

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

Mezidruhová kompetice spermií jeseterovitých ryb

Autor:	Bc. Hana Šachlová
Vedoucí diplomové práce:	Ing. Miloš Havelka, Ph.D.
Konzultant diplomové práce:	Ing. Martin Bláha, Ph.D.
Studijní program a obor:	Zootechnika, Rybářství
Forma studia:	Prezenční

České Budějovice, 2016

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění je elektronickou formou v databázi STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum: 6. 5. 2016

Podpis studenta:

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce Ing. Miloši Havelkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi poskytl v průběhu experimentu a zpracování této diplomové práce.

Dále děkuji Ing. Marku Rodinovi, Ph.D. a ostatním zaměstnancům VÚRH JU, kteří se na tomto experimentu podíleli, stejně tak jako svému konzultantovi Ing. Martinu Bláhovi, Ph.D.

Výsledky diplomové práce byly získány za podpory Grantové agentury ČR projektu GAČR 14-28375P (odpovědný řešitel: Ing. Miloš Havelka, Ph.D.)

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Hana ŠACHLOVÁ**
Osobní číslo: **V14N007P**
Studijní program: **N4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Mezidruhová kompetice spermií jeseterovitých ryb**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Jeseterovité ryby jsou jednou z nejstarších skupin obratlovců žijících na naší planetě a jejich polyploidní původ je předurčuje k častým mezidruhovým hybridizacím. Tyto mezidruhové hybridizace byly popsány jak ve volných vodách, tak i v akvakulturních chovech. Za posledních 60 let došlo k výrazné ztrátě přirozených výtěrových míst vhodných pro přirozenou reprodukci jeseterů. V důsledku toho stále častěji dochází k překryvu doby a místa jejich přirozeného výtěru. Toto může vést k situaci, kdy se v jednom místě a čase setkají různé druhy jeseterů, které se pak zapojí do společného tření. Výrazně se tak zvyšuje pravděpodobnost setkávání gamet těchto druhů a úspěšnost jejich spermií při oplození může hrát zásadní roli ve výsledném složení nově vznikající populace. Nicméně data týkající se mezidruhové kompetice spermií jeseterů v literatuře chybí.

Cílem této práce bude objasnit úlohu mezidruhové kompetice spermií vybraných druhů jeseterů při mezidruhové hybridizaci. Autorka práce se seznámí se základními charakteristikami gamet jeseterů. Dále se bude podílet na vytvoření skupin potomstva, které budou získány pomocí navrženého experimentálního designu zaměřeného na kompetici spermií vybraných druhů jeseterů. Hlavní náplní práce autorky pak bude detailní analýza rodičovství získaných jedinců z experimentálních skupin pomocí vybraných metod molekulární biologie.

Rozsah grafických prací: 5
Rozsah pracovní zprávy: 50 - 70
Forma zpracování diplomové práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

- Flajšans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Bohlen Šlechtová, V., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2012. Genetika a šlechtění ryb (Fish Genetics and Breeding), Druhé rozšířené a upravené vydání, FROV JU, 322 s.
- Dettlaff, T. A., Ginsburg, A. S., Schmalhausen, O. I., 1993. Sturgeon Fishes, Springer Berlin Heidelberg, 300 s.
- Ludwig, A., 2008. Identification of Acipenseriformes species in trade, Journal of Applied Ichthyology 24, 2-19 s.
- Dudu, A., Suciú, R., Paraschiv, M., Georgescu, S. E., Costache M., Berrebi, P., 2011. Nuclear Markers of Danube Sturgeons Hybridization, International Journal of Molecular Science 12(10), 753-760 s.
- Ludwig, A., Lippold, S., Debus, L., Reinartz, R., 2009. First evidence of hybridization between endangered starlets (*Acipenser ruthenus*) and exotic Siberian sturgeons (*Asipenser baerii*) in the Danube River, Biological Invasion, 753-760 s.
- Havelka, M., Hulák, M., Bailie, D. A., Prodöhl, P. A., Flajšans, M., 2013. Extensive genome duplications in sturgeons: new evidence from microsatellite data, Journal of Applied Ichthyology 29, 704-708 s.,

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Miloš Havelka, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant diplomové práce: **Ing. Martin Bláha, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání diplomové práce: **12. prosince 2014**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2016**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší 728/II
389 25 Vodňany (2)


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

dne

Obsah

1. Úvod	8
2. Literární přehled	9
2.1 Hybridizace	9
2.1.1 Mezidruhová hybridizace jeseterů	10
2.2 Pohlavní výběr.....	12
2.3 Reprodukčně izolační bariéry.....	13
2.4 Kompetice spermií	14
2.4.1 Adaptace gonád a spermií ve vztahu ke kompetici spermií.....	15
2.4.2 Semenná tekutina.....	17
2.4.3 Další faktory ovlivňující kompetici spermií	18
2.4.4 Alternativní reprodukční taktiky samců.....	19
2.5 Skrytá volba samic.....	20
2.6 Gamety chrupavčitých ryb	22
2.6.1 Základní aspekty spermií chrupavčitých ryb v porovnání s kostnatými rybami.....	22
2.6.2 Jikry chrupavčitých ryb	23
3. Materiál a metodika	25
3.1. Experimentální část	25
3.1.1 Původ a stáří generačních ryb	25
3.1.2 Příprava ryb na výtěr, teplotní a hormonální stimulace	26
3.1.3 Výtěr ryb	26
3.1.4 Oplození, aktivace pohlavních produktů a odlepkování	27
3.1.4.1 Určování motility a koncentrace spermií	27
3.1.4.2 Množství spermií a jiker použité pro oplození	28
3.1.5 Aktivace pohlavních produktů a odlepkování	28
3.1.6 Inkubace jiker a stanovení oplozenosti.....	30
3.1.7 Kulení, určování líhnivost, a vzorkování.....	30
3.2 Molekulární analýzy	31
3.2.1 Izolace DNA	31
3.2.2 Gelová elektroforéza	32
3.2.3 PCR amplifikace DNA	32
3.2.4 Analýza mitochondriální DNA (mtDNA).....	33

3.2.5	Fragmentační analýza mikrosatelů a jejich vyhodnocování.....	34
3.2.6	Zpracování výsledků	35
4.	Výsledky	37
4.1	Koncentrace spermií a jejich pohyblivost	37
4.2	Počet jiker	37
4.3	Oplozenost a líhivost	38
4.4	Zastoupení čistokrevného a hybridního potomstva v jednotlivých experimentálních skupinách.....	38
4.5	Přiřazení mateřství a otcovství.....	39
4.6	Celkový reprodukční úspěch analyzovaných druhů	40
5.	Diskuze	42
6.	Závěr	49
7.	Použitá literatura.....	50
8.	Abstrakt.....	65
9.	Abstract.....	66

1. Úvod

Jeseteři (Acipenseriformes) patří do nadřádu chrupavčitých ryb (Chondrostei) a jsou označováni jako žívoucí fosilie. Jde o jednu z nejstarších skupin obratlovců, u kterých evoluce trvá již více než 200 milionů let (Bemis a kol., 1997). Během této doby u nich došlo k několika duplikacím chromozomových sádek v buněčném jádře, které byly pravděpodobně spojeny s mezidruhovou či mezirodovou hybridizací (Fontana a kol., 2007). Současné druhy jeseterů jsou k častým mezidruhovým hybridizacím nejspíše předurčeny právě díky svému allopolyploidnímu původu (Billard a Lecointre, 2001).

Hybridi jeseterů se vyskytují jak ve volných vodách (Ludwig a kol., 2002, 2009; Dudu a kol., 2011), tak i v akvakultuře, kde jsou intenzivně využíváni (Zhang a kol., 2013). Jedním z hlavních důvodů nárůstu nepřírozené mezidruhové hybridizace jeseterů v přírodních podmínkách je snížení počtu přirozených výtěrových míst následkem antropogenních zásahů a tím následné zvýšení koncentrace různých druhů jeseterů v místech vhodných k reprodukci (Billard a Lecointre, 2001; Dudu a kol., 2011). Pokud dojde k překrytí času a místa přirozeného výtěru různých druhů, je překonána jedna z pre-kopulačních reprodukčních bariér a jeseteři se pak mohou zapojit do společné reprodukce. V místech společné reprodukce je zvýšena pravděpodobnost setkání gamet různých druhů a míra úspěšnosti spermií, a faktory ji ovlivňující, zde mohou mít zásadní význam při prevenci či naopak vzniku mezidruhové hybridizace.

Významnou post-kopulační reprodukční bariérou zabraňující mezidruhové hybridizaci je gametická izolace, která zahrnuje reprodukční bariéry působící od kopulace až po oplození (Coyne a Orr, 2004; Howard a kol., 2009). Kompetice spermií a skrytá volba samic mohou hrát důležitou roli právě v gametické izolaci mezi druhy, kde došlo k absenci jiných reprodukčních bariér (Coyne a Orr, 2004; Yeates a kol., 2013).

Cílem této práce bylo objasnit úlohu kompetice spermií a skryté volby samic při mezidruhové hybridizaci geneticky a fylogeograficky vzdálených druhů jeseterů, u kterých však již byla mezidruhová hybridizace v přírodních podmínkách zdokumentována.

2. Literární přehled

2.1 Hybridizace

Hybridizace je jedním z procesů speciace (Abbott a kol., 2013), při kterém potomstvo dědí strukturně pozměněné rodičovské geny získané během reprodukce jedinců s různými genotypy. Mezidruhá hybridizace je jedním ze základních speciálních mechanismů hlavně u rostlin, ale i živočichů jako jsou obojživelníci, hmyz či ryby (Abbott a Rieseberg, 2012).

Proces hybridizace má vliv na samotnou diferenciaci populací. Ta může být zpomalena nebo změněna, jelikož hybridizace umožňuje tok genů a jejich rekombinaci. Tím může být speciace urychlena prostřednictvím adaptivní introgrese nebo může dojít k téměř okamžité speciaci zmnožením chromozomových sádek při mezidruhé či mezirodové hybridizaci - allopolyploidie (Abbott a kol., 2013). Polyploidizací genomu hybridů vzniká jedna z reprodukčních bariér, která je důležitá k izolaci vzniklých hybridů a rodičovských druhů a která brání jejich vzájemnému rozmnožování (Baack a kol., 2007). Díky takovýmto bariérám pak vznikají nové taxony (Mallet, 2005). Vznik hybridních druhů je vysoce závislý na schopnosti obsadit nová nebo prostorově izolovaná stanoviště, v důsledku čehož dojde k prevenci kompetice a toku genů mezi hybridními a rodičovskými druhy (Abbott a Rieseberg, 2012).

Hybridizace v přírodě probíhá v tzv. hybridních zónách, což jsou oblasti, kde se překrývají místa výskytu rodičovských druhů. Dojde-li k hybridizaci mezi blízkými příbuznými druhy, vzniká často potomstvo, které je životaschopné a to díky různým mechanismům, jako je epistáze, rekombinace, či mutace (Burke a Arnold, 2001). Tyto mechanismy ovlivňují proces hybridizace a mění genetickou strukturu, díky které vznikají hybridní fenotypy. Ty mohou mít výrazný vliv na evoluci druhů. V těchto zónách vzniklí hybridi nemusí mít žádný vliv na původní rodičovské populace díky reprodukčním bariérám. Avšak hybridizace velmi ohrožuje populace s nízkou abundancí, protože může ovlivnit existenci rodičovského druhu a může vést až k jejímu úplnému vyhynutí (Rhymer a Simberloff, 1996).

Mezidruhá hybridizace je běžným jevem, během kterého se vzájemně rozmnožují jedinci dvou různých druhů (Leary a kol., 1995). U vzniklých hybridů dochází z velké části ke zlepšení mnoha fyziologických vlastností v porovnání s rodičovskými druhy

(Malett, 2008; Kocour a kol., 2011). Během hybridizace, kdy dochází ke zkřížení dvou vzdálených genotypů, mohou být kombinovány vlastnosti, které vedou k vyššímu heteróznímu efektu projevujícím se zvýšením fitness potomstva. Tím dochází k rychlejšímu růstu, vyšší životaschopnosti, flexibilitě, různým adaptacím a někdy i k rychlejšímu dovršení pohlavní dospělosti (Bartley a kol., 2001; Kocour a kol., 2011).

Přirozená mezidruhová hybridizace je u ryb pozorována i mezi taxonomicky vzdálenějšími druhy (Scribner a kol., 2001). Pokud je takový hybrid životaschopný, bývá zpravidla neplodný, neboť genetická neslučitelnost zabraňuje normálnímu vývoji jeho gamet, kdy nedochází ke správnému párování chromozomů v zygotenní profázi I meiotického dělení (Piferrer a kol., 2009).

Mallet (2005) udává, že v přírodě hybridizuje asi 25 % druhů rostlin a 10 % druhů živočichů. Dříve se předpokládalo, že mezidruhová hybridizace nehraje, právě vzhledem k neživotaschopnosti a sterilitě hybridů, v evoluci žádnou roli. Nicméně dnes tomu tak není, jelikož hybridy mohou být částečně fertily a mohou tak zprostředkovat tok genů mezi druhy (Mallet, 2005). Z tohoto důvodu je také hybridizace považována za hrozbu pro ohrožené druhy (Wolf a kol., 2001), včetně jeseterů.

Pokud dojde k výskytu druhů mimo areál jejich přirozeného rozšíření (nepůvodními druhy) a k jejich následnému křížení s původními populacemi, může dojít k outbrední depresi. Tento jev vede ke snížení fitness první generace v důsledku ztrát genetické variace anebo narušením ko-adaptovaných genových komplexů (Ludwig, 2006).

2.1.1 Mezidruhová hybridizace jeseterů

I když mezidruhová hybridizace mezi taxonomicky vzdálenými druhy obratlovců není častá (Arnold, 1997), neplatí to u paprskoploutvých ryb (Winfield a Nelson, 1991). U ryb je mezidruhová hybridizace častým jevem, jenž byl v přírodě mnohokrát zdokumentován (Benfey, 1989; Bronzi, 1999; Scribner a kol., 2001).

Jeseteři mohou díky svému allopolyploidnímu původu hybridizovat snadněji než jiné ryby (Birstein a kol., 1997). Během jejich evoluce došlo k několika polyploidizačním událostem, kdy se duplikovaly jejich chromozomové sádky v buněčném jádře (Ludwig a kol., 2001; Fontana a kol., 2007). Tyto duplikace byly pravděpodobně spojeny s mezidruhovou či mezirodovou hybridizací (Fontana a kol., 2007). Přirozená hybridizace jeseterů je oproti ostatním druhům ryb dále podpořena evolučním stářím,

blízkou genetickou příbuzností a podobnými požadavky na reprodukci (Billard a Leconte, 2001; Havelka a kol., 2011).

Jeseteři se vyznačují vysokým počtem chromozomů, díky kterému můžeme jeseterovité ryby (Acipenseriformes) zařadit do skupin dle obsahu DNA a počtu chromozomů v jejich buněčných jádrech. Rozdělují se na druhy s ~ 120 , $\sim 240 - 270$ a ~ 360 chromozómy. Se zvyšujícím se počtem chromozomů se u jeseterů nelineárně zvyšuje obsah DNA v jádře jejich buněk (Bytyutskyy a kol., 2012).

Jeseteři mezi sebou hybridizují bez ohledu na to, jestli mají stejnou či rozdílnou úroveň ploidie. Pokud dojde k mezidruhové hybridizaci v rámci jedné ploidní úrovně, obecně se předpokládá, že takovéto potomstvo bude plodné. Avšak pokud dojde k hybridizaci v rámci dvou různých ploidních úrovní, potomstvo je obecně považováno za funkčně neplodné (Hochleitner, 2004; Chebanov a Galich, 2011).

Mezidruhová hybridizace jeseterů není v přirozených podmínkách běžná (Ludwig a kol., 2002). Jednou z hlavních příčin nepřirozené mezidruhové hybridizace u jeseterů, je překrytí jejich populací v čase a místě jejich výskytu, v důsledku snížení počtu výtěrových míst zásahem člověka (Dudu a kol., 2011). Tyto změny přirozeného prostředí, jako je např. stavění přehrad, znemožňují jeseterům anadromní migrace do oblastí jejich přirozeného výtěru nebo přímo devastují přirozené výtěrové lokality. Různé druhy jeseterů se pak koncentrují pod přehradami či v omezených místech pro výtěr (Billard a Leconte, 2001). To vede k synchronní reprodukci druhů, které by se v přirozených podmínkách nesetkaly, v důsledku přirozených pre-kopulačních reprodukčních bariér.

Pro studium hybridizace u ryb je využíváno mnoha různých metod od morfologických, přes morfometrické až po metody molekulární, které využívají analýzy DNA (Peitts a kol., 1997; Costedoat a kol., 2004; Flajšhans a kol., 2013). Mezidruhová hybridizace byla u jeseterů po dlouhou dobu zjišťována na základě morfologických odlišností (Berg, 1948; Birstein a kol., 1997). Jelikož se jeseteři vykazují výraznou distribucí mezidruhové hybridizace a morfometrické plasticity (Nikolyukin, 1972), v mnoha případech je identifikace druhů a hybridů na základě morfologických kritérií uznávaných v ichthyologii nemožná.

Pomocí molekulárních a cytogenetických analýz bylo v přírodě detekováno několik hybridů jeseterů. Např. v řece Mississippi byli nalezeni hybridi lopatonosa velkého

(*Scaphirhynchus albus*) a lopatonosa amerického (*S. platyctus*; Tranah a kol., 2004), v řece Volze byli popsáni hybridní jesetera ruského (*Acipenser gueldenstaedtii*) a jesetera sibiřského (*A. baerii*; Jenneckens a kol., 2000), v Černém moři a dolním toku Dunaje byli identifikováni hybridní jesetera ruského, jesetera malého (*A. ruthenus*), jesetera hvězdnatého (*A. stellatus*) a vyzy velké (*Huso huso*; Dudu a kol., 2011) a v horním toku Dunaje pak byli nalezeni hybridní jesetera sibiřského a jesetera malého (Ludwig a kol., 2009).

