

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4106 Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Katedra biologických disciplín

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

MAGISTERSKÁ PRÁCE

Hybridní zóna kuněk *Bombina bombina* a *B. variegata*

v jižních Čechách

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Pavla Robovská, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Mgr. Michal Berec, Ph.D.

Autor: Bc. et Bc. Helena Straková

České Budějovice, duben 2012

Prohlašuji, že svoji magisterskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

16.4.2012

Ráda bych poděkovala své školitelce za rady a asistenci v terénu i teorii, Mgr. Simoně Polákové za pomoc se statistickým zpracováním dat, Tereze Holicové za fotografickou výpomoc a dále své rodině za neustávající podporu psychickou i technickou, v podobě transferu na hůře dostupné lokality.

Abstrakt:

V této práci jsem se zaměřila na revizi vybraných lokalit v rámci hybridní zóny kuňky obecné a žlutobřiché, kde výzkumy v minulých letech potvrdily výskyt těchto druhů a jejich kříženců. Cílem je sledování vývoje těchto habitatů vhodných pro výskyt ohrožených druhů a trendy v početnosti výskytu žab. Dalším úkolem bylo spočítat hybridní index jedinců pomocí ventrálních skvrn a přiřadit tak populace na lokalitách ke druhům.

V sezóně 2011 jsem prováděla revizi na místech, která jsem v bakalářské práci vyhodnotila jako stabilní, či se na nich vyskytly kuňky v letech 2009 až 2010. Místo jsem vyfotografovala a odchytila většinou všechny kuňky, které se zde podařilo najít. Fotograficky jsem je zdokumentovala kvůli identifikaci a výpočtu hybridního indexu a poté jsem je vypustila zpět.

Celkem jsem navštívila 10 lokalit v oblasti mezi Českými Budějovicemi a Kaplicí. 9 z nich se dá hodnotit jako stabilní a jediná zanikla. Počty nalezených exemplářů nevykazují žádné významné výkyvy. Populace tří lokalit přísluší podle hybridního indexu ke kuňce obecné, 1 je hybridní, 2 jsou na hranici mezi hybridy a kuňkou žlutobřichou a zbylé 4 náleží ke kuňce žlutobřiché. Rozložení těchto lokalit odpovídá geografickému gradientu zóny. Jako statisticky průkazné byly na základě hybridního indexu vyhodnoceny 4 lokality, zbylé nevykazovaly dostatečnou specifitu.

Klíčová slova: kuňka obecná, kuňka žlutobřichá, lokalita, hybridní index, ventrální skvrny

Summary:

In this paper I focused on the examination of chosen localities inside the hybrid zone of the fire-bellied toads, where the occurrence of these species and their hybrids was confirmed in previous research. The goal is to follow the development of these habitats, suitable for the presence of a threatened species, and trends in quantities of these toads. Another aim was to calculate the hybrid index of each individual based on the ventral spots and so to classify the populations on each locality according to species.

In season 2011 I revised localities that I considered stable in my bachelor thesis, or there were specimen found in seasons 2009 and 2010. I took picture of each locality and captured all present fire-bellied toads if possible. I also made a photographic documentation of each toad for the purpose of estimation of the hybrid index and identification. Then I released all the animals back.

Altogether I examined 10 localities between České Budějovice and Kaplice. 9 of them can be considered as stable and one as disappeared. The numbers of captured specimen do not show any significant fluctuation. Population from 3 localities belong to a *Bombina bombina* species, based on the hybrid index. One locality is hybrid, another 2 are located on the border between hybrid and *B.variegata* and 4 remaining belong to pure *B.variegata*. Distribution of these localities is corresponding to a geographical gradient of the hybrid zone. As for statistical assessment of the hybrid index, only 4 localities were proven significant and conclusive, while the others did not evince considerable specificity.

Keywords: fire-bellied toad, yellow-bellied toad, locality, the hybrid index, ventral spots

Obsah

1. Úvod	5
2. Literární přehled	5
2.1 Hybridní zóny.....	5
2.2 Hybridizace u rodu <i>Bombina</i>	9
2.3 Metody studia hybridních zón.....	12
2.3.1 Morfologie.....	13
2.3.2 Alozymy.....	14
2.3.3 Mitochondriální DNA.....	15
2.3.4 Mikrosatelity.....	16
2.3.5 SSCP.....	17
3. Cíle práce	17
4. Materiál a metodika	17
4.1. Sběr dat.....	17
4.2. Morfologické znaky jedinců.....	18
4.3. vyhodnocení dat.....	19
5. Výsledky	20
5.1 Lokality.....	20
5.2. Hybridní index.....	23
6. Diskuse	27
6.1 Stav lokalit a počet kuněk.....	27
6.2 Druhové rozložení hybridní zóny.....	29
7. Závěr	32
8. Použitá literatura	33
9. Přílohy	41
9.1 Mapy lokalit.....	41
9.2 Tabulky.....	42
9.3 Fotografie.....	49

1. Úvod

Všechny druhy obojživelníků, kteří u nás žijí, patří mezi ohrožené, a tedy zákonem chráněné živočichy. Příčiny ohrožení a úbytku populací obojživelníků jsou různé, většinou však jde o destrukci habitatu. Ta má za následek mizení stanovišť, na kterých by obojživelníci mohli žít a množit se.

Oblast jižně od Českých Budějovic je zajímavá tím, že se zde společně vyskytují oba naše druhy kuněk, které obvykle obývají odlišná stanoviště. Jejich blízký kontakt zde vede k hybridizaci. Vznikají tak plodní potomci genotypově i fenotypově různě blízcí rodičovským druhům. Z tohoto důvodu byl v této oblasti prováděn v letech 1997 až 2002 výzkum, a to zejména za účelem genetické identifikace jedinců, ale i detekce možných lokalit výskytu.

Tato práce navazuje na bakalářskou práci, kde jsem zrevidovala lokality, na kterých byl v minulých výzkumech potvrzen výskyt kuněk. Sledovala jsem stav lokalit a počet jedinců, kteří zde žijí, zejména s ohledem na dříve zjištěné výsledky.

Pro diplomovou práci jsem se zaměřila na místa, kde byl výskyt kuněk vyhodnocen jako stabilní. Pokračovala jsem ve sledování vývoje stavu lokalit a početního výskytu kuněk. Díky unikátnímu vzoru ventrálních skvrn bylo možné zachytit trend výskytu čistokrevných a hybridních populací v rámci geografického umístění lokalit v hybridní zóně.

