Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie

Bc. Kristina Beatrix Bílá

Morfometrická disparita u evropských linií hlaváčů *(Gobiidae)*

Morphometric disparity in European lineages of gobies *(Gobiidae)*

Diplomová práce

Poděkování

Děkuji těm mnoha lidem, kteří mi pomohli při zpracovávání této diplomové práce, ať už se jednalo o vedení, nápady, korekturu či psychickou podporu.

Prohlášení

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

V Praze, 10. 9. 2022 Bc. Kristina Beatrix Bílá

podpis studenta

Abstrakt

Hlaváči (Actinopterygii: Gobiiformes) jsou velmi pozoruhodnou skupinou ryb, nejen tím, že jsou druhově nejbohatším řádem kostnatých ryb (Teleostei), ale i tím, že dokázali kolonizovat nejrůznější typy prostředí. Díky tomu se u nich rozvinulo mnoho forem, lišících se svou morfologií. Cílem této práce bylo zjistit, zda u evropských evolučních linií hlaváčů díky opakované kolonizaci stejných typů mikrohabitatů došlo k vytvoření ekomorf, tj. zda je morfologie (tvar těla) ovlivněna nikou, a jakou roli hraje konvergentní evoluce v adaptaci na jednotlivé typy prostředí. K tomu jsem použila kvantifikaci a porovnání tvaru těla pomocí metod geometrické morfometrie.

Výsledky této práce ukázaly, že u čtyř z šesti ekologických skupin studovaných hlaváčů došlo ke konvergentní evoluci a jejich tvar je ovlivněn prostředím, které obývají a jejich způsobem života, bez ohledu na příslušnost k linii a na fylogenetické vztahy. Konvergentní evoluce byla prokázána u hyperbentických, nektonických, mořských epibentických a sladkovodních epibentických druhů. Nebyla naopak prokázána u euryhalinních epibentických druhů, ani u kryptobentických druhů hlaváčů.

Klíčová slova:

geometrická morfometrie, konvergentní evoluce, adaptace, Gobiiformes

Abstract

Gobies (Actinopterygii: Gobiiformes), are a remarkable group of fishes, not only because they are the most species-rich order of bony fishes (Teleostei), but also due to their extraordinary ability to colonize different types of environments. As a consequence, they evolved a variety of morphological shapes. The aim of this work was to reveal whether the European evolutionary lineages of gobies evolved ecomorphs through repeated colonisation of the same types of microhabitats, i.e. whether morphology (body shape) is influenced by niche, and what role convergent evolution plays in adaptation to different types of environments. For this purpose i made quantification and comparison of body shape using the methods of geometric morphometry.

The results of this work showed that convergent evolution has occurred in four out of the six ecological groups of studied gobies, i.e., that their shape is influenced by the environment they inhabit and their way of life, regardless of lineage affiliation and phylogenetic relationships. Convergent evolution has been revealed in hyperbenthic, nektonic, marine epibenthic and freshwater epibenthic species. In contrast, convergent evolution has not been proven in euryhaline epibenthic species, nor in cryptobenthic species of gobies.

Key words:

geometric morphometry, convergent evolution, adaptation, Gobiiformes

Obsah

1 Úvod 1

2 O hlaváčích 3

2.1 Zařazení v systému a rozšíření 5

2.1.1 Ekologické skupiny evropských linií hlaváčů 7

2.2 Typické morfologické znaky hlaváčů 9

2.3 Původ evropských hlaváčů 10

2.3.1 Hlaváči ve Středozemním moři 10

2.4 Morfometrická adaptace hlaváčů na různé typy prostředí 12

2.4.1 Morfometrie na rybách 12

2.4.2 Morfometrie na hlaváčích 13

3 Materiál & Metody 15

3.1 Materiál 15

3.2 Zkoumané druhy 16

3.3 Metody 23

3.3.1 Pořizování fotografií 23

3.3.2 Vybavení 24

3.3.3 Landmarkování 25

3.3.4 Analýza dat 27

4 Výsledky 31

4.1 PCA setu z boku 31

4.1.1 Kategorizace dle linie (Lineage) 31

4.1.2 Kategorizace dle prostředí (Environment) 33

4.1.3 Kategorizace dle životního stylu s ohledem na prostředí (Lifestyle_environment) 35

4.2 PCA setu shora 38

4.2.1 Kategorizace dle linie (Lineage) 39

4.2.2 Kategorizace dle prostředí (Environment) 41

4.2.3 Kategorizace dle životního stylu s ohledem na prostředí (Lifestyle_environment) 42

4.3 Test konvergence..... 45

4.4 Shluková analýza..... 46

5 Diskuze 49

5.1 Tvar a jeho změny při pohledu z boku 50

5.2 Tvar a jeho změna při pohledu shora 52

5.3 Možné externí vlivy 53

6 Závěr 55

7 Seznam literatury a zdrojů 57

1 Úvod

Při zkoumání různorodosti a rozmanitosti života si častso klademe otázku, jaké vlivy stojí za vývojem tolika odlišných ekologických a fenotypických forem. Někteří autoři považují za jeden z hlavních takových procesů jev zvaný adaptivní radiace (Rainey & Travisano, 1998; Simpson, 1953; Schutler, 1996; Gavrilets & Vose, 2005; Frédérich et al., 2013; Stroud & Losos, 2016). K adaptivní radiaci dochází, pokud se z jednoho společného předka rychle vyvine řada nových druhů. Nejčastěji se tak stane, jsou-li kolonizovány pro druh nové typy prostředí, neboť se tak zpřístupní nová škála ekologických nik, které může druh využívat. Protože v těchto nikách mohou být výhodné jiné vlastnosti než v původním prostředí, vyvíjejí se lokální adaptace (Stroud & Losos, 2016). Následně tak dojde k tomu, že vznikne mnoho nových druhů, které jsou přizpůsobeny různým typům prostředí (Gavrilets & Vose, 2005), přičemž se u nich mohou vyvinout značně rozdílné morfologie těla.

Pokud výše popsaným způsobem dojde k rychlé diverzifikaci a vývoji morfologických odlišností na začátku evoluční historie kládů, mluvíme o takzvaném modelu „early burst“ (Arbour et al., 2019). Důkazy podporující tento model radiace byly nalezeny pouze u některých skupin organismů, jako například u proslulých „Darwinových pěnkav“ rodu *Geospiza* z Galapážského souostroví, či u cichlid z východoafrických jezer (Frédérich et al., 2013).

Early burst není jediný model, kterým se dá diverzifikace kládů a jejich morfologie vysvětlit. Další, používaný pro vysvětlení vzniku těchto rozdílů je model konvergentní radiace (Frédérich et al., 2013). V takovém případě nedochází k morfologickým změnám pouze na začátku evoluce kládu, ale adaptace na podobné typy prostředí se vyvíjí znovu a znovu v důsledku osidlování opakovaně dostupných podobných nik. Obdobné adaptivní radiace jsou tak často replikovány a vznikají skupiny druhů, jež jsou si podobné v morfometrické a funkční disparitě (Frédérich et al., 2013).

Díky tomu, že při opakovaném osídlení stejné niky jsou vystaveny stejným selekčním tlakům, vyvíjí se u nepříbuzných druhů podobné fenotypické formy, nezávisle na sobě. Jedinci jsou si pak podobní ne proto, že by si byli blízce příbuzní, ale protože se přizpůsobili stejnému typu habitatu (Lowry, 2012). Pro popis této

situace zavedl Ernest Edward Williams roku 1972 pojem ekomorfa. Ten označuje skupinu druhů, které obývávají stejný habitat a jsou si podobné tvarem těla i chováním, avšak nemusí si být blízce fylogeneticky příbuzné. Studiem ekomorf se zabývá disciplína ekomorfologie, která zkoumá to, jaký má prostředí vliv na fenotyp, jaká morfologie umožňuje obývat konkrétní typy prostředí, a jaká je predikovatelnost tvaru těla na základě obývané niky.

Takovouto opakovanou konvergentní radiaci můžeme pozorovat u leguánů rodu *Anolis* na různých ostrovech v Karibiku (Losos et al., 2001; Mahler et al., 2013; Huie et al., 2021), cichlid z jezer východní Afriky (Muschick et al., 2012), pavouků ze souostroví Hawaii (Blackledge & Gillespie, 2004; Gillespie, 2004), nebo žab v různých částech světa (Moen et al., 2016). Prvními popsanými příklady opakované konvergentní radiace byly druhy, které se vyvinuly na ostrovech, tedy evolučně mladé druhy, kolonizující nová prostředí (Losos et al., 2001; Gillespie, 2004). Později se ukázalo, že ke konvergentní adaptaci docházelo i na pevnině (Poe & Anderson, 2017), a také u starých evolučních skupin (Moen et al., 2016).

Hlaváči oplývají velkým počtem druhů, které se navzájem velmi liší svojí distribucí, velikostí obývaného teritoria, způsobem života a ekologickými požadavky. Právě kvůli této velké diverzitě jak ekologických strategií, tak morfologických forem, je to skupina velmi vhodná pro studium vývoje morfologie v závislosti na obývaném prostředí a stylu života, a testování modelů adaptivní radiace.

Geometrická morfometrie je statistickou metodou analýzy tvaru a umožňuje kvantifikaci tvaru těla. Využívá souřadnic námi vybraných bodů (v angličtině „landmark“), které mohou být biologicky významné – určují například délku zvířete, velikost oka, apod. Na základě srovnání pozice těchto bodů u různých jedinců můžeme zhodnotit, jak moc jsou si tito jedinci tvarově podobní.

Cílem této diplomové práce bylo kvantifikovat tvary těla hlaváčů z různých vývojových linií. Pomocí nich zjišťujeme, zda u evropských druhů hlaváčů díky opakované kolonizaci stejných typů mikrohabitatů došlo k vytvoření ekomorf v důsledku konvergentní adaptace, tj. zda druhy ze stejné ekologické skupiny mají podobnou morfologii bez ohledu na fylogenezi.

2 O hlaváčích

Ač jsou hlaváči (Gobiiformes) ve svém přirozeném prostředí v mnoha případech přehlédnutelní, ve skutečnosti se jedná o velmi významnou a výjimečnou skupinu ryb. Žádné jiné kostnaté ryby se jim nemohou rovnat v rozmanitosti prostředí, kam se dokázali rozšířit a, co je nejdůležitější, na která se dokázali dokonale adaptovat. Jejich schopnosti dostávat se do nových prostředí a adaptovat se na mikrohabitaty vedly k adaptivní radiaci a rychlému vzniku nových druhů. Díky tomu se s počtem druhů přesahujícím 2 200 v 315 rodech řadí hlaváči mezi největší a nejdiverzifikovanější skupiny v rámci kostnatých ryb (Teleostei) (Patzner et al., 2011, Fricke et al., 2022). Hlaváči tvoří důležitou složku ichthyofauny téměř po celém světě. Můžeme je najít v tropických, subtropických i temperátních mořích a brakických vodách. Obývají ovšem i sladké vody, a v sladkovodních tocích často dominují.

U hlaváčů můžeme nalézt i neobyčejnou rozmanitost životních stylů. Někteří žijí v otevřených oceánech, jiní se vznáší nad písčitým a kamenitým dnem, a další preferují kryptobentický styl života, schovávajíce se pod kameny. Můžeme je ale nalézt i v přílivových jezírkách, podmořských „loukách“, na korálových útesech, v podmořských i sladkovodních jeskynních, a na bahnitém dně. Několik druhů se dokonce specializovalo na život uvnitř bezobratlých živočichů, jakými jsou například živočišné houby. U 15 druhů hlaváčů se vyvinul symbiotický vztah s krevetkami z čeledi Alpheidae (Herler, 2007). Hlaváči žijí v mělčinách i mořských hloubkách, například druh *Karsten totyensis* byl nalezen v hloubce 1 122 m (Patzner et al., 2011).

Některé druhy hlaváčů jsou tažné. Jeden z velmi impresivních rybích výkonů je tah amfidromních hlaváčů druhu *Sicyopterus stimpsoni* proti proudu vodopádů vysokých až 350 m, které ryby překonávají za pomoci přísavných disků z přeměněných břišních ploutví, který je pro hlaváče typický (Blob et al., 2008).

Hlaváči se adaptovali na široké rozmezí teplot, od 7 °C u druhu *Leucopsarion petersi* až do 40 °C u druhu *Chlamydogobius eremius* (Herler et al., 2011).

Naprosto extrémní životní strategii mají někteří zástupci čeledi lezců (Oxudercidae), kteří se adaptovali k životu na souši, kde tráví velkou část života, a dokáží dýchat jak pod vodou, tak nad ní (Patzner et al., 2011).

S rozmanitostí životních stylů přichází rozmanitost ve způsobu rozmnožování. Oplození u hlaváčů je vnější, většina z nich jsou gonochoristé, ovšem některé druhy jsou hermafroditické s protogynními tendencemi (Cole, 1990). U hlaváčů byla pozorována monogamie, polygamie i promiskuita. Mnoho druhů investuje do svého potomstva rodičovskou péči, kdy samci hlídají oplodněná vajíčka. Krátce žijící hlaváči se rozmnožují pouze jednou za život, zatímco déle žijící druhy se mohou rozmnožovat v průběhu mnoha let, někdy i víckrát během jednoho roku (Patzner, 2011).

V řádu hlaváčů panuje i velká diverzita co se tvaru a velikosti těla týče. Většina druhů hlaváčů je drobných, patří mezi ně jedna z nejmenších kostnatých ryb vůbec, *Eviota deminuta*. Tato ryba dorůstá v dospělosti pouhých 0,8 cm. Stejně tak se sem řadí nejlehčí rybovitý obratlovec, *Schindleria brevipinguis*, jejíž nejtěžší jedinec váží kolem 2 mg (Herler, 2011). Oproti tomu největší exempláře hlaváčů, a to z druhu *Oxyeleotris marmorata*, dorůstají až 65 cm (Kottelat, 2001). Právě kvůli malé velikosti a skrytému způsobu života většiny hlaváčů se o nich dosud neví mnoho, neboť jsou málo studovaní. Navíc jsou stále popisovány a objevovány nové druhy (Herler, 2011), a to i v evropských mořích (např. Kovačić & Šanda, 2016; Kovačić et al. 2016, 2017, 2018, 2021; Engin & Seyhan, 2017). Protože je však tento řád tak rozmanitý v oblastech morfologie, ekologie i chování, jsou hlaváči nyní stále častěji používáni jako modelové organismy při studiu evolučních mechanismů, které stojí za procesem diverzifikace (Agorreta et al., 2013).

Hlaváči mají nejen roli jakožto zajímavý subjekt pro výzkum, ale mají význam i v komerčním využití. V Itálii, Ukrajině i Rusku jsou loveni jakožto potrava druhy *Zosterisessor ophiocephalus, Mesogobius batrachocephalus, Neogobius fluviatilis, Neogobius melanostomus*, z nichž některé zkoumáme i v této práci. Hlaváči jsou důležitou součástí jídelníčku mnoha druhů ryb, včetně těch komerčně důležitých, jako jsou tresky, mořčáci, a platýsi (Zander, 2011). Hojné využití zejména pro tropické druhy hlaváčů má i akvaristika. Obzvláště jsou tak pěstovány ty, co jsou výrazněji barevné nebo na sobě mají zajímavé vzory. z mořských jsou to především hlaváči z rodů *Amblyeleotris, Amblygobius*, *Cryptocentrus, Elacantinus, Eviota, Gobiodon, Hoplolatilus, Stonogobiops, Trimma, a Valenciennea*. Zájmu akvaristů ovšem neunikly ani brakické druhy, jako ty z rodu *Brachygobius, Chlamydogobius, Stiphodon* či *Sicyopus*.

V neposlední řadě jsou mohou být hlaváči i významnými invazními druhy, obzvláště v případě hlaváče černotlamého (*Neogobius melanostomus*) (Kornis et al., 2013).

Dalo by se tak říct, že studium hlaváčů nám rozhodně může poskytnout mnoho zajímavých poznatků, neboť jejich množství druhů, kosmopolitní rozšíření, a především neuvěřitelná diverzita životních stylů by nám při bližším studiu mohla odpovědět na mnoho otázek týkajících se vývoje života ryb.

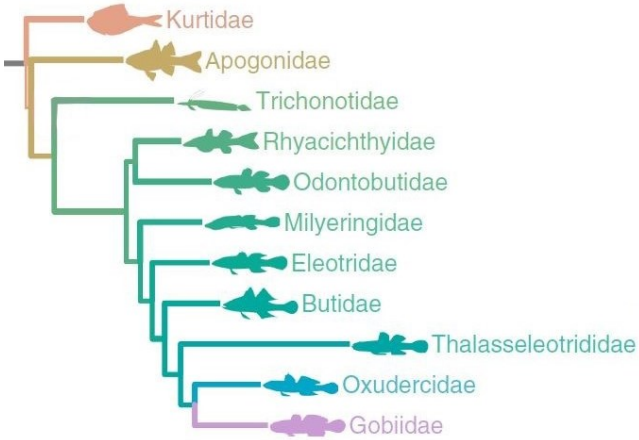
2.1 Zařazení v systému a rozšíření

Hlaváči (Gobiiformes) se řadí mezi paprskoploutvé kostnaté ryby (Actinopterygii: Teleostei). Příbuzenské vztahy s ostatními kostnatými rybami ještě nejsou jasně rozřešeny, stejně tak vztahy uvnitř tohoto řádu, a na toto téma neustále vznikají nové studie (např. Agorreta et al., 2013; Thacker & Gkenas, 2019; McCraney et al., 2020). Fylogenetické stromy založené na morfologii a výskytu synapomorfií se ne vždy shodují se stromy molekulárními (Patzner & al, 2011). Hlaváči jsou řazeni mezi Percomorphacea (Fricke et al., 2022).

Doposud nejnovější a nejdetailnější studií vzniklou na toto téma nabízí McCraney et al. (2020). Jejich analýza zařazuje hlaváče do blízké příbuznosti s čeleděmi kroužkožebernatcovitých (Kurtidae) a parmovcovitých (Apogonidae), které navíc dává dohromady do společného řádu Kurtiformes.

Samotný řád hlaváčů se v této studii rozděluje na devět čeledí: Trichonotidae, Rhyacichthyidae, Odontobutidae, Milyeringidae, Eleotridae, Butidae, Thalasseleotrididae, Oxudercidae a Gobiidae. Jejich vzájemné umístění je k nahlédnutí na obrázku 1. Mřenkounovití (Rhyacichthyidae) jsou amfidromní hlaváči vyskytující se v Tichém oceánu a slaných i sladkých vodách Oceánie, a od ostatních hlaváčů se morfologicky poměrně liší. Hlavačkovcovití (Odontobutidae) jsou sladkovodní ryby z východní Asie. Do čeledi Milyeringidae patří slepí jeskynní hlaváči. Hlavačkovití (Eleotridae) je velká kosmopolitní čeleď, jejíž zástupci se vyskytují hojně ve sladkých i slaných vodách po celém světě s výjimkou temperátních moří, kde jsou vzácní. Do čeledi Butidae se řadí druhy žijící v Indo-Pacifiku a Západní Africe, zatímco zástupce čeledi Thalasseleotrididae nalezneme v mořích Austrálie a Nového Zélandu (McCraney et al., 2020; popisy čeledí z Nelson et al., 2016).

Sesterské čeledi lezci (Oxudercidae = gobionelline-like klád čeledi Gobiidae *sensu* Agorreta et al., 2013) a hlaváčovití (Gobiidae = gobiine-like klád čeledi Gobiidae *sensu* Agorreta et al., 2013) se dříve řadily do jedné čeledi (Gobiidae; Agorreta et al., 2013). Díky velkému množství krátkých větví na bázi čeledí Gobiidae a Oxudercidae bychom zde mohli být svědky právě explozivní radiace typu „early-burst“ (Agorreta et al., 2013).



Obrázek 1: Fylogeneze podle McCraney et al. (2020)

Čeleď Oxudercidae se nyní skládá z okolo 600 druhů, jenž se vyskytují po celém světě a to jak v tropických, tak temperátních oblastech. Většina druhů je euryhalinních a vyskytuje se při mořském pobřeží na písečných substrátech. Mnoho druhů je ovšem i sladkovodních, a patří sem i obojživelné druhy a druhy schopné přežít delší dobu na souši (Nelson et al., 2016).

Čeleď hlaváčovitých (Gobiidae), je třetí největší čeledí ryb. Dnes se do ní řadí odhadem více než 1500 druhů v přibližně 250 rodech. Zástupce této čeledi lze nalézt v tropických i temperátních oblastech po celém světě. Většina z nich je mořských a obývá korálové útesy po celém světě. Existuje však i mnoho druhů žijících ve sladkých vodách Evropy a Asie. V této čeledi převažuje bentický styl života, často na písečném dně v pobřežních oblastech. Mnoho z nich nepohrdne ani opuštěnými norami po bezobratlých. Díky tomu, že je drtivá většina hlaváčovitých ryb drobná, a kvůli kryptickému zbarvení i stylu života je mnoho druhů obtížně nalezitelných, jejich biologie není důkladně prozkoumána. Mnoho dalších druhů možná teprve čeká na objevení (Thacker & Patzner, 2011).

V této práci jsem pracovala s druhy hlaváčů z biogeografické oblasti severovýchodního Atlantiku a Středozemního moře a přilehlých sladkých vod. Tuto oblast obývají celkem tři evoluční linie hlaváčů (Agorreta et al., 2013): *Pomatoschistus*, patřící do čeledi (Oxudercidae) a *Aphia* a *Gobius* linie, patřící do čeledi Gobiidae. Druhově bohaté jsou linie *Gobius* a *Pomatoschistus*. *Aphia* linie, je naopak zastoupena jen několika málo druhy. Tyto tři evropské linie se vyvíjely

nezávisle na sobě, což poukazuje na možnost, že Středozemní moře bylo hlaváči opakovaně kolonizováno hned několikrát (Agorreta et al., 2013).