Poslední zmiňovaný hybrid by se vůbec neměl v těchto vodách vyskytovat vzhledem k areálu původního rozšíření rodičovských druhů, kdy jeseter malý patří původem do Evropy a jeseter sibiřský je původem z Asie (Bemis a Kynard, 1997), kde obývá všechna povodí od řeky Ob až po řeku Kolyma (Ruban, 2005). Jeseter sibiřský se do vod evropských toků dostal pravděpodobně v důsledku úniku z akvakulturních chovů (Maury-Brachet a kol., 2008), kde je intenzivně využíván (Bronzi a kol., 2011). I přes společný nepřírozený výskyt by nemělo v přírodních podmínkách docházet k mezidruhové hybridizaci mezi těmito druhy vzhledem k jejich rozdílným preferencím podmínek prostředí. Rozdíly ve výtěrových teplotách a teplotách embryonálního vývoje mezi oběma druhy by měly vést k rozdílným reprodukčním dobám a místům výtěru a měly by hybridizaci zabránit. Jelikož ale byly narušeny přirozené migrace jesetera malého přehradou Jochenstein u německo-rakouských hranic, dochází ke shromažďování jedinců připravených k výtěru pod přehradou. Navíc v těchto místech klesá teplota vody díky alpské řece Inn ústící kousek nad touto přehradou do Dunaje. Nižší teplota tak podporuje reprodukci i embryonální vývoj jesetera sibiřského v této oblasti (Ludwig a kol., 2009). Kvůli hybridizaci mezi těmito druhy může v konečném důsledku dojít k úplnému vyhynutí jedné z původních populací jesetera malého v Dunaji.

2.2 Pohlavní výběr

Pohlavní výběr patří mezi evoluční procesy, kdy jednotlivci zlepšují své fitness prostřednictvím reprodukce (Darwin, 1871; Andersson, 1994). Během pohlavního výběru jsou upřednostňovány geny přinášející reprodukční výhody. Tyto geny nesou znaky, které jsou jedincem preferovány, a tak se četnost těchto genů v populaci zvyšuje (Birkhead a Pizzari, 2002).

Při pohlavním výběru se prosazují ti jedinci, kteří najdou zdatného partnera, reprodukují se a své geny předají potomkům. Tento proces začíná pre-kopulačním pohlavním výběrem, který probíhá před samotným pářením a dochází k soupeření mezi jedinci ať už stejného pohlaví či opačného pohlaví (intrasexuální pohlavní výběr).

Dále si jedinci vybírají svého partnera na základě jeho kvalit (intersexuální pohlavní výběr), kdy jsou uplatňovány tzv. sekundární pohlavní znaky, které bývají zřetelné převážně u samců. Mezi tyto znaky patří např. zbarvení či výrazné přívěsky (Andersson, 1994).

Pohlavní výběr se může projevit i po samotné kopulaci, kdy je nazýván post-kopulačním pohlavním výběrem a probíhá prostřednictvím kompetice spermií a skryté volby samic, které mohou mít hluboký efekt na tok genů a reprodukční úspěch (Parker, 1970; Snook, 2005; Bonduriansky a Chenoweth, 2009; Yeates a kol., 2013).

2.3 Reprodukčně izolační bariéry

Existuje mnoho definic druhu, ze kterých k nejrozšířenějším patří tzv. biologický koncept druhu. Ten je definován jako skupina jedinců, mezi kterými dochází k volnému toku genů, přičemž je reprodukčně izolován od druhů jiných (Mayr, 1995; Coyne a Orr, 2004). Z tohoto pohledu je pro vznik nových druhů s pohlavním rozmnožováním nezbytný vznik reprodukčních bariér (Coyne a Orr, 2004). Nicméně disperze druhu a s ní spojený tok genů mezi heterospecifickými populacemi umožňuje tyto reprodukční bariéry překonat.

Reprodukčně izolační bariéry omezují nebo zcela přerušují tok genů mezi populacemi různých druhů. K reprodukční izolaci dochází, pokud se dva taxony vyskytují alopatricky, populace se vyvíjí s malým rozptylem, anebo pokud jedinci setrvávají v podobných prostředích (Edelaar a kol., 2008).

Reprodukční bariéry zahrnují mechanismy, které brání výměně genů mezi pohlavně se rozmnožujícími jednotlivci z populací různých druhů a jsou řazeny do různých kategorií v závislosti na tom, kdy se během reprodukčního cyklu uplatňují. Reprodukčních bariér je celá řada a jsou děleny na prezygotické a postzygotické reprodukční bariéry (Coyne a Orr, 2004).

Prezygotické reprodukční bariéry: i) brání vzájemnému pohlavnímu výběru jednotlivců = pre-kopulační reprodukční bariéry, mezi které řadíme např. sexuální

nezájem odlišných druhů, izolaci míst výskytu či rozdílnou dobu vhodnou pro páření; ii) brání úspěšnému oplození = post-kopulační reprodukční bariéry. Post-kopulační reprodukční bariéry jsou jinak nazývány gametickou izolací a působí mezi kopulací a oplozením (Coyne a Orr, 2004). Projevuje se během ní gametická inkompatibilita, tedy nemožnost splynutí pohlavních buněk zabraňující vzniku zygoty. Při udržování gametické izolace mezi druhy hraje důležitou roli kompetice spermií a skrytá volba samic. Tyto jevy mohou bránit setkání geneticky nekompatibilních gamet v případě, kde existuje riziko post-kopulační hybridizace (Coyne a Orr, 2004; Yeates a kol., 2013).

Při působení postzygotických reprodukčních bariér zygota vzniká, ale později dojde ke snížení životaschopnosti či plodnosti hybridních potomků (Howard, 1999; Coyne a Orr, 2004). V přírodě je u hybridního potomstva mnohem častější jejich neplodnost než neživotaschopnost, kdy příčinou neplodnosti hybridů jsou poruchy při segregaci chromozomů v průběhu meiózy (Johnson a Kliman 2002, Coyne a Orr, 2004). Tyto postzygotické bariéry jsou lépe prozkoumány z hlediska genetického než z ekologického (Hatfield a Schluter, 1999).

Pokud nejsou reprodukční bariéry zcela kompletní, může docházet k mezidruhovému hybridizaci a následnému vzniku hybridního potomstva (Coyne a Orr, 2004). Darwin (1859) byl jedním z prvních, kdo si byl vědom významu konspecifických spermií jako prevence před hybridizací mezi blízkými příbuznými druhy. Preference konspecifických spermií před spermatem od heterospecifických druhů je stále více uznávána jako důležitá překážka pro hybridizaci a tok genů mezi blízkými příbuznými druhy (Arnold a kol., 1993; Howard, 1999). Mnoho druhů ryb využívá stejná výtěrová místa, třou se ve stejnou dobu, a proto je přítomnost spermií více různých druhů velmi pravděpodobná (Petersen a Warner, 1998). Vlivem reprodukčních bariér bývá při inseminaci konspecifickým i heterospecifickým spermatem zpravidla upřednostňováno konspecifické sperma (Howard, 1999).

2.4 Kompetice spermií

Kompetice spermií je forma pohlavního výběru, která se vyskytuje u mnoha zvířat (Møller a Birkhead, 1991; Birkhead a Møller, 1998; Simmons, 2001). Prvně byla popsána Parkerem (1970), který ji definoval jako soupeření mezi spermii dvou nebo více samců o oplodnění samičích vajíček. V roce 1997 Parker a kol. definovali riziko

a intenzitu kompetice spermií. Rizikem kompetice spermií je pravděpodobnost, že spermie samce budou soutěžit se spermii jiných samců. Intenzita kompetice spermií je rozsah překrytí spermatu různých samců, a proto je funkcí počtu samců, kteří se angažují v kompetici spermií a množství spermií, kterým přispívají samci k reprodukci (Parker a kol., 1997; Wedell a kol., 2002). Samci investují do produkce spermií dle rizika nebo intenzity kompetice spermií a to jak napříč druhy (Parker, 1998; Fitzpatrick a kol., 2009) tak i v rámci druhů (Wedell a kol., 2002).

Ryby představují jednu z nejrozšířenějších skupin obratlovců, u kterých se kompetice spermií intenzivně projevuje (Stockley a kol., 1997). Toto je dáno diversitou pářících systémů – od striktní monogamie, přes polyandrii až k masivní promiskuitě (Avisé a kol., 2002) a pro mnoho ryb s vnějším oplozením je kompetice spermií typická (Peterson a Warner, 1998). Můžeme se s ní ale setkat i u ryb s vnitřním oplozením (Apsbury, 2007). Kompetice spermií se vyskytuje jak na vnitrodruhové, tak na mezidruhové úrovni (Petersen a Warner, 1998).

Aby byly spermie jednotlivce úspěšnější než konkurenta, vede kompetice spermií k přizpůsobení se v chování samců jako je agrese, námluvy a páření či vznik sociálních systémů (Birkhead a Møller, 1992; Gomendio a Roldan, 1993; Petersen a Warner, 1998). Dále dochází k morfologickým i fyziologickým adaptacím, což má vliv na samčí gonády i na samotné spermie. U spermií jsou jejich kompeticí ovlivňovány některé fenotypové vlastnosti jako je velikost, délka, rychlost, pohyblivost a životnost (Morrow a Gage, 2000; Snook, 2005; Petersen a Werner, 1998), avšak tyto vlastnosti se mohou u jednotlivých taxonů lišit (Snook, 2005).

2.4.1 Adaptace gonád a spermií ve vztahu ke kompetici spermií

S teorií, že kompetice spermií vede k vyšší produkci spermií, přišel prvně Parker (1990a, 1990b), kdy vytvořil několik sérií modelů kompetice spermií a na jejich základě potvrdil, že se množství ejakulátu vyprodukované samci liší v rámci jednoho druhu v závislosti na riziku kompetice spermií. Následující srovnávací studie napříč druhy prokázaly, že kompetice spermií působí na zvýšení velikosti samčích gonád a vede ke zvýšení produkce spermií u různých taxonů např. savců (Harcourt, 1995), ptáků (Briskie a Montgomerie, 1992), obojživelníků (Jennions a Passmore, 1993) a hmyzu, konkrétně motýlů (Gage, 1994). U ryb se touto tematikou zabývali Stockley a kol.

(1997) a demonstrovali, že při větším potenciálu konkurence mezi druhy se jejich gonadosomatický index (GSI = poměr váhy gonád a celkové tělesné hmotnosti ryb) zvyšuje. Tato studie obsahuje data pro 89 rybích druhů a nejenže zaznamenává zvýšení GSI, ale i významné pozitivní korelace mezi rizikem kompetice spermií a počtem spermií v ejakulátu.

Zvýšená produkce spermií byla pozorována např. u mořského kněžníka dvoupruhého (*Thalassoma bifasciatum*), kdy bylo zjištěno, že tento druh ryby produkuje více spermií během páření ve skupinách, kdy je intenzita kompetice spermií vyšší, než při páření v párech (Shapiro a kol., 1994). Nicméně to, že se množství spermií s rostoucím rizikem jejich kompetice zvyšuje, neplatí plošně u všech druhů ryb. Důkazem může být studie u hlaváčovitých (Gobiidae) - hlaváče černého (*Gobius niger*) a hlaváče chutného (*Zosterisessor ophiocephalus*), kdy množství spermií se zvyšujícím se počtem konkurujících ryb klesá (Pilastro a kol., 2002).

Relativní hmotnost gonád je pozitivně korelována s intenzitou kompetice spermií nejen na mezidruhové úrovni (Stockley a kol., 1997), ale i na vnitrodruhové úrovni, a to především u ryb, u kterých existují samčí pářící taktiky (Taborsky, 1994; Petersen a Werner, 1998).

Výsledek kompetice spermií je závislý na kvalitě spermií, která je komplexem znaků a účinků spermií (Flegr, 2007; Smith, 2012). Kompetice spermií může participovat na evoluci konkurenceschopnějších spermií tím, že ovlivňuje jejich různé fenotypové vlastnosti. Tyto změny vlastností spermií se v reakci na kompetici spermií liší jak na vnitrodruhové, tak i na mezidruhové úrovni (Fitzpatrick, 2008).

Morfologické vlastnosti v kontrastu s kompeticí spermií byly popsány hlavně u savců (Moore a Birkhead, 1999; Ramm a Stockley, 2010). Kompetice spermií společně se skrytou volbou samic snižují variabilitu v morfologii spermií v rámci celého ejakulátu samce a mezi samci v populaci. Tato variabilita však nemusí být ovlivněna pouze postkopulačním výběrem ale i inbreedingem (Immler a kol., 2008). Variabilita ve velikosti spermií pravděpodobně přímo ovlivňuje reprodukční úspěšnost samců při oplození, jelikož u mnoha taxonů bylo zjištěno, že délka spermií je pozitivně korelována s jejich maximální rychlostí (Gomendio a Roldan, 1991; Snook, 2005).

I když byl v některých studiích potvrzen pozitivní vztah délky spermie a kompetice spermií různých taxonů (Gomendio a Roldan, 2008), u ryb je vztah délky spermie

a jejich kompetice obecně negativní a délka spermií se u ryb snižuje se zvyšující se kompeticí napříč druhy (Stockley a kol., 1997). Avšak existují u ryb i studie, kde je délka spermií pozitivně korelována se zvyšující se kompeticí, jako je tomu u cichlid (Cichlidae). U všech druhů polygammních afrických cichlid, které byly zkoumány, se délka spermií se zvyšující se kompeticí zvyšovala v porovnání s monogamními cichlidami (Balshine a kol., 2001). Navíc delší spermie u těchto cichlid vykazují vyšší rychlost (Fitzpatrick a kol., 2009), která má také vliv na úspěšnost spermií při jejich kompetici.

Dalšími vlastnostmi, které mají vliv na úspěšnost spermií při kompetici a úspěšnost oplodnění, jsou jejich pohyblivost, rychlost a životnost (Snook, 2005; Pizzari a Parker, 2009). Rychlost spermií se u některých druhů živočichů zvyšuje se vzrůstající intenzitou kompetice (Nascimento a kol., 2008; Fitzpatrick a kol., 2009). Pohyblivost a rychlost spermií byla zkoumána např. Gagem a kol. (2004) u lososa atlantského (*Salmo salar*), kdy bylo zjištěno, že spermie, které byly pohyblivější a rychlejší, měly vyšší pravděpodobnost, že najdou jikru a oplodní ji. Podobně byly studovány spermie u živorodky duhové (*Poecilia reticulata*; Boschetto a kol., 2011).

2.4.2 Semenná tekutina

Při kompetici spermií je nutné zohlednit celý ejakulát. Své opodstatnění má tedy i semenná tekutina, která tvoří jednu část ejakulátu, druhou složkou jsou spermie. Plasticita složení ejakulátu je ovlivněna sociální skladbou společenstva (Ramm a kol., 2015). Chemický obsah této tekutiny je komplex, který obsahuje celou řadu látek s širokou škálou působení (Simmons, 2001). Některé tyto vlastnosti semenné tekutiny se soustředí přímo na spermie, včetně účinku na jejich přežití, pravděpodobnost oplodnění a transport spermií (Eberhard a Cordero, 1995). Samci jsou schopni přizpůsobit chemické složení své semenné tekutiny v reakci na kompetici spermií (Simmons a Fitzpatrick, 2012). Dále je známo, že látky v semenné tekutině ovlivňují důležité fyziologické a behaviorální odezvy u samic (Eberhard, 1996; Simmons, 2001). Složení ejakulátu může mít tedy vliv nejen na paternitu konkurenčních samců, ale stejně i tak na plodnost samic (Gillot, 2003).

Ačkoliv složení semenné tekutiny bylo u ryb zkoumáno poměrně zevrubně (např. Alavi a kol., 2004a), existují pouze dvě studie, která se zaměřují na to, jestli semenná tekutina může ovlivnit vlastnosti spermií, které jsou v kompetici. Jedna ze studií byla

provedena u hlaváče chutné, u kterého se vyskytují samčí alternativní reprodukční taktiky. Bylo zjištěno, že úspěšnost spermií dominantních samců je negativně ovlivněna semennou tekutinou subdominantních samců, zatímco spermie subdominantních samců mají naopak lepší výsledky v přítomnosti semenné tekutiny dominantních samců. Interakce spermií a semenné tekutiny v ejakulátech konkurujících samců, kteří investují do obou složek, mohou tedy mít vliv na úspěch oplodnění v reakci na riziko kompetice spermií (Locatello a kol., 2013).

Výsledky studie u sivena alpského (*Salvelinus alpinus*) dokládají, že přítomnost vlastní semenné tekutiny samce při kompetici spermií nemusí mít pouze pozitivní vliv, ale i negativní. Pokud jsou totiž aktivovány spermie sivena alpského ve vlastní semenné tekutině, dochází k velkému inhibičnímu účinku počáteční aktivace spermií, kdy je počáteční pohyblivost u sivenů silný prediktor úspěšného oplození při kompetici spermií (Rudolfson a kol., 2015).

2.4.3 Další faktory ovlivňující kompetici spermií

Na kompetici spermií může mít vliv mnoho dalších faktorů. Svou roli při kompetici spermií může hrát také vzdálenost spermatu od jiker. Samec, který ejakuluje nejbližší k samici, dává svým spermiím jistou výhodu v boji o oplodnění jiker (Knapp a Neff, 2008). Vliv vzdálenosti samce od samice u ryb byl demonstrován např. Hutchingsem a kol. (1999) u tresky obecné (*Gadus morhua*) a Blanchfieldem a kol. (2003) u sivena amerického (*S. fontinalis*). Do vzdálenosti spermií od jiker může zasáhnout rychlost vody a vodní turbulence, která je způsobena okolím či samostatným třením. Jejich vlivem může dojít k rozptýlení spermatu a jiker ve vodě. Tím se úroveň kompetice spermií a pravděpodobnost úspěšného oplození jiker snižuje (Petersen a Warner, 1998).

Důležité pro kompetici spermií je také samotné načasování ejakulace kvůli koordinaci s jikrami, kdy je podstatné, aby se jikry střetly se spermiiemi v danou dobu. Pokud samec vypustí sperma dříve, spermie se můžou ve vodě difundovat a jejich koncentrace bude nižší (Levitan, 1998; Peterson a Warner, 1998) nebo pohyb spermií se zastaví dříve, než samice naklade jikry, či spermie úplně zahynou. Pokud dojde k opačnému případu, kdy samec vypustí ejakulát příliš pozdě, jikry mohou být oplodněny už jiným samcem (Hoysak a kol., 2004).

Dále může úspěšnost při kompetici spermií záviset i na stáří ryby. Například u živorodky duhové starší samci produkují delší a pomalejší spermie. Tedy pravděpodobnost oplodnění spermii staršího samce je při kompetici spermií snížena. Navíc při oplodnění spermatem starších samců, klesá fitness samice a genetická kvalita potomků (Gasparini a kol., 2010).

