

DIPLOMOVÁ PRÁCE

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

Genetická analýza populací sekavců rodu *Cobitis*
v dunajském povodí Bulharska

Praha, 2007, Jana Lopaurová

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie

Genetická analýza populací sekavců rodu *Cobitis*
v dunajském povodí Bulharska

Jana Lopaurová

Diplomová práce



Školitel: Mgr. Lukáš Choleva

Konzultanti: Ing. Věra Šlechtová, Csc.

RNDr. Miroslav Švátora, CSc.

Mgr. Karel Janko, PhD.

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

V Praze, dne 4. 9. 2007.....

Jana Lopaurová



Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. L. Cholevovi za vedení mojí diplomové práce, za pomoc při jejím vypracování a za cenné připomínky k rukopisu.

RNDr. M. Švátorovi, CSc., děkuji především za podporu mojí práce v rámci oddělení zoologie.

Ing. V. Šlechtové, CSc., děkuji za pomoc při analýze alozymů a za uvedení do problematiky této metody. Bc. J. Pivoňkové děkuji za technickou podporu během práce v Laboratoři genetiky ryb AV ČR Liběchov. Chtěla bych poděkovat také Ing. M. Flajšhansovi za umožnění analýzy ploidie na průtokovém cytometru a za laskavou pomoc při řešení problémů se vzorky v souvislosti s touto metodou. Bc. M. Balážovi děkuji za laboratorní spolupráci na analýze ploidie.

Svému příteli a své rodině děkuji za velkou podporu a trpělivost.

Poděkování patří rovněž Grantové agentuře Univerzity Karlovy v Praze, která financovala genetické analýzy sekavců (grant č. GAUK 187/2005 B-BIO, nositel L. Choleva), MŠMT ČR LC06073, MŽP VaV-SM/6/3/05, Akademii věd České republiky v rámci výzkumného záměru IRP IAPG AV0Z 50450515 a společnému výzkumnému projektu č. 6 mezi AV ČR a Bulharskou akademií věd pro období 2005-2007.

Obsah:

1. Úvod.....	6
2. Literární přehled.....	8
2.1. Reprodukční mechanismy obratlovců.....	8
2.2. Hybridní komplex <i>C. taenia</i>	10
2.2.1. Gynogeneze komplexu <i>C. taenia</i>	12
2.2.2. Polyploidie.....	13
2.2.3. Diverzita biotypů komplexu <i>C. taenia</i>	15
2.2.4. Biogeografie rodu <i>Cobitis</i> v Bulharsku.....	18
3. Metodika.....	19
3.1. Odlov ryb a zpracování vzorků.....	19
3.2. Elektroforetické studium alozymů.....	19
3.2.1. Postup elektroforézy.....	20
3.2.1.1. Příprava vzorků.....	20
3.2.1.2. Elektroforéza na škrobovém gelu.....	20
3.2.1.3. Barvení specifických proteinů.....	20
3.2.1.4. Vyhodnocování elektroforeogramů.....	21
3.3. Určení ploidie.....	21
3.3.1. Průtoková cytometrie.....	21
3.4. Vyhodnocování dat.....	22
4. Výsledky.....	23
4.1. Distribuce alel a jejich kombinace.....	23
4.2. Diverzita biotypů.....	25
4.3. Klonální diverzita jednotlivých biotypů.....	26
4.4. Genetická analýza vajíček.....	29
4.5. Úroveň ploidie ve zkoumaných populacích.....	30
4.6. Populační diverzita.....	30
5. Diskuse.....	32
6. Souhrn.....	39
7. Seznam použité literatury.....	40
Přílohy.....	47
Příloha I	

Příloha II

Příloha III

Příloha IV

Příloha V

1. Úvod

Sekavcovité ryby rodu *Cobitis* jsou drobné ryby, žijící ve stojatých a pomalu tekoucích vodách zahrabány do písčitého dna. Díky jejich značné morfologické podobnosti byly v Evropě dříve tyto ryby považovány za příslušníky jediného, široce rozšířeného druhu *C. taenia* Linnaeus. V současné době, pomocí moderních genetických a biochemických metod bylo vyčleněno a popsáno několik dalších druhů a objeveny hybridní biotypy (Bohlen a Ráb, 2001). Ty vznikají mezidruhovým křížením a dále se rozmnožují asexuálně, mechanismem gynogeneze. Jedinci s gynogenetickou reprodukcí jsou při svém rozmnožování závislí na spermiích hostitelského druhu. Hybridní biotypy společně s druhy, podílejícími se na jejich vzniku nebo sloužícími jako hostitelé při jejich reprodukci, tvoří hybridní komplex *C. taenia* (Janko et al., 2005b), rozšířený ve všech hlavních evropských povodích (Janko et al., in press).

Ve své práci jsem se zaměřila na dosud nevzorkované oblasti Bulharska, se snahou doplnit biogeografii druhů i hybridů a pozorovat složení smíšených populací na jednotlivých lokalitách s ohledem na gynogenetický způsob rozmnožování. Situace v Bulharsku je o to složitější, že zde vedle sebe žijí fylogeneticky vzdálenější druhy. Blízce si příbuzné druhy, vyskytující se v Dunaji, se v bulharských řekách potkávají s druhem *C. strumicae*, který patří k jiné fylogenetické linii. Podle prvních dostupných záznamů se vzácně může i tento nesesterský druh podílet na vzniku hybridních forem (Janko et al., in press).

Komplex *C. taenia* představuje mimo jiné vhodný model pro studii asexuálního rozmnožování u obratlovců. Je jednou ze skupin, kde vedle sebe žijí a jsou na sebe úzce vázány sexuálně se rozmnožující druhy a asexuální hybridní biotypy. Pokud by se potvrdila hybridizace druhů z jiných fylogenetických linií, jednalo by se o velmi pozoruhodný jev i v rámci celé skupiny obratlovců. Mezidruhové křížení můžeme běžně pozorovat pouze u blízce si příbuzných druhů.

Cíle:

1. Doplnit údaje o biogeografii sekavců rodu *Cobitis* v Bulharsku.
2. Rozřešit hypotézu intenzivní či příležitostné hybridizace druhu *C. strumicae* s blízkce nepříbuznými druhy a hybridy komplexu *C. taenia*.
3. Zmapovat složení populací vyskytujících se v Bulharsku s ohledem na gynogenezi.
4. Na základě analýzy jednotlivých vajíček otestovat gynogenetický mechanismus reprodukce.

2. Literární přehled

2.1 Reprodukční mechanismy obratlovců

Rozmnožování je jedním ze základních projevů živých organismů. Díky němu se organismy udržují v čase a prostoru. Pro většinu obratlovců je typické rozmnožování sexuální, jehož podstatou je výměna genetické informace mezi jedinci. Při sexuální reprodukci vzniká nový jedinec splnutím samčí a samičí gamety a dále při gametogenezi dochází v meióze ke genové rekombinaci rodičovských genomů. Ta je mimořádně významná pro udržování vnitrodruhové a vnitropopulační variability a hraje důležitou roli při evoluci organismů. Vedle sexuální reprodukce se u některých taxonů obratlovců objevuje i reprodukce asexuální. Vývoj pohlavních buněk při asexuální reprodukci probíhá modifikovanými mechanismy gametogeneze, které brání genové rekombinaci a způsobují tak klonální dědičnost (Dawley, 1989).

Sexuální rozmnožování napomáhá zvyšování evolučního potenciálu, a to udržováním polymorfismu a také tím, že přispívá ke vzniku variability. Dále umožňuje organismům rychleji reagovat na změny životního prostředí, uniknout před zátěží způsobenou hromaděním mutací nebo parazity a zvyšovat tak jejich individuální zdatnost (Felsenstein, 1974; Hamilton et al., 1990). Asexuální formy mezi vyššími obratlovci byly považovány za evolučně slepé větve v důsledku limitovaného adaptačního potenciálu. Výskyt asexuálních obratlovců byl vysvětlován jejich nedávným vznikem, avšak asexuální linie mohou být mnohem starší než bylo kdy dříve uvažováno (Quattro et al., 1992). Současné objevy u některých modelových skupin kontrastují s tradičními předpoklady o asexuálních formách (Vrijenhoek, 1993; Judson a Normark, 1996; Alves et al., 1998), stejně tak je zářející i rostoucí množství objevených asexuálních komplexů (Vrijenhoek et al., 1989). Jedním z obranných mechanismů asexuálních obratlovců před negativními důsledky, plynoucí z podstaty klonální reprodukce, může být složení jejich populací z více linií (Vrijenhoek et al., 1989), což jim pomáhá zátěž vyvolanou parazity minimalizovat (Hamilton et al., 1990) nebo efektivněji využívat zdroje (Vrijenhoek, 1998). Výhodou asexuální reprodukce

proti sexuální je, že nemusí investovat do samců, meiózy, není limitována velikostí populace a nedochází k rozpadu již osvědčených kombinací genů (Bogart, 1989). Mezi asexuálními obratlovci je běžná polyploidie, nejčastěji se vyskytují triploidi (Vrijenhoek et al., 1989).

Prvním objeveným asexuálním obratlovcem byla živorodá ryba *Poecilia formosa* (Hubbs a Hubbs, 1932). V současné době je mezi obratlovci známo více než 100 unisexuálních forem (Vrijenhoek et al., 1989, reference v Alves et al., 2001). Asexuální obratlovci sdílí některé společné znaky: 1. jsou hybridního mezidruhového původu, 2. gamety vznikají aberantními mechanismy gametogeneze, aniž by docházelo k rekombinaci genomů rodičovských druhů, 3. jejich populace zahrnují zpravidla pouze samice, 4. většina z nich je polyploidní (Dawley, 1989). U asexuálních obratlovců rozlišujeme tři základní reprodukční mechanismy. U plazů (amniota) je známá partenogeneze, u některých skupin obojživelníků a ryb (anamniota) jsou to gynogeneze a hybridogeneze (Dawley, 1989).

Partenogeneze je způsob reprodukce, kdy dochází k produkci klonálních, neredukovaných vajíček, která se vyvíjí bez přítomnosti spermií (Maslin, 1966; Cuellar, 1970). Diploidní potomstvo je pak geneticky identické. Příkladem může být ještěrka *Lacerta unisexualis* (Beukeboom a Vrijenhoek 1998).

Gynogeneze, stejně jako partenogeneze, spočívá v produkci neredukovaných, klonálních vajíček. Na rozdíl od ní je však pro zahájení vývoje vajíčka nutná jeho aktivace spermií, i když ke splynutí pohlavních buněk zpravidla nedochází. Samčí genom se tedy geneticky neúčastní na tvorbě jedince. Mezi gynogeneticky se rozmnožující organismy patří i ryby rodu *Cobitis* (Beukeboom a Vrijenhoek, 1998)

Hybridogeneze je ve své typické podobě reprezentována rybami rodu *Poecilia* (Schultz, 1969). Stejně jako u gynogeneze, je i zde nutná přítomnost spermií. Pohlavní buňky při ní splývají, samčí genom se podílí na vzniku somatických buněk. Během oogeneze však nedochází k rekombinaci rodičovských genomů, naopak samčí genom je z vajíčka eliminován a v každé generaci znovu doplněn. Vznikají tak klonální vajíčka se samičím, nerekombinovaným genomem (Dawley, 1989).

Gynogenetické a hybridogenetické formy jsou svým rozmnožováním závislé na gametách rodičovských druhů, můžeme je označit za sexuální parazity. Tímto vznikají komplexy rodičovských druhů a jejich hybridů. Druhy a hybridy jsou v rámci

komplexu na sebe úzce vázány, vzájemně se udržují a napomáhají si při rozšiřování do nových areálů (Vrijenhoek, 1998). Jedním z modelových organismů pro studium takových komplexů jsou sekavcovité ryby rodu *Cobitis*.

2.2 Hybridní komplex *Cobitis taenia*

Až do 90. let 20. století byla většina sekavcovitých ryb rodu *Cobitis* v Evropě považována za příslušníky jediného, široce rozšířeného druhu *Cobitis taenia* Linnaeus, členěného do několika poddruhů (Lelek, 1987). Pozdější studie ukazují, že diverzita uvnitř rodu *Cobitis* je mnohem větší. Bylo vyčleněno i nově popsáno několik dalších druhů (shrnuto v Kottelat, 1997) a objeveny hybridní biotypy (shrnuto v Ráb a Slavík, 1996), které vznikají mezidruhovým křížením a dále se rozmnožují asexuálně.

V současné době je v Evropě známo 23 druhů sekavcovitých ryb rodu *Cobitis*. Ty zde nejsou rovnoměrně rozšířeny, vyšší druhová pestrost je zastoupena v jižní, mediteránní Evropě, kde se alopaticky vyskytuje 17 druhů. Nemediteránní Evropu obývá 7 druhů. Pouze jeden druh, *C. strumicae*, obývá oba regiony. Přítomnost hybridních biotypů je popsána pouze z nemediteránní Evropy (Bohlen a Ráb, 2001).

Naše poznání o biogeografii a taxonomii rodu *Cobitis* v Evropě má i přes značné množství studií daleko do úplnosti. To je způsobeno především extrémní morfologickou podobností jednotlivých druhů i jejich hybridů. Navržen byl koncept skupin sesterských druhů, v rámci kterých jsou druhy mezi sebou podle vnějších charakteristik prakticky nerozeznatelné, ale výrazně se odlišují na genetické úrovni (Vasil'eva a Vasil'ev, 1998; Vasil'eva 2000). Jednotlivé biotypy pak můžeme od sebe spolehlivě rozlišit především na základě studií karyotypu a alozymových dat (Ráb et al., 2000; Šlechtová et al., 2000). V současné době jsou známy nejméně tři takové skupiny sesterských druhů. Vedle komplexu *C. striata* Okada et Ikeda z Japonska (Ueno a Ojima, 1976) se jedná o skupinu tvořenou *C. paludica* z Iberijského poloostrova a *C. maroccana* ze severní Afriky (Vasil'eva et al., 1992; Perdices et al., 1995) a dále komplikovanou skupinu druhů, sesterských k druhu *C. taenia*, rozšířenou v Evropě v povodí Černého, Kaspického, Baltského i Severního moře (Vasil'eva a Vasil'ev, 1982; Boron, 1992, 1995; Ráb a Slavík 1996, Vasil'eva a Vasil'ev, 1998; Boron a Danilkiewicz, 1998).

Posledně jmenovaná skupina je označována jako hybridní komplex *C. taenia* sensu Janko et al. (2007).

Hybridní komplex *C. taenia* je skupina sedmi rodičovských druhů z Evropy a jejich 16 asexuálně se rozmnožujících, převážně triploidních, mezidruhových hybridních biotypů. Komplex obsahuje diploidní i hybridní polyploidní formy, které se navzájem významně liší svým genotypem, ale jsou téměř nerozeznatelné od *C. taenia* L., 1758, ve všech hlavních morfologických charakteristikách (Janko et al., 2005b). Z druhů do komplexu patří *C. taenia* Linnaeus, 1758, *C. elongatoides* Bacescu et Maier, 1969, *C. tanaitica* Bacescu et Maier, 1969, *C. strumicae* Karaman, 1955, *C. melanoleuca* Nichols, 1925, *C. elongata* Heckel a Kner, 1858, *C. taurica* Vasil'eva, Vasil'ev, Janko, Ráb et Rábová, 2005. Tyto druhy, vyjma *C. elongata*, se mezi sebou vzájemně kříží a dávají vzniknout hybridním biotypům.