2.1.1 Ekologické skupiny evropských linií hlaváčů

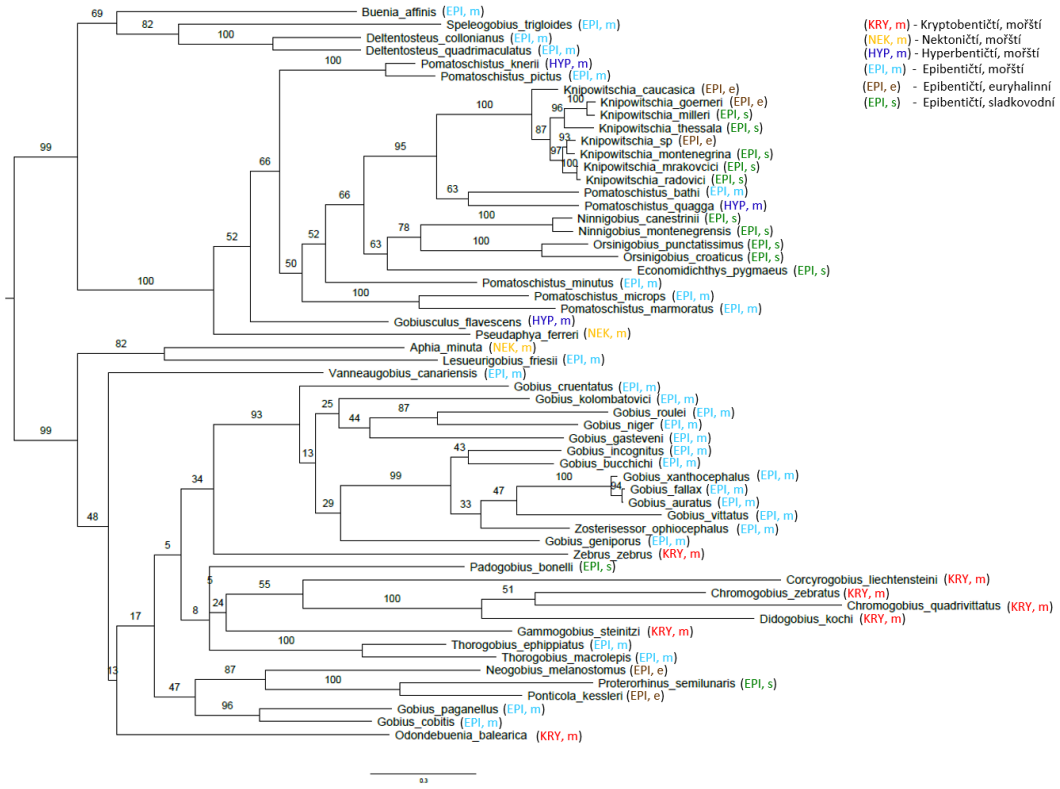
Z hlediska adaptace na různá prostředí se evropští mořští hlaváči dělí na čtyři základní ekologické skupiny (Kovačić & Patzner, 2011). Nejvíce druhů je adaptovaných na život na dně (epibentické druhy). Velké množství druhů je tzv. kryptobentických, žijí skrytým způsobem života pod kameny či v různých dutinách v substrátu a toto prostředí opouštějí jen velmi zřídka. Několik druhů vyvinulo tzv. hyperbentický způsob života, tzn. že se zdržují ve volném vodním sloupci blízko dna, většinou do jednoho metru nade dnem. Několik druhů je pak čistě pelagických, kdy se zdržují ve volném vodním sloupci. Druhy pelagické jsou navíc pedomorfní (Giovannotti et al., 2007). Jak hyperbentické, tak pelagické druhy jsou hejnové, kdežto epibentické a kryptobentické druhy společenstva nevytvářejí.

V rámci *Aphia* linie jsou zástupci rodu *Lesuerigobius* považováni za kryptobentické druhy (tři druhy), přičemž jeden druh se často vyskytuje v blízkosti korýšů rodu *Nephrops*, kdežto *Aphia minuta* je pelagickým pedomorfním druhem. Zástupci linie *Pomatoschistus* jsou z velké většiny epibentičtí, několik druhů je však hyperbentických a dva druhy pelagické a pedomorfní. Také v *Gobius* linii převažují druhy epibentické, avšak mnoho druhů je kryptobentických. Naopak v této skupině nejsou známi žádní hyperbentičtí ani pelagičtí zástupci.

Zajímavá je adaptace na sladké či brakické vody u zástupců evropských skupin hlaváčů. Zatímco zástupci linie *Aphia* jsou mořští, jak u *Gobius*-linie, tak i u *Pomatoschistus*-linie se vyvinuly druhy obývající brakické i sladké vody. V rámci *Pomatoschistus* linie je řada druhů rodu *Pomatoschistus* euryhalinních, vyskytují se v příbřežních oblastech moří, ale i v lagunách o různé salinitě a brakických vodách ústí řek. Zástupci rodu *Ninnigobius* (dříve řazení do rodu *Pomatoschistus*) se vyskytují ve sladkých vodách, jen výjimečně v brakickém prostředí. Zástupci rodu *Knipowitschia* jsou buď sladkovodní, nebo se vyskytují v brakických vodách lagun a ústí řek, kdežto zástupci rodů *Orsinigobius* (dříve řazení do rodu *Knipowitschia*) a *Economidychthys* jsou sladkovodní. V rámci *Gobius* linie všichni zástupci hlaváčů z ponto-kaspické oblasti (Benthophilinae podle Nielson & Stepien, 2009) žijí

v brakických či sladkých vodách. Dále jsou sladkovodní zástupci rodu *Padogobius* (dva druhy), obývající jaderské a tyrhénské úmoří.

Podle současně dostupné fylogeneze (data týmu školitelky) u evropských linií hlaváčů došlo k přechodu na sladkovodní způsob života nejméně pětkrát, na hyperbentický a pelagický způsob života nejméně třikrát a na kryptobentický nejméně šestkrát, jak můžeme vidět na obrázku 2 (Zvětšená verze obrázku je k dispozici v příloze 1).



Obrázek 2 Fylogeneze s vyznačeným životním stylem a obývaným habitatem u jednotlivých druhů (data týmu školitelky)

2.2 Typické morfologické znaky hlaváčů

Většina hlaváčů má protáhlé tělo s lehce zploštělou hlavou se zakulaceným koncem. Oči, umístěné dorzolaterálně, mohou vystupovat nad linii hlavy (Patzner et al., 2011). Naprosto typickým znakem pro řád hlaváčů je vznik ventrálního disku fúzí obou břišní ploutví. Tento disk může být používán jako adhezivní přísavka, za pomoci které hlaváči udržují svoji pozici na kamenech a jiných površích při proudění okolní vody, nebo jako v případě *Sicyopterus stimpsoni*, k překonávání kolmých skalních stěn vodopádů (Blob et al., 2008). Tento disk však může být u některých hlaváčovitých redukován, jako je tomu například u druhu *Odondebuenia balearica*, u kterého jsou břišní ploutve téměř oddělené a spojuje je pouze tenká blanka (Ahnelt & Dorda, 2003), anebo může disk zcela chybět. Tak je tomu například u čeledi *Eleotridae* a *Butidae* (Patzner et al., 2011).

Dalším typickým znakem jsou dvě hřbetní ploutve hlaváčů, přičemž první hřbetní ploutev může obsahovat 4 až 8 tvrdých paprsků, a druhá začíná jedním tvrdým paprskem a pokračuje 9 až 18 měkkými paprsky (Carpenter & De Angelis, 2002).

Tělo hlaváčů je pokryto cykloidními nebo ktenoidními šupinami. Některé druhy, jako je například *Pseudaphya ferreri,* mohou mít oba typy šupin najednou (Kovačić & Golani, 2007). Druh *Crystallogobius linearis* nemá šupiny žádné (La Mesa, 2001).

Příslušníci obou pohlaví jsou si u hlaváčů velmi podobní, distinktní sexuální dimorfismus je patrný u dospělých jedinců hlavně ve tvaru a velikosti urogenitálních papil (Miller, 1961). U některých druhů mají samci prodloužené paprsky na začátku první hřbetní ploutve.

Podoba hlaváčů se může lišit podle jejich životního stylu. Zatímco epibentické druhy mají fusiformní tvar těla, u těch žijících pod kameny, ve škvírách a v jeskynních dochází k laterálnímu zploštění těla (Herler, 2007). Hyperbentické druhy mají protáhlé tělo. Nejodlišnější jsou druhy žijící nektonicky, jejichž tělo je drobné, průhledné, a oči jsou umístěny spíše laterálně, bez vyvýšení typického pro ostatní hlaváčovité (Patzner et al., 2011).

2.3 Původ evropských hlaváčů

Jak již bylo zmíněno dříve, řád hlaváčů je součástí skupiny Percomorphaceae. Betancur-R et al. (2013) se ve své studii snažili stanovit přibližné stáří této skupiny a jejích jednotlivých řádů. Její vznik je běžně na základě fosilních nálezů odhadován na období mezi pozdními druhohorami a začátkem třetihor, s tím, že k vývoji předků moderních skupin patřících do Percomoprhaceae došlo již brzy po vymírání na konci křídy, které se odehrálo před téměř 66 miliony let. Betancur-R et al. (2013) ovšem za pomoci genetické analýzy stanovují vznik Percomorphacea *o* několik desítek milionů let dříve, do doby před zhruba 130 miliony let, tedy na začátek období křídy. Rozvoj skupiny Gobiaria odhadují na dobu před 100 miliony let (Betancur-R et al., 2017). Řád hlaváčů však lze odhadem datovat na období před 65 miliony let (Betancur-R et al., 2013).

Místo původu hlaváčů a vysvětlení jejich přítomnosti ve Středozemním moři je stále předmětem výzkumů. Thacker (2015) ve své studii odhaduje vznik hlaváčovitých *(Gobiidae)* do období mezi 36,2-48,7 miliony lety, tedy v pozdním eocénu, a to do oblasti Západního Indo-Pacifiku. Odtud docházelo k migracím a osidlování východního Pacifického oceánu, Atlantiku, a Středomoří.

Nejstarší nalezená fosilie z rodu *Gobius*, *Gobius jarosi*, pochází z brzkého miocénu, a shodou okolností byla nalezena na území České republiky. Její věk je odhadován na 19,1-20,4 milionů let. Morfologická analýza ji klade do blízké příbuznosti s dnes žijícími druhy *G. niger, G. roulei*, a *G. vittatus*. To naznačuje nejdřívější možný rozvoj této linie až do tohoto období (Reichenbacher et al., 2018).

2.3.1 Hlaváči ve Středozemním moři

Historické osídlení hlaváčů ve Středozemním moři je velmi komplikovaným tématem, které dosud zastírá mnoho nevyřešených otázek. V době rozvoje mnoha řádů ryb bylo místem s největší diverzitou ryb západní moře Tethys (Thacker, 2015). To se tou dobou rozkládalo na místě, kde se dnes nachází Středozemní a Rudé moře (Wood, 2011). Díky pozdějším geologickým aktivitám a posunu tektonických desek se tato moře postupně čím dál tím víc izolovala. Dá se tak očekávat, že Středozemní moře mohlo hostit bohatou reliktní faunu z Tethysu, a to až do doby pozdního miocénu. Před 5,59-5,33 miliony let totiž díky kolizi Africké a Euroasijské tektonické desky

došlo k zvednutí pevniny pod Gibraltarským průlivem až o 1 kilometr, což vedlo k jeho uzavření (Krijgsman et al., 1999; Warny et al., 2003), a možné následné izolaci. Tento jev je v literatuře často popisován jako Messinská salinitní krize, která trvala až do doby kolem 5,33 milionů let, kdy nejspíše vliv tektonických pohybů nastartoval protržení hráze v Gibraltarském průlivu, jenž se tak znovu otevřel a došlo k takzvané Zankleanské záplavě (Abril & Periáñez, 2016). Ta pak hladinu Středozemního moře opět dorovnala na úroveň Atlantiku. Dříve se předpokládalo, že proudění vody z Atlantského oceánu ustalo úplně, Středozemní moře vyschlo, a většina místních druhů vymřela (Bianchi & Morri, 2000; Gargani & Rigollet, 2007). Novější studie však tvrdí, že kontakt Středozemního moře a Atlantského oceánu nezanikl zcela, a místní druhy byly zachovány (Krijgsman et al., 2018), včetně druhů hlaváčů. Tuto teorii podporují i data Agorrety et al. (2013).

Během Pleistocéního střídání dob ledových a meziledových nejspíše docházelo k opakované kolonizaci Středozemního moře teplomilnými druhy z mírných a subtropických pásem zasažených ledovci, které ho využívaly jako refugium (Almada et al., 2001; Bianchi & Morri, 2000).

Velmi významnou událostí pro faunu Středozemního moře bylo otevření Suezského kanálu v roce 1869, který ho tak propojil s Rudým mořem. To umožnilo migraci organismů do nového prostředí, díky čemuž se do Středozemního moře dostalo mnoho nových druhů ryb. Tyto druhy jsou označovány jako lessepští migranti, a mezi jejich řadami je i několik druhů hlaváčů. Dosud bylo dokumentováno nejméně 11 druhů: *Coryogalops ochetica* (Kovačić & Golani, 2007), *Cryptocentrus caeruleopunctatus* (Rothman & Goren, 2015), *Cryptocentrus steinhardti* (Goren & Stern, 2021), *Hazeus ingressus* (Engin et al., 2018), *Oxyurichthys petersii* (Akyol et al., 2006), *Papillogobius melanobranchus* [(Kovačić and Golani, 2007), syn. *Silhouettea chaimi* (Kovačić & Bogorodsky, 2013)], *Silhouetta aegyptia* (Golani et al., 2022), *Tridentiger trigonocephalus* (Goren et al., 2009), *Trypauchen vagina* (Salameh et al., 2010), a *Vanderhorstia mertensi* (Bilecenoglu et al., 2008). Dá se předpokládat, že migrace nových druhů stále pokračuje i v současnosti, a tudíž bude záznamů o druzích z Rudého moře, nově nalezených i v moři Středozemním, stále přibývat.

2.4 Morfometrická adaptace hlaváčů na různé typy prostředí

Díky tomu, že jsou si hlaváči příbuzní, můžeme zde sledovat vývoj druhů z jednoho společného předka do velmi odlišných ekomorf, které jsou výsledkem vlivu kolonizace rozdílného prostředí a změny způsobu života. Ke studiu tvaru těla a jeho srovnávání napříč různými druhy i řády je hojně používána geometrická morfometrie. Ta nám umožňuje kvantifikovat tvar těla pomocí matematických souřadnic a následně provést s těmito informacemi statistické analýzy. Díky tomu můžeme srovnávat velké množství stejně definovaných bodů na těle mezi stovkami jedinců. Můžeme tak například vidět, jaké vlastnosti mají tendenci se vyvíjet u druhů, které obývají určitý typ prostředí. U druhů, které se od sebe oddělily dávno, ale obývají stejný typ prostředí, bychom měli pozorovat podobné vlastnosti získané vlivem konvergence.

2.4.1 Morfometrie na rybách

Vliv adaptace na mikroprostředí a rozdělení nik na morfologii těla ryb bylo studováno např. u korálových společenstev (Claverie & Wainwright, 2014). Důležitá byla u nich hlavně míra protažení těla. Morfometrie byla udělána na fotografiích živých jedinců pořízených při přístrojovém potápění, na rozdíl od většiny ostatních studií, kde byly použity fotografie muzejních exponátů fixovaných ve formaldehydu. Korálové ryby jsou dobrým vzorkem pro morfoanalýzu, neboť představují nejvíce morfologicky rozmanitou skupinu ryb na světě. Tato studie zjistila, že zvláštností u korálových ryb je kromě individuálních modifikací hlavně elongace těla, přičemž tato může být i disproporcionální. Například u pyskounovitých (Labridae) se v porovnání s druhy, nežijícími na korálových útesech, zvětšuje hlavně hlava, u jiných (například u Pempheridae a Pinguipedidae) je to naopak tělo a ocas. Podélné prodloužení těla umožňuje rybám podávat lepší výkon v plavání. Některé ryby se prodlužují naopak vertikálně. To se ukazuje jako dobrá obrana proti predátorům, neboť pokud nemají dostatečně velká ústa, nemohou rybu spolknout. Postavení ploutví díky tomuto tvaru těla – tím, že jsou dále od těžiště – dává také rybám lepší schopnost manévrovat a rychle vystřelit dopředu. Takové schopnosti jsou v komplexním a členitém prostředí, jakým korálový útes je, velmi výhodné. Elongace může také souviset se způsobem získávání potravy. Vyskytuje se například u ryb, které se živí sáním, neboť je zde

prostor pro větší svalovinu hlavy, která tak umožňuje vyvíjet při sání větší sílu (Claverie & Wainwright, 2014).

2.4.2 Morfometrie na hlaváčích

Co se týče hlaváčů žijících na korálových útesech, i mezi nimi byla zjištěna velká diverzita tvaru těla. Hlaváči okupují mnoho mikrohabitatů, které toto prostředí nabízí. Mohou žít jak v měkkých, tak v tvrdých substrátech, obývají různé jeskyně a pukliny, a samozřejmě také živé korály. Druhy, které žijí u dna (například *Istigobius*, *Bathygobius, Valenciennea,* či *Amblygobius*), mají fusiformní tvar těla, zatímco druhy vznášející se nade dnem (například *Ptereloetris, Nemateleotris*) mají tělo podlouhlé (Herler, 2007). Oproti tomu hlaváči žijící v úzkých prostorech mezi větvemi korálů jsou laterálně zploštělí. Druhou možností je celkové zmenšení těla, jak je tomu u druhu *Gobiodon rivulatus*, který obývá podobné prostředí. Ti, žijící ve více otevřeném prostředí, například na povrchu plochých korálů, jsou zploštělí dorso-ventrálně (například *Bryaninops, Pleurosicya*). Hlaváči obývající skály mívají oproti tomu tělo oválné (Herler, 2007; Herler, 2011). Díky této rozmanitosti jak v obývaných habitatech, tak tvarových formách, bývají koráloví hlaváči používání jako modelové skupiny pro studium ekologie a evoluční biologie (Herler, 2011). Studium opakovaného vývinu podobných znaků totiž může odhalit skryté evoluční procesy, působící na druhu žijícímu v určitém typu prostředí (Claverie & Wainwright, 2014).

Také adaptace na sladkovodní prostředí může způsobit změnu tvaru těla. Rozdílnost morfologických forem již byla studována na sladkovodních hlaváčích (Thacker & Gkenas, 2019). Autoři kvantifikovali pomocí morfometrických metod tvar 14 druhů sladkovodních hlaváčů. Interpretace výsledků v kontextu fylogeneze jim umožnila zjistit, zda existují nějaké společné tendence ke změně tvaru těla u těchto druhů, a zda a do jaké míry jsou tyto tendence výsledkem blízké příbuznosti či konvergentní evoluce. Zjistili, že společným rysem hlaváčů z linie *Pomatoschistus* žijících ve sladkých vodách je, že bývají velmi drobní a mají neproporčně velkou hlavu ku tělu oproti mořským druhům této linie (Thacker & Gkenas, 2019). Také u nich dochází k početným tělním redukcím. Nejspíše má na tomto jevu podíl heterochronie. Podmínky v řekách se mohou často měnit a nejsou příliš stabilní, proto zde získávají výhodu ty druhy, které žijí krátce a brzy se rozmnožují. Je zde tudíž tlak na brzké dosažení dospělosti, čehož lze docílit předčasným dospěním, kdy má

dospělec ještě charakteristiku juvenila, ale již má funkční pohlavní orgány. Sladkovodní hlaváči se dožívají pouze 1-2 let života. Jejich velká hlava se podobá morfologii, jakou mají jejich larvy a juvenilové (Thacker & Gkenas, 2019).

3 Materiál & Metody

3.1 Materiál

Na morfometrickou analýzu bylo použito 769 jedinců z 58 různých druhů uložených ve sbírkách Národního muzea v Praze a Přírodovědného muzea v Rijece, v Chorvatsku. Kompletní přehled všech vyfocených druhů a mapa všech lokalit odběru je k dispozici v podkapitole 3.2 Zkoumané druhy.

Ryby byly konzervovány standardní muzejní metodou, tedy nejdříve fixovány ve formaldehydu a poté naloženy v roztoku etanolu ve skleněných nádobách, označených štítky s informacemi mimo jiných o místu sběru, datu odchycení, a identifikačním číslem jedince.

Pro tuto práci byly použity pouze ryby fixované standartdním způsobem, nikdy ne ryby čerstvě chycené. Jak ukazuje ve své práci Thacker & Gkenas (2019), při dělání morfometrických studií se totiž mohou výsledky značně lišit podle toho, zda jsou k morfometrii použity fotografie pořízené hned po odchytu ryby před její fixací či ty ryb již delší dobu fixovaných (Thacker & Gkenas, 2019). Kvůli tomu nelze tyto dva typy materiálu kombinovat dohromady. Vzhledem k rozsáhlosti muzejních sbírek fixovaných ryb bylo značně výhodnější použít k analýze tyto vzorky než chytat čerstvé. Pouze díky tomu bylo do práce také možné zahrnout takové množství druhů a jedinců. Díky způsobu fixace nebylo možno zahrnout do analýzy původní barvu a vzorování ryb, neboť tyto informace nebyly zachovány. Pracovalo se tak tedy pouze s tvarem ryb, přičemž byly vyřazeny ti jedinci, jejichž tvar těla byl fixací či usmrcením deformován (vizte dále).

Pro morfometrickou analýzu byly použity ryby neporušené a nezkroucené. Určitá malá míra zkroucení mohla být tolerována, pokud měla ryba ohnutý ocas do strany, neboť rozměry používané pro morfometrii, které byly díky prohnutí na fotografii zkreslené, mohly být naměřeny ručně a poté použity při digitálním umisťování landmarků. V programu MorphoJ bylo ověřeno, že takováto kompenzace nemá na morfometrické analýzy vliv. Kvůli prezervaci materiálu nebylo možné fixovat polohu těla ryb pomocí špendlíků. Ryby ohnuté ve vertikální ose se ukázaly být zcela nepoužitelné, především kvůli deformaci ploutví hřbetních a řitní. Navíc na

fotografiích pak toto prohnutí způsobovalo příliš velké zkreslení délky a polohy částí těla ryb, které nebylo možné jednoduše kompenzovat ručním naměřením hodnot. Takoví jedinci byli z analýz vyloučeni. Stejně tak bylo důležité, aby ryby neměly nafouklý abdomen a rozevřená ústa. Ryby, které měly příliš otevřené žábry, rovněž nebyly použity, neboť i tato vlastnost znemožňovala správné umístění landmarků.

3.2 Zkoumané druhy

V této práci bylo analyzováno celkem 58 evropských druhů hlaváčů, mezi než patřily jak druhy sladkovodní, tak mořské a brakické. Mojí snahou bylo zkoumat vliv různých stylů života na tvar těla ryb, a proto bylo žádoucí, abych pracovala s co nejvíce druhy s odlišnou životní strategií. Nakonec se nám povedlo získat data od druhů žijících epibentickým, hyperbentických, kryptobentickým, a dokonoce i nektonickým stylem života, přestože je tato strategie zastoupena mezi evropskými hlaváči poměrně vzácně.

