhů, dokonce je znám i případ u různých linií téhož druhu (*Xiphophorus maculatus*). V komerčním chovu tilapií (rod *Oreochromis*) se tradičně využívá mezidruhových kříženců (např. *O. niloticus* (XX) samice x *O. aureus* (ZZ) samec), neboť takovéto uniformní F1 potomstvo je složeno především ze samců, kteří se vyznačují vysokými přírůstky. Fakt, že množství samců není 100%, je způsoben tím, že ne všechny pohlaví determinující faktory, které se však liší v síle exprese, jsou umístěny na gonozómech (Devlin 2002).

#### 2. Cytonukleární nekompatibilita

Samčí funkční sterilita hybridů *B. barbuis* x *meridionalis* může být způsobena částečnou nekompatibilitou nukleárního a mitochondriálního genomu. Spermie jsou vysoce citlivé na dokonalou funkci mitochondrií. Nepatrné zhoršení jejich funkce, které má malý,

nebo dokonce žádný vliv na viabilitu a fertilitu samice, může mít za následek neplodnost samce (Gemmell et Allendorf 2001). Berrebi et al. (1992) uvádějí až čtyřikrát vyšší spotřebu kyslíku u některých hybridů *B. barbus x meridionalis*.

Jelikož *B. carpathicus* pravděpodobně v minulosti prošla silným „bottleneckem“ (Kotlík et Berrebi 202), vykazuje velmi nízkou genetickou variabilitu. Jak se již zmiňuji v jí věnované kapitole, je mtDNA mnohem citlivější k efektivnímu snížení populace, než nukleární. Zdá se mi pravděpodobnější, že mtDNA *B. carpathicus* bude inkompatibilní s jaderným hybridním genomem, než je tomu u mtDNA silně geneticky variabilní *B. barbus*. Domnívám se, že charakter haploidní mtDNA by mohl v tomto případě hrát zásadnější roli, než diploidní nukleární genom. (Právě proto, že diploidní = flexibilnější.) Bohužel jsem o takové teorii v literatuře nenašel žádnou zmínku.

### 3. Preference spermií

Polyandrický reprodukční systém parem ponechává spermie silnému selekčnímu tlaku (Simmons 2001). Nakolik v tomto případě platí předpoklad nadřazenosti konspecifických spermií (Howard et al. 1998; Howard 1999) zatím nikdo nezkoumal. Je pravděpodobné, že se ve vzájemném rozpoznání gamet budou oba směry lišit.

Chenuil et al. (1998) zjišťovali rozdílnou reprodukční zdatnost samců *B. meridionalis*, ale výsledek jejich pokusu není příliš přesvědčivý, neboť přežilo minimum potomstva.

#### 5.2.1.2. Porovnání s předchozími zjištěními

Šlechtová et al. (1993) na základě 4 diagnostických lokusů v řekách Poprad, Torysa i Laborec detekovali 6 hybridních jedinců jejichž elektroforetické fenotypy odpovídaly očekávání pro BC 1 do *B. carpathicus* i *B. barbus* a zástupcům F2 i F1. Jelikož však nepoužili žádný cytoplazmatický marker, nelze určit jejich maternitu.

Tyto údaje nejsou v přímém rozporu s mými závěry ohledně pouze jedné možnosti vzniku F1.

BC1 do *B. carpathicus* mohou vzniknout: F1 ♀ + *B. carpathicus* ♂. Takoví BC1 by ovšem pravděpodobně obsahovali mtDNA specifickou pro *B. barbus*. V celé kolekci jsem však neobjevil žádnou známku cytoplazmatické introgrese ani v jednom směru.

Detekce BC do *B. carpathicus* by tedy svědčila spíše pro existenci plodných F1 ♂, budu-li stále předpokládat sterilitu jednoho pohlaví F1, což nabourává detekce genotypu, splňujícího očekávání pro F2. Stejný vzor ale může vzniknout i kombinací BC + BC, nebo BC

+ F1 (Redenbach et Taylor 2003), navzdory předpokladu eliminace nejvíce rekombinantních genotypů (Rieseberg et Randall Linder 1999; viz. kapitola 3.5.). Zmíněný předpoklad se však v tomto případě asi silně uplatňuje. Prokazatelně hybridní jedinci na studovaných lokalitách v řece Poprad dohromady tvoří pouze zanedbatelné procento populace palem, přestože zde byli poprvé zaznamenáni již 4.9.1959 (Kux et Weisz 1960) a nejspíš zde k hybridizaci dochází po celou dobu společného výskytu, stejně jako ve všech ostatních povodích. Vzhledem k tomu, že se pravděpodobně oba dva druhy společně rozšířili do povodí Visly díky „river capture“ přes řeku Poprad a povodí Hornádu koncem posledního glaciálu (před 10 000 lety), nezdá se, že by zde hybridizace ohrožovala integritu zúčastněných druhů. Paradoxně lze říci, že *B. barbatus* si tímto způsobem pouze obohacuje svůj, již tak silně polymorfní (Šlechtová et al. 1998), genom.

#### 5.2.1.3. Porovnání s ostatními případy mezidruhové hybridizace v rámci podrodu *Barbus*.

Oproti mým zjištěním byli takřka ve všech případech, studovaných pomocí molekulárních markerů, zjištěni jedinci, u nichž lze z kombinace alel usuzovat na příslušnost k F2 generaci. Výjimkou však není ani případ *B. barbatus* x *B. meridionalis*, kde Philippart et Berrebi (1990) experimentálně ověřili sterilitu F1 ♂.

V obou případech hybridizace *B. meridionalis* byla zjištěna hybridní zóna, kde čisté rodičovské druhy zcela chyběly. Případ *B. haasi* a *B. meridionalis* (Machordom et al. 1990) však nese příliš mnoho velmi odlišných rysů a nemá smysl na něj poukazovat.

Pouze Tsigenopoulos et al. (2002) zaznamenali výskyt hybridů i pomocí mitochondriálních markerů. Nízký počet jedinců (*B. caninus* + hybridů) z lokality (9), kde navíc zcela chyběli zástupci fluvio-lacustrinního rodičovského druhu (*B. plebejus*), neumožňuje bohužel ani v tomto případě vyvozovat hlubší závěry ohledně směru a míry introgrese. Oba dva hybridní jedinci nesli mtDNA specifickou pro *B. plebejus* a zároveň splňovali očekávání pro F2 generaci v nDNA markerech. Možná jsou zde tedy plodní F1 hybridy obojího pohlaví.

Dobrovolovem (1993; 1996) popsaná přirozená hybridizace *B. tauricus* a *B. petenyi* se jeví být opačného směru. Vyskytují se zde asi pouze F1 a BC k druhu rheofilnímu. Ten však v tomto případě vykazuje vyšší genetický polymorfismus, než druh fluvio-lacustrinní.

## 6. Závěr

Hlavní zjištění mé studie je možné shrnout do následujících bodů:

1. Populace *Barbus carpathicus* i *B. barbus* z řeky Poprad se pravděpodobně nacházejí v Hardy-Weinbergově rovnováze.
2. Nejsou průkazné genetické rozdíly mezi jednotlivými subpopulacemi v řece Poprad.
3. Populace obou druhů palem z Popradu se geneticky liší od konspecifických populací z povodí Dunaje.
4. Druhy se plodně kříží v obou povodích, zastoupení detekovatelných hybridních jedinců v popradské populaci je však mizivé (1,74%).
5. Hybridizace je jednosměrná. Způsob vzniku F1 je vždy: *B. carpathicus* ♂ + *B. barbus* ♀.
6. Tok jaderných i cytoplazmatických genů mezi oběma druhy je výrazně omezený
7. Dochází pouze ke zpětnému křížení k *B. barbus*. K introgresi do genomu *B. carpathicus* nedochází.
8. Zjištěná absence F2 bývá většinou důsledkem sterility jednoho pohlaví F1.
9. Kombinace etologických, ekologických a fyziologických činitelů je s největší pravděpodobností zodpovědná za genetickou architekturu hybridizace.

