

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 *Kribia* 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. *Kribia* sp. „Xingu“ – Brazílie, 8. *Tahuantinsuyoa macantatzta* – 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. Völke, 2) preparace chromozomů z embryí dle M. Völke a 3) kultivace fibroblastů *in vitro*.

Metody preparace chromozomů z regenerátu ploutve dle M. Völke a kultivace fibroblastů *in vitro* byly použity u všech vyjmenovaných druhů, metoda preparace chromozomů z embryí dle M. Völke 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. Völke je založena na principu regenerace buněk v místě poškození po odstranění části tkáně, v tomto případě se jednalo o ocasní ploutev. Rybě byla odstrižena 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 odstrižen 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 CaCl_2 ; 0,016 g NaHCO_3 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% CH_3OH a 100% CH_3COOH , 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 sítky 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 mikrozskumavky 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 předeřhátá (45 °C) podložní skla (Menzel GmbH) stejným způsobem jako v předchozí metodě preparace chromozomů z regenerátu.

Kultura fibroblastů byla založena z malého vzorku tkáně (cca 2 x 2 mm), který byl rybě odebrán z hřbetní ploutve. Případně byl použit odstrižek ocasní ploutve, který byl odebrán při využití metody preparace z regenerátu 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 mikrozskumavce typu Eppendorf na 60 minut. Poté byla tkáň umístěna do roztoku 1,5 ml PBS + 0,5 ml antibiotické–antimykotické směsi v mikrozskumavce 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 rozstříhávána 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).

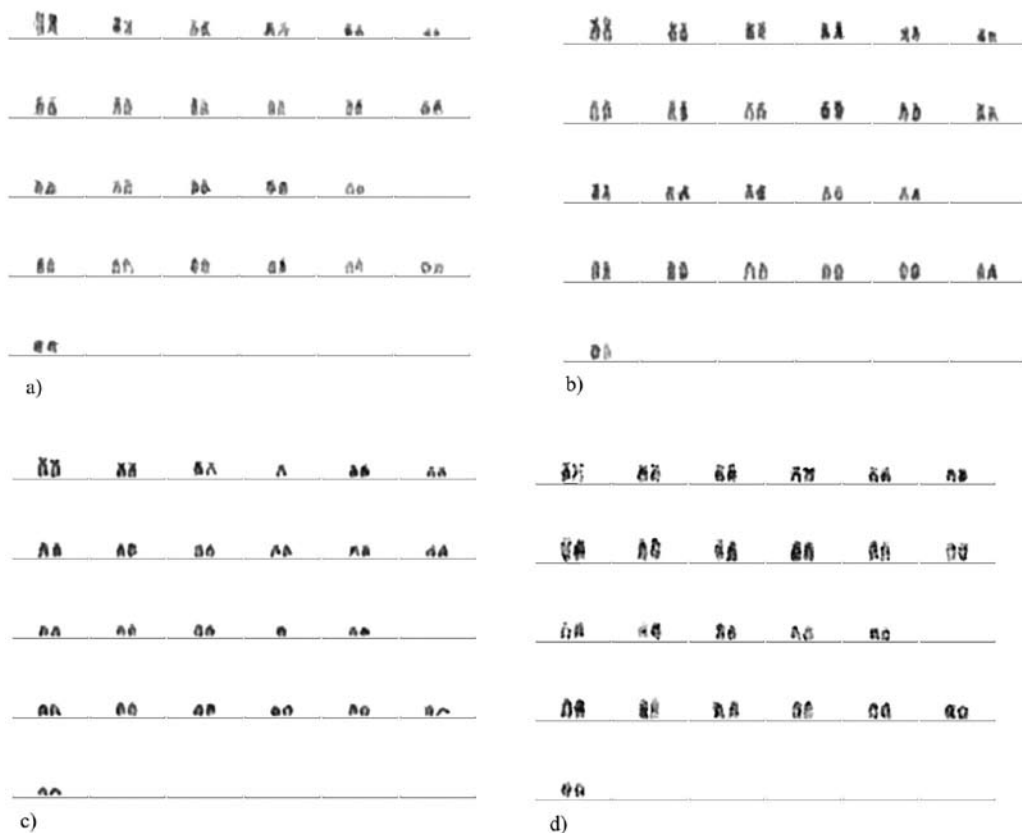
Chromozomy byly klasifikovány dle Levana a kol. (1964) na základě délky chromozomových ramen a polohy centromery do těchto kategorií: metacentrické (m), submetacentrické (sm), subtelocentrické (st) a akrocentrické (a). Získané výsledky cytogenetické analýzy byly posouzeny s ohledem na známé příbuzenské 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 kritéria maximální parsimonie (tj. aby celkový počet evolučních změn schopných vysvětlit rozložení znaků u reálných studovaných druhů byl co nejmenší; Flegel, 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*, *Kribia* 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.

