

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra zoologie a rybářství

**Cytogenetická analýza a evoluce karyotypu u jihoamerických
cichlid**

.....
doktorská disertační práce

Autor: Ing. Lucie Hodaňová

Školitel: prof. Ing. Iva Langrová, CSc.

**Konzultant: Mgr. Zuzana Musilová Ph.D., Zoological Institute,
University of Basel, Switzerland**

Praha 2014

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala několika lidem, bez kterých by tato práce nikdy nevznikla.

Konzultantce Mgr. Zuzaně Musilové, PhD., za odborné vedení a vstřícný přístup po celou dobu naší spolupráce, někdy i na větší vzdálenost.

doc. Ing. Lukáši Kalousovi, PhD., za přátelský přístup po celé doktorandské studium a trpělivé opravování publikovaných textů.

prof. Ing. Petru Rábovi, DrSc., za odborné konzultace a zázemí cytogenetické laboratoře v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR v.v.i. v Liběchově.

Ing. Kateřině Rylkové a Ing. Martinovi Knytlovi, PhD. za péči o ryby a akvária v mé nepřítomnosti.

Bc. Šárce Pelikánové a Janě Čechové za pomoc laboratoři.

Nakonec bych ráda poděkovala svojí matce Ing. Miroslavě Krajákové, za soustavnou podporu při studiu a trpělivé hlídání dcery Leony kdykoliv jsem potřebovala pracovat na této práci.

Obsah

1.	Přehled o současném stavu poznání	1
1.1.	Obecné představení cichlid	1
1.1.1.	Diverzita cichlid	1
1.2.	Výlučné znaky cichlid	2
1.3.	Fylogeneze cichlid	3
1.4.	Charakteristika tribu Cichlasomatini	5
1.5.	Karyotyp a klasifikace chromozómů	7
1.6.	Evoluce karyotypu	7
1.6.1.	Typy karyotypů u cichlid	8
2.	Vědecké hypotézy a cíle práce	16
3.	Materiál a metody	17
3.1.	Materiál	17
3.2.	Metody	17
3.2.1.	Preparace chromozómů z regenerátu ploutve dle Völkerera	17
3.2.2.	Kultivace fibroblastů in vitro	18
3.2.3.	Preparace chromozómů z embryí dle Völkerera	20
3.3.	Vizualizace chromozómů	20
3.3.1.	Zpracování preparátů	21
3.3.2.	Klasifikace chromozómů	21
3.4.	Fluorescenční barvení	21
3.4.1.	Zpracování preparátů s fluorescenčním CDD pruhováním	22
4.	Výsledky a diskuze	23
4.1.	Počty chromozómů	23
4.2.	Karyotypy	23
4.3.	Fluorescenční barvení CDD pruhováním	30
4.4.	Fylogeneze a evoluce karyotypů tribu Cichlasomatini	32
5.	Závěry a doporučení pro využití v praxi nebo pro další rozvoj oboru	35
6.	Seznam použité literatury	36
7.	Přílohy	44
7.1.	Publikace a příspěvky	44

1. Přehled o současném stavu poznání

1.1. Obecné představení cichlid

Cichlidy jsou početná skupina paprskoploutvých ryb (Actinopterygii) patřící do řádu ostnoploutví (Perciformes), podřádu pyskouni (Labroidei) a čeledi vrubozubcovití (Cichlidae), které jsou přirozeně rozšířeny v tropických a subtropických sladkovodních i brakických vodách Střední a Jižní Ameriky, Texasu, Afriky, Západní Indie, Madagaskaru, Sýrie, Izraele, Srí Lanky a pobřeží jižní Indie (Kullander, 1998). Tato čeleď v současné době čítá 1612 platných druhů (Eschmeyer, 2012) a odhaduje se, že včetně nepopsaných forem by se počet druhů mohl dosáhnout až k 3000 (Kocher, 2004; Salzburger a Meyer, 2004). Již se současně známým počtem druhů jsou cichlidy třetí nejpočetnější čeleď ryb vůbec (po kaprovitých a hlaváčovitých; Eschmeyer, 2012).

Cichlidy jsou primárně ryby tropických nížin a jejich přirozená geografická distribuce odpovídá tzv. „Gondwanskému vzoru“. Příčinou tzv. „Gondwanského“ rozšíření je skutečnost, že evoluce hlavních linií předcházela rozpadu prakontinentu Gondwany, a recentně pozorované rozšíření je pak pozůstatkem původně spojitého areálu. Dříve se předpokládalo, že cichlidy vznikly ve svrchní křídě (Stiassny, 1991), avšak z fosilního záznamu známe cichlidy až z mnohem pozdější doby. Nejstarší nalezenou fosilií cichlidy je *Mahengechromis* sp. ze středního eocénu (třetihory), což je později než proběhl rozpad Gondwany. Také z tohoto důvodu jsou cichlidy intenzivně studovány a rekonstrukce jejich paleontologické historie je stále nejasná (Genner et al., 2007).

1.1.1. Diverzita cichlid

Cichlidy jsou extrémně úspěšnou evoluční linií ryb. Má se za to, že žádná jiná čeleď obratlovců nepřevyšuje cichlidy počtem variet, tvarů, barev a mírou ekologických i trofických specializací (Fryer a Iles, 1972; Coulter, 1991; Meyer, 1993; Stiassny a Meyer, 1999; Kornfield a Smith, 2000; Kocher, 2004).

Největší počet druhů cichlid se nachází ve východní Africe v oblasti velkých jezer Tanganika, Malawi a Victoria (Turner et al., 2001; Turner 2007), jelikož zde dochází ke zrychlené adaptivní speciaci, díky níž byly cichlidy schopny opakovaně a velmi úspěšně obsazovat volné ekologické niky. Nejlépe je toto patrné na široké škále potravních specialistů přítomných v jezerech. Díky adaptivní radiaci se africké cichlidy staly modelovým organismem pro studium evoluce (Barlow, 2001).

Cichlidy jsou velmi oblíbené i u akvaristů díky svému atraktivnímu vzhledu a rozvinutému sociálnímu chování, ať už se jedná o cichlidy velkých afrických jezer Malawi a Tanganika, nebo o jihoamerické skaláry amazonské (*Pterophyllum scalare*), terčovce (*Symphysodon* spp.) a další.

Celosvětově se cichlidy jako hospodářsky významné ryby uplatňují i v produkční akvakultuře. Tilápie nilská (*Oreochromis niloticus*) a tilápie mosambická (*O. mossambicus*) jsou nejčastěji chovanými zástupci cichlid v akvakulturních chovech po celém světě (FAO, 2012).

1.2. Výlučné znaky cichlid

Cichlidy jsou charakterizovány několika morfologickými a anatomickými znaky, které jsou pro ně typické a odlišují je od ostatních kostnatých ryb. Některé znaky lze nalézt i u jiných rybích skupin, ale jejich vzájemná kombinace je unikátní pouze pro cichlidy (tj. nelze nalézt tuto kombinaci u zástupců jiných čeledí).

Jedním z výrazných znaků cichlid je přítomnost pouze jednoho čichového otvoru na každé straně rypce. Typický znak pro většinu ostatních kostnatých ryb (kromě mořských sapínů) jsou dva čichové otvory (Barlow, 2001).

Dalším znakem je pak charakteristické uspořádání postranní čáry, která začíná na zadní části hlavy a běží podél horní části těla asi do jeho dvou třetin, poté je postranní čára přerušena a pokračuje o něco nížeji až ke kořeni ocasní ploutve. Pouze zástupci dvou afrických rodů *Teleogramma* a *Gobiocichla* mají nepřerušenu postranní čáru stejně jako většina ostatních ryb. Tyto rody obývají rychle tekoucí části řeky Kongo a tubulární tělíska postranní čáry se

prodlužováním přizpůsobily rychle tekoucí vodě, až splynuly v jednotnou postranní čáru (Barlow, 2001).

Ani jediný čichový otvor, ani přerušovaná postranní čára nejsou výlučnými znaky cichlid, avšak jejich kombinace ano.

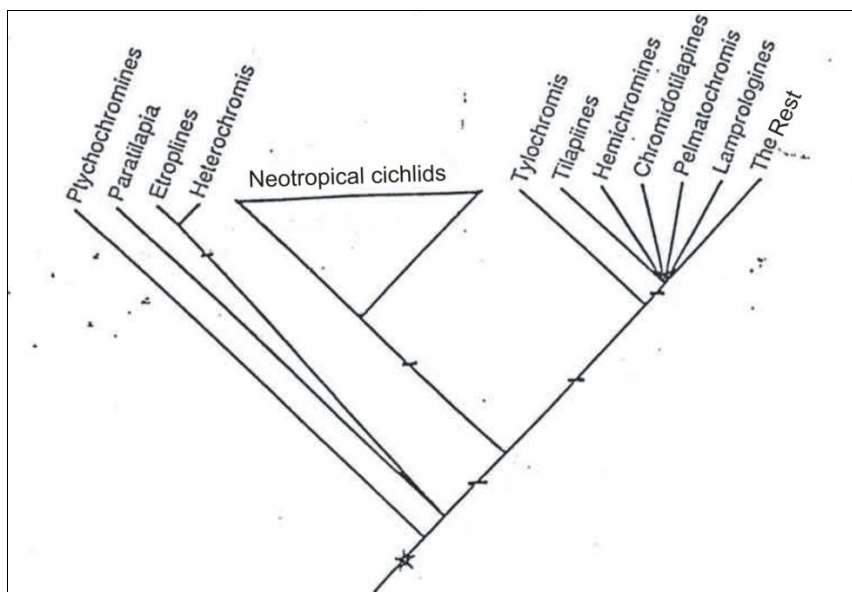
Výlučnými znaky cichlid jsou potom dále i) charakteristický tvar největšího otolitu, který má na jedné straně hlubokou rýhu, a ii) dále pak způsob, jakým je žaludek cichlid spojen s tenkým střevem. U většiny ryb je tenké střevo napojeno na žaludek po pravé straně, u cichlid je napojeno na levé straně (Barlow, 2001).

Za nejdůležitější apomorfii cichlid, která je zodpovědná za jejich evoluční úspěšnost jsou plně funkční požerákové zuby, které jim umožnily adaptovat se na různé způsoby získávání potravy. Díky požerákovým zubům, které převzaly žvýkací a drtící funkci, mohla proběhnout adaptace čelistí k různým způsobům získávání potravy (Stiassny, 1991; Barlow, 2001).

Všechny cichlidy mají vysoce rozvinuté sociální chování, které zahrnuje komunikaci a péči o potomstvo. Rodičovská péče se dá rozdělit na dva způsoby a to na: 1) hlídání potomstva, které je charakteristické převážně pro neotropické a asijské druhy, a dále 2) tlamcovitost, tedy odchov potomstva v tlamě, se kterou se setkáváme hlavně u afrických druhů (Barlow, 2001).

1.3. Fylogeneze cichlid

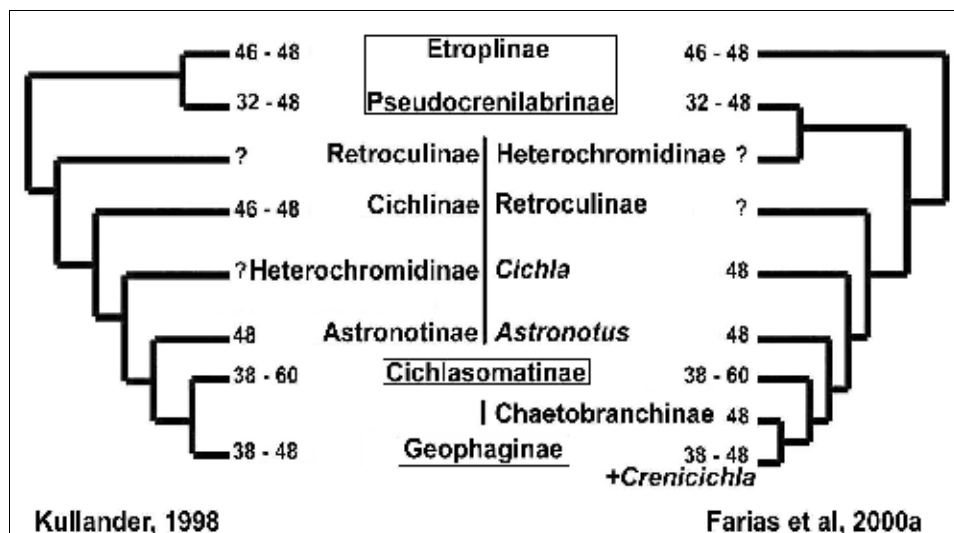
První fylogenetickou studii na cichlidách (obr. 1) provedla Stiassny (1991) a tato studie je založena na anatomicko - morfologických znacích lebečních kostí. Cichlidy zde byly rozděleny do 10 samostatných linií zahrnující africké a asijské cichlidy a jednu dále nerozlišenou linii neotropických cichlid.



Obr. 1. Phylogenetický strom navržený Stiassny (1991) na základě anatomicko-morfologických znaků.

Později Kullander (1998) navrhl novou fylogenetickou hypotézu pro čeleď Cichlidae založenou na analýze 91 morfologických znaků pro 43 jihoamerických a 7 afrických a asijských cichlid. Z výsledků analýzy vyplynulo následující uspořádání cichlid do podčeledí: Etroplinae (Asie), Pseudocrenilabrinae (Afrika), Retroculinae (Jižní Amerika), Cichlinae (Jižní Amerika; triby: Crenicichlini, Cichlini), Heterochromidinae (Afrika), Astronotinae (Jižní Amerika; triby: Astronotini, Chaetobranchini), Geophaginae (Jižní Amerika; triby: Geophagini, Acarichthyini, Crenicaratini) a Cichlasomatinae (Jižní Amerika; triby: Acaroniini, Cichlasomatini, Heroini). V jeho stromu jsou Etroplinae (Malajské a Indické cichlidy) a Pseudocrenilabrinae (Africké cichlidy) sesterské skupiny a tvoří sesterské skupiny všech ostatních cichlid (obr. 2).

Farias et al. (1999) pak prezentovala první zevrubnější fylogenetickou studii založenou na molekulárních znacích (jak mitochondriálních, 16S rRNA, tak jaderných markerů TMO-M27 a TMO-4C4) a později Farias et al. (2000) publikovali výsledky kombinované fylogenetické analýzy na základě molekulárních a morfologických znaků pocházející ze studie Kullandera (1998). Tato studie ukázala, že podčeleď Etroplinae je bazální linií cichlid a že africké podčeledi Heterochromidinae a Pseudocrenilabrinae představují monofyletickou linií a tvoří společně sesterskou skupinou ke zbývajícím neotropickým podčeledím (viz obr. 2).



Obr. 2 Porovnání fylogenetických hypotéz na základě morfologických znaků (Kullander, 1998; vlevo), a výsledek kombinované molekulární a morfologické analýzy (vpravo; Farias et al., 2000). Převzato z Feldberg (2003).

1.4. Charakteristika tribu Cichlasomatini

Tato práce se zabývá neotropickým tribem Cichlasomatini, pro který se vžil český termín akary. Do tohoto tribu patří deset rodů s celkovým počtem přes 70 druhů (Eshmeier, 2012).

Akary rodu *Aequidens* žijí od severu Jižní Ameriky, od povodí Orinoka a Guyanské vysočiny po systém Amazonky. Čítají kolem 16 druhů, některé jsou dosud nepopsané. Mezi běžně chované akary rodu *Aequidens* patří akara kolumbijská (*Aequidens metae*) a akara *Aequidens tetramerus* (Froese a Pauli, 2011).

Rod *Cichlasoma* obývá území, které zahrnuje celou Jižní Ameriku, kromě pacifické oblasti And. Žijí v povodí Amazonky, Orinoka, Páraná, řek Guyanské vysočiny a východní Brazílie. Z druhů rodu *Cichlasoma* jsou mezi akvaristy rozšířeny *Cichlasoma dimerus* a *Cichlasoma portalegrese* (Froese a Pauli, 2011).

Rod *Andinoacara* byl ustanoven teprve v roce 2008 (Musilová et al., 2008) pro skupinu modrých akar (skupina kolem '*Aequidens pulcher*') a pro skupinu akary potoční ('*Aequidens rivulatus*'). V rodě *Andinoacara* se dnes nachází 7 druhů, které byly dříve řazeny do rodu *Aequidens*. Jedná se o

skupinu akar, které nejsou blízké příbuzné s takzvanými pravými akarami, kam se řadí zástupci rodu *Aequidens*. Skupina modrých akar žije na severu Jižní Ameriky s přesahem do Panamy. Druhy příbuzné akaře potoční pak obývají vody pacifického pobřeží Jižní Ameriky (Froese a Pauli, 2011).

Mezi drobnější druhy akar pak patří rod *Laetacara* (druhy *Laetacara dorsigera* a *Laetacara curviceps* jsou běžně chovány v akváriích). Tyto akary se vyskytují v povodí Amazonky a v severním povodí řeky Páraná (Froese a Pauli, 2011).

České jméno akarka náleží rodu *Nannacara*, který čítá pět druhů. Běžně chovaný druh je akarka zelená (*Nannacara anomala*), méně často jsou chovány *Nannacara aureocephalus*, *Nannacara taenia*, *Nannacara adoketa* a pouze vzácně lze mezi akvaristy najít druh *Nannacara bimaculatum*. Akarky žijí v povodí Amazonky a v řekách na Guyanské vysočině (Froese a Pauli, 2011).

Akara hnědá (*Cleithracara maronii*) je monotypický druh. Obývá deltu Orinoka a řeky Guyanské vysočiny. Na rozdíl akar rodu *Aequidens*, *Cichlasoma* a *Andinoacara* se jedná o akaru s velmi mírnou povahou (Froese a Pauli, 2011).

Rod *Krobia* čítá tři druhy, dva z nich byly v minulosti běžně chovány v akváriích, a to akara delfínová (*Krobia itanyi*) a *Krobia guianensis*. Oba druhy žijí v řekách Guyanské vysočiny (Froese a Pauli, 2011). Třetí, nově popsáný, druh *Krobia xinguensis* (Kullander, 2012) obývá povodí řeky Xingu (Amazonka) a v současné době ho lze též najít mezi akvaristy.

Rod *Bujurquina* čítá sedmáct druhů, většina z nich byla popsána až v 80. letech. Známé z akvarijních chovů jsou *Bujurquina mariae*, *Bujurquina vittata* a *Bujurquina sypilus*. Obývají jak povodí Orinoka a Amazonky, tak i řeky Páraná.

Rod *Tahuantinsuyoa* je velice blízké příbuzný s rodem *Bujurquina*. Tento rod má dva zástupce *Tahuantinsuyoa macantzatza* a *Tahuantinsuyoa chipi*, oba z horního toku Amazonky (Froese a Pauli, 2011).

Z rodu *Acaronia* jsou popsány dva druhy: *Acaronia nassa* a *Acaronia vultuosa*. *Acaronia nassa* žije v Amazonii i řekách Guyanské vysočiny. *Acaronia vultuosa* můžeme nalézt v povodí Orinoka a na horním toku Rio Negro (Froese a Pauli, 2011).

1.5. Karyotyp a klasifikace chromozómů

Karyotypem označujeme uspořádané a rozřazené chromozomové páry, ve stádiu metafáze buněčného dělení.

Nejrozšířenější metodikou pro popis chromozómů je klasifikace dle Levana et al. (1964), ten chromozómy klasifikoval do těchto kategorií: metacentrické, submetacentrické, subtelocentrické a akrocentrické, na základě polohy centromery a délky chromozómových ramen.

Pokud centromera leží zhruba uprostřed chromozómu, označujeme jej jako metacentrický, raménka jsou stejně dlouhá. U submetacentrického chromozómu centromera rozděluje chromozóm na část s krátkým a dlouhým raménkem. U subtelocentrického chromozómu je centromera výrazně posunuta ke konci chromozómu, tak že krátké raménko je velmi krátké. Pokud chromozóm má pouze dlouhé raménko, centromera leží na konci chromozómu jedná se o akrocentrický chromozóm.

1.6. Evoluce karyotypu

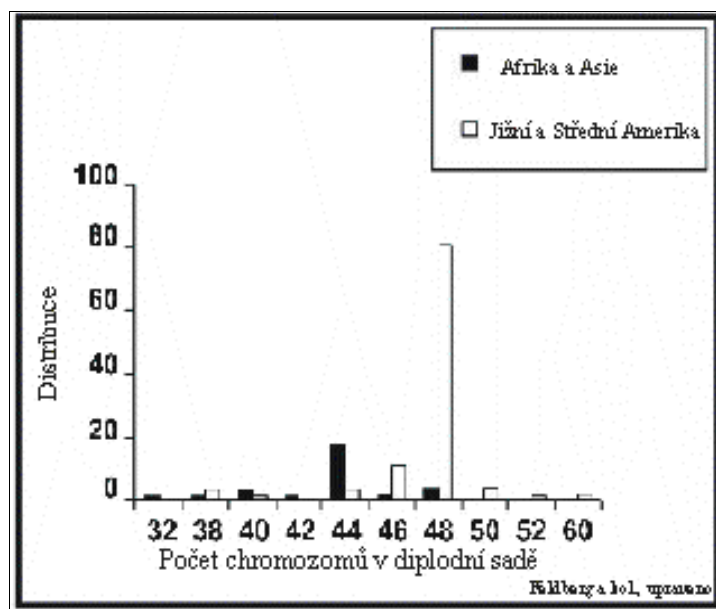
Genomy paprskoploutvých ryb jsou známy svou evoluční dynamikou, která je odrazem změn probíhajících v DNA a to jak na úrovni genů, tak celých vazbových skupin. Často se jedná o okrskové či celogenomové duplikace, utichání či úplné vymizení genů, posuny, delece a inserce genomových segmentů a znovu vytváření konvergentních chromozómových vzorů odlišnými evolučními cestami. Avšak na velké evoluční škále jsou počty chromozómů v karyotypech vysoce konzervativní. U 615 druhů paprskoploutvých ryb byl rozsah chromozómů od 22 do 250, u 29,3% se vyskytuje 48 chromozómů a u 25,4% 50 chromozómů (Mank, 2006).

Informace, které nám poskytují cytogenetická data, jsou signálem, který molekulární genetika a sekvenace DNA nemůže odhalit, proto propojení informací o počtu a stavbě chromozómů v jádře a dat ze sekvenace DNA může být vhodným doplňkem při studiu evoluce dané skupiny a je základem nově vznikajícího oboru fylogenomika (Ráb et al., 2007).

Protokaryotyp pro koncoústé ryby (Teleostei) (tj. před celogenomovou duplikací) je tvořen $n=12$ chromozómy (Kohn et al., 2006), jejichž zdvojení během celogenomové duplikace vedlo ke vzniku karyotypu $2n=48$ ($n=24$), což

je nejčastěji pozorovaný rybí karyotyp a bývá často označován termínem ancestrální karyotyp skupiny Teleostei (Ohno et al., 1969; Ebeling et al., 1971; Uyeno, 1973; Kirpichnikov, 1973; Ohno 1974; Arai a Nagaiwa, 1976; Gold, 1979; Nakatani et al., 2007). Tento typ karyotypu také velmi často nacházíme u cichlid. Ačkoliv je u cichlid diploidní chromozómový počet v rozsahu od $2n=32$ až do $2n=60$, více než 60% dosud zkoumaných druhů vykazuje karyotyp s $2n=48$ (obr. 2) a jde o dominantní počet chromozómů zejména v neotropické linii.

Z cytogenetického hlediska byly cichlidy dříve považovány za konzervativní skupinu díky častému výskytu ancestrálního karyotypu (Thompson, 1979; Kornfield, 1984; Feldberg a Bertollo, 1985), ale postupným přibýváním informací z novějších studií (Marescalchi, 2004, Feldberg, 2003, Poletto, 2010) se jednoznačně prokázala existence velmi konzervativních linií (skupin rodů) a naopak linií, ve kterých probíhaly změny v karyotypu často a ve značné míře.



Obr. 3 Zastoupení chromozómů u cichlid v diploidní sadě. Převzato z Feldberg, (2003).

1.6.1. Typy karyotypů u cichlid

Karyotypy cichlid vykazují některé společné rysy - například mnoho druhů afrických a neotropických cichlid má jeden chromozomový pár výrazně větší. Homologie tohoto páru byla ověřena mezi celou africkou linií cichlid (Ferreira et al. 2010), stejně jako vysoká syntenie genomů afrických cichlid (Mazzuchelli et al., 2012), ale stále zůstává otázkou, zda se tato rozsáhlá homologie vyskytuje napříč celou čeledí Cichlidae (Valente et al., 2009).

Jihoamerické cichlidy mají v porovnání s africkými a asijskými druhy rozdílné karyotypy, lišící se v počtu chromozómů. Zatímco jihoamerické cichlidy mají nejčastěji zastoupen diploidní karyotyp s 48 chromozómy, u afrických druhů nejčastěji nacházíme $2n=44$ chromozómů (Feldberg, 2003 a obr. 2).

Dle Thompsona (1979) se u cichlid vyskytují dva typy karyotypů „A“ a „B“. Oba typy karyotypů se vyvinuly z ancestrálního karyotypu kostnatých ryb ($2n=48$ st/a). Karyotyp typu „A“ se oddělil od ancestrálního karyotypu pericentrickými inverzemi, který se vyznačuje původním počtem chromozómů tj. $2n=48$ nebo více, s většinou subtelocentrických a akrocentrických chromozómů. Metacentrické chromozómy se téměř nevyskytují. U většiny chromozómů ancestrálního karyotypu dále docházelo k centrickým fúzím a tím se oddělil typ karyotypu „B“, pro který je naopak charakteristický vysoký počet metacentrických chromozómů a celkově nižší diploidní počet chromozómů. Centrickými fúzemi se tedy vysvětluje vysoký počet metacentrických chromozómů a celkové snížení počtu chromozómů v karyotypu typu „B“.

Ze 41 druhů cichlid byl karyotyp typu „B“ zatím objeven u třech nepříbuzných linií: u druhu *Bujurquina vittata* (tribus Cichlasomatini), rodu *Apistogramma* (tribus Geophagini) a rodu *Symphysodon* (tribus Heroini; sesterský tribus k tribu Cichlasomatini) a je tedy zřejmé, že v evoluci cichlid došlo k chromozómovým přestavbám a vzniku karyotypu typu „B“ několikrát nezávisle na sobě.

I dnes s přibývajícím počtem cytogeneticky analyzovaných druhů platí skutečnost, že $2n=48$ a karyotyp složený hlavně z akrocentrických chromozómů se nalézá u 60% cichlid, zejména pak u neotropické linie. Feldberg (2003) se domnívá, že i přes tuto skutečnost není možno chromozómovou diferenciací cichlid považovat za konzervativní. Skutečnost,

že velký počet karyotypů cichlid má sice $2n=48$, ale jiný počet chromozómových ramen, svědčí o diferenciaci karyotypů intrachromozómovými přestavbami typu posunu centromery. U afrických cichlid se pohybuje počet chromozómových ramen od 44 do 88 u neotropických druhů od 44 do 118.

1.6.1.1. Africké a asijské cichlidy

U zástupců asijské podčeledi Etroplinae leží diploidní počet chromozomů v úzkém rozmezí $2n = 46 - 48$. Podčeleď Etroplinae (např. druh *Etroplus maculatus* ($2n=46$)) reprezentuje sesterskou větev všech ostatních cichlid a její zástupci jsou morfologicky odlišní a vykazují početné specializace, které se nevyskytují v dalších liniích cichlid (Smith, 2008). Tato podčeleď byla první skupinou cichlid, která se izolovala od ancestrální skupiny cichlid, vyskytující se na Gondwanském superkontinetu (Sparks a Smith, 2004). Nejdelší čas pro vikariantní speciace mohl být tak příčinou pro transformace jako je odvozený karyotyp (Polleto, 2010).