## 7. Perspektivy

Přestože výsledky, které plynou z této práce, přispěly k porozumění tomuto případu hybridizace, je zřejmé, že stále přetrvává nutnost dalšího prohlubování našich znalostí.

Prioritu v dalším výzkumu by, dle mého názoru, měla mít identifikace a kvantifikace pre- a postkopulačních izolačních mechanismů. Primárně bych navrhoval provést experimentální umělý výtěr, podobně jako Philippart et Berrebi (1990). Oproti tomuto článku, bych však zvýšil počet skupin o 1 kontrolní. Vznikly by tímto skupiny A1, A2 : *B. barbuis*; B1, B2: *B. barbuis* (samci) x *B. carpathicus* (samice); C1,C2: *B. carpathicus* (samci) x *B. barbuis* (samice); D1,D2: *B. carpathicus*. Při výtěru by byli použiti vždy 2 samci na 1 samici. Generační ryby by byly označeny individuálně a následné potomstvo skupinově (např. zastřížením ploutví, elastomerami, či tekutým dusíkem, popřípadě jinou běžnou metodou). Dále by bylo ideální odchovat hybridní jedince do pohlavní dospělosti a pokusit se o zpětné křížení. Pokud by se během experimentů neobjevily nepřekonatelné problémy, bylo by určitě zajímavé pokusit se o rozšíření projektu na další evropské druhy palem, u nichž je potvrzena, či předpokládána existence přirozených hybridů.

Genetický rozbor ryb by byl pouze jednou z mnoha možných analýz, nabízejících se k realizaci. Nezanedbatelný přínos by jistě měly morfologické, etologické a fyziologické studie. Nepochybně zajímavé by bylo zrealizovat polopřirozený výtěr v akváriích dle Poncina et al. (1994). To by bylo nezbytné pro případnou etologickou studii, ale přínosné i pro zpřesnění celkové kvantifikace praekopulačních, praezygotických a postzygotických zábran. Vhodné by bylo zároveň provést histologická i morfometrická vyšetření hybridních jedinců, obdobně jako Poncin et al. (1996).

Ačkoliv ve Francii bylo provedeno mnoho pokusů na podobném případě hybridizace, stále nebylo dosaženo jednoznačných výsledků. Práce zmíněných autorů považuji do jisté míry za průkopnické. Bylo by vhodné se z nich poučit a navázat na ně. Je velmi pravděpodobné, že celkový výsledek je souhrou několika vlivů, jež jsem zde nastínil a mnoha těch, které jsem opomenul.

Vzhledem k tomu, že *B. carpathicus* je endemickým druhem severní části Karpat s omezeným rozšířením, měl by vzniknout určitý tlak na jeho ochranu. To by mělo jistě zvýšit jeho zajímavost a v neposlední řadě také ulehčit získávání prostředků na výzkum, zároveň by to však mohlo zkomplikovat další sběr materiálu.

## Seznam použité literatury

- Allendorf F.W., Leary R.F., Spruell P., Wenburg J.K., 2001: The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16 (11), 613-622.
- Almaça C., 1984: Notes on some species of western paleactic *Barbus* (*Cyprinidae*, *Pisces*). *Arquivos do Museu Bocage* (Ser. C) 1, 1-76.
- Anderson E., G.L. Stebbins, 1954: Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution* 8, 378-388.
- Arkhipov S.A., Ehlers J., Johnson R.G., Wright H.E. Jr., 1995: Glacial drainages towards the Mediterranean during middle and late Pleistocene. *Boreas*, 24, 196–206.
- Arnold M.L., 1993: Cytonuclear disequilibria in hybrid zones. *Annu.Rev.Ecol.Syst.* 24, 521-554.
- Arnold M.L., 1997: *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press.
- Asmussen M.A., Arnold J., Avise J.C., 1989: The effect of assortative mating and migration on cytonuclear associations in hybrid zones. *Genetics* 122, 923-934.
- Asmussen M.A., Basten C.J., 1994: Sampling Theory for Cytonuclear Disequilibria. *Genetics* 138, 1351-1363.
- Asmussen M.A., Basten C.J., 1996: Constraints and normalized measures for cytonuclear disequilibria. *Heredity* 76, 207-214.
- Avise J.C., 2001: Cytonuclear genetic signatures of hybridization phenomena: Rationale, utility, and empirical examples from fishes and other aquatic animals. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10, 253-263.
- Balon E., 1963: Dodatok k ichtyobiologickej charakteristike rieky Olše a výskytu *Barbus meridionalis petényi*. *Zool. listy* 12(3), 262-264.
- Baras E., 1994: Constraints imposed by high densities on behavioural spawning strategies in the barbel, *Barbus barbus*. *Folia Zool.* 43, 255–266.
- Baras E., Philippart J.C., 1999: Adaptive and evolutionary significance of a reproductive thermal threshold in *Barbus barbus*. *J. Fish. Biol.* 55, 354–375.
- Barton N.H., Hewitt G.M., 1985: Analysis of hybrid zones. *Annu.Rev.Ecol.Syst.* 16, 113-148.
- Basten C.J., Asmussen M.A., 1997: The Exact Test for Cytonuclear Disequilibria. *Genetics* 146, 1165-1171.
- Bănărescu P.M., 1991: *Zoogeography of Fresh Waters, 2: Distribution and Dispersal of Fresh Water Animals in North America and Eurasia*. AULA-Verlag, Wiesbaden.

- Bănărescu P.M., Bogutskaya N.G., Movchan Y.V., Smirnov A.I., 2003: *Barbus barbus* (Linnaeus, 1758). In: The Freshwater Fishes of Europe, 5/II: *Cyprinidae* 2/II (eds. Bănărescu P.M., Bogutskaya N.G.), 43–98. AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Belkhir K., Borsa P., Goudet J., Chikhi L., Bonhomme F., 1998: GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations <<http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm> . Montpellier, France: Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université Montpellier II.
- Berrebi P., 1995: Speciation of the genus *Barbus* in the North Mediterranean Basin: recent advances from biochemical genetics. *Biological Conservation* 72, 237-249.
- Berrebi P., Cattaneo-Berrebi G., Le Brun N., 1993: Natural hybridization of two species of tetraploid barbels: *Barbus meridionalis* and *Barbus barbus* (Osteichthyes, Cyprinidae) in southern France. *Biological Journal of the Linnean Society* 48, 319-333.
- Berrebi P., Kottelat M., Skelton P., Ráb P., 1996: Systematics of *Barbus*: state of the art and heuristic comments. *Folia Zool.* 45 (Suppl. 1), 5-12.
- Berrebi P., Pouyard L., Crespin L., 1992: *Barbus* hybridisation (fish, *Cyprinidae*): Description of the hybrid zone (genetics – ethology). In *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Symposium, Bangor, sep. 1992.
- Berrebi P., Tsigenopoulos C.S., 2003: Phylogenetic organization of the genus *Barbus sensu stricto* : a review based on data obtained using molecular markers. In: The Freshwater Fishes of Europe, 5/II: *Cyprinidae* 2/II (eds. Bănărescu P., Bogutskaya N.G.), 11–22. AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Betti L., 1995: Prime osservazioni sull'ibridazione del barbo commune (*Barbus barbus plebejus* Val.) e Barbo canino (*Barbus meridionalis* Risso). *Studi trentini di Scienze Naturali. Acta Biologica* 70, 23-28.
- Bianco P.G., 1995: A revision of the Italian *Barbus* species (Cypriniformes: Cyprinidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 6, 305-324.
- Bianco P.G., 2003: *Barbus caninus* Bonaparte, 1839. In: The Freshwater Fishes of Europe, 5/II: *Cyprinidae* 2/II (eds. Bănărescu P.M., Bogutskaya N.G.), 129–146. AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Bianco P.G., Ketmaier V., 2001: Anthropogenic changes in the freshwater fish fauna of Italy, with reference to the central region and *Barbus graellsii*, a newly established alien species of Iberian origin. *J. Fish Biol.* 59 (Suppl.A), 190-208.
- Birky C.W., 1983: An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics* 103, 513–527.