2. Literární přehled

2.1 Hybridní zóny

Hybridní zóny se vyskytují tam, kde se setkávají geneticky odlišné skupiny organismů a vzájemným křížením vytváří alespoň nějaké smíšené potomky (Barton & Hewitt, 1989). Vznikají v místech styku geneticky rozdílných populací, či dokonce taxonů, kterým chybí dostatečná bariéra proti genovému toku. Výměna genů mezi živočišnými druhy je mnohem častější jev, než se předpokládalo. Hybridní zóny vytvářejí rekombinantní jedince, kteří jsou důsledkem mnoha generací hybridizace (Rieseberg & Buerkle, 2002).

Často se předpokládá, že hybridní zóny jsou bezprostředním následkem destrukce habitatu či změn prostředí. V mnoha případech dochází k odstranění ekologické izolace následkem působení člověka (Harrison, 1993).

Od poloviny 19. století byly navrženy dvě hlavní možnosti vzniku hybridních zón. První, více rozšířená, považuje hybridní zóny za výsledek sekundárního kontaktu populací, které byly dříve alopatricky odděleny (např. Mayr, 1942 ex Harrison, 1993). Slabé místo zde tvoří fakt, že primární přechod i sekundární kontakt mohou vytvářet stejný charakter variace (Endler, 1977 ex Harrison, 1993).

Druhá teorie předpokládá, že hybridní zóny vznikají v přímém důsledku prostorově rozdílných selekčních tlaků (gradientů prostředí) (Endler, 1977 ex Harrison, 1993). Samotná geografie speciace je však často neznámá díky pozdějším změnám v distribuci, které jsou způsobeny rozptylem či lokálními extinkcemi, anebo obojím (Hewitt, 1988).

Velké množství hybridních zón se jeví jako stabilní, udržované na základě rovnováhy mezi rozptylem a selekcí. Selektce proti heterozygotům může být na prostředí nezávislá (různé typy chromozómových změn) nebo závislá. To nastává v případě, že se hybridní zóna vytvoří podél ostrých environmentálních gradientů či na hranicích habitatů a odlišné genotypy mají v těchto různých prostředích větší fitness (Harrison, 1993).

Pokud by hybridní zóny představovaly sekundární kontakt a neutrální disperzi genů, došlo by po spojení populací k vytvoření jednoho, pravděpodobně polymorfního druhu. Jestliže jde naopak o vlnu šíření úspěšnějšího konkurenta, může být výsledkem vymření jednoho nebo i obou hybridizujících druhů (Harrison, 1990 ex Harrison, 1993). Přežívají-li stabilně některá uskupení rekombinantních genotypů vytvořených hybridizací nebo zpětným křížením, mohou být tyto skupiny považovány za samostatné druhy (Harrison, 1993).

Zdá se, že hybridizace se u zvířat nevyskytuje zdaleka tak často jako u rostlin. Nicméně kvantitativní odhady jsou zatím dostupné pouze pro ryby a ptáky (Arnold, 1997). V případě ptačích druhů hybridizuje 9 až 10%. Hybridizace u čeledí severoamerických sladkovodních ryb se pohybuje mezi 3 a 17% (Hubbs, 1995).

Zatímco u rostlin byla hybridizace vždy považována za důležitou, zoologové dlouho těmto procesům nepřikládali evoluční význam (Štefka, 2000). Díky zvýšení variability způsobené hybridizací může selektce pracovat se společně segregující skupinou genů, namísto několika genů vzniklých mutací. Na druhou stranu u živočichů bývá tok genů silně brzděn selekcí proti heterozygotům, způsobenou snížením fitness v důsledku zhoršené kompatibility rodičovských genomů, jejichž

adaptivní hodnota závisí na integraci většího množství genů než u rostlin (Dobzhansky, 1951 ex Dowling & Secor, 1997).

Harrison (1993) rozlišuje mezi dvěma typy hybridních zón podle toku genů dovnitř zóny. U tzv. dispersal independent zón hybridní jedinci preferují přechodné prostředí na pozvolném gradientu mezi prostředními rodičovských druhů. Naproti tomu u dispersal dependent zón, mezi něž spadají hybridní zóny kuněk, závisí stav v centru zóny na rozmístění populací rodičovských druhů a selekci proti heterozygotům.

Stebbins (1959, ex Harisson, 1993) definoval hybridizaci jako „křížení jedinců z oddělených populací, jenž se vyznačují rozdílnými adaptivními formami“. Vzal tedy v úvahu nejen rozdílné druhy, ale i druhotný kontakt mezi alopaticky oddělenými populacemi téhož druhu. Harrison (1990, ex Harrison, 1993) popisuje hybridizaci jako křížení dvou populací (či skupin populací), které jsou rozlišitelné na základě jednoho nebo více dědičných znaků.

Studie zabývající se hybridními zónami řeší otázky, zda jsou tyto zdroji nových rekombinantních typů, a tedy i nových druhů, nebo jsou místy, kde selekce proti hybridizaci vede k vytvoření silných prezygotických bariér. S tím souvisí některé problémy. Konkrétně za jakých okolností může být lokální hybridní populace označena jako nový druh odlišný od rodičovských a otázka, zda jsou hybridizující taxony rasami či poddruhy, jelikož se spolu kříží, nebo jsou regulárními druhy, protože alopatické populace rodičů zůstávají oddělené (Havelková, 2002).

Hybridní zóny tudíž představují poměrně vážný problém pro definici druhu jako skupiny individuí, která sdílí „specifický rozpoznávací partnerský systém“ (SMRS) (Paterson, 1985 ex Harrison, 1993). Fylogenetické pojetí druhů (Nixon & Wheeler, 1990 ex Harrison, 1993) je výhodnější, protože nespolehá na reprodukční spojitost jako nezbytné kritérium definice druhů. Podle něj je druh nejmenší seskupení populací, které lze popsat na základě unikátních kombinací znaků srovnatelných jedinců. Hybridní zóny v důsledku rekombinace však mohou obsahovat jedince, kteří mají tuto „unikátní kombinací znaků“ porušenou.

Dle Brandona (1977) není hybridizace vhodným indikátorem druhové příslušnosti. Navíc úroveň toku genů není u různých druhů konstantní (Slatkin, 1981; 1985). Odhadnutá hodnota toku genů mezi populacemi kuněk studovaných Piálkem (1992) rovněž vylučuje možnost splývání obou druhů vlivem toku genů.

Ačkoli otázka definice druhů zůstává otevřená, hybridizace nabízí možnost nahlédnout do procesu jejich vzniku. Jelikož jsou hybridy často neživotaschopní, sterilní nebo vykazují sníženou fitness vůči rodičovským druhům, selekce by měla tlačit na vytvoření a posílení izolačních mechanismů (Liou & Price, 1994). Na druhou stranu někteří autoři (Barton, 2001) uvádějí, že genotyp hybridů může být někdy stejně vhodný, nebo dokonce vhodnější než byly genotypy rodičovské. V případě produkce plodných hybridů bývají jejich genotypy odlišné gen od genu. U některých lokusů se zafixují na každé straně hybridní zóny univerzálně prospěšné alely, u jiných mohou být různé alely výhodné např. v různých podmínkách prostředí (Barton & Gale, 1993).