2.4.4 Alternativní reprodukční taktiky samců

Studium kompetice spermií u ryb je také usnadněno rozšířeným výskytem samčích alternativních reprodukčních taktik (Taborsky, 1994), což jsou rozdíly v chování jedinců, kdy se samci uvnitř druhu či populace snaží maximalizovat svůj reprodukční úspěch během páření či oplodňování jiker druhů s vnějším oplozením (Taborsky, 2008). Alternativní samčí taktiky se vytvořily v důsledku zvýšeného rizika kompetice spermií (Flannery a kol., 2013; Lewis, 2015). Největší variabilitu v alternativních reprodukčních taktikách vykazují právě ryby (Taborsky, 2008), což může být spojeno s tím, že se tyto taktiky vyvinuly pravděpodobně v důsledku jejich vnějšího oplození (Taborsky, 1994).

U ryb je nejznámější komplex guarder a sneaker (Taborsky, 1994; Taborsky, 2008). Samci mohou být buď teritoriální (guarder), kteří jsou dominantní a brání aktivně svá území. Tito samci během tření uvolňují menší počet spermií (Peterson a Warner, 1998; Taborsky, 1998). Riziko kompetice přichází od alternativních reprodukčních taktik neteritoriálních samců (sneaker), kteří nemají žádné předpoklady k obraně a hájení teritoria či lákání samic. Neteritoriální samci jsou na rozdíl od teritoriálních malí, pro samice neatraktivní, rychleji dospívají a jejich produkce spermií je vyšší (Vladič a kol., 2002). Tito subdominantní samci se třou nepozorovaně v blízkosti teritoriálních samců a v blízkosti samic a snaží se tak oplodnit jikry (Vladič a kol., 2002). Nevýhodné postavení subdominantních samců při konkurenci samčích spermií může být kompenzováno kvalitnějším spermatem, které mají hlavně mladší a menší jedinci (Taborsky, 1998, Evans a kol., 2003, Rudolfson a kol., 2006). Tato situace je známá např. u slunečnice velkoploutvé (*Lepomis macrochirus*; Andersson, 1994). U spermií neteritoriálních samců této ryby byla zpozorována až o 50 % vyšší intracelulární zásoba ATP. Ta je právě možným důvodem, proč jsou jejich spermie rychlejší (Burness a kol., 2004). Tyto alternativní reprodukční taktiky samců se vyskytují také u lososa

atlantského (Taborsky, 1994; Vladič a kol., 2002). U něj ale rozdíly životnosti u spermii dominantních a nedominantních samců nebyly přímo potvrzeny (Vladič a kol., 2002).

Dalším příkladem adaptace za účelem snížení rizika kompetice spermii samců či úplnému vyhnutí se kompetice spermii, můžou být reprodukční taktiky cichlid (*Lamprologus callipterus*) z jezera Tanganika, které se třou do prázdných ulit sladkovodních plžů (*Neothauma tanganyicense*). Velcí samci se u nich shromažďují a brání je, a i přesto drobní samci téhož či jiného druhu do nich mohou během tření vniknout a nepozorovaně tak oplodnit jikry uvnitř (Sato a kol., 2004; Wirtz-Ocaña a kol., 2013).

S dalším reprodukční strategií jako odpovědí na kompetici spermii se můžeme setkat u polyandriálních samic cichlidel mramorovaných (*Julidochromis transcriptus*), které jsou schopny kontroly otcovství. Samice využívají přírodní faktory k umístění své snůšky v oblastech, které k nim umožňují maximální přístup více samců. Tímto se zvyšuje šíření otcovství mezi dominantními a subdominantními samci (Kohda a kol., 2009).

Další alternativu, jak kompetici spermii předejít, lze pozorovat u hořavky duhové (*Rhodeus sericeus*). Samci aktivně navádějí samice ke sladkovodním mlžům (Unionidae, Margaritiferidae), které pak kladou jikry do jejich žaberní dutiny. Vedou je k mlžům, kde nejsou jiní samci nebo kde ještě nebylo vypuštěno sperma jiného samce (Smith a kol., 2002).

2.5 Skrytá volba samic

Samice mohou ovlivnit, s kterým ze samců zplodí potomstvo nejen před kopulací, ale i po kopulaci (Birkhead, 1998). Skrytá volba samic neboli selekce spermii je možnost samic ovlivnit oplození jiker manipulací spermii různých samců (Birkhead, 1998; Birkhead a Pizzari, 2002). Samice jsou schopny upřednostnit spermie jednoho samce před jinými, a tak získat např. lepší geny pro další generaci. U samic dochází k selekci na určité fenotypové znaky spermii a to může poskytnout výhodu některému ze samců při kompetici spermii (Thornhill, 1983). Tímto způsobem jsou samice schopny kontrolovat otcovství a mají tak možnost si aktivně vybírat spermie preferovaných samců (Birkhead, 1998). Skrytá volba samic může tedy zlepšit kvalitu potomstva a mít za následek samotnou polyandrii (Reinhold, 2002; Simmons, 2005). Skrytá samčí volba

tedy podporuje mezipohlavní konflikty a má tak vliv morfologické, fyziologické a behaviorální adaptace v evolučním procesu (Birkhead a Pizzari, 2002). Díky mezipohlavním konfliktům dochází k inter-sexuální koevoluci a selekci na různé samičí či samčí znaky (Miller a Pitnick, 2002). Šíření sexuálně vybraných vlastností u jednoho pohlaví vyvolává odpověď druhého pohlaví, která vede ke zvýšení inter-sexuální specializace (Birkhead a Pizzari, 2002; Székely a kol., 2010). Díky této koevoluci mezi oběma pohlavími může v důsledku dojít k reprodukční izolaci, divergenci populace, a nakonec i speciaci (Birkhead a Pizzari, 2002). Samice zvyšují pravděpodobnost oplodnění svých jiker samcem na úkor jiného samce různými způsoby (Eberhard, 1996). Princip skryté volby samic nebyl doposud dobře prostudován, přesto byla identifikována řada fyziologických a biochemických mechanismů u živočichů s vnitřním oplozením (Birkhead 2000; Birkhead a Pizzari, 2002). U druhů s vnějším oplozením mohou samice kontrolovat počet jiker, které vypustí v přítomnosti různých samců (Reyer a kol., 1999), anebo samotné jikry mohou rozlišovat mezi spermii biochemickými mechanismy (Zeh a Zeh, 1997).

Se selekcí spermií u ryb se můžeme setkat například u tichomořského lososa čavyča (*Oncorhynchus tshawytscha*). Spermie od různých samců mají signifikantně odlišné reakce při setkání s ovariálními tekutinami různých samic, kdy je ovlivněna jejich životnost, motilita, rychlost a napřímění trajektorie směrem k jikře. Samice tak upřednostňují samce s kompatibilními genotypy bez ohledu na jejich fenotyp. Selektce spermií je tedy řízena genetickou kompatibilitou mezi partnery (Rosengrave a kol., 2008). Navíc skrytá volba samic zvyšuje u tohoto druhu lososa nejen úspěšnost oplození, ale i embryonální přežití. Po stanovení genetické kvality samců multilokusovou metodou mikrosatelitních markerů bylo zjištěno, že přežití embryí je spojeno právě se skrytou volbou samic více kvalitních samců, kdy ukazatelem kvality samců byla vyšší genetická heterozygotita (Rosengrave a kol., 2016).

Jak je obecně známo, spermie jsou obvykle pohyblivé pouze krátkou dobu. U koljušky tříostné (*Gasterosteus aculeatus*) bylo zjištěno, že ovariální tekutina má výrazný vliv na životnost spermií. Spermie, které byly aktivovány pomocí média obsahujícího 25 % ovariální tekutiny, měly výrazně prodlouženou dobu pohyblivosti (Elofsson a kol., 2003). Podobný experiment byl proveden u sivena alpského, kdy bylo zjištěno, že ovariální tekutina má signifikantní vliv na pohyblivost, rychlost, životnost

a trajektorii spermií. Všechny tyto proměnné se zvyšovaly se zvyšující se koncentrací ovariální tekutiny. Za zvýšený pohyb spermií v ovariální tekutině je částečně zodpovědné její kationtové složení, které se mezi samice v rámci jednoho druhu může lišit. Složení a koncentrace ovariální tekutiny tak může potenciálně ovlivnit úspěšnost oplození a výsledek kompetice spermií (Turner a Montgomerie, 2002).

Při mezidruhovém křížení byl sledován poměr oplodnění jiker konspecifickým a heterospecifickým spermatem lososa atlantského a pstruha obecného (*S. trutta*; Yeates a kol., 2013). Bylo zjištěno, že i když je mezi oběma druhy vzájemná interfertilita, spermie jsou intenzivně přitahovány konspecifickou ovariální tekutinou a tudíž byl pozorován výrazně nižší podíl heterospecifického oplodnění u sledovaných druhů. Výsledky dokazují, že ovariální tekutina efektivněji přitahuje konspecifické spermie směrem k mikropyle. To se pravděpodobně děje díky rychle se vyvíjejícím specifickým proteinům, které jsou schopny rozpoznávat gamety mezi blízce příbuznými druhy. A tak je díky této chemotaxi podporována reprodukční izolace na úrovni gamet (Yeates a kol., 2013).

Je tedy známo, že existují interakce mezi ovariální tekutinou a spermii související se skrytou volbou samic a kompeticí spermií. K těmto vzájemným ovlivňováním patří například složení ovariální tekutiny, které může být mechanismem skryté samičí volby. Samičí ovariální tekutina obsahuje kationty jako je Mg^{2+} a Na^{+} . Tyto kationty mohou mít vliv na spermie a to tak, že mohou zvyšovat jejich pohyblivost a životnost (Linhart a kol., 2002). Nicméně interakce ovariální tekutiny se spermii nebyly doposud hlouběji prozkoumány. Často je obtížné rozlišit, zdali je samčí úspěch oplodnění způsoben skrytou volbou samic či spíše kompeticí spermií (Birkhead, 1998) a tyto dva fenomény nelze zcela oddělit (Coyne a Orr, 2004).

2.6 Gamety chrupavčitých ryb

2.6.1 Základní aspekty spermií chrupavčitých ryb v porovnání s kostnatými rybami

Tvar a stavba pohlavních buněk samců ryb závisí na příslušnosti k taxonomické skupině a způsobu oplození (Alavi a kol., 2008). Spermie kostnatých ryb (Teleostei) a chrupavčitých ryb (Chondrostei) mají jednoduchou strukturu. U kostnatých ryb hovoříme o tzv. aqua spermii (Jamieson, 1991). Hlavička spermie je kulovitá, střední část bičíku je velmi redukováná s centriolou a obsahuje 1 – 2 modifikované

mitochondrie, následuje zřetelně ukončený bičík bez laterálního lemu (Pšenička a kol., 2006). Nepřítomnost akrozomu nahrazuje jeden otvor ve vaječných obalech jikry - mikropyle (Ginsburg, 1968).

Spermie chrupavčitých ryb se od kostnatých liší ve více parametrech. Hlavička spermie chrupavčitých ryb je protáhlá a několikanásobně větší než u kostnatých ryb. Typickým znakem u chrupavčitých ryb je akrozom s posterolaterálními výběžky a jádrem, který obsahuje akrosomální enzymy napomáhající průniku spermie do jikry (Pšenička a kol., 2011a). Střední část obsahuje 2 – 9 mitochondrií. Bičík je zřetelně ukončen a má viditelný laterální lem (Pšenička a kol., 2007).

Pohybový aparát spermií obou skupin ryb je charakterizován dvěma centrálními mikrotubuly obklopenými devíti dublety postranních mikrotubulů nazývaných axon (Cosson, 1996). Energie pro pohyb spermií je využívána ve formě ATP z glykolytických a oxidačních reakcí. Spermie většiny sladkovodních kostnatých ryb se po kopulaci vyznačují krátkou periodou pohybu, která trvá méně než 2 min, kdežto u chrupavčitých ryb pohyb trvá několik minut až desítky minut (Billard a kol., 1995; Cosson, 2010; Alavi a kol., 2012). Motilita spermií je kontrolována složením semenné tekutiny a osmotickým tlakem a to hlavně u kostnatých ryb (Linhart a kol., 1991). U chrupavčitých ryb je pohyblivost kontrolována osmotickým tlakem pouze z části. Druhou část tvoří iontovým efekt (Linhart a kol., 1995; Billard a kol., 1999; Alavi a Cosson, 2006).

2.6.2 Jikry chrupavčitých ryb

Jikry jeseterovitých ryb jsou kulovitého nebo elipsovitého tvaru (Detlaff a kol., 1993), jsou lepkavé a velikost neoplozených jiker je variabilní v závislosti na druhu. Například u jesetera malého mají ovulované jikry velikost 1,8 – 2,8 mm (Hochleithner a Gesner, 1999) a u jesetera sibiřského je v rozmezí 2,4 – 4,9 mm (Billard a Lecointre, 2001). Jikry jeseterovitých ryb jsou chráněny silným obalem (chorionem) s desítkami mikropylárních otvorů na animálním pólu. Tento obal jikry je složen z 3 hlavních vrstev - nejsvrchnější alveolární vrstva s rosolovitou lepkavou vrstvou, zona radiata externa a zona radiata interna. V případě neoplozené jikry jsou těsně pod obalem kortikální alveoly, které v průběhu aktivace vodou bobtnají. Dále se zde nacházejí mitochondrie

a pigmentové, lipidové a žloutkové granule (Dettlaff a kol., 1993; Pšenička a kol., 2011b).

Pomocí mikropylárních otvorů spermie pronikají do jikry. Jikry chrupavčitých ryb mají několik takovýchto otvorů (Ginsburg, 1959) na rozdíl od jiker kostnatých ryb, které mají pouze jeden (Kudo, 1991). Počet mikropylí je u jeseterů variabilní, jak v rámci jedince, tak i druhu (Dettlaff a kol., 1993). Jikry jesetera malého mají 5 – 13 mikropylí (Dettlaff a kol., 1993), u jesetera sibiřského 3 – 16 (Debus a kol., 2008) a u jesetera ruského se můžeme setkat dokonce i s 52 mikropylemi (Dettlaff a kol., 1993). Vyšší počet mikropylí může poskytovat spermii výhodu snadnějšího nalezení vstupu do jikry. Nicméně se tím zvyšuje riziko polyspermatického oplození, které je pro embryo letální či může ovlivnit ploidii vzniklého embrya (Pšenička a kol., 2008a).

3. Materiál a metodika

V tomto experimentu byla sledována kompetice spermií a tendence spermií přednostně oplodnit konspecifické jikry při mezidruhové hybridizaci jesetera sibiřského a jesetera malého.

Prvotně byly vybrány vhodné ryby k výtěru. Následně byl proveden umělý výtěr, kde byly kříženy samice a samci jesetera sibiřského a jesetera malého podle navrženého experimentálního designu. Celkem bylo vytvořeno 5 experimentálních skupin a 4 kontrolní skupiny. Byla zjišťována oplozenost a líhnivost ryb v každé ze skupin a následovně byla provedena detailní analýza rodičovství potomstva z jednotlivých experimentálních skupin pomocí molekulárních markerů.

3.1. Experimentální část

3.1.1 Původ a stáří generačních ryb

Pro experiment byly použity generační ryby pocházející z uzavřeného chovu pokusného zařízení Genetického rybářského centra FROV JU ve Vodňanech.

U samic byla zjištěna zralost jiker pomocí biopsie. Ryby vhodné k reprodukci byly před plánovaným výtěrem umístěny do předem připravených bazénů v rybí líhni. Bylo použito celkem dvanáct ryb - tři od každého druhu a pohlaví.

V následujících tabulkách (tab. 1. a 2.) jsou uvedeny základní charakteristiky jednotlivých ryb použitých pro experiment.

Tab. 1. Základní údaje o samcích použitých k reprodukci.

Samci	Věk	Hmotnost (kg)	Délka těla (cm)
J. sibiřský S _{m1}	11	5,50	103
J. sibiřský S _{m2}	9	4,48	98
J. sibiřský S _{m3}	11	5,50	99
J. malý M _{m1}	6	0,91	57
J. malý M _{m2}	6	1,08	59
J. malý M _{m3}	11	1,30	60

Tab. 2. Základní údaje o samicích použitých k reprodukci.

Samice	Věk	Hmotnost (kg)	Délka těla (cm)
J. sibiřský S _{f1}	19	7,80	112
J. sibiřský S _{f2}	9	5,50	105
J. sibiřský S _{f3}	9	6,00	106
J. malý M _{f1}	11	1,25	60
J. malý M _{f2}	11	1,42	62
J. malý M _{f3}	11	2,04	72

3.1.2 Příprava ryb na výtěr, teplotní a hormonální stimulace

Před plánovaným výtěrem byly ryby teplotně stimulovány v nádržích o objemu 5 m³ umístěných v líhni, kde byla voda z recirkulačního systému vytemperována na 15 °C. Tato teplota byla udržována po dobu 7 dnů a poté byla provedena hormonální stimulace. Ryby nebyly po dobu teplotní stimulace krmeny.

Před hormonální stimulací byl použit hřebíčkový olej jako anestézie v množství 0,07 ml.l⁻¹. Pro samotnou hypofyzaci byla použita kapří hypofýza aplikovaná ve formě intramuskulární injekce suspenze ve fyziologickém roztoku do hřbetní svaloviny. Tato suspenze byla samcům podávána v dávce 4 mg.kg⁻¹ živé hmotnosti ryby 36 hodin před plánovaným výtěrem. U samic byla použita stejná suspenze ve dvou dávkách. První dávka byla aplikována v množství 0,5 mg.kg⁻¹ živé hmotnosti ryby 42 hodin před plánovaným výtěrem a druhá dávka po 12 hodinách a to v množství 4,5 mg.kg⁻¹ živé hmotnosti ryby.

3.1.3 Výtěr ryb

Samotný výtěr byl proveden dle metodické příručky Gela a kol. (2008). Samcům bylo odebráno sperma z urogenitální papily pomocí kanyly o průměru 5 mm při současně lehké masáži břišní krajiny do plastových nádob pro kultivaci buněk o objemu 100 ml. Tyto nádobky se spermatem byly uloženy pro krátkodobé uchování na led o teplotě 0 – 4 °C v termoboxu. Poté byla v laboratoři zjištěna motilita a koncentrace spermií.

Ovulované jikry byly odebrány po mikrochirurgickém naříznutí vejcovodů dle Štěcha a kol. (1999) a následným výtěrem pomocí břišní masáže do suchých misek. Jikry byly krátkodobě uchovány při teplotě 16°C ve vlastní ovariální tekutině, jejíž přebytek byl ihned po výtěru slit.