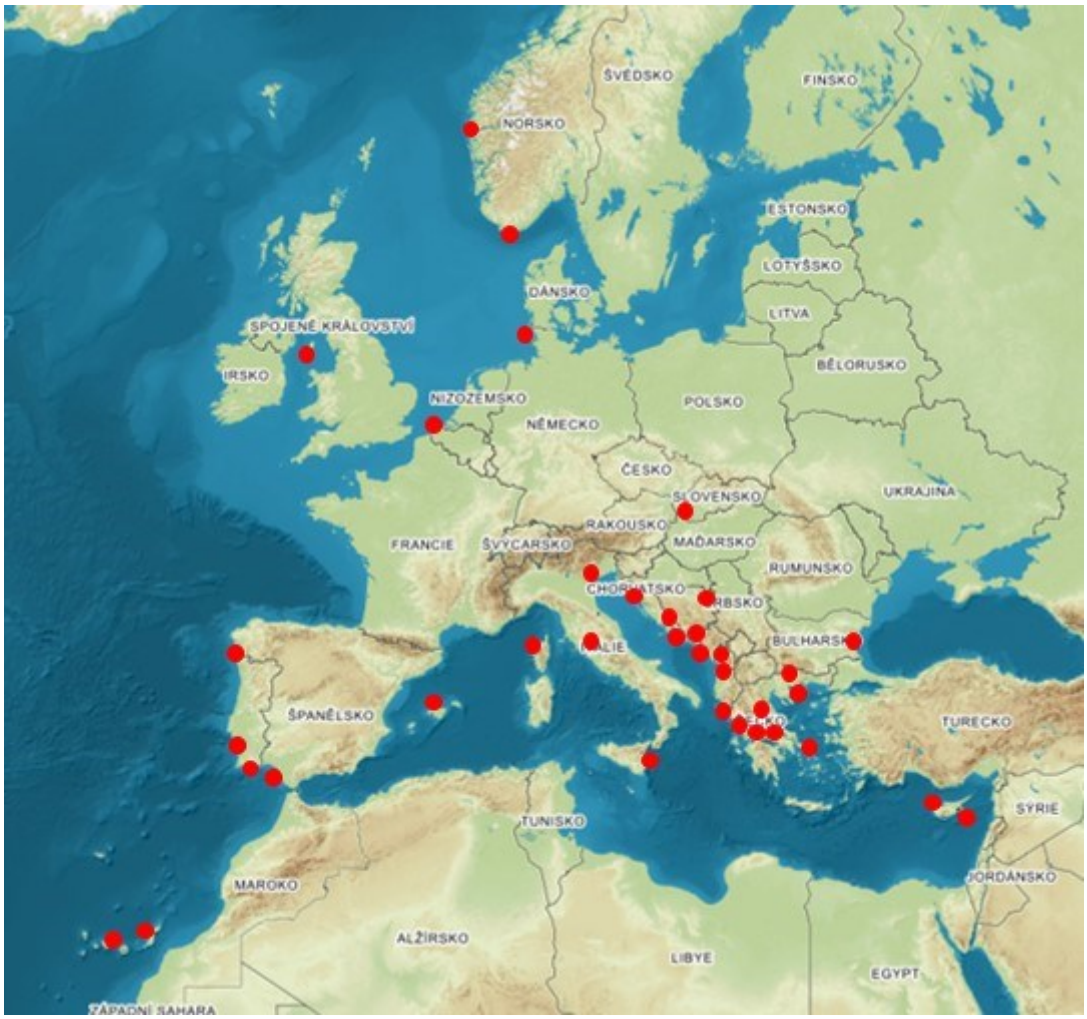
Podařilo se mi zajistit zastoupení všech tří evropských linií. z linie *Pomatoschistus*- byla získána data o 26 druzích, z nichž polovinu tvořily mořské druhy, a druhou polovinu skládaly druhy euryhalinní a sladkovodní. Euryhalinních druhů bylo nejméně, byly zastoupeny třemi druhy rodu *Knipowitschia*, z nichž jeden je v současnosti nově popisován, a tudíž je dále uváděn jako *Knipowitschia* sp. Sladkovodní druhy patřily do rodů *Economidichthys, Knipowitschia, Ninnigobius* a *Orsinigobius*. Všechny sladkovodní a brakické druhy mají epibentickou strategii. U mořských druhů (zastoupených rody *Buenia, Deltentosteus, Gobiusculus, Pomatoschistus, Pseudaphya, a Speleogobius*), byl kromě epibentického stylu života zastoupen i nektonický, a to u druhu *Pseudaphya ferreri*. Pouze v této linii se také díky druhům *Gobiusculus flavescens, Pomatoschistus knerii a P. quagga* vyskytuje hyperbentická životní strategie.

Aphia- linie byla v této práci zastoupena dvěma mořskými druhy, *Aphia minuta* a *Lesueurigobius friesii*, z nichž každý má jinou životní strategii. Druh *A. minuta* je totiž nektonický, zatímco *L.friessi* žije epibentickým stylem života.

Konečně z linie *Gobius*- pocházelo 29 zastoupených druhů, u nichž drtivě převažoval počet mořských druhů, kterých bylo 25 a patřili mezi ně zástupci rodů *Corcyrogobius, Didogobius, Gammogobius, Gobius, Chromogobius, Odondebuenia, Thorogobius, Vanneaugobius, Zebrus a Zosterisessor*. Většina těchto druhů má

epibentický styl života a část z nich kryptobentický. Euryhalinní druhy zde byly dva, vysoce invazivní *Neogobius melanostomus*, a *Ponticola kessleri*, původem z Ponto-Kaspické oblasti, přičemž oba tyto druhy jsou epibentické. Sladkovodní druhy byly také dva a sice *Padogobius bonelli* a *Proterorhinus semilunaris*, jenž se vyskytuje i u nás. Tyto druhy jsou taktéž epibentické.

Pro úplný přehled vyfocených druhů spolu s informacemi o místu jejich odběru, životní strategií a charakteristikou jejich přirozeného prostředí vizte tabulku 1, kde jsou tato data shrnuta. Místa odběru hlaváčů jsou také k nahlédnutí na mapě na obrázku 3.



Obrázek 3: Mapa s vyznačenými lokalitami sběru hlaváčů použitých v této práci

Druh	Počet jedinců	Způsob života (Lifestyle)	Prostředí (Environment)	Linie (Lineage)	Způsob života s ohledem na prostředí (Lifestyle_Environment)	Místo odchytu	Zdroj
Aphia minuta	10	nektonický	mořské	*Aphia*	Nectonic	esp, hrv	Kovačić & Patzner, 2011
Buenia affinis	10	epibentický	mořské	*Pomatoschistus*	Epibenthic	esp, hrv	Kovačić & La Mesa, 2010
Corcyrogobius liechtensteini	13	kryptobentický	mořské	*Gobius*	Cryptobenthic	ita, hrv	Kovačić et al., 2011
Deltentosteus collonianus	6	epibentický	mořské	*Pomatoschistus*	Epibenthic	esp, hrv	Miller, 1986
Deltentosteus quadrimaculatus	8	epibentický	mořské	*Pomatoschistus*	Epibenthic	fra	Miller, 1986
Didogobius kochi	3	kryptobentický	mořské	*Gobius*	Cryptobenthic	esp	Van Tassell, 1988
Economidichthys pygmaeus	10	epibentický	sladkovodní	*Pomatoschistus*	Epib_Fresh	grc	Rampin et al., 2011
Gammogobius steinitzi	12	kryptobentický	mořské	*Gobius*	Cryptobenthic	cyp, hrv	Kovačić et al., 2011
Gobius auratus	23	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	cyp, grc, hrv, mne	Kovačić et al., 2011
Gobius bucchichi	13	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	alb, hrv	Kovačić, 2003
Gobius cobitis	7	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	alb, mne, prt	Miller, 1986
Gobius cruentatus	4	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	hrv	Kovačić, 2003

Gobius fallax	18	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	cyp, fra, grc, hrv	Herler & Patzner, 2005
Gobius gasteveni	8	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	esp, prt	Miller, 1986
Gobius geniporus	37	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	cyp, fra, hrv, ita, mne	Kovačić, 2003
Gobius incognitus	44	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	cyp, fra, grc	Kovačić & Šanda, 2016
Gobius kolombatovici	13	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	hrv	Tiralongo et al., 2020
Gobius niger	38	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	esp, fra, grc, hrv, mne	Hajji et al., 2013
Gobius paganellus	59	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	esp, fra, grc, hrv, ita, mne, prt	Miller, 1961
Gobius roulei	11	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	hrv	Kovačić, 2003
Gobius vittatus	22	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	hrv, mne	Kovačić et al., 2011
Gobius xanthocephalus	13	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	esp, fra	Villegas-Ríos & Bañón, 2010
Gobiusculus flavescens	9	hyperbentický	mořské	*Pomatoschistus*	Hyperbenthic	esp, gbr	Patzner et al., 2011
Chromogobius quadrivittatus	21	kryptobentický	mořské	*Gobius*	Cryptobenthic	hrv, ita, mne	Kovačić et al., 2011
Chromogobius zebratus	15	kryptobentický	mořské	*Gobius*	Cryptobenthic	hrv	Tiralongo et al., 2020
Knipowitschia caucasica	18	epibentický	brakické	*Pomatoschistus*	Epib_Euryh	bgr, grc	Didenko et al., 2020

Knipowitschia goerneri	5	epibentický	brakické	*Pomatoschistus*	Epib_Euryh	alb	Crivelli, 1995
Knipowitschia milleri	6	epibentický	sladkovodní	*Pomatoschistus*	Epib_Fresh	grc	Crivelli, 1995
Knipowitschia montenegrina	8	epibentický	sladkovodní	*Pomatoschistus*	Epib_Fresh	mne	Kovačić & Šanda, 2007
Knipowitschia mrakovcici	2	epibentický	sladkovodní	*Pomatoschistus*	Epib_Fresh	hrv	Miller, 2009
Knipowitschia radovici	9	epibentický	sladkovodní	*Pomatoschistus*	Epib_Fresh	bih, hrv	Kovačić, 2005
Knipowitschia sp	5	epibentický	brakické	*Pomatoschistus*	Epib_Euryh	alb	nepublikovaná data, Vukić et al.
Knipowitschia thessala	10	epibentický	sladkovodní	*Pomatoschistus*	Epib_Fresh	grc	Miller, 1990
Lesueurigobius friesii	10	epibentický	mořské	*Aphia*	Epibenthic	fra, hrv, nor	Miller, 1986
Neogobius melanostomus	10	epibentický	brakické	*Gobius*	Epib_Euryh	hrv	Hempel & Thiel, 2013
Ninnigobius canestrinii	10	epibentický	sladkovodní	*Pomatoschistus*	Epib_Fresh	hrv	Franco et al., 2012
Ninnigobius montenegrensis	19	epibentický	sladkovodní	*Pomatoschistus*	Epib_Fresh	alb, mne	Miller & Šanda, 2008
Odondebuenia balearica	14	kryptobentický	mořské	*Gobius*	Cryptobenthic	mne, hrv	Miller, 1986
Orsinigobius croaticus	12	epibentický	sladkovodní	*Pomatoschistus*	Epib_Fresh	bih, hrv	Kottelat, 1997
Orsinigobius punctatissimus	6	epibentický	sladkovodní	*Pomatoschistus*	Epib_Fresh	ita	Miller, 1990

Padogobius bonelli	11	epibentický	sladkovodní	*Gobius*	Epib_Fresh	hrv, ita	Bo et al. 2010
Pomatoschistus bathi	11	epibentický	mořské	*Pomatoschistus*	Epibenthic	fra	Kovačić & La Mesa, 2010
Pomatoschistus knerii	3	hyperbentický	mořské	*Pomatoschistus*	Hyperbenthic	hrv	Kovačić, 2003
Pomatoschistus marmoratus	25	epibentický	mořské	*Pomatoschistus*	Epibenthic	mne, fra, hrv, grc, esp	Mazzoldi & Rasotto, 2001
Pomatoschistus microps	10	epibentický	mořské	*Pomatoschistus*	Epibenthic	fra	Leitão et al., 2006
Pomatoschistus minutus	10	epibentický	mořské	*Pomatoschistus*	Epibenthic	bel, deu, fra	Leitão et al., 2006
Pomatoschistus pictus	10	epibentický	mořské	*Pomatoschistus*	Epibenthic	deu, esp, nor, prt	Bouchereau et al., 2003
Pomatoschistus quagga	8	hyperbentický	mořské	*Pomatoschistus*	Hyperbenthic	hrv	Kramer et al., 2012
Ponticola kessleri	19	epibentický	brakické	*Gobius*	Epib_Euryh	hrv, svk	Jakovlić et al., 2015
Proterorhinus semilunaris	18	epibentický	sladkovodní	*Gobius*	Epib_Fresh	deu, hrv, svk	Valová et al., 2015
Pseudaphya ferreri	11	nektonický	mořské	*Pomatoschistus*	Nectonic	hrv	Kovačić & Patzner, 2011
Speleogobius trigloides	8	epibentický	mořské	*Pomatoschistus*	Epibenthic	hrv	McKay & Miller, 1997
Thorogobius ephippiatus	10	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	hrv, nor	Miller, 1986
Thorogobius macrolepis	12	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	hrv	Herler et al., 1999

Vanneaugobius canariensis	10	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	esp	Van Tassell et al. 1988
Zebrus zebrus	10	kryptobentický	mořské	*Gobius*	Cryptobenthic	hrv	Patzner, 1999
Zosterisessor ophiocephalus	11	epibentický	mořské	*Gobius*	Epibenthic	hrv	Miller, 1986

Tabulka 1 Přehled focených druhů spolu s počtem nafocených jedinců, způsobem života, obývaným prostředím, příslušností k linii hlaváčů, proměnnou Lifestyle_habitat, místem odchytu, a zdrojem informace o charakteristikách

Vysvětlivky pro zkratky: alb = Albánie; bel = Belgie; bih = Bosna & Hercegovina; bgr = Bulharsko; cyp = Kypr; deu = Německo; esp = Španělsko; fra = Francie; gbr = Velká Británie; grc = Řecko; hrv = Chorvatsko; ita = Itálie; mne = Černá Hora; nor = Norsko; prt = Portugalsko; svk = Slovensko

3.3 Metody

3.3.1 Pořizování fotografií

Aby bylo možno provést morfometrická měření pomocí metody landmarkování, bylo potřeba pořídit snímek každého měřeného jedince. Bylo důležité, aby poloha vzorků vůči fotoaparátu byla standardizována, čili aby byli jedinci natočeni pokud možno stejně a nedocházelo tak ke zkreslení měření. Toho bylo možno docílit kontrolou vzájemné polohy dvou bodů na jedinci, například tak, aby byly přesně v zákrytu. V tomto případě byly k tomuto záměru použity oči, neboť u hlaváčů běžně vystupují nad linii hlavy a lze tedy snadno kontrolovat polohou obou, i když je ryba na boku. Stejně tak vzdálenost jedinců od fotografického zařízení by měla být konstantní. Zde ovšem činil problém velikostní rozptyl vzorků, a pokud by byla zachována stejná vzdálenost fotoaparátu, nebylo by možno správně zaostřit. Byly tudíž stanoveny tři různé vzdálenosti podle velikostní kategorie. Ryby tak byly rozděleny na základě standartdní délky na malé (do délky 5 cm), střední (délky 6-9 cm) a velké (o délce od 10 cm).

Kvůli dobré manipulaci a hlavně z důvodu docílení stejné polohy byly jedinci podloženi stojánky z tvarovatelné modelíny. Velikost těchto stojánků byla také konstantní, aby byla zachována stejná vzdálenost od podkladu. Na každém snímku bylo také vyfotografováno měřítko v podobě milimetrového papíru. Byla stanovena odchylka měřítka, způsobená vzdáleností jedinece od podkladu díky stojánku, a ověřena její přesnost porovnáním hodnot naměřených na jedinci ve skutečnosti a na fotografii.

Každý jedinec byl před fotografováním ještě změřen ručně. Byla změřena standartní délka, a výška mezi bází břišního terče a začátkem první hřbetní ploutve. Byla taky zaznamenána identita jedince, místo sběru a určené pohlaví.

U každého jedince bylo celkem pořízeno 5 fotografií. Nejprve fotografie urogenitální papily, jenž byla pořízena fotografickým aparátem spojeným s binokulární lupou. Tato fotografie posloužila k dokumentaci pohlaví jedince. Další fotografie byly provedeny výše popsaným způsobem. Každý jedinec byl nafocen

z levého boku a zeshora. Tyto fotografie sloužily přímo pro morfometrickou analýzu. Dále byla pořízena ještě fotografie z levého boku, ta sloužila pro upřesnění polohy landmarků při nejasnostech, které nejčastěji vznikaly při zakrytí požadovaných bodů prsní ploutví. Tato ploutev byla na pravé straně často ustřižena po sběru materiálu na genetické analýzy. Poslední fotografie byla pořízena na molitanové podložce a špendlíky zde byly označeny konec první hřbetní ploutve a začátek a konec druhé hřbetní ploutve a řitní ploutve, neboť tyto body nemuselo být snadné správně identifikovat na pořízených fotografiích. Byl však kladen důraz na nepoškození materiálu špendlíky.

Aby nedošlo k poškození materiálu vysušením, byl mezi měřením a fotografováním ponořen ve vodě, a při přesunech mezi binokulární lupou a fotoaparátem přenášen na zvlhčených papírových utěrkách. Doba, kdy byl materiál na suchu, byla zkrácena na nezbytné minimum, a po ukončení fotografování byl materiál ihned přemístěn zpět do originálních nádob s roztokem lihu, odkud byl prve vyjmut.

Celkem bylo pro účely této práce pořízeno kolem 3500 fotografií.

3.3.2 Vybavení

K pořizování fotografií byl použit fotoaparát Canon EOS 1100D s objektivem EFS 18-55 mm. Jeho stabilní pozice vůči fotografovanému objeku byla zajištěna speciálním stojanem, určeném přímo k pořizování ideálních snímků na morfometrii. Fotoaparát na něm bylo možno uchytit tak, aby objektiv směřoval kolmo na podložku, a zároveň bylo možné vzdálenost fotoaparátu vůči podložce měnit. Stupnice v metrické soustavě podávala informaci, jak daleko od podložky se fotoaparát nachází. Stojan také obsahoval rám, na kterém byla z různých stran uchycena čtyři světla, zajišťující, aby se na fotografovaném objektu nevyskytovali nežádoucí stíny.

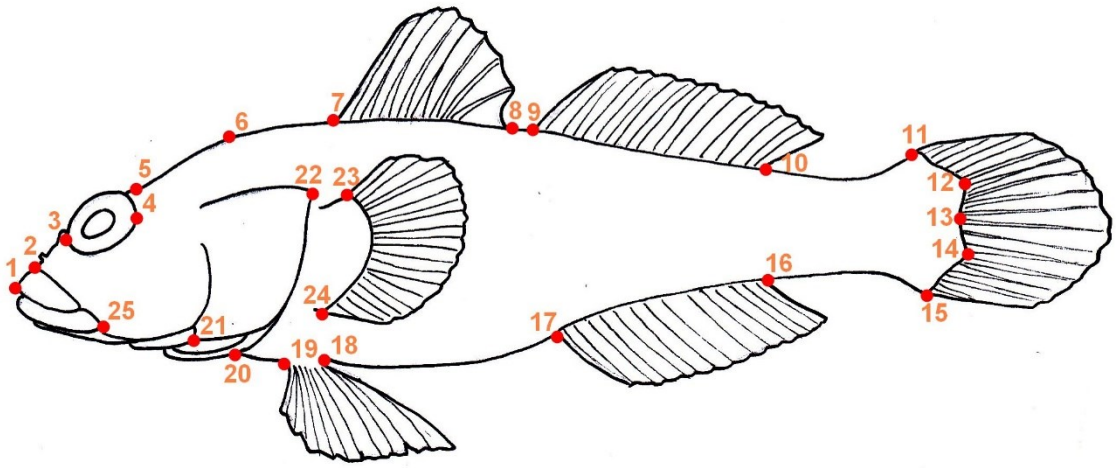
Při fotografování materiálu mimo Národní muzeum byl použit fotoaparát Nikon D7500 s objektivem Nikon, AF-S Micro Nikkor 40mm, 1:2.8 G. Stojan, který nebylo možno převážet, byl nahrazen stativem. Speciální vyvažovací rameno značky Sirui, model HA-77, které bylo možno připevnit na stativ, umožnilo, aby mohl být fotoaparát kolmo k snímanému objektu. Dva blesky Nikon Speedlight SB-500 s přídatným osvětlením zajišťovaly eliminaci stínů.

3.3.3 Landmarkování

Tvar těla ryb byl kvantifikován za pomoci metod geometrické morfometrie. Přímo k analýze byly použity pouze fotografie ryb z levého boku a shora. Pro umístění landmarků byla vybrána charakteristická místa na tělech ryb tak, aby bylo možno je identifikovat u všech focených druhů. Také byly vybrány tak, aby odrážely obrysy těla a zachytily jeho části, které hrají důležitou roli při krmení a pohybu ryby, například ústa a jejich pozici a velikost vůči zbytku těla, délku a postavení řitní a hřbetních ploutví, délku ocasního násadce, polohu a šířku prsních a břišních ploutví, respektive přísavného disku z fúzovaných břišních ploutví, velikost a polohu očí.

Pro analýzu charakteristik ryb z laterálního pohledu bylo zavedeno 25 landmarků, pro analýzu z pohledu dorzálního 29. Poloha těchto landmarků je uvedena na obrázku 4 pro pohled z boku a na obrázku 5 pro pohled shora. K digitalizaci landmarků byl použit volně dostupný program tpsDdig 232 (Rohlf, 2019a). K tomuto zpracování bylo potřeba fotografie, jenž byly pořízeny ve formátech .tif a .jpg, převést na soubory .TPS. K tomuto účelu byl použit program tpsUtil 32, taktéž volně dostupný (Rohlf, 2019b).

Umístění landmarků při pohledu z boku

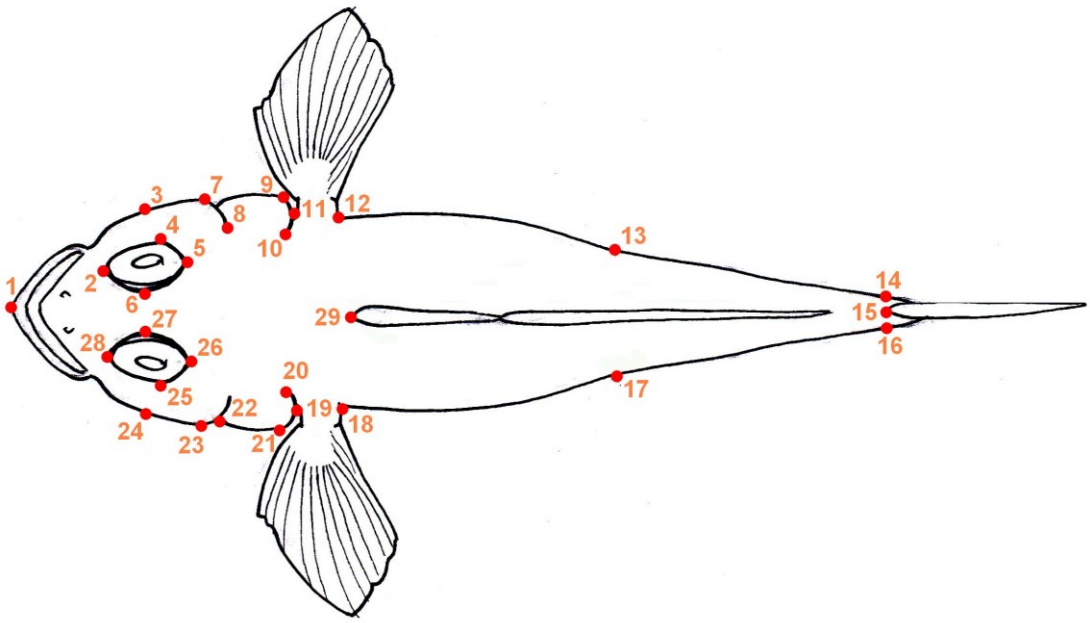


Obrázek 4: pozice landmarků na fotografiích ryb z boku

1. spodní rostrální okraj horního rtu; **2.** vrchní rostrální okraj horního rtu; **3.** přední a **4.** zadní nejvzdálenější body na oku; **5.** horní okraj hlavy nad 4. landmarkem; **6.** bod na okraji těla, na kolmici na přímku mezi 5. a 7. landmarkem, která je v jejich poloviční vzdálenosti; **7**. začátek báze první hřbetní ploutve; **8**. konec báze první hřbetní ploutve; **9**. začátek báze druhé hřbetní ploutve; **10.** konec báze druhé hřbetní

ploutve; **11.** báze prvního horního paprsku ocasní ploutve; **12**. nejvzdálenější bod v horní polovině ocasního násadce; **13**. bod v polovině ocasního násadce v bázi ocasní ploutve; **14.** nejvzdálenější bod v dolní polovině ocasního násadce v bázi ocasní ploutve; **15.** báze prvního dolního paprsku ocasní ploutve; **16.** konec báze řitní ploutve; **17.** začátek báze řitní ploutve; **18.** báze nejkaudálnějšího napojení spojených břišních ploutví; **19.** báze nejrostrálnějšího napojení spojených břišních ploutví; **20.** bod styku branchiostegální membrány se spodním koncem těla; **21.** bod styku operkulární rýhy s rýhou na obličejové části; **22.** nejkaudálnější horní konec operkula; **23.** báze prvního horního paprsku prsní ploutve; **24.** báze prvního dolního paprsku prsní ploutve; **25.** nejkaudálnější konec úst.