- Boecklen W.J., Howard D.J., 1997: Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markers and power of resolution. *Ecology* 78, 2611-2616.
- Bogutskaya N.G., Smirnov A.I., Movchan Y.V., 2003: *Barbus tauricus* Kessler, 1877. In: The Freshwater Fishes of Europe, 5/II: *Cyprinidae* 2/II (eds. Bănărescu P.M., Bogutskaya N.G.), 397–420. AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Bohlen J., Nolte A., 1998: Die barbe, *Barbus barbus* (Linné, 1758), in der Hunte. *Drosera*, 98, 79–82.
- Boroń A., 2000: Brzanka *Barbus peloponnesius*. In: Brylińska M. (ed.), *Ryby słodkowodne Polski*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 183–186.
- Brown J.R., Beckenbach A.T., Smith M.J., 1992: Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmy in populations white sturgeons (*Acipenser transmontanus*). *Genetics* 132, 221–228.
- Bruce I.J., Hurst C.D., 1996: An introduction to PCR and hybridisation techniques. Oxford University Press.
- Callejas C., Ochando M.D., 2002: Phylogenetic relationships among Spanish *Barbus* species (*Pisces*, *Cyprinidae*) shown by RAPD markers. *Heredity* 89, 36–43.
- Carvalho G. R., Pitcher T.J., 1995: *Molecular Genetics in Fisheries*. Chapman and Hall, New York.
- Castelli, M., Philippart, J.C., 1993: La détermination du sexe chez les barbeaux (*Osteichthyes*, *Cyprinidae*, *Barbus*). *Cahiers d’Ethologie* 13 (2), 191- 194.
- Crespin L., Berrebi P., 1999: Asymmetrical introgression in freshwater fish hybrid zone as revealed by a morphological index of hybridization. *Biological Journal of the Linnean Society* 67, 57-72.
- Darius H., Berrebi P., 1993: Asymétrie et anomalies morphologiques dans la zone hybride de la Lergue (sud de la France) *Barbus barbus* x *Barbus meridionalis*. *Cahiers d’Ethologie* 13 (2), 243-144.
- Devlin R.H., Nagahama Y., 2002: Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191–364.
- Di Rienzo A., Peterson A.C., Garza J.C., 1994: Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91, 3166–3170.

- Doadrio I., 1984: „Relaciones Filogenéticas y Biogeográficas de los Barbos (*Barbus*, *Cyprinidae*) de la Península Ibérica y Aportes Corológicos y Biogeográficos a su Ictiofauna Continental.“ Ph.D. dissertation, Madrid.
- Doadrio I., 1990: Phylogenetic relationships and classification of western paleactic species of the genus *Barbus* (Osteichthyes, Cyprinidae). *Aquatic Living Resources* 3, 265-282.
- Doadrio I., Perdices A., 2003: *Barbus meridionalis* Risso, 1826. In: *The Freshwater Fishes of Europe, 5/II: Cyprinidae 2/II* (eds. Bănărescu P.M., Bogutskaya N.G.), 23 –41. AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Dobrovolov I.S., 1993: Taxonomie des barbeaux du genre *Barbus* en Bulgarie: étude biochimique. *Cahiers d’Ethologie* 13 (2), 239- 240.
- Dobrovolov I.S., 1996: Biochemical genetic characteristics of Barbel (*Barbus* Cuvier genus) from Bulgarian rivers. *Folia Zool.* 45 (Suppl. 1), 59-65.
- Dowling T.E., Secor C.L., 1997: The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 28, 593-619.
- Durand J.D., Persat H., Bouvet Y., 1999: Phylogeography and post-glacial dispersion of the chub (*Leuciscus cephalus*) in Europe. *Molecular Ecology*, 8, 989 –997.
- Durand J.D., Tsigenopoulos C.S., Ünlü E., Berrebi P., 2002: Phylogeny and Biogeography of the Family Cyprinidae in the Middle East Inferred from Cytochrome b DNA- Evolutionary Significance of This Region. *Mol. Phylogenet. Evol.* 22, 91-100.
- Economidis P.S., 2003: *B. macedonicus* Karaman, 1928. In: *The Freshwater Fishes of Europe, 5/II: Cyprinidae 2/II* (eds. Bănărescu P.M., Bogutskaya N.G.), 271 –276. AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Economidis P.S., Herzig-Straschil B., 2003: *Barbus albanicus* Steindacher, 1870. In: *The Freshwater Fishes of Europe, 5/II: Cyprinidae 2/II* (eds. Bănărescu P.M., Bogutskaya N.G.), 23 –41. AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Economidis P.S., Sorič M.V., Bănărescu P.M.:2003: *Barbus peloponnesius* Valenciennes, 1842. In: *The Freshwater Fishes of Europe, 5/II: Cyprinidae 2/II* (eds. Bănărescu P.M., Bogutskaya N.G.), 301 –337. AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Ferguson K.A., Wallace L.C., 1961: Starch gel electrophoresis of anterior pituitary hormones. *Nature* 190, 629-630.
- Gemmell N.J., Allendorf F.W., 2001: Mitochondrial mutations may decrease population viability. *Trends in Ecology and Evolution* 16 (3), 115-117.