Hybridní biotypy žijí společně s pohlavně se rozmnožujícími formami ve smíšených populacích. Jsou rozšířeny v celém areálu, neomezují se pouze na kontaktní zóny rodičovských druhů (Bohlen a Ráb, 2001). Hybridní jedinci jsou především polyploidní a rozmnožují se asexuálně, mechanismem gynogeneze. Jejich existence závisí tedy na přítomnosti spermií hostitelského druhu (Vasil'ev et al., 1989; Saat, 1991). Studium alozymů nebyla zjištěna žádná alela specifická výhradně pro hybridy (Šlechtová et al., 2000). Jako u většiny asexuálních obratlovců i populace hybridů komplexu *C. taenia* tvoří převážně samice. Pokud se vyskytují samci, vznikají v každé generaci *de novo* jako výsledek oplození klonálního vajíčka spermií nesoucí Y chromozom (Vasil'ev et al., 1989). Tento předpoklad podporuje i skutečnost, že pokud byli nalezeni triploidní samci, nacházeli se v populaci společně s diploidními samicemi. Stejně tak tetraploidní samci byli objeveni pouze na lokalitách, které obývaly triploidní samice (Bohlen et al., 2002). Hybridní biotypy se navzájem liší svým genotypem. Ten je ovlivněn nejenom druhy, které se v minulosti setkávaly, ale i lokální historií populací a souborem biotických i abiotických faktorů na dané lokalitě. Typická populace je tvořena jedním hostitelským druhem a více přidruženými hybridními biotypy. Je pravidlem, že hostitelský druh dominuje v genomu přidruženého biotypu (Bohlen a Ráb, 2001).

2.2.1 Gynogeneze komplexu *C. taenia*

Přítomnost gynogeneze, jako způsobu rozmnožování asexuálních hybridů, byla v rámci komplexu *C. taenia* poprvé navržena u biotypu *C. elongatoides* - *taenia* (Vasil'ev et al., 1989; Saat, 1991). Předpokládá se, že i ostatní hybridy komplexu se rozmnožují gynogeneticky. Podporují to následující skutečnosti: 1. hybridy nebyly nalezeny bez přítomnosti rodičovských druhů, 2. samice se nemohou rozmnožovat bez samců, 3. populace hybridů jsou tvořeny převážně triploidy a zahrnují téměř výhradně samice, (Saat 1991, Janko et al. 2007, Janko et al., in press), 4. alozymové analýzy jednotlivých vajíček neodhalily žádný důkaz hybridogeneze (K. Janko, nepublikovaná data).

Dostupná data ukazují, že všichni asexuální obratlovci jsou hybridního původu. Mezidruhové křížení může proto hrát významnou roli při vzniku klonálních linií (Dawley, 1989; Vrijenhoek et al., 1989). Hybridizující druhy mají vždy rozdělené role. Při křížení samice pocházejí z jednoho rodičovského druhu a samci z druhého (Wirtz, 1999). Výjimkou z tohoto pravidla jsou pouze dvě partenogenetické ještěrky, *Heteronotia binoei* (Moritz a Heideman, 1993) a *Lacerta uzzeli* (Fu et al., 2000), u kterých byla prokázána reciproká hybridizace. V rámci biotopu *C. elongatoides* - *tanaitica* bylo prokázáno, že jedinci vznikli spářením samic *C. elongatoides* se samci *C. tanaitica*. Naproti tomu u skupiny hybridů *C. elongatoides* - *taenia* předpokládáme reciprokou hybridizaci, protože u jedinců se objevuje mitochondriální DNA obou rodičovských druhů. Jedná se o první případ reciproké hybridizace mezi asexuálními obratlovci s reprodukcí závislou na přítomnosti spermií. Reciproká hybridizace u *C. elongatoides* - *taenia* dále naznačuje, že asexualita v komplexu *C. taenia* vznikla více než jednou (Janko et al., 2003).

Polyfyletický původ asexuálních linií rodu *Cobitis* odpovídá situaci ve většině komplexů asexuálních obratlovců s reprodukcí závislou na přítomnosti spermií (Avisé et al., 1992). Uvnitř komplexu *C. taenia* nebyla objevena žádná zřejmá omezení, která by zabraňovala vzniku asexuality. Ukazuje se, že asexuální linie vznikají často, v podstatě pokaždé, když jsou rodičovské druhy v reprodukčním kontaktu. Rozdíly nebyly pozorovány ani v genetické dispozici k hybridizaci mezi geograficky odlišnými populacemi (Janko et al., 2005a). Většina asexuálních linií tedy vznikla během

Holocénu hned několikrát, a to v odledněných oblastech, kde docházelo k častému reprodukčnímu kontaktu mezi rodičovskými druhy (Janko et al., 2005a). Nezávislý vícenásobný vznik těchto asexuálních obratlovců podporuje i rozmanitost klonů, která usnadňuje jejich společnou existenci se sexuálními předky, na něž jsou způsobem rozmnožování vázání (Vrijenhoek, 1979).

Hybridní linie mají značný areál rozšíření. Nacházíme je téměř v celé oblasti výskytu rodičovských druhů a navíc i v lokalitách, kde se původní rodičovské druhy samostatně nevyskytují. *Cobitis elongatoides* - *tanaitica* se bez přítomnosti rodičovských druhů nachází v oblasti jižní Ukrajiny a v řece Rýn, *C. elongatoides* - *taurica* na jihu Ukrajiny (Janko et al. 2005, Janko et al., in press). V obou případech hybridním samicím slouží při reprodukci jako hostitelský druh *C. taenia*, žijící na dané lokalitě. Často se zde pak vyskytují triploidní, trihybridní jedinci s genomem *C. taenia*, inkorporovaným do původního hybridního genomu (Janko et al., in press).

Vedle polyfyletického původu může ke vzniku diverzity hybridů přispívat i fertilizace klonálních vajíček, jejímž výsledkem je potomstvo s vyšší ploidií.

2.2.2 Polyploidie

Polyploidie je běžná mezi asexuálními obratlovci a významně ovlivňuje osud asexuálních linií. Napomáhá jejich stabilizaci (Moritz et al, 1989), zároveň je však mutační rychlost polyploidního genomu vyšší než u diploidů a jsou tedy vystaveni větší mutační zátěži (Kondrashov, 1997).

Janko et al. (2003) zaznamenali šest triploidních hybridů *C. elongatoides* - *taenia* a jednoho *C. elongatoides* - *tanaitica*, jejichž mitochondriální DNA pocházela od toho z rodičů, který se na jejich genomu podílel jednou chromozomovou sadou. Tito jedinci vznikli mechanismem oplození neredukovaných samičích gamet, produkovaných F1 hybridy při gynogenezi (Schultz, 1969). Například pokud při primární hybridizaci dochází ke křížení samice *C. elongatoides* se samcem *C. tanaitica*, vzniklí hybridi budou vlastnit mitochondriální DNA obsaženou ve vajíčku – od *C. elongatoides*. Inkorporace třetího genomu do genomu hybrida jeho mitochondriální DNA neovlivní. V uvedeném případě tedy může dojít k inkorporaci

třetího genomu od druhu *C. tanaitica*, vzniklí hybridní jedinci *C. Ielongatoides* – *2tanaitica* budou mít mitochondriální DNA druhu *C. elongatoides*. Naproti tomu při oplození neredukovaných vajíček náhodně vznikajících u sexuálně se rozmnožujících druhů, jak navrhovali Richards a Nace (1977) a Moritz et al. (1989), by totiž mitochondriální DNA musela být odvozena pouze od toho druhu, který slouží jako donor vajíček a který se tím pádem podílí na genomu triploidů dvěma chromozomovými sadami. Oplození haploidního vajíčka diploidní spermií je nepravděpodobné, kvůli nízké schopnosti diploidních spermií splynout s vajíčkem v důsledku jejich větší velikosti a nižší pohyblivosti (Chourrout et al., 1986). Dalším důvodem je i sterilita vzácně se vyskytujících hybridních samců, kteří by byli nejpravděpodobnějšími producenty diploidních spermií (Vasil'ev et al., 1989).

Ke vzniku triploidních forem dochází tedy v důsledku vysokého poměru fertilizace diploidních samičích gamet produkovaných hybridy při gynogenezi (30-70%). Jejich třetí genová sada závisí na dostupném dárci spermií. V lokalitách vzdálených od původních kontaktních zón triploidů nahradili své diploidní předky. Tvoří smíšené populace s tím rodičovským druhem, který do jejich genomu přispěl dvěma sadami chromozomů. Morfologické analýzy *C. elongatoides*, *C. taenia* a jejich hybridů, ukazují fenotypovou podobnost triploidů s tím rodičovským druhem, který převládá v jejich genomu (J. Kotusz, nepublikovaná data). Tento jev jim může nabízet lepší sexuální mimikry a zvyšovat tak jejich šanci ke spáření (Beukeboom a Vrijenhoek, 1998). Pozdější selekce se bude klonit k jedincům, kteří lépe splývají se sympatricky se vyskytujícím druhem.

Mimo triploidních jedinců, jejichž genom je tvořen dvěma druhy, byly nalezeny i trihybridní formy. Ty vznikly oplozením diploidního vajíčka hybrida spermií druhu, který nebyl zahrnutý v původní hybridizaci a ke kterému se hybridní formy přidružily, aby se mohly rozšiřovat i bez primárních rodičovských druhů (Janko et al., 2005a).

Výskyt tetraploidních forem je v komplexu *C. taenia* poměrně vzácný. Tetraploidní formy s největší pravděpodobností vznikly jako odnože triploidních linií, navíc podle analýz mitochondriální DNA nemají dlouhodobý charakter (Janko et al., 2005a). Mezi tetraploidy jsou zastoupena obě pohlaví, výskyt samců však není příliš hojný (Vasil'ev et al., 1990; Bohlen a Ráb, 2001). Reprodukční pokusy ukázaly, že tetraploidní samci mají sníženou schopnost oplodnit nebo stimulovat samičí gamety

(Vasil'ev et al., 1990, 2003). Zdá se proto, že nehráli významnou roli v evoluci asexuálního komplexu.

2.2.3 Diverzita biotypů komplexu *C. taenia*

V dalším textu haploidní genom *C. taenia* označuji T, *C. elongatoides* E, *C. tanaitica* N, *C. taurica* C, *C. strumicae* S.

Diploidní formy:

Diploidní formy komplexu *C. taenia* tvoří deset rozdílných biotypů. Zahrnují sedm druhů a tři hybridní biotypy s jasným geografickým vymezením. Diploidní hybridní biotypy se vyskytují vždy v blízkosti rodičovských druhů. Vznikají v zónách reprodukčního kontaktu mezi rodičovskými druhy nezávisle na sobě vícekrát, odtud se pak dále rozšiřují. I když ve většině populací převládají triploidy, jsou diploidní hybridy běžní na některých lokalitách v Odře a Labi (Bohlen et al., 2002) V populacích jednotlivých druhů se objevují jedinci obou pohlaví, zatímco hybridní biotypy tvoří většinou pouze samice.

Cobitis taenia Linnaeus, 1758, (TT) se vyskytuje na většině území střední Evropy (Bohlen a Ráb, 2001). Populace tohoto druhu jsou rozšířeny od západu na východ od pobřeží Atlantského oceánu až do povodí řeky Volha, na severu od jižního Švédska a Finska až k ukrajinskému pobřeží Černého moře na jihu. Zřejmě chybí v povodí Dunaje (Janko et al., 2005a; Culling et al., 2005).

Populace *C. elongatoides* Bacescu et Maier, 1969, (EE) jsou známy z povodí Dunaje a horních toků řek Labe a Odra. Jižní hranicí výskytu je bulharská řeka Kamčija. Populace tohoto druhu se nevyskytují v pravých přítocích dolního toku Dunaje, řekách Vit a Jantra (Ráb et al., 2000; Freyhof et al., 2000). Od *C. taenia* se odlišuje v pěti alozymových lokusech (příloha I, tabulka 1), a to GPI-A, SOD, sAAT, sMDH-A, GPI-B (Šlechtová et al., 2000). Nikdy nebyli zaznamenáni hybridy, kteří by neměli nejméně jednu kopii genomu *C. elongatoides*.

Cobitis tanaitica Bacescu et Maier, 1969, (NN) byl zaznamenán v dolním toku Dunaje, v regionu Dobrudža (pobřežní část Rumunska a severního Bulharska), v horní Odře, v Dněpru a v řece Don (Šlechtová et al., 2000; Janko et al., 2003, 2005b). Jeho

areál zahrnuje celý severní okraj Černého moře. Tato forma sdílí alozymové alely s *C. taenia*, pouze její populace z Dunaje, Odry a regionu Dobruďa mají rozdílnou alelu pro sMDH-A (Tabulka 1).

V řece Chernaya na poloostrově Krym byla objevena forma označená jako *C. spec. Crimea* (Vasil'ev, 1995), která byla později popsána jako *C. taurica* Vasil'eva, Vasil'ev, Janko, Ráb et Rábová, 2005, (CC). Další populace se stejným karyotypem byly zaznamenány v řekách Jižní Bug (Ukrajina) a Veleka (jižní Bulharsko), i když jejich zařazení ke *C. taurica* díky morfologické odlišnosti od populací z poloostrova Krym může být sporné (Janko et al., 2005b). To vedlo recentně Vasil'eva a Vasil'ev (2006) k popsání populací z řek Veleka a Jižní Bug jako nový druh *C. pontica*. Nicméně, populace ze zmíněných tří lokalit se od ostatních členů komplexu liší unikátní strukturou karyotypu. Navíc jsou i dobře morfologicky odlišitelné podle pigmentace. Naproti tomu ve všech sledovaných alozymových lokusech jsou nerozeznatelné od *C. taenia* (příloha I, tabulka 1), i přes to, že se tyto dva druhy nacházejí v těsném sousedství, nebyl odhalen žádný případ hybridizace. To by ukazovalo na jejich reprodukční izolaci.

Cobitis elongata Heckel a Kner, 1858, je rozšířen v horních přítocích středního a horního Dunaje (Povž a Šumer 2000, Ivanova et al. 2003, Šlechtová et al. 2003) a jako jediný druh z celého komplexu netvoří hybridy.

Dalším druhem komplexu, široce rozšířeným v Bulharsku, části Řecka a Turecku je *C. strumicae* Karaman, 1955, (SS). *Cobitis strumicae* patří k jiné fylogenetické linii než ostatní druhy komplexu, do skupiny *Bicanestrinia* (Bohlen et al., 2006). Rozšířil se z poloostrova Malá Asie na Balkánský poloostrov. Některé bulharské přítoky Dunaje a bulharská část povodí Černého moře tvoří jedinou oblast, na které se překrývá výskyt tohoto druhu s ostatními druhy *Cobitis* z Dunaje. V Bulharsku se vyskytuje v řece Kamčija a v pravých přítocích dolního toku Dunaje, řekách Vit a Jantra (Bohlen et al., 2006). Tento druh má nejasné názvosloví, bývá označován i jako *C. albicoloris*. Od ostatních druhů se liší ve všech sledovaných alozymových lokusech (příloha I, tabulka 1).

Cobitis melanoleuca Nichols, 1925, byl zaznamenán pouze v řece Volha, hojně je zastoupen v Asii a Rusku (Vasil'ev et al., 1989). Tento druh je také fylogeneticky vzdálený ostatním druhům hybridního komplexu *C. taenia* (Bohlen et al., 2006).