Umístění landmarků při pohledu shora



Obrázek 5: Pozice landmarků na fotografiích ryb shora

1. nejrostrálnější bod hlavy; **2. a 28.** nejrostrálnější část oka; **3. a 24.** okraj těla pod 4. bodem, na kolmici přímky mezi 2. a 5. landmarkem; **4. a 25.** nejlaterálnější část oka; **5. a 26.** nejkaudálnější část oka; **6. a 27.** část oka nejblíže k mediánu těla ryby; **7. a 23.** horní část hrbolku, kde se napojuje operkulum na obličejovou část; **8.** a **22.** dolní část hrbolku, kde se napojuje operkulum na obličejovou část; **9. a 21.** nejlaterálnější okraj operkula; **10. a 20.** místo, kde se napojuje operkulum k hlavě; **11. a 19.** začátek báze prsní ploutve; **12. a 18.** konec báze prsní ploutve; **13.** a **17.** bod na okraji těla, na kolmici na

přímku mezi landmarky 12 a 14, respektive 18 a 16, která je v polovině jejich vzdálenosti; **14. a 16.** pravý, respektive levý okraj ocasu nad 15. landmarkem, na kolmici přímky vedené mediánem těla rostrokaudálně; **15.** báze paprsků ocasní ploutve; **29.** začátek báze první hřbetní ploutve.

3.3.4 Analýza dat

Aby mohla z digitalizovaných landmarků být extrahována informace o morfometrii, musely být podrobeny superimpozici. Superimpozice slouží k tomu, aby byla z analýzy eliminována variace vzniklá na základě rozdílných velikostí ryb a různé pozici a orientaci na fotografii. Při tomto procesu pak vzniká tak zvaný morfoprostor (anglicky „morphospace“). Ten představuje multivariátní prostor definovaný tvary studovaných druhů a počtem umístěných landmarků. Rozdíly ve tvaru jedinců jsou tak kvantifikovány (Thacker & Gkenas, 2019). Superimpozice byla vytvořena za použití metody Procrustes ve volně dostupném programu MorphoJ (Klingenberg, 2011). Tato metoda umožňuje, aby byla pozice, velikost a orientace porovnávaných objektů co nepodobnější. Tím dochází k eliminaci chybně zaznamenaných rozdílů mezi objekty, způsobených pouze jinou polohou na fotografii, anebo jinou velikostí objektu.

Následně byla vytvořena kovarianční matice, umožňující porovnání všech objektů mezi s sebou. Byla také přidána tabulka s proměnnými, která poskytovala ke každému jedinci informace (například o typu obývaného habitatu, životní strategii, příslušnosti do linie hlaváčů, standardní délce a šířce) jenž by mohly hrát při analýze dat a interpretaci výsledků nějakou roli. Ty mohly být přirazeny ke konkrétním jedincům díky jedinečnému identifikačnímu kódu, který byl každému jedinci přiřazen.

Před provedením samotných analýz bylo ještě nutno odstranit jedince, kteří mohli výpočty zkreslit, tak zvané „outliery“. Pokud vnášeli do výpočtů chybu tím, že u nich byly prohozeny landmarky, byla tato chyba napravena, pokud se však jednalo například o juvenilní či příliš zkroucené jedince, byly z výpočtů vyřazeni definitivně.

Dále byl nahrán fylogenetický strom ve formátu Nexus. Ke konstrukci fylogenetického stromu byly použity sekvence pro mitochondriální gen *cytochrom b*, poskytnuté Terezou Soukupovou (Slámová, 2017). Fylogeneze byla rekonstruována pomocí programu Randomized Maximum Likelihood (RAxML, Stamatakis, 2014), použitém v platformě Cipres (Miller et al., 2010), za použití 1 000 replikací.

Po těchto přípravách bylo již možné provést test fylogenetického signálu ve tvaru těla a analýzu hlavních komponent (PCA), abychom mohli určit, jaké tvarové změny od sebe odlišovaly jedince nejvíce. Pro každý dataset byl proveden test na fylogenetický signál aplikovaný na PC skóry a Centroid Size. PCA (zkratka z anglického Principal Component Analysis), neboli analýza hlavních komponent, se používá k vizualizaci variace mezi jedinci v morfoprostoru. Lze pomocí ní zahrnout do analýzy mnoho různých dat s co nejmenší ztrátou informace, a umožňuje odhalit případné skryté proměnné, stojící na pozadí této variability. Díky ní můžeme objevit morfologickou diverzitu mezi určitými druhy, která nebyla na první pohled zřejmá. Pro odhalení diverzity na základě tvaru se pro PCA používají data z analýzy geometrické morfometrie.

PC skóry pro jednotlivé PC osy a centroid size byly exportovány z MorphoJ. Dále byla provedena statistická analýza dat v programu Statistica 14. Testovala jsem, zda má prostředí, příslušnost do evoluční linie, a životní styl druhů statisticky signifikantní podíl na jejich tvaru, a tudíž na jejich rozmístění podle PCA. Zjišťovala jsem významnost rozdílů PC skórů na jednotlivých PCA osách a významnost rozdílů velikosti mezi jednotlivými ekologickými skupinami, obývanými typy prostředí a evolučními liniemi. Nejprve bylo nutno vyhodnotit, zda mají data normální rozdělení. Byl použit Shapiro-Wilkův test a vizualizace pomocí histogramů. Shapiro-Wilkův test ukázal, že normální rozdělení nemá většina dat. Navíc, porovnávané skupiny nebyly stejně veliké, tak bylo potřeba provést neparametrickou obdobu analýzy variance jednoduchého třídění. Za tímto účelem byl použit Kruskal-Wallisův test a následně „post hoc“ mnohonásobný párový test, abych zjistila, které dvojice se mezi sebou liší.

Významnost rozdílů PC skórů na jednotlivých PC osách a významnost rozdílů velikosti centroidu jsem zjišťovala stejným způsobem navíc i pro jednotlivé druhy rozdělené do skupin podle způsobu života, typu prostředí a evoluční linie. Nektonický způsob života měly pouze dva druhy. Pro jejich porovnání jsem použila t-test pro dva výběry a jeho neparametrickou obdobu, Mann-Whitney u test. Když bylo rozdělení dat normální, a porovnávané skupiny byly podobné velké, byl proveden Levenův test shody rozptylů. Pokud nebyla hypotéza o shodě rozptylů zamítnuta, byl na další analýzu použit t-test. Pokud hypotéza o shodě rozptylů byla zamítnuta, použila se

neparametrická obdoba t-testu, Mann-Whitney u test, který se použil i v případech, kdy data neměla normální rozdělení.

Pro morfometrickou analýzu byly použity dva sety dat. Jeden sestával z fotek jedinců z boku, a druhý z fotek jedinců shora. V jednotlivých setech byly porovnávány jednak fotky všech jedinců dohromady, poté pouze jednotlivé druhy mezi sebou (které byly složeny z průměru všech jejich příslušných jedinců), a nakonec v poslední fázi jedinci odděleně podle příslušnosti k linii *Pomatoschistus* a *Gobius+Aphia*.

Nulová hypotéza o náhodném rozdělení pro každý test byla zavržena, pokud bylo $p < 0,05$. V texu bylo p zaokrouhlováno na tři desetinná místa.

Po každé PCA byl v programu MorphoJ proveden test na fylogenetický signál z PC skórů.

Závislost tvaru těla, který určoval rozdělení jedinců v PCA, byla zkoumána na základě tří charakteristik. Za prvé příslušnosti k linii hlaváčů (Lineage), kde byly jedincům přiřazeny kategorie *Aphia, Gobius* nebo *Pomatoschistus*. Další použitou charakteristikou bylo životní prostředí ryb (Environment), které bylo rozděleno na mořské (Marine), sladkovodní (Freshwater), a brakické (Euryhaline). Poslední a nejrozsáhlejší charakteristika popisovala životní styl jedinců (Lifestyle). Byla v ní rozeznávána životní strategie kryptobentická (Cryptobenthic), hyperbentická (Hyperbenthic), nektonická (Nectonic), a konečně epibentická (Epibenthic). Vzhledem k tomu, že u nemořských druhů je zastoupena pouze poslední kategorie, byla rozdělena ještě do tří podkategorií podle životního prostředí, tedy pro sladkovodní (Epib_Fresh), brakické (Epib_Euryhali), a pro ostatní, tedy mořské (Epibenthic).

Pro každou PCA analýzu byl zhotoven graf, jehož horizontální osa odpovídá PC1, a vertikální osa buď PC2, PC3, nebo PC4. Počet použitých os byl vybrán podle výsledků vlastní hodnoty (eigenvalue), přičemž ke konečnému zhodnocení byly použity pouze ty, jež vysvětlovaly více než 10 % variability (tedy hodnota jejich eigenvalue přesahovala 10). Grafy s hodnotami eigenvalue ke každé PCA jsou k dispozici v přílohách 2 a 3. Pro snadný přehled byla ke každému PCA přidána vizualizace změny tvaru těla podle dané osy, přičemž tyrkysový obrys ukazuje průměrný tvar těla na dané ose (0,00), a tmavě modrý ukazuje maximální změnu tvaru.

Nejnázornější zobrazení rozmístění jednotlivců na osách PCA je vidět u grafů, kde jsou zobrazeni všichni jedinci ze všech linií dohromady. Díky velkému množství bodů však nebylo možné ke každému bodu napsat, o jaký druh se jedná. Proto je vždy ke každé sadě výsledků v přílohách vytvořen graf s názvy druhů, kde vidíme jejich přibližné umístění na osách (přílohy 6 – 21). Body na grafu vznikly zprůměrováním polohy všech příslušníků jednoho druhu do jednoho bodu. Pro důslednost byl ke každé PCA pro data ze zprůměrovaných druhů vytvořen i graf s hodnotami eigenvalue (přílohy 4 a 5).

PCA udělané pro každou linii zvlášť obsahovaly informace velmi podobné analýze se všemi jedinci a neposkytovaly žádnou novou informaci, proto nakonec nebyly do práce zařazeny.

Pro odhalení přítomnosti konvergence byla data z os, vysvětlujících nad 10 % variability, zpracována v softwarovém prostředí R za použití balíčku convevol. Ten nám umožňuje zjistit vliv konvergence mezi taxony v rámci jimi zabraného morfoprostoru, a to sice pomocí rekonstrukce ancestrálního stavu pro různé sledované fenotypické znaky, simulace evoluce Brownovými pohyby, vypočítání euklidovské vzdálenosti mezi porovnávanými druhy a jejich zrekonstruovaným předkem, a také mezi různými těmito předky mezi sebou. Pokud je objeveno podezření na konvergenci u nějaké linie, potvrzuje se toto podezření zjišťováním, kolikrát členové této obsadili stejný morfoprostor. Výsledky těchto testů jsou shrnuty do hodnoty čísla p, a pokud je tato hodnota nižší než 0,05, je vliv konvergence signifikantní. Dále nám slouží výstup v podobě hodnoty C1, která popisuje rozdíly v morfoprostoru, jež lze vysvětlit pomocí konvergence. C1 = 1 – (aktuální vzdálenost / maximální vzdálenost od předka) (Stayton, 2015). V našem případě bylo pro výpočet p a C1 použito 100 simulací.

Nakonec byla pro lepší znázornění podobnosti druhů na základě tvaru těla použita shluková analýza, kdy byl vytvořen strom, v němž se vytvářely shluky druhů podle vzdálenosti PC skórů pomocí eukleidovské metriky, metodou single linkage, při které se shlukují k sobě „nejbližší sousedé“.

4 Výsledky

4.1 PCA setu z boku

Test fylogenetického signálu prokázal, že ve variabilitě dat v PC skorech datasetu z boku je fylogenetický signál (permutační test tetující hypotézu o žádném fylogenetickém testu byl zamítnut, $p < 0,0001$).

Pro vyhodnocení analýzy PCA na datasetu z boku byly na základě výše eigenvalue (vizte přílohu 2) vybrány osy PC1, PC2, a PC3, které vysvětlovaly 35 %, 15 % a 13 % variability (procenta zaokrouhlena na celé číslo).

Osa PC1 (obrázek 6 – 8) zobrazovala změny tvaru především v délce báze a umístění druhé hřbetní ploutve a řitní ploutve, přičemž čím byla hodnota na PC1 vyšší, tím kratší byly báze těchto ploutví. Menší změny se týkaly také tvaru konce ocasního násadce, který se na ose PCA směrem k vyšším hodnotám protahuje. Dále se zužoval celkový tvar těla ryby.

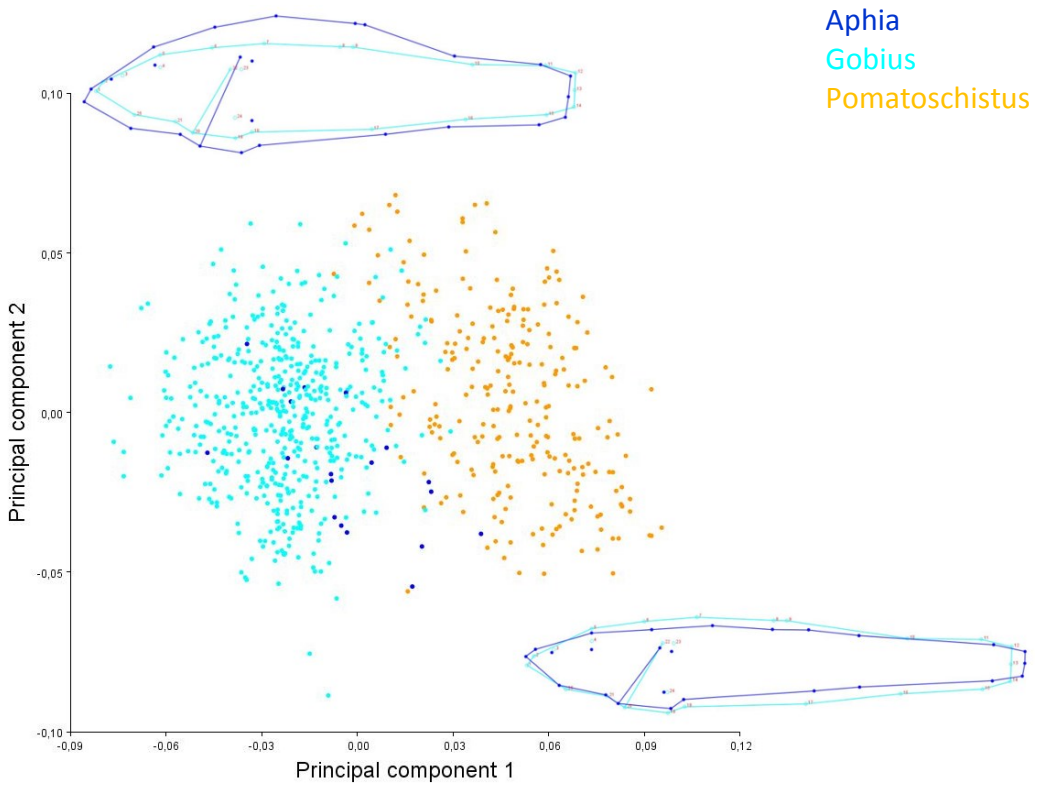
Osa PC2 (obrázek 6 – 8) naopak charakterizovala ve svých maximálních hodnotách vysoký tvar těla, s výrazným vyboulením hřbetu. Dochází také ke zkracování báze řitní ploutve, která je tak oproti té u průměrného jedince kratší než báze druhé hřbetní ploutve.

Na maximu osy PC3 (obrázek 9 – 11) se umisťovaly ryby se spodnějšími ústy, vyklenutým hřbetem a rovným břichem.

4.1.1 Kategorizace dle linie (Lineage)

Kruskal-Wallisův test prokázal signifikantní rozdíl v hodnotách PC skórů mezi liniemi podle PC1 ($H = 501,3519$; $p < 0,001$), PC2 ($H = 14,38022$; $p = 0,0008$), ovšem nikoliv na PC3 ($H = 3,475330$; $p = 0,1759$).

Párový post hoc test od sebe na PC1 odlišil všechny linie ($p < 0,01$) (tabulka s hodnotami v příloze 22), na PC2 prokázal rozdílnost *Aphia* linie od ostatních ($p < 0,01$), *Pomatoschistus* a *Gobius* se však podle něj signifikantně nelišily ($p = 0,129$), vizte přílohu 23. Na ose PC3 se neukázala jakákoliv odlišnost jako signifikantní ($p > 0,2$, příloha 24).

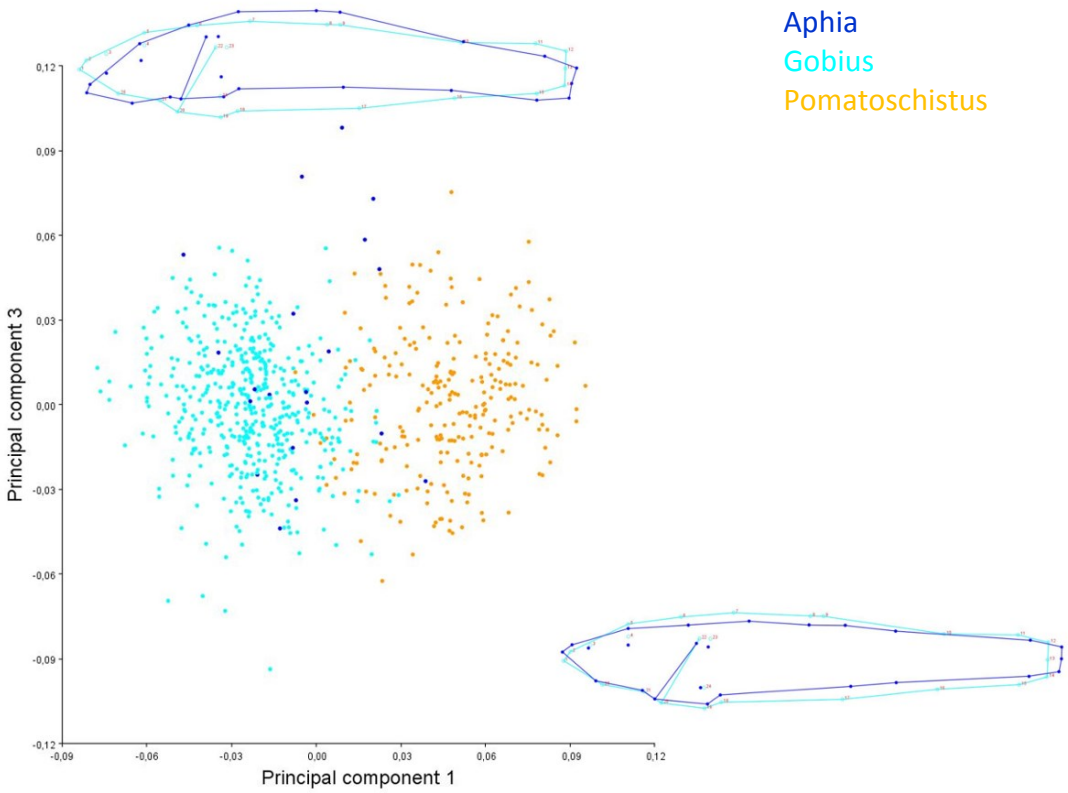


Obrázek 6 Graf pro osy PC1 a 2, s barevně odlišenými liniemi

Při pohledu na PCA grafy na obrázku 6 pro PC1 a PC2 (a na obrázku 7 pro osy PC1 a PC3) na PC1 ose vidíme, že zde dochází k výraznému odlišení linie *Gobius* a *Pomatoschistus*, přičemž linie *Gobius* se umisťuje na ose více vlevo, *Pomatoschistus* naopak směrem vpravo. Linie *Aphia* se situuje více doprostřed, přičemž jedinci druhu *Aphia minuta* se umisťují blíže k linii *Pomatoschistus*, zatímco *Lesueurigobius friesii* více zapadá mezi linii *Gobius*.

Na ose PC2 (obrázek 6) mají linie *Gobius* a *Pomatoschistus* podobný rozptyl, pokrývající široké rozmezí celé osy. Pouze linie *Aphia* je na této ose více kompaktní, umisťuje se kolem průměru a dále směrem k nižším hodnotám, přičemž nektonický druh Aphia minuta se umisťuje níže, zato epibentický *Lesueurigobius friesii* se umisťuje blíže průměrným hodnotám této osy, mezi příslušníky linie ***Gobius***.

V případě PC3 (obrázek 7) k žádnému výraznému shlukování skupin podle příslušnosti k linii nedošlo, většina jedinců se umístila kolem prostředních hodnot.