Dalším ze sporných bodů týkajících se hybridních zón je otázka, jestli jsou místem evoluce silnějších prezygotických bariér v důsledku selekce proti hybridům (Howard, 1993). Selektce proti hybridům může ale vést i k zeslabení bariér proti genové výměně, pokud zvýhodňuje takové varianty, které vykazují při křížení s jedním z rodičovských druhů minimální redukci životaschopnosti a plodnosti (Searle, 1986 ex Harrison, 1993).

Díky hybridizaci a zpětnému křížení s jedním či oběma rodičovskými druhy může dojít ke včlenění alel jednoho taxonu do genetického poolu taxonu druhého. Tento fenomén popsali Anderson a Hubricht (1938, ex Harrison, 1993) jako introgresivní hybridizaci. Introgrese je dokonce důležitějším zdrojem nových variací než mutace a tyto variace mají největší pravděpodobnost úspěšnosti v měnících se nebo zanikajících prostředích (Anderson, 1953 ex Harrison, 1993).

Z hlediska populační genetiky se hybridní zóna jeví jako soubor geografických gradientů (klin) kvantitativních znaků či alelových frekvencí. Tyto klíny jsou udržovány dvěma hlavními mechanismy (Barton & Hewitt, 1985). Prvním je symetrický polymorfismus, kdy se ekvilibrium liší se v jednotlivých místech. Druhým rovnováha mezi selekcí proti hybridům a náhodným rozptylem.

V prvním případě tvar klin přímo odráží místní prostředí a nezávisí na velikosti migrace jedinců. Pro většinu hybridních zón však toto neplatí, protože se skládají z klin, které jsou mnohem užší než gradienty prostředí a mají šířku přibližující se individuálnímu dosahu rozptylu (Barton & Hewitt, 1985).

Většinu hybridních zón zřejmě udržuje druhý mechanismus, což dokazuje jejich úzká šířka, stálý tvar a výrazná podobnost. Ostré oddělení taxonů, které by způsobovala samotná selekce, je zmírněno náhodným pohybem individuů. Různé

způsoby fungování selekce se primárně liší adaptací k vnějšímu prostředí, kdy jsou různé alely preferovány na různých místech a selekcí proti hybridům, kdy jsou alely nejvýhodnější na svém vlastním genetickém pozadí (Barton & Hewitt, 1989).

Toto rozlišení je důležité, protože určuje, jak se může hybridní zóna pohybovat, neboli jak si konkurují genetické soubory hybridizujících populací. V prvním případě musí hybridní zóna ležet na určitém místě gradientu prostředí, při druhé možnosti se může pohybovat z místa na místo a nazývá se tenzí zónou. Ve skutečnosti se v jedné hybridní zóně může uplatňovat více typů selekce (Harrison, 1993; Barton & Hewitt, 1989). Výhodou je, že mechanismus selekce má pouze malý vliv na tvar klíny, který navíc nezávisí ani na struktuře lokální populace, ovšem za předpokladu, že selekce není příliš silná (Harrison, 1993).

2.2 Hybridizace u rodu *Bombina*

Kuňka obecná (*Bombina bombina*, Linné 1761) a kuňka žlutobřichá (*Bombina variegata*, Linné 1758) se liší v mnoha vlastnostech. První druh je typickým obyvatelem nížin, kde se rozmnožuje ve větších permanentních nádržích a žije více akvatickým způsobem života. Naproti tomu kuňka žlutobřichá obývá kopcovitý terén větších nadmořských výšek a je více suchozemská. Tomu mimo jiné odpovídá zesílená tloušťka její pokožky či delší zadní končetiny. Rozmnožuje se spíše v malých temporálních vodách. Areál kuňky obecné se rozkládá v nížinách východní a severní Evropy a v povodí Dunaje. Kuňka žlutobřichá, jejíž výskyt spadá do hornatých oblastí západní a jižní Evropy a karpatského oblouku, tvoří několik poddruhů, odlišných svým genotypem (Vasara et al., 1991), alozými i mitochondriální DNA (Szymura et al., 2000).

Dle Bartona a Hewitta (1985) jsou biologické druhy skupiny vzájemně se rozmnožujících přírodních populací, které jsou reprodukčně odděleny od jiných takových skupin. Pokud mají dvě populace patřit k různým druhům, musí být dokončena reprodukční izolace, a tedy nesmějí tedy tvořit žádné plodné hybridy. Důvodem pochybností o platnosti druhové příslušnosti kuněk je tedy vytváření plodných hybridů, což naznačuje, že speciace ještě nebyla ukončena.

Někteří autoři (např. Mayr, 1963) proto navrhují převedení kuněk do kategorie poddruhu. Harrison (1993) argumentuje, že přežívají-li stabilně některá uskupení rekombinantních genotypů vytvořených hybridizací nebo zpětným křížením, mohou být tyto skupiny považovány za samostatné druhy. Což odpovídá fylogenetické

koncepti druhu, podle které je druh skupina jedinců, kteří mají unikátního společného předka a vykazují určité společné znaky.

Werner (1897) poukázal na mizení specifických druhových charakteristik díky hybridizaci v místech společného výskytu příbuzných druhů. Velké množství diagnostických znaků rozlišujících oba druhy dělá z kuněk ideální příklad pro studium hypotéz o původu a dynamice hybridních zón (Hewitt, 1988). Selektce proti hybridům působí na velkém množství lokusů (asi 55), které jsou ale rozmístěny v geonomu víceméně rovnoměrně (Szymura & Barton, 1986; 1991).

Příčinou hybridizace mezi oběma evropskými druhy kuněk je druhotný kontakt pre a postzygoticky nedostatečně oddělených druhů. Arntzenova (1978) teorie předpokládala vznik obou druhů vikariancí během pleistocénního zalednění, přičemž hory jižní Evropy sloužily jako refugium kuňky žlutobřiché, zatímco kuňka obecná našla refugia ve stepích obklopujících Černé a Kaspické moře. V průběhu oteplování po posledním glaciálu došlo ke znovurozšíření obou kuněk do střední Evropy a v místech kontaktu pak došlo ke vzniku hybridních zón.

Na základě elektroforetické a albuminové analýzy byla později doba divergence těchto druhů určena na 2.45 ± 0.65 mil. let. Po přihlédnutí k poměru rychlých alel byl údaj upraven na 6.8 ± 1.8 mil. let (Szymura, 1983), což vyvrátilo výše zmíněnou teorii pleistocénního původu. V současnosti se areály obou druhů stýkají v délce několika tisíc kilometrů, a to od rakouského povodí Dunaje přes oblouk Karpat až po Chorvatsko. Kontaktní zóna, ve které dochází k rychlým změnám frekvencí alel obou druhů, je charakteristická velmi malou šířkou, asi 5 až 10 kilometrů (Szymura & Barton, 1986).