Hybridní biotyp *C. 1taenia* – *1elongatoides* (ET) je rozšířený v Labi, Odře a v řece Weser, kde se zároveň vyskytují oba nebo alespoň jeden z rodičovských druhů.

V dolním toku Dunaje byl pozorován jeden jedinec formy *C. 1elongatoides* - *1tanaitica* (EN). V tomto úseku jsou zastoupeny oba rodičovské druhy.

V řece Kamčija byl objeven jedinec diploidního biotypu *C. 1elongatoides* - *1strumicae* (ES).

Mozaika:

Pomocí průtokové cytometrie byla určena jedna diploid - triploidní mozaika, samice v potoce Pšovka, přítoku Labe. Byla určena jako hybrid mezi *C. elongatoides* a *C. taenia* (ET/EET).

Triploidní formy:

Pozorování triploidní jedinci byli ve většině případů samice, pouze Bohlen et al. (2002) uvádí několik triploidních samců z Labe a Odry.

Mezi triploidními hybridy s genomem *C. elongatoides* a *C. taenia* se vyskytují dva typy - *Cobitis 1elongatoides* - *2taenia* (ETT) a *C. 2elongatoides* - *1taenia* (EET). Formy EET tvoří smíšené populace společně s *C. elongatoides*, ETT společně s *C. taenia*. Obě najdeme v celém areálu výskytu hostitelských druhů kromě Anglie a Švédska.

Podobně i u hybridních biotypů s genomem *C. elongatoides* a *C. tanaitica* najdeme oba typy – *C. 1elongatoides* - *2tanaitica* (ENN), *C. 2elongatoides* - *1tanaitica* (EEN). Forma EEN tvoří smíšené populace s *C. elongatoides* v povodí Dunaje a v horní části Odry, zatímco v povodí řek Vistula a Jižní Bug se nachází společně s *C. taenia*. Biotyp ENN žije, společně s *Cobitis tanaitica*, v jezerech Sinoe a Razelm (Rumunsko).

Navíc byly objeveny triploidní formy, jejichž genom je složen z genomu tří druhů. Jedinci s genomem *C. elongatoides*, *C. tanaitica* a *C. taenia* (ENT) byli nalezeni v řece Rýn. Forma s genomem *C. elongatoides*, *C. taurica* a *C. taenia* (ECT) se nachází v řece Jižní Bug. V řece Jantra to je biotyp s genomem od *C. elongatoides*, *C. tanaitica* a *C. strumicae* (ENS).

Tetraploidní formy:

Tetraploidní formy jsou vzácné ve všech lokalitách vyjma řeky Moskva, vykazují však velkou variabilitu genotypu. Byly pozorovány hybridní biotypy EEET

(Ráb et al., 2000), EETT (Boron a Danilkiewicz, 1998), ETTT, EEEN, EETM (Vasil'ev et al., 1989).

2.2.4 Biogeografie rodu *Cobitis* v Bulharsku

Podle dostupných údajů, téměř všechny bulharské řeky s výjimkou severozápadu a jihovýchodu území osidluje druh *C. strumicae*, fylogeneticky řazený do skupiny Bicanestrinia, která pochází z Anatólie (Bohlen et al. 2006). Tento druh tedy rovněž pronikl do oblasti jižních přítoků Dunaje. Zde se předpokládá kontakt s hybridním komplexem *C. taenia* ze severu, geograficky zastoupeným formami *C. elongatoides*, *C. tanaitica* a hybridními biotypy (Bohlen et al. 2006, Janko et al., in press.). *Cobitis elongatoides* byl na území Bulharska zaznamenán pouze jedním jedincem z černomořské řeky Kamčija, syntopicky s *C. strumicae* a překvapivě hybridním jedincem mezi oběma druhy (Janko et al., in press.) Jediným dokladem o kontaktu gynogenetických biotypů s *C. strumicae* je smíšená populace tří trihybridů *C. elongatoides – tanaitica - strumicae* s tímto druhem z řeky Jantra (Janko et al., in press). Pro úplnost, černomořskou řeku Veleka obývá další druh sekavce *C. taurica*, nově pojmenován jako *C. pontica* (Vasil'eva et al. 2006). Posledním zástupcem je sekavec *C. elongata* známý z dunajských přítoků Jantry a Vitu (Ivanova et al. 2003, Šlechtová et al. 2003), u kterého, podobně jako u předchozího druhu, nebyla pozorována hybridizace.

3. Metodika

3.1 Odlov ryb a zpracování vzorků

Pomocí elektrolovu a ruční sítě bylo v letech 2005-2006 na 12 lokalitách v Bulharsku a 1 lokalitě v Rumunsku odchyceno celkem 151 ryb rodu *Cobitis* (viz příloha II a příloha V, obrázek 1). Populace byly vybrány se snahou co nejlépe pokrýt dosud nevzorkovanou oblast Bulharska a zmapovat výskyt jednotlivých biotopů v dané oblasti.

3.2 Elektroforetické studium alozymů

Elektroforéza je první široce použitelná metoda studia genetické proměnlivosti. Je založena na pohybu makromolekul v elektrickém poli. Elektroforetické studium alozymů umožňuje identifikaci proteinového polymorfismu a srovnání jejich rozdílností v pohyblivosti v elektrickém poli.

Výhodou metody je její metodická jednoduchost, relativně nízká finanční nákladnost a snadné vyhodnocování výsledků. Hlavní nevýhodou využití alozymů jako markerů je možnost, že produkty určitého lokusu u dvou různých populací, které mají stejnou elektroforetickou pohyblivost, nemusejí být vždy produktem stejných alel, a tedy nemusejí být důkazem příbuznosti těchto populací. Může jít o produkty různých alel, jejichž shodná primární struktura (a tedy i elektroforetická pohyblivost) je důsledkem konvergentního vývoje (Kocher a Stepien, 1997). Další možný důvod shodné pohyblivosti může být stejný celkový elektrický náboj proteinu za daných podmínek elektroforézy i při různé primární struktuře molekuly.

V mojí práci byla pro analýzu proteinových markerů použita klasická metoda využívaná v současné době v populačně-genetických studiích nižších obratlovců - horizontální škrobová elektroforéza. Tato metoda má od sedmdesátých let velký

význam zejména v molekulární populační genetice ryb a pravděpodobně ještě nějaký čas bude hrát důležitou roli při popisu vnitrodruhové diversity u ryb.

3.2.1 Postup elektroforézy

3.2.1.1 Příprava vzorků

Před samotnou analýzou bylo ke každému vzorku svalové tkáně o hmotnosti 0,1 až 0,2 gramu přidáno určité množství extrakčního pufru (0,1 mol.l⁻¹ Tris.HCl pH 8,2 - Valenta et al., 1971), vždy v poměru 2:1 (objem pufru: hmotnost vzorku). Následně byly vzorky homogenizovány laboratorním homogenizátorem v ledové lázni a vzniklý homogenát odstředěn v centrifuze (4°C, 11 000 rpm, 20 min.). Takto získané tkáňové extrakty byly dále analyzovány.

Při analýze vajíček byly vzorky pouze rozmrazeny. Vajíčka byla analyzována jednotlivě, v počtu 16 až 28 vajíček od 22 samic ze 7 lokalit v Bulharsku.

3.2.1.2 Elektroforéza na škrobovém gelu

Enzymy byly děleny horizontální elektroforézou (VN zdroj, Vývojové dílny ČSAV) v 9% škrobovém gelu. Ten vznikl smísením 37,08g (40,44g) hydrolyzovaného škrobu a 300ml (400ml) příslušného gelového pufru (příloha III, Tab.3) ve vakuové zábrusové baňce s kulatým dnem. Údaje v závorkách udávají množství potřebná pro vznik gelů o mocnosti 6mm.

Směs byla za stálého míchání ve vodní lázni ohřátá na 85°C a odvzdušněna vodní vývěvou. Gel byl nalit do skleněných forem o rozměrech 260 x 120 x 4 (6) mm. Po ztuhnutí byly do štěrbin, rozříznuté v gelu napříč 3,5 cm od okraje formy, nasazeny na chromatografických papírcích Whatman W3MMChr (5,5 x 7 mm) extrakty z homogenizovaných tkání v množství 11 kusů / gel a provedena elektroforéza. Při analýze jiker spočívala jediná odlišnost metodiky v tom, že vzorky nebyly homogenizovány, ale pomocí párátko byly nasazovány jednotlivé jikry, a to vždy po jedné na každý papírek. Pro kontrolu, zda elektroforéza běží správně, byla k některým vzorkům přidána bromfenolová modř (BFB), která putuje směrem k anodě rychleji než proteiny. Elektroforéza probíhala za teploty 5 °C v chladničce.

3.2.1.3 Barvení specifických proteinů

Po skončení elektroforézy byl každý gel horizontálně rozříznut na 2 vrstvy o tloušťce 2mm (3 vrstvy pokud se jednalo o 6mm silný gel), z nichž každá byla použita

k barvení jiného enzymového systému metodou probarvování agarové vrstvy (Valenta et al., 1971). Analyzováno bylo 6 enzymových systémů, což představovalo produkty, jejichž syntéza byla řízena z 8 lokusů (příloha III, tabulka 4). Při studiu jiker byly analyzovány pouze systémy Gpi-A, Pgm, sAat, sMdh-A.

Alozymy byly detekovány pomocí standardních chromogenických metod (složení barvicích roztoků v příloze III). AK, GPI, PGM byly barveny dle Pasteura et al. (1987), MDH, LDH podle Valenty et al. (1971), AAT dle Harrise a Hopkinsona (1976). Vzhledem k efektu tzv. elektrodekantace, při kterém se s postupujícím časem proteiny o vysoké molekulové hmotnosti „propadají“ na spodní stranu gelu, což může způsobit jejich slabou či nedostatečnou koncentraci v horních vrstvách, byly pro slaběji se barvicí proteiny (MDH, LDH) použity spodní části gelů.

3.2.1.4 Vyhodnocování elektroforeogramů

Každý obarvený gel byl vyfotografován, elektromorfy zakresleny a obarvený agarózový gel sloupnut na filtrační papír, usušen, vylisován a i s podkladem nalepen do protokolu vedle nákresu. Označení lokusů a alel sledovalo doporučení Shaklee et al., (1990).

3.3 Určení ploidie

Analýza ploidie sekavcovitých ryb rodu *Cobitis* byla provedena pomocí průtokové cytometrie (flow cytometry, FCM). Je to jedna z nejcitlivějších metod měření obsahu buněčné DNA (Birstein et al., 1993). Tato technika zahrnuje analýzu fluorescence a využívá vlastnosti rozptylu světla z jednotlivých částic vzorku během jejich průtoku nitrem jehly cytometru.

3.3.1 Průtoková cytometrie

K měření byl použit dvoustupňový DNA kit na svalovou tkáň uchovanou v 96% ethanolu. První stupeň slouží k rozrušení buněčných membrán, v druhém stupni následně dojde k obarvení buněčné DNA fluorescenčním barvivem.

Svalová tkáň (25 mm³) byla pomocí nůžek rozmělněna na hodinovém sklíčku v 0,5 ml fyziologického roztoku. Poté bylo přidáno 200 µl DAPI Solution A a suspenze byla inkubována v pokojové teplotě. Po 10 minutách byla suspenze přefiltrována přes

30 μ l filtr do zkumavky a společně s 1000 μ l DAPI Solution B protřepána na třepače. Po dalších deseti minutách inkubace v pokojové teplotě mohlo proběhnout vlastní měření na průtokovém cytometru. Před každým měřením byly jednotlivé vzorky ještě krátce protřepány a teprve potom analyzovány na Partec CCA 1 průtokovém cytometru (Partec GmbH, Německo). Proud kapaliny nasávající vzorek k měření procházel přístrojem rychlostí 3 μ l/s.

K určení relativního obsahu DNA ryb s neznámou ploidií byl nejdříve použit vzorek z diploidního jedince jako standard, podle něhož byla výchozí hodnota pro diploida nastavena na číslo 50. Ostatní vzorky v této studii byly vyhodnocovány podle nastavené hodnoty, a tedy číslo pro triploida bylo 75 a tetraploida 100. Přesnost měření je vyjádřena koeficientem variace (CV%).

3.4 Vyhodnocování dat

Výsledná data byla získána kombinací obou metod – studie alozymů a určení ploidie pomocí průtokového cytometru. Při analýze ploidie se pomocí průtokové cytometrie nepodařilo získat data pro velkou část vzorků, 118 z celkových 139 analyzovaných. Pravděpodobně kvůli špatné fixaci v terénu byly některé vzorky neměřitelné. V těchto případech bylo složení genomu a ploidie stanoveno pomocí gene - dose efektu (Vrijenhoek, 1975) na elektroforeogramu. Metoda gene - dose efektu je založena na pozorování, že v případě triploidního hybridu by produkty genomu, vyskytujícího se ve dvou kopiích, měly být dvakrát koncentrovanější, než produkty genomu přítomného v jediné kopii. U tetraploida by produkty genomu, vyskytujícího se ve třech kopiích, měly být třikrát koncentrovanější, než produkty genomu s jedinou kopií.

4. Výsledky

Celkem bylo analyzováno 151 ryb rodu *Cobitis* z 12 lokalit v Bulharsku a 1 lokality v Rumunsku (příloha II). Ze zkoumaných vzorků jich bylo 12 neaktivních.

Z jednotlivých druhů byly zaznamenány druhy *C. elongatoides*, *C. tanaitica*, *C. strumicae* a na jedné lokalitě samostatně se vyskytující *C. elongata*. Dále byly pozorovány hybridní biotypy EN, EEN, ENN, ENS a vůbec poprvé i biotypy EEN/EENS, ENSS, EENS. Nejčastěji se vyskytovaly triploidní biotypy.

4.1 Distribuce alel a jejich kombinace

Celkem bylo analyzováno 6 enzymových systémů kódovaných 8 strukturálními genovými lokusy (příloha III, tabulka 4). Všechny lokusy byly polymorfni (vykazovaly více než jednu alelu). Výsledky analýzy alozymů jsou shrnuty v příloze IV, tabulka 5.

Gpi A: V lokusu *Gpi A* bylo zjištěno 7 alel a byly označeny jako 050, 060, 074, 080, 087, 100, 113. Vzorky *C. tanaitica* vykazovaly homozygotnost pro alelu 087. U *C. elongatoides* se vyskytovaly alelové kombinace 100/100, 113/113 a 100/113. Vzorky *C. strumicae* sdílely kombinace alel 050/060, 050/074, 050/080, 060/060, 060/074, 060/080, 074/074, 074/080, 080/080. Pro *C. elongata* byly zaznamenány kombinace 074/080 a 080/080. Hybridní biotypy představovaly různé kombinace alel rodičovských druhů. Diploidní biotyp EN vykazoval kombinace 087/100 a 087/113. Triploidní hybridní biotyp EEN vlastnil alely 087/100/100, 087/100/113, 087/113/113. Kombinace alel pro ENN byly 087/087/100 a 087/087/113. Trihybridi ENS měli alely 080/087/100, 080/087/113, 060/087/113, 060/087/100. Dvě analyzované mozaiky EEN/EENS vlastnily alely 060/087/100/113 a 080/087/100/100. Pozorování tetraploidi EENS sdíleli kombinace 080/087/113/113, 080/087/100/113 a ENSS kombinace 060/080/087/100 a 074/080/087/100.

s-Aat: V lokusu *s-Aat* bylo detekováno 5 alel, označeno jako 071, 085, 087, 095, 100. Pro *C. tanaitica* byla druhově specifická homozygotní kombinace 071/071.