Pro zástupce africké podčeledi Pseudocrenilabrinae je pak diploidní počet chromozomů o něco variabilnější, v rozmezí od $2n = 32$ do 48 chromozómů a nejčastější počet chromozómů je pak $2n = 44$ (obr. 2). Vzhledem k tomu, že karyotyp $2n = 48$ s akrocentrickými chromozómy představuje ancestrální stav, můžeme tvrdit, že chromozómová diferenciaci u těchto dvou základních větví se vydala ve dvou směrech: i) udržování $2n=48$ chromozómů a ii) snížení počtu chromozómů, pravděpodobně díky fúzi. Tento jev je potvrzen přítomností velkých metacentrických a submetacentrických chromozómů v karyotypu několika druhů (Feldberg, 2003). Některé druhy vykazují značné rozdíly ve svých karyotypech v souvislosti s výskytem specifických chromozómových přestaveb v průběhu jejich evoluční historie. U zástupců podčeledi Pseudocrenilabrinae jsou přítomny typické karyotypové prvky oddělující tribus Tilapiini od tribů Haplochromini a Hemichromini (Poletto, 2010).

Africký tribus Tilapiini vykazuje karyotyp s většinou subtelocentrických a akrocentrických chromozómů s počtem $2n=44$. U africké linie *Tilapia - Sarotherodon* se pak vyskytuje velký subtelocentrický pár, který

je významným znakem této linie (Kornfield et al., 1979). Pouze u omezeného počtu tilápií známe karyotyp, ale jednotlivé druhy jsou si blízce příbuzné (Nagl et al., 2001), a jejich karyotyp je považován za vysoce konzervativní (Majumdar a McAndrew, 1986; Klinkhardt et al., 1995). Pouze u čtyř druhů tilápií se karyotyp liší od $2n=44$, konkrétně u *Tilapia mariae*, $2n=40$ (Poletto, 2010), *Tilapia sparrmanii*, $2n=42$ (Thompson, 1981), *Oreochromis alcalius*, $2n=48$ (Denton, 1973) a *Oreochromis karongae*, $2n=38$ (Harvey, 2002). Karyotyp *Oreochromis karonge* vykazuje redukovaný počet chromozómů a liší se tak od ostatních karyotypů tilápií. Cytogenetické analýzy prokázaly, že snížení počtu chromozómů a vznik velkého subetacentrického chromozómového páru je následek fúze, která zahrnovala tři chromozómové páry z původního karyotypu tilápie (Harvey, 2002; Mota-Velasco, 2010).

Karyotypy ostatních afrických cichlid jsou zřetelně odlišné, ačkoliv mají stejný počet chromozómů.

Chromozómové fúze mohou rovněž vysvětlit redukcii v počtu chromozómů v karyotypu *Tilapia mariae* na $2n=40$. Přítomnost dvou atypických metacentrických chromozómových párů v karyotypu *T. mariae* naznačuje, že tyto chromozómy pochází z fúze malých st/a chromozómů. Tato data podporují hypotézu, že chromozómové fúze se vyskytují nezávisle v průběhu evoluce tilápií a redukují počty chromozómů z $2n = 44$, které byly pozorovány v karyotypech několika druhů tilápií.

Většina zkoumaných druhů z tribu Haplochromini má také diploidní počet chromozómů $2n= 44$ chromozómů, stejně jako skupina Tilapiini. Avšak narozdíl od typického karyotypu tilápií, kde je velikostně dominantní jeden chromozómový pár, vykazují zástupci tribu Haplochromini odlišný vzor, konkrétně dva páry výrazně větších chromozómů (jeden metacentrický a jeden akrocentrický; Polleto, 2010).

Dále pak druh *Astatotilapia burtoni* má karyotyp se 40 chromozómy s přítomností dvou typických metacentrických chromozómových párů, které jsou pravděpodobně výsledkem centrické fúze čtyř malých st/a chromozómů. Tyto chromozómové přestavby se zřejmě vyskytují po oddělení *Astatotilapia* od ostatních Haplochromini, jejichž zástupci si mají jinak výše zmíněných $2n = 44$ chromozómů.

Karyotypy afrických a asijských cichlid vykazují menší variabilitu v počtu chromozómů v porovnání s neotropickými druhy.

1.6.1.2. Neotropické cichlidy

Karyotypová variabilita je u neotropických cichlid výraznější, s diploidním počtem od $2n=38$ do $2n=60$ chromozómů, většinou ale mají $2n = 48$ chromozómů (Feldberg, 2003). Největší počet, tedy $2n= 60$ mají karyotypy zástupců rodu *Symphysodon* (Heroini), který reprezentuje vysoce odvozenou skupinu v podčeledi Cichlinae (Smith, 2008). U rodu *Symphysodon* se pak dále vyskytuje atypická meioza, kdy jednotlivé elementy nepárují, ale vytváří chromozomální řetězce. Jedná se o situaci, při které některé chromozómy ve fázi pachytene nevytvoří bivalenty s chiazmaty, ale vznikne uzavřený řetězec. (Gross et al, 2009).

Původní karyotyp jihoamerických cichlid prodělal velké změny ve své struktuře v několika liniích, což vedlo k rozsáhlé karyotypové diverzifikaci (Polleto, 2010). Za hlavní mechanismus přispívající ke změnám ve velikostech chromozómových ramen jsou u Perciformes považovány pericentrické inverze (Galetti, 2000; Affonso, 2005). Rozdílnost v diploidních počtech chromozómů pozorovaná v karyotypech některých druhů pak předpokládá, že translokace byla následována chromozómovou fúzí nebo rozpadem. U neotropické větve se dají rozeznat tři směry v diferenciaci karyotypu. První směr je typický udržováním karyotypu charakterizovaném $2n= 48$ akrocentrických elementů popřípadě se mohou vyskytnout metacentrické či submetacentrické chromozómy, které vznikly pericentrickými inverzemi. Tento evoluční trend je patrný u karyotypu druhů z podčeledí Cichlinae, Astronotinae, Geophaginae a Cichlasomatinae (Feldberg, 2003). Rody *Cichla* (Cichlini) a *Retroculus* (Retroculini) prezentují karyotypy složené pouze z st/a chromozómů, která je považovaná za ancestrální karyotyp moderních paprskoploutvých (Teleostei) ryb (Brum, 1997).

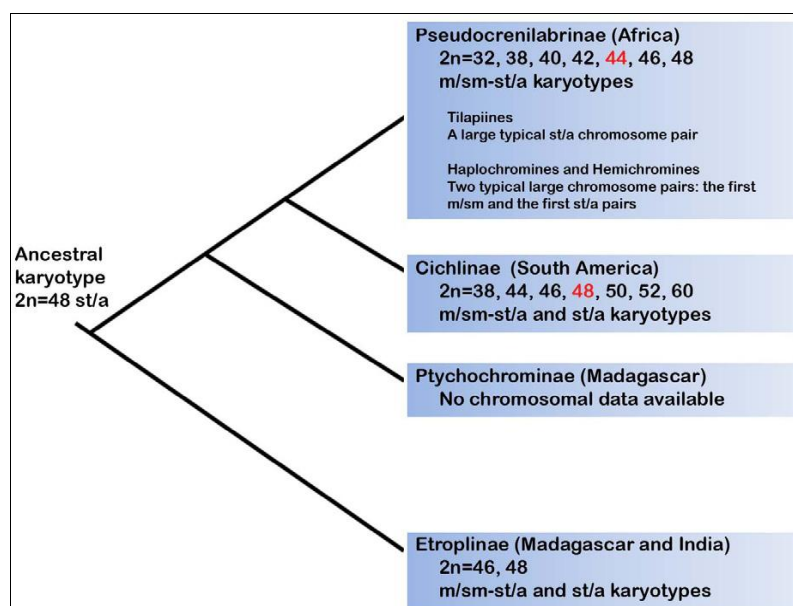
Karyotyp s $2n=48$ st/a chromozómy je charakteristický pro řád ostnoploutví (Perciformes) a byl pozorován u řady čeledí, např. smuhovití (Sciaenidae) (Feldberg, 1999; Accioly, 2008), sapínovití (Pomacentridae)

(Molina, 2002) a chrochtalovití (Haemulidae) (Nirchio, 2007). To svědčí o tom, že rody *Cichla* a *Retroculus* si zachovávají ancestrální karyotyp ($2n=48$).

Druhý evoluční trend zahrnuje snížení diploidního počtu doprovázený zvyšováním počtu metacentrických a submetacentrických chromozómů cestou fúzí a pericentrickými inverzemi. Tento typ diferenciace karyotypu se vyskytuje u zástupců podčeledí: Cichlinae (rod: *Crenicichla*), Geophaginae (rody: *Apistogramma*, *Dicrossus*) a Cichlasomatinae (rody: *Bujurquina*, *Cichlasoma*, *Laetacara*, *Nannacara* a *Uaru*).

Třetí typ diferenciace karyotypu vychází ze zvýšení diploidního počtu na $2n=50$; 52 a karyotypem složeným z akrocentrických chromozómů. Tento karyotyp mohl vzniknout z karyotypu předka s $2n=48$ s metacentrickými či submetacentrickými chromozómy, u kterého došlo nejdříve k pericentrickým inverzím a pak rozpadu chromozómů. Tento evoluční směr se vyskytuje pouze u karyotypů druhů z podčeledi Cichlasomatinae (*Acoronia nassa*, *Caquetaia spectabilis*, *C. kraussii*, *Cichlasoma salvini* a *Cleithracara maronii*) (Feldberg, 2003).

Uvedená chromozómová data podporují hypotézu od Farias et al. (2000), že neotropické cichlidy, z pohledu karyotypové diverzity vykazují rychlejší tempo diferenciace než africké a asijské cichlidy.



Obr. 4 Kladogram čeledi Cichlidae s vyznačenými počty chromozómů. Červeně vyznačen nejčastější karyotyp. Převzato z Polleto (2010).

1.6.1.3. Chromozómové charakteristiky karyotypu zástupců tribu Cichlasomatini

U sedmi druhů ryb z tribu Cichlasomatini zjistila Marescalchi (2004) tyto diploidní počty chromozómů a charakteristiky karyotypů:

Aequidens tetramerus: $2n = 48$ chromozómů, hlavně subtelocentrické. Pouze jeden pár mohl být označen jako submetacentrický. Zbývajících 46 chromozómů bylo označeno jako subtelocentrické až akrocentrické chromozómy.

Aequidens metae: $2n = 48$ chromozómů. Tři páry chromozómů byly označeny jako submetacentrické. Zbývajících chromozómy byly zařazeny do kategorie subtelocentrické až akrocentrické.

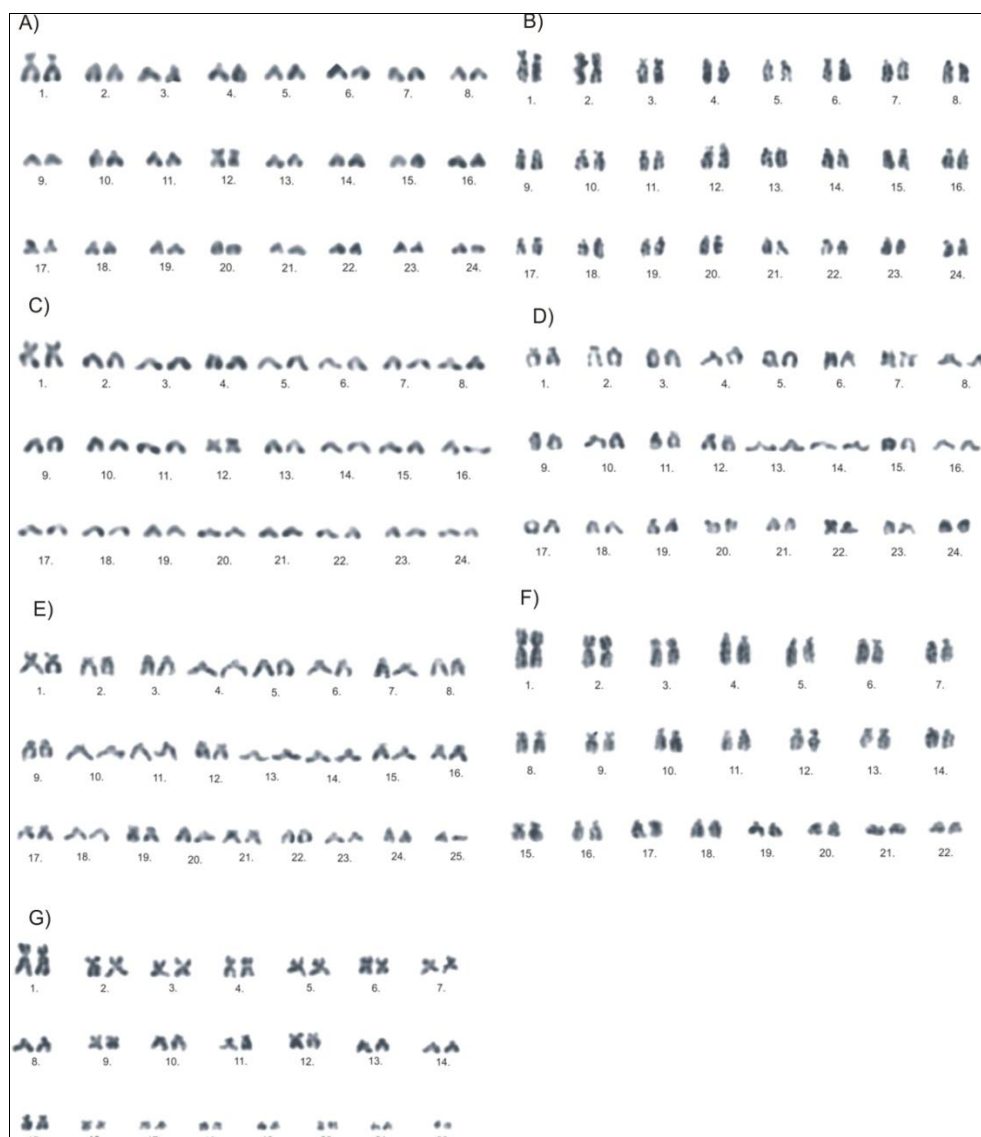
Andinoacara pulcher: $2n = 48$, pouze dva páry byly označeny jako submetacentrické, z toho jeden z nich je zřetelně větší než druhý. Zbývajících chromozómy byly zařazeny do skupiny subtelocentrických až akrocentrických chromozómů.

Andinoacara rivulatus: $2n = 48$, z toho čtyři páry jsou submetacentrické a zbývajících chromozómy byly zařazeny do kategorie subtelocentrických až akrocentrických. Všechny chromozómy tvoří odstupňovanou řadu od největšího po nejmenší bez ostrých přechodů mezi velikostmi.

Cleithracara maronii: $2n = 50$, z toho 6 párů bylo označeno jako submetacentrické chromozómy. Zbývajících chromozómy pak jako subtelocentrické až akrocentrické.

Laetacara dorsigera: $2n = 44$, tento karyotyp je odlišný nejen počtem chromozómů, ale i jeho morfologií. Bylo pozorováno 11 párů metacentrických až submetacentrických chromozómů. Ostatní chromozómy byly označeny jako subtelocentrické až akrocentrické.

Bujurquina vittata: $2n = 44$, z toho 13 párů patří do kategorie submetacentrických a zbývajících 9 párů do skupiny subtelocentrických až akrocentrických chromozómů. Raménka u párů 1-15 se postupně zkracují, ale jsou znatelně větší než u párů 16-22, které mají raménka velmi drobná.



Obr. 5 Karyotypy: A) *Aequidens tetramerus*, B) *Aequidens metae*, C) *Andinoacara pulcher*, D) *Andinoacara rivulatus*, E) *Cleithracara maronii*, F) *Laetacara dorsigera*, G) *Bujurquina vittata*. Převzato z Marescalchi, 2004.

Přestože byl karyotyp cichlid považovaný za konzervativní (Thompson, 1979; Kornfield, 1984; Feldberg a Bertollo, 1985) je evidentní, že s přibývajícými cytogenetickými studii se rozšiřuje úroveň poznání o tom, že v některých liniích došlo k výrazným diferenačním procesům a karyotypy cichlid mohou být velmi variabilní.

2. Vědecké hypotézy a cíle práce

Hypotéza fylogenetických vztahů založena na sekvenaci mitochondriální DNA nemůže postihnout celou genomovou variabilitu. Oproti tomu cytogenetické metody pracují se strukturou genomu, která v sobě nese informaci o fylogenetických vztazích (Ráb et al., 2007). Syntézou molekulárně genetických a cytogenetických dat můžeme stanovit daleko pravděpodobnější hypotézu fylogenetických vztahů, než by to bylo použitím samostatných metod.

V rámci této práce jsem si vytyčila nejdříve stanovit počet chromozomů u společného předka tribu Cichlasomatini a dále potvrdit či vyvrátit skutečnost, že známé fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy tribu Cichlasomatini odvozené ze sekvenací mitochondriálních a jaderných genů jsou ve shodě s fylogenetickými vztahy, které jsou založeny na evolučních změnách v karyotypech.

S ohledem na omezený unikátní materiál bylo také nejdříve nutné optimalizovat Völkerovu metodu pro preparaci chromozomů z regenerátu pro cichlidy, která umožňuje nedestruktivní metodou získat suspenzi jader. V neposlední řadě bylo jedním z cílů rozšířit cytogenetická data o tribu Cichlasomatini a z těchto dat rekonstruovat možnou evoluci karyotypu. Jednotlivé počty chromozomů pak zaznamenat do již známých fylogenetických vztahů a porovnat tyto informace mezi sebou.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Jednotlivé druhy byly identifikovány podle znaků uvedených v pracích Kullander & Nijssen, 1989, Kullander & Prada-Pedrerros, 1993 and Staeck & Schindler (2004).

Druh	Počet jedinců	Pohlaví	Původ
<i>Andinoacara biseriatus</i>	4	nerozlišené	Akvarijsní chov
<i>Andinoacara cf. pulcher</i> „Rio Chirgua“	3	nerozlišené	Import
<i>Andinoacara pulcher</i>	6	nerozlišené	Akvarijsní chov
<i>Andinoacara rivulatus</i>	2	nerozlišené	Akvarijsní chov
<i>Aequidens tubicen</i>	2	nerozlišené	Akvarijsní chov
<i>Cichlasoma amazonarum</i>	4	nerozlišené	Akvarijsní chov
<i>Cichlasoma boliviense</i>	4	nerozlišené	Akvarijsní chov
<i>Cleithracara maronii</i>	3	nerozlišené	Akvarijsní chov
<i>Ivanacara adoketa</i>	3	2 x ♂, 1 x ♀	Akvarijsní chov
<i>Krobia xinguensis</i>	3	nerozlišené	Akvarijsní chov
<i>Laetacara araguaiae</i>	3	nerozlišené	Akvarijsní chov
<i>Nannacara anomala</i>	5	3x ♂ 2x ♀	Akvarijsní chov
<i>Nannacara aureocephalus</i>	3	nerozlišené	Akvarijsní chov
<i>Nannacara taenia</i>	3	nerozlišené	Akvarijsní chov
<i>Tahuantinsuyoa macantzatza</i>	3	nerozlišené	Import

Tab. 1 Seznam analyzovaných druhů

3.2. Metody

Chromozomové preparáty byly získávány třemi metodami: nejčastěji z regenerátu ploutve metodou podle Völker (2006), kultivací fibroblastů a preparací z embryí.

3.2.1. Preparace chromozomů z regenerátu ploutve dle Völker

Chromozomové preparáty byly získávány z regenerátu ploutve dle metody Völker (2006), upravenou Kalousem et al. (2010), která je založena

na principu regenerace buněk v místě poškození, v tomto případě se jednalo o ocasní ploutev. Jedná se o metodu vyvinutou pro drobné druhy halančíků (Notobranchiidae), která byla přizpůsobena pro cichlidy.

Rybě byla odstřížena malá část ocasní ploutve (pásek o šířce cca 1 mm). Ocasní ploutev se nechala regenerovat 4-7 dní podle individuální regenerační aktivity. Po uplynulém časovém úseku byl regenerát odstřížen a vložen do kultivačního roztoku (7,48g NaCl+0,18 KCl+0,5g CaCl₂+0,016g NaHCO₃/1l destilované vody) s kolchicinem na 2 hodiny. Během této doby probíhalo dělení buněk do stádia metafáze. Po té byly do roztoku přidány 3 kapky čerstvě připraveného fixačního roztoku (metanol+kyselina octová, 3:1), který se nechal působit 30 minut při teplotě 4°C. Po té byl odstraněn kompletní roztok, který byl nahrazen fixačním roztokem s dobou působení 30minut při teplotě 4°C. Tento krok byl ještě jednou opakován. Následně byl regenerát přenesen na jemnou síťku a zakápnut 50μl kyselinou octovou (20%). Ta způsobí rozbití jaderných membrán. Dále byla tkáň regenerátu jemně rozvolněna o síťku pinzetou a z druhé strany síťky byla odsáta suspenze s buňkami. Suspenze byla nakapána na podložní skla, která byla zahřátá na 45°C na topné plotýnce. Suspenze byla vždy po 20 sekundách odstraněna a kápnuta na nové místo na podložním skle. Tímto způsobem byly na podložním skle vytvořeny 3 kapky. Skla se ponechala vychladnout při laboratorní teplotě.

3.2.2. Kultivace fibroblastů in vitro

Kultura fibroblastů byla založena z malého vzorku tkáně (cca 2x2 mm), který byl rybě odebrán z hřbetní ploutve. Případně byl použit odstřížek ocasní ploutve, která byla odebrána pro metodu preparace z regenerátu ploutví. Veškerá manipulace s kulturami probíhala ve sterilním aseptickém boxu („flow-box“).

3.2.2.1. Příprava kompletního média

Do sterilního odměrného válce bylo odměřeno 80 ml Liebovitz media L15 (Sigma – Aldrich) a přidáno 20 ml bovinního séra (Baria). Dále byl přidán 1 ml antibiotické- antimykotické směsi (Sigma – Aldrich) a 1 ml glutaminu

(Sigma-Aldrich). Takto připravené médium bylo přefiltrováno přes speciální filtry (Millex Millipore) a uchováváno ve sterilní nádobě v chladničce.

3.2.2.2. Nasazování kultur

Odebraný kousek tkáně z hřbetní nebo ocasní ploutve byl umístěn do roztoku PBS 0,5 ml (10g NaCl +0,25 g KCl+0,25 KH₂PO₄ +1,44 g Na₂HPO₄ . 12H₂O) a 0,5 ml antibiotické – antimykotické směsi (Sigma – Aldrich) v mikrozkušavce typu Eppendorf na 60 minut. Po té byla tkáň umístěna do roztoku 1,5 ml PBS + 0,5 ml antibiotické- antimykotické směsi v mikrozkušavce typu Eppendorf na 60 minut.

Ve „flow-boxu“ byla tkáň postupně oplachována ve třech Petriho miskách s roztokem kompletního media. V poslední Petriho misce byla tkáň ponechána hodinu. Následně byla tkáň rozstříhána na několik menších kousků. Takto získané kousky tkáně byly pomocí očkovací kličky přeneseny na dno kultivační lahvičky (Nunc). Po 20 minutách, kdy došlo k přilnutí tkáně ke dnu kultivační lahvičky, bylo přidáno 3 ml kompletního media.

3.2.2.3. Vlastní kultivace

Fibroblasty byly kultivovány při 28,5°C v termostatu. Každý třetí den probíhala výměna kompletního media. Celková doba kultivace byla ± 14 dní, podle vizuální kontroly růstu fibroblastů pod inverzním mikroskopem.

3.2.2.4. Sklizeň fibroblastů

Do kultivačních lahviček byly přidány 3 kapky 0,1% kolchicinu (Serva), který se nechal působit po dobu 4 hodin v termostatu při 28,5°C. Po té byly dvakrát přidány a odsáty 2ml PBS. K takto ošetřeným fibroblastům byl přidán 1ml PBS a 0,7 ml 0,1 % trypsinu (Sigma – Aldrich). Celková doba působení trypsinu byla 2 minuty, pak byl jeho účinek zastaven přidáním kultivačního media. Očkovací kličkou byly ze dna kultivační nádoby seškrábány narostlé fibroblasty, které byly spolu s kultivačním roztokem převedeny do zkumavky. Suspenze byla centrifugována 10 min při 1200 otáčkách. Poté byl odsát supernatant a k buňkám usazeným na dně zkumavky bylo přidáno 5 ml roztoku chloridu draselného (KCl 0,075 mol/l, 37°C). Doba

hypotonického působení roztoku KCl byla 8 minut. Po centrifugaci (10 min/1200 otáček) byl odsát supernatant a přistoupilo se k fixaci (CH₃OH + CH₃COOH, 3:1) po dobu 20 minut. Proces fixace byl třikrát opakován a poté byla suspenze nakapána na vyčištěné podložní sklo (Menzel GmbH).

3.2.3. Preparace chromozómů z embryí dle Völkerera

Tato metoda byla též optimalizována Völkerem (2006) pro drobné druhy halančíků (Notobranchiidae).

Do připraveného roztoku kolchicinu (Serva) (0,25 g/ 50 ml vody z akvária) v Petriho miskách bylo umístěno po 3-4 embryích. Ty byly takto kultivovány 4 hodiny při pokojové teplotě. Během této doby probíhalo dělení buněk ale pouze do stádia metafáze, ve které kolchicin zastavuje buněčné dělení. Do zkumavek byl připraven roztok citronanu sodného (0,8%) ve kterém byly embrya ponechány hypotonickému působení po dobu 40 minut při laboratorní teplotě. Poté byly zkumavky opatrně slity a bylo přidáno 5 ml fixativa (CH₃OH + CH₃COOH, 3:1), probublány a umístěny do lednice na 20 minut. V této fázi došlo k zabití všech buněk. Tento krok byl opakován ještě dvakrát, s tím že v posledním kroku byly zkumavky ponechány v chladničce 24 hodin.

Po 24 hodinách byla embrya osušena filtračním papírem a umístěna do mikrozkušavky typu Eppendorf s kyselinou octovou (40%), která způsobí rozbití jaderných membrán a rozvolnění chromozómů pro následné pozorování na sklíčku. Zde byla embrya rozmělněna pomocí plastové tyčinky. Po té byla suspenze kapána na předehřátá (45°C) podložní skla (Menzel GmbH), stejným způsobem jako v předchozí metodě preparace chromozómů z regenerátu kapitola 3.2.1.

3.3. Vizualizace chromozómů

Preparáty byly nejdříve barveny Giemsovým barvivem po dobu 10 minut v 3% roztoku Giemsa v Sörensově pufru (pH=6,8). Poté byly preparáty důkladně opláchnuty destilovanou vodou po dobu 30 sekund.

3.3.1. Zpracování preparátů

Preparáty byly prohlíženy na mikroskopu Olympus AX-70, při zvětšení 1000x. Vybrané metafáze byly snímány CDD kamerami (Olympus; DP30BW). Snímky chromozómů byly zpracovány v programu Microimage. Vlastní stanovení diploidního počtu chromozómů v metafázích probíhalo ručně nebo pomocí programu Microimage. Sestavování karyotypu bylo provedeno pomocí programu Photoshop.