Obrázek 7 Graf pro osy PC1 a 3, s barevně odlišenými liniemi

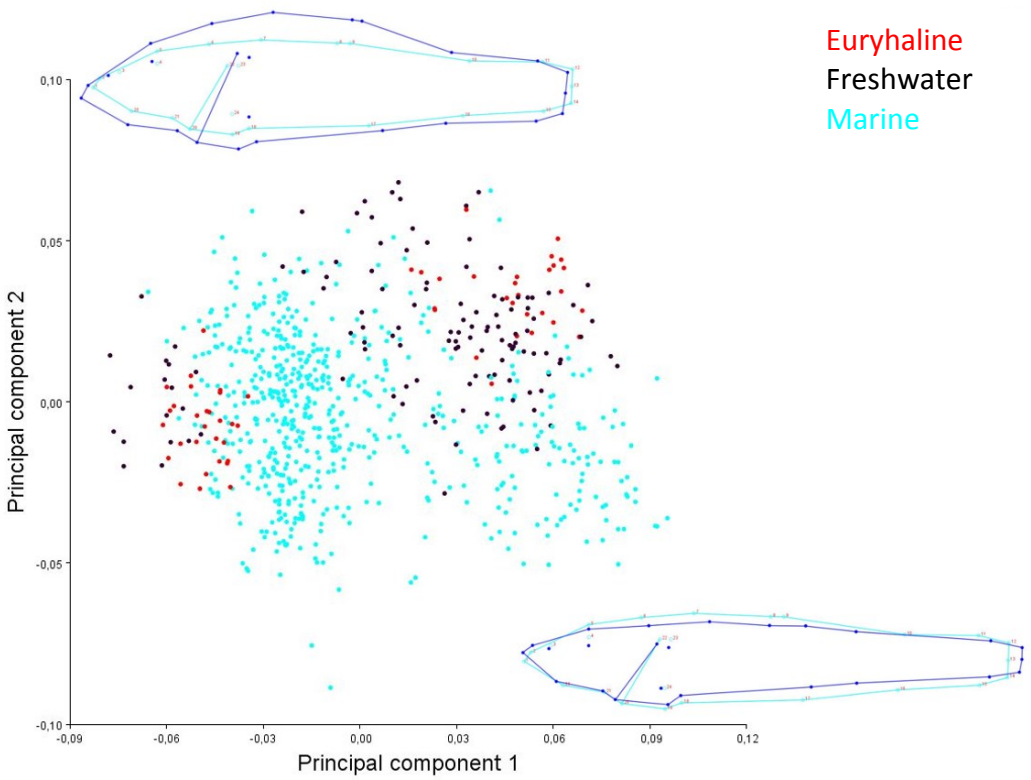
Extrémní hodnoty směrem k vyšším hodnotám zastávali příslušníci linie *Aphia*, konkrétně druh *Aphia minuta*.

4.1.2 Kategorizace dle prostředí (Environment)

V případě rozdělení podle obývaného prostředí prokázal Kruskal-Wallisův test signifikantní rozdíl mezi sladkovodními, euryhalinními a mořskými druhy na ose PC1 (H = 36,13073; p = 0,0000), na ose PC2 (H = 113,6125, p = 0,000), a na ose PC3 také (H = 16,32813; p = 0,0003).

Post hoc párový test v případě PC1 ukázal signifikantní rozdíl mezi sladkovodními a ostatními druhy (p < 0,001), oproti tomu euryhalinní a mořské druhy se vzájemně průkazně nelišily (p = 1) (příloha 25). U PC2 byl naopak signifikantní rozdíl mezi mořskými a ostatními (p < 0,001), mezi sladkovodními a euryhalinními už nikoliv (p = 0,145) (příloha 26). Podle PC3 se sladkovodní druhy odlišovaly od mořských (p < 0,0001), od euryhalinních ovšem ne (p = 0,737). Mořské a euryhalinní se navzájem průkazně nelišily (p = 0,423) (příloha 27).

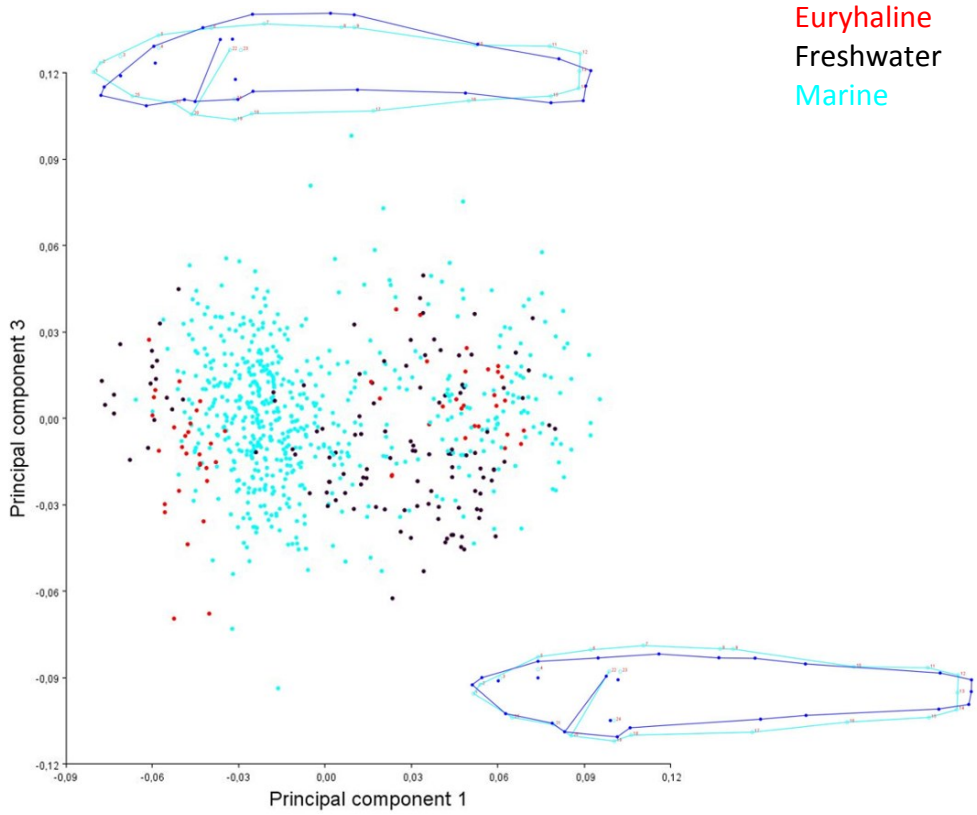
Pokud se podíváme na graf PCA na obrázku 8, vidíme, že se nám tu podle PC1 oddělují dvě skupiny sladkovodních a euryhalinních druhů. Hraje zde zřejmě velkou



Obrázek 8 Graf s osami PC1 a 2, s barevně odlišeným obývaným prostředím

roli příslušnost k linii, protože sladkovodní a euryhalinní příslušníci *Gobius* linie se umístili jinde než ti, patřící do linie *Pomatoschistus*. Sladkovodní jedinci (tvořeni druhem *Proterorhinus semilunaris*) z *Gobius* linie se umístili nejvíce směrem k nízkým hodnotám. Vpravo od nich (nízké hodnoty PC1, ale vyšší než pro *P. semilunaris*) se oproti nim vyčlenily euryhalinní druhy z této linie (blízko k sobě měly druhy *Ponticola kessleri* a *Neogobius melanostomus*), ovšem překrývaly se částečně s mořskými druhy. Oproti tomu všichni jedinci z *Pomatoschistus* linie se na této ose umístili do vyšších hodnot než ti z *Gobius*. Podle této osy se však podle typu obývaného prostředí příliš nelišili, pouze někteří sladkovodní jedinci se umisťovali blíže průměrným hodnotám než ostatní. Mořští členové *Gobius* linie zabírali část grafu, kde PC1 dosahovala průměrných až záporných hodnot, zatímco ti z *Pomatoschistus* linii se usazovali spíše k vyšším hodnotám.

Na ose PC2 (obrázek 8) docházelo především k oddělení mořských druhů z linie *Pomatoschistus* od těch sladkovodních a euryhalinních z této linie. U *Gobius* linie k tak velkým rozdílům nedocházelo, oproti euryhalinním druhům z *Pomatoschistus* linie se však druhy z *Gobius* linie umístily do nižších hodnot.



Obrázek 9 Graf s osami PC1 a 3, s barevně odlišeným obývaným prostředím

U PC3 osy (na obrázku 9) došlo k většímu shluku sladkovodních druhů především z linie *Gobius*, oproti tomu mořské a euryhalinní měly na této ose široký rozptyl.

4.1.3 Kategorizace dle životního stylu s ohledem na prostředí (Lifestyle_environment)

Při zahrnutí jak informace o obývaném prostředí, tak životním stylu, prokázal Kruskal-Wallisův test významné rodíly podle PC1 (H = 112,8085; p = 0,000), PC2 (H = 153,6763; p = 0,000), i PC3 (H = 45,65874; p = 0,0000).

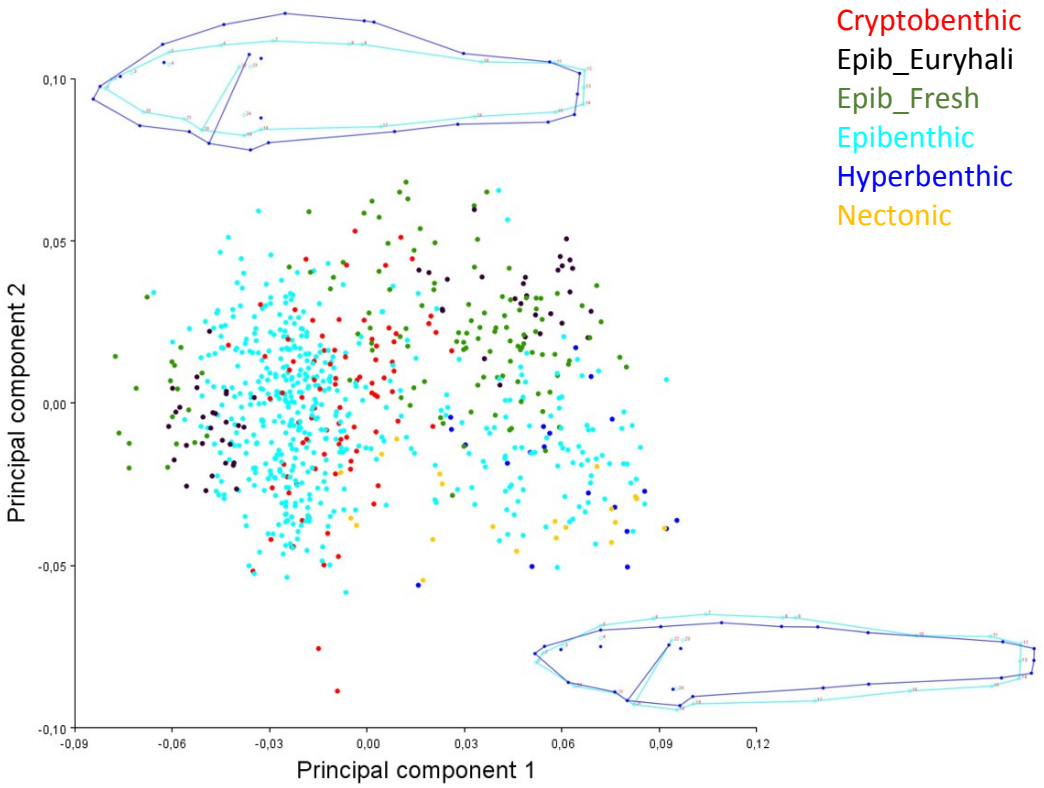
Post hoc párové testy ukázaly signifikatní rozdíly ve tvaru na PC1 mezi rybami s hyperbentickým stylem života a ostatními (u všech testů p < 0,007), s jedinou výjimkou u porovnání s nektonickými (p = 1) (konkrétní data pro tuto kategorii jsou k nalezení v příloze 28). Stejně tak tomu bylo u epibentických sladkovodních druhů, kde také vyšly signifikantní rozdíly při porovnávání s ostatními druhy (p < 0,008), s jedinou výjimkou u porovnání s nektonickými (p = 0,25). Nektonické se však kromě těchto dvou výjimek (u hyperbentických a epibentických sladkovodních) signifikantně lišily od ostatních (p < 0,001). Kryptobentické druhy se významně nelišily od

mořských a euryhalinních epibentických ($p > 0,9$), od všech ostatních včetně sladkovodních epibentických ano ($p < 0,007$). Epibentické euryhalinní druhy se signifikantně odlišovaly od všech ($p < 0,001$) kromě epibentických mořských a kryptobentických (v obou případech $p = 1$). Mořské epibentické druhy nebyly průkazně odlišitelné od kryptobentických a epibentických euryhalinních ($p > 0,9$), od všech ostatních se však lišily signifikantně ($p < 0,001$).

Podle PC2 (příloha 29) se naopak nektonické druhy signifikantně lišily ode všech ($p < 0,001$) kromě hyperbentických ($p = 1$). I epibenitcké sladkovodní druhy se významně odlišovaly téměř ode všech ostatních ($p < 0,001$) s výjimkou epibentických euryhalinních ($p = 0,172$. Mořské epibentické druhy podle této osy nešlo významně odlišit od kryptobentických ($p =1$) a od hyperbentických ($p = 0,0508$). Od ostatních životních stylů se však již lišily prokazatelně ($p < 0,001$). Kryptobentické druhy se signifikantně odlišovaly ode všech ($p < 0,001$) kromě mořských ($p = 1$) a euryhalinních epibentických ($p = 0,12$) druhů. Hyperbentické druhy se průkazně neodlišovaly od nektonických ($p = 1$) a jak již bylo řečeno, jejich odlišení od mořských epibentických bylo na hranici signifikance ($p = 0,0508$), od všech ostatních životních stylů se však již lišily prokazatelně ($p < 0,01$). Konečně euryhalinní epibentické druhy šlo významně odlišit ode všech ($p < 0,001$) s výjimkou u kryptobentických ($p = 0,12$) a sladkovodních epibentických ($p = 0,72$).

Osa PC3 od sebe oddělovala podle párových post hoc testů pouze velmi málo životních stylů (příloha 30). Nejvíce signifikantních rozdílů se ukázalo u nektonického životního stylu, který nešlo odlišit pouze od hyperbentického ($p = 0,38$), od ostatních ovšem ano ($p < 0,001$). Naopak nejméně odlišitelné byly hyperbentické druhy, kde žádné srovnání nevyšlo signifikantně ($p > 0,1$). Kryptobentické druhy se významně lišily od nektonických ($p < 0,001$), od ostatních ale ne ($p > 0,08$). Stejně tak tomu bylo u epibentických euryhalinních druhů (porovnání s nektonickými $p < 0,001$, se všemi ostatními $p = 1$). Epibentické mořské druhy se významně lišily pouze od nektonických ($p < 0,001$) a epibentických sladkovodních ($p < 0,002$), od ostatních nikoliv ($p > 0,08$). Epibentické sladkovodní se, jak již bylo zmíněno, odlišovaly od epibentických mořských ($p < 0,002$) a od nektonických ($p < 0,001$), od všech ostatních ne ($p > 0,1$).

Na grafech PCA (obrázek 10 a 11) můžeme sledovat, jak se po ose PC1 oddělují opět epibentické sladkovodní a euryhalinní druhy z linie *Gobius* jednak navzájem, především však od těch z linie *Pomatoschistus*. Hyperbentické druhy se umisťují blízko těch nektonických, především z linie *Pomatoschistus* (pozitivní hodnoty PC1). Kryptobentičtí jedinci se shlukují na této ose dohromady u průměrných hodnot PC1. Mořští epibentičtí z linie *Gobius* se taktéž více shlukují, a oddělují se od těch z linie *Pomatoschistus*. Druhy *Pomatoschistus* linie se na základě životních strategií na této ose nijak výrazněji neoddělují, pouze epibentické sladkovodní druhy zahrnují i jedince umístěné na nižších hodnotách osy oproti ostatním skupinám z *Pomatoschistus* linie, a přibližují se hodnotám pro kryptobentické druhy z *Gobius* linie.

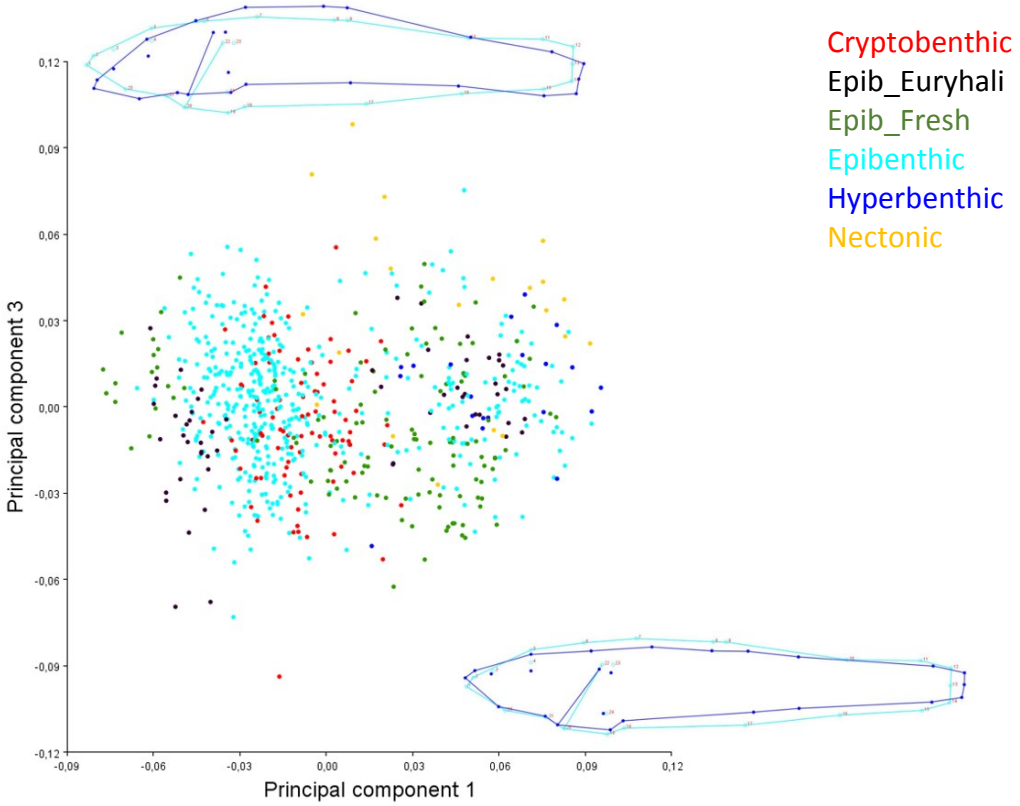


Obrázek 10 Graf s osami PC1 a 2, s barevně odlišeným životním stylem

Na ose PC2 (obrázek 10) se euryhalinní epibentické druhy z linie *Pomatoschistus* umisťují spolu s těmi sladkovodními u vyšších hodnot než zástupci s ostatními životními styly. Hyperbentické a nektonické druhy padají k nižším hodnotám osy, nektonické druhy z linií *Aphia* a *Pomatoschistus* se shlukují dohromady. U *Gobius* linie k tak velkým rozrůzněním na této ose nedochází. Nejníže

na této ose se umístili jedinci z druhu *Didogobius kochi*, kteří jsou kryptobentičtí (jak vidno v příloze 12).

U osy PC3 (obrázek 11) zaujímají epibentické euryhalinní druhy z linie *Gobius* jiné postavení než ty z *Pomatoschistus*. Nektonické druhy se umisťují u nejvyšších hodnot. U *Gobius* linie se epibentičtí sladkovodní oddělují od těch euryhalinních.



Obrázek 11 Graf s osami PC1 a 3, s barevně odlišeným životním stylem

4.2 PCA setu shora

Test fylogenetického signálu prokázal, že ve variabilitě dat v PC skorech datasetu shora je fylogenetický signál (permutační test tetující hypotézu o žádném fylogenetickém testu byl zamítnit, $p < 0{,}0001$).

Pro vyhodnocení analýzy PCA na datasetu z boku byly na základě výše eigenvalue vybrány taktéž osy PC1, PC2, a PC3, které vysvětlovaly 44 %, 18 % a 12 % variability dat (zaokrouhleno na celá čísla, graf je k dispozici v příloze 2).

Osa PC1 (na obrázku 12 – 17) zde ve svém maximu zobrazovala ryby výrazně zúžené, a to jak v oblasti hlavy (především v oblasti skřelí), tak břicha. Naopak ocasní

násadec se oproti průměru příliš nezužoval, byl ale o něco delší. Tyto ryby také neměly tak vypouklé oči jako průměrný jedinec.

PC2 (obrázek 12, 14 a 16) a na své ose směrem k maximu umisťovala ryby s delší hlavou v poměru k tělu, kratším ocasem a prodlouženějším rostrem. Tyto ryby měly také větší oči a první hřbetní ploutev výrazně posazenou více kaudálním směrem.

Konečně osa PC3 (obrázky 13, 15 a 17) zde směrem k vyšším hodnotám představovala jedince s protaženější hlavou, ovšem narozdíl od PC2 se protahovala kaudálním směrem, a tito jedinci měli krátké rostrum, s dlouhou částí hlavy od oka ke skřelím. Měli také blíže posazené a větší oči. Jejich první hřbetní ploutev byla posunuta rostrálně.

4.2.1 Kategorizace dle linie (Lineage)

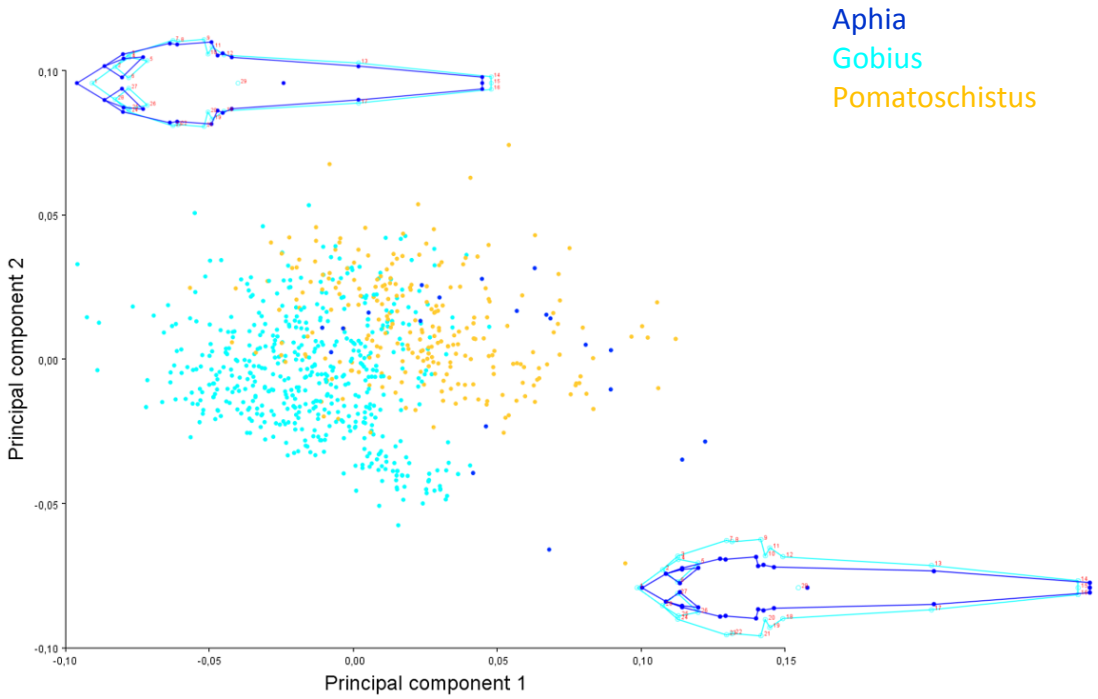
Kruskal-Wallisův test prokazoval odlišení linií podle osy PC1 ($H = 249,6293$; $p = 0,000$), osy PC2 ($H = 91,55824$; $p = 0,000$), a PC3 ($H = 69,52452$; $p = 0,0000$).