- Gougnard I., Poncin P., Ruwet J.C., Philippart J.C., 1987: Description et analyse du comportement de reproduction du barbeau *Barbus barbus* (L.) en aquarium. Influence du nombre de mâles courtisans sur les comportements observés. Cahiers d'Ethologie appliquée 7, 293- 302.
- Gyllensten U., Wharton D., Josefsson A., Wilson A.C., 1991: Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. Nature 352, 255–257.
- Haldane J.B.S., 1922: Sex ratio and the unisexual sterility of hybrid animals. J. Genet. 12, 101-109.
- Harris H., Hopkinson D.A., 1976: Handbook of Enzyme electrophoresis in Human Genetics. North-Holland, Amsterdam.
- Harrison R.G., 1990: Hybrid zones: windows on evolutionary process. Surveys in Evolutionary Biology 7, 69-128.
- Hartl D., Clark A.G., 1997: Principles of population genetics. Sinauer, Sunderland, MA.
- Heckel J., 1843: Abbildungen und Beschreibung der Fische Syricus, nebst einer neuen Classification und Charakteristik sämmtlicher Gattungen der Cyprinen. Stuttgart.
- Heckel J., 1852: Verzeichniss der Fische des Donaugebietes in der ganzen Ausdehnung des österreichischen Kaiserstaates. Vehr. Zool. Bot. Ges. Wien 2, 28-33.
- Heckel J., Kner R., 1858: Die Süßwasserfische der Österreichischen monarchie mit Rücksicht auf die Angränzenden länder. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Hewitt G.M., 2004: Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 359, 183-195.
- Hochman L., 1965: K významu plodnosti v populační dynamice ostroretky stěhovavé (*Chondrostoma nasus* L.), jelce tlouště (*Leuciscus cephalus* L.) a parmy obecné (*Barbus barbus* L.) v podmínkách řeky Oslavy. Acta Univ. Agric. Brno, ř. A, 3: 487-502.
- Holčík J., Hensel K., 1972: Ichtyologická příručka. Obzor, Bratislava.
- Howard D.J., 1999: Conspecific sperm and pollen precedence and speciation. Annual Review of Ecology and Systematics 30, 109-132.
- Howard D.J., Gregory P.G., Chu J., Cain M.L. 1998: Conspecific sperm precedence is an effective barrier to closely related species. Evolution 52: 511–516.
- Howes G.J., 1987: The phylogenetic position of the Yugoslavian Cyprinid genus *Aulopyge* Heckel, 1841, with an appraisal of the genus *Barbus* Cuvier et Cloquet, 1816 and the subfamily Cyprinidae. Bull. Br. Mus. Nat. Hist. 52, 165-196.

- Howes G.J., 1991: Systematics and biogeography: an overview. In: Cyprinid Fishes, Systematics, biology and exploitation (eds. Winfield I.J., Nelson J.S.), 1-33. London: Chapman and Hall.
- Hubbs C.L., 1955: Hybridization between fish species in nature. *Syst. Zool.* 4, 1-20.
- Chang Y.S., Huang F.L., Lo T.B., 1994: The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.* 38, 138–155.
- Chenuil A., Desmarais E., Pouyaud L., Berrebi P., 1997: Does polyploidy lead to fewer and shorter microsatellites in *Barbus* (*Teleostei, Cyprinidae*)? *Mol.Ecol.* 6., 169-178.
- Chenuil A., Binda O., Cattaneo-Berrebi B., Poncin P., Berrebi P., 1998: Relative reproductive succes of males in polyandrous crosses of *Barbus meridionalis* revealed by microsatellite fingerprinting. *Folia Zool.* 47 (Suppl. 1), 53-60.
- Chenuil A., Galtier N., Berrebi P., 1999: A test of the hypotesis of an autopolyploid vs. allopolyploid origin for a tetraploid lineage: application to the genus *Barbus* (*Cyprinidae*). *Heredity* 82, 373-380.
- Chenuil A., Crespín L., Pouyaud L., Berrebi P., 2000: Movements of adult fish in a hybrid zone revealed by microsatellite genetic analysis and capture-recapture data. *Freshwater Biology* 43, 121-131.
- Chevassus B., 1983: Hybridization in fish. *Aquaculture* 33, 245-262.
- Ionescu V., 1968: Vertebratele din România. Edit. Acad., București, 497 p.
- Karakousis Y., Machordom A., Doadrio I., Economidis P.S., 1995: Phylogenetic relationships of *Barbus peloponnesius* Valenciennes, 1842 (*Osteichthyes: Cyprinidae*) from Greece with other species of *Barbus* as revealed by allozyme electrophoresis. *Biochem. Syst. Ecol.* 23, 365–375.
- Karaman S.M., 1971: Süßwasserfische der Türkei. 8. Teil: Revision der Barben Europas, Vordenasien und Nordafrikas. *Mitteilun-gen Aus Dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut*, 67, 175 –254.
- Kimura M., Ohta T., 1978: Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (6) 2868-2872.
- Kocher T.D., Stepien C.A., 1997: Molecules and Morphology in studies of Fish evolution. In: *Molecular Systematics of Fishes* (eds. Kocher T.D., Stepien C.A.), 1-11. New York: Academic Press.
- Kotlík P., Berrebi P., 2001: Phylogeography of the barbel (*Barbus barbus*) assessed by mitochondrial DNA variation. *Mol. Ecol.* 10, 2177-2185.

- Kotlík P., Berrebi P., 2002: Genetic subdivision and biogeography of the Danubian rheophilic barb *Barbus petenyi* inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 91-100.
- Kotlík P., Tsigenopoulos C., Rab P., Berrebi P., 2002: Two new *Barbus* species from the Danube River basin, with redescription of *B. petenyi* (Teleostei: Cyprinidae). *Folia Zool.* 51 (3), 227–240.
- Kotlík P., Bogutskaya G., Ekmekçi F.G., 2004: Circum Black Sea phylogeography of *Barbus* freshwater fishes: divergence in the Pontic glacial refugium. *Mol. Ecol.* 13, 87-95.
- Kottelat M., 1997: European freshwater fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation. *Biologia, Bratislava* 52, 1–271.
- Krupka I., 1983: Rozšírenie, systematická príslušnosť, vybrané časti biológie a biotechnológie umelej reprodukcie mreny obyčajnej (*Barbus barbus* (Linnaeus, 1758)). *Kand. dis. práca, Lab. rybárstva a hydrobiol., Bratislava*, 142 pp., nepubl.
- Krupka I., 1985: Príspevok k poznaniu veku a rastu mreny obyčajnej (*Barbus barbus* (Linnaeus, 1758)) v rieke Vlára. *Práce Laboratória rybárstva a hydrobiológie* 4 (5), 199-215.
- Krupka I., 1987: Umělý výtěr a odchov plůdku parmy. *Metodiky VÚRH č.23, Vodňany*.
- Krupka I., J. Holčík, 1976: On the occurrence of *Barbus plebejus* in the Poprad river (Vistula basin, Czechoslovakia) with regard to its assumed hybrid origin. *Vest. Cs. Spol. Zool.* 40, 163-178.
- Kux Z., 1964: Ichtyofauna západní části karpatského oblouku a přilehlých nížin. *Kandidátská disertační práce, Institute of Vertebrate Research, Czechoslovakian Academy of Sciences, Brno*.
- Kux Z., 1982: Příspěvek k problematice hybridů druhů *Barbus barbus* a *Barbus meridionalis* ve vodách východního Slovenska. *Parazitologické aktuality* 2, 128-131.
- Kux Z., Weisz T., 1958: Příspěvek k poznání ichtyofauny řeky Toplé v bardějovském okrese. *Acta Musei Moraviae* 43, 145-174.
- Kux Z., Weisz T., 1960: Příspěvek k poznání ichtyofauny Dunajce, Popradu, Váhu a Hronu. *Acta Musei Moraviae* 45, 203-240.
- Kux Z., Weisz T., 1964: Příspěvek k poznání ichtyofauny slovenských řek. *Acta Musei Moraviae* 49, 191-246.
- Levinson G., Gutman G.A., 1987: Slipped-Strand Mispairing: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4(3), 203-221.