U vzorků *C. elongatoides* se vyskytovaly alely 085/085, 085/100 a 100/100. *Cobitis elongata* byl homozygotní pro 095/095. Vzorky *C. strumicae* sdílely kombinace 087/087, 087/095, 087/100, přičemž fenotyp 087/087 byl zaznamenán nejčastěji. U hybridního biotypu EN se vyskytovala alelová kombinace 071/100. Biotyp ENN vykazoval pouze kombinaci 071/071/100. Naproti tomu u biotypu EEN byly přítomny kombinace 071/085/100, 071/087/100, 071/100/100. Trihybridi ENS vlastnili alely 071/100/100, 071/087/100, 071/087/087, 071/085/100. Triploid tetraploidní mozaiky EEN/EENS měly v *s-Aat* alely 071/100/100 a 071/087/100/100. Kombinace 071/087/087/087, 071/087/087/100 byly zaznamenány u biotypu ENSS. Jedinci tetraploidního biotypu EENS sdíleli kombinace 071/087/100/100 a 071/085/087/100.

s-Mdh A: V lokusu *s-MDH A* byly zjištěny 4 alely, a to 060, 064, 070, 100. Pro *C. strumicae* byla druhově specifická homozygotní alela 064. U vzorků *C. tanaitica* byly zaznamenány homozygotní alelové kombinace 060/060 a 100/100. Analyzované vzorky *C. elongatoides* sdílely kombinace 060/070, 060/100, 070/100, 100/100. Vzorky *C. elongata* měly homozygotní alelu 100. U biotypu EN se vyskytovaly alelové kombinace 060/100 a 100/100. Pro biotyp ENN byla známa pouze kombinace 100/100/100, kterou sdílel společně s biotypem EEN. Ten měl navíc ještě i kombinace 060/100/100, 060/070/100, 070/100/100. Alelové kombinace 064/070/100, 064/100/100, 060/064/100, 060/100/100 byly zaznamenány pro trihybridy ENS. Obě mozaiky EEN/EENS sdílely kombinaci 060/064/100. U tetraploidních biotypů byla pro každý z nich zaznamenána pouze jediná kombinace, a sice 064/064/100/100 u ENSS a 064/100/100/100 u EENS.

Ldh A: V lokusu *Ldh A* byly zaznamenány dvě alely, označeny 100 a 200. Alela 100 byla přítomná v homozygotním stavu u všech druhů. Pouze u *C. strumicae* byly navíc zaznamenány kombinace 100/200 a 200/200. Téměř všechny hybridní biotypy byly homozygotní pro alelu 100, výjimkou byly 3 vzorky biotypu ENS s kombinací 100/100/200.

Ldh B: V lokusu *Ldh B* byly detekovány dvě alely – 100 a 102. Alela 102 byla v homozygotním stavu fixována pro *C. strumicae*. Všechny ostatní druhy vykazovaly homozygotní alelu 100.

Gpi B: V tomto lokusu byly zaznamenány dvě alely – 100 a 200. Alela 200 byla zaznamenána pouze u některých vzorků na lokalitě 11 - u 2 vzorků *C. strumicae*

v kombinaci 100/200, u 3 vzorků biotypu ENS v kombinaci 100/100/200. Ve všech ostatních případech druhy i hybridní biotypy sdílely homozygotní alelu 100.

Pgm: V lokusu *Pgm* byly zaznamenány alely 090, 100 a 108. Alelová kombinace 090/090 byla fixována pro *C. elongata*, kombinace 108/108 pro *C. strumicae*. *C. elongatoides* a *C. tanaitica* vykazovaly fenotyp 100/100. Hybridní biotyp ENS měl kombinaci alel 100/100/108, EENS kombinaci 100/100/100/108 a ENSS 100/100/108/108. Ostatní hybridní biotypy byly homozygotní pro alelu 100.

AK: Pro lokus *AK* byly detekovány alely 070 a 100. Homozygotní alela 070 byla specifická pro *C. strumicae*. Alelu 100 v homozygotním stavu sdílely ostatní druhy. Všechny hybridní biotypy s genotypem *C. strumicae* měly heterozygotní kombinaci alel – 070/100/100 v případě ENS, 070/100/100/100 v případě EENS a 070/070/100/100 v případě biotypu ENSS. Ostatní hybridní biotypy vlastnily homozygotní alelu 100.

4.2 Diverzita biotypů

Zastoupení jednotlivých biotypů na zkoumaných lokalitách je uvedeno v souhrnné tabulce 5, příloha IV. Grafické znázornění lokalit s příslušnými biotypy je vyobrazeno na obrázku 1 v příloze V.

Rodičovské druhy

Z jednotlivých druhů byly pozorovány druhy *C. elongatoides*, *C. tanaitica*, *C. strumicae*, *C. elongata*. Druh *C. elongata* se vyskytoval pouze samostatně na lokalitě 10 v Bulharsku. Ostatní druhy se vyskytovaly buďto samostatně, anebo častěji ve smíšených populacích s hybridními biotypy.

Hybridní biotypy

Bylo zaznamenáno celkem 7 hybridních biotypů, jejichž genom byl složen z haploidních sad druhů *C. elongatoides*, *C. tanaitica* a *C. strumicae*.

Diploidní hybridní biotyp EN byl analýzou alozymů zjištěn na 4 lokalitách v Bulharsku (lokality 1, 3, 6, 11) a dále na lokalitě 13 z Rumunska, v celkovém počtu 16 jedinců.

Triploidní biotypy byly objeveny tři – EEN, ENN a ENS. Biotyp EEN byl zjištěn na 4 lokalitách v Bulharsku (lokality 3, 5, 7, 11), 15 jedinců, a dále byli zaznamenáni 4 jedinci na lokalitě 13 v Rumunsku. Dva jedinci formy ENN byli určeni na lokalitě 1 v Bulharsku, na lokalitě 13 v Rumunsku bylo objeveno 12 jedinců. Trihybridní biotyp ENS byl detekován na 4 lokalitách v Bulharsku (lokality 2, 4, 7, 11). Ve všech smíšených populacích, kde byl zaznamenán, se vyskytoval společně s jedinci druhu *C. strumicae*. S celkovým počtem 22 jedinců byl zároveň nejpočetnějším pozorovaným hybridním biotypem.

Na dvou lokalitách v Bulharsku (lokality 2 a 7) se vyskytovaly dvě triploid – tetraploidní mozaiky EEN/EENS. Na stejných lokalitách byli zároveň zaznamenáni i triploidní hybridi ENS.

Analýzou byly zjištěny dva tetraploidní biotypy s genomovým složením EENS a ENSS. Na lokalitě 11 v Bulharsku se vyskytovali společně, od každého biotypu zde byli zaznamenáni dva jedinci. Jeden jedinec s genomem ENSS byl navíc zaznamenán ještě na bulharské lokalitě 4. Na obou lokalitách se tetraploidní hybridi objevovali společně s triploidním biotypem ENS.

4.3 Klonální diverzita jednotlivých biotypů

V rámci každého biotypu bylo zaznamenáno několik klonálních forem s různými alelovými kombinacemi v jednom i více lokusech.

Pro hybridní biotyp EN byly detekovány tři fenotypové formy, lišící se v lokusech Gpi A a s-Mdh A (tabulka 1). V ostatních lokusech formy sdílely shodné alelové kombinace.

Tabulka 1: klonální diverzita biotypu EN

Klon EN	N	Gpi A	s-Mdh A	s-Aat	Ldh-A	Ldh-B	Gpi-B	Pgm	AK
1	7	087100	100100	071100			100100		
2	6	087113	100100						
3	3	087100	060100						

N počet jedinců

V této i následujících tabulkách je každá alela je definována trojčiferným číslem, kombinace alel jsou zapsány bez mezer.

Pro hybridní biotyp ENN byly popsány dvě klonální formy, lišící se pouze v lokusu Gpi A (tabulka 2). Ve všech ostatních lokusech se jejich fenotyp shodoval.

Tabulka 2: klonální diverzita biotypu ENN

Klon ENN	N	Gpi A	s-Aat	s-Mdh A	Ldh-A	Ldh-B	Gpi-B	Pgm	AK
1	12	087087100	071071100						
2	2	087087113							

Biotyp EEN se, podle alelových kombinací v lokusech Gpi A, s-Aat a s-Mdh A, dělí do devíti klonálních forem (tabulka 3). V lokusech Ldh-A, Ldh-B, Gpi-B, Pgm, AK formy sdílely shodné alely.

Tabulka 3: klonální diverzita biotypu EEN

Klon EEN	N	Gpi A	s-Aat	s-Mdh A	Ldh-A	Ldh-B	Gpi-B	Pgm	AK
1	3	087100113	071085100	100100100					
2	1	087100100	071085100	100100100					
3	1	087113113	071100100	100100100					
4	1	087100100	071100100	060100100					
5	2	087100100	071100100	100100100					
6	7	087100100	071085100	060100100					
7	2	087100113	071100100	060070100					
8	1	087100100	071100100	070100100					
9	1	087113113	071085100	100100100					

Trihybridní biotyp ENS zahrnoval 10 klonálních forem, členěných podle rozdílných alelových kombinací až ve čtyřech lokusech – Gpi A, s-Aat, s-Mdh A, Ldh A (tabulka 4).

Tabulka 4: klonální diverzita biotypu ENS

Klon ENS	N	Gpi A	s-Aat	s-Mdh A	Ldh-A	Ldh-B	Gpi-B	Pgm	AK
1	1	060087 113	071087 100	064100 100	100100 200	100100 102	100100 100	100100 108	070100100
2	1	080087 100	071087 100	060100 100	100100 100				
3	3	080087 113	071087 100	064100 100	100100 100				
4	1	080087 100	071085 100	064100 100	100100 100				
5	2	080087 100	071087 100	064070 100	100100 100				
6	5	080087 100	071087 100	064100 100	100100 100				
7	3	080087 100	071100 100	064100 100	100100 100				
8	1	080087 113	071087 100	060064 100	100100 100				
9	4	060087 100	071087 087	060064 100	100100 200				
10	1	080087 100	071087 100	064100 100	100100 200				

Dvě triploid – tetraploidní mozaiky EEN/EENS se navzájem odlišovaly v lokusech Gpi A a s-Aat (tabulka 5).

Tabulka 5: klonální diverzita biotypu EEN/EENS

Klon EEN/EENS	N	Gpi A	s-Aat	s-Mdh A	Ldh-A	Gpi-B	Pgm	AK
1	1	080087100 100	071087100 100	060064100	100100100	100100 108	070100 100	
2	1	060087100 113	071100100					

U tetraploidního hybridního biotypu EENS byly pozorovány dvě klonální formy, navzájem se také lišící v lokusech Gpi A a s-Aat (tabulka 6).

Tabulka 6: klonální diverzita biotypu EENS

Klon EENS	N	Gpi A	s-Aat	s-Mdh A	Ldh-A	Ldh-B	Gpi-B	Pgm	AK
1	1	080087 113113	071087 100100	064100 100100	100100100100			100100 100108	070100100 100
2	1	080087 100113	071085 087100						

U posledního z nalezených biotypů, ENSS, byli jedinci podle alelových kombinací v lokusech Gpi A a s-Aat rozděleni do tří fenotypových skupin (tabulka 7).

Tabulka 7: klonální diverzita biotypu ENSS

Klon ENSS	N	Gpi A	s-Aat	s-Mdh A	Ldh-A	Ldh-B	Gpi-B	Pgm	AK
1	1	060080 087100	071087 087100	064064 100100	100100 100100	100100 102102	100100 100100	100100 108108	070070 100100
2	1	074080 087100							
3	1	060080 087100	071087 087087						

4.4 Genetická analýza vajíček

Analýze byly podrobeny samičí gamety 22 jedinců ze 7 lokalit – lokality 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11 - v rozmezí počtu 16 až 28 vajíček od každé samice, podle množství dostupného materiálu. Výsledky byly porovnávány s daty získanými analýzou somatické tkáně mateřských jedinců a shrnuty do tabulky 6 v příloze IV. Cílem byla snaha ověřit produkci klonálních vajíček, případně zaznamenat redukci genomu. Analyzovány byly 4 enzymové systémy (Gpi A, s-Aat, s-Mdh A a Pgm). Lokus Pgm však nebyl zahrnut do výsledků kvůli nízké aktivitě a variabilitě vzorků.

U diploidních a triploidních jedinců, ať už druhů nebo hybridů, se genotyp somatických tkání a vajíček zcela shodoval. Vyjímkou byly dvě triploid – tetraploidní mozaiky, u jejichž vajíček byla pozorována redukce ploidie a chyběla u nich alela, která se jinak objevovala ve svalové tkáni. V případě jedné mozaiky byly v somatické tkáni

mateřského jedince detekovány alelové kombinace v lokusu Gpi A 060/087/100/113 a v lokusu s-Aat 071/100/100, lokus s-Mdh A se jevil jako neaktivní, zatímco analýzou jednotlivých vajíček byly zjištěny kombinace 087/100/113 v lokusu Gpi A, 071/100 a 071/100/100 v s-Aat, 060/070 v s-Mdh A. U druhé mozaiky byl somatický genotyp 080/087/100/100 v Gpi A, 071/087/100/100 v s-Aat a 060/064/100 v s-Mdh A. Genotyp jejich vajíček byl 087/100 nebo 087/100/100 v lokusu Gpi A, 071/100/100 v s-Aat a 060/100/100 v s-Mdh A.

4.5 Úroveň ploidie ve zkoumaných populacích

Pouze u 21 vzorků z celkových 139 zkoumaných byla určena ploidie pomocí průtokové cytometrie. U zbývajících 118 vzorků byla ploidie odhadnuta pomocí gene – dose efektu při analýze alozymů.

Nejvíce jedinců bylo diploidních – 77, z toho 61 vzorků náleželo jednotlivým druhům a 16 hybridům. Dále bylo určeno 55 triploidů, dvě triploid – tetraploidní mozaiky a pět tetraploidních jedinců.

4.6 Populační diverzita

Mezi populacemi na jednotlivých lokalitách byla zaznamenána značná diverzita. Nejjednodušší populace tvořil jediný druh, naopak složitější se skládaly z jednoho nebo dvou rodičovských druhů a jejich hybridních biotypů s různou úrovní ploidie. Složení populací na jednotlivých lokalitách je uvedeno v tabulce 5, příloha IV a na obrázku 1, příloha V.

Celkem byly objeveny 4 čisté populace, složené z jedinců příslušejících k jedinému druhu. Populace dvou jedinců *C. elongatoides* se vyskytovala na lokalitě 8. Na lokalitě 10 byla zaznamenána populace sestávající z pěti jedinců druhu *C. elongata*. Čisté populace *C. strumicae* byly detekovány zároveň na lokalitách 9 a 12.

Populace biotypu EEN byla nalezena na lokalitě 5, zahrnovala 11 jedinců.