Párové post hoc testy v setu shora neprokazovaly tak často signifikantní odlišení, jako u setu z boku (konkrétní hodnoty testů jsou v přílohách 31 – 33) . Na ose PC1 prokazuje pouze odlišnost linie *Gobius* od ostatních dvou ($p < 0,001$), rozdíl mezi *Pomatoschistus* a *Aphia* již nabývá neprůkazné hodnoty ($p = 0,21$) (příloha 31). I na ose PC2 (příloha 32) se linie *Gobius* signifikantně liší od linie *Pomatoschistus* ($p < 0,001$), od linie *Aphia* již ne ($p = 0,167$). Ostatní dvě linie (*Pomatoschistus* a *Aphia*) mezi sebou nemají dostatečně průkazné rozdíly ($p = 0,řá$). Na ose PC3 se naopak tyto linie signifikantně liší ($p < 0,001$), což neplatí pro linie *Gobius* a *Aphia* ($p = 0,96$) (příloha 33).

V grafu se na obrázku 12 i 13 podle osy PC1 neodlišovaly linie tak jasně jako u setu z boku. Linie *Pomatoschistus* přesahovala více k vyšším hodnotám na této ose, zatímco *Gobius* linie zaujímala místo spíše u nižších hodnot. Obě linie se však u průměrných hodnot překrývaly. *Aphia* linie se zde umísťovala spíše k *Pomatoschistus*, a řadily se k ní body s nejvyššími hodnotami (pro druh *Aphia minuta*), jak je vidět i v přílohách 14 a 15, kde jsou označeny zprůměrované pozice jednotlivých druhů.

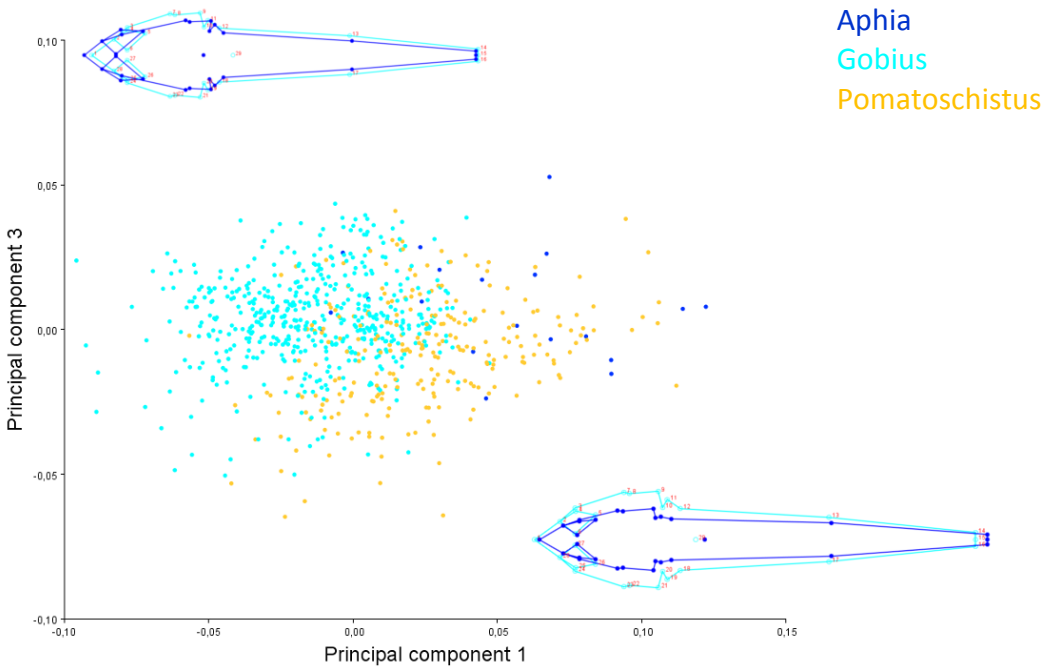
Na ose PC2 (obrázek 12) se jak linie *Aphia* tak *Gobius* vyskytují spolu s linií *Pomatoschistus* kolem průměrných hodnot, ovšem první dvě zaujímají i výraznější

pozici mezi nižšími hodnotami osy. Zástupci linie *Pomatoschistus* mají většinou pozitivní hodnoty osy.



Obrázek 12 Graf s osami PC1 a 2, s barevně odlišenými liniemi

Naopak u PC3 (obrázek 13) se *Pomatoschistus* linie shlukují spíše u průměru a nižších hodnot, oproti tomu většina jedinců z *Gobius* linie se objevuje u průměru a nad ním. Linie *Aphia* má na této ose široký rozptyl.



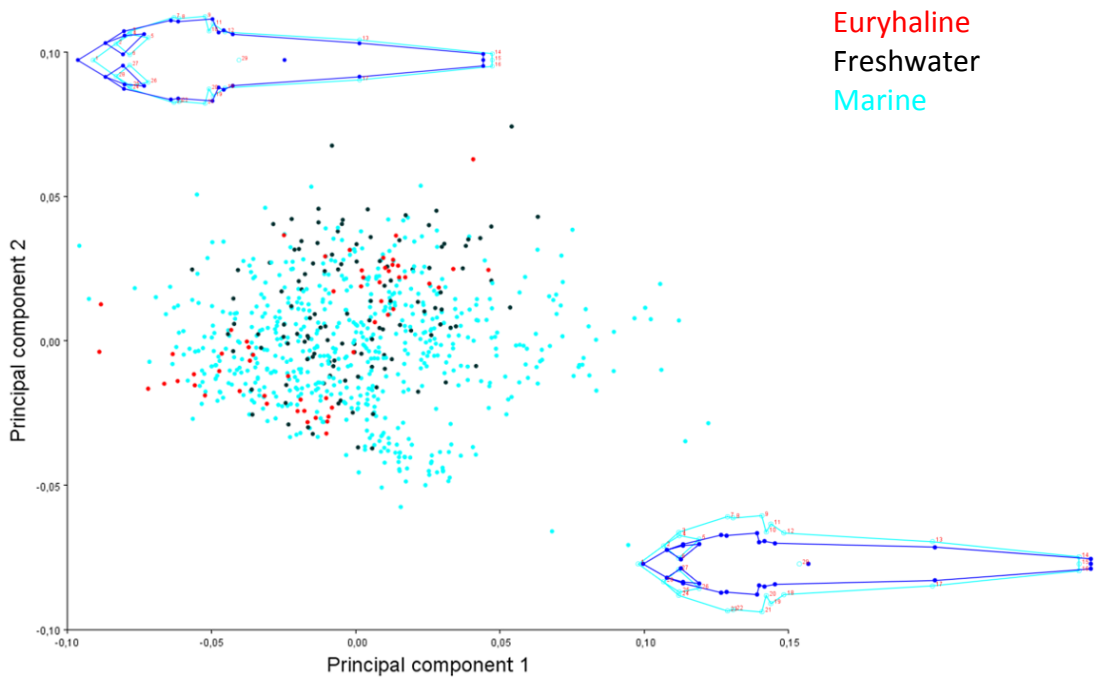
Obrázek 13 Graf s osami PC1 a 3, s barevně odlišenými liniemi

4.2.2 Kategorizace dle prostředí (Environment)

Kruskal-Wallisův test zde ukazuje signifikantní rozdíl podle PC1 (H = 8,404046; p = 0,0150), podle PC 2 (H = 32,56812; p = 0,0000), a podle PC3 také (H = 175,6473; p = 0,000).

Post hoc párový test průkazně odlišuje v případě PC1 euryhalinní druhy od mořských (p = 0,011), u ostatních porovnání ovšem nevyšel signifikantní rozdíl (p > 0,05) (konkrétní data v příloze 34). U PC2 se zase průkazně od mořských odlišují sladkovodní (p < 0,001), u ostatních porovnání průkazné rozdíly nejsou (p > 0,09) (příloha 35). Na PC3 se mořské druhy signifikantně odlišují od ostatních dvou (p < 0,001), sladkovodní a euryhalinní však nejsou podle této osy průkazně odlišitelné (p = 1) (příloha 36).

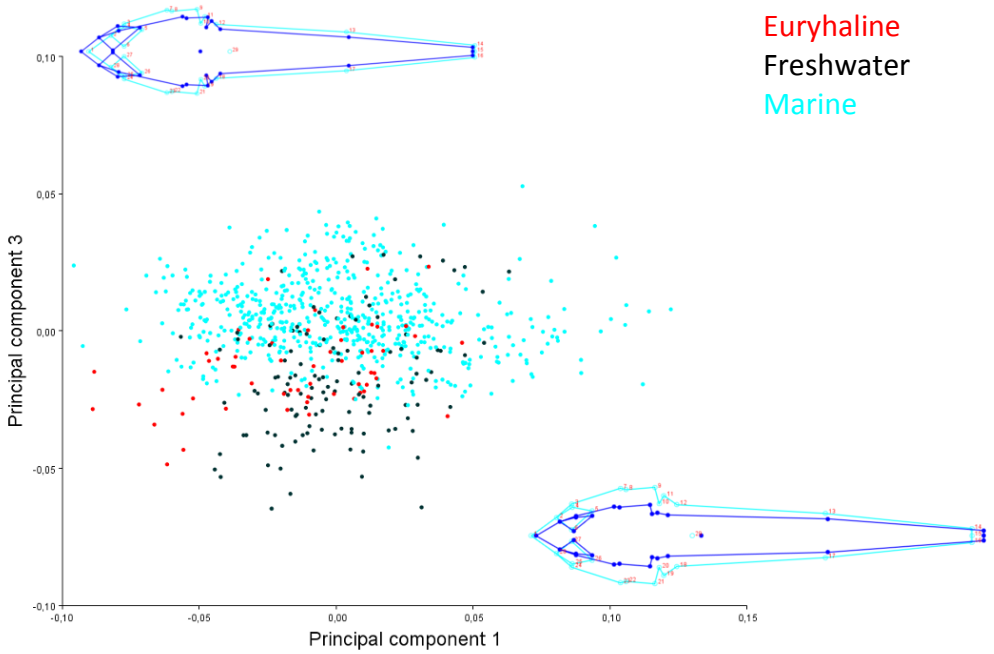
Při pohledu na grafy (na obrázku 14 a 15) se u PC1 jedinci euryhalinních druhů opět rozdělují do dvou skupin. V části osy s nižšími hodnotami se shlukovali jedinci druhu *Ponticola kessleri* (*Gobius* linie), zatímco v druhé skupině s vyššími hodnotami na ose se shromažďovaly ostatní euryhalinní druhy, řadící se do linie *Pomatoschistus*. Mořské druhy měly na této ose největší rozptyl, do nejvyšších hodnot se dostávali jedinci druhu *Pseudaphya ferreri a Aphia minuta*, do těch nejnižších zase *Gobius paganellus* (vizte přílohy s názvy druhů, tedy přílohu 14 a 15).



Obrázek 14 Graf s osami PC1 a 2, s barevně odlišeným obývaným prostředím

Na ose PC2 (obrázek 14) došlo k podobnému oddělení jedinců euryhalinních druhů a rozdělení do dvou skupin jako u PC1, ovšem ne tak výraznému. Sladkovodní druhy zaujímají místo kolem průměru a směrem k vyšším hodnotám, oproti tomu mořské dominují v nižších hodnotách.

U osy PC3 (obrázek 15) dochází k velmi výraznému odlišení mořských druhů od sladkovodních a euryhalinních. Jedinci mořských druhů se umisťují od kolem



Obrázek 15 Graf s osami PC1 a 3, s barevně odlišeným obývaným prostředím

průměru a výše, většina z nich je situována u vyšších hodnot osy. Oproti tomu euryhalinní a sladkovodní druhy pokrývají kromě průměru především spodní části osy.

4.2.3 Kategorizace dle životního stylu s ohledem na prostředí (Lifestyle_environment)

U této kategorie Kruskal-Wallisův test ukázal průkazné odlišení druhů podle životních stylů na PC1 (H = 115,1220; p = 0,000), stejně tak na PC2 (H = 171,8604; p = 0,000) i PC3 (H = 196,0171; p = 0,000).

Na ose PC1 se podle párových post hoc testů významně ode všech lišily pouze nektonické ($p < 0,001$) a hyperbentické druhy ($p < 0,001$). Skupiny druhů s těmito životními styly se však průkazně nelišily mezi sebou (při srovnání nektonických

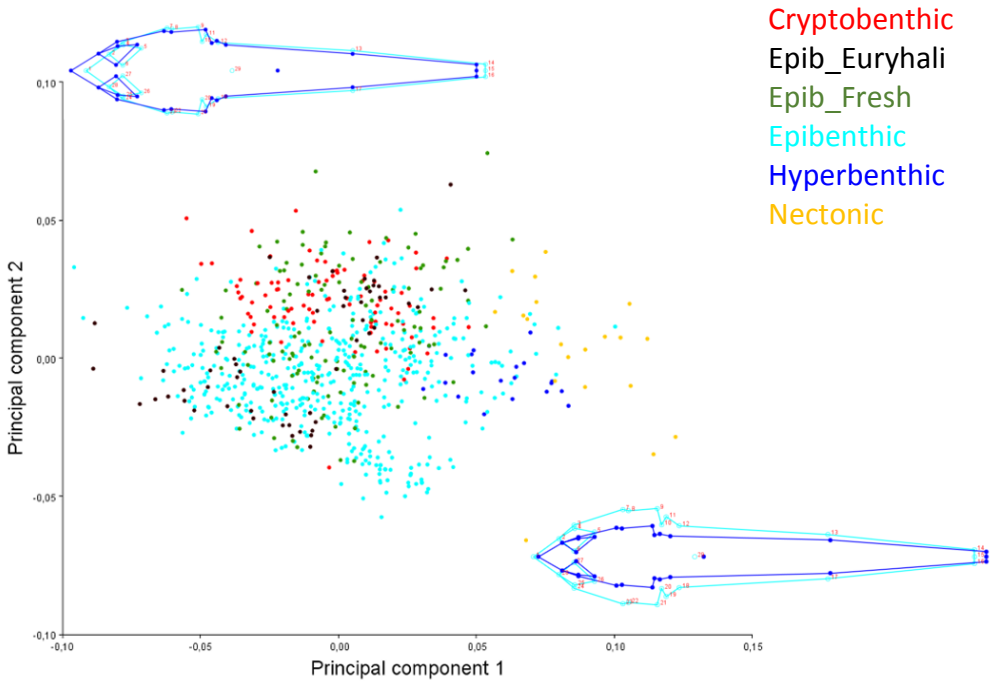
a hyperbentických p = 1). Mezi všemi ostatními životními styly nebyl prokázán signifikantní rozdíl (p > 0,2).

Osa PC2 měla přesně opačný trend. Skupina nektonických druhyůse významně nelišila od žádných jiných skupin (p > 0,4) s jedinou výjimkou u kryptobentických (p = 0,005). Skupina hyperbentických druhů se také významně lišila od skupiny kryptobentických druhů (p < 0,001) a navíc od skupiny epibentických sladkovodních (p = 0,006), ale již ne od žádných dalších (p > 0,7). Nejvíce odlišná byla skupina druhů s kryptobentickým stylem života, jenž se významně odlišovala ode všech (p < 0,005), a to bez výjimky. Epibentické mořské druhy šlo průkazně odlišit ode všech (p < 0,03) vyjma nektonických (p = 0,457) a hyperbentických (p = 1). Skupina sladkovodních epibentických druhů se významně nelišila od euryhalinních (p = 0,499), a od nektonických (p = 1), od ostatních již ano (p u všech ostatních srovnání < 0,006). Skupina euryhalinních epibentických druhů se signifikantně odlišovala od epibentický (p = 0,027), a také od kryptobentické skupiny druhů (p < 0,001), od všech ostatních ovšem nikoliv (p > 0,4).

U porovnávání druhů podle PC3 osy vyšlo nejvíce signifikantních rozdílů u skupiny mořských druhů hlaváčů s epibentickým stylem života. Ta se na této ose významně lišila ode všech (p = 0,02) vyjma nektonické skupiny druhů (p = 1). Naopak skupina hyperbentických druhů nebyla významně odlišitelná od žádných (p > 0,5) kromě výše zmíněné skupiny mořských epibentických druhů (p = 0,02). Skupina kryptobentických druhů se signifikantně lišila ode všech (p < 0,01) s výjimkou u srovnání se skupinami nektonických a hyperbentických druhů (p = 1). Skupinu s nektonickým stylem života šlo průkazně odlišit od skupin s epibentickým stylem života u sladkovodních a euryhalinních ryb (p < 0,001), ne však již u mořských ani u ryb s ostatními životními styly (p > 0,8). Sladkovodní i euryhalinní epibentické ryby se významně lišily od nektonických (p < 0,001), kryptobentických (p < 0,001) a mořských epibentických druhů (p < 0,001), ale ne od hyperbentických, ani od sebe navzájem (při porovnání euryhalinních a sladkovodních epibentických nabývala p value hodnoty 1).

Při pohledu na graf (obrázek 16 a 17) se na PC1 dle očekávání jedinci epibentických euryhalinních druhů opět rozdělili do dvou skupin, jak je popsáno u shrnutí jejich pozice u PC1 při zohledňování prostředí. Oddělují se zde nektonické

druhy, které se umísťují ve vyšších hodnotách osy. Stejně tak se shlukují druhy hyperbentické, taktéž zaujímající místo kolem vyšších hodnot, ne však těch nejvyšších.

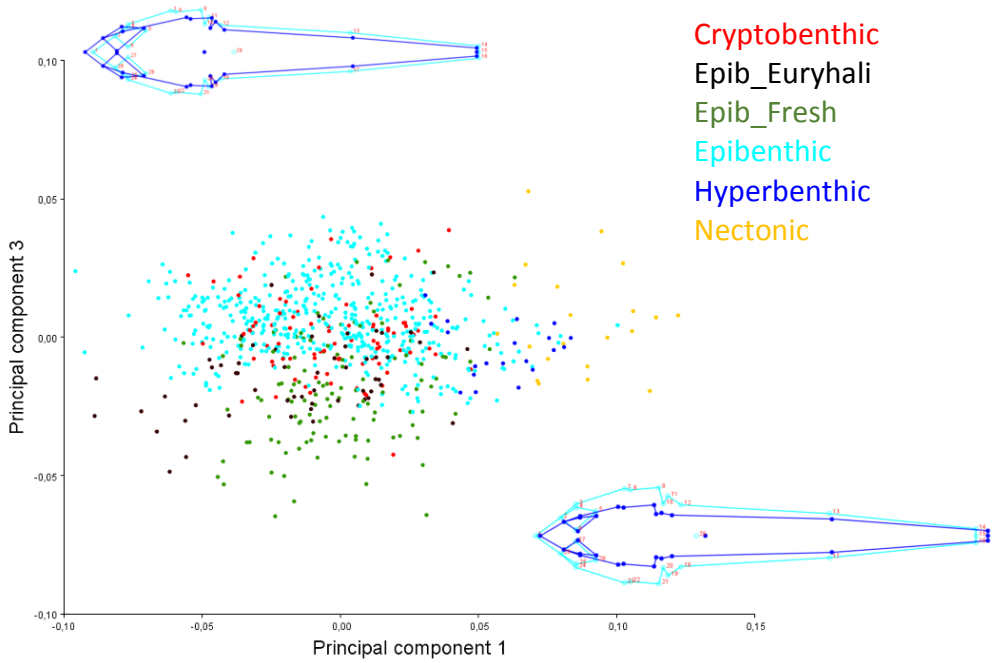


Obrázek 16 Graf s osami PC1 a 2, s barevně odlišeným životním stylem

Na PC2 (obrázek 16) se shlukují k sobě druhy žijící kryptobentickým způsobem života, a to spíše nad průměrnými hodnotami grafu. Oproti tomu hyperbentické druhy se sdružují kolem průměru a pod ním. Do dolní části pod průměrem se také oddělují epibentické euryhalinní druhy *Neogobius melanostomus a Ponticola kessleri* (*Gobius* linie) od ostatních patřících do stejné kategorie ovšem jiné linie (konkrétně *Pomatoschistus*), neboť ty zaujaly místo u vyšších hodnot osy. Epibentické mořské a sladkovodní druhy měly velmi podobný rozptyl, který pokryl široké rozmezí od vyšších po nižší hodnoty.

U PC3 (na obrázku 17) můžeme odlišit především odlišit mořské epibentické druhy, které se shlukovaly u průměrných hodnot osy a směrem k vyšším hodnotám.

Oproti tomu epibentické sladkovodní a euryhalinní druhy zaujímaly místo u nižších hodnot.



Obrázek 17 Graf s osami PC1 a 3, s barevně odlišeným životním stylem

4.3 Test konvergence

Test konvergence odhalil konvergentní evoluci některých skupin hlaváčů rozdělených podle životního stylu a typu habitatu. Více signifikantních výsledků bylo v datasetu na základě dat shora než v datasetu na základě dat z boku, kde celkem čtyři skupiny z šesti byly konvergentní, jak je vidno v tabulce 2. V datasetu shora se ukázala být statisticky významnou konvergence ve tvaru u druhů hyperbentických ($p < 0{,}001$), mořských a sladkovodních epibentických (mořské: $p < 0{,}001$, ; sladkovodní $p < 0{,}001$), a také u těch s nektonickým stylem života ($p = 0{,}003$). U euryhalinních epibentických druhů nebyl výsledek testu signifikantní ($p = 0{,}182$), stejně tak tomu bylo u kryptobentických druhů ($p = 0{,}182$), vizte tabulku 2. Měřítko konvergence C1, které ukazuje, jak moc se taxony fenotypicky přiblížily k sobě oproti jejich maximální fenotypické ancestrální vzdálenosti (C1 = 1 – (současná fenotypická vzdálenost / maximální maximální fenotypická vzdálenost), nabylo velmi vysoké hodnoty u nektonických a hyperbentických druhů (tabulka 2).

U testu evoluční konvergence na datasetu z boku byla objevena pouze jedna dostatečně prokazatelná konvergence, a to u sladkovodních druhů s epibentickým stylem života (p = 0,048), vizte tabulku 2. U všech ostatních skupin hlaváčů test evoluční konvergence neprokázal signifikantní výsledek (p > 0,05; tabulka 2). Hodnota měřítka konvergence C1 byla u sladkovodních epibentických druhů vysoká (tabulka 2). Sladkovodní epibentické druhy byly jedinou skupinou, u které evoluční konvergence byla průkazná na základě obou datasetů, shora i z boku.