- Lucas M.C., Batley E., 1996: Seasonal movements and behaviour of adult barbel *Barbus barbus*, a riverine cyprinid fish: implications for river management. *Journal of Applied Ecology* 33, 1345-1358.
- Ludwig A., May B., Debus L., Jenneckens I., 2000: Heteroplasmy in the mtDNA Control Region of Sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* 156, 1933–1947.
- Machordom A., Berrebi P., Doadrio I., 1990: Spanish barbel hybridization detected using enzymatic markers: *Barbus meridionalis* Risso x *Barbus haasi* Mertens (*Osteichthyes*, *Cyprinidae*). *Aquat. Living Resour.* 3, 295- 303.
- Machordom A., Doadrio I., 2001a: Evidence of a Cenozoic Betic-Kabilian connection based on freshwater fish phylogeography (*Luciobarbus*, *Cyprinidae*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 252- 263.
- Machordom A., Doadrio I., 2001b: Evolutionary history and speciation modes in cyprinid genus *Barbus*. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 268, 1297- 1306.
- Markert C., Moller F., 1959: Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45, 753-763.
- May B., 1993: Starch gel electrophoresis of allozymes. In: *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach* (ed. Hoelzel A.R.). Oxford: IRL Press.
- Mayr E., 1963: *Animal Species and Evolution*. Cambridge: Harvard Univ. Press.
- Moritz C., Hillis D.M., 1990: Molecular Systematics Context and Controversies. In: *Molecular Systematics*. (eds. Hillis D.M., Moritz C.), 1-10. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Movchan I.V, Smirnov A.I., 1981: Fishes, Cyprinidae, part 1. *Fauna Ukraini*, vol. 8, Fishes. liv. 2, part 1. Naukova Dumka, Kiev.
- Myers G.S., 1960: Preface to any future classification of the cyprinid fishes of the genus *Barbus*. *Stanford Ichthyological Bul.* 7, 212–215.
- Nei M., 1987: *Molecular evolutionary genetics*. Columbia Univ. Press.
- Nelson J.S., 1976: *Fishes of the World*. Wiley-Interscience, New York.
- Nelson J.S., 1994: *Fishes of the World*. 3rd ed., Wiley and Sons, New York.
- Nesbř C. L., Arab M.O., Jakobsen K.S., 1998: Heteroplasmy, length and sequence variation in the mtDNA control regions of three percid fish species (*Perca fluviatilis*, *Acerina cernua*, *Stizostedion lucioperca*). *Genetics* 148, 1907–1919.
- Oellermann L.K., P.H. Skelton, 1990: Hexaploidy in yellowfish species (*Barbus*, Pisces, *Cyprinidae*) from southern Africa. *J. Fish. Biol.* 37, 105- 115.
- Otto S.P., Whitton J., 2000: Polyploid incidence and evolution. *Ann.Rev.Genet.* 34, 401–437.

- 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.
- Pekárik L., 2004: Štúdium ichtyocenóz povodia rieky Udava. Diplomová práca.
- Pelz G.R., Kästle A., 1989: Ortsbewegungen der Barbe *Barbus barbus* (L.) – radiotelemetrische Standortbestimmungen in der Nidda (Frankfurt/Main). *Fischökologie* 1(2), 15-28.
- Peňáz M., 1995: 12. rod *Barbus* Cuvier, 1817 – Parma, Mrena. In: Fauna ČR a SR/ Mihulovci a ryby 2 (eds. Baruš V., Oliva O.), 132-145. Academia, Praha.
- Pethon P., 1978: Age growth and maturation of natural hybrids between roach (*Rutilus rutilus*, L.) and bream (*Abramis brama*, L.) in lake Oyeren, SE Norway. *Acta Hydrobiol.* 20 (4), 281-295.
- Philipp D.P., Childers W.F., Whitt G.S., 1979: Evolution of patterns of differential gene expression: a comparison of the temporal and spatial patterns of isozyme locus expression in two closely related species (northern largemouth bass, *Micropterus salmoides*, and smallmouth bass, *Micropterus dolomieu*). *J. Exp. Zool.* 210, 473-488.
- Philippart J.C., Berrebi P., 1990: Experimental hybridization of *Barbus barbus* and *Barbus meridionalis*: physiological, morphological, and genetic aspects. *Aquat. living resour.* 3, 325-332.
- Plénet S., Pagano A., Joly P., Fouilett P., 2000: Variation of plastic responses to oxygen availability within the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *J. Evol. Biol.* 13 (1), 20-28.
- Poncin P., Jeandarme J., Berrebi P., 1994: A behavioral study of hybridization between *Barbus barbus* and *Barbus meridionalis*. *J. Fish Biol.* 45, 447-451.
- Poncin P., Thiry M., Lepoint A., Philippart J.C., 1996: Histological and biometrical study of intraovarian oocytes in barbel (*Barbus barbus*) reared in captivity. *Folia Zool.* 45 (Suppl. 1), 117-121.
- Poulik M.D., 1957: Starch electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature* 180, 1477.
- Powell J.R., 1994: Molecular techniques in population genetics: A brief history. In: *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications* (eds. Schierwater B., Streit B., Wagner G.P., DeSalle R.). Berlin: Birkhauser Verlag.
- Ráb P., 1980: Cytogenetické studium některých druhů ryb čeledi *Cyprinidae*. Thesis ČSAV, Liběchov.

- Ráb P., Collares-Pereira M.J., 1995: Chromosomes of European cyprinid fishes (Cyprinidae, Cypriniformes): a review. *Folia Zool.* 44 (3), 193–214.
- Raufaste N., Bonhomme F., 2000: Properties of Bias and Variance of Two Multiallelic Estimators of  $F_{ST}$ . *Theoretical Population Biology*, 57, (3), 285-296.
- Redenbach Z., Taylor W.B., 2003: Evidence for bimodal hybrid zones between two species of char (*Pisces: Salvelinus*) in northwestern North America. *J. Evol. Biol.* 16(6), 1135-1148.
- Rembiszewski J., Rolik H., 1975: Katalog Fauny Polski (A checklist of the freshwater fishes of Poland). Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
- Rieseberg L.H., Randall Linder C., 1999: Hybrid classification: insights from genetic map-based studies of experimental hybrids - Hybridization and Resistance to Parasites. *Ecology* 80, 346-352.
- Rieseberg L.H., Wendel J.F., 1993: Introgression and its consequences in plants. In *Hybrid zones and the Evolutionary Process* (ed. R.G. Harrison), 70-109. Oxford, UK, Oxford University Press.
- Robertson A., Hill W.G., 1984: Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* 107, 703-718.
- Rolik H., 1967: O niektórych naturalnych krzyżówkach ryb karpioiwatych (*Pisces, Cyprinidae*) w Polsce. *Fragmenta Faunistica* 14, 153 –167.
- Rolik H., 1970: *Barbus cyclolepis waleckii* ssp. n.– A new subspecies of *B. cyclolepis* Haeckel, 1840, from the Vistula and Dniester basin (*Pisces, Cyprinidae*). *Bull. Acad. Pol. Sci., Cl. II. Vol. XVIII Ser. Sci. Biol.*, 401- 404.
- Scribner K.T., Page K.S., Barton M.L., 2001: Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10, 293-323.
- Seehausen O., 2004: Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution* 19 (4), 198-207.
- Schwartz F.J., 1981: World literature to fish hybrids with an analysis by family, species and hybrid. NOAA Technical Report NMFS SSRF-750, Suppl.1.
- Simmons L.W., 2001: The evolution of polyandry: an examination of the genetic incompatibility and good-sperm hypotheses. *J. Evol. Biol.* 14, 585-594.
- 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.