3.3.2. Klasifikace chromozómů

Chromozómy byly klasifikovány dle Levana et al. (1964) do těchto kategorií: metacentrické (m), submetacentrické (sm), subtelocentrické (st) a akrocentrické (a), na základě vzájemného poměru délek chromozómových ramen a polohy centromery. Kvůli shodě se současnými cytogenetickými studii (Marescalchi, 2005, Feldberg, 2003 a Polleto, 2010) na cichlidách byly chromozómy v karyotypech děleny do dvou skupin metacentrické až submetacentrické (m-sm) a subtelocentrické až akrocentrické (st-a).

3.4. Fluorescenční barvení

Fluorescenční barvení je založeno na principu vazby specifického fluorochromu (obvykle antibiotika) na AT- nebo GC- bohaté segmenty DNA v heterochromatinových oblastech. Konkrétně při CDD (Chromomycin A₃/distamycin/DAPI) pruhování (Mayr, 1985) a (Sola, 1992) se využívá současného působení fluorescenčních barviv s rozdílnou specifitou k bazím společně s fluorochromem, který neemituje záření, ale pouze zvýrazňuje excitaci druhého fluorochromu. Dnes se místo distamycinu používá účinnější methylzeleň.

Preparát byl dehydratován v ethanolové sérii (70%, 90%, 100%). Dále byl preparát 10 min ponořen v pufru McIlvain + MgCl₂ (pH=7). Ve vlhké komůrce byl na preparáty nakápnut roztok Chromomycinu A₃. Preparát byl překryt krycím sklem, doba působení Chromomycinu A₃ byla 15 min při 37°C. Po té byl preparát ponořen do pufru McIlvain a po té do roztoku methylzeleně (35mg methylzeleně/100ml McIlvain, pH=7), doba působení 15 min při

laboratorní teplotě. V dalším kroku se preparát opět ponořil do pufru McIlvain a následně se na preparát napipetovala DAPI ((4,6- diamino-2-phenylindole, 5 μ l DAPI/1 ml McIlvain, pH=7), překryl krycím sklem, doba působení DAPI 20 min při laboratorní teplotě. Preparát se ponořil do pufru McIlvain, osušil filtračním papírem a stabilizoval pomocí glycerolu, krycího skla a laku. Preparát se po celou dobu zpracování a skladování uchovává ve tmě.

3.4.1. Zpracování preparátů s fluorescenčním CDD pruhováním

Preparáty byly prohlíženy na mikroskopu Olympus AX-70, při zvětšení 1000x. Vybrané metafáze byly sejmuty CDD kamerami (Olympus; DP30BW). Změnou excitačních filtrů pro daný fluorochrom byly získány dva různé typy fluorescenčního barvení chromozómů. Překrytí obrazů a nastavení barevných kanálů bylo provedeno v programu Microimage.

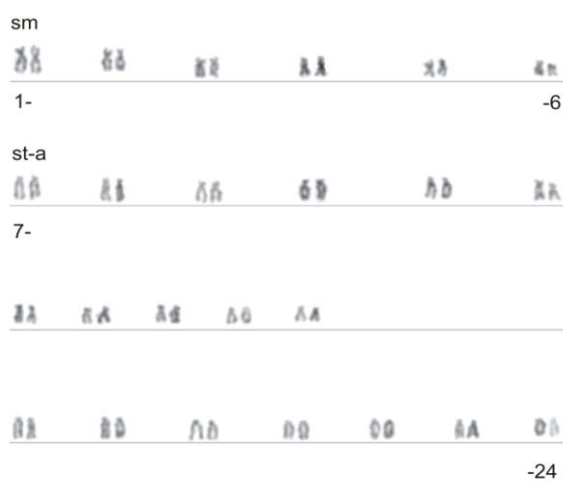
4. Výsledky a diskuze

4.1. Počty chromozómů

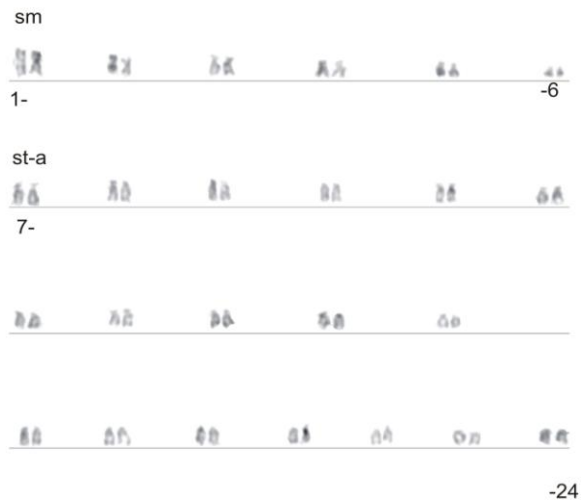
Druh	2n
<i>Andinoacara biseriatus</i>	48
<i>Andinoacara</i> cf. <i>pulcher</i> „Rio Chirgua“	48
<i>Andinoacara pulcher</i>	48
<i>Andinoacara rivulatus</i>	48
<i>Aequidens tubicen</i>	48
<i>Cichlasoma amazonarum</i>	48
<i>Cichlasoma boliviense</i>	48
<i>Cleithracara maronii</i>	50
<i>Ivanacara adoketa</i>	48
<i>Krobia xinguensis</i>	48
<i>Laetacara araguaia</i>	44
<i>Nannacara anomala</i>	44
<i>Nannacara aureocephalus</i>	44
<i>Nannacara taenia</i>	44
<i>Tahuantinsuyoa macantzatzta</i>	30

Tab. 2 Stanovené chromozómové počty v diploidní sadě pro 15 druhů tribu Cichlasomatini.

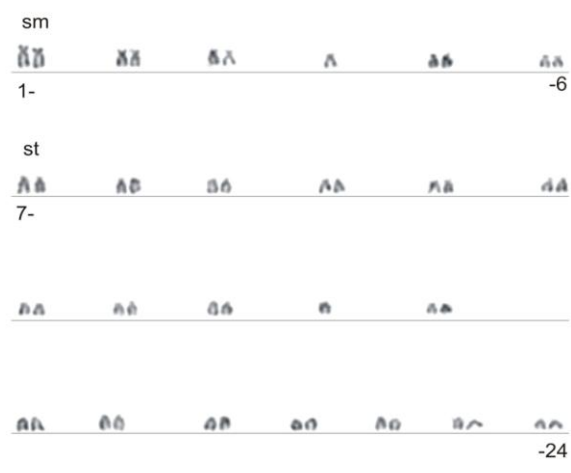
4.2. Karyotypy



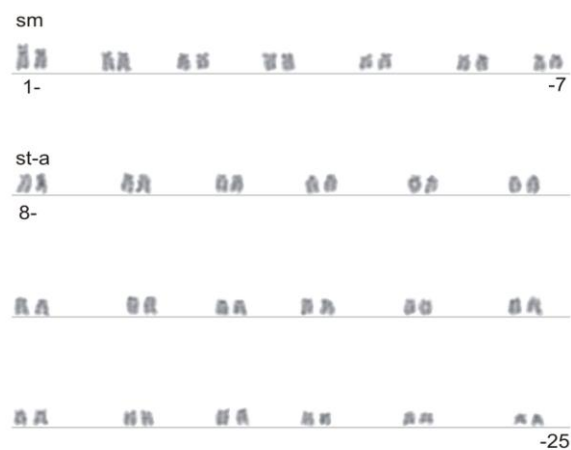
Obr. 6 Karyotyp *Aequidens tubicen*, preparát získaný preparací chromozómů z regenerátu, chromozómy barveny Giemsovým barvivem, měřítko 10 μ m.



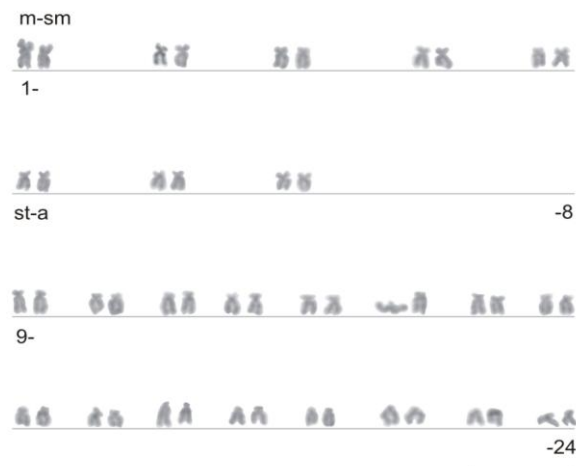
Obr. 7 Karyotyp *Andinoacara biseriatus*, preparát získaný preparací chromozómů z regenerátu, chromozómy barveny Giemsovým barvivem, měřítko 10µm.



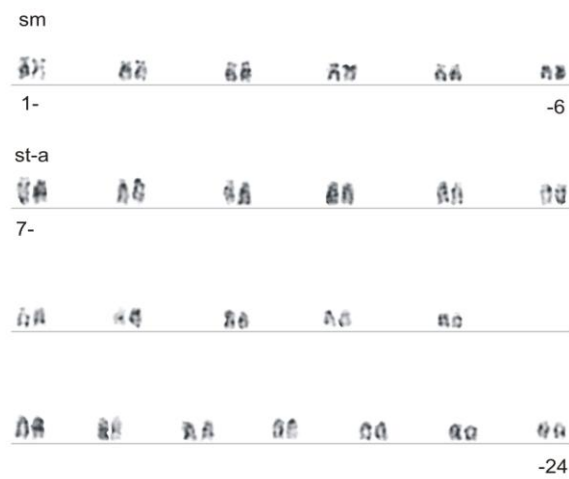
Obr. 8 Karyotyp *Cichlasoma amazonarum*, preparát získaný preparací chromozómů z embryí, chromozómy barveny Giemsovým barvivem, měřítko 10µm.



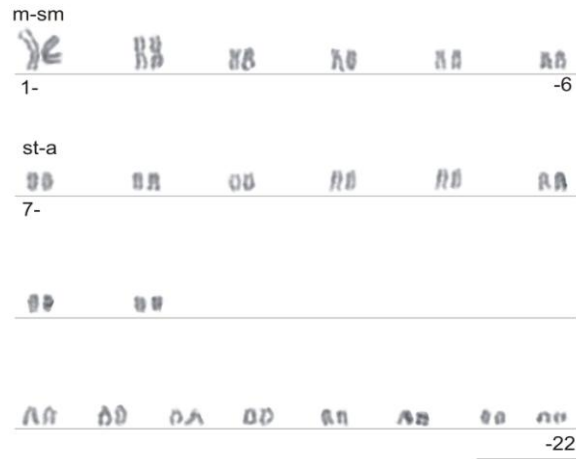
Obr. 9 Karyotyp *Cleithracara maronii*, preparát získaný preparací chromozómů z regenerátu, chromozómy barveny Giemsovým barvivem, měřítko 10 μ m.



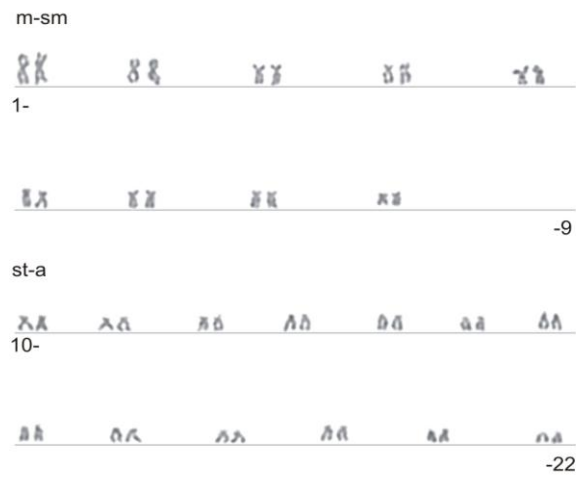
Obr. 10 Karyotyp *Ivanacara adoketa*, preparát získaný preparací chromozómů z regenerátu, chromozómy barveny Giemsovým barvivem, měřítko 10 μ m.



Obr. 11 Karyotyp *Krobia xinguensis*, preparát získaný preparací chromozómů z regenerátu, chromozómy barveny Giemsovým barvivem, měřítko 10 μ m.



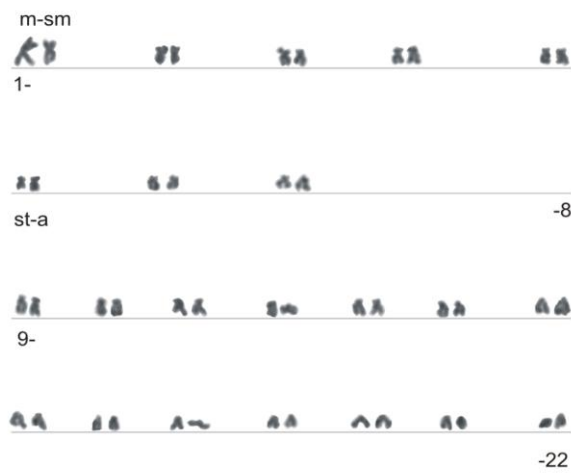
Obr. 12 Karyotyp *Laetacara araguia*, preparát získaný preparací chromozómů z regenerátu, chromozómy barveny Giemsovým barvivem, měřítko 10 μ m.



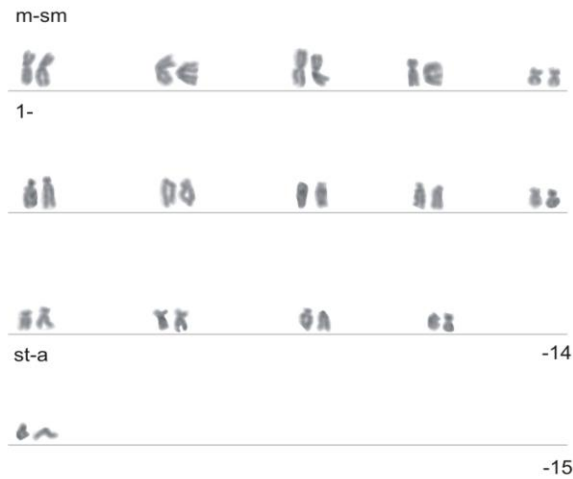
Obr. 13 Karyotyp *Nannacara anomala*, preparát získaný preparací chromozómů z regenerátu, chromozómy barveny Giemsovým barvivem, měřítko 10 μ m.



Obr. 14 Karyotyp *Nannacara aureocephalus*, preparát získaný preparací chromozómů z regenerátu, chromozómy barveny Giemsovým barvivem, měřítko 10 μ m.



Obr. 15 Karyotyp *Nannacara taenia*, preparát získaný preparací chromozómů z regenerátu, chromozómy barveny Giemsovým barvivem, měřítko 10 μ m.



Obr. 16 Karyotyp *Tahuantinsuyoa macantzatza*, preparát získaný preparací chromozómů z regenerátu, chromozómy barveny Giemsovým barvivem, měřítko 10 μ m.

Když získané chromozomové počty a karyotypy rozřadíme podle Thompsonova (1979) tvrzení můžeme konstatovat, že 9 druhů spadá do karyotypu typu „A“ pro, který je charakteristický původní počet $2n = 48$ chromozómů s většinou subtelocentrických až akrocentrických chromozómů. Jedná se o druhy: *Aequidens tubicen*, (Obr. 7), *Andinocara biseriatus* (Obr. 8), *Andinoacara pulcher*, *Andinoacara cf. pulcher* „Rio Chirgua“, *Andinocara rivulatus*, *Cichlasoma amozonarum* (Obr. 9), *Cichlasoma boliviense*, *Ivanacara adoketa* (Obr. 11) a *Krobia xinguensis* (Obr. 12).

Zbývajících 6 druhů má zvýšený nebo redukovaný počet chromozómů ($2n = 50, 44, 30$). Jsou to tyto druhy: *Cleithracara maronii* (Obr. 10), *Laetacara araguaia* (Obr. 13), *Nannacara anomala* (Obr. 14), *Nannacara aureocephalus* (Obr. 15), *Nannacara taenia* (Obr. 16) a *Tahuantinsuyoa macantzatza* (Obr. 17). Ty jsem zařadila do evolučně odvozeného karyotypu typu „B“ s nižším počtem chromozómů. Nejvýraznějším příkladem redukce je druh *Tahuantinsuyoa macantzatza* s $2n=30$, zde je fúzování chromozómů zcela evidentní nejen díky nízkému počtu, ale i velikosti chromozómů.

Když srovnáme charakteristiky karyotypů, které získala Marescalchi (2004) a charakteristiky získané v této práci, můžeme pozorovat určité rozdíly. Marescalchi (2004) vyhodnotila počet submetacentrických chromozómů v rozmezí 2 až 13 párů chromozómů. Námi získané výsledky ukazují vždy 6 párů submetacentrických chromozómů u skupiny rodů (*Aequidens* -

Andinoacara) s $2n=48$. Z toho pak vyplývají i rozdílné počty chromozomů v kategorii subtelocentrických až akrocentrických. Rozdíl mezi jedinci stejného druhu (konkrétně *Andinoacara pulcher*) může být způsobený odlišnou lokalitou původu jedinců v práci Marescalchi (2004) a v této práci. Marescalchi (2004) použila ke své studii ryby z akvarijských chovů, naopak v této práci byly použity ryby získané a importované z místa původu. Takovým příkladem je *Andinoacara cf. pulcher*, kdy typový materiál (jedinci podle kterých byl druh popsán) pochází z Trinidadu, zatímco areál rozšíření pokrývá mnohem rozsáhlejší území Venezuely a Kolumbie. Mnou použitý jedinec pocházel z řeky Chirgua ve Venezuele. V akvarijských chovech se vyskytuje tento druh již dlouho, ale geografický původ chovaných jedinců není jistý. Není proto možné říci, z které lokality pochází jedinec použitý v práci Marescalchi (2004). Navíc druh *Andinoacara pulcher* je velmi variabilní a podle analýzy DNA se pravděpodobně jedná o více druhů (Musilová et al., 2009). Dokud nebude vyřešena taxonomická situace v rámci tohoto druhu, nelze vyvodit jednoznačný závěr.

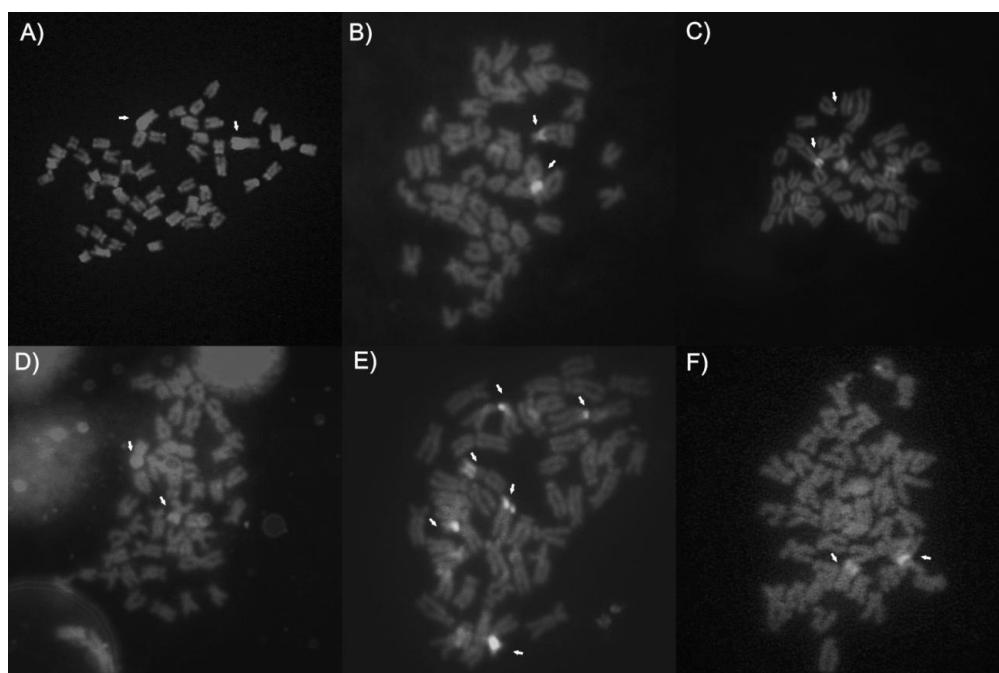
Pět z patnácti druhů uvedených v rámci této práce byly již dříve zkoumány v pracích Thompson (1979), Marescalchi (2004) nebo jsou uvedeny v přehledu chromozómových charakteristik čeledi Cichlidae (Feldberg, 2003).

Karyotyp *Nannacara anomala* odpovídá jak chromozómovým počtem ($2n=44$), tak karyotypovou charakteristikou ($18m/sm+26st/a$) výsledkům Thompsona (1979).

Cleithracara maronii koresponduje s předchozími studii (Marescalchi, 2004 a Feldberg, 2003) v počtu chromozómů ($2n=50$), ale v karyotypové charakteristice se mírně liší. Zatímco v mé studii jsem zjistila sedm m/sm chromozómových párů ($14m/sm+36st/a$) Marescalchi (2004) stanovila jen šest m/sm . Při přezkoumání studie Marescalchi (2004) jsem došla k závěru, že zařadila jeden submetacentrický pár do kategorie st/a chromozómů. Mohu tedy konstatovat, že mnou sestavený karyotyp je srovnatelný s karyotypem publikovaným Marescalchi (2004).

4.3. Fluorescenční barvení CDD pruhováním

Pro tyto druhy (*Cleithracara maronii*, *Ivanacara adoketa*, *Laetacara araguaia*, *Nannacara anomala*, *Nannacara aureocephalus* a *Nannacara taenia*) bylo provedeno fluorescenční barvení a byly pozorovány signály pro Chromomycin A₃ v rozmezí od jednoho do tří chromozómových párů.



Obr. 17 Metafáze s CDD pruhováním: A) *Cleithracara maronii*, B) *Ivanacara adoketa*, C) *Laetacara araguaia*, D) *Nannacara anomala*, E) *Nannacara aureocephalus*, F) *Nannacara taenia*. Šipky označují chromozómy se signálem pro CMA₃.

Chromomycin A₃ (CMA₃) poskytuje signály, které obvykle představují segmenty bohaté na GC báze v heterochromatinových oblastech DNA. Tyto oblasti často korelují s lokalizací aktivních nebo neaktivních NORů (nukleolárních organizátorů jádérka) v regíonech rDNA (Polleto et al. 2010, Schmid & Guttenbach, 1988, Ráb et al., 1999, Fontana et al., 2001).

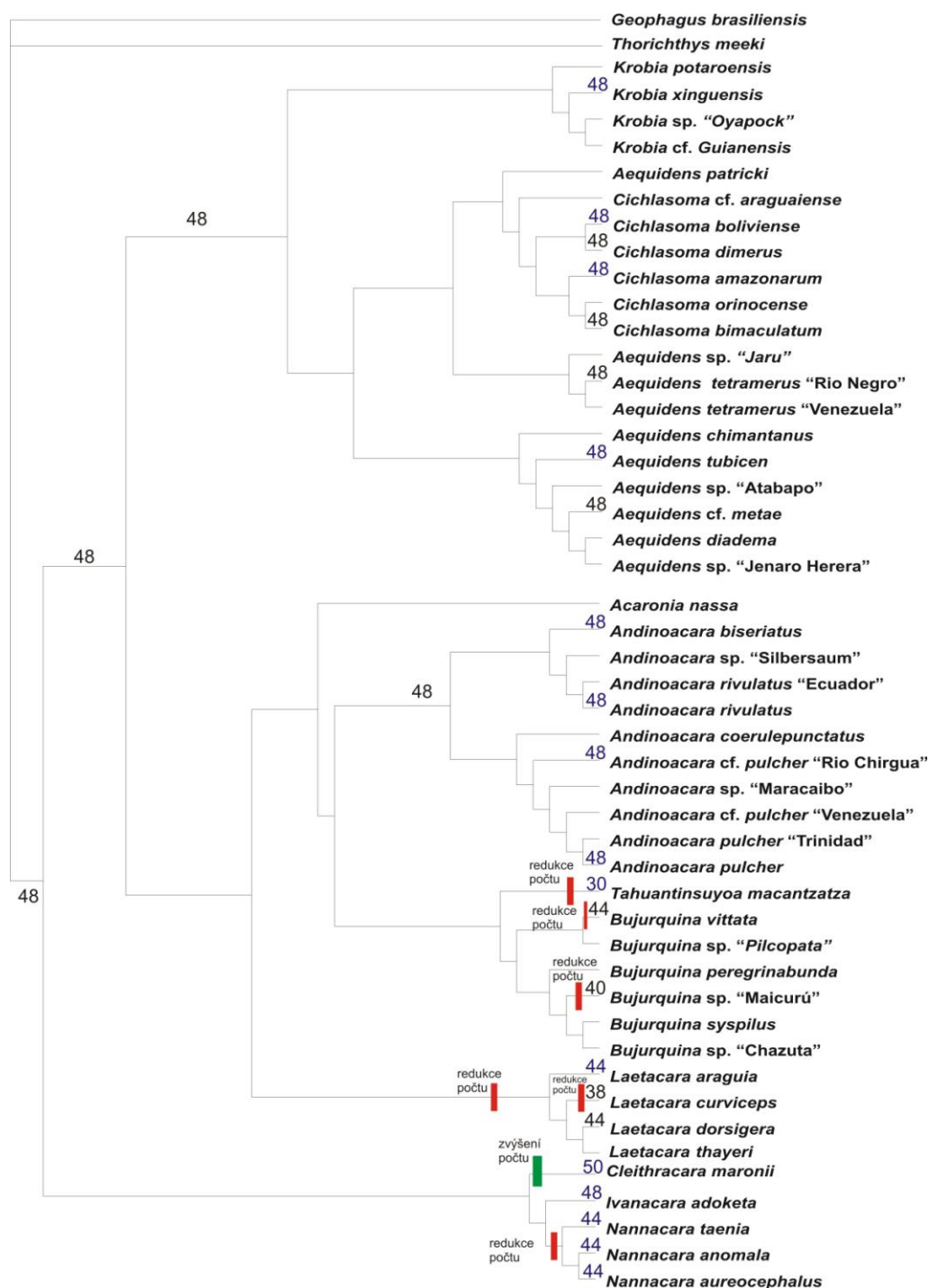
Počet nalezených CMA₃ signálů v této studii odpovídá skutečnosti, která byla již dříve pozorována u cichlid tj. nejčastější počet NORů u neotropických cichlid je jeden pár, avšak u některých druhů byly zjištěny až tři páry (Feldberg et al., 2003, Poletto et al., 2010). U skupiny rodů *Nannacara* – *Ivanacara*- *Cleithracara*- *Ivanacara* mají všechny druhy kromě *N. aureocephalus* jeden pár chromozomů s CMA₃ signálem.

U *N. aureocephalus* se vyskytují CMA₃ signály na třech chromozómových párech, tento stav je obvykle interpretován jako výsledek chromozomové inverze a následné zmnožení regionů rDNA (Polleto et al., 2010). Jeden z pozorovaných CMA₃ signálů u tohoto druhu se nachází v oblasti centromery.

Podle Feldberg et al. (2003) jeden NOR signál na větším chromozómovém páru představuje nejobvyklejší výskyt signálu pro NOR u celé čeledi Cichlidae. Hsu et al. (1975) navrhl, že druhy s jedním párem signálů pro NOR by měly být považovány za primitivnější než druhy s karyotypem s více signály pro NORy, které naznačují, že ancestrální karyotyp má méně NORů než karyotyp evolučně odvozený. Násobení NORů je obvykle způsobeno chromozomálními přestavbami typu translokace nebo inverze. Různé studie ale upozorňují na důkaz přítomnosti vlivu způsobeným aktivitou transpozomů v genomové struktuře Cioffi et al. 2010; Symonová et al. 2013; Schneider et al. 2013).