Ke složeným populacím patřily populace skládající se pouze ze dvou biotypů. Byla to jednak populace vyskytující se na lokalitě 6, kde vedle sebe bylo zaznamenáno 12 jedinců *C. elongatoides* a jeden diploidní hybrid EN, dále pak populace tvořená jedním jedincem EN a jedním EEN z lokality 3.

Na lokalitě 1 byla objevena populace tvořená druhem *C. tanaitica* a hybridy EN a ENN.

Dalším typem smíšené populace byla populace z lokality 2, tvořená 4 jedinci *C. strumicae*, třemi trihybridy ENS a jednou mozaikou EEN/EENS.

Skladbou biotypů velmi podobná předchozí lokalitě byla lokalita 4, na které se vyskytovalo 7 jedinců *C. strumicae*, 4 jedinci biotypu ENS a jeden tetraploid ENSS.

Jednou z nejkomplicovanějších složených populací, které byly zaznamenány, byla populace jedinců biotypů *C. elongatoides*, *C. strumicae*, EEN, ENS a EEN/EENS z lokality 7.

Další komplikovaná populace byla objevena na bulharské lokalitě 11. Tvořili ji jedinci náležející k biotypům *C. strumicae*, EN, EEN, ENS, EENS, ENSS.

Populace z rumunské lokality 13 zahrnovala jedince *C. elongatoides*, *C. tanaitica* a výhradně jejich hybridní biotypy, a sice EN, EEN i ENN, přičemž nejčastěji, dvanáctkrát, byl zaznamenán biotyp ENN.

5. Diskuse

Alozymová analýza

Pro jednotlivé druhy rodu *Cobitis* jsou známy druhově specifické alely (Janko et al., 2007; Šlechtová et al., 2000), shrnuté v tabulce 1, příloha I. Pro *C. tanaitica* byly při mnou prováděných alozymových analýzách zaznamenány pouze alely korespondující s údaji uvedenými pro tento druh v tabulce 1, příloha I, nebyly však pozorovány všechny známé alely. V lokusu s-Aat byla detekována pouze alela 071, v lokusu Ldh B alela 100 a v lokusu Pgm také výhradně alela 100. Ostatní alely uváděné pro tyto lokusy u *C. tanaitica* v Janko et al. (2007) zaznamenány nebyly.

U druhu *C. elongatoides* nebyla v lokusu Gpi A pozorována alela 098, v s-Mdh A pak alela 040 a v Ldh B alela 117, jinak uváděné v Janko et al. (2007). Ostatní detekované alely se shodovaly s alelami v tabulce 1, příloha I. Navíc, u dvou jedinců na lokalitě 6 a u jednoho jedince z lokality 8, se v lokusu s-Mdh A objevila dosud nezaznamenaná alela 060.

U druhu *C. strumicae* se vyskytovaly všechny alely shrnuté v tabulce 1, příloha I. Vedle těchto známých specifických alel byla v lokusu Gpi A detekována alela 050 u dvou jedinců na lokalitě 9, v lokusu s-Aat alela 095 u jednoho jedince na lokalitě 7 a alela 100, která se vyskytovala u jedinců ze čtyř lokalit, a dále alela 200 v lokusu Ldh A na lokalitách 2 a 4.

Rodičovské druhy

Z jednotlivých druhů byly zaznamenány druhy *C. elongatoides*, *C. tanaitica* a *C. strumicae* (tabulka 5, příloha IV; obrázek 1, příloha V). *Cobitis elongatoides*, který nebyl dosud v dunajských přítocích Bulharska zaznamenán, se vyskytoval samostatně na lokalitě 8. Na lokalitách 9 a 12 byl zaznamenán samostatný výskyt *C. strumicae*.

Na všech ostatních lokalitách, pokud byly druhy zaznamenány, pak vždy společně s hybridními biotypy.

Na lokalitě 10 v Bulharsku byli detekováni jedinci *C. elongata*. To potvrzuje dřívější literární údaj (Ivanova et al. 2003). Výhradně samostatný výskyt *C. elongata* na dané lokalitě a nepřítomnost druhově specifických alel v hybridních genomech potvrzují, že nedochází ke křížení s jinými druhy a jeho genom nepřispívá ke vzniku a reprodukci hybridů.

Hybridní biotypy a smíšené populace

Diverzita hybridních forem na pozorovaných lokalitách je poměrně vysoká. Byly zaznamenány již dříve pozorované hybridní biotypy EN, EEN, ENN, ENS, i nově objevené biotypy EEN/EENS, EENS, ENSS. Na většině ze zkoumaných lokalit se hybridní biotypy vyskytovaly ve smíšených populacích, společně s jedním nebo dvěma rodičovskými druhy (tabulka 5, příloha IV; obrázek 1, příloha V).

Doposud byl zaznamenán pouze jeden jedinec formy EN v dolním Dunaji, v místě dlouhodobého reprodukčního kontaktu obou rodičovských druhů *C. elongatoides* a *C. tanaitica*. Primární hybridy EN zde pravděpodobně vznikají vícenásobně, nezávisle na sobě (Janko et al., 2003, 2005a), a společně s některým z rodičovských druhů se následně šíří areálem. Díky velkému procentu fertilizace klonálních vajíček, produkovaných gynogenetickými hybridními samicemi, dochází k inkorporaci 3. genomu do genotypu hybridu od toho druhu, který slouží jako donor spermií pro gynogenezi (Janko et al., 2007). Vznikají triploidní formy, které nahrazují primární diploidní hybridy a danou hybridní linii stabilizují (příloha V, obrázek 2). Přítomnost jedinců biotypu EN, dokonce na více analyzovaných lokalitách (lokality 1, 3, 6, 11, 13), ukazuje na hybridizaci rodičovských druhů i v současnosti a vznik primárních hybridů *de novo*.

Ke složeným populacím patřila populace z lokality 1, tvořená jedinci *C. tanaitica* a dvěma hybridními biotypy EN a ENN. Situace na této lokalitě odpovídá běžnému populačnímu vzoru v Evropě, kdy jeden rodičovský druh, přidružený hybridním biotypům, slouží jako donor spermií pro gynogenetické hybridní

samice. Tento model podporuje mimo jiné i současný výskyt diploidních a triploidních jedinců biotypů EN a ENN v oblasti západního pobřeží Černého moře (Janko et al., 2007). Forma ENN vzniká zřejmě náhodným začleněním haploidního genomu *C. tanaitica* do genomu primárního hybridu EN při gynogenezi.

Na lokalitě 5 byli pozorováni výhradně jedinci hybridního biotypu EEN, bez přítomnosti některého z rodičovských druhů. Pravděpodobně se však nejednalo o čistou hybridní populaci, ale pouze nebyl při vzorkování zachycen žádný jedinec rodičovského druhu.

Populaci z lokality 6 tvořili jedinci *C. elongatoides* a jeden primární hybrid EN.

Unikátní složení populace bylo pozorováno na lokalitě 13 v Rumunsku, kde vedle sebe existovaly syntopicky druhy *C. elongatoides*, *C. tanaitica* a hybridní biotypy EN, EEN, ENN. Záznam primárních hybridů EN opět ukazuje na recentní hybridizaci rodičovských druhů. Současný výskyt forem EEN, ENN pak vypovídá o rovnocenné schopnosti druhů *C. elongatoides* i *C. tanaitica* sloužit při gynogenetické reprodukci hybridů jako donoři spermií.

Na všech ostatních lokalitách se smíšenými populacemi byl pozorován i druh *C. strumicae* a hybridní biotypy s jeho genomem. Nacházely se zde jednak populace, ve kterých se vedle jednoho z primárních rodičovských druhů sympatricky vyskytoval i *C. strumicae*, ale i populace, ve kterých jediný druh, ke kterému se přidružovaly hybridní biotypy, představoval výhradně *C. strumicae*.

K výše uvedenému prvnímu typu populací patřila i populace z lokality 7. Zde se společně nacházely dva rodičovské druhy - *C. elongatoides*, *C. strumicae* a dále hybridní formy EEN, ENS a jedna triploid – tetraploidní mozaika ENS/EENS.

Populace z lokalit 2, 4, 11 představovaly druhý typ populací, ve kterých se vyskytoval *C. strumicae* s hybridními biotypy bez přítomnosti primárních rodičovských druhů. Na lokalitě 2 se druh *C. strumicae* nacházel společně s formami ENS a ENS/EENS, na lokalitě 4 společně s biotypy ENS a ENSS. V obou případech měli všichni zaznamenaní hybridní inkorporovaný genom *C. strumicae*. Naproti tomu na lokalitě 11 byli vedle hybridních biotypů s genomem *C. strumicae* ENS, EENS, ENSS, pozorováni i jedinci forem EN a EEN.

Biotyp ENS byl zaznamenán ve všech smíšených populacích zahrnujících druh *C. strumicae*, a tedy téměř ve všech hlavních bulharských tocích. Fakt, že byl s počtem

22 jedinců nejčastějším pozorovaným hybridním biotypem naznačuje, že jeho výskyt není vzácným jevem. Přitom do současné doby byli zaznamenáni pouze tři jedinci biotypu ENS v bulharské řece Jantra (Janko et al., 2007). Navíc, tetraploidní hybridní biotypy s inkorporovaným genomem *C. strumicae* byly pozorovány vůbec poprvé. Podařilo se mi detekovat hned dvě odlišné formy, a to EENS a ENSS. Pozoruhodný a ojedinělý se zdá být i nález dvou triploid – tetraploidních mozaik ENS/EENS.

Záznam všech těchto forem ukazuje na schopnost druhu *C. strumicae* sloužit jako donor spermií při gynogenezi hybridů a současně na schopnost hybridů inkorporovat genom *C. strumicae*. A to i přes to, že druh *C. strumicae* je ostatním druhům hybridního komplexu *Cobitis taenia* nesesterský a patří do jiné fylogenetické linie zvané Bicanestrinia (Bohlen et al., 2006).

Analýza vajíček

Alozymová studie vajíček byla provedena se snahou ověřit jejich klonální povahu a potvrdit gynogenetický způsob rozmnožování, nebo naopak pozorovat redukci genomu, a tím najít důkaz pro hybridogenezi. Pokud postupně uvažujeme známé způsoby asexuální reprodukce, jako jsou partenogeneze, gynogeneze a hybridogeneze, z pozorování, že hybridy se ve většině případů vyskytují společně s některým z rodičovských druhů, můžeme odhadovat na způsob rozmnožování závislý na spermiích hostitelského druhu. Výjimkou byly dvě pozorované lokality (3, 5), na kterých se vyskytovaly hybridní biotypy samostatně. Zde však předpokládáme, že díky nízkému počtu vzorků pravděpodobně pouze nedošlo k zachycení hostitelského druhu, neboť neznáme dosud jediný případ pravé partenogeneze u ryb.

Z výsledků analýz dále vyplývá, že u všech testovaných diploidních i triploidních jedinců se fenotyp somatické tkáně shodoval s fenotypem vajíček. Naopak u hybridogeneze, například u vajíček vodních skokanů *Rana esculenta*, najdeme pouze sadu jednoho rodičovského druhu. Druhá je eliminována a znovu doplněna pářením s druhem, jehož genom byl eliminován (např. Choleva, 2004). Přítomnost kompletního genomu ve všech analyzovaných vzorcích a syntopický výskyt se samci rodičovských

druhů ukazuje na gynogenetický způsob reprodukce těchto biotypů. U diploidních ani triploidních forem tedy nebyl zaznamenán žádný náznak hybridogeneze.

Pozoruhodná je situace u dvou analyzovaných triploid – tetraploidních mozaik EEN/EENS. Pozorována zde byla částečná redukce ploidie, kdy ve vajíčkách chyběla alela druhu *C. strumicae*, jinak pozorovaná v somatické tkáni. Tento jev by se dal vysvětlit dvěma odlišnými modely. U triploid - tetraploidní mozaiky část jedince tvoří triploidní a část tetraploidní buňky. Podle první z hypotéz by vajíčka mohla vzniknout z triploidních buněk. Tento fenotyp pouze zdánlivě kontrastuje s fenotypem somatickým, kde vizualizace čtyř alel tetraploidních buněk zakrývá existenci rovněž přítomných triploidních somatických buněk.. Druhá hypotéza naopak navrhuje původ vajíček z tetraploidních buněk. Tento model by naznačoval redukci genomu a stal by se prvním podkladem pro potvrzení hybridogenetické reprodukce v rodu *Cobitis*. Mezi těmito dvěma hypotézami bohužel nemůžeme pomocí alozymových analýz rozhodnout a mechanismus oogeneze u triploidně - tetraploidních biotypů zůstává nerozřešen.

Reprodukční vztahy

Na základě determinace jedinců pomocí genetických analýz a faktu, že společně s *C. strumicae* se ve smíšených populacích nacházejí i formy EN a ENS, navrhuje tento historický reprodukční scénář (příloha V, obrázek 2):

V místě reprodukčního kontaktu rodičovských druhů *C. elongatoides* a *C. tanaitica* v dolním Dunaji vznikali jedinci primárního hybridního biotypu EN (Janko et al., 2003, 2005a). Přidružení k rodičovskému druhu se společně s ním šířili areálem a fúzí s gametami samce vznikaly nově také biotypy EEN (se samci druhu *C. elongatoides*) a ENN (se samci druhu *C. tanaitica*). Dalším šířením se v Bulharsku setkaly areály „dunajských“ druhů a jejich hybridů s areálem druhu *C. strumicae*, pocházejícího z egejské oblasti Balkánského poloostrova. Dostupná alozymová a genetická data ukazují, že mezi hybridy a jedinci *C. strumicae* docházelo a dochází k intenzivní hybridizaci. Svědčí o tom pozorování skladby bulharských smíšených populací z hybridů EN a ENN bez primárních rodičovských druhů pouze společně

s *C. strumicae*. Dalším důkazem je syntopická přítomnost rovněž trihybridní formy ENS, kde předpokládáme, že primární hybridi EN využili pro gynogenetickou reprodukci druh *C. strumicae* a během gynogeneze došlo k fúzi klonálního vajíčka a spermií *C. strumicae*, inkorporaci nového genomu a vzniku této formy. Inkorporace genomu *C. strumicae* jsou schopné nejenom diploidní, ale i triploidní linie - forma EEN tímto způsobem dále dává vzniknout tetraploidním jedincům EENS. Může docházet i k přidání genomu *C. strumicae* dvakrát za sebou a ke vzniku biotypu ENSS z původního ENS. Výsledkem hybridizací je přítomnost až pěti hybridních biotypů (EN, ENN, ENS, EENS a ENSS) a druhu *C. strumicae* na jedné lokalitě, jak dokládá příklad lokality 11.

Z evolučního hlediska nemusí být hybridní formy v takovém případě vázány na primární rodičovský druh, ale jsou schopny jako donora spermií pro gynogenezi využívat nový druh *C. strumicae*, se kterým se pak mohou šířit do dalších lokalit nezávisle na původních rodičovských druzích. Hybridizace s novým druhem zde rovněž vyvolává vznik a vysokou variabilitu nových hybridních biotypů a klonálních linií.