Až do poloviny 70. let byly všechny výzkumy založeny na porovnávání morfologických znaků, přičemž si většina autorů vypracovala vlastní systém hodnocení a vážení znaků (Sturgen, 1959; Lác, 1961; Michalowski, 1961; Maděj, 1964). Teprve aplikace metody separace molekul bílkovin elektroforézou (Szymura, 1976) umožnila populačně genetické studium kuněk.

Takto byly neprve prostudovány hybridní zóny v Polsku (Szymura, 1983; Szymura & Barton, 1986), které jsou ve shodě s modelem tenzí zóny (Barton & Hewitt, 1985), pro kterou je charakteristická rovnováha mezi tokem genů dovnitř zóny a selekcí proti hybridům. Čisté populace obou druhů jsou zde odděleny hybridními jedinci, přičemž F_1 hybridi se vyskytují vzácně. Tato zóna je nezávislá na okolním prostředí a je geograficky přímá. Zdejší populace se nacházejí

blízko Hardy-Weinbergově rovnováze, čímž je indikováno náhodné páření. Funkci selekčního faktoru zde plní zvýšená mortalita hybridů v embryonální a larvální fázi vývoje (Kruuk et al., 1999).

Zejména transeky nalezené v Jugoslávii a Chorvatsku (Szymura, 1988; MacCallum et al., 1998) se svojí heterogenitou liší od poměrně uniformního prostředí v Polsku. Tyto transeky odpovídají nedostatkem heterozygotů a silnou selekcí mezi prostředími typickými pro oba druhy spíše modelu mozaikové zóny (Rand & Harrison, 1989). Existují zde populace obou rodičovských druhů s deficitem hybridních jedinců, ovšem s častějším výskytem F_1 hybridů. Také některé další hybridní zóny, zejména na Slovensku a v Maďarsku (Gollmann, 1987; Gollmann et al., 1988) zcela neodpovídají charakteru tenzí zóny.

Gollmann (1996) navíc poukazuje na existenci tzv. reliktní (reziduální) mozaikové zóny v dolním Rakousku, kde došlo k velké disturbanci prostředí v důsledku lidské činnosti a následně k vytvoření izolovaných populací kuněk s velmi omezenou genetickou výměnou. Přesto ale okrajové populace obou druhů nesou znaky dříve probíhající hybridizace. Tyto populace odpovídají Hardy-Weinbergově rovnováze.

Hybridní zóna kuněk je široká pouze 6-20 km, táhne se východní a střední Evropou v délce 3000 – 4000 km a probíhá nadmořskými výškami 110-400m (Gollmann, 1984; Szymura, 1988; Horák, 1997; Štefka, 2003). Struktura hybridní zóny je geograficky proměnlivá, přesto oba druhy účinně odděluje (Gollmann & Szymura, 1986). Tok genů je omezen na oblast hybridní zóny a genová introgrese zasahuje z centra hybridizace maximálně 260 km do areálu kuňky obecné a 280 km do areálu kuňky žlutobřiché (Szymura & Barton, 1991).

Na území České republiky dochází ke kontaktu populací obou druhů ve dvou oblastech. Na severovýchodní Moravě detekoval hybridní zónu v Oderských vrších Piálek (1992). V jižních Čechách odhalila Horáková morfologická práce (1997) hybridní zónu v předšumaví, která byla následně potvrzena i geneticky (Havelková, 1999; 2002). Štefka (2000; 2003) morfologicky analyzoval její transekt v Novohradských horách. Gollmann et al. (1993) popsal na základě morfologie hybridní jedince z jihozápadních Čech, kteří však po genetické stránce náleželi ke kuňce obecné.

2.3 Metody studia hybridních zón

Při setkání dvou odlišných genofondů a produkci plodných hybridů se genotypy těchto hybridů přirozeně liší gen od genu. U některých lokusů se zafixují na obou stranách hybridní zóny univerzálně prospěšné alely, u jiných mohou být různé alely výhodné v různých podmínkách. Genetické studie se většinou zaměřují na neutrální lokusy, které nemají žádný významný vliv na fitness (nepodléhají selekci) a jsou proto fixovány náhodně a dědí se podle zákonů Mendelovské genetiky (Barton & Gale, 1993).

Frekvence jednotlivých genotypů vyskytujících se v hybridní zóně nás informují o selekci, množství genů, které jí podléhá, velikosti rozptylu jedince a míře obtížnosti, s jakou alely přecházejí z jednoho genetického poolu do druhého (Harrison, 1993).

Oba druhy kuněk jsou velmi vhodné pro studium hybridizace a jevů s ní spojených, protože jsou od sebe dobře anatomicky, morfologicky, ekologicky i etologicky odděleny. Liší se i v neutrálních biochemických znacích, jako jsou alozymy a mtDNA. Přesto jsou si geneticky blízké natolik, že se mohou plodně křížit. Tento rozpor je patrně způsoben skutečností, že geny zodpovědné za fenotypové rozdíly jsou kvalitativně odlišné a odrážejí jinou část geonomu než geny ovládající úspěšný embryonální vývoj a plodnost hybridů (Szymura, 1983).

S mezidruhovým křížením je u kuněk spojena zvýšená morfologická variabilita. Nicméně Maděj (1967) uvádí, že morfologicky distinktní jedinci byli nalezeni i na místech od hybridních zón velmi vzdálených. Existence abnormálních exemplářů byla vysvětlována jako v současnosti či v minulosti probíhající hybridizace (Maděj, 1966), jako důsledek mikroevoluce zahrnující zpětné mutace nebo důsledek klinální variability (Sturgen, 1980). Výzkum obou druhů byl v minulosti zaměřen zároveň na morfologické a biochemické studie (Gollmann, 1984; Piálek, 1992; Szymura, 1983; Havelková, 1999; 2002).

Kvantitativní metody klasifikace obou druhů i jejich přechodných forem byly poprvé použity v průzkumu rozšíření kuněk v Polsku (Michalowski, 1958). Potvrzení hybridního původu populací kuněk z míst společného výskytu bylo provedeno analýzou genetické struktury pomocí metod biochemických (Szymura, 1977).