Jak shrnula Feldberg(-ová) (2003) pět z patnácti analyzovaných druhů podčeledi Cichlasomatinae (triby Heroini a Cichlasomatini) mají více NOR párů: *Caquetaia spectabilis* (Feldberg et al. 2003), *Cichlasoma paranaense* (Feldberg et al. 2003), *Mesonauata insignis* and *M. festivus* (Feldberg et al. 2003) and *Symphysodon aequifasciatus* (Feldberg et al. 2003).

4.4. Fylogeneze a evoluce karyotypů tribu Cichlasomatini



Obr. 18 Fylogenetický strom (Musilová et al., 2009) s daty o počtu chromozomů získaných během této práce (modrá čísla), a dále pak v práci Marescalchi (2004), Feldberga et al., (2003) a Thompsona (1979) (černá čísla). Dále jsou naznačeny hypotetické evoluční události, které mohly změnit počet chromozomů (redukce nebo zvýšení počtu chromozomů) s použitím metody maximální parsimonie za předpokladu vyšší pravděpodobnosti fúze než rozpadu chromozomů a aplikaci optimalizace ACCTRAN (hypotetické změny proběhly co nejdále od kořene stromu). Za počet chromozomů předka je považován původní ancestrální diploidní počet chromozomů cichlid je $2n = 48$ (Feldberg et al., 2003).




U tribu Cichlasomatini můžeme rozlišit tři směry diference karyotypů. První směr reprezentuje skupina rodů *Aequidens* – *Cichlasoma-Krobia*, všichni zkoumaní jedinci této skupiny mají $2n=48$ a shodnou karyotypovou charakteristiku: $12sm+36st-a$. Podle Thompsona (1979) odpovídá jejich karyotyp typu „A“ s většinou subtelocentrických/akrocentrických chromozómů. Tento karyotyp se vyvinul z ancestrálního díky pericentrickým inverzím, kdy dojde k posunu centromery ze středu chromozómu.

U skupiny rodů *Bujurquina* – *Tahuantinsuyo* – *Andinoacara* – *Laetacara* – *Acaronia* se vyskytuje tendence k postupnému snižování počtu chromozómů, všechny druhy *Andinoacara* mají $2n=48$, druhy rodů *Bujurquina* mají $2n=44;40$ a druhy rodů *Laetacara* mají $2n=44;38$ a u druhu *Tahuantinsuyo macantzaza* nacházíme dokonce $2n=30$. Podle Thompsona (1979) odpovídá jejich karyotyp typu „B“.

Díky většímu počtu sub/metacentrických chromozómů, oproti ancestrálnímu karyotypu, mohou být všechny studované druhy ze skupiny rodů *Nannacara* – *Ivanacara* – *Cleithracara* zařazeny do typu karyotypu „B“ dle Thompsona (1979), i přesto, že některé druhy nemají snížený celkový počet chromozómů. Tato skupina rodů prošla v minulosti různé evoluční cesty. Ke zvýšení počtu chromozómů dochází rozpadem, naopak snížení počtu se může odehrávat fúzí, či hromadnou fúzí, pravděpodobnější evoluční událost je fúze chromozómů než jejich rozpad (Imai et al., 1986). Přehled analyzovaných druhů a jejich chromozomových změn je naznačen v tabulce č. 3.

Fylogenetická rekonstrukce evoluce karyotypu naznačuje následující scénář: z ancestrálního karyotypu se karyotyp *C. maronii* ($2n=50$; $14sm+36st/a$) oddělil rozpadem jednoho sub/metacentrického chromozomového páru na dva další páry subtelocentrických/akrocentrických chromozómů. U linie *Nannacara* došlo ke dvěma fúzím, které snížily počet chromozómů na $2n=44$. Tyto fúze byly následovány pericentrickými inverzemi, které opět snížily počet sub/metacentrických chromozómů. Alespoň k jedné pericentrické inverzi došlo u předka všech *Nannacar*. U linie *N. taenia* ($2n=44$; $16m/sm+28st/a$) došlo ještě k jedné pericentrické inverzi. Nakonec dvě

inverze, které vedly k znásobení oblasti s CMA₃ signálem se vyskytly u *N. aureocephalus* (2n=44; 18m/sm+26st/a).

Chromozómová přestavba	Druh
Pericentrická inverze/bez změny 	<i>Aequidens tubicen</i> <i>Andinoacara biseriatus</i> <i>Andinoacara cf. Pulcher "Rio Chirgua"</i> <i>Andinoacara pulcher</i> <i>Andinoacara rivulatus</i> <i>Cichlasoma amazonarum</i> <i>Cichlasoma boliviense</i> <i>Krobia xinguensis</i>
Fúze/ hromadná fúze 	<i>Laetacara araguaia</i> <i>Nannacara anomala</i> <i>Nannacara aureocephalus</i> <i>Nannacara taenia</i> <i>Tahuantinsuyoa macantzatza</i>
Rozpad 	<i>Cleithracara maronii</i>

Tab. 3 Souhrn chromozomových změn u analyzovaných druhů.

Popsané mechanismy chromozómových přestaveb jsou popsány jak u cichlid, tak u ostatních rybích druhů. Obvykle sub/metacentrický chromozóm vzniká (centrickou) fúzí, kdy se dva akrocentrické/telocentrické chromozómy spojí (Thompson, 1979). Nicméně počet sub/metacentrických chromozómů v karyotypu není evolučně stabilní. Sub/metacentrický chromozóm se změní zpět v akrocentrický/subtelocentrický chromozóm díky inverzi, která zahrnuje centromeru (pericentrická inverze) (Feldberg et al. 2003, Poletto et al. 2010). Tyto pericentrické inverze jsou považovány za hlavní mechanismus, který přispívá ke změnám velikosti chromozomových ramen u Perciformes (Galletti et al., 2000, Affonso, 2005).

5. Závěry a doporučení pro využití v praxi nebo pro další rozvoj oboru

Podle stanoveného cíle jsem určila počet chromozómů u společného předka tribu Cichlasomatini na $2n=48$, což je ve shodě s autory Marescalchi (2004) a Feldberg (2003).

Dále se podařilo přizpůsobit Völkerovu metodu izolace chromozómů z regenerátu pro cichlidy.

Přesto, že se nepodařilo získat cytogenetické informace pro všechny zástupce tribu Cichlasomatini, došlo k rozšíření cytogenetických dat tohoto tribu.

Podařilo se popsat diferenciaci karyotypů, ke kterým v průběhu evoluce tribu pravděpodobně došlo, současně byl stanoven minimální počet evolučních událostí. Rovněž byly popsány mechanismy, jakým způsobem se uvedené změny odehrávají.

Došlo k zanesení získaných a již publikovaných cytogenetických dat na fylogenetický strom, který je založen na sekvenačních datech. Při porovnání těchto informací můžeme potvrdit skutečnost, že známé fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy tribu Cichlasomatini odvozené ze sekvenací mitochondriálních a jaderných genů jsou zatím ve shodě s fylogenetickými vztahy, které jsou založeny na evolučních změnách v karyotypech. Jistotu pro toto tvrzení budeme mít, až budou k dispozici kompletní cytogenetická data pro celý tribus.

K objasnění dalších evolučních skutečností u tribu Cichlasomatini by bylo vhodné pokračovat v získávání karyotypů u ještě nezanalyzovaných druhů. K doplnění cytogenetických dat by bylo vhodné použít barvení pomocí $AgNO_3$, telomerické a ribosomální sondy k vyjasnění dalších evolučních změn v karyotypech.

Pro další poznání tribu Cichlasomatini by bylo užitečné provést srovnávací analýzu karyotypů u samců a samic a detekovat pohlavní chromozómy a následně stanovit systém určení pohlaví.

6. Seznam použité literatury

Accioly, I. V., Molina, W. F. 2008. Cytogenetic studies in Brazilian marine Sciaenidae and Sparidae fishes (Perciformes). *Genetics Molecular Research*. 7:358-370.

Affonso, P. R., Galetti, P. M. Jr. 2005. Chromozomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). *Genetica*. 123:227-233.

Arai, R., Nagaiwa, K. 1976. Chromozomes of two species of Beryciform fishes from Japan. *Bulletin of the National Science Museum, Ser. A (Zool.)*. 2:199-203.

Barlow, G. W. 2001. *The Cichlid Fishes Nature's Grand Experiment in Evolution*, Basic Books, Cambridge, ISBN:0-7382-0528-1.

Brum, M. J. I., Galetti, P. Jr. 1997. Teleostei ground plan karyotype. *Journal of Computational Biology*. 2:91-102.

Cioffi M.B., Martins C., Bertollo L.A. 2010. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Bioliology*. 10:271.

Coulter, G. W. 1991. *Lake Tanganyika and its life* (Oxford University Press, Oxford).

Denton, T. E. 1973. Evolution of the fish karyotype. In *Fish chromozome methodology*. Illinois: Springfield:129-148.

Eschmeyer, W. N. and Fricke, R. (eds.) *Catalog of Fishes* electronic version (15.01.2012) dostupné z

<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>

Ebeling, A. W., Atkin N. B., Setzer, P. Y. 1971. Genome sizes of teleostean fishes: increase in some deep-sea species. *The American Naturalist* 105:549-562.

FAO, Overview: Major Trends and Issues (22.1.2012) dostupné z <http://www.fao.org/fishery/statistics/en>

Fontana F., Tagliavini J., Congiu L. 2001. Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives. *Genetica*. 111:359-373.

Farias, I. P., Ortí, G., Sampaio, I., Schneider, H., Meyer, A. 1999. Mitochondrial DNA Phylogeny of the Family Cichlidae: Monophyly and Fast Molecular Evolution of the Neotropical Assemblage. *Journal of Molecular Evolution*. 48:703-711.

Farias, I. P., Ortí, G., Meyer, A. 2000. Total evidence: Molecules, Morphology, and the Phylogenetics of Cichlid fishes. *Journal of Experimental Zoology. (Molecular and Developmental Evolution.)* 288:76-92.

Feldberg, E. and Bertollo, L.A.C. 198.: Karyotypes of 10 species of Neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). *Caryologia*. 38(3-4): 257-268.

Feldberg, E., Porto, J. I. R., Santos, E. B. P., Valentim, F.C.S. 1999. Cytogenetics studies of two freshwater sciaenids of the genus *Plagioscion* (Perciformes, Scianidae) from the Central Amazon. *Genetics and Molecular Biology*, 22:351-356.

Feldberg, E., Porto, J. I. R., Bertollo, L. A. C. 2003. Chromosomal changes and adaption of cichlid fishes during evolution. In: *Fish Adaption*. Val, A. L., Kapoor, B.G., (Eds.) Enfield-NH, USA, Science Publishers. p. 285-308.

Ferreira I., Poletto B., Kocher T.D., Mota-Velasco J.C., Penman D.J., Martins C. 2010. Chromosome evolution in African cichlid fish: contributions from the physical mapping of repeated DNAs. *Cytogenetic and genome research* 129(4): 314–22. doi:10.1159/000315895.

Froese R., Pauly D. 2011. FishBase World Wide Web electronic publication, (28.12. 2011) dostupné z www.fishbase.org

Fryer, G., Iles, T. D. 1972. *The Cichlid fishes of the great lakes of Africa: Their biology and evolution* (TFH Publications, Neptune City, NJ).

Genner, M. J., Seehausen, O., Lunt, D. H., Joyce, D. A., Shaw, P. W., Carvalho, G. R., Turner, G. F. 2007. Age of Cichlids: New Dates for Ancient Lake Fish Radiations.

Gold, J. R. 1979. Cytogenetics, p. 353-405. In Fish physiology, Vol. 8, W. S. Hoar, D. J. Randall and Brett J. R. (eds.) Academic Press.

Gross, M. C., Feldberg, E., Cella, D. M., Schneider, M. C., Schneider, C. H., Porto, J. I. R., Martins, C. 2009. Intriguing evidence of translocations in Discus fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. *Heredity*, 102(5):435-41.

Harvey, S. C., Campos-Ramos, R., Kennedy, D. D., Ezaz, M. T., Bromage, N. R., Griffin DK, Penman, D. J. 2002. Karyotype evolution in tilapia: mitotic and meiotic chromozóme analysis of *Oreochromis karongae* and *O. niloticus* X *O. karongae* hybrids. *Genetica* 115:169-177.

Kalous, L., Knytl M., Krajáková, L. 2010. Usage of non-destructive method of chromosome preparation applied on silver Prussian carp (*Carassius gibelio*). In: Kubík Š, Barták M (Eds) Proceedings of the Workshop on Animal Biodiversity. Jevany, July 7, 2010, 57-60.

Kirpichnikov, V. S. 1973. On karyotype evolution in Cyclostomata and Pisces. *Ichthyologia*. 5:55-77.

Klinkhardt, M., Tesche, M., Greven, H. 1995. Database of fish chromozomes Magdeburg. Westarp Wissenschaften.

Kocher, T. D. 2004. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nature Reviews Genetics*. 5:288-98.

Kohn, M., Högel, J., Vogel, W., Minich, P., Kehrer-Sawatzki, H., Graves, J. A. M., Hameister, H. 2006. Reconstruction of a 450-My-old ancestral vertebrate protokaryotype. *Trends in Genetic*. 22(4):203-210.

Kornfield, I. L., Ritte, U., Richler, C., Wahrman, J. 1979. Biochemical and cytological differentiation among cichlid fishes of the Sea of Galilee. *Evolution* 33(1, part 1): 1-14.

Kornfield, I. L. 1984. Descriptive Genetics of Cichlid fishes. In: *Evolutionary Genetics of Fishes*, Turner, B. J. (Ed.), Plenum Press, New York. p. 591-616.

Kornfield, I., Smith, P. F. 2000. African cichlid fishes: Model system for evolutionary biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 31:163-96.

Kullander, S. O. 1998. A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Part 5*. Malabara, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M., Lucena, C.A.S. (Eds.) Porto Alegre, RS, Brasil. EDUPUCRS. p. 461-498.

Kullander, S. O., Nijssen, H. 1989. *The Cichlids of Surinam*. E. J. Brill, Leiden, 251pp.

Kullander, S. O., Prada-Pedrerros, S. 1993. *Nannacara adoketa*, a new species of cichlid fish from the Rio Negro in Brazil *Ichthyological Exploration of Freshwaters* . 4(4):357-366.

Levan, A., Fredga, K., Sanger, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52:201-220.

Majumdar, K. C., McAndrew, B. J. 1986. Relative DNA content of somatic nuclei and chromosomal studies in three genera, *Tilapia*, *Sarotherodon*, and *Oreochromis* of the tribe Tilapiini (Pisces, Cichlidae). *Genetica*. 68:175-188.

Mank, J. E., Avise, J. C. 2006. Phylogenetic conservation of chromosome numbers in Actinopterygian fishes. *Genetica*. 127:321-327.

Marescalchi, O. 2004. Karyotype and mitochondrial 16S gene characterizations in seven South American Cichlasomatini species (Perciformes, Cichlidae). *Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research*, 43: 22-28.

Mayr, B., Ráb, P., Kalat, M. 1985. Localisation of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae), *Genetica*. 67, 51-56.

Meyer, A. 1993. Phylogenetic relationships and evolutionary processes in East African cichlids. *Trends in Ecology and Evolution*. 8:279–284.

Molina, W. F., Galetti, P. M. Jr 2002 Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromozómes bearing 5S rRNA genes. *Genetics and Molecular Biology*. 25:373-377.

Mota-Velasco, J. C., Ferreira, I. A., Cioffi, M. B., Ocalewicz, K., Campos-Ramos, R., Shirak, A., Lee, B-Y, Martins, C., Penman, D. J. 2010. Characterization of the chromozóme fusions in *Oreochromis karongae*. *Chromozome Research*. 18:5 (575-586).

Musilová, Z., Říčan, O., Janko, K. and Novák, J., 2008. Molecular phylogeny and biogeography of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatinae), *Molecular phylogenetics and evolution*. 46:2, 659-672.

Musilová, Z., Říčan, O., Novák, J., 2009. Phylogeny of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae) based on morphological and molecular data, with the description of a new genus. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 47(3):234-247.

Nagl, S., Tichy, H., Mayer, W. E., Samonte, I. E., McAndrew, B. J., Klein, J. 2001. Classification and phylogenetic relationships of African Tilapiine fishes inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 20:361-374.

Nakatani, Y., Takeda, H., Kohara Y., Morishita, S. 2007. Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates, *Genome Research*. 17(9): 1254–1265.

Nirchio, M., Gaviria, J. I., Oliveira, C., Ferreira, I. A., Martins, C. 2007. Cytogenetic analysis of three species of the genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulinae) from Margarita Island, Venezuela. *Genetica*. 131:135-140.

Ohno, S. 1974. Chordata 1, Protochordata, Cyclostomata and Pisces. *Animal Cytogenetics*. 4:1-92.

Ohno, S., Muramoto, J., Klein, J., Atkin, N. B. 1969 Diploid-tetraploid relationship in clupeoid and salmon fis. *Chromozomes Today*. 2:139-147.

Poleto, A. B., Ferreira, I. A., Cabral de Mello, D. C., Nakajima, R. T., Mazzuchelli, J., Ribeiro, H. B., Venere, P. C., Nirchio M., Kocher, T. D., Martins, C. 2010. Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. *BMC Genetics*. 11:50.

Ráb, P., Bohlen, J., Rábová, M., Flajšhans, M., Kalous, L. 2007. Cytogenetics as a tool in fish conservation: the present situation in Europe. in: *Fish Cytogenetics*. E. Pisano, C. Ozouf- Costaz, F. Foresti, B. G. Kapoor (Eds), Science Publishers, Enfield, USA, ISBN 1-57808-330-3, pp. 215-241.

Ráb, P., Rábová, M., Reed, K. M., Phillips, R. B. 1999. Chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the primitive semionotiform fish, longnose gar *Lepisosteus osseus* . *Chromosome Research*. 7: 475-480.

Salzburger, W., Meyer, A. 2004. The species flocks of East African cichlid fishes: recent advances in molecular phylogenetics and population genetics. *Naturwissenschaften* 91:277-290.

Schmid, M., Guttenbach, M. 1988. Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma*. 97:327-344.

Schneider, CH., Gross, M.C., Terencio, M. L., do Carmo E. J., Martins, C., Feldberg, E. 2013. Evolutionary dynamics of retrotransposable elements Rex1, Rex3 and Rex6 in neotropical cichlid genomes. *BMC Evolutionary Biology*. 13:152.

Smith, W. L., Chakrabarty, P., Sparks, J. S. 2008: Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics*. 24:625-641.

Sola L, Rossi AR, Laselli V, Rasch, EM, Monaco PJ 1992. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3, and silver staining. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 60: 229 – 235.

Sparks, J. S., Smith, W. L. 2004. Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Cladistics*. 20:501-517.

Staeck, W. and Schindler, I. 2004. *Nannacara quadrispinata* sp. n. - a new dwarf cichlid fish (Teleostei: Perciformes: Cichlidae) from the drainage of the Orinoco Delta in Venezuela. *Zoolgische Abhandlungen aus dem Staatlichen Museum für Tierkunde in Dresden*. 54:155-161.

Stiassny, M. L. J. 1991. Phylogenetic intrarelationships of the family Cichlidae: an overview. In *Cichlid Fishes Behaviour, ecology and evolution*, Ed. M. H. A. Keenleyside, Chapman Hall, London, 1991.

Stiassny, M. L. J., Meyer, A. 1999. Cichlids of the Rift Lakes. *Scientific American* 280(2):64-69.

Symonová, R., Majtánová, Z., Sember, A., Staaks, G. B. O., Bohlen, J., Freyhof, J., Rábová, M., Ráb, P. 2013. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated

retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evolutionary Biology*. 3:42.

Thompson, K. W. 1979. Cytotaxonomy of 41 species of Neotropical Cichlidae. *Copeia*. (4):679-691.

Thompson, K. W. 1981. Karyotypes of six species of African Cichlidae (Pisces: Perciformes). *Experimentia*. 37:351-352.

Turner, G. F., Seehausen, O., Knight, M. E., Allender, C. J, Robinson, R. L. 2001. How many species of cichlid fishes are there in African lakes? *Molecular Ecology*. 10:793–806.

Turner, G. F. 2007. Adaptive radiation of cichlid fish. *Current Biology*. 17(19):R827-31.

Uyeno, T. 1973: A komparative study of chromozómes in the teleostean fish order Osteoglossiformes. *Japanese Journal of Ichthyology*. 20:211-217.

Valente, G. T., Schneider, CH., Gross, M. C., Feldberg, E., Martins, C. 2009. Comparative cytogenetics of cichlid fishes through genomic in-situ hybridization (GISH) with emphasis on *Oreochromis niloticus*. *Chromosome research*. 17(6): 791–9. doi:10.1007/s10577-009-9067-5.

Völker, M., Sonnenberg, R., Ráb, P., Kullmann, H. 2006. Karyotype differentiation in Chromaphyosemion killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). II: Cytogenetic and mitochondrial DNA analyses demonstrate karyotype differentiation and its evolutionary direction in *C. riggenbachi*. *Cytogenetic Genome Research*. 115:70-83. DOI:10.1159/000094803.

7. Přílohy

7.1. Publikace a příspěvky

Comparative cytogenetics of Neotropical cichlid fishes (*Nannacara*, *Ivanacara* and *Cleithracara*) indicates evolutionary reduction of diploid chromosome numbers

Lucie Hodaňová¹, Lukáš Kalous¹, Zuzana Musilová^{1,2,3}

1 Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic **2** Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics AV CR, Libeňov, Czech Republic **3** Zoological Institute, University of Basel, Switzerland

Corresponding author: Zuzana Musilová (zuzmus@gmail.com)

Academic editor: Petr Rab | Received 17 February 2014 | Accepted 29 July 2014 | Published @ @ @ @ @ 2014

urn:lsid:zoobank.org:pub:

Citation: Hodaňová L, Kalous L, Musilová Z (2014) Comparative cytogenetics of Neotropical cichlid fishes (*Nannacara*, *Ivanacara* and *Cleithracara*) indicates evolutionary reduction of diploid chromosome numbers. *Comparative Cytogenetics* @ @ : @ - @ . doi: 10.3897/CompCytogen.@@.7279

Abstract

A comparative cytogenetic analysis was carried out in five species of a monophyletic clade of neotropical Cichlasomatine cichlids, namely *Cleithracara maronii* Steindachner, 1881, *Ivanacara adoketa* (Kullander et Prada-Pedreras, 1993), *Nannacara anomala* Regan, 1905, *N. aureocephalus* Allgayer, 1983 and *N. taenia* Regan, 1912. Karyotypes and other chromosomal characteristics were revealed by CDD banding and mapped onto the phylogenetic hypothesis based on molecular analyses of four genes, namely *cyt b*, 16S rRNA, *S7* and *RAG1*. The diploid numbers of chromosomes ranged from 44 to 50, karyotypes were composed predominantly of monoarmed chromosomes and one to three pairs of CMA₃ signal were observed. The results showed evolutionary reduction in this monophyletic clade and the cytogenetic mechanisms (fissions/fusions) were hypothesized and discussed.

Keywords

Cichlid cytotaxonomy, *cyt b*, 16S rRNA, *S7-1*, *RAG1* phylogeny, karyotype differentiation, CMA₃ phenotypes, Cichlasomatini

Introduction

Cichlids are a species-rich group of ray-finned fishes (Actinopterygii), distributed in tropical and subtropical freshwaters of Africa and South and Central America, Texas, Madagascar, the Middle East, India and Sri Lanka (Kullander 1998). As a third largest fish family (Eschmeyer 2012) cichlids represent highly evolutionarily successful fish lineage and it is considered that no other family of vertebrates exceeds cichlids in a number of varieties, shapes, colors and especially in ecological and trophic specializations (Kocher 2004).

In general, genomes of ray-finned fishes are known for high evolutionary dynamics among vertebrates, which is reflected in huge genome-architecture variability (Mank and Avise 2006). The diploid chromosome number ($2n$) studied in 615 Actinopterygian species ranges from 22 to 250, but over a half of the species possess the conservative number of $2n = 48 - 50$ chromosomes (29.3% have $2n = 48$ and 25.4% have $2n = 50$; Mank and Avise 2006). The most frequent fish karyotype, i.e. $2n = 48$ ($n=24$), is also recognized as an ancestral karyotype of the whole Teleostei (Ohno et al. 1969, Nakatani et al. 2007).

In total, over 190 cichlid species have been cytogenetically analyzed and the karyotype formula was determined for 157 of them (Arai 2011). Available cytogenetic data in cichlids show that the diploid chromosome numbers range from $2n=32$ to $2n=60$, but more than 60% of the examined species show the ancestral karyotype with $2n=48$, which mostly dominates in the Neotropical cichlid lineage (Feldberg et al. 2003).

In the past only few species were analyzed and Neotropical cichlids were considered a karyotypically conservative group due to the frequent findings of 48 chromosomes (Thompson 1979, Kornfield 1984). Later, Marescalchi 2004 and Poletto et al. 2010 demonstrated much higher variability in the chromosome number and hypothesized that the ancestral karyotype of the Neotropical cichlids underwent significant changes in structure in several lineages, which led to extensive karyotype diversification. Further, many species possess the similar $2n=48$, but differ in karyotype structures, which brings additional evidence of the karyotype differentiation due to the intra-chromosomal rearrangements like centromeric shifts (Feldberg et al. 2003). It is likely that at least some different lineages coincidentally converged to the same number of chromosomes from different ancestral stages but the mechanisms of why there is certain favorable number of chromosomes remains still unknown (Mank and Avise 2006).

Dwarf cichlids of the genus *Nannacara* Regan, 1905, and its relatives, genera *Ivanacara* Römer et Hahn, 2007 and *Cleithracara* Kullander et Nijssen, 1989 represent a well-defined evolutionary lineage of acaras (NIC-clade of the tribe Cichlasomatini, Musilová et al. 2008) distributed mostly in rivers of the Guyana shield, as well as in the Rio Negro basin, and the Amazon and Orinoco deltas. This group includes seven known species, four in the genus *Nannacara*, then two species recently extracted from *Nannacara* to the genus *Ivanacara* (Römer and Hahn 2007), and the monotypic genus *Cleithracara*, which is basal to all the others. The cytogenetics of this clade remains poorly known since only two species of this group, *Cleithracara maronii* (Steindach-

ner, 1881) with $2n=50$ (Marescalchi 2004) and *Nannacara anomala* Regan, 1905 with $2n=44$ (Thompson 1979) have been previously investigated.

In this study we present karyotypes and other chromosomal characteristics as revealed by CDD banding in five species of monophyletic clade of neotropical Cichlasomatine cichlids, namely *Cleithracara maronii*, *Ivanacara adoketa* (Kullander et Prada-Pedrerros, 1993), *Nannacara anomala*, *Nannacara aureocephalus* Allgayer, 1983 and *Nannacara taenia* Regan, 1912. We further mapped the results onto the phylogenetic hypothesis from molecular analyses based on four genes. We discuss possible scenario of the karyotype evolution of the clade of dwarf cichlids within the tribe Cichlasomatini.

Materials and methods

Materials

The species included in the present study are listed in Table 1. Most of the individuals originated from aquarium trade from different breeders. Further, various collectors or ornamental-fish importers donated several samples for DNA analysis. Species were identified following Kullander & Nijssen, 1989, Kullander & Prada-Pedrerros, 1993 and Staeck & Schindler (2004), and part of the analyzed fish was deposited in ICCU (Ichthyological Collection of Charles University, Prague). See Table 1 and Table 2.