Podobná situace, kdy se hybridní biotypy vyskytují v nepřítomnosti rodičovských druhů, vázané na druh původně v jejich genomu nezahrnutý, byla zaznamenána v Rýnu a v ukrajinské řece Bug. V oblasti jižní Ukrajiny a řece Rýn pozorujeme samostatně bez primárních rodičovských druhů biotyp *C. elongatoides - tanaitica*, v ukrajinské řece Bug biotyp *C. elongatoides - taurica* (EC). Oba uvedené biotypy se sem rozšířily vázané na nový hostitelský druh *C. taenia*, o čemž vypovídá i přítomnost forem ENT, respektive ECT (Janko et al., in press). V tomto případě se však jedná o přidružení sice nového, ale blízce příbuzného hostitelského druhu, zatímco v případě *C. strumicae* v Bulharsku jde o druh fylogeneticky vzdálenější. Tento jev je vzácný i mezi asexuálními obratlovci obecně, kdy hybridizace byla pozorována vždy pouze mezi blízce příbuznými druhy.

Biogeografie

Genetické analýzy potvrdily výskyt čtyř druhů sekavců (*C. elongatoides*, *C. tanaitica*, *C. strumicae* a *C. elongata*), již dříve známých z území Bulharska. Práce

však významně zpřesnila rovněž poznatky o rozšíření těchto forem (tabulka 5, příloha IV; obrázek 1, příloha V). Ukázalo se, že *C. strumicae* je na severu rozšířený mnohem více na západ, než uvádí Bohlen et al. (2006), a sice až po řeku Arčar. Práce současně potvrzuje, že *C. strumicae* nedosahuje Dunaje a ani tuto řeku nepřekonal dále na sever. Studie ukázala, že *C. elongatoides* obývá rovněž jižní přítoky Dunaje a nalezena byla nejzápadnější lokalita druhu *C. tanaitica* v Dunajském systému (Košava). Nález vzácného druhu *C. elongata* v Jantře potvrzuje dřívější literární údaj (Ivanova et al., 2003). Překvapivý je syntopický výskyt *C. elongatoides* a *C. tanaitica* (lokalita 13) a *C. elongatoides* a *C. strumicae* (lokalita 7), jinak striktně parapatrických druhů napříč Evropou (Bohlen a Ráb, 2001, Janko et al., in press). Zatímco genom druhu *C. elongata* se zřejmě skutečně neúčastní hybridizací s jinými druhy a primární hybrid mezi druhy *C. elongatoides* a *C. strumicae* se jeví jako ojedinělá událost (Janko et al., in press), práce přinesla doklad o neočekávaném geografickém rozsahu a intenzitě hybridizací mezi hybridním komplexem *C. taenia* a „exotickým“ druhem *C. strumicae*, ke kterým dochází ve všech významných dunajských přítocích napříč celým Bulharskem, a které nabízí ideální modelové území pro studium role neobvyklé hybridizace a dopadu na evoluci sexuálně-asexuálních hybridních komplexů.

6. Souhrn

1. V letech 2005-2007 bylo studováno celkem 151 sekavcovitých ryb rodu *Cobitis* z 12 lokalit v Bulharsku a jedné lokality v Rumunsku. Cílem práce bylo doplnit údaje o biogeografii sekavců rodu *Cobitis* a o gynogenetickém mechanismu reprodukce.
2. Pomocí elektroforetických analýz 8 diagnostických strukturních enzymových lokusů (Gpi-A, s-Aat, s-Mdh A, Gpi-B, Ldh-A, Ldh-B, Pgm, AK) byly detekovány druhy *C. elongatoides*, *C. tanaitica*, *C. strumicae*, *C. elongata* a hybridní biotypy EN, EEN, ENN, ENS, EEN/EENS, EENS, ENSS.
3. U druhů *C. tanaitica*, *C. elongata* a *C. strumicae* došlo k potvrzení předpokládaného výskytu a k dalšímu upřesnění poznatků druhové distribuce. Ukázalo se, že areál rozšíření *C. strumicae* nedosahuje Dunaje a nedošlo k jeho překonání. Druh *C. elongatoides* se na základě dřívějších předpokladů skutečně vyskytuje také v jižních přítocích Dunaje.
4. Byl zaznamenán častý výskyt hybridního biotypu ENS - na všech lokalitách, kde byl zaznamenán *C. strumicae*. Navíc byly objeveny zcela nové tetraploidní hybridní biotypy EENS a ENSS a triploid – tetraploidní mozaika EEN/EENS. Data ukazují na schopnost hybridů inkorporovat genom fylogeneticky vzdáleného druhu *C. strumicae*.
5. Analýzou jednotlivých vajíček vybraných jedinců byla potvrzena jejich klonální povaha a gynogenetický způsob reprodukce. Výjimkou byly dvě mozaiky samice EEN/EENS, u kterých použitá metoda elektroforetické analýzy vajíček neumožnila mechanismus oogeneze rozřešit.
6. Mapování skladby populací s ohledem na gynogenetický způsob reprodukce ukazuje na intenzivní hybridizaci *C. strumicae* s blízkými nepříbuznými druhy a hybridy komplexu *C. taenia*, nebo-li, schopnost druhu *C. strumicae* sloužit jako donor spermií při gynogenezi hybridů. Na základě dostupných faktů byl navržen historický reprodukční scénář.

7. Seznam použité literatury:

- Alves, M.J., M.M. Coelho, M.J. Collares-Pereira. 1998. Diversity in reproductive modes of females of the *Rutilus alburnoides* complex (Teleostei, Cyprinidae): A way to avoid genetic constraints of uniparentalism. *Mol. Biol. Evol.* 15:1233-1242.
- Alves, M.J., M.M. Coelho, M.J. Collares-Pereira. 2001. Evolution on action through hybridization and polyploidy in an Iberian freshwater fish: a genetic review. *Genetica* 111:375-385.
- Avise, J.C., Quattro, J.M., Vrijenhoek RC. 1992. Molecular clones within organismal clones. *Evol. Biol.* 26: 225-246
- Beukeboom, L.W. and R.C. Vrijenhoek. 1998. Evolutionary genetics of sperm-dependent parthenogenesis . *J. Evol. Biol.* 11: 755-782.
- Birstein, V.J., A.I. Poletaev, B.F. Goncharov. 1993. DNA Content in Eurasian Sturgeon Species Determined by Flow Cytometry. *Cytometry* 14:377-383.
- Bogart, J.P. 1989. A mechanism for interspecific gene exchange via all-female salamander hybrids. In *Evolution and ecology of unisexual vertebrates* (eds. Dawley R. M., Bogart J. P.) pp. 170-179. Bulletin 466, New York State Museum, Albany, New York.
- Bohlen, J. and Ráb, P. 2001. Species and hybrid richness in spined loaches (genus *Cobitis* L.), with a checklist of the species and hybrids of Europe. *Journal of Fish Biology* 59, 79-85, Suppl. A.
- Bohlen, J., Ráb, P., Šlechtová, V., Rábová, M., Ritterbusch, D. and Freyhof, J. 2002. Hybridogeneous biotypes in spined loaches (genus *Cobitis*) in Germany with implications for the conservation. In *Freshwater Fish Conservation – options for the future*. (eds. Collares-Pereira, M. J., Cowx, I. & Coelho, M.M.): Fishing News Books, , Chapter 28, pp. 311-328. Blackwell Science, Oxford.
- Bohlen, J., Perdices, A., Doadrio, I. and Economidis, P.S. 2006. Vicariance, colonisation and fast local speciation in Asia Minor and the Balkans as revealed from the phylogeny of spined loaches (Osteichthyes; Cobitidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution* 39, 552-561.

- Boron, A. 1992. Karyotype study of diploid and triploid *Cobitis taenia* (Pisces, Cobitidae) from the Vistula river basin. *Cytobios* 72: 201-206
- Boron, A. 1995. Chromosome banding studies of spined loach *Cobitis taenia* L. *Cytobios* 81: 97-102.
- Boron, A. and Danilkiewicz, Z. 1998. Diploid – polyploid complex of spined loach *Cobitis taenia* sensu stricto and *Cobitis* sp. From the Bug River, Poland (Pisces, Cobitidae). *Cytobios*, 96: 13-22.
- Cuellar, O. 1970. Egg transport in lizards. *J. Morph.* 130: 129-135.
- Culling, M., Janko, K., Boron, A., Vasil'ev, V.P., Coté, I.M. and Hewitt, G.M. (2006). European Colonisation of the Spined Loach *Cobitis taenia* from Ponto-Caspian Refugia based on mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* 15, 173-190.
- Dawley, R.M. 1989. An introduction to unisexual vertebrates. In: Dawley, R.M. & J.P. Bogard (ed.). *Evolution and Ecology of unisexual vertebrates*. New York State museum, Albany, New York. Bulletin 466:1-18.
- Felsenstein, J. 1974. The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* 78: 737-756
- Freyhof, J., Ráb, P. and Bohlen, J. 2000. The valid names of some European species of the genus *Cobitis* (Teleostei, Cobitidae). *Folia Zool.* 49 (Suppl. 1): 3-7.
- Fu, J., Murphy, R.W. and Darevsky, I.S. 2000. Divergence of the cytochrome b gene in the *Lacerta raddei* complex and its parthenogenetic daughter species: evidence for recent multiple origins. *Copeia* 2: 432-440.
- Hamilton, W.D., Axelrod R., Tanese R. 1990. Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3566-3573
- Harris, H. and D.A. Hopkinson. 1976. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North - Holland, Amsterdam.
- Hubbs, C. L. and Hubbs, L. C. 1932. Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish of hybrid origin. *Science* 76: 628-630.
- Choleva, L. 2004. Hybridogenetic reproduction in *Rana esculenta* complex in the upper Odra River drainage. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze. 89 pp.

- Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G. and Renard, P. 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females – potential of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet.* 72: 193-206.
- Ivanova, P., Erk'akan, S., Ozeren, S.C., Dobrovolnov, I. 2003. Biochemical – genetic comparison of *Cobitis simplicispina* from Turkey, and *C. taenia*, *C. albicoloris* and *C. elongata* from Bulgarian freshwaters. *Folia Biologica – Krakow* 51: 79-84 (Suppl.S)
- Janko, K., Kotlík, P. and Ráb, P. 2003. Evolutionary history of asexual hybrid loaches (*Cobitis*: Teleostei) inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. *Journal of Evolutionary Biology* 16, 1280-1287.
- Janko, K., Kotlík, P., Culling, M.A. and Ráb, P. 2005a. Ice age cloning - comparison of Quaternary evolutionary histories of sexual and clonal forms of spiny loaches (*Cobitis*; Teleostei) using the analysis of mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* 14, 2991- 3004.
- Janko, K., Vasil'ev, V.P., Ráb, P., Rábová, M., Šlechtová, V. and Vasil'eva, E.D. 2005b. Genetic and morphological analyses of 50-chromosome spined loaches (*Cobitis*, Cobitidae, Pisces) from the Black Sea basin that are morphologically similar to *C. taenia*, with the description of a new species. *Folia Zoologica* 54, 405-420.
- Janko, K., Bohlen, J., Lamatsch, D., Flajšhans, M., Kotlík, P., Ráb, P. and Šlechtová, V. 2007. Evidence for gynogenesis as the reproductive mode of hybrid loaches (*Cobitis*: Teleostei): on the evolution of polyploidy in asexual vertebrates. *Genetica*. doi: 10.1007/s10709-006-9130-5
- Janko, K., Flajšhans, M., Choleva, L., Bohlen, J., Šlechtová, V., Rábová, M., Lajbner, Z., Šlechta, V., Ivanova, P., Dobrovolov, I., Culling, M., Persat, H., Kotusz, J. and Ráb, P. Diversity of European spined loaches (genus *Cobitis* L.): an update of the geographic distribution of the *Cobitis taenia* hybrid complex with a description of new molecular tools for species determination. *J. Fish. Biol*, in press.
- Judson, O.P., Normark BB. 1996. Ancient asexual scandals. *Trends Ecol. Evol.* 11: 41-46.

- Kocher T.D., Stepien C.A., 1997: Molecules and Morphology in studies of Fish evolution. In: Molecular Systematics of Fishes (eds. Kocher T. D., Stepien C. A.), 1-11. New York: Academic Press.
- Kondrashov, A.S. 1997. Annu. Rev. Ecol. Syst. 28: 391-435.
- Kottelat, M. 1997. European freshwater fishes. *Biologia* 52 (Suppl. 5), 1-271.
- Lelek, A. 1987. Threatened fishes of Europe. In *The freshwater fishes of Europe* (European Committee for the Conservation of Nature and Natural Resources, ed.). Wiesbaden: Aula.
- Maslin, T.P. 1966. The sex of hatchlings of live apparently unisexual species of whiptail lizards *Cnemidophorus*. *Teiidae*. *Amer. Mid. Natur.* 76: 369-378.
- Moritz, C., W.M. Brown, L.D. Densmore, J.W. Wright, D. Vyas, S. Donnellan, M. Adams, P. Baverstock. 1989. Genetic diversity and the dynamics of hybrid parthenogenesis in *Cnemidophorus* (Teiidae) and *Heteronotia* (Gekkonidae). In: Dawley, R. M. & J. P. Bogart (ed.). *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*. New York State Museum, Albany, New York. Bulletin 466:268-280.
- Moritz, C. and Heideman, A. 1993. The origin and evolution of parthenogenesis in *Heteronotia binoei* Gekkonidae. Reciprocal origins and diverse mtDNA in western populations. *Syst. Biol.* 42: 293-306.
- Pasteur, N., G. Pasteur, F. Bonhomme, J. Catalan, J. Britton-Davidian. 1987. *Manual Technique de génétique par électrophorèse des protéines*. Techniques et Documentation. Lavoasier, Paris. 217 pp.
- Perdices, A., Machordom, A. and Doadrio, I. 1995. Allozyme variation of African and Iberian populations of the genus *Cobitis*. *Journal of Fish Biology* 47: 707-718.
- Povž, M. & S. Šumer (2000): Present status and distribution of the species of the genera *Misgurnus*, *Cobitis* and *Sabanejewia* in Slovenia. *Folia Zoologica* 49 Suppl. 1: 107-112
- Quattro, L., J.C. Avise, R.C. Vrijenhoek. 1992. An ancient clonal lineage in fish genus *Poeciliopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:348-352.
- Ráb, P. and Slavík, O. (1996). Diploid-triploid-tetraploid complex of the spined loach, genus *Cobitis* in Psovka Creek: the first evidence of the new species of *Cobitis* in

- the ichthyofauna of the Czech Republik. *Acta Universitatis Carolinae Biologica* 39, 201-214.
- Ráb, P., Rábová, M., Bohlen, J., and Lusk, S. 2000. Genetic differentiation of the two hybrid diploid-polyploid complexes of loaches, genus *Cobitis* (Cobitidae) involving *C. taenia*, *C. elongatoides* and *C. spp.* in the Czech Republic: karyotypes and cytogenetic diversity. *Folia Zoologica* 49 (Suppl.), 55-66.
- Richards, C.M. and Nace, G.W. 1977. The occurrence of diploid ova in *Rana pipiens*. *J. Hered.* 68: 307-312.
- Saat, T.V. 1991. Reproduction of the diploid and polyploid Spinous Loach (*Cobitis*, Teleostei). Oocyte maturation and fertilization in the triploid form. *Soviet Journal of Developmental Biology* 22: 332-338.
- Shaklee, J.B., Allendorf, F.W., Morizot, D.C., Whitt, G.S., 1990. Gene nomenclature of protein-coding loci in fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 119, 2-15.
- Schultz, R.J. 1969. Hybridization, unisexuality and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *Am. Nat.* 103: 605-619.
- Šlechtová, V., Lusková, V., Šlechta, V., Lusk, S., Halačka, K., and Bohlen, J. 2000. Genetic differentiation of two diploid-polyploid complexes of spined loach, genus *Cobitis* (Cobitidae), in the Czech Republic, involving *C. taenia*, *C. elongatoides* and *C. spp.*: Allozyme interpopulation and interspecific differences. *Folia Zoologica* 49 (Suppl.), 67-78.
- Šlechtová, V., Lusková, V., Šlechta, V., Lusk, S., Pivoňková, J. 2003. Potential species identification by allozyme/protein markers in European spined loaches. *Folia Biologica – Krakow* 51: 43-47 (Suppl. S).
- Ueno, K. and Ojima, Y. 1976. Karyotypes and geographical distribution in the genus *Cobitis* (Cobitidae). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 46: 9-18
- Valenta, M., J. Hylgaard-Jensen, E.S. Jensen. 1971. Interaction of veronal, pyrophosphate, citrate and protein with lactate dehydrogenase isozyme determination and kinetics. *Acta Veterinaria Scandinavia* 12: 15-35.
- Vasil'ev, V.P. 1995. Karyological diversity and taxonomic heterogeneity in *Cobitis taenia* (Pisces, Cobitidae). *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 342: 839-842 (in Russian).
- Vasil'ev, V.P. and Vasil'eva, E.D. 1982. A new diploid polyploid complex in fish. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 266: 250-252 (in Russian).