Během výtěru byl od každé z rodičovských ryb odebrán vzorek tkáně z prsní ploutve pro molekulární analýzy. Všechny 12 vzorků bylo uloženo v 96% etanolu.

3.1.4 Oplození, aktivace pohlavních produktů a odlepkování

3.1.4.1 Určování motility a koncentrace spermií

Pro určení množství spermií, které bylo použito pro oplození, byla nejdříve stanovena mikroskopicky motilita a koncentrace spermií.

Pohyblivost spermií byla určena tak, že byl vzorek spermatu nejdříve naředěn 1 : 50 destilovanou vodou, čímž bylo sperma aktivováno. Do naředěného spermatu byl přidán 0,1% pufr BSA (hovězí sérový albumin), aby se tak zabránilo přilepení spermií k mikroskopickému sklíčku. Motilita spermií byla sledována dle Rodiny a kol. (2004) pomocí mikroskopu Olympus BX 41.

Koncentrace spermií byla měřena v Bürkerově komůrce na Bürkerově hemocytometru a mikroskopu Olympus BX 41 při zvětšení 200×. Před stanovením koncentrace bylo sperma naředěno 100× v imobilizačním roztoku (10mM Tris, pH 8,5 a 100 mM sacharóza). Koncentrace spermií byla vypočtena tak, jak uvádí Caille a kol. (2006), kde počet spermií byl spočten v 16 čtvercích a vypočten dle následujícího vzorce:

$$\left[\frac{\left(\frac{1}{a^2} \times b \right) \times 1000}{N} \times 10^9 \right] \times \left[\frac{1}{V_1 + V_2} \right] \times \left[\frac{1}{V_3 + V_4} \right] \times \left[\sum (n \times N) \right]$$

kde: a = stěna čtverce (mm²)

b = hloubka čtverce (mm)

N = počet čtverců

n = počet spermií na čtverec

V₁ = objem spermatu (mm³)

V₂ = objem fyziologického roztoku s formaldehydem (mm³)

V₃ = celkové množství předředěného spermatu (mm³)

V₄ = objem přidaného imobilizačního roztoku (mm³)

Koncentrace spermií byla vyjádřena jako 10^9 ml^{-1} spermií ve spermatu.

3.1.4.2 Množství spermií a jiker použité pro oplození

Na základě získaných údajů o pohyblivosti a koncentraci byl objem spermatu od každého samce stanoven tak, aby se dosáhlo poměru $6,67 \times 10^4$ pohyblivých spermií na jednu jikru. Při použití 3 samců daného druhu to ve výsledku činilo 2×10^5 pohyblivých spermií na jednu jikru od každého druhu. Objemy spermií pro oplození od každého samce (V_{spz}) byly vypočteny dle následujícího vzorce:

$$V_{spz} = \frac{\left(\frac{spz_o \times O_t}{m_t} \right)}{(C_{mi} \times M_{mi})}$$

kde: spz_o = celkový počet pohyblivých spermií jednoho druhu na jikru = 2×10^5

O_t = celkový počet jiker ve skupině = 3×10^3 (ks)

m_t = počet samců daného druhu = 3 (ks)






















C_{mi} = koncentrace spermií samce

M_{mi} = pohyblivost spermií samce





Pro oplození bylo použito vždy celkem 3 000 jiker v každé experimentální i kontrolní skupině. Pokud probíhalo oplození ve skupině, kde byly jikry pouze od jednoho druhu, bylo použito vždy 1000 jiker od každé samice daného druhu. Pokud se jednalo o skupinu se dvěma druhy, kde byly použity jikry jak od jesetera malého, tak i od jesetera sibiřského, bylo použito od každé samice 500 jiker.

3.1.5 Aktivace pohlavních produktů a odlepkování

Stanovený počet jiker od daných samic byl smíchán dle experimentální skupiny a dán do plastových misek. Jikry od každé skupiny byly osemeněny odpovídajícím spermatem od příslušných samců (obr. 1.). Těsně před smísením s jikrami bylo sperma naředěno vodou ($15 \text{ }^\circ\text{C}$). Stykem spermií s vodou došlo k jejich aktivaci. Objem vody pro ředění byl vypočten tak, aby výsledná koncentrace spermií při oplození činila $3,75 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$.

	Skupina	Použité jikry		Použité sperma	
		J. sibiřský	J. malý	J. sibiřský	J. malý
Experimentální skupiny	A			×	
	B			×	
	C			×	
	D			×	
	E			×	
Kontrolní skupiny	F			×	
	G			×	
	Ab			×	
	Ar			×	

Obr. 1. Znárodnění vytvořených experimentálních a kontrolních skupin.

-  jikry od všech třech samic jesetera sibiřského
-  jikry od všech třech samic jesetera malého
-  sperma od všech třech samců jesetera sibiřského
-  sperma od všech třech samců jesetera malého

Po smíchání spermií s vodou a jikrami byla tato směs promíchávána po dobu 3 minut rukou. Následně byla přidána suspenze jílu sloužící k odstranění lepivosti jiker, která byla po 20 vteřinách míchání slita. Dále následovalo promývání jiker vodou s malým množstvím odlepkovací suspenze a to 3× po sobě, aby byly odstraněny přebytečné spermie a bylo zabráněno polyspermii (Gela a kol., 2008). Pro dostatečné odstranění lepivosti jiker byl použit 0,1% tanin (kyselina tříslová) po dobu 60 sekund. Poté byla opět přidána suspenze jílu a směs byla umístěna na elektronickou třepačku při otáčkách 200 rpm. Po 45 minutách odlepkování jílem byly jikry promyty vodou, aby byl odstraněn všechen zbylý jíl.

3.1.6 Inkubace jiker a stanovení oplozenosti

Promyté jikry po odlepkování byly přemístěny do inkubačních Kannengieterových lahví, které byly umístěny v odchovných kolíbkách o rozměrech 24 × 34, 5 × 107 cm o provozním objemu 0,08 m³. Průtok byl nastaven tak, aby došlo k výměně 30 – 40 % objemu vody v lahvích za minutu (Conte, 1988), čímž bylo zajištěno, že nedocházelo k odplavování jiker ven z lahví nebo toho, že se jikry neusazovaly na jejich dně. Teplota vody byla po dobu inkubace udržována na 15 °C a byla sterilizována UV lampou, aby bylo zamezeno výskytu plísňových onemocnění. Obsah kyslíku ve vodě se pohyboval okolo 9 mg.l⁻¹ O₂.

Pro stanovení oplozenosti bylo po 6 hodinách od oplození odebráno náhodně 100 oplozených jiker od každé skupiny a to celkem 3×. Jikry v této době jsou ve stádiu 4 – 8 buněk, což odpovídá druhému a třetímu rýhování, kdy je doba pro kontrolu oplozenosti nejvhodnější (Dettlaff a kol., 1993). Oplozenost byla stanovena podle rýhování animálního pólu. U oplozených jiker se animální pól rýhuje symetricky. Pokud však dojde k nesymetrickému rýhování animálního pólu, či k rýhování vůbec nedochází, jikra je neoplozena. Ze zaznamenaného počtu oplozených a neoplozených jiker byla vypočtena procentuální oplozenost u jednotlivých experimentálních a kontrolních skupin.

3.1.7 Kulení, určování líhnivost, a vzorkování

Masivní kulení embryí nastalo přibližně 7. den od oplození. V tomto období byla zvýšena výměna vody v systému, aby se voda organicky nezatěžovala rozpadajícími se obaly jiker a nedocházelo tak ke snižování kyslíku ve vodě a následným úhynům inkubovaných jiker i embryí (Gela a kol., 2012).

Hodnota líhnivosti pro každou skupinu byla stanovena jako podíl vylíhlých larev z celkového počtu jiker použitých v dané skupině a byla vyjádřena procentuálně. Larvy byly počítány individuálně po vykulení.

Pro následné molekulární analýzy bylo při počítání larev z každé experimentální skupiny odebráno náhodně 96 jedinců. Pro každou kontrolní skupinu bylo odebráno 24 larev. Všechny vzorky byly uloženy v 96% etanolu a uchovány v lednici při 4 °C.

3.2 Molekulární analýzy

Molekulární analýzy byly použity pro určení rodičovství u jedinců z experimentálních skupin. Po rutinní izolaci DNA byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR), fragmentační analýza mikrosatelitních markerů a následně byly vyhodnoceny genotypy pomocí softwaru. U experimentálních skupin, kde byly použity jikry obou druhů, bylo dále využito analýzy kontrolní oblasti mitochondriální DNA pro stanovení původu jedinců po materiální linii. U rodičovských jedinců bylo nejprve testováno 14 mikrosatelitních markerů. Na základě úrovně polymorfismu mikrosatelitů mezi rodiči bylo pro určování rodičovství vybráno 6 markerů - AciG 35 (Börk a kol., 2008), AfuG 135 (Welsh a kol., 2003), Aox 45 (King a kol., 2001), Spl 101, Spl 163 a Spl 173 (McQuown a kol., 2002). Z každé experimentální skupiny bylo analyzováno 96 náhodně vybraných jedinců a jejich genotypy byly porovnány se získanými genotypy rodičovských ryb.

3.2.1 Izolace DNA

Genomová DNA byla izolována z tkání pomocí kitu NucleoSpin® Tissue dle přiloženého návodu (Macherey-Nagel, 2012). Vzorky pro izolaci DNA byly připraveny do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml tak, že u larev bylo pomocí nůžek od jedince odstříhnuo kousek těla či byli jedinci použiti celí dle velikosti, aby měl vzorek cca 25 mg. U vzorků rodičů (z odebraných částí prsních ploutví při výtěru) byl vždy odstříhnut kousek odpovídající téže hmotnosti. Tkáň byla vždy rozstříhána na menší kousky (pro lepší rozpouštění) a bylo přidáno 200 μ l lyzačního pufru k rozpuštění membrán buněk a denuraci bílkovin a 20 μ l proteinázy pro rozštěpení proteinů a histonů. Po dobu 3 – 4 hodiny byla tato směs zahřívána při teplotě 56°C na termobloku při otáčkách 450 rpm. Během lyze byly vzorky 2 – 3 \times promíchány na vortexu nebo protřepány v ruce. Poté byl přidán další lyzační pufr (200 μ l) a vzorky byly zahřívány při 70 °C a 600 rpm. Po 10 minutách bylo přidáno ke vzorkům 210 μ l 96% etanolu k vysrážení detergentů a ostatních složek lyzačního roztoku, proteinu, solí a dalších nečistot a vzorky byly protřepány v ruce. Buněčný lyzát každého vzorku byl přenesen na izolační kolonku, jejíž součástí je silikátová membrána. Kolonky byly předem umístěny do 2,0ml sběrných zkumavek. Poté byly vzorky stočeny na centrifuze opět po dobu 1 minuty a 11 000 rpm. Po odstranění filtrátů ze sběrných zkumavek

byly kolonky umístěny zpět. Následovalo promytí kolonek s DNA vázanou na silikát promývacími pufrů (400 a 500 μ l), kdy po každém promytí byly vzorky opět stočeny a filtráty vylity. Poté byly kolonky vysušeny v centrifuze při 11 000 rpm, v čase 2 minut a následně přeneseny do nových mikrozkušavek o objemu 1,5 ml. Pro uvolnění DNA z kolonek bylo použito 50 μ l elučního pufru, který byl předem přehřátý na 70 °C, a vzorky byly stočeny při 11 000 rpm po dobu 1,5 minut. Vzorky s izolovanou DNA byly uchovávány v lednici při 4 °C.

3.2.2 Gelová elektroforéza

Kvalita extrahované DNA byla kontrolována pomocí gelové elektroforézy. Byl použit 1% agarózový gel - 0,5 g agarózy a 50 ml TBE pufru (Tris-borát-EDTA). Agaróza s pufrém se nechala přejít varem. Po zchladnutí bylo do gelu přidáno pro vizualizaci DNA fragmentů 5 μ l barviva GoldView (Guangzhou Geneshun Biotech Ltd., Čína). Gel byl nalit do formy a byl do něj vložen hřeben. Po ztuhnutí gelu bylo do vzniklých jamek nanášeno vždy 5 μ l vzorku DNA s 2 μ l vkládací pufr Loading Dye (TaKaRa Bio Inc., Japonsko). Elektroforéza byla nastavena na napětí 100 V a 50 minut. Po uběhnutí elektroforézy byly vzorky zkontrolovány pod UV zářením o vlnové délce 300 nm.

3.2.3 PCR amplifikace DNA

Pro fragmentační analýzu mikrosatelitů bylo zapotřebí amplifikovat žádoucí úsek DNA pomocí PCR. PCR reakce byla pro každý lokus provedena zvlášť.

Byla vytvořena reakční směs vždy pro příslušný počet vzorků. Složení reakční směsi je v tabulce 3. Celá příprava probíhala na ledu v termoboxu.

Tab. 3. Složení a objem reakční směsi pro PCR reakci na jeden vzorek.

Reagenty	Množství na 1 vzorek (μ l)
Master mix	5
Přímý primer	0,03
Zpětný primer	0,3
Univerzální fluorescenčně značený primer	0,3
Deionizovaná voda	2,87
Vzorek DNA	1,5
Celkem	10

Do reakční směsi byl přidán PP Master Mix (TopBio, Česká republika) obsahující 150 mM Tris-HCl, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, stabilizátory a aditiva. Dále byla přidána voda a 3 primery – přímý, zpětný a univerzální fluorescenčně značený primer. Přímý primer obsahoval sekvenci na 5' konci, která odpovídala sekvenci univerzálního primeru, jenž byl použit pro daný lokus (Schuelke, 2000). Všechny reagenty pro příslušný počet vzorků byly smíchány do jedné mikrozumavky o objemu 1,5 ml a promíchány na vortexu. Objem PCR reakční směsi byl rozdělen po 10 μl do PCR destičky, poté byl přidán příslušný vzorek templátové DNA (1,5 μl) a destička byla uzavřena víčky. Následně byly vzorky v destičce promíchány na vortexu a před vložením do termocykleru byly stočeny na odstředivce. V termocykleru byl spuštěn program pro „Touchdown PCR“ (tab. 4.). Po skončení programu byly PCR produkty vyjmuty z termocykleru a opět zkontrolovány pomocí elektroforézy (viz kapitola 3.2.2)

Tab. 4. PCR protokol pro amplifikaci DNA.

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94	180	
Denaturace	94	30	
Nasedání	63 – 54 (-1 / cyklus)	45	10
Elongace	72	45	
Denaturace	95	30	
Nasedání	53	45	20
Elongace	72	45	
Finální elongace	72	600	

3.2.4 Analýza mitochondriální DNA (mtDNA)

U rodičovských samic a také u jednotlivců ze skupin A, B, a C, kde byly použity jikry od obou druhů, byla provedena analýza mtDNA. Pro PCR reakci byly použity již izolované vzorky DNA. Pro amplifikaci 620 bp kontrolní oblasti mtDNA byl použit standardní protokol pro PCR (tab. 5., Muge a kol., 2008).

Tab. 5. PCR protokol pro amplifikaci mitochondriální DNA.

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Úvodní denaturace	95	120	
Denaturace	95	60	5
Nasedání	53	60	
Elongace	72	60	
Denaturace	95	30	30
Nasedání	53	45	
Elongace	72	60	
Finální elongace	72	720	

PCR produkty byly purifikovány s použitím kitu NucleoSpin® Extrakt II (Macherey-Nagel, Německo), kdy byl do nich nejdříve přidán vazebný pufr NTI (50 µl). Poté byly vzorky přeneseny na kolonky a centrifugovány při 11 000 rpm po dobu 30 sekund. Membrány byly promyty pomocí NT3 pufru (500 µl) a vysušeny v centrifuze při 11 000 rpm během 2 minut a následně přeneseny do nových mikrozkušavek o objemu 1,5 ml. Ke každému vzorku bylo přidáno 30 µl NE pufru a poté byly kolonky centrifugovány.

Následovala kontrola PCR produktů na 1,5% gelové elektroforéze při 100 V a 50 min. Poté byly vzorky přeneseny na platíčko a odeslány na sekvenaci do společnosti MacroGen Europe Inc. v Nizozemí.

3.2.5 Fragmentační analýza mikrosatelů a jejich vyhodnocování

Nejdříve bylo nutné PCR produkty zředit kvůli rozdílné intenzitě jejich amplifikace, tak, aby se dosáhlo vyrovnaných hodnot koncentrace amplifikovaných fragmentů (tab. 6.).

Tab. 6. Multiplexy pro fragmentační analýzu s názvy mikrosatelitních lokusů, univerzální primery s použitými fluorofory a množství deionizované vody pro zředění PCR produktů

Multiplex pro fragmentační analýzu	Název mikrosatelitního markeru	Univerzální fluorescenčně značený primer		Objem deionizované vody (μl)
		Univerzální primer	Použitý flouorofor	
Spl	Spl 163	M13R	FAM	40
	Spl 101	Hillyer	VIC	40
	Spl 173	CAG	NED	20
AAA	AfuG 135	M13R	VIC	20
	Aox 45	CAG	NED	10
	AciG 35	M13R	FAM	10

Po naředění byla dle příslušného počtu vzorků připravena směs deionizovaného formamidu (HIDI) o objemu 10 μl na vzorek a velikostního standardu LIZ 600 o objemu 0,5 μl na vzorek. Tato směs byla promíchána a odměřena do speciálního platíčka do sekvenátoru. Poté byly přidány PCR produkty o objemu 0,5 μl a to dle daného multiplexu.

Takto připravené vzorky byly přikryty fólií, promíchány na vortexu, krátce stočeny a vloženy do termocykleru na 5 minut při 95 °C. Po denaturaci byly vzorky rychle schlazeny na ledu po dobu 5 minut. Následně byly vloženy do automatického kapilárního sekvenátoru ABI 3500 (Applied Biosystems, TM), kde byla provedena fragmentační analýza.

3.2.6 Zpracování výsledků

Zpracování výsledků fragmentační analýzy a určení genotypů bylo provedeno pomocí softwaru GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems, TM).

Byly určeny genotypy všech rodičovských jedinců na lokusech AciG 35, AfuG 135, Aox 45, Spl 101, Spl 163 a Spl 173. Pro kontrolu správného určování rodičovských genotypů bylo využito analýzy dědičnosti alel mezi rodiči a potomky v kontrolních skupinách. Na základě získaných údajů bylo standardizováno skórování alel.