Cytogenetic analyses

Chromosomes were obtained by non-destructive isolation procedure from caudal fin regenerates as developed by Völker et al. (2006) and modified by Kalous et al. (2010). This method is based on regeneration of the caudal fin tissue after cutting a small part (2–3mm) from its margin. After five to seven days the regenerated tissue was cut and incubated in the solution with colchicine for two hours at room temperature. A few drops of fixative (methanol, acetic acid 3:1) were added to the tissue after this incubation and it was placed for 30min at 4°C. The tissue was washed twice in fixative, always staying for 30min at 4°C after the wash. Next, the tissue was placed into a drop of 20% acetic acid and gently mashed through a fine sieve. The suspension was dropped on a slide on a hot plate (45°C). After 20 seconds the drop of suspension was sucked up from the slide and dropped to a different place in the slide. Metaphase chromosomes were stained in 4% Giemsa solution in phosphate buffer (pH=7). Generally 5–50 metaphases per individual were evaluated. Chromosomes were classified according to Levan et al. (1964), to be consistent with most of the recent studies on cichlid fishes (Marescalchi 2005, Fedlberg 2003, Poletto et al. 2010) and arranged to karyotypes by using ADOBE PHOTOSHOP, version CS7. The CDD fluorescent banding (Chromomycin A₃/methyl green/DAPI) was performed following Mayr (1985) and Sola (1992).

Table 1. Sample list for the present study. Details on individuals of cichlids investigated for the molecular genetics. Outgroup data were used from the original study (Musilová et al. 2008, 2009).

Individuals used in molecular phylogenetic analyses:		Accession numbers in GenBank					Sample voucher
species	sample code	origin	cytb	16S rRNA	S7	RAG1	
<i>Geophagus brasiliensis</i>	ouigroup - used from GenBank		EF470895	EU888080	EU199082	EU706360	-
<i>Bujurquina vittata</i>	ouigroup - used from GenBank		EF432951	EF432892	EF432984	EU706385	-
<i>Aequidens metae</i>	ouigroup - used from GenBank		EF432927	EF432882	EF432974	-	-
<i>Laetacara thayeri</i>	ouigroup - used from GenBank		AY050608	EF432909	EF433001	EU706401	-
<i>C. maronii</i>	Cleith	aquarium trade	AY050614	EF432901	EF432993	EU706394	ICCU 0736
<i>N. (L.) adoketa</i>	ADO	aquarium trade	EF432946	EF432903	EF432995	EU706396	ICCU 0745
<i>N. (L.) adoketa</i>	In06	Rio Inirida	KJ136667	-	KJ136659	-	ICCU 1001
<i>N. (L.) adoketa</i>	In03	Rio Inirida	KJ136668	-	KJ136660	-	ICCU 1002
<i>N. anomala</i>	ANO	aquarium trade	AY050618	EF432898	EF432990	EU706391	ICCU 0746
<i>N. anomala</i>	NaD	Orinoco delta	KJ136669	KJ136671	KJ136661	-	ICCU 1004
<i>N. anomala</i> "Suriname"	WSN	F1 progeny	-	-	KJ136654	-	-
<i>N. aureocephalus</i> "blue"	RNA01	aquarium trade	-	KJ136673	KJ136663	-	ICCU 1005
<i>N. aureocephalus</i> "blue"	RNA03	aquarium trade	-	KJ136674	KJ136664	-	-
<i>N. aureocephalus</i> "blue"	RNA04	aquarium trade	-	KJ136675	KJ136665	-	-
<i>N. aureocephalus</i>	AUR	aquarium trade	EF432939	EF432899	EF432991	EU706392	ICCU 0747
<i>Nannacara sp.</i>	SAR	import/unknown	-	KJ136670	KJ136655	KJ136666	ICCU 1003
<i>N. prope aureocephalus</i> "brown"	AurBrown01	aquarium trade	-	KJ136672	KJ136662	-	-
<i>Nannacara sp.</i> "Soumourou"	NSP01	F1 progeny	-	-	KJ136656	-	-
<i>Nannacara sp.</i> "Oyapock"	NSP02	F1 progeny	-	-	KJ136657	-	-
<i>Nannacara sp.</i> "Oyapock"	NSP03	F1 progeny	-	-	KJ136658	-	-
<i>Nannacara sp.</i>	AF045860	GenBank	-	AF045860	-	-	-
<i>N. taenia</i>	TAE	aquarium trade	EF432921	EF432900	EF432921	EU706393	ICCU 0749

Table 2. Sample list for karyotypes analysis.

Individuals used in cytogenetic analyses (all from aquarium trade):		
Species	Number of analyzed individuals	Sex
<i>C. maronii</i>	3	undifferentiated
<i>I. adoketa</i>	3	2× male, 1× female
<i>N. anomala</i>	5	3× male, 2× female
<i>N. aureocephalus</i>	3	undifferentiated
<i>N. taenia</i>	3	undifferentiated

Molecular genetic analyses

DNA was extracted from the ethanol-preserved samples by the commercially available kits (QiaGen), and four target genes (cyt b, 16S rRNA, S7 first intron, RAG1) were amplified by PCR using primers according to Musilová et al. (2009). Sequences of the PCR products were obtained by commercial sequence-service company (Macrogen, South Korea, Netherlands). Sequences were aligned in BIO EDIT (Hall, 1999) software and genes were concatenated for the bayesian analysis in MRBAYES 3.2. (Ronquist et al. 2012). Analysis parameters were: number of generations = 10,000,000, number of chains = 4, number of runs = 2, model set for every gene separately (and unlinked) based on the jModeltest (Posada, 2008) results. Three additional species (*Bujurquina vittata*, *Aequidens metae* and *Laetacara thayeri*) from the same taxonomic tribus Cichlasomatini as *Nannacara* + *Ivanacara* were analyzed as well, and one species of the different tribus Geophagini (*Geophagus brasiliensis*) was determined as an out-group for the phylogenetic analysis. Sequences were uploaded to GenBank (Table 1).

Results

Karyotype characteristics

Results are summarized in Fig. 1 and Table 3. Examined individuals of the species of genera *Nannacara*, *Ivanacara* and *Cleithracara* showed the diploid chromosome number $2n = 44$ to 50 chromosomes. All three species of the genus *Nannacara* possessed 44 chromosomes and karyotype composed of 18 metacentric (m)-submetacentric (sm)+26 subtelocentric (st)-acrocentric (a) or 16m-sm+28st-a chromosomes, while *Ivanacara adoketa* had $2n = 48$ and karyotype of 16m-sm+32st-a chromosomes, and *Cleithracara maronii* had $2n = 50$ composed of 14sm+36st-a chromosomes. Karyotypes of all studied species are shown in Fig. 1.

CDD fluorescence

In the karyotypes of four studied species, namely *C. maronii*, *I. adoketa*, *N. anomala*, and *N. taenia*, the CMA₃-positive signals were found on one chromosome pair,

Table 3. Karyotype characteristics of the South American dwarf cichlids, including the diploid number of chromosomes (2n), chromosome categories, and CMA₃ phenotype.

Species	2n	Karyotype	CMA ₃ signals
<i>Cleithracara maronii</i>	50	14sm+36st-a	1 sm pair
<i>Ivanacara adoketa</i>	48	16m-sm+32st-a	1 st-a pair
<i>Nannacara anomala</i>	44	18m-sm+26st-a	1 m-sm pair
<i>Nannacara aureocephalus</i>	44	18m-sm+26st-a	3 m-sm pair
<i>Nannacara taenia</i>	44	16m-sm+28st-a	1 st-a pair

although probably not homologous in different species. In *C. maronii* the CMA₃-positive signals were located on terminal parts of the largest m-sm chromosome pair, whereas in *I. adoketa* and *N. taenia* the CMA₃ signals were located a chromosome pair from st-a group, terminal parts in *N. taenia* and around the centromere in *I. adoketa*. In *N. anomala* the CMA₃ signals were found on the terminal parts of a chromosome pair from m-sm group, but not on the largest pair. Contrarily, in the karyotype of *N. aureocephalus*, the CMA₃ signals were located on three m-sm chromosome pairs including the largest chromosome pair in the centromeric region. See Table 3 for more detail about the karyotype formulas and CMA₃ phenotypes and Fig. 1 for representative metaphases and results of different staining steps.

Phylogenetic analysis and karyotype differentiation

Phylogenetic reconstruction based on the DNA sequences of up to four genes shows monophyly of the genus *Nannacara* (three species used in this study) and its sister relationship with the genus *Ivanacara* (one species present in our study). The monotypic genus *Cleithracara* (*C. maronii*) represents then basal lineage to the rest of *Nannacara* + *Ivanacara* (Fig. 2). The observed karyotype characteristics, i.e. the diploid chromosome number, the karyotype and the phenotype, were mapped on the phylogenetic tree and allowed reconstruction of the scenario of genome/karyotype evolution in the studied cichlids as well as to reconstruct as well as of the most likely hypothetical karyotype of an ancestor of the whole group. An ancestral karyotype of $2n = 48$ was hypothesized as (16m-sm + 32 st-a) and was estimated as a basal stage for the clade by the most parsimonious reconstruction based on our material. The ancestor also had most likely only one pair of CMA₃ sites (Fig. 2).

Discussion

Cytogenetic characteristics

Two of the five species presented within this study have been previously studied in Thompson (1979), Marescalchi (2004) and reviewed in Feldberg (2003). The karyo-

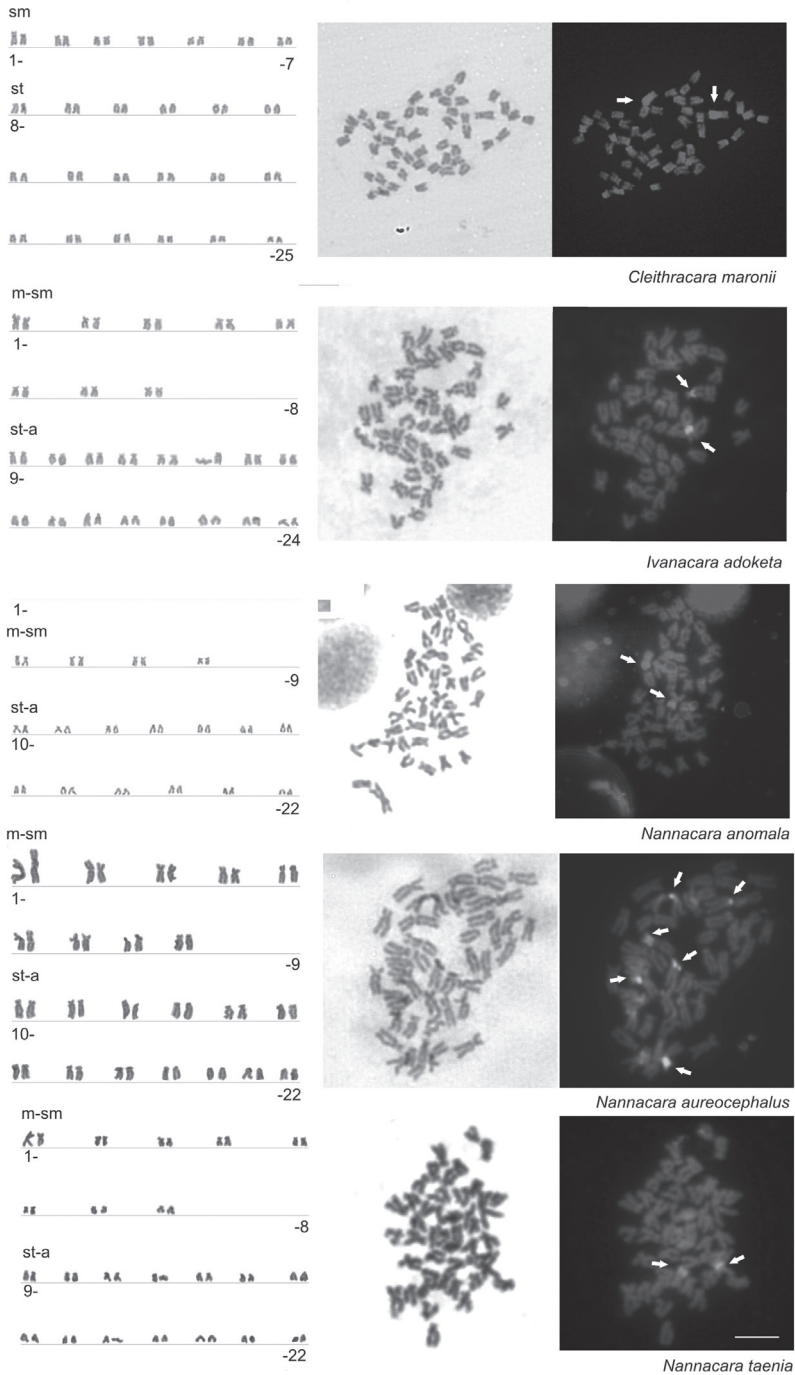


Figure 1. Karyotypes arranged from Giemsa stained chromosomes (left) of five species of cichlids: *C. maronii*, *I. adoketa*, *N. anomala*, *N. aureocephalus*, *N. taenia*. Selected metaphases stained with Giemsa staining (center) and sequentially by CDD banding (right). White arrows indicate chromosomes with positive Chromomycin A₃ signals. Bar=10µm.

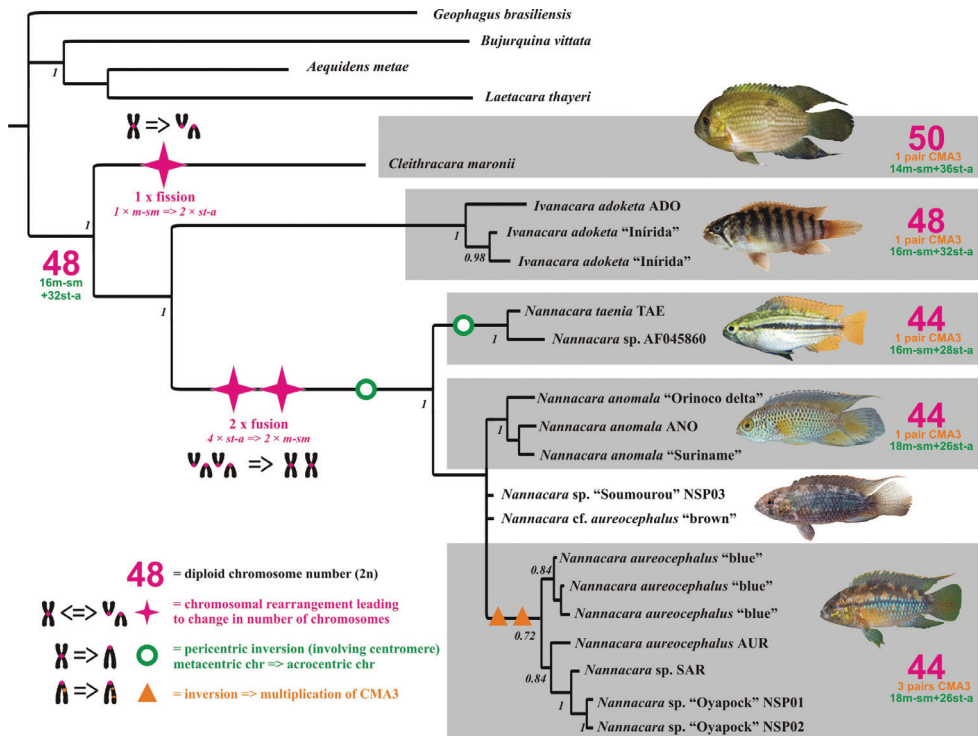


Figure 2. Phylogenetic relationships of cichlid fishes of genera *Nannacara*, *Ivanacara* and *Cleithracara*. Phylogenetic tree reconstructed based on the mitochondrial (cytochrome b, 16S rRNA) and nuclear (S7, RAG1) genes. Karyotype characteristics, such as diploid chromosomal number (2n), karyotype formula and CMA₃ phenotype were mapped on the tree and interpreted under the most parsimonious criterion. Ancestral karyotype of the group evolved from the ancestral cichlid karyotype 48st-a (Mank and Avise 2006) by increasing number of sub-metacentric chromosomes. One fission (in *Cleithracara* clade) and two fusion events (in the *Nannacara* clade) were detected, followed by at least one pericentric inversion in the latter case causing the decrease of the number of sub-metacentric chromosomes. Second pericentric inversion occurred in *N. taenia*, and another inversion leading to the multiplication of the CMA₃ regions occurred in *N. aureocephalus*.

type of *Nannacara anomala* corresponds in both the chromosomal number (2n=44) and the karyotype (18m-sm+26st-a) to the results of Thompson (1979). The karyotype of *C. maronii* corresponds with various previous studies in chromosomal number (2n = 50; Marescalchi 2004, see Feldberg et al. 2003), but slightly differs in the karyotype description: while in our study we recognized seven pairs of sub-metacentric chromosomes (14m-sm+36st-a), Marescalchi (2004) found only six pairs of those. However, inspecting the study of Marescalchi (2004), we found one additional pair of sub-metacentric chromosomes in their original karyotype data as well, so it is fully comparable with our results.

In the clade of Neotropical cichlids, three trends in karyotype differentiation can be distinguished (Feldberg et al. 2003). First trend - also called Karyotype “A” by

Thompson (1979) - is characterized by maintaining the ancestral karyotype of $2n=48$ with mostly subtelocentric-acrocentric elements (karyotype of 48st-a, although not exclusively) and evolved mostly by the pericentric inversions (during which the centromere is shifted from the central position of chromosome). Second evolutionary trend is similar to the previous one and additionally suppose the chromosomal breakage/fission events (Feldberg et al. 2003), leading to the increasing diploid chromosome number usually to the $2n=50$ or 52 , extremely up to $2n=60$). This karyotype is dominated by unarmed chromosomes. The third evolutionary trend - also called Karyotype "B" in Thompson (1979) - is represented by the opposite evolutionary scenario - mostly centric fusions played role in evolution from the ancestral karyotype, which lead to reduction of diploid chromosome number accompanied by increasing number of metacentric and submetacentric chromosomes (Thompson 1979, Poletto et al. 2010). This trend of chromosome number reduction seems to be parallel to some other fish groups like it was uncovered in killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae) Völker et al. (2008).

All of the species within the studied evolutionary lineage have a higher proportion of sub-metacentric chromosomes in their karyotypes compared with the rest of cichlids (Poletto et al. 2010). Especially considering the fact that the ancestral cichlid karyotype has been postulated as $2n=48$ and 48st-a, i.e. no sub-metacentric chromosomes are present (Poletto et al., 2010), the whole *Nannacara* – *Ivanacara* – *Cleithracara* clade seems to have evolutionary derived karyotype within cichlids. Based on Thompson's (1979) classification, the whole lineage possess the karyotype type "B" characterized by higher proportion of the sub-metacentric chromosomes, although not all the species have the lower number of chromosomes then the ancestral stage, which is usually characteristic for the karyotype "B" as well (Thompson 1979). Interestingly, the chromosome rearrangements and formation of karyotype "B" occurred several times independently in cichlid evolution, as from 41 examined Neotropical cichlids, the karyotype "B" has been found in three unrelated lineages: in the species *Bujurquina vittata* (Heckel, 1840) (tribe Cichlasomatini), in the genus *Apistogramma* Regan, 1913 (tribe Geophagini) and in the genus *Symphysodon* Heckel, 1840 (tribe Heroini; sister tribe of Cichlasomatini; Thompson 1979). Strikingly, the most similar karyotype formula possessed by all the species of the genera *Apistogramma* (22-24m-sm+16-22st-a) and *Dicrosus* Steindachner, 1875 (12m-sm+34st-a), which also represent another two unrelated lineage of the dwarf cichlids (Thompson 1979, Feldberg 2003), and then a few other species like *Cichlasoma paranaense* Kullander, 1983 (14-20m-sm+28-34st-a), *Mesonauta festivus/insignis* (Heckel, 1840) (12m-sm+36st-a), *Crenicichla niederleini* (Holmberg, 1891) (14m-sm+34st-a) and *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831) and *Astronotus crassipinnis* (Heckel, 1840) (12-18m-sm+30-36st-a, Feldberg et al. 2003). Note, that although the karyotype composed of mostly subtelocentric-acrocentric chromosomes is considered as ancestral for the cichlids, it is not generally ancestral trait for other fish groups. Therefore, the emergence of karyotype "B" (with more sub-metacentric chromosomes) probably represents secondary change back to the "common teleost karyotype" (Thompson 1979, Arai 2011).

CMA₃ patterns

The CMA₃ signals represent usually the GC-rich DNA segments of heterochromatic regions, often correlated with the location of active or inactive NORs, usually represented by the rDNA regions in genome (Schmid & Guttenbach 1988, Ráb et al. 1999, Poletto et al. 2010, but see Fontana et al. 2001, Gromicho et al. 2005 or Saitoh & Laemmlí 1994). The number of CMA₃ signals found within this study corresponds to what has been previously observed in cichlids – i.e. the most common number of NORs in Neotropical cichlids is one pair, but in some species were found up to three pairs (Feldberg et al. 2003, Poletto et al. 2010). In the *Nannacara – Ivanacara – Cleithracara* clade, all species except for *N. aureocephalus* possess only one pair of CMA₃ signals in their karyotype. *N. aureocephalus* has three pairs of CMA₃ signals, which is usually interpreted as the result of inversion followed by the multiplication of the rDNA regions (Poletto et al. 2010). Further, one of the observed CMA₃ regions in this species is located in the centromeric region.

After Feldberg et al. (2003), one pair of NORs on the larger pair of chromosomes represents the most common NOR phenotype for the whole family Cichlidae. Further, Hsu et al. (1975) suggested that species with the single pair of NORs should be considered as more primitive than the karyotype with several NOR pairs hinting that the ancestral karyotypes possess less NORs than the evolutionary derived. Multiplication of NORs is usually caused by the chromosomal rearrangements, such as translocation or inversion but recently an increasing number of studies has shown the cases of rDNA multiplication caused by the activity of transposable elements (Cioffi et al. 2010, Simonová et al. 2013, Schneider et al. 2013). As summarized in Feldberg et al. (2003), five out of 15 analysed species of the subfamily Cichlasomatinae (tribes Heroini + Cichlasomatini) possess multiple NOR pairs, i.e. *Caquetaia spectabilis* (Steindachner, 1875) (Feldberg et al. 2003), *Cichlasoma paranaense* Kullander, 1983 (Feldberg et al. 2003), *Mesonauata insignis* and *M. festivus* (Heckel, 1840) (Feldberg et al. 2003) and *Symphysodon aequifasciatus* Pellegrin, 1904 (Feldberg et al. 2003).

Phylogeny of *Nannacara – Ivanacara – Cleithracara* cichlids

The phylogenetic reconstruction of the *Nannacara – Ivanacara – Cleithracara* clade (also called NIC clade in Musilová et al. 2008, 2009) corresponds to the results observed in the previous studies (Musilová et al. 2008, 2009). This suggests the basal position of the monotypic genus *Cleithracara* followed by the *Ivanacara* (one species) sister to the rest of fishes from the genus *Nannacara* (three species). Within *Nannacara*, the *N. taenia* has basal position and *N. anomala* + *N. aureocephalus* represent the sister species. In this study, we did not include two species of the studied clade, i.e. *Nannacara quadrispinae* and *Ivanacara bimaculata*, which we failed to obtain either as live individuals for cytogenetics, or as samples for DNA analysis. Especially *I. bimaculata* would be crucial for confirmation of monophyly of the genus *Ivanacara*, since *I.*

bimaculata was previously found as closely related to the fishes of the genus *Nannacara* then to *I. adoketa* based on morphological data set (Musilová et al. 2009).

Within *N. aureocephalus*, more distinct forms are known; some of them were introduced into the aquarium trade under different names. So far no robust revision of *Nannacara* is available, and it is therefore difficult to make any taxonomic conclusion based on our data set. However, at least two different forms of *N. aureocephalus* are spread among the aquarium hobbyist within Central Europe (Germany, Poland, Czech Republic, Slovakia) – one of them called “blue” and the other one called “brown” both included in our analyses. These forms are not of artificial origin, as usually F1 progeny of the wild caught individuals has been studied. Intuitively, the blue morph shows more light-blue coloration with iridescent elements both on the face and body, while the “brown” form doesn’t have the iridescent coloration and possess darker brown to dark-green coloration pattern. We have shown that those two morphs are genetically distinct; however, more detailed future work is necessary on this species/genus.

Karyotype differentiation

Cichlid karyotypes show some general common features - for example many species from African and Neotropical cichlids possess one pair of significantly larger chromosomes. Although the homology of the largest chromosome within the African lineage has been proved (Ferreira et al. 2010) as well as high synteny conservation of African cichlid genomes (Mazzuchelli et al. 2012), it is, however, not yet clear to what extent is the homology present across the whole family Cichlidae (Valente et al. 2009).

Although all the studied species from the *Nannacara* – *Ivanacara* – *Cleithracara* clade are characterized by the karyotype “B” (Thompson 1979), they underwent different evolutionary paths in past. The phylogenetic reconstruction of the karyotype evolution suggests the following scenario: from the ancestral karyotype, first the karyotype of the *Cleithracara maronii* ($2n = 50$; 14mt-sm + 36 st-a) evolved by fission event of one sub-metacentric chromosome pair, falling apart into two additional pairs of subtelocentric-acrocentric chromosomes. While the karyotype of *Ivanacara adoketa* remained unchanged compared with the ancestral one, in the lineage of *Nannacara*, two fusions occurred decreasing chromosomal number to $2n = 44$. These fusions were followed by pericentric inversions, which again decreased the number of sub-metacentric chromosomes. At least one pericentric inversion happened in the base of all *Nannacaras*, and additional pericentric inversion happened in the *N. taenia* lineage. Finally, two inversion impacting CMA₃ regions happened in *N. aureocephalus* leading to the multiplication of these signals.

The proposed mechanisms of chromosomal rearrangements are described in cichlids as well as in other fish species. Usually the sub-metacentric chromosome arises during the (centric) fusion, when two acrocentric-telocentric chromosomes fuse (Thompson 1979). However, the number of sub-metacentric chromosomes in karyotype is not evolutionarily stable. The sub-metacentric chromosome changes back to the

acrocentric-subtelocentric chromosome by inversion, which involves the centromere, i.e. the pericentric inversion (Feldberg et al. 2003, Poletto et al. 2010). Further, those pericentric inversions are considered as the main mechanism generally contributing to changes in chromosome arms size in various percomorph lineages (Galetti et al. 2000, Affonso 2005). In general, the taxon sampling within such comparative studies is however still too low to be able to make a strong conclusion about the general trends in cichlid karyotype evolution (Feldberg et al. 2003, Poletto et al. 2010).

To conclude, we aimed to provide a comparative study on a small scale of three genera combining molecular and cytogenetic approaches. Assuming that cytogenetic data provide additional information, which is undetectable by molecular genetics (Ráb et al. 2007), we expected a broad insight into the genome evolution of the studied group. In the dwarf cichlid genus *Nannacara* and its relatives (*Ivanacara* and *Cleithracara*), we reconstructed the phylogeny and we found substantial amount of karyotype characteristics, which we were able to interpret in the evolutionary context.

Acknowledgement

We would like to thank Jan Nekola, Wolfgang Staeck, Tomáš Kučera, Ingomar Kranz, Leonel Calderón for providing of the samples or live specimens. We would like to thank Martina Pokorná and Marie Rábová for their constructive comments on the preliminary results. We thank Carlos Ziok, Jaroslav Hofmann and Miloslav Petřtýl for providing us their photos of the fish. The project was supported by S grant of MŠMT ČR and CIGA 20132016.