- Starmach K., Rosoľ E., 1961: Morfometryczna charakterystyka brzanki (*Barbus petenyi* Heckel) z Górnej Wisly – Morphometric characteristics of *Barbus petenyi* Heckel from the upper region of Wisla (Vistula). Acta Hydrobiol. 3, 217-224.
- Stebbins G.L., 1966: Processes of Organic Evolution. Inglewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.
- Steinmann P., Koch W., Scheuring L., 1937: Die Wanderungen unserer Süßwasserfische. Dargestellt auf Grund von Markierungsversuchen. Z. Fisch. Hillswiss. 35, 369-467.
- Stratil A., Bobák P., Tomášek V., Valenta M., 1983: Transferins of *Barbus barbus*, *Barbus meridionalis petenyi* and their hybrids. Genetic polymorphism, heterogeneity and partial characterization. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 76B, No. 4, 845- 850.
- Šlechtová V., Šlechta V., Berrebi P., 1993: Diversité génétique du genre *Barbus* dans les rivières tchèques et slovaques. Cahiers d'Ethologie 13 (2), 207- 210.
- Šlechtová V., Šlechta V., Lusková V., Lusk S., Berrebi P., 1998: Genetic variability of common barbel, *Barbus barbus* populations in the Czech Republic. Folia Zool., 47 (Suppl.1), 21– 33.
- Štancl J., 1996: Hybridizace mezi cejnem velkým (*Abramis brama*) a perlínem ostrobřichým (*Scardinius erythrophthalmus*). Diplomová práce.
- Taanman J.W., 1999: The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. Biochimica et Biophysica Acta 1410, 103-123.
- Templeton A.R., 1981: Mechanisms of speciation – a population genetic approach. Annu.Rev.Ecol.Syst. 12, 23-48.
- Templeton A.R., Hemmer H., Mace G., Seal U.S., Shields W.M. et Woodruff D.S., 1986: Local adaptation, coadaptation, and population boundaries. Zoo Biology 5, 115-125.
- Tsigenopoulos C., Berrebi P., 2000: Molecular phylogeny of North Mediterranean freshwater barbs (genus *Barbus*: *Cyprinidae*) inferred from cytochrome b sequences: biogeographic and systematic implications. Mol. Phylogenet. Evol.14, 165- 179.
- Tsigenopoulos C. S., Karakousis Y., and Berrebi P. 1999: The North Mediterranean *Barbus* lineage: Phylogenetic hypotheses and taxonomic implications based on allozyme data. J. Fish Biol.54, 267–286.
- Tsigenopoulos C., Kotlík P., Berrebi P., 2002: Biogeography and pattern of gene flow among *Barbus* species (*Teleostei*: *Cyprinidae*) inhabiting the Italian Peninsula and neighbouring Adriatic drainages as revealed by allozyme and mitochondrial sequence data. Biological Journal of the Linnean Society 75, 83- 99.
- Turner G.F., 1999: What is a fish species ? Reviews in fish biology and fisheries 9(4), 281-297.

- Uyeno T., Smith G.R., 1972: Tetraploid origin of karyotype of catostomid fishes. *Science* 175, 644–646.
- Valenta M., Hylgaard-Jensen J., Jensen E. S., 1971: Interaction of veronal, pyrophosphate, citrate and protein with lactate dehydrogenase isozyme determination and kinetics. *Acta Veterinaria Scandinavia* 12, 15-35.
- Valenta M., Ráb P., Stratil A., Kálal L., Oliva O., 1979: Karyotypes, heterogeneity, and polymorphism of proteins in the tetraploid species *Barbus meridionalis* and its hybrids with *Barbus barbus*. *Proc. XVIth Anim. Blood Gprs Biochem. Polymorph. Vol. IV.*, 204- 214.
- Weir B.S., 1990. *Genetic data analysis*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Weir B.S., 1996: *Genetic Data Analysis II*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Weir B.S., Cockerham C.C., 1984: Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wheeler A., Jordan D.R., 1990: The status of the barbel, *Barbus barbus* (L.) (*Teleostei, Cyprinidae*), in the United Kingdom. *J. Fish. Biol.* 37, 393- 399.
- White M.J.D., 1978: *Modes of speciation*. WH Freeman, San Francisco.
- Winfield I.J., Nelson J.S., 1991: *Cyprinid fishes - Systematics, biology and exploitation*. Chapman and Hall, London.
- Wirtz P., 1999: Mother species–father species: unidirectional hybridization in animals with female choice. *Animal Behavior* 58, 1–12.
- Wolf U., Ritter H., Atkin N.B., Ohno S., 1969: Polyploidization in the fish family *Cyprinidae*, order *Cypriniformes*. I. DNA - content and chromosome sets in various species of *Cyprinidae*. *Humangenetik* 7, 240- 244.
- Wood A.B., Jordan D.R., 1987: Fertility of roach x bream hybrids, *Rutilus rutilus* (L.) x *Abramis brama* (L.), and their identification. *J. Fish. Biol.* 30, 249- 261.
- Wright S., 1921: Systems of mating I-V. *Genetics* 6:111-178.
- Wright S., 1969: *Evolution and the genetics of populations*. Vol. 2. The theory of gene frequencies. University of Chicago Press.
- Wright S., 1978: *Evolution and the genetics of populations*. Vol. 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, IL.
- Zardoya R., Doadrio I., 1999: Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *J. Mol. Evol.* 49, 227-237.
- Zauner G., 1998: Der Semling eine verschollene Fischart wurde wiederentdeckt. *Österreichs Fischerei*, 51(10), 218.

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1.</b> Seznam všech lokalit a jedinců.....	24
<b>Tabulka 2.</b> Použité diagnostické endonukleázy.....	32
<b>Tabulka 3.</b> Srovnání použitých typů odhadu fixačního koeficientu.....	35
<b>Tabulka 4.</b> Alelické frekvence polymorfních lokusů <i>Barbus carpathicus</i> .....	40
<b>Tabulka 5.</b> Alelické frekvence polymorfních lokusů <i>Barbus barbuis</i> .....	41
<b>Tabulka 6.</b> Charakteristika populací rodičovských druhů pomocí F statistiky.....	43
<b>Tabulka 7.</b> Formální test náhodného páření mezi <i>Barbus carpathicus</i> a <i>B. barbuis</i> .....	44
<b>Tabulky 8.- 10.</b> Hodnoty koeficientů nerovnováhy (D) v povodí Popradu pro plně diagnostické lokusy a mtDNA s výsledky testů významnosti.....	47
<b>Tabulky 11.- 12.</b> Hodnoty koeficientů nerovnováhy (D) v povodí Dunaje pro plně diagnostické lokusy a mtDNA s výsledky testů významnosti.....	48
<b>Tabulky 13.- 16.</b> Hodnoty koeficientů nerovnováhy (D) v obou povodí pro plně diagnostické lokusy a mtDNA s výsledky testů významnosti.....	49-50
<b>Tabulka 17.</b> 3x2 tabulka dle Avise (2001) společná všem plně diagnostickým lokusům pro obě povodí.....	51
<b>Tabulka 18.</b> Počty jedinců <i>Barbus carpathicus</i> , <i>B. barbuis</i> a hybridů dle zjištěných genotypů na jednotlivých lokalitách.....	52
<b>Tabulka 19.</b> Konkrétní elektroforetické fenotypy všech zjištěných hybridů ve všech analyzovaných nukleárních lokusech.....	53