Hybridní zóny jsou ideální pro genetický rozbor fenotypových znaků. Žijí zde blízkce příbuzné druhy, které byly odděleny přirozenou selekcí a mohou nás tak informovat o roli majoritních genů v druhové divergenci. Jaderný genom druhů rodu

Bombina sestává z 12 párů metacentrických či submetacentrických chromozomů (Morescalchi, 1965). Genom kuňky žlutobřiché je asi o 12% větší než kuňky obecné (Olmo et al., 1982). S průměrnou velikostí asi 1010 párů bází je jejich genom jedním z největších mezi druhy žab a výrazně převyšuje předpokládané hodnoty pro další druhy sesterských čeledí Alytidae a Bombinatoridae (Duellmann & Trueb, 1994).

2.3.1 Morfologie

Morfologie sledující kvalitativní znaky zahrnuje pak zejména analýzu rozložení ventrálních skvrn. Ventrální skvrna označuje žlutě až oranžově červenou, ostře ohraničenou plochu na šedočerném až černém pozadí na břišní straně těla včetně končetin (Piálek, 1992).

Propojení skvrn mezi dvěma oblastmi se přiřazuje hodnota 1, zatímco nepřítomnost propojení se hodnotí 0. Protože všechny oblasti kromě břicha a hrdla jsou symetrické, byly hodnoceny pro každou polovinu těla zvlášť a získané hodnoty zprůměrnovány. Kromě toho byl v oblastech, které jsou u kuněk obecných charakteristické větším počtem skvrn (hrdlo, břicho, stehna a holeně) hodnocen také výskyt jedné skvrny jako 1 a výskyt dvou nebo více menších skvrn jako 0.

Znaky nabývající hodnoty 1 (Gollmann, 1981; 1984):

1. Špička prvního prstu přední končetiny je žlutá nebo oranžová a je spojena s palmární skvrnou. Znak je hodnocen pro každou končetinu zvlášť a je vypočítána jeho průměrná hodnota.
2. Palmární skvrna je spojena s ventrální skvrnou na předloktí. Spojení obou částí probíhá přes dorzální část končetiny. Znak je hodnocen pro každou končetinu zvlášť a je vypočítána jeho průměrná hodnota.
3. Ventrální skvrny na předloktí a rameni jsou spojeny. Znak je hodnocen pro každou končetinu zvlášť a je vypočítána jeho průměrná hodnota.
4. Prsní skvrna je spojena s ventrální skvrnou na pažích. Znak je hodnocen pro každou stranu těla zvlášť a je vypočítána jeho průměrná hodnota.
5. Prsní skvrna je spojena se skvrnou na hrdle. Znak je hodnocen pro každou stranu těla zvlášť a je vypočítána jeho průměrná hodnota.
6. Všechny skvrny na hrdle jsou navzájem spojeny.
7. Obě prsní skvrny jsou spojeny.
8. Prsní skvrna je spojena se skvrnou na břichu. Znak je hodnocen pro každou stranu těla zvlášť a je vypočítána jeho průměrná hodnota.
9. Všechny skvrny na břiše jsou spojeny.

10. Tříselná skvrna je spojena se skvrnou na bříše. Znak je hodnocen pro každou stranu těla zvlášť a je vypočítána jeho průměrná hodnota.
11. Tříselné nebo ventrální stehenní skvrny jsou spojeny navzájem přes mediánní rovinu. Sturgen (1959) vymezuje spojení ventrálních skvrn pouze na oblast stehén.
12. Tříselná skvrna je spojena s ventrální skvrnou na stehně. Znak je hodnocen pro každou stranu těla zvlášť a je vypočítána jeho průměrná hodnota.
13. Všechny ventrální skvrny na stehně jsou spojeny. Znak je hodnocen pro každou končetinu zvlášť a je vypočítána jeho průměrná hodnota. Stejný znak hodnotí také Michalowski a Maděj (1969).
14. Ventrální skvrny na stehně a holeni jsou spojeny. Znak je hodnocen pro každou končetinu zvlášť a je vypočítána jeho průměrná hodnota.
15. Všechny ventrální skvrny na holeni jsou spojeny. Znak je hodnocen pro každou končetinu zvlášť a je vypočítána jeho průměrná hodnota.
16. Ventrální skvrna na holeni je spojena se skvrnou na zánártí. Znak je hodnocen pro každou končetinu zvlášť a je vypočítána jeho průměrná hodnota.
17. Ventrální skvrna na zánártí a chodidle (plantární skvrna) jsou navzájem spojeny. Znak je hodnocen pro každou končetinu zvlášť a je vypočítána jeho průměrná hodnota. Spojení obou skvrn probíhá přes dorzální část končetiny. Sturgen (1959) tento znak hodnotí jako dva samostatné.
18. Špička palce je žlutá nebo oranžová a je spojena s plantární skvrnou. Znak je hodnocen pro každou končetinu zvlášť a je vypočítána jeho průměrná hodnota. Stejný znak hodnotí také Michalowski a Maděj (1969).

Piálek (1992) uvádí ještě další morfologické znaky využitelné pro determinaci, mimo jiné barvu břicha a zad, přítomnost a drsnost trnů, rozsah skvrn či zbarvení varlat.

2.3.2 Alozymy

Jak již bylo zmíněno, dosud nejužívanější metodou stanovení druhové příslušnosti v hybridní zóně kuněk byla alozymová analýza. Ke genetické analýze evropských populací rodu *Bombina* pomocí elektroforetického stanovení alozymů se obvykle používá následujících osm enzymů kódovaných deseti lokusy: aspartát aminotransferáza (AAT-1), adenylát kináza (AK), kreatin kináza (CK), glukózofosfát isomeráza (GPI), isocitrát dehydrogenáza (IDH), laktát dehydrogenáza (LDH-1, LDH-2), malát dehydrogenáza (MDH-1, MDH-2) a nukleosidní fosforyláza (NP).

Důvodem jejich výběru bylo, že pro ně platí obecné vlastnosti alozymů použitelných pro elektroforetickou analýzu, kdy jsou odlišné elektromorfy produkty různých alel. Mezi těmito alelami platí vztah kodominance a nejsou v interakci s jinými, které by modifikovaly jejich účinek (Pasteur et al., 1988; Szymura & Farana, 1978; Hofman & Szymura, 2000). Dále proto, že jsou uvnitř kuňky obecné i k. žlutobřiché monomorfní, ale jejich elektromorfy se mezi druhy liší v mobilitě (Szymura, 1983; MacCallum, 1994). Rovněž jsou analyzovatelné z tkáně amputovaných prstů (Gollmann, 1984).

Při studiu alozymové variace byly objeveny jasné geografické trendy v heterozygotnosti (Szymura, 1988; 1993). Konkrétně jsou severní populace obou druhů méně variabilní než jižní populace, což je zřejmě odrazem ztráty alel během rozšiřování obou druhů po posledním zalednění (Szymura et al., 2000). U kuňek žlutobříchých byly zjištěny elektroforetické podskupiny odpovídající rozlišení na poddruhy (Szymura et al., 2000).