References

- Affonso PR, Galetti, PM Jr. (2005) Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). *Genetica* 123(3): 227–233. doi: 10.1007/s10709-004-3214-x
- Arai R (2011) *Fish Karyotypes*. Springer, Japan, 340 pp. doi: 10.1007/978-4-431-53877-6
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LA (2010) Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology* 10: 271. doi: 10.1186/1471-2148-10-271
- Eschmeyer WN, Fricke R (Eds) *Catalog of Fishes* electronic version (15.01.2012) available from <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>
- Feldberg E, Bertollo, LAC (1985) Karyotypes of 10 species of Neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). *Caryologia* 38(3–4): 257–268. doi: 10.1080/00087114.1985.10797749
- Feldberg E, Porto, JIR, Bertollo, LAC (2003) Chromosomal changes and adaption of cichlid fishes during evolution. In: Val AL, Kapoor BG (Eds) *Fish Adaption*. Enfield-NH, USA, Science Publishers, 285–308.

- Ferreira I, Poletto B, Kocher TD, Mota-Velasco JC, Penman DJ, Martins C (2010) Chromosome evolution in African cichlid fish: contributions from the physical mapping of repeated DNAs. *Cytogenetic and genome research* 129(4): 314–22. doi: 10.1159/000315895
- Fontana F, Tagliavini J, Congiu L (2001) Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advances and perspectives. *Genetica* 111: 359–373. doi: 10.1023/A:1013711919443
- Galetti PM Jr., Aguilar C T, Molina W F (2000) An overview on marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia* 420: 55–62. doi: 10.1007/978-94-017-2184-4_6
- Gromicho M, Ozouf-Costaz C, Collares-Pereira MJ (2005) Lack of correspondence between CMA3-, Ag-positive signals and 28S rDNA loci in two Iberian minnows (Teleostei, Cyprinidae) evidenced by sequential banding. *Cytogenetic Genome Research* 109: 507–511. doi: 10.1159/000084211
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hsu TC, Spirito SE, Pardue LM (1975) Distribution of 18/28S ribosomal genes in Mammalian genomes. *Chromosoma* 53: 25–36. doi: 10.1007/BF00329388
- Kalous L, Knytl M, Křajčková L (2010) Usage of non-destructive method of chromosome preparation applied on silver Prussian carp (*Carassius gibelio*). *Proceedings of the Workshop on Animal Biodiversity*. Jevany, July 7, 2010, 57–60.
- Kocher TD (2004) Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nature Reviews Genetics* 5: 288–98. doi: 10.1038/nrg1316.
- Kornfield IL (1984) Descriptive Genetics of Cichlid fishes. In: Turner BJ (Ed.) *Evolutionary Genetics of Fishes*. Plenum Press, New York. p. 591–616. doi: 10.1007/978-1-4684-4652-4_12
- Kullander SO (1998) A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). In: Malabara LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS (Eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Part 5. Porto Alegre, Brasil. EDUPU-CRS. 461–498.
- Kullander SO, Nijssen H (1989) *The Cichlids of Surinam*. E. J. Brill, Leiden, 251 pp.
- Kullander SO, Prada-Pedreiros S (1993) *Nannacara adoketa*, a new species of cichlid fish from the Rio Negro in Brazil *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 4(4): 357–366.
- Levan A, Fredga K, Sanger AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201–220. doi: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x
- Mank, JE, Avise, JC (2006) Phylogenetic conservation of chromosome numbers in Actinopterygian fishes. *Genetica* 127: 321–327. doi: 10.1007/s10709-005-524
- Marescalchi O (2004) Karyotype and mitochondrial 16S gene characterizations in seven South American Cichlasomatini species (Perciformes, Cichlidae). *Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research*. 43: 22–28. doi: 10.1111/j.1439-0469.2004.00285.x
- Mayr B, Ráb P, Kalat M (1985) Localisation of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). *Genetica* 67: 51–56. doi: 10.1007/BF02424460
- Mazzuchelli J, Kocher TD, Yang F, Martins C (2012) Integrating cytogenetics and genomics in comparative evolutionary studies of cichlid fish. *BMC genomics* 13(1): 463. doi: 10.1186/1471-2164-13-463

- Musilová Z, Říčan O, Janko K, Novák J (2008) Molecular phylogeny and biogeography of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46(2): 659–72. doi: 10.1016/j.ympev.2007.10.011
- Musilová Z, Říčan O, Novák J (2009) Phylogeny of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae) based on morphological and molecular data, with the description of a new genus. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 47(3): 234–247. doi: 10.1111/j.1439-0469.2009.00528.x
- Nakatani Y, Takeda H, Kohara Y, Morishita S (2007) Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates. *Genome Research* 17(9): 1254–1265. doi: 10.1101/gr.6316407
- Ohno S, Muramoto J, Klein J, Atkin NB (1969) Diploid-tetraploid relationship in clupeoid and salmon fish. *Chromosomes Today* 2: 139–147.
- Poletto AB, Ferreira IA, Cabral de Mello DC, Nakajima RT, Mazzuchelli J, Ribeiro HB, Venere PC, Nirchio M, Kocher TD, Martins C (2010) Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. *BMC Genetics* 11: 50. doi: 10.1186/1471-2156-13-2
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Phylogenetics Evolution* 25: 1253–1256. doi: 10.1093/molbev/msn083
- Ráb P, Bohlen J, Rábová M, Flajšhans M, Kalous L (2007) Cytogenetics as a tool in fish conservation: the present situation in Europe. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (Eds). *Fish Cytogenetics*. Science Publishers, Enfield, USA.
- Ráb P, Rábová M, Reed KM, Phillips RB (1999) Chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the primitive semionotiform fish, longnose gar *Lepisosteus osseus*. *Chromosome Research* 7: 475–480. doi: 10.1023/A:1009202030456
- Römer U, Hahn I (2007) Ivanacara gen. n. (Teleostei: Perciformes, Cichlasomatini)—a new genus of cichlids from the Neotropis. In: Römer, U. (Ed), *Cichlid Atlas, volume 2, Natural History of South American Dwarf Cichlids, Part 2*. Mergus Verlag GmbH, Melle, Germany, 1190–1197.
- Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres, DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61(3): 539–42. doi: 10.1093/sysbio/sys029
- Saitoh Y, Laemmli UK (1994) Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* 76: 609–622. doi: 10.1016/0092-8674(94)90502-9
- Schmid M, Guttenbach M (1988) Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma* 97: 327–344. doi: 10.1007/BF00327367
- Schneider CH, Gross MC, Terencio ML, do Carmo EJ, Martins C, Feldberg E (2013) Evolutionary dynamics of retrotransposable elements Rex1, Rex3 and Rex6 in neotropical cichlid genomes. *BMC Evolutionary Biology* 13: 152. doi: 10.1186/1471-2148-13-152
- Sola L, Rossi AR, Laselli V, Rasch, EM, Monaco PJ (1992) Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3, and silver staining. *Cytogenetics and Cell Genetics* 60: 229–235. doi: 10.1159/000133346

- Staeck W, Schindler I (2004) *Nannacara quadrispinae* sp. n. - a new dwarf cichlid fish (Teleostei: Perciformes: Cichlidae) from the drainage of the Orinoco Delta in Venezuela. *Zoolgische Abhandlungen aus dem Staatlichen Museum für Tierkunde in Dresden* 54: 155–161.
- Symonová R, Majtánová Z, Sember A, Staaks GBO, Bohlen J, Freyhof J, Rábová M, Ráb P (2013) Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evolutionary Biology* 3: 42. doi: 10.1186/1471-2148-13-42
- Thompson KW (1979) Cytotaxonomy of 41 species of Neotropical Cichlidae. *Copeia* 4: 679–691. doi: 10.2307/1443877
- Valente GT, Schneider CH, Gross MC, Feldberg E, Martins C (2009) Comparative cytogenetics of cichlid fishes through genomic in-situ hybridization (GISH) with emphasis on *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Research* 17(6): 791–9. doi: 10.1007/s10577-009-9067-5
- Völker M, Sonnenberg R, Ráb P, Kullmann H (2006) Karyotype differentiation in Chromaphyosemion killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). II: Cytogenetic and mitochondrial DNA analyses demonstrate karyotype differentiation and its evolutionary direction in *C. riggenbachi*. *Cytogenetic Genome Research* 115: 70–83. doi: 10.1159/000094803
- Völker M, Ráb P, Kullmann H (2008) Karyotype differentiation in Chromaphyosemion killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae): patterns, mechanisms, and evolutionary implications. *Biological Journal of the Linnean Society*, 94(1): 143–153. doi: 10.1111/j.1095-8312.2008.00967.x

CYTOGENETICKÁ ANALÝZA A EVOLUCE KARYOTYPU U JIHOAMERICKÝCH CICHLID TRIBU CICHLASOMATINI

CYTOGENETIC ANALYSIS AND KARYOTYPE EVOLUTION IN SOUTH AMERICAN CICHLIDS OF THE TRIBE CICHLASOMATINI

L. KRAJÁKOVÁ¹, Z. MUSILOVÁ^{1,2}, L. KALOUS¹

¹Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů, Katedra zoologie a rybářství, 165 21 Praha 6 – Suchbátka, krajakova@af.czu.cz

²Ústav živočišné fyziologie a genetiky AVČR v.v.i., Laboratoř genetiky ryb, 277 21 Liběchov

ABSTRACT

We present our cytogenetic data of South American cichlids (tribus Cichlasomatini) that were consequently consulted with phylogenetic analysis of other authors. Nuclei suspensions for this study were obtained by different methods of chromosome preparation, then dropped on slides and stained by the solution of Giemsa - Romanowski. Obtained metaphases were investigated by microscope and recorded by digital camera connected with image analysing software. Karyotypes were constructed only in samples with good metaphases and cytogenetic data (chromosome number, karyotype) and they were consequently applied to known phylogenetic tree. We concluded that common ancestor had $2n = 48$ chromosomes. Change of chromosome number occurred at least in seven evolution events; six times the number of chromosome increased and once decreased. The increase of chromosome number was observed in group of Nannacara and Cleithracara (Cleithracara maronii $2n = 50$). In the second clade of Bujurquina – Tahuantinsuyoa – Andinoacara – Laetacara – Acaronia we found a reduction of chromosome number (Bujurquina $2n = 44$; 40, Laetacara $2n = 44$; 38 and Tahuantinsuyoa $2n = 30$). From available data we are still not able to formulate final hypothesis of karyotype evolution within the tribus Cichlasomatini. Anyway, present study is the first cytogenetic overview of the tribe.

Klíčová slova: Cytogenetika, jihoamerické cichlidy, Cichlosomatini, evoluce karyotypu

Keywords: Cytogenetics, South American cichlids, Cichlosomatini, evolution of caryotype

ÚVOD

Cytogenetická analýza karyotypu je dostupnou a relativně levnou metodou, jak získat informace o organizaci struktur dědičné informace, tedy o počtu a stavbě chromozomů v jádře buňky. Jedná se tak o signál, který molekulární genetika a sekvenace DNA nemůže odhalit, a proto může být vhodným doplňkem při studiu evoluce dané skupiny (Pisano a kol., 2007). Tyto informace je možné porovnat mezi jednotlivými druhy, přesto o jihoamerických cichlidách (tribus Cichlasomatini) není v literatuře mnoho cytogenetických informací. Konkrétně existují dvě cytogenetické studie: od autorů Thompson (1979) a Marescalchi (2005). Z těchto studií vyplývá, že variabilita chromozomového uspořádání je větší, než se předpokládalo. Studované rody byly původně považovány za uniformní v počtu chromozomů.

Ukazuje se, že zástupci rodů *Aequidens*, *Cichlasoma* a *Krobia* mají 48 chromozomů ($2n = 48$), což je doposud považováno za ancestrální stav. Naopak rody *Bujurquina* ($2n = 44; 40$), *Laetacara* ($2n = 44; 38$), *Nannacara* ($2n = 44$) a *Cleithracara* ($2n = 50$) se v počtech chromozomů liší.

Cílem této studie je popsat cytogenetické charakteristiky druhů jihoamerických cichlid, které dosud nebyly z tohoto pohledu zkoumány, a následnou fylogenetickou interpretací zároveň rozšířit znalosti o možném průběhu evoluce karyotypu v rámci tribu Cichlasomatini.

MATERIÁL A METODIKA

Do studie bylo zahrnuto 8 druhů z 6 různých zemí (1. *Andinoacara biseriatus* – Kolumbie, 2. *Andinoacara* cf. *pulcher* „Rio Chirgua“ – Venezuela, 3. *Andinoacara rivulatus* – Ekvádor, 4. *Aequidens tubicen* – Peru, 5. *Cichlasoma amazonarum* – Brazílie, 6. *Cichlasoma boliviense* – Bolívie, 7. *Krobia* sp. „Xingu“ – Brazílie, 8. *Tahuantinsuyo macantzata* – Peru. Většina ryb použitých v této studii pochází z původního místa jejich výskytu a byla zakoupena prostřednictvím specializovaných firem v České republice nebo v Německu. Všechny ryby byly chovány v akváriích na ČZU a PřF UK v Praze. Od každého druhu byli použiti dva jedinci ke stanovení počtu chromozomů, pro sestavení karyotypu pak byla vybrána jedna nejlepší metafáze.

K získání chromozomových preparátů byly použity tři metody, a to: 1) preparace chromozomů z regenerátu ploutve dle M. Völker, 2) preparace chromozomů z embryí dle M. Völker a 3) kultivace fibroblastů *in vitro*.

Metody preparace chromozomů z regenerátu ploutve dle M. Völker a kultivace fibroblastů *in vitro* byly použity u všech vyjmenovaných druhů, metoda preparace chromozomů z embryí dle M. Völker byla použita u druhů *Cichlasoma amazonarum* a *Cichlasoma boliviense*, které se přirozeně vytíraly v akváriích, k jednotlivým preparacím bylo použito postupně pět snůšek od každého druhu.

Metoda preparace chromozomů z regenerátu ploutve dle M. Völker je založena na principu regenerace buněk v místě poškození po odstranění části tkáně, v tomto případě se jednalo o ocasní ploutev. Rybě byla odstrážena malá část ocasní ploutve (pásek o šířce cca 1 mm). Ocasní ploutev se nechala regenerovat 4–7 dní podle regenerační aktivity. Po uplynulém časovém úseku byl regenerát odstrážěn a vložen na 2–3 hodiny do Petriho misky s kultivačním roztokem skládajícího se z 14,3 ml zásobního roztoku (7,48 g NaCl; 0,18 g KCl; 0,2 g CaCl₂; 0,016 g NaHCO₃ a 1000 ml destilované vody), 85,7 ml destilované vody a 0,025 g kolchicinu (Serva). Během této doby probíhalo dělení buněk, ale pouze do stadia metafáze, ve které kolchicin zastavuje buněčné dělení. Po té byly přidány 3–4 kapky fixačního roztoku (100% CH₃OH a 100% CH₃COOH, 3 : 1), který se nechal působit 30 minut v chladničce při 4 °C. V této fázi došlo k usmrcení všech buněk. Poté byl z Petriho misky veškerý roztok odstraněn a byl přidán pouze fixační roztok, který působil dalších 30 minut. Odstranění starého a přidání čerstvého fixačního roztoku bylo opakováno dvakrát. Následně byl regenerát přenesen na sítku a zakápnut 45–50 µl 20% kyseliny octové. Ta způsobila rozbití jaderných membrán a rozvolnění chromozomů, což je důležité pro následné pozorování na podložním sklíčku. Poté byla tkáň regenerátu jemně rozrušena o sítku pinzetou a z druhé strany sítka byla automatickou pipetou Nichirio 200 odsáta suspenze buněk do mikrozkrumavky typu Eppendorf. Suspenze byla následně nanesena na podložní sklo (Menzel GmbH) zahřátá na teplotu 45 °C na topné plotýnce. Suspenze byla na sklo nakápnuta a po 20 sekundách nasáta zpět. Tímto způsobem byly na jednom podložním skle vytvořeny tři kapky. Díky teplotě skel se vytvořil v místě kapky jemný film s buňkami. Skla se nechala vychladnout při pokojové teplotě v laboratoři.

Metoda preparace chromozomů z embryí, byla též optimalizována Völkerem (2006).

Do připraveného roztoku kolchicinu (Serva) (0,25 g a 50 ml vody z akvária) v Petriho miskách bylo umístěno po 3–4 embryích, které byly získány z přirozeného výtěru ryb v akváriu. Embrya byla takto kultivována 4 hodiny při pokojové teplotě. Během této doby probíhalo dělení buněk, ale pouze do stadia metafáze, ve které kolchicin zastavuje buněčné dělení. Do zkumavek byl připraven roztok citronanu sodného (0,8%), ve kterém byla embrya ponechána hypotonickému působení po dobu 40 minut při laboratorní teplotě. Poté byla tekutina ze zkumavek slita a bylo přidáno 5 ml fixativa (100% CH_3OH a 100% CH_3COOH , 3 : 1). Embrya byla provzdušněna pomocí Pasteurovy pipety a umístěna do chladničky (4 °C) na 20 minut. V této fázi došlo k usmrcení všech buněk. Tento krok byl opakován ještě dvakrát, s tím že v posledním kroku byly zkumavky ponechány v chladničce 24 hodin. Po 24 hodinách byla embrya osušena a umístěna do mikrozukumavky typu Eppendorf s 40% kyselinou octovou, která způsobila rozbití jaderných membrán a rozvolnění chromozomů pro následné pozorování na sklíčku. Zde byla embrya rozmělněna pomocí plastové tyčinky. Poté byla suspenze kapána na předehřátá (45 °C) podložní skla (Menzel GmbH) stejným způsobem jako v předchozí metodě preparace chromozomů z regenerátů.

Kultura fibroblastů byla založena z malého vzorku tkáně (cca 2 x 2 mm), který byl rybě odebrán z hřbetní ploutve. Případně byl použit odstřížek ocasní ploutve, který byl odebrán při využití metody preparace z regenerátů ploutví. Odebraný kousek tkáně z hřbetní nebo ocasní ploutve byl umístěn do roztoku PBS 0,5 ml (10 g NaCl, 0,25 g KCl, 0,25 g KH_2PO_4 , 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1000 ml H_2O) a 0,5 ml antibiotické–antimykotické směsi (Sigma-Aldrich) v mikrozukumavce typu Eppendorf na 60 minut. Poté byla tkáň umístěna do roztoku 1,5 ml PBS + 0,5 ml antibiotické–antimykotické směsi v mikrozukumavce typu Eppendorf na 60 minut. Ve „flow-boxu“ byla tkáň postupně oplachována ve třech Petriho miskách s roztokem kompletního media složeného z 80 ml Liebovitz media L15 (Sigma-Aldrich) a 20 ml bovinního sera (Baria). Dále byl přidán 1 ml antibiotické–antimykotické směsi (Sigma-Aldrich) a 1 ml glutaminu (Sigma-Aldrich). Takto připravené medium bylo přefiltrováno speciálními filtry (Millex Millipore) a uchovávalo ve sterilní nádobě v chladničce při 4 °C. V poslední Petriho misce byla tkáň ponechána hodinu. Následně byla tkáň rozstříhána na několik menších kousků. Takto získané kousky tkáně byly pomocí očkovací kličky přeneseny na dno kultivační lahvičky (Nunc). Po 20 minutách, kdy došlo k přilnutí tkáně ke dnu kultivační lahvičky, byly přidány 3 ml kompletního media. Fibroblasty byly kultivovány při 28,5 °C v termostatu. Každý třetí den probíhala výměna kompletního media. Celková doba kultivace byla přibližně 14 dní, podle vizuální kontroly růstu fibroblastů pod inverzním mikroskopem. Do kultivačních lahviček byly přidány 3 kapky 0,1% kolchicinu (Serva), který se nechal působit po dobu 4 hodin v termostatu při 28,5 °C. Poté byly dvakrát přidány a odsáty 2 ml PBS. K takto ošetřeným fibroblastům byl přidán 1 ml PBS a 0,7 ml 0,1% trypsinu (Sigma-Aldrich). Celková doba působení trypsinu byla 2 minuty, pak byl jeho účinek zastaven přidáním kultivačního media. Očkovací kličkou byly ze dna kultivační nádoby seškrabány narostlé fibroblasty, které byly spolu s kultivačním roztokem převedeny do zkumavky. Suspenze byla centrifugována 10 minut při 1200 otáčkách a laboratorní teplotě. Poté byl supernatant odsát a k buňkám usazeným na dně zkumavky bylo přidáno 5 ml KCl (5,6 g/l, 37 °C). Doba hypotonického působení KCl byla 8 minut. Po centrifugaci (10 min/1200 otáček) byl supernatant odsán a přistoupilo se k fixaci (100% CH_3OH , 100% CH_3COOH , 3 : 1) po dobu 20 minut. Proces fixace byl třikrát opakován a poté byla suspenze nakapána na vyčištěné podložní sklo (Menzel GmbH). Barvení bylo prováděno po dobu 10 minut ve 3% roztoku Giemsa Romanovski (Dr. Kulich Pharma) v Sorensově pufru (4,5 g KH_2PO_4 , 4,7 g Na_2PO_4 , 1000 ml destilované vody; pH = 6,8). Poté byly preparáty důkladně opláchnuty destilovanou vodou.

Všechny preparáty byly prohlíženy na mikroskopu Olympus AX-70 při zvětšení 1000x za použití imerzního oleje. Vybrané metafáze byly vyfoceny CDD kamerou (Olympus; DP30BW). Obraz byl zpracován v programu Microimage. Vlastní počítání chromozomů v metafázích probíhalo ručně nebo pomocí programu Microimage. Sestavování karyotypu bylo provedeno ve specializovaném programu Ikaros (Metasystems).

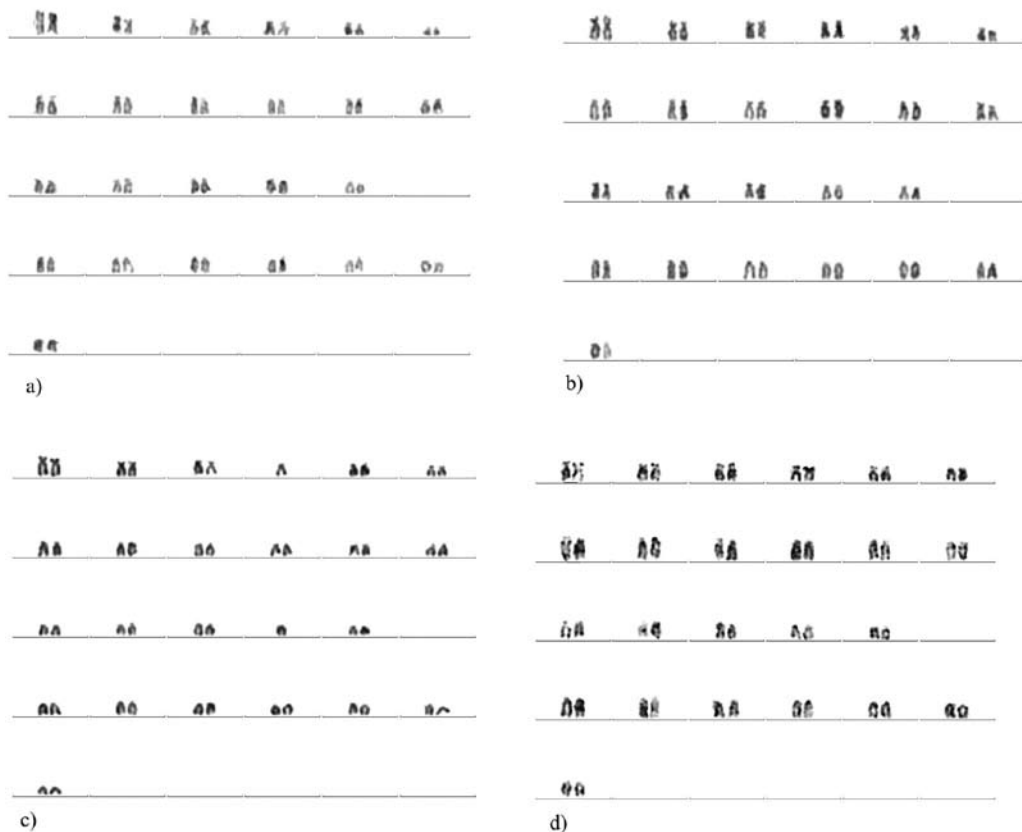
Chromozomy byly klasifikovány dle Levana a kol. (1964) na základě délky chromozomových ramen a polohy centromery do těchto kategorií: metacentrické (m), submetacentrické (sm), subtelocentrické (st) a akrocentrické (a). Získané výsledky cytogenetické analýzy byly posouzeny s ohledem na známé příbuzenské vztahy zkoumaných druhů. Zjištěné počty chromozomů byly zaneseny na fylogenetický strom. Použit byl publikovaný fylogenetický strom (Musilová a kol., 2009), který byl sestaven na základě dat získaných molekulárně genetickými metodami, a to sekvenací jak jaderných (RAG 1 a S7), tak mitochondriálních (Cytb, 16S) genů. Na strom byla zanesena i data získaná z publikací Marescalchi (2005), Feldberg a kol. (2003) a Thompson (1979) (obr. č. 2). Dále byly na fylogenetickém stromu vyznačeny evoluční události ve změně počtu chromozomů (zvýšení/redukce počtu) a pravděpodobný počet chromozomů společných předků s použitím kriterií maximální parsimonie (tj. aby celkový počet evolučních změn schopných vysvětlit rozložení znaků u reálných studovaných druhů byl co nejmenší; Flegl, 2005). Pro zanesení byla využita optimalizace ACCTRAN, která předpokládá, že evoluční změny se udály co nejpozději, tj. co nejbližší koncovým taxonům ve fylogenetickém stromu, a tedy co nejdále od jeho kořenů (Agnarsson a Miller, 2008). Poslední vstupní informace je předpoklad, že redukce počtu chromozomů je častější jev než zvýšení počtu (Imai a kol., 1986). Ke zvýšení počtu chromozomů dochází rozpadem, naopak snížení počtu se může odehrávat fúzí či hromadnou fúzí.

VÝSLEDKY

U všech osmi zkoumaných druhů se podařilo stanovit počty chromozomů. Druhy *Andinoacara biseriatus*, *Andinoacara* cf. *pulcher* „Rio Chirgua“, *Andinoacara rivulatus*, *Aequidens tubicen*, *Cichlasoma amazonarum*, *Cichlasoma boliviense*, *Krobia* sp. „Xingu“ měly $2n = 48$ chromozomů, pouze druh *Tahuantinsuyoia macantzatza* měl $2n = 30$ chromozomů. Karyotypy byly sestaveny u čtyř druhů (obr. č. 1). Jeden karyotyp není kompletní (obr. č. 1c), ale dobře typově zapadá mezi ostatní kompletní karyotypy, proto je uveden.

Obr. 1. Karyotypy jihoamerických cichlid tribu Cichlasomatini a) *Andinoacara biseriatus*, b) *Aequidens tubicen*, c) *Cichlasoma amazonarum*, d) *Krobia* sp. "Xingu", 1–6 sm, 7–24 st – a.