Po určení genotypů rodičů byly skórovány alely všech analyzovaných potomků z každé experimentální skupiny na všech analyzovaných lokusech. Velikosti jednotlivých alel byly zapisovány do tabulky Microsoft Excel 2010 (Microsoft, 2010)

a na základě získaných genotypů bylo provedeno určení rodičovství u každého z jedinců.

U skupin, kde byly použity jikry od obou druhů, byla dodatečně analyzována kontrolní oblast mtDNA. Získané nukleotidové sekvence kontrolní oblasti byly zpracovány v programu Geneious 6.1.8 (<http://www.geneious.com>, Kearse a kol., 2012). Získané haplotypy analyzovaného potomstva byly porovnány s haplotypy rodičovských samic, a tak byl určen jejich původ potomstva po maternální linii. To výrazně usnadnilo určení rodičovství u jedinců z experimentální skupiny C a přispělo k určení maternálního původu u skupin A a B.

4. Výsledky

4.1 Koncentrace spermií a jejich pohyblivost

Koncentrace spermií a procento pohyblivých spermií se v rámci druhu vzájemně lišily. Při přímém pozorování neředěného spermatu pomocí mikroskopie v tmavém poli bylo zjištěno, že většina spermií jesetera malého a jesetera sibiřského nevykazovala žádnou pohyblivost. Bičík byl rovný a mírně se chvěl. Po následném zředění spermatu destilovanou vodou se pohyblivost spermií zvýšila na 42 – 98 % u jesetera malého a na 82 – 91 % u jesetera sibiřského.

Koncentrace pohyblivých spermií se u jesetera malého pohybovala v rozmezí $1,61 \pm 0,05 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ – $3,35 \pm 0,07 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ a u jesetera sibiřského v rozmezí $1,03 \pm 0,05 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ – $1,94 \pm 0,03 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$. Jednotlivé hodnoty koncentrace a pohyblivosti spermií všech samců jsou uvedeny v tabulce 7.

Tab. 7. Hodnoty koncentrace spermií a pohyblivosti spermií od každého samce.

Samci	Koncentrace spermií (10^9 ml^{-1})	Pohyblivost spermií (%)
J. sibiřský S_{m1}	$1,03 \pm 0,05$	$89 \pm 3,30$
J. sibiřský S_{m2}	$1,94 \pm 0,03$	$82 \pm 2,82$
J. sibiřský S_{m3}	$1,30 \pm 0,05$	$91 \pm 4,50$
J. malý M_{m1}	$2,11 \pm 0,03$	$49 \pm 3,55$
J. malý M_{m2}	$3,35 \pm 0,07$	$42 \pm 4,65$
J. malý M_{m3}	$1,61 \pm 0,05$	$98 \pm 1,25$

4.2 Počet jiker

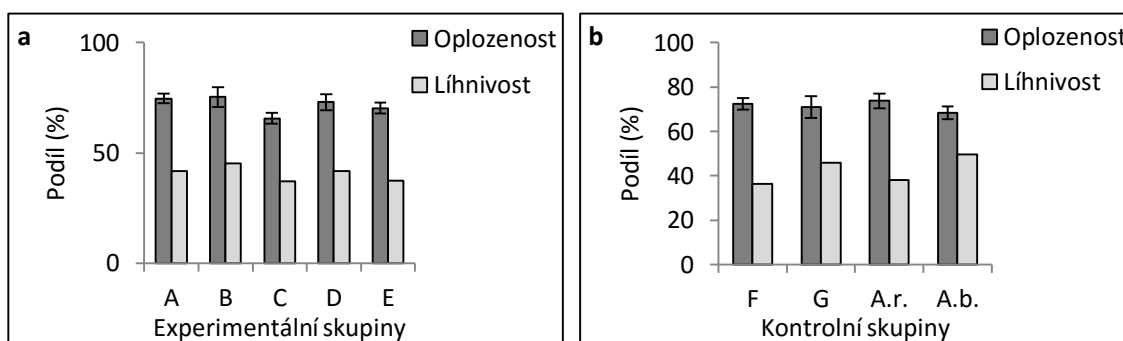
Množství jiker odebraných od samic jesetera malého se pohybovalo v rozmezí 92 – 110 ks na 1 g a u jesetera sibiřského 37 – 73 ks jiker na 1 g. Počty jiker v 1 g od každé samice jsou uvedeny v tabulce 8.

Tab. 8. Počet jiker od každé samice.

Samice	Počet jiker ks.g ⁻¹
J. sibiřský S _{f1}	37 ± 1,67
J. sibiřský S _{f2}	52 ± 2,06
J. sibiřský S _{f3}	73 ± 2,14
J. malý M _{f1}	110 ± 2,48
J. malý M _{f2}	111 ± 3,70
J. malý M _{f3}	92 ± 3,52

4.3 Oplozenost a líhivost

Oplozenost se v experimentálních skupinách pohybovala mezi 65,7 – 75,3 % a v kontrolních skupinách mezi 65,3 – 73,7 %. Líhivost z Kannengiterových lahví byla v rozmezí 37,1 – 45,4 % v experimentálních skupinách a 36,4 – 49,5 % v kontrolních skupinách. Hodnoty oplozenosti a líhivosti ve všech experimentálních a kontrolních skupinách znázorňuje graf 1a a 1b.



Graf 1: Hodnoty oplozenosti a líhivosti a) v experimentálních skupinách; b) v kontrolních skupinách.

4.4 Zastoupení čistokrevného a hybridního potomstva v jednotlivých experimentálních skupinách

Ve skupině A a B byly jikry jesetera malého a jesetera sibiřského smíchány dohromady a osemeněny buď spermatem jesetera malého (skupina A), anebo spermatem jesetera sibiřského (skupina B). Výsledné potomstvo v obou skupinách obsahovalo téměř stejný poměr hybridních a čistokrevných jedinců (tab. 9.). V případě skupiny A, kde byly jikry obou druhů osemeněny spermatem jesetera malého, bylo čistokrevných potomků 52,6 % a hybridních potomků 47,4 %. Ve skupině B, kdy byly

opět jikry obou druhů osemeněny tentokrát spermatem jesetera sibiřského, bylo identifikováno 47,9 % čistokrevných potomků a 52,1 % hybridního potomstva.

Ve skupině C byly smíchány jak jikry, tak i sperma obou dvou druhů. Čistokrevného potomstva bylo celkem 48,4 %, přičemž 38,9 % potomstva tvořil jeseter malý a 9,5 % jeseter sibiřský. Na 51,6% hybridního potomstva se podílel hybrid jesetera malého a jesetera sibiřského (*A. ruthenus* ♀ × *A. baerii* ♂) z 11,6 % a hybrid jesetera sibiřského a jesetera malého (*A. baerii* ♀ × *A. ruthenus* ♂) ze 40 % (tab. 9.).

Výsledky ze skupiny D a E, kde byly osemeňovány jikry buď jesetera sibiřského, anebo jesetera malého směsným spermatem obou druhů jeseterů, jsou znázorněny v tabulce 9. Z výsledků u skupiny D, kde byly osemeňovány jikry jesetera sibiřského směsným spermatem obou druhů, vyplývá, že čistokrevných potomků bylo 18,1 % a zbývajících 81,9 % bylo hybridů. Ve skupině E byly osemeněny směsným spermatem jikry jesetera malého. Výsledné potomstvo bylo složeno ze 75,8 % čistokrevných jedinců a zbylých 24,2 % tvořili hybridní jedinci.

Tab. 9. Počty čistokrevného a hybridního potomstva u jednotlivých experimentálních a kontrolních skupin.

Skupina		Potomstvo					Celkem analyzovaných vzorků
		M × M	S × S	M × S	S × M	N	
Experimentální skupiny	A	50	-	-	45	1	96
	B	-	46	50	-	-	96
	C	37	9	11	38	1	96
	D	-	17	-	77	2	96
	E	69	-	22	-	5	96
Kontrolní skupiny	F	-	-	-	24	-	24
	G	-	-	24	-	-	24
	A.r	24	-	-	-	-	24
	A.b	-	24	-	-	-	24

Pozn.: M × M = čistý druh – jeseter malý (*A. ruthenus*), S × S = čistý druh – jeseter sibiřský (*A. baerii*), M × S = hybrid jesetera malého a jesetera sibiřského (*A. ruthenus* ♀ × *A. baerii* ♂), S × M = hybrid jesetera sibiřského a jesetera malého (*A. baerii* ♀ × *A. ruthenus* ♂), N = neidentifikovaní jedinci.

4.5 Přiřazení mateřství a otcovství

Ve skupinách A, B a C byly osemeňovány smíšené jikry jesetera malého a jesetera sibiřského, a to buď spermatem každého druhu zvlášť (skupiny A a B), anebo směsným

spermatem obou druhů (skupina C). Celkové množství potomstva zplozeného samicemi jesetera malého a jesetera sibiřského znázorňuje tabulka 10. Na celkovém počtu potomků z těchto skupin se ze 48,25 % podílel jeseter sibiřský a z 51,75 % jeseter malý. Z výsledků je patrné, že jikry žádného z druhů nevykazovaly schopnost „přitahovat“ konspecifické spermie, tedy spermie stejného druhu a ovlivnit tak výsledný poměr čistokrevného a hybridního potomstva.

Tab. 10. Přiřazené mateřství – výsledný počet potomků jesetera malého (*A. ruthenus*) a jesetera sibiřského (*A. baerii*) ve skupinách, kde byly smíseny jikry obou druhů. Pro názornost jsou uvedeny i hodnoty pro skupiny s nesmísenými jikrami.

Druh	Smísené jikry (A, B, C)		Nesmísené jikry (D, E)	
	Počet	%	Počet	%
J. sibiřský	138	48,25	94	50,81
J. malý	148	51,75	91	49,19

V případech, kdy bylo použito směsné sperma jesetera malého a jesetera sibiřského a spermie tak byly v kompetici (skupiny C, D a E), bylo celkem 78,93 % potomstva zplozeno jeseterem malým a 21,07 % potomstva jeseterem sibiřským (tab. 11.).

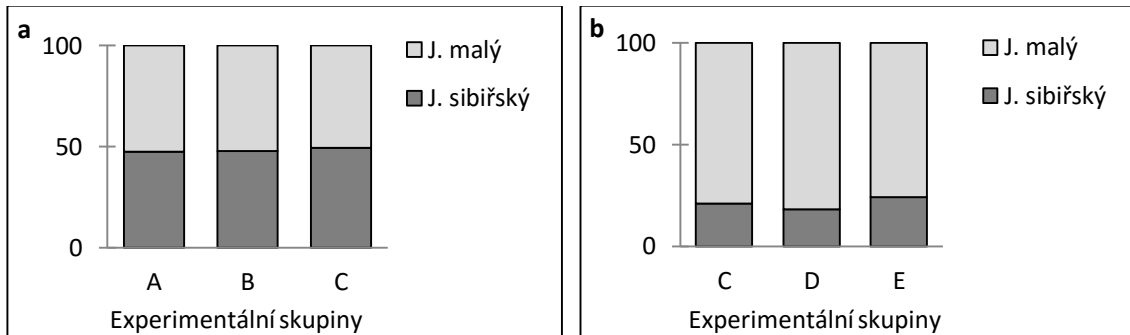
Tab. 11. Přiřazené otcovství – výsledný počet potomků, kdy byly spermie v kompetici (směsné sperma obou druhů). Pro názornost jsou uvedeny i hodnoty pro skupiny, kde spermie v kompetici nebyly.

Druh	Směsné sperma (skupiny C, D, E)		Nesmísené sperma (skupiny A, B)	
	Počet	%	Počet	%
J. sibiřský	59	21,07	96	50,26
J. malý	221	78,93	95	49,74

4.6 Celkový reprodukční úspěch analyzovaných druhů

Graf 2a a 2b znázorňuje celkový reprodukční úspěch jesetera sibiřského a jesetera malého v jednotlivých skupinách. Z grafu 2a, kdy byly smíseny jikry samic (skupiny A, B, C), je patrné, že samice obou druhů jeseterů se na výsledném potomstvu podílely téměř stejnou měrou a vykazovaly tedy shodný reprodukční úspěch. Graf 2b zobrazuje experimentální skupiny, kdy osemeňování jiker probíhalo směsným spermatem obou

druhů (skupiny C, D a E). V tomto případě byl ve všech skupinách, kde byly spermie v kompetici, výrazně úspěšnější jeseter malý, kdy se hodnoty potomstva zplozeného tímto jeseterem pohybovaly mezi 75,8 – 81,9 %, dokonce i tehdy, kde byly přítomny pouze heterokonspecifické jikry jesetera sibiřského (skupina D). To jasně ukazuje na vyšší oplození schopnost spermií jesetera malého v porovnání s jeseterem sibiřským, a to bez ohledu na druhový původ jiker.



Graf 2: Procentuální reprodukční úspěch jesetera sibiřského (*A. baerii*) a jesetera malého (*A. ruthenus*) v experimentálních skupinách a) kde byly smíseny jikry; b) kde bylo smíšeno sperma.

5. Diskuze

Kompetici spermií a skryté volbě samic nebyla u jeseterovitých ryb prozatím věnována pozornost, jako tomu bylo doposud u jiných rybích druhů (např. Vladič a kol., 2002; Fitzpatrick a kol., 2009; Yeates a kol., 2013 a další). Tyto post-kopulační bariéry byly studovány hlavně mezi rybami téhož druhu, přestože mezidruhovú hybridizace není u ryb vzácným jevem (Campton, 1987; Scribner a kol., 2001). Navíc jeseteři mohou tvořit hybridy snadněji než jiné ryby (Birstein a kol., 1997). A právě kompetice spermií společně se skrytou volbou samic patří mezi významné reprodukční bariéry, které nepřírozené mezidruhovú hybridizaci zabraňují (Coyne a Orr, 2004).

Zvolené druhy jeseterů, tedy jeseter malý a jeseter sibiřský, byly vybrány s ohledem na zdokumentovaný výskyt jejich hybridů ve volné přírodě (Ludwig a kol., 2009) a dále s ohledem na jejich genetickou i fylogeografickou vzdálenost (Peng a kol., 2007; Krieger a kol., 2008) a v neposlední řadě také s ohledem na jejich rozdílné ploidní úrovně (Havelka a kol., 2011).

Geografický výskyt jesetera malého a jesetera sibiřského je důležitou pre-kopulační reprodukční bariérou bránící hybridizaci mezi těmito druhy. Jeseter sibiřský pochází původem z Asie, zatímco jeseter malý je evropským druhem (Bemis a Kynard, 1997). Tyto dva druhy se přirozeně společně nevyskytují, a proto není jejich hybridizace v přírodě běžná.

S původním výskytem těchto druhů jeseterů souvisí i jejich autekologie, kdy se jejich preference přirozených podmínek pro reprodukci a embryonální vývoj liší. Jeseter malý se vytírá od dubna až do června při teplotě vody 12 – 17 °C na zatopené plochy se štěrkovým dnem (Billard a Lecointre, 2001). Zatímco výtěr jesetera sibiřského probíhá v přirozených podmínkách především od začátku června do konce července při teplotách 9 – 18 °C, kdy optimum pro reprodukci je mezi 11 – 16 °C. Výtěr probíhá v hlavním proudu na kamenné či štěrkové dno (Ruban a Bin Zhu, 2010; Billard a Lecointre, 2001). Embryonální vývoj jesetera sibiřského probíhá mezi 8 – 22 °C (Gisbert a Williot, 2002), kdy se optimální teploty pohybují mezi 11,7 – 14,9 °C (Nikolskaya a Sytina, 1974) a minimální teplota pro vývoj embrya je 4°C (Ruban, 2005). U jesetera malého se tyto teploty pohybují mezi 15 – 24 °C a nejnižší teplota pro vývoj embrya je 12 °C (Ruban, 2005). Přesto odlišnosti v reprodukčních dobách, místech

výtěru či teplotách výtěru a embryonálního vývoje netvoří pro jesetera malého a jesetera sibiřského výraznou překážku v simultánní reprodukci a tudíž vzájemné hybridizaci (Ludwig a kol., 2009). Jeseter sibiřský je v současnosti preferovaným akvakulturním druhem pro svoji odolnost, dobrou konverzi krmiva a relativně rychlý růst (Bronzi a kol., 2011). Do volných vod se pravděpodobně dostává při povodních nebo při jiném nežádoucím úniku z chovů (Maury-Brachet a kol., 2008).

V případě, že dojde k překonání pre-kopulačních reprodukčních bariér, mohou jako prevence hybridizace jesetera malého a jesetera sibiřského sloužit post-kopulační reprodukční bariéry bránící splynutí jejich gamet, tedy kompetice spermií a skrytá volba samic.

Na úspěšnosti spermií při kompetici participuje jejich kvalita (Smith, 2012), na které se podílí několik složek, mezi které patří hlavně pohyblivost (Cosson a kol., 1991; Alavi a kol., 2004b). Spermie jeseterů, tak jako kostnatých ryb, jsou v semenné tekutině či v pohlavních vývodech inaktivní (Gallis a kol., 1991; Cosson a kol., 2000). K aktivaci pohybu dochází až ve vodním prostředí či aktivačním médiu. Pohyb spermií je ovlivňován biochemickým složením semenné plazmy a osmolalitou, kdy záleží na koncentracích různých iontů, osmotické tlaku, pH, teplotě a poměru naředění ve vodním prostředí či aktivačním médiu (Alavi a Cosson, 2006).

Při posuzování pohyblivosti spermií u jednotlivých samců v tomto experimentu bylo zjištěno, že motilita spermií se pohybovala v rozmezí 42 – 98 %. Hodnoty pohyblivosti spermií samců jesetera sibiřského nebyly příliš odlišné a všechny se pohybovaly nad 82 %. Obdobné hodnoty pohyblivosti spermií již byly u jesetera sibiřského pozorovány (Tsvetkova a kol., 1996). U dvou samců jesetera malého byly hodnoty pohyblivosti spermií pod 50 %, což bylo v souladu s výsledky motility spermií jesetera malého, které byly pozorovány Sieczynskim a kol., (2012). Rozdíly v hodnotách pohyblivosti spermií neměly v tomto experimentu vliv na reprodukční úspěch jednotlivých druhů, jelikož se objem spermatu použitého k oplození upravoval tak, aby bylo dosaženo stejného počtu pohyblivých spermií od každého samce na jednu jikru (viz níže).