2.3.3 Mitochondriální DNA

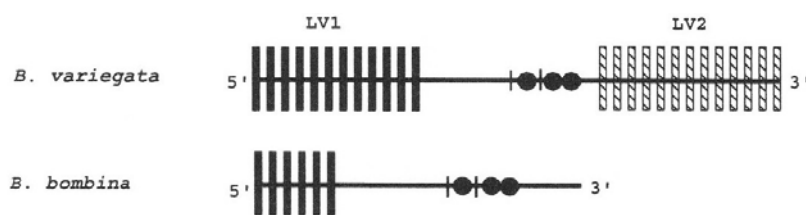
Mitochondriální DNA je modelovou molekulou v evoluční a systematické biologii, i studiích souvisejících s ochranou druhů. Vyznačuje se několika specifickými rysy, jako je vysoká četnost mutací a snížená velikost populace díky matroklinnímu přenosu a dispersi samic (Hofman & Szymura, 2007). U mnoha organismů dochází v případě mtDNA ke snazší introgresi než u jaderných genů. Díky materiální dědičnosti ukazuje hodnotu genetického toku zprostředkovaného samicemi.

Unikátní příležitostí pro studium dynamiky mtDNA jsou právě hybridní zóny mezi geneticky odlišenými populacemi, protože mitochondriální haplotypy se zde nalézají na různém jaderném pozadí v různých typech habitatů (Hofman & Szymura, 2007).

U obou evropských hybridizujících druhů byl popsán kompletní mitochondriální genom, přičemž pořadí genů odpovídá standardnímu pořadí mitochondriálních genů u obratlovců. Pabijan et al. (2008) kvantifikoval rozdíl mezi geomy těchto dvou druhů i mezi jejich funkčními komponenty, včetně přesné organizace kontrolní oblasti (Spolsky et al., 2006) a včetně studia distribuce substitucí v mitochondriálních genomech.

Sekvenční divergence mezi mitochondriální DNA kuňky obecné a žlutobřiché dosahuje hodnoty 8,7% (2,3% rozdíl v aminokyselinách). Kontrolní oblast

mitochondriálního geomu obsahuje dvě opakující se sekvence, LV1 a LV2. Ty jsou přítomné u všech druhů s výjimkou kuňky obecné, u níž došlo ke druhotné ztrátě oblasti LV2 (viz obr.1.).



Obr. 1. Struktura kontrolní oblasti mitochondriální DNA u obou druhů kuněk. Svislé čáry znázorňují tandemové repetice sekvencí LV1 a LV2. Délka oblasti proporcčně odpovídá počtu nukleotidů. Převzato a upraveno z Pabijan et al. (2008)

Výchozí mezidruhové křížení kuněk nejčastěji zahrnovalo samice k. obecných a samce k. žlutobříchých. Tato asymetrie by znamenala produkci nadbytku jedinců F1 generace s haplotypy k. obecné a jadernými geny k. žlutobříché (Hofman & Szymura, 2007). Generační doba kuněk je tři roky a ke kontaktu druhů dochází 17000 let. Paleontologická, elektroforetická i imunologická data určují dobu divergence těchto dvou druhů na 2,5 až 6,8 miliónů let (Szymura, 1983). Vzhledem k průměrnému rozdílu mezi mtDNA kuňky obecné a žlutobříché, který činí asi 7%, se zdá, že se odlišnosti v mitochondriálním genomu těchto druhů vyskytují s četností 1-2,8% za milión let. Což je hodnota srovnatelná se savčím mitochondriálním genomem (Wilson et al., 1985).

2.3.5 Mikrosatelity

Mikrosatelity, neboli krátké variabilní tandemové repetice, jsou krátké úseky DNA s opakující se sekvencí, vyskytující se v nekódujících oblastech. Tvoří je specifická sekvence bází ve formě mono, di, tri či tetranukleotidových opakovaných úseků (Goldstein & Schlötterer, 1999). Mikrosatelity vděčí za svou variabilitu zvýšenému počtu mutací, ve srovnání s ostatními neutrálními oblastmi DNA. Tyto mutace se často vysvětlují jako sklouznutí vláknů při párování bází během replikace na jednom řetězci DNA (Beebee & Rowe, 2004).

Mikrosatelity jsou typicky neutrální či kodominantní. Využívají se jako molekulární markery v genetických, populačních i mnoha jiných studiích. Jako jediný typ markeru poskytují informaci o tom, které alely jsou si blíže příbuzné. U diploidních organismů má každý jedinec dvě kopie veškerých mikrosatelitních segmentů.

Zdá se, že v geonomu kuněk jsou mikrosatelity poměrně vzácné. Vyskytuje se zde ale velký počet opakování CA bází. Četnost těchto CA mikrosatelitů je u kuněk o řád nižší, než třeba u ptáků (1 na 136 kb; Primmer et al., 1997). U lidí je tato četnost ještě mnohem vyšší (1 per 30 kb; Beckmann & Weber, 1992). (CA)_n repetice u obratlovců (Neff & Gross, 2001) vykazují pokles četnosti se zvětšující se velikostí geonomu. Překvapující je u kuněk převaha mikrosatelitů TA/CA, u většiny z těchto mikrosatelitů se na 5' vyskytuje motiv TA (Nürnbergger et al., 2003).

2.3.6 SSCP

Polymorfismus konformace jednořetězcové DNA je metoda umožňující fragmentům DNA amplifikovaným za pomoci specifických primerů při polymerázové řetězové reakci (PCR) vyhledávání variací v sekvenci. V optimálních podmínkách se touto metodou mohou odhalit rozdíly v jediné bázi. Technika SSCP je schopna identifikovat většinu sekvenčních rozdílů na jednořetězcové DNA o délce 150 až 250 nukleotidů (Kalvatchev & Draganov, 2005).

Pokud není jednořetězcová DNA denaturována, zaujme konformaci závislou na sekvenci. Tato konformace se obvykle mění se změnou i pouhé jedné báze. Při navrhování optimální strategie pro SSCP jsou důležité čtyři faktory (Kalvatchev & Draganov, 2005), a to délka PCR fragmentu, vliv teploty při gelové elektroforéze, způsob denaturace při PCR a charakterizace gelu. Ideální délka řetězce pro použití této metody je 150 až 200 nukleotidů. Při takové délce je totiž možno detekovat 70 až 90% substitucí na jediné bázi.