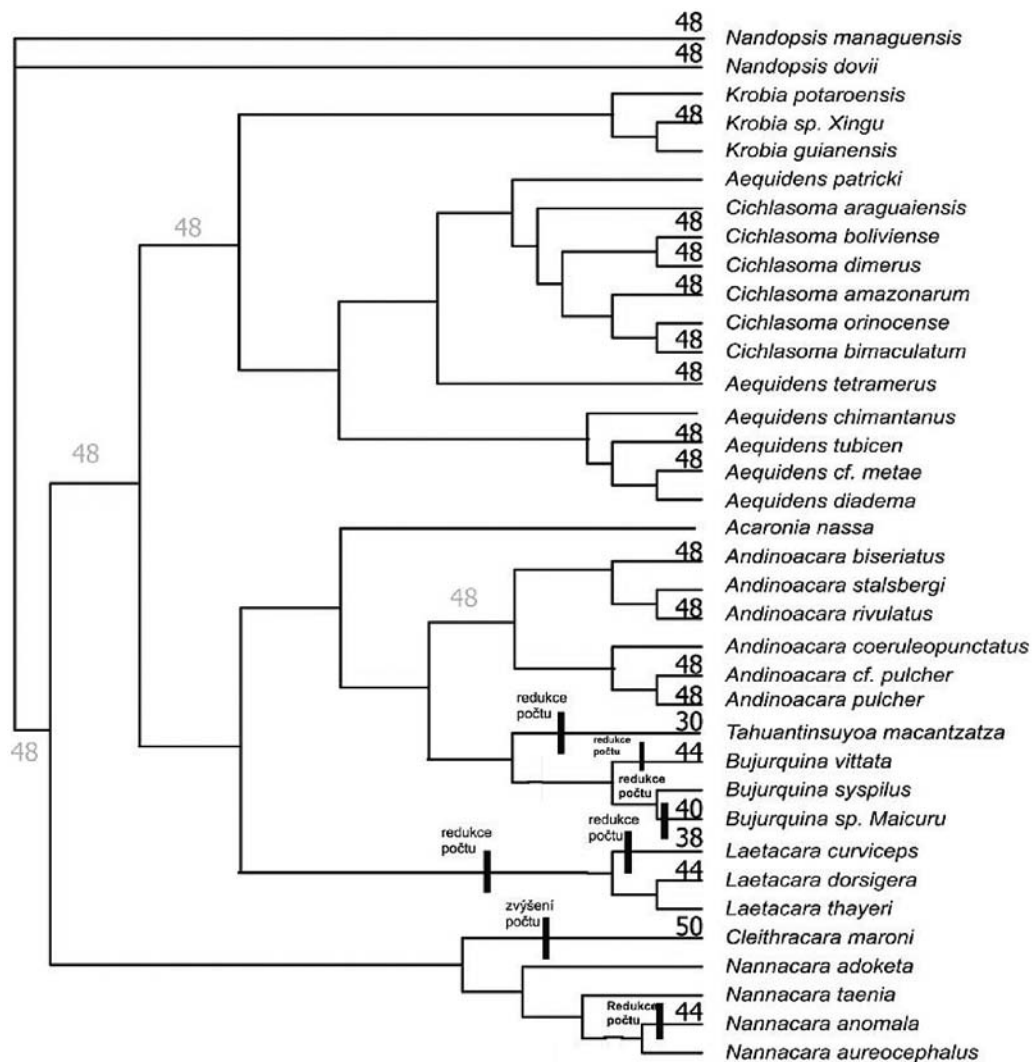
Fig. 1. Karyotypes of South American cichlids of tribe Cichlasomatini a) *Andinoacara biseriatus*, b) *Aequidens tubicen*, c) *Cichlasoma amazonarum*, d) *Krobia* sp. "Xingu", 1–6 sm, 7–24 st – a.



Společnou charakteristikou získaných karyotypů je šest párů submetacentrických chromozomů, z toho ve dvou případech (*Aequidens tubicen*, *Andinoacara biseriatus*) je první pár submetacentrických chromozomů výrazně větší než zbývající páry. Na základě získaných výsledků je pravděpodobné, že předek tribu Cichlasomatini měl $2n = 48$ chromozomů. Ke změně počtu chromozomů došlo minimálně při sedmi evolučních událostech, z toho jednou ke zvýšení a šestkrát ke snížení počtu chromozomů. Jako stabilní se v počtu chromozomů jeví klastr rodů *Aequidens* – *Cichlasoma* – *Krobia*. Dosud všichni zkoumaní jedinci z tohoto klastru mají $2n = 48$. U klastru rodů *Nannacara* – *Cleithracara* došlo ke zvýšení počtu chromozomů u *Cleithracara maroni* a k redukci počtu chromozomů u *Nannacara anomala*. U klastru rodů *Bujurquina* – *Tahuantinsuyoa* – *Andinoacara* – *Laetacara* – *Acaronia* existuje tendence k postupnému snižování počtu chromozomů, jelikož všechny druhy rodu *Andinoacara* mají $2n = 48$, druhy rodu *Bujurquina* mají $2n = 44$; 40, druhy rodu *Laetacara* mají $2n = 44$; 38 a *Tahuantinsuyoa* má dokonce $2n = 30$.

Obr. 2. Fylogenetický strom (Musilová a kol., 2009) s daty o počtu chromozomů získaných během této práce a dále pak v práci Marescalchi (2005), Feldberga a kol. (2003) a Thompsona (1979). Data pro srovnávací skupinu (rod *Nandopsis*, tribus *Heroinii*) pochází z práce Salase a Boza (1991). Dále jsou naznačeny hypotetické evoluční události, které mohly změnit počet chromozomů (redukce nebo zvýšení počtu chromozomů) s použitím metody maximální parsimonie za předpokladu vyšší pravděpodobnosti fúze než rozpadu chromozomů a aplikací optimalizace ACCTRAN (hypotetické změny proběhly co nejdále od kořene stromu). Počet chromozomů u předka byl stanoven s využitím faktu, že původní karyotyp cichlid je $2n = 48$ (Feldberg a kol., 2003). Šedá čísla znázorňují počet chromozomů u hypotetického předka.

Fig. 2. Phylogenetic tree (Musilová et al., 2009) with the number of chromosomes obtained in this study, and from the Marescalchi (2005), Feldberg et al. (2003) and Thompson (1979) studies. Data for group comparison comes from the study of Salas and Boza (1991). Hypothetical evolutionary events which could change chromosome numbers (increase or reduction) are marked. The method of maximal parsimony was used with a presumption of a higher probability of fusion versus a chromosome break up; the application ACCTRAN optimization was used (hypothetical changes with the greatest distance from the tree's root). The ancestor chromosome number was determined by the fact that the ancestral karyotype of cichlids is $2n = 48$ (Feldberg et al., 2003). Gray numbers indicate the chromosome numbers of a hypothetical ancestor.



DISKUSE

Důvodem získání malého počtu kvalitních metafází je vlastní metoda regenerátu, která byla optimalizována pro drobné druhy halančíků (Völker, 2006) a pro cichlidy se metodu nepodařilo plně optimalizovat. Rovněž metoda kultivace fibroblastů nepřinesla kvalitní výsledky. Na tématu je tedy třeba nadále pracovat i v budoucnu a popisované výsledky je nutno chápat jako předběžné.

Pokud srovnáme charakteristiky karyotypů, které získala Marescalchi (2005), a charakteristiky získané v této práci, můžeme pozorovat určité rozdíly. Marescalchi (2005) vyhodnotila počet submetacentrických chromozomů v rozmezí 2 až 13 párů chromozomů. Námi získané výsledky ukazují vždy 6 párů submetacentrických chromozomů. Z toho pak vyplývají i rozdílné počty chromozomů v kategorii subtelocentrických až akrocentrických. Rozdíl mezi jedinci stejného druhu (konkrétně *Andinoacara pulcher*) může být způsobený odlišnou lokalitou původu jedinců v práci Marescalchi (2005) a v této práci. Marescalchi (2005) použila ke své studii ryby z akvarijních chovů, naopak v této práci byly použity ryby získané a importované z místa původu. Takovým příkladem je *Andinoacara cf. pulcher*, kdy typový materiál (jedinci, podle nichž byl druh popsán) pochází z Trinidadu, zatímco areál rozšíření pokrývá mnohem rozsáhlejší území Venezuely a Kolumbie. Námi použitý jedinec pocházel z řeky Chirgua ve Venezuele. V akvarijních chovech se vyskytuje tento druh již dlouho, ale geografický původ chovaných jedinců není jistý. Není proto možné říci, z které lokality pochází jedinec použitý v práci Marescalchi (2005). Navíc druh *Andinoacara pulcher* je velmi variabilní a podle analýzy DNA se pravděpodobně jedná o více druhů (Musilová a kol., 2009). Dokud nebude vyřešena taxonomická situace v rámci tohoto druhu, nelze vyvodit jednoznačný závěr.

Stabilně se jeví skupina rodů *Aequidens* – *Cichlasoma* – *Krobia*, všichni zkoumaní jedinci z této skupiny mají $2n = 48$. U skupiny rodů *Nannacara* – *Cleithracara* došlo ke zvýšení počtu chromozomů u *Cleithracara maroni* a k redukci počtu chromozomů u *Nannacara anomala*. U skupiny rodů *Bujurquina* – *Tahuantinsuyoa* – *Andinoacara* – *Laetacara* – *Acaronia* se vyskytuje tendence k postupnému snižování počtu chromozomů, všechny druhy rodu *Andinoacara* mají $2n = 48$, druhy rodů *Bujurquina* mají $2n = 44$; 40 a druhy rodů *Laetacara* mají $2n = 44$; 38 a druh *Tahuantinsuyoa* má dokonce $2n = 30$. Ke zvýšení počtu chromozomů dochází rozpadem, naopak snížení počtu se může odehrávat fúzí či hromadnou fúzí, pravděpodobnější evoluční událost je fúze chromozomů než jejich rozpad (Imai a kol., 1986).

Pro zanesení počtu chromozomů jednotlivých druhů na jejich fylogenetický strom bylo použita optimalizace ACCTAN, která předpokládá evoluční události „co nejpozději“, tedy co nejdále od kořene stromu. Zvolili jsme tuto optimalizaci, jelikož data o počtu chromozomů jsou nekompletní a použití opačné optimalizace (DELTRAN – událost se udála co nejbližší kořenu stromu) by zanášelo do interpretace výsledků informaci i o druzích, které dosud nebyly zkoumány (Agnarsson a Miller, 2008).

Thompson (1979) tvrdí, že u cichlid se vyskytují dva typy karyotypů: 1) karyotyp „A“, který je původní ($2n = 48$), s malým počtem metacentrických chromozomů, obvyklejší jsou submetacentrické chromozomy a dále nacházíme vysoký počet subtelocentriků a akrocentriků; 2) evolučně odvozený karyotyp „B“, ve kterém nacházíme větší počet metacentrických chromozomů, často se také liší samotný počet chromozomů. Pokud porovnáme námi získané metafáze a karyotypy můžeme konstatovat, že většina zkoumaných cichlid majících $2n = 48$ chromozomů má karyotyp typu „A“. Naopak u druhů s redukováným počtem chromozomů ($2n = 44, 38$ nebo 30) se jedná převážně o karyotyp typu „B“.

Nejvýraznějším příkladem redukce počtu chromozomů je druh *Tahuantinsuyo* *macantzatza*, u kterého došlo k redukci až na $2n = 30$. U tohoto druhu se bohužel nepodařilo sestavit karyotyp, ale uvedený počet chromozomů ($2n = 30$) byl pozorován u dostatečného počtu metafází, kde bylo možno chromozomy alespoň spočítat.

Podle dostupných údajů má většina zástupců jihoamerických cichlid základní karyotyp $2n = 48$ (Salas a Boza, 1991, Feldberg a kol., 2003). S ohledem na zjištěné výsledky v této studii je velmi pravděpodobné, že předek tribu Cichlasomatini měl také $2n = 48$ chromozomů. Tento počet je též v souladu s prací Marescalchi (2005) a Feldberga a kol. (2003).

SOUHRN

Získali jsme cytogenetická data o jihoamerických cichlidách z tribu Cichlasomatini, která jsme následně porovnávali s fylogenetickými studiemi jiných autorů. Jaderné suspenze byly získány různými metodami chromozomové preparace, nakapány na skla a barveny roztokem Giemsa-Romanowski. Získané metafáze byly pozorovány mikroskopem a zaznamenány pomocí digitální kamery. Karyotypy byly sestaveny pouze z kvalitních metafází. Cytogenetická data (počet chromozomů, karyotyp) byla následně zanesena na známý fylogenetický strom. Ze získaných výsledků je pravděpodobné, že předek tribu Cichlasomatini měl $2n = 48$. Ke změně počtu chromozomů došlo minimálně při sedmi evolučních událostech. Z toho jednou ke zvýšení a šestkrát ke snížení počtu chromozomů. Zvýšení počtu chromozomů bylo pozorováno ve skupině *Nannacara* a *Cleithracara* (*Cleithracara maronii* $2n = 50$). Ve druhé skupině *Bujurquina* – *Tahuantinsuyo* – *Andinoacara* – *Laetacara* – *Acaronia* je patrná tendence k postupnému snižování počtu chromozomů. Všechny druhy rodu *Andinoacara* mají $2n = 48$, druhy rodů *Bujurquina* mají $2n = 44$, 40 a druhy rodů *Laetacara* mají $2n = 44$; 38 a *Tahuantinsuyo* má $2n = 30$. Ze získaných dat není zatím možné formulovat finální hypotézu o evoluci karyotypu tribu Cichlasomatini.

PODĚKOVÁNÍ

Autoři děkují oponentům za rozsáhlé a konstruktivní kritické poznámky k rukopisu.

LITERATURA

- Agnarsson, I., Miller, J.A., 2008. Is ACCTRAN better than DELTRAN? *Cladistics*, 24: 1–7.
- Feldberg, E., Porto, J.I.R., Bertollo, L.A.C., 2003. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: A.L. Val and B.G. Kapoor (Editors), *Fish Adaptation*. Science Publishers, Inc, Enfield – NH, USA, pp. 285–308.
- Flegr, J., 2005. *Evoluční biologie*. Academia, Praha, 559 pp.
- Imai, H.T., Maruyama, T., Gojobori, T., Inoue, Y., Crozier, R.H., 1986. Theoretical bases for karyotype evolution 1. The minimum interaction hypothesis, *The American Naturalist*, 128: 900–920.
- Levan, A., Fredga, K., Sanberg, A.A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201–220.
- Marescalchi, O., 2005. Karyotype and mitochondrial 16S gene characterizations in seven South American Cichlasomatini species (Perciformes, Cichlidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43(1): 22–28.

- Musilová, Z., Říčan, O., Novák, J., 2009. Phylogeny of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae) based on morphological and molecular data, with the description of a new genus. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 47(3): 234–247.
- Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti F., Kapoor B. G., (Editors), 2007. Cytogenetics as a tool in fish conservation: the present situation in Europe. In: *Fish Cytogenetics*. Science Publishers, Enfield, USA, pp. 215–241.
- Salas, E., Boza, J., 1991. Comparative cytotaxonomy of 3 species of *Cichlasoma* (Pisces: Cichlidae) native of Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 39(2): 219–224.
- Thompson, K.W., 1979. Cytotaxonomy of 41 species of neotropical cichlidae. *Copeia*, 4: 679–691.
- Val, A.L., Kapoor, B.G., (Editors), 2003. *Fish Adaption, Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution*. Science Publishers, Inc, Enfield – NH, USA, pp. 285–308.
- Völker, M.E., 2006. Karyotype differentiation in *Chromaphyosemion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae): Patterns, mechanisms and evolutionary implications. Ph.D. Thesis.

Karyotype characterizations in two South American Cichlasomatini species (Perciformes, Cichlidae)

Lucie Krajáková^{1*}, Zuzana Musilová^{1,2} & Lukáš Kalous¹

¹Czech University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Zoology and Fishery, 165 21 Praha 6 - Suchdol, Czech Republic;

²Laboratory of fish genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR v.v.i., Liběchov, Czech Republic, e-mail: *Corresponding author: Lucie Krajáková; E-mail address: krajakova@af.czu.cz,

Abstract

In South American Cichlids exist just a few studies dealing with chromosome research non destructive method of chromosome preparation by Martin Völker was used. Chromosomes were stained by solution of Giemsa-Romanowski and finally karyotypes were conducted from chosen metaphases. Two species *Aequidens tubicen* and *Andinoacara biseriatus* both with $2n = 48$.

Key words: karyotype, Cichlasomatini, cytogenetics

1. Introduction

Cytogenetic analysis is an available method how to get information about the number and shape of chromosomes and subsequently for constructing of a karyotype for comparison of different species.

2. Material and Methods

Material for study was obtained from several aquarium fish dealers. Fish were kept in common aquaria and feed by commercial food. Nuclei suspension was obtained by non destructive method of isolation from fin regenerates described by Völker (2006). Nuclei suspension were then dropped on slides on a hot plate and stained by Giemsa Romanowski. Metaphases were captured by camera (Olympus; DP30BW) and set up in programme Microimage. Specialized programme Ikaros (Metasystems) was used for karyotype constructions. Chromosomes were classified according to Levan et al. (1964), their classification (based on chromosome arm length and centromere position) distinguishes four groups: metacentric (m), submetacentric (sm), subtelocentric (st) and acrocentric (a).

3. Results

We constructed karyotypes for two species (Fig.1) *Aequidens tubicen* and *Andinoacara biseriatus*. Common characterization of karyotypes is $2n = 48$, first six chromosomes pairs were placed to group of submetacentric chromosomes, the rest of chromosome pairs were among subteloctetric – acrocentric group.

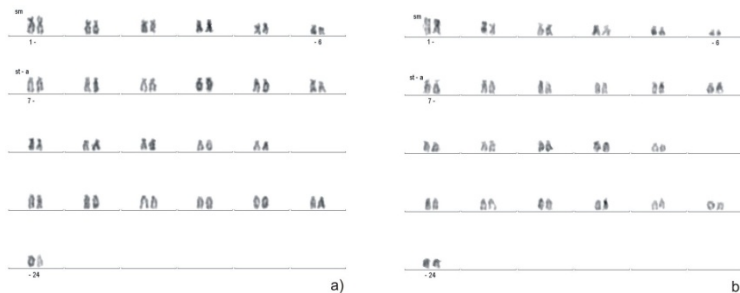


Figure 1: Karyotypes of South American cichlids of tribe Cichlasomatini a) *Aequidens tubicen*, b) *Andinoacara biseriatus*, 1- 6 sm, 7-24 st – a

4. Conclusions and discussion

According to data available, the majority of representatives of South American cichlids are characterized by basic karyotype with $2n = 48$ (Salas & Boza, 1991, Feldberg et al., 2003), which is consistent with our results.

Thompson (1979) wrote, that in cichlids exists two types of karyotypes: 1) ancestral karyotype „A“ ($2n = 48$) with low number of metacentric chromosomes and higher number of submetacentric, subteloctetric and acrocentric chromosomes ; 2) evolutionary derived karyotype „B“ with higher number of metacentrics and by different number of chromosomes.

When we compare our karyotypes we can conclude that *Aequidens tubicen* and *Andinoacara biseriatus* belong to karyotype “A”.

5. Acknowledgements

The authors thank to Š. Pelikánová and M. Rábová for their technical help and advices and to P. Ráb for the constructive comments. The study was supported by the research project of the Czech University of Life Sciences Prague IRP FANFR, CULF No. MSM 604607090.

6. References

- Feldberg E., Porto J., and Bertollo L. 2003: Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: A.L. Val and B.G. Kapoor (eds.), *Fish Adaptation*. Science Publishers, Inc, Enfield – NH, USA. 285-308
- Levan A., Fredga K., Sanberg, A .A. 1964: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220
- Salas E., Boza J. 1991: Comparative cytotaxonomy of 3 species of *Cichlasoma* (Pisces: Cichlidae) native of Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 39(2):219 – 224
- Thompson K.W. 1979: Cytotaxonomy of 41 species of neotropical cichlidae. *Copeia* 4: 679-691
- Völker M. E. 2006: Karyotype differentiation in Chromaphyosemion killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae): Patterns, mechanisms and evolutionary implications. Ph.D. Thesis

ICHTYOFAUNA MALÉHO TOKU V POVODÍ HORNÍHO LABE VE STŘEDNÍCH ČECHÁCH: VLIV RYBNÍKŮ NA DRUHOVÉ SLOŽENÍ

ICHTHYOFAUNA OF A SMALL STREAM IN THE UPPER ELBE BASIN, CENTRAL BOHEMIA: IMPACT OF PONDS ON FISH SPECIES COMPOSITION

L. KALOUS, T. DANĚK, Š. ROMOČUSKÝ, M. PETRTÝL, K. RYLKOVÁ, M. KNYTL, L. KRAJÁKOVÁ

Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů, Katedra zoologie a rybářství, 165 21 Praha 6 – Suchbát, kalous@af.czu.cz

ABSTRACT

The ichthyofauna and main abiotic parameters of a 20.8 km long stream (Jevanský potok) a right-hand tributary of the Sázava River in the Central Bohemia (Czech Republic), were studied. The stream is running partially through one of the few remaining fragments of Central European beech forest. BMA PLUS engine electroshocker was used to capture the fishes. Fishing was realized on 9 localities and on each 100 m long stretch of the stream was investigated. During two days collecting effort, more than 600 fish specimens belonging to eight families, 16 genera and 16 species were recorded. Of these, two species are non-native, *Pseudorasbora parva* and *Carassius gibelio*, two species are considered as transferred, *Salmo trutta* and *Anguilla anguilla* and 12 native species: *Gobio gobio*, *Alburnus alburnus*, *Barbatula barbatula*, *Squalius cephalus*, *Leuciscus leuciscus*, *Cottus gobio*, *Perca fluviatilis*, *Leucaspis delineatus*, *Esox lucius*, *Rutilus rutilus*, *Rhodeus amarus* and *Lampetra planeri*. Studied ichthyofauna is affected by ponds that are situated on the stream or in its alluvium. The heavy abundance of *Perca fluviatilis* in some places can be explained by its escapes from the ponds where it naturally spawns. A general view of the composition and spatial distribution of the ichthyofauna seems to be affected by ponds despite the natural character of the surrounded environment.

Klíčová slova: Druhové složení, vliv rybníků, Jevanský potok, degradace habitatu

Keywords: Species richness, impact of ponds, Jevanský potok, habitat degradation

ÚVOD

Výstavba jezů, zdymadel s plavebními komorami a přehradních nádrží ovlivňuje větší toky, na kterých jsou tato díla dobře viditelná. Nesporný negativní dopad těchto příčných překážek dokladují například práce Nilssona a kol. (2005), Jungwirtha a kol. (2000) nebo Dynesiuse a Nilssona (1994). Přirozený hydrologický režim povodí horního Labe je již od pradávna vystavován antropogenním vlivům, které mají dopad na společenstva vodních organismů (např. Adámek, 2010). Lidské činnosti nebyla vystavována jen vlastní řeka Labe, ale i mnohé malé říčky a potoky v jejím povodí.

Velké množství vodních děl je soustředěno především v horní části povodí, tedy v Čechách. Již od středověku jsou v Čechách malé vodní toky využívány k napájení rybníků a zároveň slouží jako recipienty vody při jejich vypouštění. V současnosti je na území České republiky přibližně 52 tis. ha vodních ploch rybníků (MZe, 2010), jejichž výstavba probíhala ponejvíce v 15.–16. století a významně změnila ráz krajiny (Pokorný, 2002). Rybníky jsou významné krajinnotvorné a ekologické prvky a neslouží jen k produkci ryb. V krajině plní mnoho ekologických a socioekonomických funkcí. Některá tato lidská díla se stala objektem ochrany přírody, jsou významným stanovištěm chráněných organismů, například ptáků (Musil a Fuchs, 1994). Rybníky jsou na druhou stranu známy také pro svůj možný negativní dopad na okolní ekosystém. Například kvalitou vypouštěné vody při výloveh kaprových rybníků (Valloš a Sarrazin, 2010). Akvakultura, do které rybníkářství spadá, je také zodpovědná za většinu introdukcí nepůvodních druhů (Welcomme 1988; 1992). Negativní vliv rybníkářství spočívá jak v samotné introdukci nepůvodních druhů, tak i ve funkci jejich zásobárny (Musil a kol., 2007; 2010). Neposledním nepříznivým vlivem rybníků je fragmentace toku, která způsobuje oddělení původních populací jednotlivých druhů, v důsledku čehož dochází k přerušení genového toku minimálně proti proudu a hrozí inbrední deprese. V případě dotování původních populací jedinci původem z rybníků může dojít k tzv. depresi outbrední (Dudash a Fenster, 2000).

Příkladem malého vodního toku s množstvím rybníků je Jevanský potok ve středních Čechách. Jevanský potok pramení v nadmořské výšce 480 m n. m. v obci Svojetice (49°58'11.4" s. š., 14°44'26.5" v. d.) a po 20,8 km se vlevo zprava do řeky Sázavy poblíž obce Stříbrná Skalice (49°53'11.4" s. š., 14°51'24.0" v. d.), jeho průměrný průtok při ústí je 0,28 m³.s⁻¹. Celé povodí má rozlohu 75,9 km² (Vlček, 1984; ČHMÚ, 2010). Na Jevanském potoce leží celkem 12 rybníků (Požár, Louňovický, Pařez, Vyžlovský, Jan, Švýcar, Jevanský, Pílský, Penčický, Šáchovec, Propast a Hruškovský), ze kterých pouze 4 menší rybníky (Pílský, Penčický, Šáchovec a Propast) jsou neprůtočné. Jevanský potok také protéká významnou přírodní rezervací „Voděradské bučiny“. Obsádky jednotlivých rybníků jsou uvedené v tabulce 1.

Tab. 1. Rybí obsádka rybníků v Jevanské rybníční soustavě podle informací od ŠLP.

Tab. 1. Fish stock of particular ponds in Jevany pond system, according to information from ŠLP.

Název rybníku	Obsádka rybníků v době průzkumu
Požár	K1, lín plůdek, štika, karas stříbřitý, bílá ryba
Louňovický	K1, štika, candát, karas stříbřitý, bílá ryba, okoun
Pařez	K1, plůdek lína, bílá ryba
Vyžlovský	K2, plůdek štika, candát, lín, sumec, okoun, bílá ryba, stěvlička
Jan	sportovní rybolov (kapr, lín, candát, okoun, sumec, štika, bílá ryba)
Švýcar	sportovní rybolov (kapr, lín, candát, okoun, sumec, štika, bílá ryba)
Jevanský	K2, okoun, bílá ryba, karas stříbřitý, stěvlička východní
Pílský	bez nasazení ryb
Penčický	bez nasazení ryb
Šáchovec	K0, amur, bílá ryba, okoun
Propast	bez vody – odbahňování
Hruškovský	sportovní rybolov

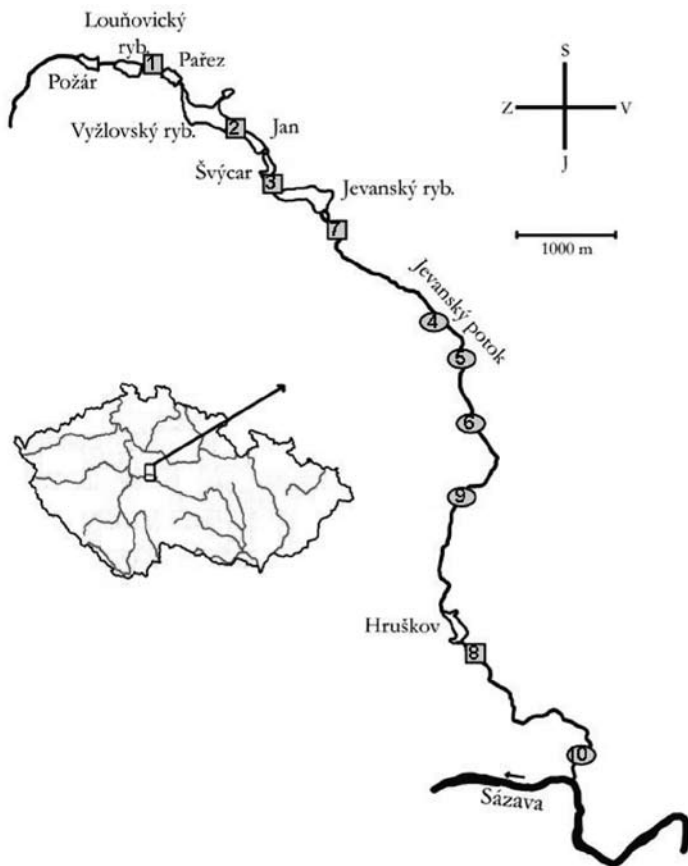
V rámci standardního inventarizačního ichtyologického průzkumu pro Školní lesní podnik České zemědělské univerzity v Praze v Kostelci nad Černými lesy (ŠLP) jsme se zaměřili také na ovlivnění rybiho společenstva soustavou zmíněných rybníků. Zajímalo nás, jaký bude rozdíl v početnosti jednotlivých druhů na úsecích toku v blízkosti rybníků a na lokalitách od rybníků vzdálenějších v letním období, kdy je obvykle nižší stav vody a jsou zhoršené kyslíkové poměry.