Dalším sledovaným parametrem, který by mohl ovlivnit kompetici spermií, byla koncentrace spermií v jednotlivých ejakulátech. Výsledné koncentrace spermií samců se lišily mezi druhy i v rámci druhu. Pozorované rozdíly v koncentraci spermií byly

pravděpodobně důsledkem zvýšené produkce semenné tekutiny. Spermie tak mohou být naředěny a tím se jejich koncentrace v ejakulátu snižuje (Shaliutina a kol., 2012). Dalším vysvětlením ve změnách koncentrace spermií může být citlivost na hormonální ošetření generačních ryb při umělém výtěru či ekologické podmínky a biologické vlastnosti generačních ryb (Linhart a kol., 2000). S vyšší koncentrací spermií se zpravidla zvyšuje reprodukční úspěch daného samce (Martin a kol., 1974). Proto byl u všech samců upraven objem spermatu tak, aby bylo dosaženo $6,67 \times 10^4$ pohyblivých spermií od každého samce na jednu jikru. To zajistilo, že byl pro oplození použit stejný počet pohyblivých spermií od každého samce, a tak měli všichni samci shodnou možnost reprodukčního úspěchu.

Reprodukční ukazatele v experimentálních i kontrolních skupinách dosahovaly podobných hodnot. Malé rozdíly v hodnotách oplozenosti v rámci kontrolních skupin prokázaly shodnou oplození schopnost spermií jednotlivých druhů. Hodnoty oplozenosti v kontrolních skupinách také vypovídají o vyrovnané kvalitě jiker a jejich shodné afinitě k oplození. Navíc hodnoty oplozenosti u kontrolních skupin F a G, v kterých bylo vytvořeno hybridní potomstvo, nepotvrdily existenci bariér, které by zabraňovaly vzájemnému splynutí gamet sledovaných druhů a tudíž jejich mezidruhové hybridizaci. Zjištěné hodnoty líhivosti v kontrolních skupinách F a G v porovnání s kontrolními skupinami A.r. a A.b. dokazují, že po oplodnění nedocházelo k výraznému post-zygotickému úmrtí hybridních jedinců, a tak pravděpodobně neexistují žádné post-zygotické reprodukční bariéry, které by snižovaly životaschopnost těchto hybridů během embryonální periody.

U hybridního potomstva je však častější neplodnost než neživotaschopnost (Howard, 1999; Coyne a Orr, 2004). Předpoklad sterility potomstva vzniklého mezidruhovou hybridizací jesetera malého a jesetera sibiřského vychází z rozdílné ploidie těchto druhů (Hochleitner, 2004; Chebanov a Galich, 2011). Jeseter malý má ~ 120 chromozomů (Ráb, 1986) a je funkčně diploidní (Havelka a kol., 2013), kdežto jeseter sibiřský má v jádře svých buněk ~ 240 – 270 chromozomů (Vasil'ev a kol., 1980) a je funkčně tetraploidní (Havelka a kol., 2013). Vzhledem k rozdílnému počtu chromozomů a rozdílné ploidní úrovni by měli být jejich hybridi neplodní, jelikož se jejich chromozomy nemohou správně párovat během zygotenní profáze I meiotického dělení a nedochází tak k normálnímu vývoji gamet (Piferrer a kol., 2009).

Byl však zdokumentován případ, kdy byl křížen jeseter malý s vyza malou (*H. dauricus*). Vyza malá má 240 – 270 chromozomů (Vasil'ev a kol., 2010) a je funkčně tetraploidní (Ludwig a kol., 2001), tedy podobně jako jeseter sibiřský. Samci hybrida těchto dvou druhů byli částečně plodní a produkovali početné potomstvo při zpětném křížení se samicemi jesetera malého a vyzy malé (Vasil'ev a kol., 2014). U hybridních potomků jesetera malého a jesetera sibiřského jsou samice sterilní, ale u samců se může projevit subfertilita (Poduška, 2004). Proto by v přírodě mohlo potenciálně dojít ke zpětnému křížení s rodičovskými druhy. To může mít za následek další negativní introgresi nepůvodních genů do ohrožených populací jesetera malého. Z tohoto důvodu může být skrytá volba samic důležitým faktorem při interakci gamet obou druhů.

Ve skupinách A a B byly smíšené jikry jesetera malého a jesetera sibiřského osemeňovány spermatem každého druhu zvlášť. Bylo zjištěno, že jikry byly oplozeny konspecifickým a heterospecifickým spermatem téměř bez rozdílu, přestože zpravidla bývá upřednostňované konspecifické sperma (Howard, 1999). V případě přiřazování mateřství (ve skupinách A, B, C), kde byly jikry smíseny, se ukázalo, že celkový reprodukční úspěch samic obou druhů byl téměř shodný. Tyto výsledky demonstrují, že jikry žádného z druhů neměly schopnost přitahovat konspecifické spermie a tím ovlivnit výsledný podíl čistokrevných jedinců. Nebylo tedy prokázáno, že by u jiker a spermií studovaných druhů existovala pozitivní chemotaxe, a jikry by tudíž přitahovaly spermie téhož druhu. Skrytá volba samic tak pravděpodobně nepředstavuje mezi těmito druhy reprodukční izolační bariéru na úrovni gamet tak, jako je tomu u lososa atlantského a pstruha obecného (Yeates a kol., 2013).

Spermie jesetera malého a jesetera sibiřského ve skupinách D a E, kde byla absence volby samic, oplodnily konspecifické a heterospecifické jikry se značným rozdílem. Po přiřazení otcovství u skupin, kde byly spermie v kompetici, bylo zjištěno, že na výsledném potomstvu se z větší části podílel jeseter malý a to ze 78,93 %. V případě kompetice spermií nebylo prokázáno, že by spermie oplodňovaly konspecifické jikry s výraznou převahou.

O výsledku kompetice spermií a tedy otcovství jednotlivých embryí rozhoduje mnoho faktorů (Petersen a Warner, 1998). Jak už bylo řečeno, ve značné míře se na tom podílí i kvalita spermií v ejakulátech (Smith, 2012). Vzhledem k tomu, že

objem spermatu byl upraven tak, aby kompetice spermií nebyla ovlivněna jejich motilitou a koncentrací, mohla se teoreticky na rozdílném reprodukčním úspěchu jesetera malého podílet rychlost spermií, která byla dříve uznána jako hlavní faktor určující úspěšnost oplození (Cosson a kol., 1991). I když v tomto experimentu nebyla rychlost spermií jesetera malého a jesetera sibiřského měřena, rychlost spermií těchto dvou druhů se významně liší. Dle dostupných údajů v literatuře dosahují spermie jesetera sibiřského vyšší rychlosti než spermie jesetera malého (Pšenička a kol., 2008b) a to konkrétně $210 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ vs. $180 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Shaliutina a kol., 2013, 2015). Jeseter sibiřský se ve skupinách, kde byla kompetice spermií, podílel na výsledném potomstvu pouze z 21,07 %. Proto lze vyloučit, že by rychlost měla vliv na úspěch oplodnění při kompetici spermií těchto dvou druhů jeseterů. Obdobně nebyl prokázán pozitivní vliv rychlosti spermií na jejich úspěšnost v kompetici u pstruha duhového (*O. mykiss*; Lahnsteiner a kol., 1998) a kapra obecného (*Cyprinus carpio*; Linhart a kol., 2005; Kašpar a kol., 2007). Naopak pozitivní vliv rychlosti spermií na jejich úspěšnost při kompetici byl pozorován u lososa atlantského (Gage a kol., 2004) či živorodky duhové (Boschetto a kol., 2011). Podobně jako u polygammích cichlid (Fitzpatrick a kol., 2009) by vyšší rychlost spermií jesetera sibiřského mohla mít souvislost s délkou jeho spermií, kdy tento druh jesetera má delší spermie než jeseter malý (Pšenička a kol., 2008b).

I přesto, že spermie jesetera malého mají potenciálně nižší pravděpodobnost se dostat k jikře dříve než spermie jesetera sibiřského a oplodnit ji, byl při kompetici spermií úspěšnější právě jeseter malý a to jak v přítomnosti konspecifických, tak i heterospecifických jiker. Tento fakt by mohla vysvětlovat morfologie a struktura gamet obou druhů jeseterů.

Zralé jikry jeseterů mají několik mikropylí poblíž animálního pólu, které perforují povrch chorionu. Mikropylární otvory jsou kónusového tvaru zužující se do mikropylárního kanálku (Siddique a kol., 2014) a v úrovni vrstvy zona radiata interna tvoří rozšiřující se ampuli, která je vyplněná cytoplazmou (Ginsburg, 1959). Průměr vnějšího otvoru mikropyle se u jeseterů pohybuje mezi 10 – 20 μm (Debus a kol., 2008). Vnitřní průměr otvoru mikropylárního kanálku je užší a u jesetera malého se pohybuje v rozmezí 2,5 – 3,0 μm , u jesetera sibiřského má tento otvor 5 μm (Vorob'eva a Markov, 1999).

Velikost nejširší části hlavičky spermie jesetera malého a jesetera sibiřského se významně liší, kdy u jesetera malého je průměr této části hlavičky $0,85 \pm 0,08 \mu\text{m}$ a u jesetera sibiřského $1,14 \pm 0,18 \mu\text{m}$ (Pšenička a kol., 2008b). To, že je hlavička spermie jesetera malého menší, může umožnit snadnější proniknutí spermie do jikry skrze mikropylární otvor. Tak může být poskytnuta spermii jesetera malého výhoda k rychlejšímu oplození jikry, i přesto, že jsou pomalejší na rozdíl od větších a rychlejších spermii jesetera sibiřského.

Z výsledků této práce vyplývá, že na úrovni jiker pravděpodobně neexistují post-kopulační reprodukční bariéry bránící mezidruhové hybridizaci jesetera malého a jesetera sibiřského. Spermie jesetera malého vykazovaly vyšší reprodukční úspěch při konkurenci se spermii jesetera sibiřského. Toto by bylo možné do jisté míry chápat jako post-kopulační reprodukční bariéru způsobenou rozdílnou velikostí spermii obou druhů v důsledku jejich rozdílných ploidií. Spermie diploidních druhů jeseterů jsou zpravidla menší v porovnání se spermii tetraploidních druhů vlivem rozdílného obsahu DNA (Pšenička a kol., 2008b). Na výtěrových místech volných vod spolu překvapivě častěji koexistují druhy jeseterů s rozdílnou ploidií, než druhy se shodnou ploidií (Vasil'ev a kol., 2014) a jejich vzájemné hybridizaci zpravidla brání více či méně rozvinuté pre-kopulační a post-kopulační bariéry. Nicméně pokud budeme pre-zygotické post-kopulační reprodukční bariéry chápat jako mechanismy bránící splnutí geneticky nekompatibilních gamet (Birkhead a Pizzari, 2002), zjištěný vyšší reprodukční úspěch spermii jesetera malého nelze považovat za tento typ bariéry, protože jesetera malého nepředurčuje k vyššímu reprodukčnímu úspěchu pouze s konspicivními samičkami. Toto zjištění zároveň poukazuje na fakt, že některé faktory a vlastnosti spermii, které jim poskytují výhodu při vnitrodruhové konkurenci, nemusí vždy platit při konkurenci mezidruhové. Vysvětlením, proč mezi studovanými druhy neexistuje žádná gametická izolace, může spočívat v tom, že se tyto dva druhy jeseterů v přirozených podmínkách společně nevyskytují a jejich vývoj probíhal zcela alopatricky. Z tohoto důvodu u nich nedošlo k vývoji post-kopulačních reprodukčních bariér, které by mezidruhové hybridizaci zabránily (Edelaar a kol., 2008). Reprodukční bariéry vznikají během evoluce v důsledku mezidruhových kontaktů u druhů, které spolu dlouhodobě koexistují (Birkhead a Pizzari, 2002).

V budoucnu by bylo vhodné realizovat obdobnou studii mezi druhy jeseterů, kteří se vyskytují spolu na stejných lokalitách. To by umožnilo porovnat, zdali se mezi nimi během sympatrické evoluce vyvinuly post-kopulační reprodukční bariéry na úrovni gamet.

6. Závěr

Tento experiment byl zaměřen na mezidruhovou kompetici spermií jesetera malého a jesetera sibiřského, kdy byla pozorována tendence přednostně oplodnit konspecifické gamety. Po provedení detailní analýzy rodičovství bylo zjištěno, že při kompetici spermií jsou výrazně úspěšnější spermie jesetera malého a to bez ohledu na druhový původ jiker. Naopak jikry studovaných druhů nevykazovaly tendenci upřednostňovat konspecifické spermie.

Za předpokladu úniku jesetera sibiřského do volných vod by hybridizace jesetera malého a jesetera sibiřského mohla vzhledem k životnosti hybridů mít značný vliv na čisté druhy ve volných vodách. Větší hrozbu při simultánní reprodukci obou druhů mohou pravděpodobně představovat samice jesetera sibiřského, jelikož jejich reprodukční úspěšnost byla shodná se samicemi jesetera malého. Samci jesetera malého vykazovali určitou reprodukční výhodu v porovnání se samci jesetera sibiřského, avšak tuto výhodu nelze chápat jako pre-zygotickou post-kopulační reprodukční bariéru, protože samce jesetera malého nepředurčuje k vyššímu reprodukčnímu úspěchu pouze s konspecifickými samicemi. Ze získaných výsledků tedy vyplývá, že pravděpodobně neexistují žádné post-kopulační reprodukční bariéry na úrovni gamet, které by zabránily mezidruhové hybridizaci jesetera malého a jesetera sibiřského.

7. Použitá literatura

- Abbott, R. J., Rieseberg, L. H., 2012. Hybrid speciation. ELS (online). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470015902.a0001753.pub2>
- Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J. W., Baird, S. J. E., Bierne, N., Butlin, R. K., 2013. Hybridization and speciation. *J. Evol. Biol.* 26 (2): 229-246.
- Alavi, S. M. H., Cosson, J., Karami, M., Abdolhay, H., Mojazi Amiri, B., 2004a. Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus*; their physiological relationship with sperm motility. *Aquac. Res.* 35 (13): 1238-1243.
- Alavi, S. M. H., Cosson, J., Karami, M., Amiri, B. M., Akhoundzadeh, M. A., 2004b. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. *Reproduction.* 128 (6): 819-828.
- Alavi, S. M. H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes: (II) Effects of ions and osmolality. *Cell. Biol. Inter.* 30: 1-14.
- Alavi, S. M. H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, G., (Ed.), 2008. Fish spermatology. Alpha Science International Ltd, 465 s.
- Alavi, S. M. H., Hatef, A., Pšenička, M., Kašpar, V., Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Cosson, J., Bondarenko, V., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., 2012. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II) sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 22 (4): 861-886.
- Andersson, M., 1994. Sexual selection. Princeton University Press, Princeton, 314 s.
- Apsbury, A., 2007. Sperm competition effects on sperm production and expenditure in sailfin mollies, *Poecilia latipinna*. *Behav. Ecol.* 18: 776-780.
- Arnold, M. L., 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, New York, 232 s.
- Arnold, M. L., Hamrick, J. L., Bennett, B. D., 1993. Interspecific pollen competition and reproductive isolation in *Iris*. *J. Hered.* 84: 13-16.
- Avise, J. C., Jones, A. G., Walker, D., DeWoody, J. A., 2002. Genetic mating systems and reproductive natural histories of fishes: lessons for ecology and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 36: 19-45.
- Baack, E. J., Rieseberg, L. H., 2007. A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17: 513-518.
- Balshine, S., Leach, B. J., Neat, F., Werner, N. Y., Montgomerie, R., 2001. Sperm size of African cichlids in relation to sperm competition. *Behav. Ecol.* 12: 726-731
- Bartley, D., M., Rana, K., Immink, A. J., 2001. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 10: 325-337.

- Bemis, W. E., Findeis, E., Grande, L., 1997. An overview of Acipenseriformes. In: Birstein, V. J., Waldman, J. R., Bemis, W. E., (Eds.), 1997. Sturgeon Biodiversity and Conservation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 25-71.
- Bemis, W. E., Kynard, B., 1997. Sturgeon rivers: an introduction to Acipenseriformes biogeography and life history. In: Birstein, V. J., Waldman, J. R., Bemis, W. E., (Eds.), 1997. Sturgeon Biodiversity and Conservation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 167-183.
- Benfey, T. J., 1989. A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 1682: 33.
- Berg, L. S., 1948. Freshwater Fishes of the USSR and Adjacent Countries. Acad. Sci. USSR. 1: 1-466.
- Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., Linhart, O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture. 129 (1): 95-112.
- Billard, R., Cosson, J., Fierville, F., Brun, R., Rouault, T., Williot, P., 1999. Motility analysis and energetics of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* spermatozoa. J. Appl. Ichthyol. 15: 199-203.
- Billard, R., Lecointre, G., 2001. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. Rev. Fish Biol. Fisher. 10: 355-392.
- Birkhead, T. R., 1998. Cryptic female choice: Criteria for establishing female sperm choice. Evolution. 52 (4): 1212-1218.
- Birkhead, T. R., 2000. Defining and demonstrating postcopulatory female choice—again. Evolution. 54 (3): 1057-1060.
- Birkhead, T. R., Møller, A. P., 1992. Sperm competition in birds: evolutionary causes and consequences. Academic Press, London, 282 s.
- Birkhead, T. R., Møller, A. P., (Eds.), 1998. Sperm Competition and Sexual Selection, 826 s.
- Birkhead, T. R., Pizzari, T., 2002. Evolution of sex: Postcopulatory sexual selection. Nat. Rev. Genet. 3 (4): 262-273.
- Birstein, V. J., Hanner, R., DeSalle, R., 1997. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. In: Birstein, V. J., Waldman, J. R., Bemis W. E. (Eds.), 1997. Sturgeon Biodiversity and Conservation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 127-155.
- Blanchfield, P. J., Ridgway, M. J., Wilson, C. C., 2003. Breeding success of male brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in the wild. Mol. Ecol. 12: 2417-2428.
- Bonduriansky, R., Chenoweth, S. F., 2009. Intralocus sexual conflict: tests, mechanisms and implications. Trends Ecol. Evol. 24 (5): 280-288.