3. Cíle práce

- revize lokalit detekované hybridní zóny kuněk v jižních Čechách
- odchyt, měření, fotografování a odběr vzorků od kuněk nalezených na těchto lokalitách
- druhová determinace jedinců odchycených v hybridní zóně
- vyhodnocení rozšíření druhů v rámci hybridní zóny

4. Materiál a metodika

4.1 Sběr dat

Severní část hybridní zóny se nachází na jižním okraji českobudějovické kotliny v širokém bazénu tvořeném soutokem Vltavy a Malše. Nadmořská výška zde

většinou nepřesahuje 420 m.n.m.. V této oblasti se nachází poměrně hustá síť rybníků a rybníčních náhonů. Jižní část zóny má charakter pahorkatiny. Její nadmořská výška se pohybuje mezi 500 až 700 m n.m. Směrem na západ a sever přibývá lesů a pastvin. Stojaté vody jsou většinou vysychající. V této oblasti vytipovali a zkoumali Horák (1997), Havelková (1999, 2002) a Štefka (2000, 2003) několik konkrétních lokalit, na části z nichž jsem prováděla revizi výskytu a početnosti žab, a to v letech 2009 a 2010 (viz bakalářská práce - Straková, 2010).

V roce 2011 jsem prováděla výzkum pouze na lokalitách, kde jsem v předchozích dvou letech výskyt kuněk potvrdila (konkrétní lokality viz kap. 5. Výsledky) Lokalitu jsem vyfotografovala a poté odchytila nalezené jedince. V případě, že se na místě nacházeli pouze pulci či juvenilní jedinci krátce po metamorfóze, nedokumentovala jsem všechny, ale pouze reprezentativní vzorek (z důvodu velkého počtu, technické obtížnosti a předpokládané uniformity jedinců).

Dále byli chycení jedinci na místě narkotizováni v asi 2% roztoku uspávacího MS 222 (etyléster kyseliny 3-aminobenzoové, SIGMA). Poté jsem všechny vyfotografovala z dorzální i ventrální strany (viz kap. 9. Přílohy). Jednak proto, že jedinečnost ventrálních skvrn umožňuje identifikaci každého jedince, důležitou při zpětných odchycích. Zejména ale z důvodu druhového určení pomocí hybridního indexu. Všechny jedince jsem také změřila a amputovala jim článek prstu na zadní noze (pro případné budoucí genetické určení druhů). Po procitnutí z narkózy byl každý jedinec vypuštěn zpět na místo nálezu (na celou manipulaci i odběr vzorků jsem měla povolení příslušného úřadu).

4.2 Morfologické znaky jedinců

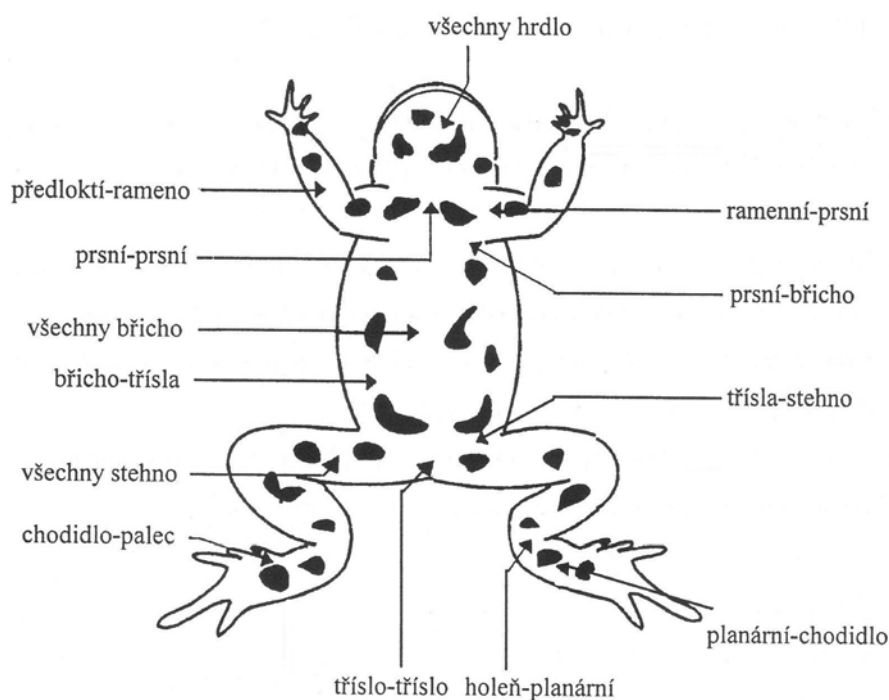
Klasifikace chycených jedinců byla provedena pomocí znaků popisujících distribuci a propojení oranžově až žlutě zbarvených ventrálních skvrn. K hodnocení byla použita metoda Gollmanna (1984), jejíž výhodou je velký počet rovnocenných znaků a poměrně dobrá shoda s genotypem (Piálek, 1992; MacCallum, 1994; Havelková, 1999)

Horák (1997), Štefka (2000) i Havelková (2002) použili 17 z 18 znaků uváděných Piálkem (1992), a to z důvodu nesnadné fotodokumentace a odečtení spojení skvrny špičky prvního prstu přední končetiny s palmární skvrnou. V této práci jsem se rozhodla hodnotit pouze 13 z těchto 17 znaků, a to ty, u kterých Havelková (2002) dokázala průkaznou závislost na genetické frekvenci „variegátní“ alely f_v . Všechny znaky ventrálního zbarvení nebyly totiž stejně informativní, což

Gollmann (1984) odůvodňuje např. větší selekci proti cizím alelám morfologických znaků nebo naopak jejich častější introgresí.

Celkem bylo tedy hodnoceno 13 znaků a jejich součet pro každého jedince je vyjádřen jako hybridní index. Spojení skvrn mezi jednotlivými oblastmi bylo hodnoceno jako 1 (*variegata*), naopak absence spojení jako 0 (*bombina*). U plošně rozsáhlých oblastí (hrdelní, břišní a stehenní) byla navíc přítomnost jediné velké skvrny (spojení menších skvrn) hodnocena jako 1 a přítomnost dvou a více skvrn jako 0.

Horák (1997) a Havelková (2002) potvrdili regresní analýzou hybridního indexu k jednotlivým znakům, resp. frekvenci diagnostické „variegátní alely“ vhodnost postupu hodnocení ventrálních skvrn a použití této metody pro určení druhové příslušnosti.



Obr. 2. Znázornění ventrálních skvrn použitých pro výpočet hybridního indexu. Zde v pozici hodnocené jako 0, tedy bez spojení. (Převzato a upraveno z Piálka, 1992)

4.3 Vyhodnocení dat

K rozlišení jednotlivých lokalit a zařazení jedinců do nich byla využita diskriminační analýza v programu STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., 2011). Nejprve byla na základě hybridního indexu spočtena klasifikační funkce, která pomocí regresní rovnice co nejlépe popíše jedince z dané lokality. Na základě této rovnice jsou pak všichni jedinci znovu zařazováni do lokalit. Výsledkem je procento správně

zpětně klasifikovaných jedinců, čili síla klasifikační funkce. A v případě špatně zařazených jedinců je zjištěno, do které lokality by podle svého hybridního indexu měli patřit. Tím se prokáže podobnost jednotlivých lokalit, případně zpochybní jejich samostatné vymezování a zařadí je pod jinou.