MATERIÁL A METODIKA

Porovnány byly části toku nacházející se ve větší vzdálenosti než 1 km od průtočných rybníků s částmi toku nacházejícími se do 300 m od hráze průtočných rybníků. Tyto vzdálenosti byly vybrány pouze s ohledem na geografii povodí potoka. Měření environmentálních parametrů a odlovy ryb byly provedeny 4.–29. 8. 2009. Po provedení průzkumu environmentálních podmínek (charakter okolí toku, typ substrátu dna, množství úkrytů, obsah kyslíku ve vodě) na podélném profilu byla vytipována vhodná místa pro provedení inventarizace ichtyofauny. Jedním z dalších parametrů pro výběr lokality byla i přístupnost pro lov. Některé lokality na horním toku byly na základě environmentálního hodnocení vyloučeny pro elektrolov, protože vykazovaly parametry neslučující se s trvalým výskytem ryb (obsah kyslíku, hloubka toku). Následně byl na vybraných místech (Obr. 1) odlov realizován pomocí elektrického agregátu (Rybolovný agregát typ BMA PLUS, elektrocentrála HONDA s ovládací skříň BMA PLUS). Loveny byly vždy jednou cca 100 m dlouhé úseky toku. Všechny ulovené ryby byly po determinaci šetrně vráceny na místo odlovení. S ohledem na malé množství lovných míst nevykazují počty odlovených jedinců pro každý druh normální rozdělení. Pro srovnání abundance jedinců jednotlivých druhů v úsecích do 300 m (158 ks) a nad 1000 m (386 ks) od průtočných rybníků byl proto použit neparametrický ekvivalent t-testu „Man-Whitney test“. Pro statistické vyhodnocení byl použit program Statistica (StatSoft, 2009).

Obr. 1. Schématická mapa Jevanského potoka se zakreslením jednotlivých lokalit ichtyologického průzkumu. Čtverečkem jsou označeny lokality do 300 m od rybníků, kolečkem pak lokality více než jeden km vzdálené od rybníků.

Fig. 1. Schematic map of the stream "Jevanský potok" with the indication of localities of ichthyologic survey. Sites within 300 m from the ponds are indicated by square, the locations more than one kilometre away from the ponds are indicated by circle.



VÝSLEDKY

V částech toku vzdálených od rybníků bylo zaznamenáno 14 druhů ryb a 1 druh mihulovce, v částech toku v blízkosti rybníků 10 druhů. Srovnávané úseky se lišily výrazně v environmentálních charakteristikách, i složení ichtyofauny (Graf 1). Z environmentálních parametrů se jednalo především o značné zabahnění částí toku pod rybníky a nižší množství ve vodě rozpuštěného kyslíku. Zatímco v částech toku vzdálených od rybníků se koncentrace rozpuštěného kyslíku pohybovaly v rozmezí 7–9,5 mg.l⁻¹, v blízkosti rybníků, kde se ichtyologický průzkum prováděl, nezdávka klesaly koncentrace kyslíku pod 3 mg.l⁻¹ (rozmezí 1,9–6,5 mg.l⁻¹). Informace o výskytu druhů ve dvou srovnávaných typech prostředí jsou patrné z tabulky 2 (Tab. 2).

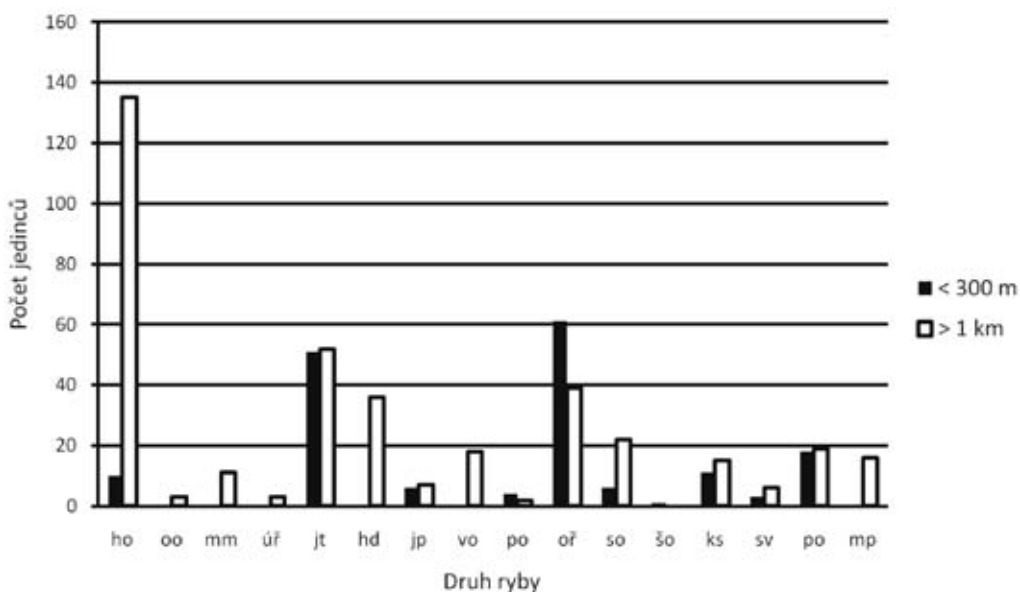
Tab. 2. Porovnání výskytu jednotlivých druhů ve sledovaných úsecích. Vyhodnoceno pomocí Man-Whitney testu.

Tab. 2. Comparison of the appearance of particular species in selected sections. Evaluated by Man-Whitney test.

Zkratka/druh	Status	Nad 1 km	Do 300 m	Preference	P
ho – hrouzek obecný (<i>Gobio gobio</i>)	LC	135	10	1 km	< 0,05
oo – ouklej obecná (<i>Alburnus alburnus</i>)	LC	3	0	–	neprůkazné
mm – mřenka mramorovaná (<i>Barbatula barbatula</i>)	LC	11	0	1 km	< 0,05
úř – úhoř říční (<i>Anguilla anguilla</i>)	NT	3	0	–	neprůkazné
jt – jelec tloušť (<i>Squalius cephalus</i>)	LC	52	51	–	neprůkazné
hd – hořavka duhová (<i>Rhodeus amarus</i>)	EN	36	0	1 km	< 0,05
jp – jelec proudník (<i>Leuciscus leuciscus</i>)	LC	7	6	–	neprůkazné
vo – vranka obecná (<i>Cottus gobio</i>)	VU	18	0	1 km	< 0,05
po – pstruh obecný (<i>Salmo trutta</i>)	LC	2	4	–	neprůkazné
oř – okoun říční (<i>Perca fluviatilis</i>)	LC	39	61	–	neprůkazné
so – slunka obecná (<i>Leucaspius delineatus</i>)	EN	22	6	1 km	< 0,05
šo – štika obecná (<i>Esox lucius</i>)	LC	0	1	–	neprůkazné
ks – karas stříbřitý (<i>Carassius gibelio</i>)		15	11	–	neprůkazné
sv – stěvlíčka východní (<i>Pseudorasbora parva</i>)		6	3	–	neprůkazné
pc – plotice obecná (<i>Rutilus rutilus</i>)	LC	19	18	–	neprůkazné
mp – mihule potoční (<i>Lampetra planeri</i>)	EN	16	0	1 km	< 0,05

LC – málo dotčený (Least Concern), NT – téměř ohrožený (Near Threatened), VU – zranitelný (Vulnerable), EN – ohrožený druh (Endangered), status podle Luska a kol. (2006)

Graf 1. Porovnání součtů jedinců jednotlivých druhů odlovených v úsecích do 300 m od rybníků (černé sloupce) a v úsecích vzdálených více jak 1 km od průtočných rybníků (bílé sloupce).

Graph 1. Comparison of totals of individuals of each species caught in the sections of stream up to 300 meters from the ponds (black columns) and in the sections more than 1 km from the ponds (white columns).


DISKUZE

S ohledem na naše výsledky lze konstatovat, že rybníky ovlivňují druhovou početnost v navazujících úsecích toku. Na určitý obecný trend snižování počtu druhů v tocích s velkým množstvím rybníků poukazuje i práce Pivničky (1998) nebo Humpla (2006). Z našich dat (Tab. 2) je patrné, že vzácnější druhy v letní sezóně jsou v Jevanském potoce vázány spíše na části toku, které jsou ve větší vzdálenosti od rybníků (v našem případě minimálně 1 km). Za důvod lze považovat to, že tyto druhy jsou zpravidla náročnější na kvalitu prostředí a kyslíkové poměry – např. vranka a mihule. Z rybníků se do toku dostává značné množství sedimentů s velkým podílem organické složky („bahno“). Následkem čehož dochází v částech toku v blízkosti rybníků ke značnému snížení množství rozpuštěného kyslíku rozkladnými procesy. Druhým podstatným negativním dopadem je snižování úkrytové kapacity prostředí překrytím původních členitých struktur těmito jemnými sedimenty, přičemž toto může mít na některé druhy (např. vranku) velmi zásadní negativní vliv (Knaepkens a kol., 2002). Jak snížení koncentrací kyslíku, tak zabahnění částí toků pod rybníky byly na lokalitách zřetelně patrné a obojí se odráželo i v celkově nižším množství zaznamenaných ryb. Některé druhy, které se dají považovat za euryporní – tedy flexibilní vzhledem k prostředí – se prokazatelně častěji vyskytovaly v prostředí vzdálenějším od rybníků – např. hrouzek, mřenka. Překvapením pak může být prokazatelně častější výskyt slunky v úsecích vzdálenějších od rybníků, která je nejnověji považována za ohrožený druh (Lusk a kol., 2006). Výskyt slunky, resp. její absenci, dáváme do souvislosti s výskytem střevličky. Střevlička je známá svou predací na jikrách a larvách původních druhů ryb (Stein a Herl, 1986), mezidruhovou konkurencí o potravní zdroje (Declerck a kol., 2002) a zavlečením exotických parazitů (Gozlan a kol., 2005). Každý z uvedených důvodů může být vysvětlením pro výskyt slunky právě jen v místech, kde se střevlička nevyskytuje, i když se pro ni nejedná o nevhodnější habitat. S určitou rezervou je třeba nahlížet na přítomnost úhoře pouze v úsecích vzdálených od rybníků. V případě tohoto druhu se jednalo o velmi malý počet odlovených jedinců (pouze 3 ks) a jejich zastižení v částech toku vzdálených od rybníků lze přiřknout i pouhému vlivu náhody. Výskyt hořavky duhové je vázán na větší zástupce vodních mlžů, pro které je vysoká turbidita a velké množství sedimentů v toku pod rybníky nevyhovující (Strayer, 1983; Beran, 2002). Nezanedbatelným vlivem rybníků je obohacení ichtyofauny o některé druhy ryb původem přímo z rybníků, přičemž tyto druhy zpravidla obývají všechny části toku, které se vyskytují po proudu od zdrojových vodních ploch. Z druhů, které jsme zaznamenali, lze předpokládat rybníční původ u hojně se vyskytujícího okouna říčního v rybnících Jevanské soustavy, jak je patrné z přehledu obsádek (Tab. 1). Podobné zkušenosti s výskytem tohoto druhu v potocích uvádějí i jiné práce, přičemž i v těchto případech se evidentně jednalo o ryby původem z rybníků (Daněk a kol., 2008, Vlach a Švátora, 2000). Rovněž původ karase stříbřitého, střevličky východní, s vysokou pravděpodobností i odchycených úhořů a štiky lze spatřovat ve výše položených rybnících.

SOUHRN

Zjištěné poznatky naznačují, že rybníky výrazným způsobem ovlivňují přírodní podmínky ve stametrových úsecích pod rybníky a zároveň významně ovlivňují složení ichtyofauny ve veškerých částech toku nacházejících se pod nimi. V podstatě lze veškeré tyto změny považovat za změny negativní. V souvislosti s tím je třeba chápat rybníky nejen jako krajinařsky hodnotné prvky, ale rovněž jako určité nebezpečí pro původní ichtyofaunu malých vodních toků.

PODĚKOVÁNÍ

Autoři děkují jednomu z oponentů za rozsáhlé a konstruktivní kritické poznámky k první verzi rukopisu. Tato práce vznikla za podpory Školního lesního podniku České zemědělské univerzity v Praze (Projekty genofondů) v Kostelci nad Černými lesy a výzkumného záměru FAPPZ, ČZU číslo MŠMT 6046070901.

LITERATURA

- Adámek, Z., Orendt, C., Wolfram, G., Sychra, J., 2010. Macrozoobenthos response to environmental degradation in a heavily modified stream: Case study the Upper Elbe River, Czech Republic. *Biologia*, 65(3): 527–536.
- Beran, L., 2002. Vodní měkkýši národní přírodní rezervace Novozámecký rybník. *Příroda*, Praha, 20: 137–140.
- Český hydrometeorologický ústav (ČHMÚ), 2010. Hydrologický seznam podrobného členění povodí vodních toků ČR. www.chmi.cz [verze 6/2010]. Dostupné online.
- Daněk, T., Dušek, J., Moravec, P., Švátora, M., 2008. Preference mikrohabitatů vybraných druhů ryb v prostředí malých vodních toků. XI. Česká Ichtyologická konference, Sborník referátů konference s mezinárodní účastí, Brno 3. a 4. prosince 2008: pp. 44–51.
- Declerck, S., Louette, G., De Bie, T., De Meester, L., 2002. Patterns of diet overlap between populations of non-indigenous and native fishes in shallow ponds. *Journal of Fish Biology*, 61: 1182–1197.
- Dudash, M.R., Fenster, C.B., 2000. Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations. In: A.G. Young, G.M. Clarke (Editors), *Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 35–53.
- Dynesius, M., Nilsson, C., 1994. Fragmentation and flow regulation of river systems in the northern third of the world. *Science*, 266: 753–762.
- Humpl, M., 2006. Relating Fish Assemblage Variability to environmental Gradients in Small and Mid-Sized Streams of the Elbe Basin (Czech Republic). *Electronic Journal of Ichthyology*, 1: 15–25.
- Jungwirth, M., Muhar, S., Schmutz, S., 2000. Fundamentals of fish ecological integrity and their relation to the extended serial discontinuity concept. *Hydrobiologia*, 422: 85–97.
- Knaepkens, G., Bruyndoncx, L., Bervoets, L., Eens, M., 2002. The presence of artificial stones predicts the occurrence of the European bullhead (*Cottus gobio*) in regulated lowland river in Flanders (Belgium). *Ecology of Freshwater Fish*, 11: 203–206.
- Gozlan, R.E., St-Hilaire, S., Feist, S.W., Martin, P., Kent, M.L., 2005. Disease threat to European fish. *Nature*, 435: 1046.
- Lusk, S., Hanel, L., Lusková V., Lojkásek, B., Hartvich, P., 2006. Červený seznam mihulí a ryb České republiky – verze 2005. *Biodiverzita ichtyofauny České republiky (VI)*: 7–16.
- Ministerstvo zemědělství ČR (MZe). Národní strategický plán pro oblast rybářství na období 2007–2013. www.eagri.cz [verze 6/2010]. Dostupné online.
- Musil, P., Fuchs, R., 1994. Changes in abundance of water birds species in southern Bohemia (Czech Republic) in the last 10 years. – In: J.J. Kerekes (Editor), *Aquatic birds in trophic web of lakes*. *Hydrobiologia*, 279/280: 511–519.
- Musil, J., Adámek, Z., Baranyi, C., 2007. Seasonal dynamics of fish assemblage in a pond canal. *Aquaculture International*, 3–4: 217–226.

- Musil, J., Jurajda, P., Adámek, Z., Horký, P., Slavík, O., 2010. Non-native fish introductions in the Czech Republic – species inventory, facts and future perspectives. *J. Appl. Ichthyol.*, 26 (Suppl. 2): 38–45.
- Netzband, A., Reincke, H., Bergemann, M., 2002. The River Elbe: a case study for the ecological and economical chain of sediments. *Journal of Soils and Sediments*, 2: 112–116.
- Nilsson, C., Reidy, C.A., Dynesius, M., Revenga, C., 2005. Fragmentation and flow regulation of the world's large river systems. *Science*, 308: 405–408.
- Pivnička, K., 1998. Vliv některých parametrů na diverzitu ryb v malých vodních tocích CHKO Křivoklátsko. *Biodiverzita ichtyofauny České republiky (II)*: 31–34.
- Pokorný, J., Hauser, V., 2002. The restoration of fish ponds in agricultural landscapes. *Ecological Engineering*, 18: 555–574.
- StatSoft, Inc., 2009L STATISTICA (data analysis software system), version 9.0. www.statsoft.com.
- Strayer, D., 1983. The effects of surface geology and stream size on freshwater mussel (*Bivalvia*, Unionidae) distribution in southeastern Michigan, U.S.A. *Freshwater Biology*, 13: 253–264.
- Stein, H., Herl, O., 1986. *Pseudorasbora parva* – eine neue Art der mitteleuropäischen Fischfauna. *Zeitschrift für die Binnenfischerei*, 36: 1–2.
- Vallod, D., Sarrazin, B., 2010. Water quality characteristics for draining an extensive fish farming pond. *Hydrological Sciences Journal/Journal des Sciences Hydrologiques*, 3: 394–402.
- Vlach, P., Švátora, M., 2000. Ichtyofauna Tyterského potoka a její změny v letech 1995–1999 ve srovnání s potokem Úpoř. *Biodiverzita ichtyofauny České republiky (III)*: 165–170.
- Vlček, V. 1984. *Zeměpisný lexikon ČSR. Vodní toky a nádrže*. Academia, Praha, 316 s.
- Welcomme, R.L., 1988. International introductions of inland aquatic species. Technical Paper 213, FAO, Rome, Italy.
- Welcomme, R.L., 1992. A history of international introductions of inland aquatic species. In: Selected papers from ICES Marine Science Symposium, 194: 3–14 pp.

Usage of non-destructive method of chromosome preparation applied on silver Prussian carp (*Carassius gibelio*)

Lukáš Kalous^{1,2}, Martin Knytl¹ & Lucie Krajáková¹

¹*Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Department of Zoology and Fisheries, 165 21 Praha 6 - Suchbát, Czech Republic*

²*Joint Laboratory of Genetics, Physiology and Reproduction of Fish Institute of Animal Physiology and Genetics CAS v.v.i. and Research Institute of Fishery and Hydrobiology, University of South Bohemia, Vodňany, Czech Republic*

*Corresponding author: Lukáš Kalous: E-mail address: kalous@af.czu.cz

Abstract

Here we report on successful preparation of chromosomes using non – destructive method applied on silver Prussian carp (*Carassius gibelio*).

Key words: cytogenetics, fish, method, chromosome

1. Introduction

Although a number of methods exist how to obtain chromosomes from fish, many of them face some methodological constrains for wider use. Preparation from blood (Hartley & Horne 1985) or from fibroblast culture (Rodrigues & Collares-Pereira 1996) requires advanced laboratory equipment. When direct procedure of chromosome preparation from kidneys (Ráb & Roth 1988) is used fish is sacrificed and does not survive the analyses. Easy non–destructive chromosome preparation that ensures fish surviving is required in some research approaches e.g. reproduction experiments, study of unique or rare material etc. Moreover in species or complexes that are characterized by high chromosome number (Ohno et al. 1967, Peňáz et al., 1979; Wei et al., 2003) non – destructive method using fin regenerates allows us to repeat the analyses and to gain more precise results. The employed method was described by Völker & Kullmann (2006) on fish embryos of the genus *Chromaphyosemion* (Cyprinodontiformes).

Here we present the test of applicability of this non-destructive method of chromosome preparation from fin regenerates applied on polyploid complex of silver Prussian carp (*C. gibelio*).

2. Material and Methods

Five specimens of *C. gibelio* of weight about 50 g were obtained from various localities in the Czech Republic and included into the experimental trial.

Fish were kept in common aquaria and fed by commercial feed before the procedure of chromosome preparation.. Temperature of water was kept around 20 °C.

Three days before analysis the caudal fin tissue of each fish was cut (up to 10 % of the whole fin) and stock solution (SS) was prepared composed of: 7.48 g NaCl + 0.18 g KCl + 0.2 g CaCl₂ + 0.016 g NaHCO₃ all diluted in 1 litre of H₂O.

After three days the regenerated tissue of fin from each individual was cut and put into a small Petri dish with approximately 5 -10 ml of cultivation solution (CS) (CS composed of: 14.3 ml SS + 85.7 ml H₂O + 0.025 g colchicine). A small piece of regenerated fin was exposed in CS for 2 hours in room temperature. When time ran out a few drops of fixative (methanol + acetic acid in ration 3:1) were added and the fin was left in this solution for additional 30 min in cold place (6 °C). After 30 minutes CS with few drops of fixative was replaced by pure fixative (5 – 10 ml) and placed for additional 30 min to a cold place. After 30 min fixative was replaced by a new one and the last step was repeated once again.

Then the piece of processed regenerated fin was placed from fixative into a drop of 50 – 25 % acetic acid on a fine sifter and gently mashed for 10-20 seconds. Drops with nuclei suspension were suck up using micropipette from the opposite side of a sifter and suspension obtained was placed into an Eppendorf tube and kept in a cold place.

One drop of suspension was placed on a clean slide warmed up to 45 °C. After 20 seconds the drop of suspension was suck up from the slide by micropipette and dropped to a different place.

Obtained slides with nuclei were stained by Giemsa and investigated using microscope BX41TF.

3. Results and discussion

We obtained metaphases of good quality from all investigated individuals (Fig. 1). Three drops were applied on each slide and each drop contained at least 10 metaphases. Metaphases were situated mainly on the

margin of the nuclei rings. The above mentioned method did not require sophisticated equipment neither sterile environment nor expensive chemicals. The method ensures the survival of investigated fish. Moreover fish tolerate well amputation of a small part of their caudal fin and the regeneration is very fast. We proved that non-destructive chromosome preparation from regenerated fin can be used routinely in laboratory.

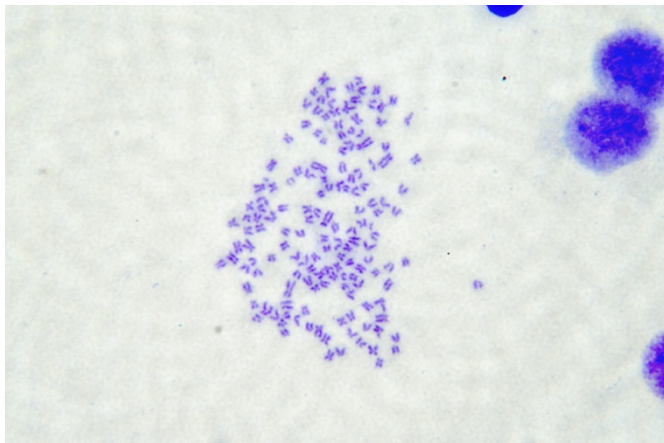


Fig.1. Metaphase of triploid silver Prussian carp (*Carassius gibelio*) isolated by non-destructive method from regenerate of caudal fin (magnification 1000 x).

5. Acknowledgements

This paper was supported by IRP MSM 6046070901. We are grateful to Dr. Martin Völker (University of Kent, UK) for explanation of the method and help in laboratory.

6. References

- Hartley, S. E., Horne, M. T. 1985. Cytogenetic techniques in fish genetics, *Journal of Fish Biology*, 26, 575-582
- Ohno, S., Muramoto, J., Christian, L., Atkin, N. B. 1967. Diploid – tetraploid relationship among old – world members of the fish family Cyprinidae, *Chromosoma*, 23, 1-9
- Peňáz M., Ráb P. & Prokeš M. 1979: Cytological analysis, gynogenesis and early development of *Carassius auratus gibelio*. *Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemoslovacae* 13 (7): 1-33.

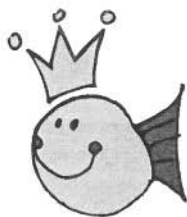
- Ráb, P., Roth, P. 1988. Metody analýzy chromozomů. Cytogenetická sekce Československé biologické společnosti při ČSAV v Brně, 115-124
- Rodrigues, E., Collares-Pereira, M. J. 1996. NOR polymorphism in the Iberian species *Chondrostoma lusitanicum* (Pisces: Cyprinidae), *Genetica* 98, 59-63
- Völker, M., Kullmann, H. 2006. Sequential chromosome banding from single acetic acid fixed embryos of Chromaphyosemion killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae), *Cybium*, 30, 2, 171-176
- Wei, W. H., Zhang, J., Zhang, Y. B., Zhou, L., Gui, J. F. 2003. Genetic heterogeneity and ploidy level analysis among different gynogenetic clones of the polyploid gibel carp, *Cytometry part A*, 56A, 46-52

Cytogenetic analysis and karyotype evolution in South American cichlids of the tribe Cichlasomatini (Cichlidae: Cichlasomatinae)

Karyotype evolution in cichlids remains quite unknown feature of their natural history. Mainly in South American cichlids, just few of studies deal with chromosome research. In this study, different methods were used for chromosome preparation of several species from the tribe Cichlasomatini (Cichlasomatinae). Cytogenetic data were consequently consulted with recent phylogenetic analysis of this group of South American cichlids and thus, first steps for karyotype evolution study were rendered herein.

Karyotypes were constructed from chosen metaphases and cytogenetic data, i.e. chromosome number and their morphology, were consequently mapped to known phylogenetic tree. We determined minimal number of evolution events of chromosome rearrangement and we formulated hypothesis regarding evolution of karyotype within the group of Cichlasomatini.

We concluded that common ancestor of Cichlasomatini had $2n=48$ chromosomes, which is considered to be the basal karyotype for all vertebrates. Different rate of evolution was found among three clades within Cichlasomatini: 1) one large clade with stable karyotype evolution exists; it is presented by $2n = 48$ and conservative morphology of chromosomes, 2) two remaining clades, where evolutionary changes in karyotype happened several times in both chromosome numbers and their morphology. Change of chromosome number occurred at least in six evolution events; once the number of chromosome increased and five times was reduced. The increase of chromosome number was observed in clade of Cleithracara (Cleithracara maroni $2n=50$). Contrarily, reduced number of chromosomes was found in Bujurquina ($2n = 44$), Laetacara ($2n = 44, 38$), Nannacara ($2n = 44$) and extremely also in Tahuantinuyoa ($2n= 30$). This is first cytogenetic overview of Cichlasomatini focused mainly on the karyotype evolution and our preliminary results show several interesting patterns.



Lucie Krajáková

Co-Authors: Z. Musilova, L. Kalous

Czech University of Life Sciences Prague

Czech Republic