- Börk, K., Drauch, A., Israel, J. A., Pedroia, J., Rodzen, J., May, B., 2008. Development of new microsatellite primers for green sturgeon and white sturgeon. *Conserv. Genet.* 9: 973-979.
- Boschetto, C., Gasparini, C., Pilastro, A., 2011. Sperm number and velocity affect sperm competition success in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 65: 813-821.
- Briskie, J. V., Montgomerie, R., 1992. Sperm size and sperm competition in birds. *P. Roy. Soc. Lond. B* 247: 89-95.
- Bronzi, P., Rosenthal, H., Arlati, G., Williot, P., 1999. A brief overview on the status and prospects of sturgeon farming in Western and Central Europe. *J. Appl. Ichthyol.* 15: 224-227.
- Bronzi P., Rosenthal H., Gessner J., 2011. Global sturgeon aquaculture production: an overview. *J. Appl. Ichthyol.* 27: 169-175.
- Burke, J. M., Arnold, M. L., 2001. Genetics and the fitness of hybrids. *Annu. Rev. Genet.* 35: 31-52.
- Burness, G., Casselman, S. J., Schulte-Hostedde, A. I., Moyes, Ch. D., Montgomerie, R., Parker, G. A., 2004. Sperm swimming speed and energetics vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 56 (1): 65-70.
- Bytyutskyy, D., Srp, J., Flajšhans, M., 2012. Use of Feulgen image analysis densitometry to study the effect of genome size on nuclear size in polyploid sturgeons. *J. Appl. Ichthyol.* 28: 704-8.
- Campton, D. E., 1987. Natural hybridization and introgression in fishes. In: Ryman, N., Utter, F., (Eds.). *Population Genetics & Fishery Management*. University of Washington Press, Seattle, s. 161-192.
- Caille, N., Rodina, M., Kocour, M., Gela, D., Flajšhans, M., Linhart, O., 2006. Quality, motility and fertility of tench (*Tinca tinca*) sperm in relation to LHRH analogue and carp pituitary treatments. *Aquacult. Int.* 4: 75-87.
- Conte, F. S., Doroshov, S. I., Lutes, P. B., Strange, M. E., 1988. Hatchery manual for the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) with application to other North American Acipenseridae. Publications Division, Agriculture and Natural Resources, University of California, Oakland, 103 s.
- Cosson, J., 1996. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. *Cell. Biol. Int.* 20: 83-94.
- Cosson, J., 2010. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *J. Fish Biol.* 76 (1): 240-279.

- Cosson, M., P., Cosson, J., Billard, R., 1991. Synchronous triggering of trout sperm is followed by an invariable set sequence parameters whatever the incubation medium. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 20: 55-68.
- Cosson, J., Linhart, O., Mims, S. D., Shelton, W. L., Rodina, M., 2000. Analysis of motility parameters from paddlefish (*Polyodon spathula*) and shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) spermatozoa. *J. Fish Biol.* 56: 1348-1367.
- Costedoat, C., Pech, N., Salducci, M. D., Chappaz, R., Gilles, A., 2005. Evolution of mosaic hybrid zone between invasive and endemic species of Cyprinidae through space and time. *Biol. J. Linn. Soc.* 85 (2): 135-155.
- Coyne, J. A., Orr, H. A., 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 545 s.
- Darwin, C., 1859. *The origin of species by means of natural selection*. Murray, London, 500 s.
- Darwin, Ch., 1871. *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*. J. Murray, London, 423 s.
- Debus, L., Winkler, M., Billard, R., 2008. Ultrastructure of the oocyte envelopes of some Eurasian acipenserids. *J. Appl. Ichthyol.* 24: 57-64.
- Dettlaff, T. A., Ginzburg, A. S., Schmalhausen, O. I., 1993. *Sturgeon fishes: developmental biology and aquaculture*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 300 s.
- Dudu, A., Suci, R., Paraschiv, M., Georgescu, S. E., Costache, M., Berrebi, P., 2011. Nuclear markers of Danube sturgeons hybridization. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 6796-6809.
- Eberhard, W. G., 1996. *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press, Princeton, 501 s.
- Eberhard, W. G., Cordero, C., 1995. Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products: a new bridge between sexual selection and reproductive physiology. *Trends Ecol. Evol.* 10: 493-495.
- Edelaar, P., Siepielski, A. M., Clobert, J., 2008. Matching habitat choice causes directed gene flow: a neglected dimension in evolution and ecology. *Evolution*. 62 (10): 2462-2472.
- Elofsson, H., McAllister, B., Kime, D., Borg, B., Mayer, I., 2003. Long lasting stickleback sperm: ovarian fluid a key to success in freshwater? *J. Fish. Biol.* 63: 240-253.
- Evans, J. P., Pierotti, M., Pilastro, A., 2003. Male mating behavior and ejaculate expenditure under sperm competition risk in the eastern mosquitofish. *Behav. Ecol.* 14: 268-273.
- Fitzpatrick, J. L., 2008. *Sperm competition in fish*. Canada ON: McMaster University - Department of Biology, PhD Thesis, 228 s.
- Fitzpatrick, J. L., Montgomerie, R., Desjardins, J. K., Stiver, K. A., Kolm, N., Balshine, S., 2009. Female promiscuity promotes the evolution of faster sperm in cichlid fishes. *P. Nat. Acad. Sci. USA.* 106 (4): 1128-1132.

- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Bohlen Šlechtová, V., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2013. Genetika a šlechtění ryb. 2., rozš. a upr. vyd. FROV JU, 305 s.
- Flannery, E. W., Butts, I. A., Słowińska, M., Ciereszko, A., Pitcher, T. E., 2013. Reproductive investment patterns, sperm characteristics, and seminal plasma physiology in alternative reproductive tactics of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Biol. J. Linn. Soc. 108 (1): 99-108.
- Flegr, J., 2007. Úvod do evoluční biologie. Academia, Praha, Galileo, 543 s.
- Fontana, F., Zane, L., Pepe, A., Congiu, L., 2007. Polyploidy in Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. In: Pisano, E., Ozof-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B., G., (Eds.), 2007. Fish cytogenetics. Science Publisher, Enfield, Inc. New Hampshire, USA, s. 385-403.
- Gage, M. J. G., 1994. Associations between Body Size, Mating Pattern, Testis Size and Sperm Lengths across Butterflies. P. Roy. Soc. B-Biol. Sci. 258 (1353): 247-254.
- Gage, M. J., Macfarlane, C. P., Yeates, S., Ward, R. G., Searle, J. B., Parker, G. A., 2004. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. Curr. Biol. 14 (1): 44-47.
- Gallis, J. L., Fedrigo, E., Jatteau, P., Bonpunt, E., Billard, R. 1991. Siberian sturgeon *Acipenser baerii*, spermatozoa: effects of dilution, pH, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility. In: Williot P. (Ed.). *Acipenser*. Cemagref, Antony, s. 143-151.
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). VÚRH JU, Vodňany, č. 78, 24 s.
- Gela, D., Kahanec, M., Rodina, M., 2012. Metodika odchovu raných stadií jeseterovitých ryb. Edice metodik (Technologická řada), FROV JU, Vodňany, č. 126, 46 s.
- Gasparini, C., Marino, I. A. M., Boschetto, C., Pilastro, A., 2010. Effect of male age on sperm traits and sperm competition success in the guppy (*Poecilia reticulata*). J. Evol. Biol. 23 (1): 124-135.
- Gillot, C., 2003. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. Annu. Rev. Entomol. 48: 163-184.
- Ginsburg, A. S., 1959. Fertilization in Acipenserid fishes. In: Dettlaff, T. A., Ginzburg, A. S., Schmalhausen, O. I., 1993. Sturgeon fishes: developmental biology and aquaculture. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 54 s.
- Ginsburg, A. S., 1968. Fertilization of fishes and the problem of polyspermy. In: Dettlaff, T. A., Ginzburg, A. S., Schmalhausen, O. I., 1993. Sturgeon fishes: developmental biology and aquaculture. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 103 s.

- Gisbert, E., Williot, P., 2002. Duration of synchronous egg cleavage cycles at different temperatures in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). J. Appl. Ichthyol. 18: 271–274.
- Gomendio, M., Roldan, E. R., 1991. Sperm competition influences sperm size in mammals. P. Roy. Soc. Lond. B-Biol. Sci. 243: 181-185.
- Gomendio, M., Roldan, E. R., 1993. Mechanisms of sperm competition: linking physiology and behavioural ecology, Trends Ecol. Evol. 8: 95-100.
- Gomendio, M., Roldan, E. R., 2008. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. Int. J. Dev. Biol. 52 (5): 439.
- Havelka, M., Kašpar, V., Hulák, M., Flajšhans, M., 2011. Sturgeon genetics and cytogenetics: A review related to ploidy levels and interspecific hybridization. Folia Zool. 60: 93-103.
- Havelka, M., Hulák, M., Bailie, D. A., Prodöhl, P. A., Flajšhans, M., 2013. Extensive Genome Duplication in Sturgeons: New Evidence from Microsatellite Data. J. Appl. Ichthyol. 29: 704-708.
- Harcourt, A. H., Purvis, A., Liles, L., 1995. Sperm competition: mating system, not breeding season, affects testes size of primates. Funct. Ecol. 9: 468-476.
- Hatfield, T., Schluter, D., 1999. Ecological speciation in sticklebacks: environment-dependent hybrid fitness. Evolution. 866-873.
- Hochleithner, M., 2004. Störe – Biologie und Aquakultur. AquaTech Publications, s. 9-222.
- Hochleithner, M., Gessner, J., 1999. The Sturgeons and Paddlefishes of the World. AquaTech Publications, Austria, 207 s.
- Howard, D. J., 1999. Conspecific sperm and pollen precedence and speciation. Annu. Rev. Ecol. Syst. 30: 109-132.
- Howard, D. J., Palumbi, S. R., Birge, L. M., Manier, M. K., 2009. Sperm and speciation. In: Birkhead, T. R., Hosken, D. J., Pitnick, S., (Eds.). Sperm Biology: An Evolutionary Perspective Academic Press, Amsterdam, s. 367-403.
- Hoysak, D. J., Liley, N. R., Taylor, E. B., 2004. Raffles, roles, and the outcome of sperm competition in sockeye salmon. Can. J. Zoolog. 82 (7): 1017-1026.
- Hutchings, J. A., Bishop, T. D., McGregor-Shaw, C. R., 1999. Spawning behaviour of Atlantic cod, *Gadus morhua*: evidence of mate competition and mate choice in a broadcast spawner. Can. J. Fish Aquat. Sci. 56: 97-104.
- Immler, S., Calhim, S., Birkhead, T. R., 2008. Increased postcopulatory sexual selection reduces the intramale variation in sperm design. Evolution. 62 (6): 1538-1543.
- Chebanov, M., Galich, E., 2011. Sturgeon Hatchery Manual. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 558, Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Ankara, Turkey, 325 s.

- Jamieson, B. G. M., 1991. Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa. Cambridge University Press, s. 230-295.
- Jenneckens, I., Meyer, J. N., Debus, L., Pitra, C., Ludwig, A., 2000. Evidence of mitochondrial DNA clones of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, within Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, caught in the River Volga. *Ecol. Lett.* 3 (6): 503-508.
- Jennions, M. D., Passmore, N. I., 1993. Sperm competition in frogs. Testis size and a serile male experiment on *Chiromantis xerampelina* (Rhacophoridae). *Biol. J. Linn. Soc.* 50: 211-220.
- Johnson, N. A., Kliman, R. M., 2002. Hidden evolution: progress and limitations in detecting multifarious natural selection. *Genetica.* 114: 281-291.
- Kašpar, V., Kohlmann, K., Vandeputte, M., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Alavi, S. M. H., Hulák, M., Linhart, O., 2007. Equalizing sperm concentrations in a common carp (*Cyprinus carpio*) sperm pool does not affect variance in proportions of larvae sired in competition. *Aquaculture.* 272: 204-209.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- King, T. L., Lubinski, B. A., Spidle, A. P., 2001. Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*: and cross-species amplification in the Acipenseridae. *Conserv. Genet.* 2: 103-119.
- Knapp, R., Neff, B. D, 2008. Alternative reproductive tactics in fishes. In: Magnhagen, C., Braithwaite, V. A., Forsgren, E., Kapoor, B. G., (Eds.). *Fish Behaviour*, Science Publishers Inc., Enfield, s. 411-433.
- Kocour, M., Flajšhans, M., Kašpar, V., Gela, D., Hulák, M., Rodina, M., Linhart, O., 2012. Metodické postupy při aplikaci hybridizačních programů u ryb v podmínkách českého rybářství. *Edice Metodik (Technologická řada), FROV JU, Vodňany, č. 119, 53 s.*
- Kohda, M., Heg, D., Makino, Y., Takeyama, T., Shibata, J. Y., Watanabe, K., Awata, S., 2009. Living on the wedge: female control of paternity in a cooperatively polyandrous cichlid. *P. Roy. Soc. Lond. B-Biol. Sci.* 276 (1676): 4207-4214.
- Krieger, J., Hett, A. K., Fuerst, P. A., Artyukhin, E., Ludwig, A., 2008. The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revised. *J. Appl. Ichthyol.* 24: 36-45.
- Kudo, S., 1991. Fertilization, cortical reaction, polyspermy-preventing and anti-microbial mechanisms in fish eggs. *Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica, Monograph.* 16: 313-340.

- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., Partner, R. A., 1998. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*. 163: 163-181.
- Leary, R. F., Allendorf, F. W., Sage, G. K., 1995. Hybridization and Introgression between Introduced and Native Fish. *Am. Fish. Soc. Symp.* 15: 91-101.
- Levitan, D. R., 1998. Sperm limitation, gamete competition, and sexual sperm competition and sexual selection. In: Birkhead, T. R., Møller, A. P., (Eds). *Sperm Competition and Sexual Selection* Academic Press, s. 175-206.
- Lewis, J., 2015. Polyandry and sperm competition in the alternative reproductive tactics in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). University of Windstorf, Electronic Theses and Dissertations.
- Linhart, O., Šlechta, V., Slavík, T., 1991: Fish sperm composition and biochemistry. *B. I. Zool. Acad. Sinica*. 16: 285-311.
- Linhart, O., Mims, S. D., Shelton, W. L., 1995. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon and paddlefish. *J. Fish Biol.* 47 (5): 902-909.
- Linhart, O., Mims, S. D., Gomelsky, B., Hiott, A. E., Shelton, W. L., Cosson, J., Gela, D., 2000. Spermiation of paddlefish (*Polyodon spathula*, Acipenseriformes) stimulated with injection of LHRH analogue and carp pituitary powder. *Aquat. Living Resour.* 13 (06): 455-460.
- Linhart, O., Cosson, J., Mims, S. D., Shelton, W. L., Rodina, M., 2002. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa. *Reproduction*. 124 (5): 713-719.
- Linhart, O., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Vandeputte, M., 2005. Spermatozoal competition in common carp (*Cyprinus carpio*), what is the primary determinant of competition success? *Reproduction*. 130: 705–711.
- Locatello, L., Poli, F., Rasotto, M. B., 2013. Tactic-specific differences in seminal fluid influence sperm.
- Ludwig, A., 2006. A sturgeon view on conservation genetics. *Eur. J. Wildlife Res.* 52 (1): 3-8.
- Ludwig, A., Belfiore, N. M., Pitra, C., Svirsky, V., Jenneckens, I., 2001. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics*. 158 (3): 1203-1215.
- Ludwig, A., Debus, L., Jenneckens, I., 2002. A molecular approach for trading control of black caviar. *Int. Rev. Hydrobiology*. 87: 661-674.

- Ludwig, A., Lippold, S., Debus, L., Reinartz, R., 2009. First evidence of hybridization between endangered starlets (*Acipenser ruthenus*) and exotic Siberian sturgeons (*Acipenser baerii*) in the Danube River. *Biol. Invasions*. 11: 753-760.
- Macherey-Nagel, 2012. Genomic DNA from tissue. User manual, Nucleospin® Tissue, Rev. 14, 41 s.
- Mallet, J., 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* 20 (5): 229-237.
- Martin, P. A., Reimers, R. J., Lodge, J. R., Dziuk, P. J., 1974. The effect of ratios and numbers of spermatozoa mixed from two males on proportions of offspring. *J. Reprod. Fertil.* 39: 251-258.
- Mauray-Brachet, R., Rochard, E., Durrieu, G., Boudou, A., 2008. The "storm of the century" (December 1999) and the incidental escape of Siberian sturgeons (*Acipenser baeri*) in the Gironde estuary (SW France): an original bioindicator for metal contamination, *Environ. Sci. Pollut. R.* 15 (1): 89-94.
- Mayr, E., 1995. Species, classification, and evolution. In: Arai, R., Kato, M., Doi, Y., (Eds.). *Biodiversity and Evolution*. National Science Museum Foundation, Tokyo, Japan: The National Science Museum Foundation. s. 3-12.
- McQuown, E. C., Sloze, B. L., Sheehan, R. J., Rodzen, J., Tranah, G. J., May, B., 2000. Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon (Acipenseridae): new primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*. *T. Am. Fish. Soc.* 129: 1380-1388.
- Microsoft, 2010. Microsoft Office Standard 2010. Verze 14.0.7166.5000, ©2010 Microsoft Corporation.
- Miller, G. T., Pitnick, S., 2002. Sperm-female coevolution in *Drosophila*. *Science*. 298 (5596): 1230-1233.
- Møller, A. P., Birkhead, T. R., 1991. Frequent copulations and mate guarding as alternative paternity guards in birds: a comparative study. *Behaviour*. 118 (3): 170-186.
- Moore, H. D. M., Birkhead, M. M., 1999. No evidence for killer sperm or other selective interactions between human spermatozoa in ejaculates of different males in vitro. *P. Roy. Soc. Lond. Biol.* 226: 2343-2350.
- Morrow, E. H., Gage, M. J. G., 2000. The evolution of sperm length in moths. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* 267 (1440): 307-313.
- Mugue, N. S., Barmintseva, A. E., Rastorguev, S. M., Mugue, V. N., Barminstev, V. A., 2008. Polymorphism of the mitochondrial DNA control region in eight sturgeon species and development of a system for DNA-based species identification. *Russ. J. Genet.* 44: 793-798.