- Vasil'ev, V.P., Vasil'eva, E.D. and Osinov, A.G. 1989. Evolution of diploid-triploid-tetraploid complex of fishes genus *Cobitis*. In: Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates, Bulletin 446 (RM Dawley, JP Bogart, eds), 153-169. New York State Museum, Albany, New York.
- Vasil'ev, V.P., Vasil'eva, E.D. and Osinov, A.G. 1990. On the problem of reticular speciation in vertebrates: Diploid-triploid-tetraploid complex in the genus *Cobitis* (Cobitidae). III. Origin of the triploid form. *Voprosy Ichthyologii* 30(4): 543-550 (In Russian with a summary in English).
- Vasil'ev, V.P., Akimova, N.V., Emelyanova, N.G., Pavlov, D.A. and Vasil'eva, E.D. 2003. Reproductive capacities in the polyploid males of spined loaches from the unisexual-bisexual complex, occurred in the Moscow River. *Folia Biologica Krakow* 51: 67-73 (Supplement).
- Vasil'eva, E.D., Collares-Pereira, M.J. and Madeira, J. 1992. Variability, divergence, and taxonomy of loach on the Iberian Peninsula. *J. Ichthyol.* 32 (4): 69-84.
- Vasil'eva, E.D. 2000. Sibling species in the genus *Cobitis* (Cobitidae, Pisces). *Folia Zool.*- 49 (Suppl. 1): 23-30
- Vasil'eva, E.D. and Vasil'ev, V.P. 1998. Sibling species in genus *Cobitis* (Cobitidae). *Cobitis rossomeridionalis* sp. nova. *Journal of Ichthyology* 38, 580-590.
- Vasil'eva, E.D. & Vasil'ev, V.P. (2006). *Cobitis pontica* sp. nova—a new spined loach species (Cobitidae) from the Bulgarian waters. *Journal of Ichthyology* 46(1), 15-20. doi: 10.1134/S003294520610002X
- Vrijenhoek, R.C. 1975. Gene dosage in diploid and triploid unisexual fishes (Poeciliopsis, Poeciliidae). In *Isozymes. Vol. 4, Genetics and Evolution* (C.L. Markert, ed.), pp. 463-476. Academic Press, New York.
- Vrijenhoek, R.C. 1979. Factors affecting clonal diversity and coexistence. *Am. Zool.* 19:787-797.
- Vrijenhoek, R.C. 1993. The origin and evolution of clones versus the maintenance of sex in *Poeciliopsis*. *J. Hered.* 84: 388-395
- Vrijenhoek, R.C. 1998. Clonal organisms and the benefits of sex. In *Advances in molecular ecology* (ed. G. R. Carvalho). IOS Press, Amsterdam. Pp. 151-172.
- Vrijenhoek, R.C., R.M. Dawley, C.J. Cole, J.P. Bogart. 1989. A list of known unisexual vertebrates. In: Dawley, R.M. & J.P. Bogart (eds.): *Ecology and evolution of*

unisexual vertebrates. New York State Museum, Albany, New York. Bulletin 466:19-23.

Wirtz, P. 1999. Review: Mother species – father species: unidirectional hybridization in animals with female choice. *Anim. Behav.* 58: 1-12.

Přílohy:

Příloha I:

Tabulka 1: Druhově specifické alozymové alely (Janko et al., 2007; Šlechtová et al., 2000)

Cobitis species	GPI-A	sAAT	sMDH-A	LDH-A	LDH-B	GPI-B	PGM	AK
<i>C. taenia</i>	087	067 [#] 071	060 100	100	100 117	100	100 090 095 [#]	100
<i>C. tanaitica</i>	087	071 078 100	060 ⁺ 100	100	100 105 117	100	090 100	100
<i>C. taurica</i>	087	071	060	100	100	100	090	100
<i>C. elongatoides</i>	098 [#] 100 113	085 087 100	040 070 100	100	100 117	100 200	100	100
<i>C. melanoleuca</i>	074 080	087	100	095	070	-200	100	100
<i>C. strumicae</i>	060 074 080	085 087	064	100	102	100	108	070
<i>C. elongata</i>	074 080	095	100	100	100	100	090	100

[#] = vzácné alely

⁺ = alela 060 je vzácná pro populace *C. tanaitica* z povodí řek Dunaj, Odra a Dněstr, ale je fixována v populacích řeky Don.

Příloha II:

Přehled lokalit:

- číslo lokality, název lokality, koordináty, oblast

1. **Košava**, 44° 04' 744" N, 23° 01' 809" E, Bulharsko
2. **Řeka Arčar I**, 43° 48' 620" N, 22° 50' 995" E, Bulharsko
3. **Řeka Arčar II**, 43° 48' 620" N, 22° 50' 995" E, Bulharsko
4. **Povodí řeky Cibrica, Slavotin**, 43° 33' 695" N, 23° 04' 025" E, Bulharsko
5. **Řeka Šugavica, Krapčeste**, 43° 23' 168" N, 23° 18' 024" E, Bulharsko
6. **Řeka Kozačevski, Kozačevo**, 43° 05' 088" N, 24° 44' 804" E, Bulharsko
7. **Řeka Katunecka, Bezha Novo**, 43° 13' 862" N, 24° 24' 647" E, Bulharsko
8. **Řeka Osam**, 43° 13' 768" N, 24° 52' 427" E, Bulharsko
9. **Řeka Vidima, povodí řeky Jantra**, 42° 50' 833" N, 24° 54' 197" E, Bulharsko
10. **Řeka Jantra**, 42° 57' 500" N, 25° 09' 720" E, Bulharsko
11. **Řeka Jantra, Bjala** 43° 28' 902" N, 25° 43' 203" E, Bulharsko
12. **Řeka Jantra, Debnevo** 42° 57' 489" N, 24° 50' 586" E, Bulharsko
13. **Řeka Dunaj, Oltenica**, 44° 04' 4047" N, 26° 43' 048" E, Rumunsko

Tabulka 2: Počet analyzovaných vzorků z jednotlivých lokalit

Číslo lokality	Počet vzorků	Původní značení vzorků
1	4	B1/ <i>číslo vzorku</i>
2	8	B4/ <i>číslo vzorku</i>
3	2	B3, B4
4	12	B10/ <i>číslo vzorku</i>
5	12	B14/1-11
6	18	B23/ <i>číslo vzorku</i>
7	18	B25/ <i>číslo vzorku</i>
8	3	Osam 2 - <i>číslo vzorku</i>
9	5	ATJ 1 – 5
10	5	B33/ <i>číslo vzorku</i>

11	36	B36/ <i>číslo vzorku</i> BO36/ <i>číslo vzorku</i>
12	2	Deja 1 – 2
13	26	OLT 1 - 26

Příloha III:

Tabulka 3: Složení pufrů použitých pro elektroforézu alozymů *Cobitis* a podmínky elektroforézy (hodnoty udávají napětí a proud při použití gelů o mocnosti 6 mm)

Označení pufru	Složení	
V	gelový pufr:	elektrodový pufr:
	0,026 M Tris (15,7g) 0,007 M kys.citronová (7,3g) doplnit do 5 000 ml dest. vodou; pH 7,4	0,426 M Tris (257,9g) 0,063 M kys.citronová (66,2g) doplnit do 5 000 ml destil. vodou; pH 8,6
	hodnota nastavení: 180V, 50 mA na 2 gely, 17 hodin v lednici	
MC2	zásobní roztok:	0,08 M kys. citronová (84,05g) doplnit do 5 000 ml dest. vodou, pH upravit na 6,2 aminopropylmorfolinem
	gelový pufr:	elektrodový pufr:
	100 ml zásobního roztoku doplnit do 2 000 ml dest. vodou	neředěný zásobní roztok
	hodnota nastavení: 200V, 50 mA na 2 gely, 17 hodin v lednici	
F	zásobní roztok A:	0,0147 M kys. citronové (2,85g bezvodé nebo 3,1g s krystalovou vodou) doplnit do 1 000 ml dest. Vodou
	zásobní roztok B:	0,05 M LiOH (11,97g bezvodý, 20,98g s krystalovou vodou) doplnit do 1 000 ml dest. Vodou
	gelový pufr:	elektrodový pufr:
	270 ml roztoku A 6 ml roztoku B doplnit do 1 000 ml dest.vodou	200 ml roztoku B doplnit do 1 000 ml dest. Vodou
	hodnota nastavení: 350-400 V, 50 mA, 5-6 hodin v lednici, chlazení vodou	

V - Valenta a kol. 1971; MC2 – Clayton a Tretiak 1972; F – Ferguson a Wallace 1961

Tabulka 4: Přehled enzymových systémů a analyzovaných lokusů

Enzym	Zkratka	EC. No.	Lokus	Pufrový systém
Adenylát kináza	a AK	2.7.4.3	<i>Ak</i>	V
Aspartát aminotransferáza	AAT	2.6.1.1	<i>sAat</i>	MC2
Fosfoglukomutáza	PGM	2.7.5.1	<i>Pgm</i>	V, F
Glukóza-6-fosfát isomeráza	GPI	5.3.1.9	<i>Gpi A, Gpi B</i>	V, F
Laktát dehydrogenáza	LDH	1.1.1.27	<i>Ldh-A, Ldh-B</i>	V
Malát dehydrogenáza	MDH	1.1.1.37	<i>sMdh A</i>	MC2

Složení barvicích roztoků:

LDH: laktát dehydrogenasa, E. C. klasifikace - 1. 1. 1. 27.

v mikrovlnné troubě rozvaříme 0, 3 g agaru se 30 ml 0, 1 M TRIS-HCl pufru pH8,2 *

na míchačce přidáme: - 10 ml 0, 05 M pyrofosfátu sodného
 - 2 ml 1 M mléčnanu sodného pH 8, 5
 - po ochlazení na přibližně 40°C přidáme 15 ml

„barvičky“ (200 mg NAD, 150 mg NBT, 20 mg PMS ve 150ml destilované vody)

Dobře promícháme a rovnoměrně rozprostřeme na oba gely. Inkubujeme v termostatu při 37°C do intenzivního vybarvení.

MDH: malát dehydrogenasa, E. C. klasifikace - 1. 1. 1. 37.

v mikrovlnné troubě rozvaříme 0, 3g agaru se 30 ml 0, 1 M TRIS-HCl pufru pH8,2

na míchačce přidáme: - 10 ml 0, 05 M pyrofosfátu sodného
 - 2 ml 1 M jablečnanu sodného pH 8, 5-9
 - po ochlazení na přibližně 40°C přidáme 15 ml „barvičky“ (200 mg NAD, 150 mg NBT, 20 mg PMS ve 150 ml destilované vody)

Dobře promícháme a rovnoměrně rozprostřeme na oba gely. Inkubujeme v termostatu při 37°C do intenzivního vybarvení.

GPI: glukosafosfát isomerasa, E. C. klasifikace - 5. 3. 1. 9.

v mikrovlnné troubě rozvaříme 0, 3g agaru s 30 ml destilované vody

na míchačce přidáme: - 30 ml 0, 5 M Tris-HCl pufru pH 8, 0
 - 5 ml 0, 2 M MgCl₂
 - 0, 04g F-6-P Na v 1 ml redestilované vody,
 - 0, 02g NAD v 1 ml redestilované vody,
 - 0, 005g NADP v 1 ml redestilované vody,
 - 0, 005g NBT ve 2 ml redestilované vody
 - 0, 005g MTT v 1 ml redestilované vody
 - 0, 005g PMS v 1g redestilované vody

Po zchlazení na přibližně 40°C přidáme 5 mikrolitrů (17 I. U.) G-6-PDH, rovnoměrně nanese na oba gely a inkubujeme v termostatu při 37°C do intenzivního vybarvení.

PGM: fosfoglukomutasa, E. C. klasifikace - 5. 4. 2. 2.

v mikrovlnné troubě rozvaříme 0, 3g agaru s 30 ml destilované vody

na míchačce přidáme: - 20 ml 0, 5 M Tris-HCl pufru pH 8, 0,

- 5 ml 0, 2 M MgCl₂

- 0, 1g G-1-P Na₂ rozpuštěný v 1 ml redestilované vody

- 0, 02g NAD rozpuštěný ve 2 ml redestilované vody

- 0, 005g NADP rozpuštěný v 1 ml redestilované vody

- 0, 005g NBT rozpuštěný ve 2 ml redestilované vody

- 0, 005g MTT rozpuštěné v 1 ml redestilované vody

- 0, 005g PMS rozpuštěné v 1 ml redestilované vody

Po zchladnutí na přibližně 40°C přidáme 5 mikrolitrů (17 I. U.) G-6-PDH, rovnoměrně nalijeme na oba gely a inkubujeme při 37°C v termostatu do intenzivního vybarvení.

AK: adenylát kinasa, E. C. klasifikace - 2. 7. 4. 3.

v mikrovlnné troubě rozvaříme 0, 3g agaru s 30 ml destilované vody

na míchačce přidáme: - 30 ml 0, 2 M Tris“A“ pufru pH 8, 0,

- 2 ml 0, 5 M MgCl₂

- 0, 4g α-D glukose

- 0, 12g ADP

- 0, 04g NAD rozpuštěný ve 2 ml redestilované vody

- 0, 005g NADP rozpuštěný v 1 ml redestilované vody

- 0, 01g MTT rozpuštěné v 1 ml redestilované vody

- 0, 005g PMS rozpuštěné v 1 ml redestilované vody

Po zchladnutí na přibližně 40°C přidáme 10 mikrolitrů (17 I. U.) G-6-PDH a 10 mikrolitrů hexokinasy, rovnoměrně nalijeme na oba gely a inkubujeme při 37°C v termostatu do intenzivního vybarvení.

AAT (GOT): asparát aminotransferasa, E. C. klasifikace - 2. 6. 1. 1.

gel se nechá inkubovat 20 minut na plátíčku v lázni 120 ml 0, 2 M Tris“A“ spolu s 0,16 g ASP, 0,08 g α-KG a s 0,02 g PRD,

v mikrovlnné troubě rozvaříme 0, 3g agaru s 30 ml 0, 2 M Tris“A“

na míchačce přidáme: - 30 ml 0, 2 M Tris“A“ pufru pH 8, 0,

- „Fast Blue BB“ na špičku skalpelu

dobře promícháme a po zchladnutí na přibližně 40°C rovnoměrně rozprostřeme na oba gely. Inkubujeme v termostatu při 37°C do intenzivního vybarvení.