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1.</b> Areál původního rozšíření <i>Barbus barbuis</i> a <i>B. carpathicus</i> .....	13
<b>Obrázek 2.</b> <i>Barbus carpathicus</i> ♀ z řeky Udava; ilustrativní foto (4.8.2004).....	14
<b>Obrázek 3.</b> <i>Barbus carpathicus</i> ♂ z řeky Udava; ilustrativní foto (4.8.2004).....	14
<b>Obrázek 4.</b> <i>Barbus barbuis</i> z řeky Udava; ilustrativní foto (4.8.2004).....	17
<b>Obrázek 5.</b> Lokality na řece Poprad.....	23
<b>Obrázek 6.</b> Výsledky štěpení mtDNA <i>Barbus carpathicus</i> , <i>B. barbuis</i> a všech hybridních jedinců z řeky Poprad diagnostickým restričním enzymem Msp I.....	45

## Přílohy



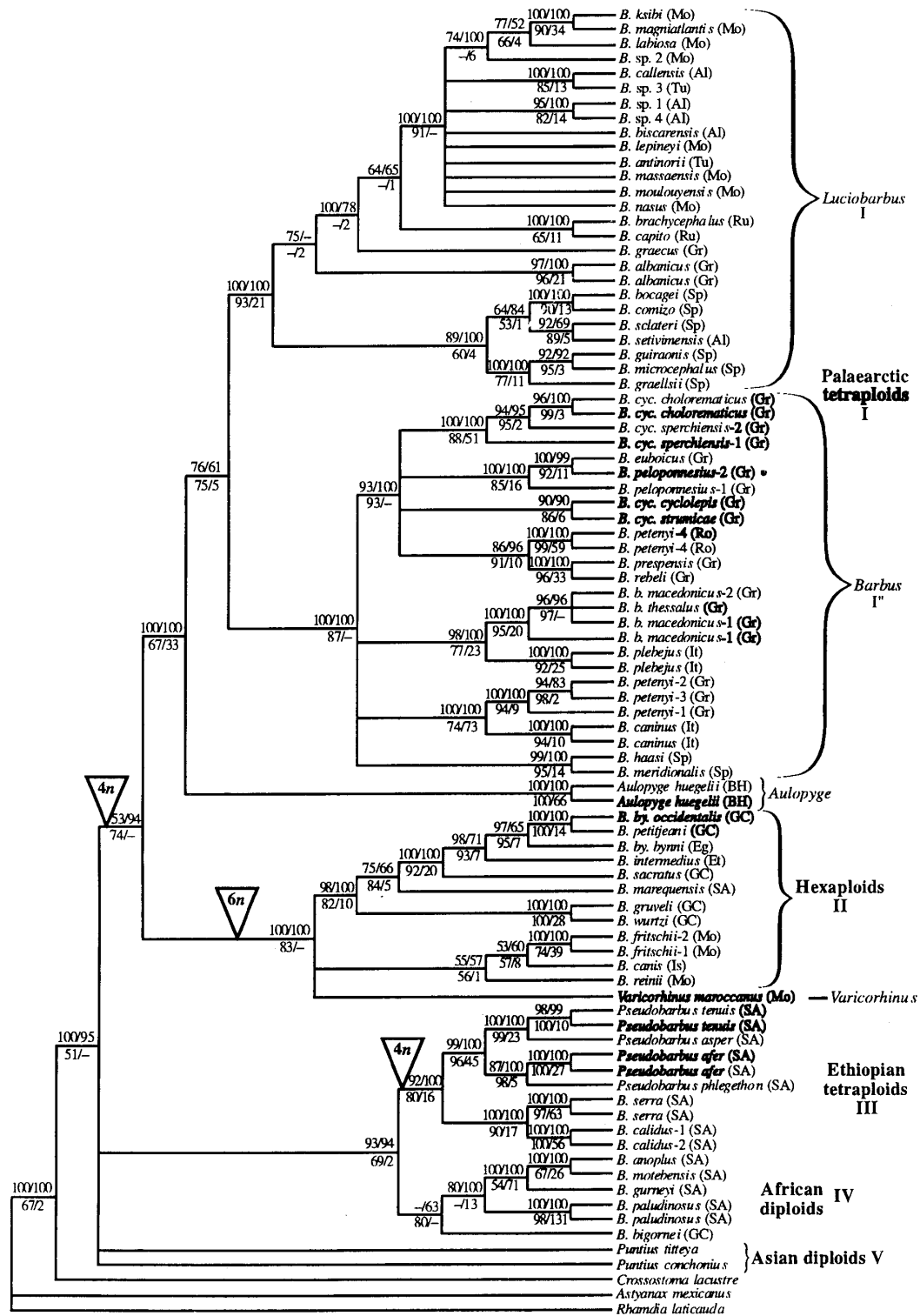
**Příloha 1.** Fylogenetická rekonstrukce taxonu *Barbus sensu lato* převzatá z práce: Machordom et Doadrio (2001).

**Příloha 2.** Fylogenetická rekonstrukce taxonu *Barbus sensu stricto* převzatá z práce: Berrebi et Tsigenopoulos (2003).

**Příloha 3.** Fotografie z povodí Popradu.

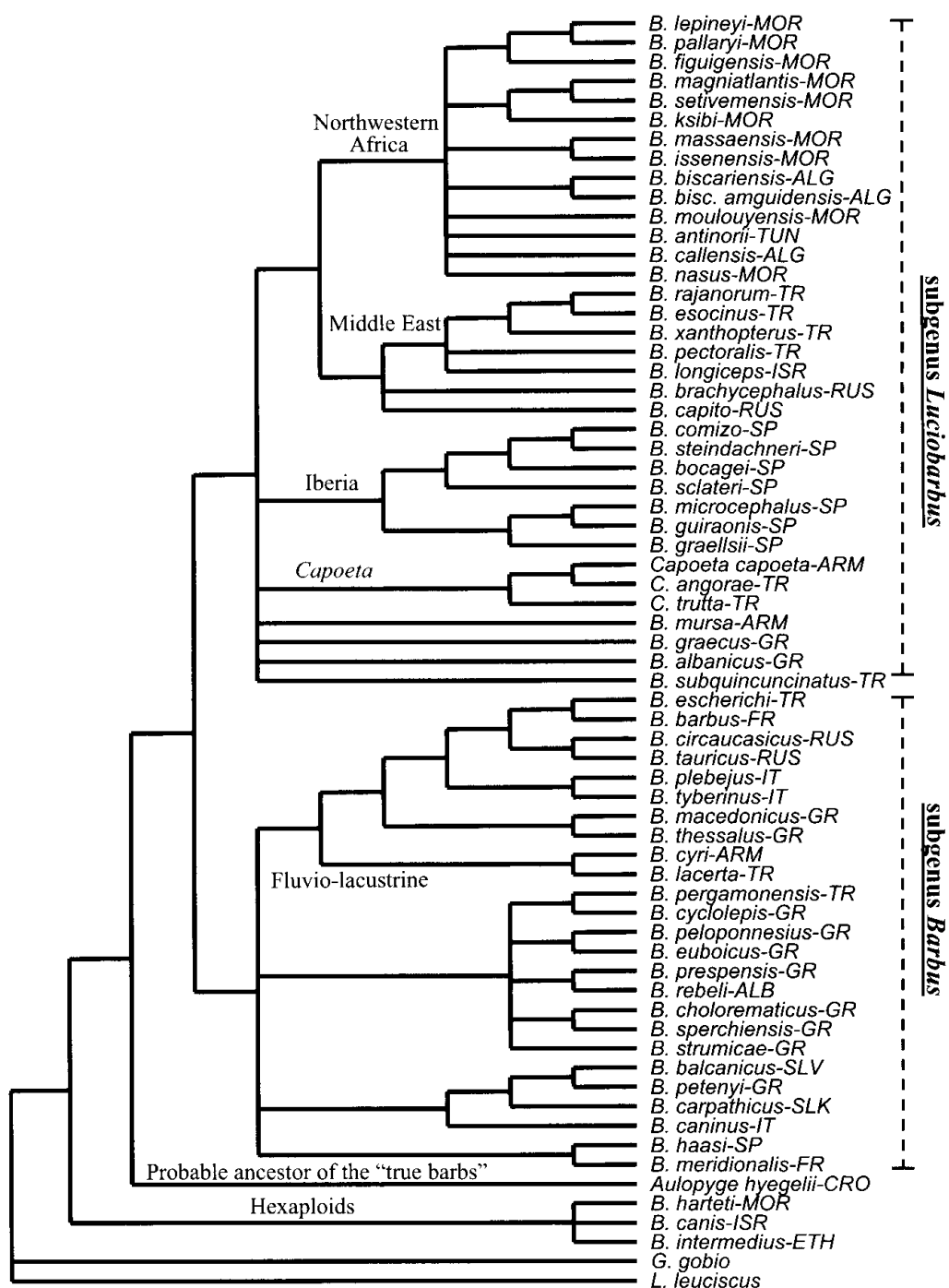
**Příloha 4.** Konkrétní postupy použité při barvení enzymových systémů.