- Nascimento, J. M, Shi, L. Z., Meyers, S., Gagneux, P., Loskutoff, N. M., Botvinick, E. L., Berns, M. W., 2008. The use of optical tweezers to study sperm competition and motility in primates. *J. Roy. Soc. Interface.* 5 (20): 297-302.
- Nikolskaya, N. G., Sytina L. A., 1974. Comparative analysis of the effect of constant temperatures on the embryonic development of different sturgeon species (in Russian). *Vopr. Ikhtiolog. 18: 101–116.* In: Gisbert, E., Ruban, G. I., 2003. Ontogenetic behavior of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*: A synthesis between laboratory tests and field data. *Environ Biol. Fishes.* 67 (3): 311-319.
- Nikolyukin, N. I., 1972. Distant hybridization of fishes. Pishchevaya Promyshlennost' Press, Moscow, 335 s.
- Parker, G. A., 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insect. *Biol. Rev. Camb. Philos.* 45 (4): 525-567.
- Parker, G. A., 1990a. Sperm competition games: raffles and roles. *P. Roy. Soc. Lond. B.* 242: 120-126.
- Parker, G. A., 1990b. Sperm competition games: sneaks and extra-pair copulations. *P. Roy. Soc. Lond. B.* 242: 127-133.
- Parker, G. A., 1998. Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. In: Birkhead, T. R., Moller, A. P. E., Sperm competition and sexual selection. Academic Press, London, s. 3-54.
- Parker, G. A., Ball, M. A., Stockley, P., Gage, M. J. G., 1997. Sperm competition games: a prospective analysis of risk assessment. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 264: 1793-1802.
- Peitts, C. S., Jordan, D. R., Cowx, I. G., Jones, N. V., 1997. Controlled breeding studies to verify the identity of roach and common bream hybrids from a natural population. *J. Fish Biol.* 51 (4): 686-696.
- Peng, Z., Ludwig, A., Wang, D., Diogo, R., Wei, Q., He, S., 2007. Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces: Acipenseriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 42: 854-862.
- Petersen, C. W., Warner, R. R., 1998. Sperm competition in fishes. In: Birkhead, T. R., Møller, A. P., (Eds). *Sperm Competition and Sexual Selection* Academic Press, s. 435-458.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguiere, J. C., Flajšhans, M., Haffray, P., Kolombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture,* 239: 125-156.
- Pilastro, A., Scaggiante, M., Rasotto, M. B., 2002. Individual adjustment of sperm expenditure accords with sperm competition theory. *P. Nat. Acad. Sci.* 99 (15): 9913-9915.

- Pizzari, T., Parker, G. A., 2009. Sperm competition and sperm phenotype. In: Birkhead, T. R., Hosken, D. J., Pitnick, S. S., (Eds.), 2008. Sperm biology: an evolutionary perspective. Academic press. s. 207-245.
- Poduška, S. B., 2004. Steril'ny li "steril'nye" gibridy osetrovyh? (Are "sterile" sturgeon hybrids sterile?), s. 202–203. In: Akvakul'tura osetrovyh ryb: dostizeniâ i perspektivy razvitie. III Meždunarodna naučno-praktičeskaâ konferencia. Materialy dokladov. Al'fa-Ast, Astrahan', Russia. (In Russian). Vasil'ev, V. P., Rachek, E. I., Lebedeva, E. B., Vasil'eva, E. D., 2014. Karyological study in backcross hybrids between the sterlet, *Acipenser ruthenus*, and kaluga, *A. dauricus* (actinopterygii: acipenseriformes: acipenseridae): *A. ruthenus* × (*A. ruthenus* × *A. dauricus*) and *A. dauricus* × (*A. ruthenus* × *A. dauricus*). Acta Ichthyol. Piscat. 44 (4): 301.
- Pšenička, M., Rodina, M., Nebesářová, J., Linhart, O., 2006. Ultrastructure of spermatozoa of tench *Tinca tinca* observed by means of scanning and transmission electron microscopy. Theriogenology. 66 (5): 1355-1363.
- Pšenička, M., Alavi, S. M. H., Rodina, M., Gela, D., Nebesářová, J., Linhart, O., 2007. Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. Biol. Cell. 99 (2): 103-115.
- Pšenička, M., Kašpar, V., Cosson, J., Linhart, O., Ciereszko, A., 2008a. Metodika hodnocení integrity akrozomu spermií jeseterů (Methodology of acrosome integrity evaluation in sturgeon). Bulletin, VÚRH Vodňany, 44 (3): 76-77.
- Pšenička, M., Alavi S. M. H., Rodina, M., Cicova, Z., Gela, D., Cosson, J., Linhart, O. 2008b. Morphology, chemical contents and physiology of chondrosteian fish sperm: a comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*). J. Appl. Ichthyol. 24 (4): 371-377.
- Pšenička, M., Kašpar, V., Alavi, S. M. H., Rodina, M., Gela, D., Li, P., Borishpolets, S., Cosson, J., Linhart, O., Ciereszko, A., 2011a. Potential role of the acrosome of sturgeon spermatozoa in the fertilization process. J. Appl. Ichthyol. 27 (2): 678-682.
- Pšenička, M., Dvořák, M., Kašpar, V., 2011b. Ultrastruktura jiker jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*) a lokalizace zárodečné plasmy jako prekurzora primordiálních gonocytů (Ultrastructure of siberian sturgeon *Acipenser baerii* eggs and localization of germ plasm as precursor of primordial gonocytes). Bulletin, VÚRH Vodňany. 47 (1): 2011.
- Ráb P., 1986. A note on the karyotype of the sterlet, *Acipenser ruthenus* (Pisces, Acipenseridae). Folia Zool. 35 (1): 73-78.
- Ramm, S. A., Stockley, P., 2010. Sperm competition and sperm length influence the rate of mammalian spermatogenesis. Biol. Letters. 6: 219-221.

- Ramm, S. A., Edward, D. A., Claydon, A. J., Hammond, D. E., Brownridge, P., Hurst, J. L., Stockley, P., 2015. Sperm competition risk drives plasticity in seminal fluid composition. *BMC biology*. 13 (1): 1.
- Reinhold, K., 2002. Modelling the evolution of female choice strategies under inbreeding conditions. *Genetica*. 116: 189-195.
- Reyer, H., Frei, G., Som, C., 1999. Cryptic female choice: frogs reduce clutch size when amplexed by undesired males. *P. Roy. Soc. Lond. B-Biol. Sci.* 266 (1433): 2101-2107.
- Rodina, M., Cosson, J., Gela, D., Linhart, O., 2004. Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench (*Tinca tinca*). *Aquacult. Int.* 12: 119-131.
- Rosengrave, P., Gemmell, N. J., Metcalf, V., McBride, K., Montgomerie, R., 2008. A mechanism for cryptic female choice in chinook salmon. *Behav. Ecol.* 6: 1179-1185.
- Rosengrave, P., Montgomerie, R., Gemmell, N., 2016. Cryptic female choice enhances fertilization success and embryo survival in chinook salmon. In *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* (online). 283 (1827). Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2016.0001>.
- Rudolfson, C., Figenschou, L., Folstad, I. I., Tveiten, H., Figenshou, M., 2006. Rapid adjustment of sperm characteristics in relation to social status. *P. Roy. Soc. Lond. B.* 273: 325-332.
- Rudolfson, G., Serrano, J. V., Folstad, I., 2015. Own, but not foreign seminal fluid inhibits sperm activation in a vertebrate with external fertilization. *Front. Ecol. Evol.* 3.
- Rhymer, J. M., Simberloff, D., 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27: 83-109.
- Ruban, G., I., 2005. The Siberian Sturgeon *Acipenser baerii* Brandt: Species Structure and Ecology. Norderstedt: Books on Demand, 203 s.
- Ruban, G., Bin Zhu, 2010. *Acipenser baerii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T244A13046607. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20101.RLTS.T244A13046607.en>.
- Sato, T., Hirose, M., Taborsky, M., Kimura, S., 2004. Size-Dependent Male Alternative Reproductive Tactics in the Shell-Brooding Cichlid Fish *Lamprologus callipterus* in Lake Tanganyika. *Ethology*. 110 (1): 49-62.
- Scribner, K. T., Page, K. S., Bartron, M. L., 2001. Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 10: 293-323.
- Shaliutina, A., Hulák, M., Dzuyba, B., Linhart, O., 2012. Spermatozoa motility and variation in the seminal plasma proteome of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) during the reproductive season. *Mol. Reprod. Dev.* 79: 879-87.

- Shaliutina, A., Hulak, M., Gazo, I., Linhartova, P., Linhart, O. 2013. Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 139: 127-35.
- Shaliutina-Kolešová, A., Cosson, J., Lebeda, I., Gazo, I., Shaliutina, O., Dzyuba, B., Linhart, O. 2015. The influence of cryoprotectants on sturgeon (*Acipenser ruthenus*) sperm quality, DNA integrity, antioxidant responses, and resistance to oxidative stress. *Anim. Reprod. Sci.* 159: 66-76.
- Shapiro, D. Y., Marconato, A., Yoshikawa, T., 1994. Sperm economy in a coral reef fish, *Thalassoma bifasciatum*. *Ecology.* 75: 1334-1344.
- Schuelke, M., 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* 18 (2): 233-234.
- Siddique, M. A. M., Cosson, J., Psenicka, M., Linhart, O., 2014. A review of the structure of sturgeon egg membranes and of the associated terminology. *J. Appl. Ichthyol.* 30 (6): 1-10.
- Sieczynski, P., Glogowski, J., Cejko, B. I., Grygoruk, C., 2012. Characteristics of Siberian sturgeon and sterlet sperm motility parameters compared using CASA. *Arch. Pol. Fish.* 20: 137-143.
- Simmons, L. W., 2001. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton University Press, 435 s.
- Simmons, L. W., 2005. The evolution of polyandry: Sperm competition, sperm selection, and offspring viability. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 36: 125-146.
- Simmons, L. W., Fitzpatrick, J. L., 2012. Sperm wars and the evolution of male fertility. *Reproduction.* 144 (5): 519-534.
- Smith, C. C., 2012. Opposing effects of sperm viability and velocity on the outcome of sperm competition. *Behav. Ecol.* 23 (4): 820-826.
- Smith, C., Douglas, A., Jurajda, P., 2002. Sexual conflict, sexual selection, and sperm competition in the spawning decisions of bitterling (*Rhodeus sericeus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 51: 433-439.
- Snook, R. R., 2005. Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends Ecol. Evol.* 20 (1): 46-53.
- Stockley, P., Gage, M. J. G., Parker, G. A., Møller, A. P., 1997. Sperm Competition in Fishes: The Evolution of Testis Size and Ejaculate Characteristics. *Am Nat.* 149 (5): 933-954.
- Székely, T., Moore, A. J., Komdeur, J., 2010. Social behaviour: genes, ecology and evolution. Cambridge University Press, 574 s.

- Štěch, L., Linhart, O., Shelton, W. L., Mims, S. D., 1999. Minimally invasive surgical removal of ovulated eggs of paddlefish (*Polyodon spathula*). *Aquacult. Int.* 7: 129-133.
- Taborsky, M., 1994. Sneakers, satellites, and helpers: parasitic and cooperative behavior in fish reproduction. *Adv. Stud. Behav.* 23: 1-100.
- Taborsky, M., 1998. Sperm competition in fish: 'bourgeois' males and parasitic spawning. *Trends Ecol. Evol.* 13: 222–227.
- Taborsky, M., 2008: Alternative reproductive tactics in fish. In: Oliveira, R. F., Taborsky, M., Brockmann, H. J., 2008. *Alternative reproductive tactics: an integrative approach.* Cambridge University Press, New York, s. 251 – 300.
- Thornhill, R., 1983. Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *Am. Nat.* 122 (6): 765-788.
- Tranah, G., Campton, D. E., May, B., 2004. Genetic Evidence for Hybridization of Pallid and Shovelnose Sturgeon. *J. Hered.* 95: 474-480.
- Tsvetkova, L. I., Cosson, J., Linhart, O., Billard, R., 1996. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser Baeri* and *A. ruthenus*. *J. Appl. Ichthyol.* 12 (2): 107-112.
- Turner, E., Montgomerie, R., 2002. Ovarian fluid enhances sperm movement in Arctic charr. *J. Fish Biol.* 60 (6): 1570-1579.
- Vasil'ev, V. P., Sokolov, L. I., Serebryakova, E. V., 1980. Karyotype of the Siberian sturgeon *Acipenser baeri* Brandt from the Lena River and some questions of the acipenserid karyotypic evolution. *Vopr. Ikhtiol.* 23: 814-822.
- Vasil'ev, V. P., Vasil'eva E. D., Shedko, S. V., Novomodny, G. V., 2010. How many times has polyploidization occurred during Acipenserid evolution? New data on the karyotypes of sturgeons (Acipenseridae, Actinopterygii) from the Russian Far East. *J. Ichthyol.* 50 (10): 950-959.
- Vasil'ev, V. P., Rachek, E. I., Lebedeva, E. B., Vasil'eva, E. D., 2014. Karyological study in backcross hybrids between the sterlet, *Acipenser ruthenus*, and kaluga, *A. dauricus* (actinopterygii: acipenseriformes: acipenseridae): *A. ruthenus*×(*A. ruthenus*×*A. dauricus*) and *A. dauricus*×(*A. ruthenus*×*A. dauricus*). *Acta Ichthyol. Piscat.* 44 (4): 301.
- Vladič, T. V., Afzelius, B. A., Bronnikov, G. E., 2002. Sperm Quality as Reflected Through Morphology in Salmon Alternative Life Histories. *Biology of Reproduction.* 66 (1): 98-105.
- Vorob'eva, E. I.; Markov, K. P., 1999: Specific ultra-structural features of eggs of Acipenseridae in relation to reproductive biology and phylogeny. *J. Ichthyol.* 39: 157-169.

- Wedell, N., Gage, M. J., Parker, G. A., 2002. Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends Ecol. Evol.* 17 (7): 313-320.
- Welsh, A. B., Blumberg, M., May, B., 2003. Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris*. *Mol. Ecol. Notes* 3: 47–55.
- Winfield, I., Nelson, J. S., 1991. *Cyprinid fishes: systematics, biology and exploitation* (Vol. 3). Springer Science & Business Media, 667 s.
- Wirtz-Ocaña, S., Schütz, D., Pachler, G., Taborsky, M., 2013. Paternal inheritance of growth in fish pursuing alternative reproductive tactics. *Ecol. Evol.* 3 (6): 1614-1625.
- Wolf, D. E., Takebayashi, N., Rieseberg, L. H., 2001. Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conserv. Biol.* 15: 1039-1053.
- Yeates, S. E., Diamond, S. E., Einum, S., Emerson, B. C., Holt, W. V., Gage, M. J., 2013. Cryptic choice of conspecific sperm controlled by the impact of ovarian fluid on sperm swimming behavior. *Evolution.* 67 (12): 3523-3536.
- Zeh, J. A., Zeh, D. W., 1997. The evolution of polyandry II: post-copulatory defences against genetic incompatibility. *P. Roy. Soc. Lond. B.* 264: 69-75.
- Zhang, X., Wu, W., Li, L., Ma, X., Chen, J., 2013. Genetic variation and relationships of seven sturgeon species and ten interspecific hybrids. *Genet. Select. Evol.* 45: 21.

8. Abstrakt

Jeseterovité ryby (řád *Acipenseriformes*) vykazují značnou náchylnost k mezidruhové hybridizaci. Vlivem antropogenních zásahů v povodí řek může docházet k překrytí doby a místa jejich přirozeného výtěru. Různé druhy jeseterů se pak snadněji zapojují do společné reprodukce, čímž se zvyšuje pravděpodobnost setkání heterospecifických gamet. V takovýchto případech mohou pro prevenci nepřirozené mezidruhové hybridizace hrát významnou roli prezygotické post-kopulační reprodukční bariéry zahrnující kompetici spermií a skrytou volbu samic. Cílem této práce bylo objasnit úlohu kompetice spermií a skryté volby samic při mezidruhové hybridizaci jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) a jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*). U vytvořených skupin byly sledovány hlavní reprodukční ukazatele (oplozenost, líhnivost), které se mezi experimentálními a kontrolními skupinami výrazně nališily. Následovně byla u vzniklého potomstva provedena detailní analýza rodičovství pomocí mikrosatelitních a mitochondriálních DNA markerů. Po přiřazení otcovství bylo zjištěno, že spermie jesetera malého byly při kompetici spermií výrazně úspěšnější než spermie jesetera sibiřského, a to bez ohledu na druhový původ oplozovaných jiker. Celkový reprodukční úspěch samců jesetera malého byl 78,9 % a jesetera sibiřského 21,1 %. Naopak, pokud nebyly spermie v kompetici, vykazovaly oba druhy shodný reprodukční úspěch, a to jak při opození konspecifických, tak i heterospecifických jiker. V případě, kdy byly jikry obou studovaných druhů smíchány a o semeněny spermatem každého druhu zvlášť, se ukázalo, že jikry žádného ze studovaných druhů neměly tendenci přitahovat konspecifické spermie. Pravděpodobně tak neexistují žádné post-kopulační reprodukční bariéry na úrovni gamet, které by mezidruhé hybridizaci jesetera malého a jesetera sibiřského zabraňovaly.

Klíčová slova: jeseter sibiřský, jeseter malý, mezidruhová hybridizace, skrytá volba samic, postkopulační sexuální výběr

9. Abstract

Sturgeon species (order Acipenseriformes) are prone for interspecific hybridization. Anthropogenic activities in river basins influence sturgeon reproduction by destruction of their natural spawning grounds. Consequently, spawning areas, as well as the time of spawning of sturgeon species overlap and different sturgeon species reproduce concurrently. This increases the probability of meeting of heterospecific gametes and pre-zygotic postcopulatory reproductive barriers, comprising of sperm competition and cryptic female choice, may play an important role in preventing undesirable interspecific hybridization. The goal of this study was to evaluate the role of interspecific sperm competition and cryptic female choice during interspecific hybridization of sterlet (*Acipenser ruthenus*) and Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Reproductive characteristics (fertilization rate and hatching rate) were described in each of experimental and control groups showing similar values for competitive and non-competitive trials. Parentage assignment was performed in hatched larvae using combination of mitochondrial DNA and microsatellite DNA markers. Obtained results revealed higher fertilization success of sterlet spermatozoa, when these competed for fertilization with spermatozoa of Siberian sturgeon. Total reproductive success of sterlet spermatozoa was 78.9 % and Siberian sturgeon 21.1 %. Contrary, when spermatozoa did not compete for fertilization, males of analysed species showed equal fertilization success. In the trials, where eggs of both studied species were mixed and fertilized by sperm from each species separately, eggs of any species did not show a tendency to bias fertilization by spermatozoa of conspecific males. Probably, there are no pre-zygotic postcopulatory reproductive barriers that prevent interspecific hybridization of sterlet and Siberian sturgeon at the gametic level.

Keywords: *Acipenser baerii*, *Acipenser ruthenus*, interspecific hybridization, cryptic female choice, postcopulatory sexual selection