Příloha IV:

V následujících tabulkách je každá alela definována trojicferným číslem, kombinace alel jsou zapsány bez mezer

P ploidie

N počet analyzovaných jedinců

Tabulka 5: Variabilita v alozymových lokusech studovaných biotypů rodu *Cobitis*

Číslo lokality	biotyp	P	N	Gpi A	s-Aat	s-Mdh A	Ldh-A	Ldh-B	Gpi-B	Pgm	AK
1	NN	2n	1	087087	071071	060060	100100	100100	100100	100100	100100
	EN	2n	1	087100	071100	060100	100100	100100			100100
	ENN	3n	2	087087100	071071100	100100100	100100100	100100100	100100100	100100100	100100100
2	SS	2n	2	060080	087087	064064	100100	102102	100100	108108	070070
			1	080080	087087	064064	100200	102102	100100	108108	070070
	ENS	3n	1	080080	087100	064064	200200	102102	100100	108108	070070
			2	080087100	071100100	064100100	100100100			100100108	070100100
3	EEN/EENS	3/4n	1	080087100	071087100	064100100	100100200	100100102	100100100	100100108	070100100
			1	080087100	071087100	060064100	100100100	100100102	100100100	100100108	070100100
	EN	2n	1	087100	071100	100100	100100	100100		100100	100100
4	EEN	3n	1	087113113	071085100	100100100	100100100				100100100
			1	074080	087087	064064	100100			108108	070070
	SS	2n	3	060080	087087	064064	100100	102102	100100	108108	070070
			2	060074	087087	064064	100100	102102	100100	108108	070070
	ENS	3n	1	074074	087087	064064	100200	102102	100100	108108	070070
ENSS	4n	4	060087100	071087087	060064100	100100200				100100108	070100100
		1	060080087	071087087	064064100	100100100	100100102				
			100	087	100	200	102				

9	SS	2n	2	050080	087087	064064	100100	102102	100100	108108	070070
			2	074080	087087	064064	100100	102102	100100	108108	070070
10	C.elongat a	2n	1	050074	087100	064064	100100	102102	100100	108108	070070
			1	080080	095095	100100	100100	100100	100100	090090	100100
11	SS	2n	4	074080		100100	100100		100100		
			2	060060	087087	064064	100100	102102	100-200	108108	070070
			3	060080	087087	064064	100100	102102	100100	108108	070070
			1	074080		064064					
			2	080080		064064			100100		
	EN	2n	6	087100	071100	100100	100100		100100	100100	100100
			2	087113	071100	100100	100100	100100	100100	100100	100100
			1	087100	071100	060100	100100	100100	100100	100100	100100
	ENS	3n	1	060087113	071087100	064100100	100100200	100100102	100100100	100100108	070100100
			1	080087100	071087100	060100100	100100100	100100102	100100100	100100108	070100100
			3	080087113	071087100	064100100	100100100	100100102	100100100	100100108	070100100
			1	080087100	071085100	064100100	100100100	100100102	100100200	100100108	070100100
			2	080087100	071087100	064070100	100100100	100100102	100100200	100100108	070100100
			4	080087100	071087100	064100100	100100100	100100102	100100100	100100108	070100100
	EEN	3n	1	087113113	071100100	100100100	100100100	100100100	100100100	100100100	100100100
	EENS	4n	1	080087113 113	071087100 100	064100100 100	100100100 100	100100100 102	100100100 100	100100100 108	070100100 100
			1	080087100 113	071085087 100	064100100 100	100100100 100	100100100 102	100100100 100	100100100 108	070100100 100
	ENSS	4n	1	060080087 100	071087087 100	064064100 100	100100100 100	100100102 102	100100100 100	100100108 108	070070100 100
			1	074080087 100		064064100 100					

12	SS	2n	1	050060	087100	064064	100100	102102	100100	108108	070070	
13			1	050080	087087	064064	100100	102102	100100	108108	070070	
	EE	2n	1	100100	100100	070100	100100	100100	100100	100100	100100	
	NN	2n	5	087087	071071	100100	100100	100100	100100	100100	100100	
	EN	2n	3	087113	071100	100100	100100	100100	100100	100100	100100	
	EEN	3n	1	087100	071100	060100	100100	100100	100100	100100	100100	
				3	087100113	071085100	100100100	100100100	100100100	100100100	100100100	100100100
	ENN	3n	1	087100100	071085100	100100100	100100100	100100100	100100100	100100100	100100100	
			0	087087100	071071100	100100100	100100100	100100100	100100100	100100100	100100100	
			2	087087113	071071100	100100100	100100100	100100100	100100100	100100100	100100100	

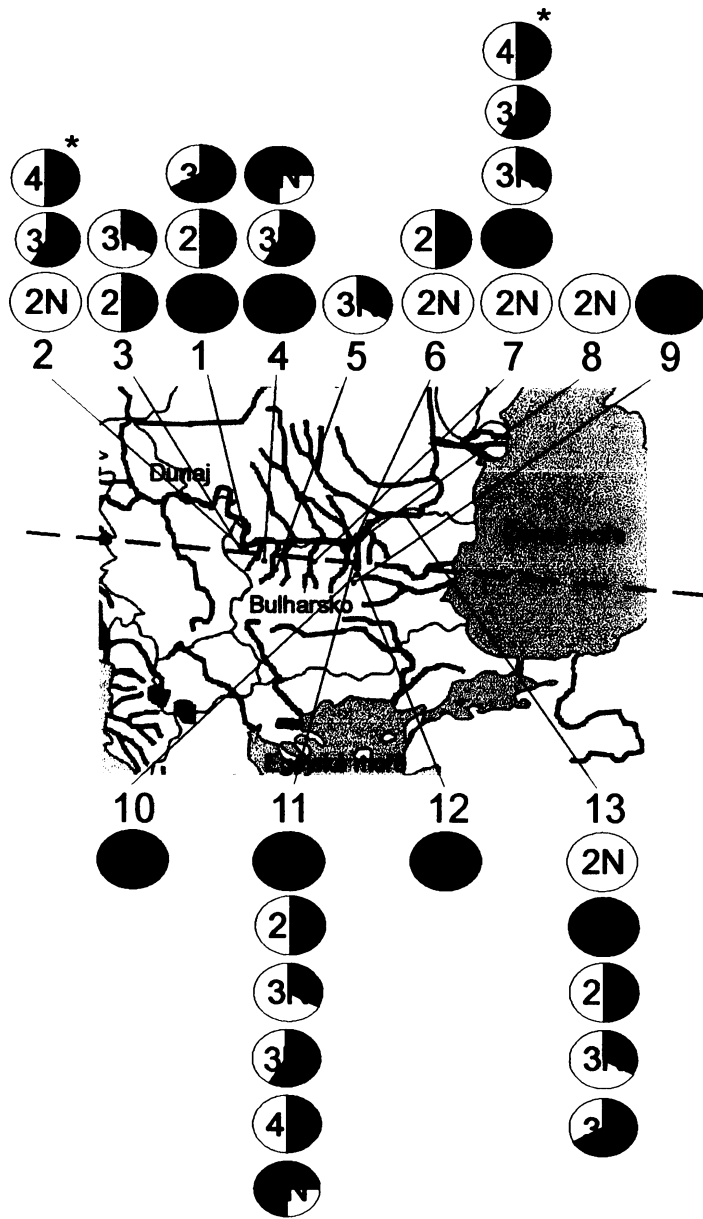
Tabulka 6: Porovnání fenotypu somatických buněk a vajíček

číslo lokality	vzorek	biotyp	tkáň	N	Gpi A	s-Aat	s-Mdh
2	Cob1	ENS	somatická		080087100	071100100	064100100
			vajíčka	12	080087100		
				10		071100100	064100100
	Cob.2	SS	somatická		060080	087087	064064
			vajíčka	14	060080		
				10		087087	064064
	B4-22	SS	somatická		080080	087100	064064
			vajíčka	10	080080		
				10			064064
	B4-23	EEN/EENS	somatická		080087100100	071087100100	060064100
			vajíčka	6	087100		
				5	087100100		
12					071100100	060100100	
3	Cob.3-B3	EEN	somatická		087113113	071085100	100100100
			vajíčka	12	087113113		
				10		071085100	100100100
				10			
4	B10-9	ENS	somatická		060087100	071087087	060064100
			vajíčka	12	060087100		
				10		071087087	060064100
	B10-10	ENS	somatická		060087100	071087087	060064100
			vajíčka	12	060087100		
				10		071087087	060064100
	B10-12	SS	somatická		074080	087087	064064
			vajíčka	12	074080		
				10		087087	064064
5	B14-2	EEN	somatická		087100113	071100100	060070100
			vajíčka	10	087100113		
				10		071100100	060070
	B14-10	EEN	somatická		087100100	071085100	
			vajíčka	12	087100100		
				10		071085100	060100100
6	B23-3	EE	somatická		113113	100100	100100
			vajíčka	10	113113		
				10		100100	100100
7	B25-4	EEN/EENS	somatická		060087100113	071100100	
			vajíčka	14	087100113		
				8		071100	060070
				3		071100100	060070
	B25-5	SS	somatická		080080	087095	064064
			vajíčka	9	080080		
				10		087095	064064
	B25-10	EEN	somatická		087100100	071100100	100100100
			vajíčka	10	087100100		
	10			071100100	100100		
11	B36-1	EN	somatická		087100	071100	100100

		vajíčka	16	087100		
			12		071100	100100
B36-2	EN	somatická		087100	071100	100100
		vajíčka	10	087100		
			10		071100	100100
B36-4	EN	somatická		087100	071100	100100
		vajíčka	12	087100		
			10		071100	100100
B36-7	EN	somatická		087113	071100	100100
		vajíčka	12	087113		
			10		071100	100100
B36-8	EEN	somatická		087113113	071100100	100100100
		vajíčka	10	087113113		
			10		071100100	100100100
B36-9	ENS	somatická		080087113	071087100	064100100
		vajíčka	10	080087113		
			10			064100
B36-10	EN	somatická		087100	071100	100100
		vajíčka	10	087100		
			10		071100	100100
B36-15	SS	somatická		060080	087087	064064
			4	060080		
		vajíčka	12		087087	064064

Příloha V:

Obr. 1:

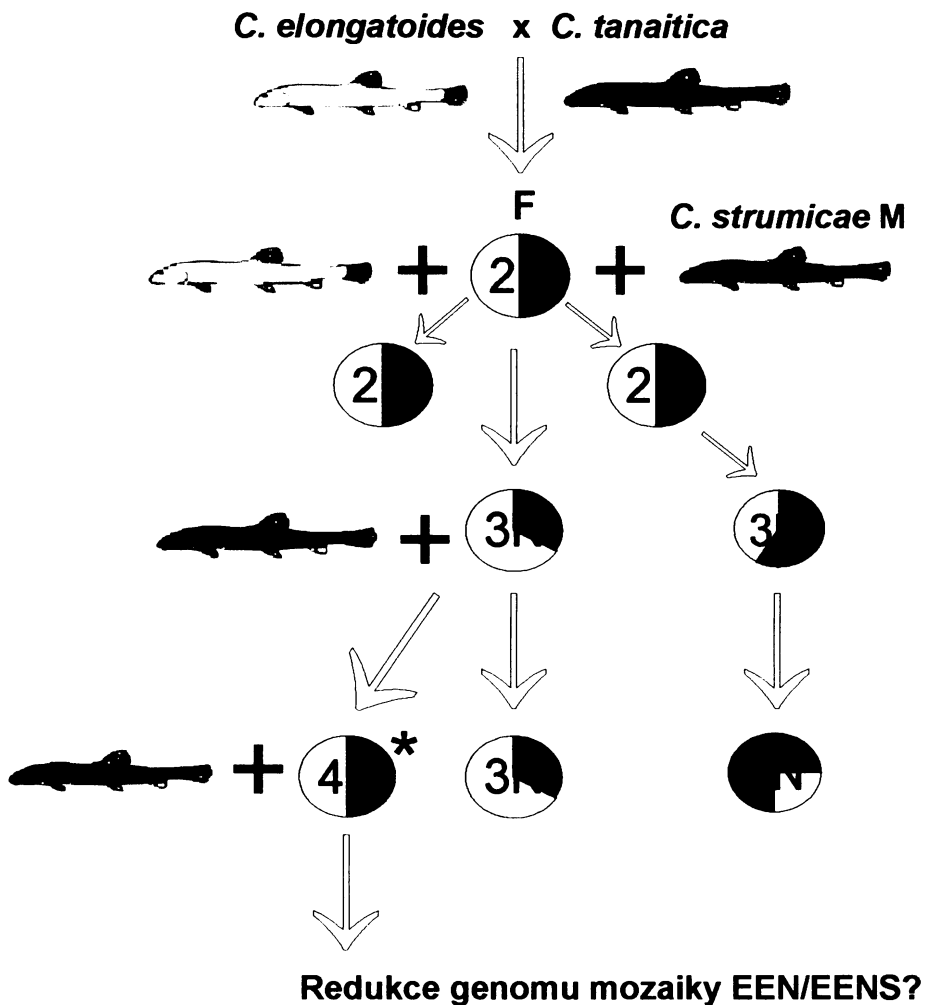


Handwritten notes:
 1. 2. 3. 4.
 2. 3. 4.

Obr. 1: Grafické znázornění lokalit (1-13, číslování odpovídá přehledu lokalit v příloze II). Nad či pod každým číslem lokality se nachází přehled přítomných biotypů dané

lokality. Žlutá – genom *C. elongatoides*, modrá – *C. tanaitica*, šedohnědá – *C. strumicae*, zelená *C. elongata*, 2n – diploid, 3n – triploid, 4n – tetraploid, * označuje mozaiku EEN/EENS Čárkovaná linie vymezuje zónu mezi rozšířením druhů *C. elongatoides* a *C. tanaitica* (na sever od linie) a *C. strumicae* (na jih od linie) v Bulharsku a předpokládanou oblast kontaktu hybridních biotypů pocházejících ze severu s *C. strumicae*, pocházejícího z jihu.

Obr. 2:



Obr. 2: Schéma návrhu směru hybridizace mezi druhy *C. elongatoides*, *C. tanaitica*, *C. strumicae* a vzniku diploidních a polyploidních gynogenetických hybridů známých z dunajských přítoků Bulharska. Kontakt spermie s diploidním či triploidním klonálním vajíčkem vede buďto pouze k aktivaci jeho rýhování bez genetického vkladu otce (gynogeneze) a udržení ploidní úrovně, anebo náhodná fúze zvyšuje ploidii potomka. Absence pentaploidů naznačuje, že hypoteticky vznikající tetraploidní vajíčka tetraploidních jedinců, jsou-li vůbec plodná, nejsou již dále oplodněna, pouze aktivována k embryogenezi.

M (samec), F (samice), * výskyt biotypu také jako mozaika EEN/EENS, žlutá – genom *C. elongatoides*, modrá - genom *C. tanaitica*, šedohnědá – genom *C. strumicae*, 2n – diploid, 3n – triploid, 4n – tetraploid.