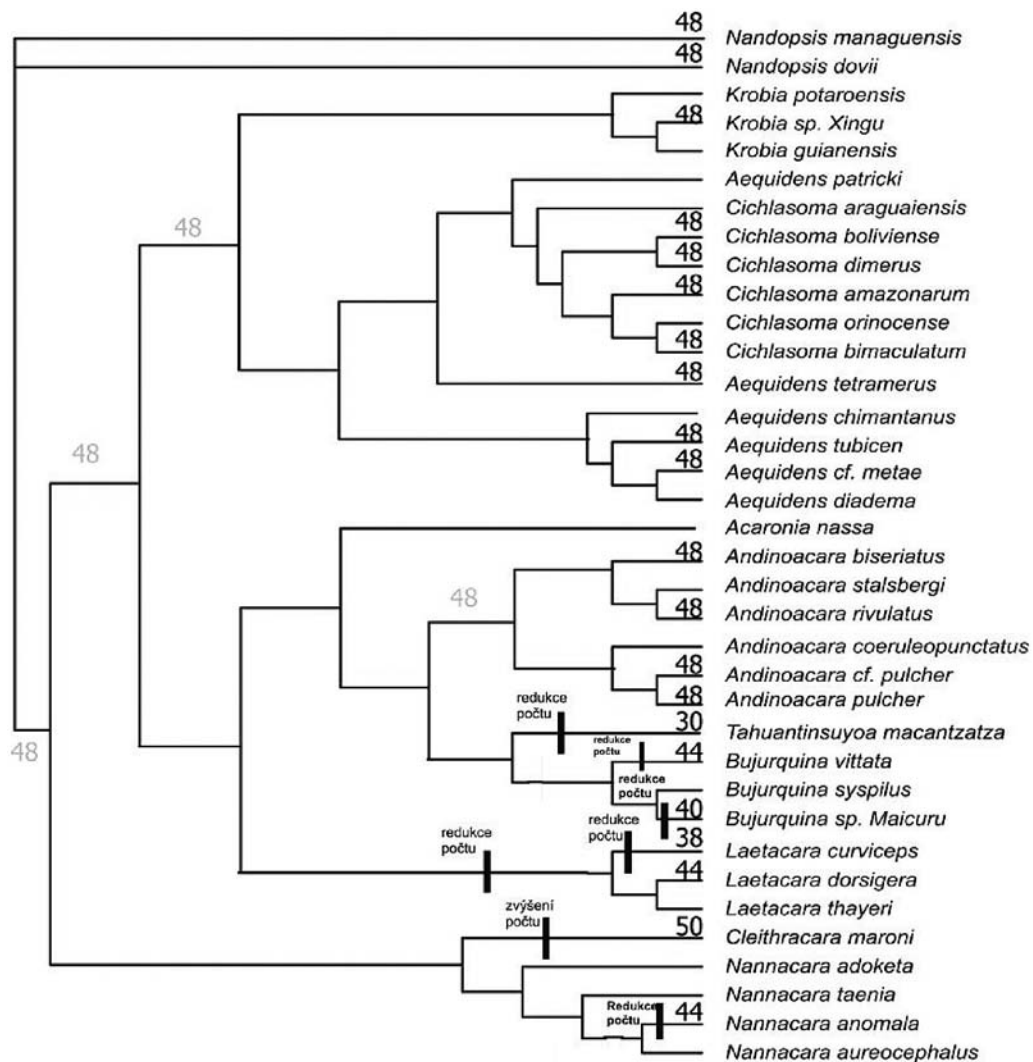
Fig. 1. Karyotypes of South American cichlids of tribe Cichlasomatini a) *Andinoacara biseriatus*, b) *Aequidens tubicen*, c) *Cichlasoma amazonarum*, d) *Krobia* sp. "Xingu", 1–6 sm, 7–24 st – a.



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 klastro 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 rodů *Bujurquina* mají $2n = 44$; 40, druhy rodů *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 *Heroini*) 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 aplikaci 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 et al., 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 akvariijních 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 akvariijních 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* – *Kribia*, 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 ACCTRAN, která předpokládá evoluční události „co nejpozději“, tedy co nejdale 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 macantzata*, 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 *Chromaphysomion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae): Patterns, mechanisms and evolutionary implications. Ph.D. Thesis.