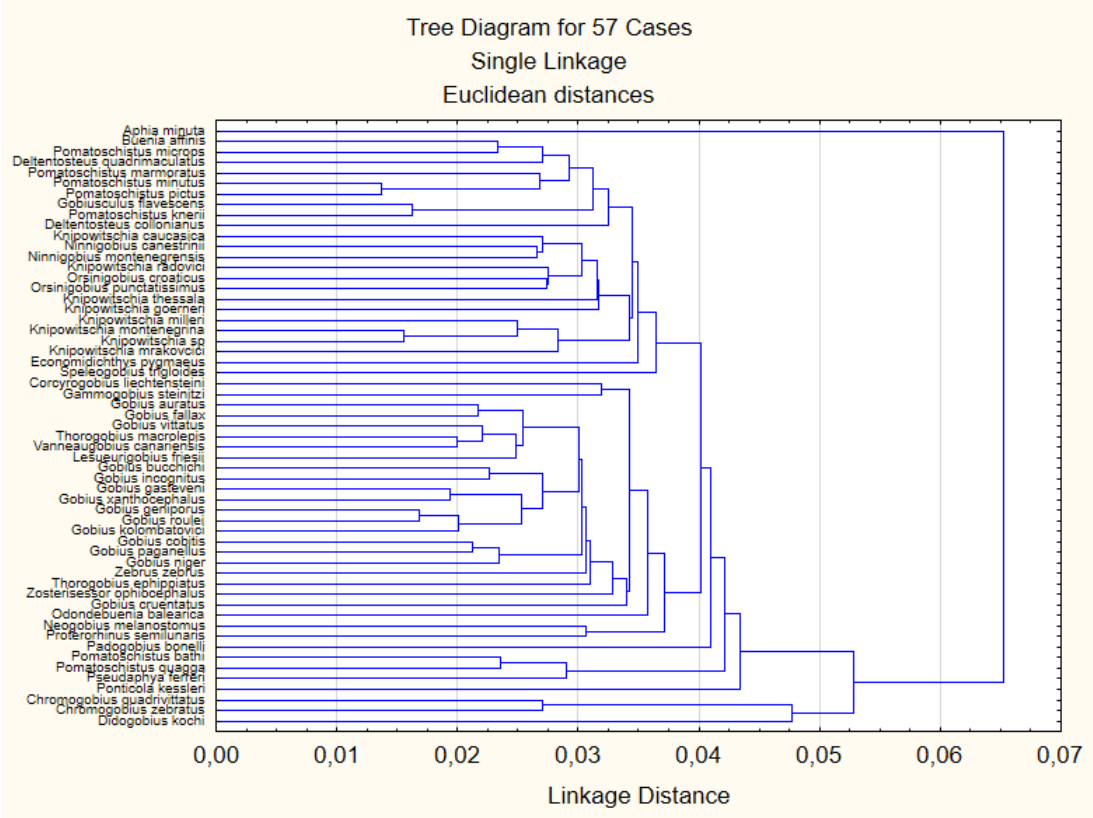
	Shora		**Z boku**	
	C1	p	C1	p
Hyperbentické	**0.500**	**< 0.001**	0.174	0.429
Nektonické	**0.817**	**0.003**	0.275	0.239
Epibentické	**0.179**	**< 0.001**	0.159	0.833
Epib_Fresh	**0.240**	**< 0.001**	**0.332**	**0.048**
Epib_Euryh	0.149	0.182	0.104	0.762
Kryptobentické	0.130	0.182	0.140	0.455

Tabulka 2 Výsledky testu konvergence

4.4 Shluková analýza

Pro lepší znázornění podobnosti druhů na základě tvaru těla byl vytvořen strom, ve kterém se vytvářely shluky druhů podle vzdálenosti PC skórů pomocí eukleidovské metriky (na obrázku 18). Nutno podotkout, že se zde srovnává pouze 58 druhů, protože pro druh *Didogobius splechtnai* nebyla k dispozici fylogenetická data.

Ve stromě se druhy linie *Pomatoschistus* ve většině případů shlukují spolu, stejně tak je tomu u linie *Gobius,* linie *Aphia* však netvořila shluk (klastr): *Lesueurigobius friesii* se začlenil mezi zástupce linie *Gobius*, zatímco druh*Aphia minuta* je výrazně odlišný od všech ostatních druhů a neshlukuje se s ničím dalším, a rozděluje tak strom již na bázi mezi něj a ostatní druhy. Některé druhy se neshlukovaly s příslušnou linií a byly vyčleněny mimo hlavní shluky představující linie. Vlastní skupinu tvořily druhy *Didogobius kochi, Chromogobius quadrivittatus a Chromogobius zebratus* (*Gobius* linie) které jsou si blízce příbuzné a jsou charakteristické dorzoventrálním zploštěním těla a kryptobentickým způsobem života. V rámci zbylých druhů se nejsamostatněji oddělil stranou od hlavního shluku



Obrázek 18 Zobrazení shlukové analýzy v podobě stromu

euryhalinní druh *Ponticola kessleri* (*Gobius* linie), který je též do jisté míry dorzoventrálně zploštělý. Dále vytvořily malý shluk druhy *Pomatoschistus bathi* (epibentický mořský) a *Pomatoschistus quagga* (hyperbentický), a dále se k nim připojoval nektonický druh *Pseudaphya ferreri* (všechny *Pomatoschistus* linie). Druh *Padogobius bonelli* se také osamostatnil stranou; patří do *Gobius* linie, je sladkovodní a je zavalitější v porovnání s ostatními druhy. Strom se poté rozdělil na dva velké klustry, z nichž jeden obsahuje převážnou většinu příslušníků k linii *Pomatoschistus*, a druhý k linii *Gobius*.

Mezi shluk s *Pomatoschistus* linií se nezařadil žádný druh linie *Gobius*. V rámci tohoto shluku se většina mořských druhů s epibentickým stylem života shlukovala k sobě, a ty s hyperbentickým zase spolu. Euryhalinní epibentické druhy se shlukovaly se sladkovodními epibentickými druhy (s výjimkou druhu *Economidichthys pygmaeus*).

Co se druhého výrazného shluku týče, obsahoval pouze zástupce linie *Gobius*, s jedinou výjimkou, jíž je již zmíněný druh *Lesueurigobius friesii* z *Aphia* linie, který se sem zařadil také. Kryptobentické druhy se neshlukly k sobě až na *Gammogobius steinitzi* a *Corcyrogobius liechtensteini*. Epibentické mořské druhy se většinou

umístily do stejného shluku, stejně tak sladkovodní *Proterorhinus semilunaris a* euryhalinní *Neogobius melanostomus*, se shlukli k sobě. Ačkoli se shlukovou analýzou vytvořily dva shluky, zahrnující v jednom případě většinu druhů linie *Pomatoshistus* a v druhém případě většinu druhů linie *Gobius*, členění uvnitř shluků neodpovídalo fylogenetickým vztahům uvnitř linií (vizte obrázek 2 a 18).

5 Diskuze

Výsledky potvrdily, že v rámci evropských linií hlaváčů je vysoká morfologická diverzita a existuje v rámci nich mnoho forem lišících se tvarem těla. Ačkoli morfologická variabilita studovaných hlaváčů byla ovlivněna fylogenetickými vztahy mezi druhy, jak ukázal test fylogenetického signálu, výsledky ukázaly, že u některých ekologických skupin studovaných hlaváčů došlo ke konvergentní evoluci, tj. že je jejich tvar ovlivněn prostředím, které obývají a jejich způsobem života. V rámci evropských hlaváčů je šest základních ekologických skupin, z nich čtyři představují různé životní styly mořských hlaváčů (epibentický, kryptobentický, hyperbentický a nektonický; Kovačić & Patzner, 2011), a další dvě skupiny jsou euryhalinní a sladkovodní druhy, obě s epibentickým způsobem života. U čtyř z těchto šesti skupin hlaváčů došlo ke konvergentní evoluci, jmenovitě u hyperbentických, nektonických, mořských epibentických a sladkovodních epibentických druhů. Moje výsledky neprokázaly konvergentní evoluci u euryhalinních epibentických druhů a u kryptobentických druhů hlaváčů.

Výsledky dále ukázaly, že vhodnější pro studování konvergentní evoluce u hlaváčů a ryb obecně je morfometrická analýza ryb shora než z boku při použití dvojrozměrné morfometrické analýzy. Tvar, který udává pohled shora více vystihuje v jakém prostředí ryba žije, a je více důležitý pro pohyb ryby v různém prostředí (např. štíhlý protáhlý tvar těla a hlavy u ryb, které se pohybují ve vodním sloupci oproti zavalitějšímu nebo dorzo-ventrálně zploštělému tvaru ryb, které žijí na dně).

Hlaváči jsou primárně mořské ryby a jejich ancestrální způsob života je epibentický. Ostatní ekologické skupiny se u evropských linií hlaváčů vyvinuly několikrát, přičemž přechody na kryptobentický, nektonický a hyperbentický způsob života by se daly považovat za rychlou adaptivní radiaci na začátku evoluční vývoje skupiny v důsledku zaplňování volných nik v mořském prostředí, při které došlo k takzvané „early burst“ rychlé druhové morfologické diverzifikaci (Arbour et al., 2019). Přechody na euryhalinní způsob života a do sladkých vod zřejmě nastaly postupně opakovaně (vizte také Thacker & Gkenas, 2019), což se stává v případě, že je evoluce skupiny řízená opakovanými adaptacemi na podobné typy prostředí, kdy jsou opakovaně dostupné podobné niky (Frédérich et al., 2013), v tomto případě jde o dostupnost sladkovodního prostředí. Přechod na sladkovodní způsob života

odpovídá modelu, podle nějž jsou adaptivní radiace replikovány a vznikají tak mnohonásobné skupiny druhů podobné v morfometrické a funkční disparitě (Frédérich et al., 2013).

Mezi evropskými hlaváči v různých ekologických skupinách, u kterých došlo k evoluční konvergenci tvaru těla v důsledku adaptace na stejný typ prostředí, se počty přechodů na daný typ prostředí či způsob života liší. U sladkovodních hlaváčů jsou to (podle všech dosud dostupných fylogenezi, nejen podle této, kde nejsou zahrnuty všechny druhy studovaných linií) čtyři přechody, z nichž ke dvěma došlo v linii *Gobius* a ke dvěma v linii *Pomatoschistus*. Ze studovaných hlaváčů jsou dva nezávislé přechody na nektonický způsob života, a to jeden u linie *Aphia* a druhý u linie *Pomatoschistus*. Celkem jsou v evropských liniích tři nezávislé přechody na tento způsob života, ovšem druh *Crystalogobius linearis* (linie *Pomatoschistus*; Agorreta el al., 2013) nebyl morfometricky studován v rámci této diplomové práce. Nezávislé přechody na hyperbentický způsob života v rámci evropských linií hlaváčů byly tři, všechny v linii *Pomatoschistus*. Epibentický způsob života mořských hlaváčů je ancestrální, nejen pro evropské linie, ale pro celý řád, jak už jsem zmínila.

Evropští hlaváči se tak mohou zařadit ke skupinám, u kterých došlo k opakované konvergentní radiaci, spolu s leguány rodu *Anolis* z ostrovů v Karibiku (Losos et al., 2001; Mahler et al., 2013), cichlidami z jezer východní Afriky (Muschick et al., 2012), žábami v různých částech světa (Moen et al., 2016). či pavouky z Havajského souostroví (Gillespie, 2004). Vzhledem k jejich obrovské druhové diverzitě (Agorreta et al., 2013), velkému rozšíření a různorodosti obývaných nik a forem, lze u hlaváčů jako řádu očekávat mnoho dalších příkladů opakované konvergentní radiace, které stále čekají na objevení.

5.1 Tvar a jeho změny při pohledu z boku

Při pohledu z boku zaujímaly největší roli v diverzitě tvaru těla studovaných ryb délka báze řitní a druhé hřbetní ploutve. Zdá se, že tyto morfologické tvary souvisejí více než s habitatem s tím, do jaké linie druh patří. Druhy z linie *Gobius* měly báze těchto ploutví delší, zatímco ty z linie *Pomatoschistus* je měly podstatně kratší. PC skóry druhů s nejdelšími bázemi ploutví z linie *Pomatoschistus* se okrajově prolínaly s těmi druhů s nejkratšími bázemi ploutví linie *Gobius*. Pouze linie *Aphia* nebyla v tomto

ohledu tak konzistentní, zde se ovšem nektonický druh *Aphia minuta* soustředil spíše v prostředních hodnotách délky bází těchto ploutví, zatímco epibentický *Lesueurigobius friessi* měl báze ploutví delší.

V rámci jednotlivých linií hlaváčů byla však variabilita v délce bází těchto ploutví podle typu obývaného habitatu a životního stylu. U linie *Gobius* se zdá, že na délku bází ploutví mohl mít vliv i životní styl či habitat, neboť epibentické sladkovodní a euryhalinní druhy měly delší ploutve než mořské epibentické a kryptobentické druhy. Jedinou výjimku byl sladkovodní epibentický druh *Padogobius bonelli*, který měl krátké ploutve, takže se opět dostáváme k otázce vlivu příbuznosti, neboť tento druh není ostatním druhům ze stejné kategorie tolik příbuzný. Mořské epibentické druhy byly v délce bází ploutví velmi rozmanité, vyskytovaly se zde druhy jak s velmi dlouhými či naopak krátkými bázemi ploutví. Zástupců této kategorie bylo ale ze všech nejvíce, což mohlo mít vliv. Kryptobentické druhy měly spíše kratší ploutve.

V rámci linie *Pomatoschistus* se neukázal vliv délky bází ploutví na habitat nebo životní styl, neboť druhy se stejnými parametry v těchto kategoriích se spolu neshlukovaly. Dalo by se pouze říct, že epibentické sladkovodní druhy měly větší tendenci mít delší báze ploutví než druhy z ostatních kategoriií z této linie. Mnohem větší vliv zde měla robustnost těla. Sladkovodní a euryhalinní epibentické druhy bývaly mnohem robustnější než ty mořské. Míra robustnosti těla byla významná i pro nektonické druhy z linie *Pomatoschistus,*, ale i *Aphia;* oba druhy byly podprůměrně robustní.

V linii *Gobius* nejspíše robustnost těla tolik nesouvisela obývaným prostředím, zato ale souvisela se způsobem života, epibentické druhy byly robustnější, což bylo popsáno i u hlaváčů z korálových útesů (Herler, 2007). Nejméně robustní druhy se ovšem řadily ke kryptobentickému životnímu stylu, což by mohlo souviset s lepší schopností ukrývání mezi kameny a uvnitř škvír (Kovačić & Patzner, 2011), kde by robustní stavba těla mohla být naopak na překážku. Jeden klád kryptobentických druhů má výrazně dorzoventrálně zploštělý tvar (druhy rodů *Didogobius* a *Chromogobius*), což nepochybně souvisí s jejich způsobem života.

Ani test konvergence neukázal v tomto setu dat signifikantní vliv habitatu na tvar těla, s jedinou výjimkou, a to u epibentických sladkovodních druhů, které měly

konvergentní tvar. Většina epibentických sladkovodních druhů linie *Gobius* měla delší bázi druhé hřbetní a anální ploutve. Také z linie *Pomatoschistus* patřili jedinci s nejdelšími ploutvemi právě mezi epibentické sladkovodní druhy. V práci Thacker & Gkenas (2019), měly sladkovodní druhy z linie *Pomatoschistus* větší poměr délky hlavy ku tělu oproti mořským druhům, stejný trend se ukázal i v mé práci.

Poslední zjištěnou důležitou morfometrickou charakteristikou na datasetu z boku byla vyklenutost zad ryby, kde se průkazně odlišovaly pouze nektonické druhy, které měly záda více vyklenutá než zástupci ostatních skupin. Zde je ovšem otázkou, zda se nejedná o odchylku způsobenou vlivem fixace exempláře, jak bude diskutováno dále (kapitola 5.3 Možné externí vlivy). Jedinci nektonických druhů totiž byli velmi drobní, a právě na jejich tvar může mít fixace zásadní vliv. Při pohledu na fotografie živých jedinců totiž takto výrazné prohnutí, jako měli mnou analyzovaní konzervovaní jedinci, není běžně přítomno.

5.2 Tvar a jeho změna při pohledu shora

U setu shora již byl odfiltrován vliv délky bází ploutví, který u setu z boku vysvětloval největší podíl variance, neboť délka bází těchto ploutví nebyla součástí měření - z tohoto pohledu ji totiž nešlo spolehlivě zaznamenat.

Zde namísto toho hrála největší roli šířka hlavy v poměru ke zbytku těla, dále délka hlavy a velikost očí. Co se prvního zmíněného jevu týče, je otázkou, jak moc velký vliv zde měla příbuznost. Rozhodně tu nedocházelo k tak výrazné distinkci jako u dat setu z boku. *Gobius* linie obsahovala hodně jedinců s širokou a krátkou hlavou a širokým tělem včetně těch, dosahujících extrémních hodnot, zatímco *Pomatoschistus* linie oplývala zástupci s hodně úzkou hlavou i tělem, hlava byla navíc často protáhlejší s delším rostrem, oči ovšem byly v poměru k tělu často menší než byl průměr. Nejštíhlejší jedinci byli druhu *Aphia minuta* z linie *Aphia*.

Jedinci mořských druhů ze všech linií měli většinou větší oči a krátké rostrum. Euryhalinní epibentické druhy měly kratší rostrum a širší hlavu než mořské epibentické druhy bez ohledu na linii, u těch z linie *Gobius* byl tento tvar výraznější než pro ty z linie *Pomatoschistus.* Oba nektonické druhy obsažené v datasetu (linie *Aphia* a *Pomatoschistus*) měly dlouhý a úzký tvar těla, což může souviset s neotenií druhů žijícím tímto způsobem života (Agorreta et al., 2013). Hyperbentické druhy

byly také spíše štíhlejšího tvaru těla. Jak nektonické, tak hyperbentické druhy se pohybují ve vodním sloupci, úzký a dlouhý tvar těla je pro takový pohyb ve volné vodě výhodný. Tento tvar těla je známý i u hlaváčů z korálových útesů se stejným způsobem života (Herler, 2007) a obecně jsou pelagické ryby (ryby obývající volnou vodu) štíhlejší než ryby vázané na dno (Friedman et al., 2020). Kryptobentické druhy měly spíše kratší rostrum, širokou hlavu a velké, dopředu posunuté oči. U této ekologické skupiny se předpokládá, že mají druhy patřící do ní noční aktivitu (Kovačić & Patzner, 2011), což by vysvětlovalo potřebu mít velké oči.

5.3 Možné externí vlivy

Vliv na výsledky určitě mohl mít způsob fixace ryb. Jak ve své práci zjistili Thacker a Gkenas (2019), při porovnávání morfometrie dělané na čerstvých exponátech a na těch fixovaných v ethanolu se výsledky značně liší. Fixace v ethanolu může změnit tvar těla ryb, způsobit krabacení kůže, odpadávání šupin, zkracování těla, scvrkávání, apod., změny navíc můžou být u různých druhů ryb různé (Berbel-Filho et al., 2013; Thacker & Gkenas, 2019). Obzvláště velký vliv má fixace na malé podlouhlé ryby jako je většina hlaváčů. Navíc záleží, jak koncentrovaný ethanol se na konzervaci ryb používá. Na konzervaci hlaváčů pro morfometrické studie je vhodný 70-80% ethanol, na rozdíl od více koncentrovaného, který způsobuje dehydrataci tkání a tím scvrkávání jedinců (Marcelo Kovačić, Přírodovědné muzeum, Rijeka, Chorvatsko, osobní sdělení; Radek Šanda, Národní muzeum, Praha, osobní sdělení). Nejvhodnější je pro morfometrické analýzy použití čerstvého materiálu (Thacker & Gkenas, 2019). Vzhledem k počtu a rozmanitosti zkoumaných exemplářů ovšem nebylo možné zajistit pro morfometrii čerstvé jedince. Jako vhodný konzervační prostředek pro ryby se v muzejních sbírkách a pro morfometrická měření používá 4% formaldehyd, ačkoliv zakonzervování jedinců ryb v nepřirozené poloze nelze vždy zabránit. Pro morfometrická měření na konzervovaném materiálu je navíc důležité, aby porovnávaný materiál byl konzervovaný stejným způsobem, a výsledky tak byly srovnatelné. Převážná většina materiálu použitá v této diplomové práci k morfometrickým měřením pochází z jedné muzejní sbírky (Národní muzeum, Praha), kde se používá standardní muzejní konzervace ryb v 4% formaldehydu. Stejný způsob konzervace se používá i v Přírodovědném muzeu v Rijece, odkud pochází menší část použitého materiálu.

Ač byli jedinci, mající známky velkého poškození anebo zkroucení, vyřazeni již na začátku analýz, přesto mohlo stáří a stav měřených exponátů mít na měření jistě také vliv. U konzervovaných ryb jsou ploutve často olámané, a jejich tvar tak nemůže být použit pro morfometrické analýzy. Proto byly ploutve vyřazeny z měření v této práci. Přitom právě tvar ploutví většinou výrazně odráží životní styl jedince (např. Bower et al., 2021), a mohl by tak poskytnout velice cennou informaci při zkoumání konvergence mezi druhy obývajícími stejné prostředí.

Dalším vlivem potenciálně ovlivňujícím výsledky mohla být nechtěná přítomnost juvenilů mezi měřenými exempláři u velmi malých druhů hlaváčů, kde bylo těžké určit stáří jedince, a ne vždy bylo možné důkladně prohlédnout pohlavní znaky, neboť deformace po fixaci měla vliv na viditelnost pohlavních znaků.

6 Závěr

V této práci jsem zkoumala tvar těla 58 druhů hlaváčů ze tří evropských evolučních linií, za účelem zjistit, zda mezi nimi existují ekomorfy, tj. zda je morfologie (tvar těla) ovlivněna nikou a jakou roli hraje konvergentní evoluce v adaptaci na jednotlivé typy prostředí. Používala jsem k tomuto účelu metody geometrické morfometrie. Tvat těla byl zkoumán z dvou druhů pohledů: z boku a shora. K zobrazení výsledků byla použita analýza hlavních komponent (PCA), ke zjištění, zda lze u skupin hlaváčů najít signifikantní rozdíly ve tvaru těla v závislosti na příslušnosti k evoluční linii, způsobu života, či obývaném habitatu, jsem použila statistické analýzy. Zda mezi hlaváči dochází ke konvergenci ve tvaru těla při stejném životním stylu a obývaném prostředí jsem zjistila za pomoci testu konvergentní evoluce.

Výsledky mé práce potvrdily, že v rámci studovaných hlaváčů existuje vysoká morfologická diverzita. Ačkoli byla ovlivněna fylogenetickými vztahy mezi druhy, jak ukázal test fylogenetického signálu, výsledky práce ukázaly, že u čtyř z šesti ekologických skupin studovaných hlaváčů došlo ke konvergentní evoluci, tj. že je jejich tvar ovlivněn prostředím, které obývají a jejich způsobem života, bez ohledu na příslušnost k linii a na fylogenetické vztahy. Konvergentní evoluce byla prokázána u hyperbentických, nektonických, mořských epibentických a sladkovodních epibentických druhů. Moje výsledky neprokázaly konvergentní evoluci u euryhalinních epibentických druhů, ani u kryptobentických druhů hlaváčů.

Nektonické druhy hlaváčů měly velmi štíhlý a protáhlý tvar těla, úzkou hlavu a relativně malé oči. Hyperbentické druhy měly podobné charakteristiky, ale byly méně štíhlé a měly o něco větší oči. Mořské epibentické druhy měly větší poměr délky hlavy ku tělu oproti ostatním skupinám, také kratší rostrum a větší oči v poměru ke zbytku těla. Sladkovodní druhy měly robustnější tvar těla a delší bázi druhé hřbetní a anální ploutve oproti ostatním skupinám, navíc měly menší očí v poměru ku zbytku těla, a delší hlavu v poměru k tělu.