Příloha 1. Fylogenetická rekonstrukce taxonu *Barbus sensu lato*.



Fylogenetický strom, sestavený na základě analýzy sekvencí ATPas 8 a 6 a cytochromu b, je převzat z práce Machordom et Doadrio (2001). V závorkách za druhovými jmény je uvedena zkratka země původu analyzovaného vzorku (Al-Alžírsko, BH-Bosna a Hercegovina, Eg-Egypt, Et-Etiopie, GC-Guinea, Gr-Řecko, Is-Izrael, It-Itálie, Mo-Maroko, Ro-Rumunsko, Ru-Rusko, SA-Jihoafrická republika, Sp-Španělsko, Tu-Tunisko). Údaje v trojúhelnících udávají stupeň ploidie.

Příloha 2. Fylogenetická rekonstrukce taxonu *Barbus sensu stricto*.



Tento fylogenetický strom sestavili Berrebi et Tsigenopoulos (2003) kombinací výsledků mnoha předchozích prací různých autorů. Za druhovými jmény je velkými písmeny uvedena zkratka země původu analyzovaného vzorku. (ALB-Albánie, ALG-Alžírsko, ARM-Arménie, CRO-Chorvatsko, ETH-Etiopie, FR-Francie, GR-Řecko, ISR-Izrael, IT-Itálie, MOR-Maroko, RUS-Rusko, SLK-Slovensko, SLV-Slovinsko, SP-Španělsko, TR-Turecko, TUN-Tunisko). Forma, která je zde označována jako *B. petenyi*, není totožná s druhem *B. petenyi* Heckel, 1852, obývajícím přítoky dolního toku Dunaje.

### **Příloha 3. Fotografie z povodí Popradu**



1. Ukázka typického říčního profilu na studovaném úseku řeky Poprad.



2. Říčka Lubotínka v povodí Popradu. Vzorky byly odebrány z úseku pod jezem.



3. Takto vypadala řeka Poprad nedaleko obce Plaveč.

#### **Příloha 4.** Konkrétní postupy použité při barvení enzymových systémů

##### **SOD** – Superoxid dismutasa (jaterní tkáň)

1. Agar + H<sub>2</sub>O (0,6 + 30 ml)
2. Pufry a roztoky: 0,05 M TRIS pH 8,0 (30 ml)
3. Barvy: MTT (0,010 g 2x1 ml)  
PMS (0,005g 1x1 ml)

##### **PGM** – Fosfoglukomutasa (svalová i jaterní tkáň)

1. Agar + H<sub>2</sub>O (0,6 + 30 ml)
2. Pufry a roztoky: 0,05 M TRIS pH 8,0 (25 ml)  
0,2 M MgCl<sub>2</sub> (8 ml)
3. Substrát: G-1-P Na<sub>2</sub> (0,1 g 1x1 ml)
4. Koenzymy: NAD (0,4 g 2x1 ml)  
NADP (0,005 g 1x1 ml)
5. Barvy: NBT (0,010 g 2x1 ml)  
MTT (0,005g 1x1 ml)  
PMS (0,005g 1x1 ml)
6. Enzymy: G-6-P-DH (17 U) Leuconostoc (25 µl)

##### **LDH** - Laktát dehydrogenasa (svalová tkáň)

1. Agar + 0,2M TRIS pH 8,5 (0,6 + 40 ml)
2. Pufry a roztoky: 0,05 M pyrofosfát sodný (10 ml)
3. Substrát: sodná sůl laktátu (2x1 ml)
4. Barvy: (2x7 ml)

##### **LDH + GPI** kombinované barvení (jaterní tkáň)

1. Agar + H<sub>2</sub>O (0,6 + 30 ml)
2. Pufry a roztoky: 0,05 M TRIS pH 8,0 (30 ml)  
0,2 M MgCl<sub>2</sub> (5 ml)
3. Substrát: sodná sůl laktátu (5x1 ml)  
F-6-P Na (0,04 g 1x1 ml)
4. Koenzymy: NAD (0,08 g 4x1 ml) nebo  
NADP (0,010 g 2x1 ml)
5. Barvy: NBT (0,010 g 2x1 ml)  
MTT (0,005g 1x1 ml)  
PMS (0,005g 1x1 ml)
6. Enzymy: G-6-P-DH (17 U) Leuconostoc (20 µl)

##### **GPI** – Glukózafosfát izomerasa (svalová tkáň)

1. Agar + H<sub>2</sub>O (0,6 + 30 ml)
2. Pufry a roztoky: 0,05 M TRIS pH 8,0 (30 ml)  
0,2 M MgCl<sub>2</sub> (8 ml)
3. Substrát: F-6-P Na (0,04 g 1x1 ml)
4. Koenzymy: NAD (0,02 g 1x1 ml)  
NADP (0,005 g 1x1 ml)
5. Barvy: NBT (0,010 g 2x1 ml)  
MTT (0,005g 1x1 ml)  
PMS (0,005g 1x1 ml)
6. Enzymy: G-6-P-DH (17 U) Leuconostoc (25 µl)

**MDH** – Malát dehydrogenasa (jaterní i svalová tkáň)

1. Agar + 0,2M TRIS pH 8,5 (0,6 + 40 ml)
2. Pufry a roztoky: 0,05 M pyrofosfát sodný (10 ml)
3. Substrát: sodná sůl malátu (2x1 ml)
4. Barvy: (2x7 ml)

Vysvětlivky:

NBT	.....nitrotetrazoliová modř (Nitro blue tetrazolium)
MTT	.....thiazolylová modř (Methyl thiazolyl tetrazolium)
PMS	.....fenazin metosulfát (Phenazin methosulphate)
NAD	.....nikotinamid-adenin dinukleotid
NADP	.....nikotinamid-adenin dinukleotid fosfát
F-6-P Na	.....sodná sůl fruktóza-6-fosfátu
G-1-P Na <sub>2</sub>	.....disodná sůl glukóza-1-fosfátu
G-6-P-DH	.....glukóza-6-fosfát dehydrogenasa izolovaná z <i>Leuconostoc mesenteroides</i>