Druhy linií *Pomatoschistus* a *Gobius* se od sebe daly odlišit podle tvaru poměrně dobře. Zástupci linie *Pomatoschistus* byl**i** celkově štíhlejší a protáhlejší, měli nižší tělo a užší hlavu, menší oči a kratší báze anální a druhé hřbetní ploutve.

Výsledky ukázaly, že tvar, který udává pohled shora více vystihuje v jakém prostředí hlaváč žije, a že analýza tvaru shora je vhodnější pro studium konvergentní evoluce u hlaváčů.

7 Seznam literatury a zdrojů

- Abril, J. M., & Periáñez, R. (2016). Revisiting the time scale and size of the Zanclean flood of the Mediterranean (5.33 Ma) from CFD simulations. *Marine Geology*, *382*, 242-256.
- Agorreta, A., San Mauro, D., Schliewen, U., Van Tassell, J. L., Kovačić, M., Zardoya, R., & Rüber, L. (2013). Molecular phylogenetics of Gobioidei and phylogenetic placement of European gobies. *Molecular phylogenetics and evolution*, *69*(3), 619-633.
- Ahnelt, H., & Dorda, J. (2003). Gobioid fishes from the north eastern Atlantic and the Mediterranean: new records and rarely found species. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie*, 5-19.
- Akyol, O., Ünal, V., & Ceyhan, T. (2006). Occurrence of two Lessepsian migrant fish, *Oxyurichthys petersi* (Gobiidae) and *Upeneus pori* (Mullidae), from the Aegean Sea. *Cybium*, *30*(4), 389-390.
- Almada, V. C., Oliveira, R. F., Gonçalves, E. J., Almeida, A. J., Santos, R. S., & Wirtz, P. (2001). Patterns of diversity of the north-eastern Atlantic blenniid fish fauna (Pisces: Blenniidae). *Global Ecology and Biogeography*, *10*(4), 411-422.
- Arbour, J. H., Curtis, A. A., & Santana, S. E. (2019). Signatures of echolocation and dietary ecology in the adaptive evolution of skull shape in bats. *Nature communications*, *10*(1), 1-13.
- Berbel-Filho, W. M., Jacobina, U. P., & Martinez, P. A. (2013). Preservation effects in geometric morphometric approaches: freezing and alcohol in a freshwater fish. *Ichthyological Research*, *60*(3), 268-271.
- Betancur-R, R., Broughton, R. E., Wiley, E. O., Carpenter, K., López, J. A., Li, C., ... & Ortí, G. (2013). The tree of life and a new classification of bony fishes. *PLoS currents*, *5*.
- Betancur-R, R., Wiley, E. O., Arratia, G., Acero, A., Bailly, N., Miya, M., ... & Ortí, G. (2017). Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC evolutionary biology*, *17*(1), 1-40.

- Bianchi, C. N., & Morri, C. (2000). Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. *Marine pollution bulletin*, *40*(5), 367-376.
- Bilecenoglu, M., Yokes, M. B., & Eryigit, A. (2008). First record of *Vanderhorstia mertensi* Klausewitz, 1974 (Pisces, Gobiidae) in the Mediterranean Sea. *Aquatic Invasions*, *3*(4), 475-478.
- Blackledge, T. A., & Gillespie, R. G. (2004). Convergent evolution of behavior in an adaptive radiation of Hawaiian web-building spiders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(46), 16228-16233.
- Blob, R. W., Bridges, W. C., Ptacek, M. B., Maie, T., Cediel, R. A., Bertolas, M. M., ... & Schoenfuss, H. L. (2008). Morphological selection in an extreme flow environment: body shape and waterfall-climbing success in the Hawaiian stream fish *Sicyopterus stimpsoni*. *Integrative and Comparative Biology*, *48*(6), 734-749.
- Bo, T., López-Rodríguez, M. J., Fenoglio, S., Cammarata, M., & de Figueroa, J. M. T. (2010). Feeding Habits of Padogobius bonelli (Osteichthyes: Gobiidae) in the Curone Creek (Northwest Italy): Territoriality Influences Diet?. *Journal of Freshwater Ecology*, *25*(3), 367-371.
- Bouchereau, J. L., Houder, V., Marques, A., & Rebelo, J. E. (2003). A new distribution record and the reproductive strategy of *Pomatoschistus pictus adriaticus* (Pisces: Gobiidae) in the Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *83*(5), 1157-1161.
- Bower, L. M., Saenz, D. E., & Winemiller, K. O. (2021). Widespread convergence in stream fishes. *Biological Journal of the Linnean Society*, *133*(3), 863-879.
- Carpenter, K. E., & De Angelis, N. (Eds.). (2002). *The living marine resources of the Western Central Atlantic* (Vol. 2, pp. 602-1373). Rome: Food and agriculture organization of the United Nations, 1781-1786.
- Claverie, T., & Wainwright, P. C. (2014). A morphospace for reef fishes: elongation is the dominant axis of body shape evolution. *PloS one*, *9*(11), e112732.
- Cole, K. S. (1990). Patterns of gonad structure in hermaphroditic gobies (Teleostei Gobiidae). *Environmental Biology of Fishes*, 28(1), 125-142.

- Crivelli, A. J., & Maitland, P. S. (1995). Future prospects for the freshwater fish fauna of the north Mediterranean region. *Biological Conservation*, *72*(2), 335-337.
- Didenko, A., Buzevych, I., Volikov, Y., Kruzhylina, S., & Gurbyk, A. (2020). Population dynamics and feeding ecology of the invasive Caucasian dwarf goby, *Knipowitschia caucasica*, in a freshwater habitat in Ukraine. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, (421), 26.
- Engin, S., Larson, H., & Irmak, E. (2018). *Hazeus ingressus sp. nov.* a new goby species (Perciformes: Gobiidae) and a new invasion in the Mediterranean Sea. *Mediterranean Marine Science*, *19*(2), 316-325.
- Engin, S., & Seyhan, D. (2017). A new species of *Pomatoschistus* (Teleostei, Gobiidae): the Mediterranean's smallest marine fish. *Journal of Fish Biology*, *91*(4), 1208-1223.
- Franco, A., Franzoi, P., Malavasi, S., Zucchetta, M., & Torricelli, P. (2012). Population and habitat status of two endemic sand gobies in lagoon marshes–Implications for conservation. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *114*, 31-40.
- Frédérich, B., Sorenson, L., Santini, F., Slater, G. J., & Alfaro, M. E. (2013). Iterative ecological radiation and convergence during the evolutionary history of damselfishes (Pomacentridae). *The American Naturalist*, *181*(1), 94-113.
- Fricke, R., Eschmeyer, W.N. & R. van der Laan, eds. Eschmeyer‘s catalog of fishes, IIS Windows Server [online, 2022]. Gobiidae Dostupné na: http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp#Gobiidae
- Friedman, S. T., Price, S. A., Corn, K. A., Larouche, O., Martinez, C. M., & Wainwright, P. C. (2020). Body shape diversification along the benthic–pelagic axis in marine fishes. *Proceedings of the Royal Society B*, *287*(1931), 20201053.
- Gargani, J., & Rigollet, C. (2007). Mediterranean Sea level variations during the Messinian salinity crisis. *Geophysical Research Letters*, *34*(10).

- Gavrilets, S., & Vose, A. (2005). Dynamic patterns of adaptive radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(50), 18040-18045.
- Gillespie, R. (2004). Community assembly through adaptive radiation in Hawaiian spiders. *Science*, *303*(5656), 356-359.
- Giovannotti, M., Cerioni, P. N., La Mesa, M., & Caputo, V. (2007). Molecular phylogeny of the three paedomorphic Mediterranean gobies (Perciformes: Gobiidae). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *308*(6), 722-729.
- Golani, D., Massuti, E., Orsi-Relini, L., and Quignard, J.P. [online, 2022]. Gobiidae In: CIESM Atlas of Exotic Fishes in the Mediterranean. Dostupno na: https://www.ciesm.org/atlas/appendix1.html
- Goren, M., Gayer, K., & Lazarus, N. (2009). First record of the Far East chameleon goby *Tridentiger trigonocephalus* (Gill, 1859) in the Mediterranean Sea. *Aquatic Invasions*, *4*(2), 413-415.
- Goren, M., & Stern, N. (2021). *Cryptocentrus steinhardti* (Actinopterygii; Gobiidae): a new species of shrimp-goby, and a new invasive to the Mediterranean Sea. *PeerJ*, *9*, e12136.
- Hajji, F., Ouannes-Ghorbel, A., Ghorbel, M., & Jarboui, O. (2013). Reproductive biology of the black goby, *Gobius niger* (Teleostei: Gobiidae), in the Gulf of Gabes (Tunisia, Central Mediterranean). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *93*(6), 1685-1693.
- Hempel, M., & Thiel, R. (2013). First records of the round goby *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) in the Elbe River, Germany. *BioInvasions Records*, *2*(4), 291-295.
- Herler, J. (2007). Microhabitats and ecomorphology of coral-and coral rock-associated gobiid fish (Teleostei: Gobiidae) in the northern Red Sea. *Marine Ecology*, *28*, 82-94.
- Herler, J., Munday, P. L., & Hernaman, V. (2011). Gobies on coral reefs. *The biology of gobies*, 493-529.
- Herler, J., Patzner, R. A., Ahnelt, H., & Hilgers, H. (1999). Habitat selection and ecology of two speleophilic gobiid fishes (Pisces: Gobiidae) from the western Mediterranean Sea. *Marine Ecology*, *20*(1), 49-62.

- Herler, J., & Patzner, R. A. (2005). Spatial segregation of two common *Gobius* species (Teleostei: Gobiidae) in the northern Adriatic Sea. *Marine Ecology*, *26*(2), 121-129.
- Huie, J. M., Prates, I., Bell, R. C., & de Queiroz, K. (2021). Convergent patterns of adaptive radiation between island and mainland *Anolis* lizards. *Biological Journal of the Linnean Society*, *134*(1), 85-110.
- Jakovlić, I., Piria, M., Šprem, N., Tomljanović, T., Matulić, D., & Treer, T. (2015). Distribution, abundance and condition of invasive Ponto-Caspian gobies *Ponticola kessleri* (Günther, 1861), *Neogobius fluviatilis* (Pallas, 1814), and *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) in the Sava River basin, Croatia. *Journal of Applied Ichthyology*, *31*(5), 888-894.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, *11*(2), 353-357.
- Kornis, M. S., Sharma, S., & Jake Vander Zanden, M. (2013). Invasion success and impact of an invasive fish, round goby, in G reat L akes tributaries. *Diversity and Distributions*, *19*(2), 184-198.
- 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*(5), 1-271.
- Kottelat, M. (2001). *Fishes of laos*. WHT Publications Ltd., 198.
- Kovačić, M. (2003). Hyperbenthic gobies in the Kvarner area, Adriatic Sea. *Journal of fish biology*, *63*(4), 1051-1055.
- Kovačić, M. (2005). A new species of *Knipowitschia* (Gobiidae) from Dalmatia, Croatia. *Cybium*, *29*(3), 275-280.
- Kovačić, M., & Bogorodsky, S. (2013). *Silhouettea chaimi* Goren, 1978, a junior synonym of *Papillogobius melanobranchus* (Fowler, 1934)(Teleostei: Gobiidae). *Zootaxa*, *3613*(4), 369-379.
- Kovačić, M., & Golani, D. (2007). First record of *Papillogobius melanobranchus* in the Mediterranean Sea and new data on geographic distributions, bathymetric ranges and morphology of several small benthic fishes in the Levant. *Cybium*, *31*(4), 417-425.

- Kovačić, M., & La Mesa, M. (2010). First data on reproduction and growth of *Buenia affinis* Iljin, 1930 (Gobiidae) in the northern Adriatic Sea. *Scientia Marina*, *74*(3), 561-568.
- Kovačić, M., Miletić, M., & Papageorgiou, N. (2011). A first checklist of gobies from Crete with ten new records. *Cybium*, *35*(3), 245-253.
- Kovačić, M., Ordines, F., & Schliewen, U. K. (2016). A new species of *Speleogobius* (Teleostei: Gobiidae) from the Western Mediterraenean Sea. *Zootaxa*, *4066*(3), 301-310.
- Kovačić, M., Ordines, F., & Schliewen, U. K. (2017). A new species of *Buenia* (Teleostei: Gobiidae) from the western Mediterranean Sea, with the description of this genus. *Zootaxa*, *4250*(5), 447-460.
- Kovačić, M., Ordines, F., & Schliewen, U. K. (2018). A new species of *Buenia* (Perciformes: Gobiidae) from the western Mediterranean slope bottoms, the redescription of *Buenia jeffreysi* and the first Balearic record of *Buenia affinis*. *Zootaxa*, *4392*(2), 267-288.
- Kovačić, M., & Patzner, R. A. (2011). North-eastern Atlantic and Mediterranean gobies. *The biology of gobies*. CRC Press, Science Publishers, Enfield, NH, 177-206.
- Kovačić, M., & Šanda, R. (2007). A new species of *Knipowitschia* (Perciformes: Gobiidae) from southern Montenegro. *Journal of the National Museum (Prague), Natural History Series*, *176*(5), 81-89.
- Kovačić, M., & Šanda, R. (2016). A new species of *Gobius* (Perciformes: Gobiidae) from the Mediterranean Sea and the redescription of *Gobius bucchichi*. *Journal of Fish Biology*, *88*(3), 1104-1124.
- Kovačić, M., Šanda, R., Čekovská, K., Soukupová, T., & Vukić, J. (2021). *Zebrus pallaoroi* sp. nov.: a new species of goby (Actinopterygii: Gobiidae) from the Mediterranean Sea with a DNA-based phylogenetic analysis of the *Gobius*-lineage. *Contributions to Zoology*, *90*(3), 285-317.
- Kramer, A., Kovačić, M., & Patzner, R. A. (2012). Dentition of eight species of Mediterranean Sea Gobiidae: do dentition characters of gobies reflect phylogenetic relationships?. *Journal of Fish Biology*, *80*(1), 29-48.

- Krijgsman, W., Capella, W., Simon, D., Hilgen, F. J., Kouwenhoven, T. J., Meijer, P. T., ... & Flecker, R. (2018). The Gibraltar corridor: Watergate of the Messinian salinity crisis. *Marine Geology*, *403*, 238-246.
- Krijgsman, W., Hilgen, F. J., Raffi, I., Sierro, F. J., & Wilson, D. S. (1999). Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature*, *400*(6745), 652-655.
- La Mesa, M. (2001). Age and growth of *Crystallogobius linearis* (von Düben, 1845)(Teleostei: Gobiidae) from the Adriatic Sea. *Scientia Marina*, *65*(4), 375-381.
- Leitão, R., Martinho, F., Neto, J. M., Cabral, H., Marques, J. C., & Pardal, M. A. (2006). Feeding ecology, population structure and distribution of *Pomatoschistus microps* (Krøyer, 1838) and *Pomatoschistus minutus* (Pallas, 1770) in a temperate estuary, Portugal. *Estuarine, Coastal and shelf science*, *66*(1-2), 231-239.
- Losos, J. B., Schoener, T. W., Warheit, K. I., & Creer, D. (2001). Experimental studies of adaptive differentiation in Bahamian *Anolis* lizards. In *Microevolution rate, pattern, process* (pp. 399-415). Springer, Dordrecht.
- Lowry, D. B. (2012). Ecotypes and the controversy over stages in the formation of new species. *Biological Journal of the Linnean Society*, *106*(2), 241-257.
- Mahler, D. L., Ingram, T., Revell, L. J., & Losos, J. B. (2013). Exceptional convergence on the macroevolutionary landscape in island lizard radiations. *Science*, *341*(6143), 292-295.
- Mazzoldi, C., & Rasotto, M. B. (2001). Extended breeding season in the marbled goby, *Pomatoschistus marmoratus* (Teleostei: Gobiidae), in the Venetian Lagoon. *Environmental biology of fishes*, *61*(2), 175-183.
- McCraney, W. T., Thacker, C. E., & Alfaro, M. E. (2020). Supermatrix phylogeny resolves goby lineages and reveals unstable root of Gobiaria. *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 151.
- McKay, S. I., & Miller, P. J. (1997). The affinities of European sand gobies (Teleostei: Gobiidae). *Journal of Natural History*, *31*(10), 1457-1482.

- Miller, P. J. (1961). Age, growth, and reproduction of the rock goby, *Gobius paganellus* L., in the Isle of Man. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *41*(3), 737-769.
- Miller, P.J. (1986). Fishes of the North-easternAtlantic and the Mediterranean. In *Gobiidae*, (Paris: UNECSO), pp. 1019–1085.
- Miller, P. J. (1990). The endurance of endemism: the Mediterranean freshwater gobies and their prospects for survival. *Journal of Fish Biology*, *37*, 145-156.
- Miller, P. J. (2009). A west Balkanian freshwater gobiid fish, *Knipowitschia mrakovcici* sp. nov.(Teleostei: Gobiidae). *Journal of Fish Biology*, *74*(7), 1499-1507.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010, November). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *2010 gateway computing environments workshop (GCE)* (pp. 1-8).
- Miller, P. J., & Šanda, R. (2008). A new West Balkanian sand-goby (Teleostei: Gobiidae). *Journal of Fish biology*, *72*(1), 259-270.
- Moen, D. S., Morlon, H., & Wiens, J. J. (2016). Testing convergence versus history: convergence dominates phenotypic evolution for over 150 million years in frogs. *Systematic Biology*, *65*(1), 146-160.
- Muschick, M., Indermaur, A., & Salzburger, W. (2012). Convergent evolution within an adaptive radiation of cichlid fishes. *Current biology*, *22*(24), 2362-2368.
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World (Fifth edition)*. John Wiley & Sons, 752–754.
- Neilson, M. E., & Stepien, C. A. (2009). Escape from the Ponto-Caspian: Evolution and biogeography of an endemic goby species flock (Benthophilinae: Gobiidae: Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *52*(1), 84-102.
- Patzner, R. A. (1999). Habitat utilization and depth distribution of small cryptobenthic fishes (Blenniidae, Gobiesocidae, Gobiidae, Tripterygiidae) in Ibiza (western Mediterranean Sea). *Environmental Biology of Fishes*, *55*(3), 207-214.

- Patzner, R., Van Tassell, J. L., Kovačić, M., & Kapoor, B. G. (Eds.). (2011). *The biology of gobies*. CRC Press, Science Publishers, Enfield, NH
- Poe, S., & Anderson, C. G. (2019). The existence and evolution of morphotypes in *Anolis* lizards: coexistence patterns, not adaptive radiations, distinguish mainland and island faunas. *PeerJ*, *6*, e6040.
- Rainey, P. B., & Travisano, M. (1998). Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature*, *394*(6688), 69-72.
- Rampin, M., Gkenas, C., Malavasi, S., & Libertini, A. (2011). A cytogenetical study on *Economidichthys pygmaeus* Holly, 1929 (Pisces, Gobiidae), an endemic freshwater goby from Western Greece. *Comparative Cytogenetics*, *5*(5), 391.
- Reichenbacher, B., Gregorová, R., Holcová, K., Šanda, R., Vukić, J., & Přikryl, T. (2018). Discovery of the oldest Gobius (Teleostei, Gobiiformes) from a marine ecosystem of Early Miocene age. *Journal of Systematic Palaeontology*, *16*(6), 493-513.
- Rohlf, F. J. [online, 2019a]. TpsDig (Version 2.31), digitize landmarks and outlines. *Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook*. Dostupné z: http://sbmorphometrics.org/soft-dataacq.html
- Rohlf, F. J. [online, 2019b]. TpsUtil (Version 1.81). *New York: Department of Ecology and Evolution and Anthropology, State University of New York at Stony Brook*. Dostupné z: http://www.sbmorphometrics.org/soft-utility.html.
- Rothman, S. B., & Goren, M. (2015). First record of the Red Sea shrimp-goby *Cryptocentrus caeruleopunctatus* in the Mediterranean Sea. *Marine Biodiversity Records*, *8*.
- Salameh, P., Sonin, O., & Golani, D. (2010). First record of the burrowing goby, *Trypauchen vagina* (Actinopterygii: Gobiidae: Amblyopinae), in the Mediterranean. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, *40*(2).
- Simpson, G. G. (1953). *The major features of evolution*. Columbia University Press.
- Slámová, T. (2017). *Phylogenetic relationships within the Gobius-lineage (Gobiidae)*. [Diplomová práce, Univerzita Karlova]. Digitální repozitář Univerzity Karlovy. Dostupno online na https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/91281

- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, *30*(9), 1312-1313.
- Stayton, C. T. (2015). The definition, recognition, and interpretation of convergent evolution, and two new measures for quantifying and assessing the significance of convergence. *Evolution*, 69(8), 2140-2153.
- Stroud, J. T., & Losos, J. B. (2016). Ecological opportunity and adaptive radiation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 47, 507-532.
- Thacker, C. E., & R. A. Patzner (2011). Systematics of Gobiidae. *The biology of gobies.* CRC Press, Science Publishers, Enfield, NH, 129-136.
- Thacker, C. E. (2015). Biogeography of goby lineages (Gobiiformes: Gobioidei): origin, invasions and extinction throughout the Cenozoic. *Journal of Biogeography*, *42*(9), 1615-1625.
- Thacker, C. E., & Gkenas, C. (2019). Morphometric convergence among European sand gobies in freshwater (Gobiiformes: Gobionellidae). *Ecology and evolution*, 9(14), 8087-8103.
- Tiralongo, F., Crocetta, F., Riginella, E., Lillo, A. O., Tondo, E., Macali, A., ... & Azzurro, E. (2020). Snapshot of rare, exotic and overlooked fish species in the Italian seas: A citizen science survey. *Journal of Sea Research*, *164*, 101930.
- Valová, Z., Konečná, M., Janáč, M., & Jurajda, P. (2015). Population and reproductive characteristics of a non-native western tubenose goby (*Proterorhinus semilunaris*) population unaffected by gobiid competitors. *Aquatic Invasions*, *10*(1).
- Van Tassell, J. L. (1988). A new species of *Didogobius* (Perciformes, Gobiidae) from the Canary Islands. *American Museum novitates*;; no. 2906.
- Van Tassell, J. L., Miller, P. J., & Brito, A. (1988). A revision of Vanneaugobius (Teleostei: Gobiidae), with description of a new species. *Journal of natural history*, *22*(2), 545-567.
- Villegas-Ríos, D., & Bañón, R. (2010). First record and new meristic data of *Gobius xanthocephalus* (Gobiidae) from Galician waters (NW Spain). *Cybium*, *34*(3), 311-314.

- Warny, S. A., Bart, P. J., & Suc, J. P. (2003). Timing and progression of climatic, tectonic and glacioeustatic influences on the Messinian Salinity Crisis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, *202*(1-2), 59-66.

- Wood, R. (2011). Tethys Ocean. *Encyclopedia of Modern Coral Reefs. Encyclopedia of Earth Sciences Series.* Springer, Dordrecht, The Netherlands, https://doi. org/10.1007/978-90-481-2639-2_158.

- Zander, C. D. (2011). Gobies as predator and prey. *The Biology of Gobies*, CRC press, USA, 291-344.