5. Výsledky

5.1 Lokality

V této podkapitole uvádím podrobný popis lokalit, které jsem vybrala ze všech vytipovaných a dříve studovaných na základě potvrzeného recentního výskytu kuněk. Věnuji se tedy vývoji lokalit, které byly po výzkumu v letech 2009 a 2010 zhodnoceny jako nové či stabilní. Tabulka se všemi lokalitami a počty nalezených kuněk a jejich podrobnější popis je uveden v bakalářské práci (Straková, 2010). V příloze (kap. 9.) je fotografická dokumentace uvedených lokalit.

Borek (BOR 97, N 48°53'36,7'', E 14°28'16'') – soustava louží vedle rybníka v kolejích vzniklých pohybem zemědělské techniky. V těchto loužích je ideálně mělká a prosluněná voda. V létě 2009 jsem zde sice žádnou kuňku fyzicky neodchytila, ale slyšela jsem vokalizujícího samce. Proto jsem lokalitu navštívila i v roce 2010, a to v červnu, kdy jsem našla čtyři dospělé jedince a zaznamenala jsem velké množství pulců. V srpnu už byly louže téměř vyschlé a dospělé kuňky i metamorfovaní juvenilní jedinci už zde nebyli. V roce 2011 zde tyto louže nebyly, a tudíž jsem nenalezla ani žáby. Důvodem nebylo vyschnutí louží, ale zřejmě změna osevného plánu. Na poli se vyskytovaly jiné plodiny, které se v tomto roce zřejmě nesklízely a tudíž zde nebyly využity ani zemědělské stroje, které by po sobě louže zanechaly.

Bočkov (BOC, N 48°43'8,90'', E 14°26'9,69'') – jedná se o velkou a poměrně hlubokou louži na okraji louky, která byla nalezena na stejném místě v letech 2009, 2010 i 2011, tudíž během sezóny zřejmě nevysychá (fotografie viz část 9.Přílohy). Leží vedle cesty, na jejíž druhé straně se nachází les. Geograficky je vzdálena asi kilometr od lokality Omlenička. I přesto, že se jedná o jedinou louži, každoročně jsem tu učinila pozitivní nález.

Chuchelec (CHU, N 48°45'35'', E 14°26'58'') – původně tu byl rybník (v roce 2001), ve kterém však kuňky nebyly nalezeny. Zato byly v loužích, které tento rybník obklopovaly. V roce 2009 byla provedena revitalizace nádrže. Louže tím zanikly, ale vznikl rybníček o ploše asi 0,2 ha, který je velmi vhodný pro výskyt obojživelníků (viz

kapitola 9. Přílohy). Je jen málo hluboký a má nízké pozvolně klesající břehy. Zde je číslo uvedené v tabulce počtů z nalezených kuněk roku 2010 pouze orientační. V rybníčku se nacházelo velké množství velmi mladých jedinců krátce po metamorfóze, které by ani nebylo dost dobře možné spočítat. V roce 2011 byla lokalita navštívena v červnu, kdy se zde nacházelo množství pulců a poté v září, kdy už se v nádrži žádní obojživelníci nevyskytovali. Nulový počet odchycených kuněk tedy neodráží skutečný stav.

Kaplice - nádraží (KAP, N 48°46'22'', E 14°27'37'') – původně zde byly louže na cestě podél železniční trati nedaleko nádraží. Tato cesta nyní je vysypána štěrkem a žádné louže na ní tudíž už nejsou. Na jejím konci byl ovšem v roce 2008 postaven pod tratí můstek, kudy je sveden potůček, tvořící malou plošku s téměř stojatou vodou. První návštěva této renovované lokality se odehrála v roce 2010 a tehdy i v roce 2011 zde byly kuňky opakovaně nalezeny.

Kaplice (KAP 2, N 48°46'11'', E 14°27'39'') – se nachází v poli asi 300 metrů od předešlé lokality Kaplice nádraží. Je to soustava louží vzniklých po projíždění zemědělských strojů. K nálezu kuněk zde došlo v roce 2010, kdy byla lokalita objevena, ale v roce 2011 byly louže vyschlé.

Omlenička (OML, N 48°43'51'', E 14°26'02'') – je lokalita se stabilním výskytem kuněk. Je zde v řadě za sebou několik rybníků, vedle nich polní cesta s mnoha loužemi po stojích těžké techniky, které pracují v lese přiléhajícím k cestě. V roce 2002 byly kuňky v těchto loužích nalezeny a stejně tak i v roce 2010. V roce 2009 jsem učinila nálezy v místě nového ještě nenapuštěného rybníka, na jehož dně stály malé bahnitě tůně. Kuňky se zde tedy dlouhodobě vyskytují, ale v závislosti na podmínkách prostředí se přesunují mezi mnoha vodními plochami. Počet kuněk nalezených v roce 2011 není absolutním číslem, lokalita byla navštívena víckrát a kuňky nebyly odchyceny úplně všechny.

Vzhledem k tomu, že lokalita je mimořádně rozlehlá, určily jsme si v roce 2010 v jejím rámci ještě sublokalitu OML 2. Jedná se o louži, která je na nejvzdálenějším okraji lokality a od přední části, vzdálené asi 200 metrů, je oddělena zarostlou polní cestou. V letošní sezóně jsem rovněž našla několik jedinců.

Třebín (TRE), N 48°58'06'', E 14°23'25'') – byl v roce 2001 příkop u silnice naplněný vodou u Městského rybníku na okraji vesnice. V roce 2009 byl příkop velmi zarostlý a kuňku jsem tam nalezla pouze jedinou, i když jsem zahlédla ještě jednu, kterou se ale nepodařilo odchytit. V sezóně 2010 už byl příkop zcela zarostlý a k výskytu žab už zde nedocházelo. Lokalitu lze tedy vyhodnotit jako zaniklou.

Třebín nová (TRE 09, N 48°57'49'', E 14°23'15'') – jedná se o nově nalezenou lokalitu blízko výše zmíněného Městského rybníka. Konkrétně jde o několik louží vzniklých pohybem těžkých strojů a skladováním stavebního materiálu v oblasti výstavby nových rodinných domů. V roce 2009 jsem zde objevila jen několik dospělců, ale v roce 2010 už tady byly počty kuněk o mnoho vyšší. Při první návštěvě se jednalo o několik adultních jedinců a velké množství pulců. Početní údaj 31 uvedený níže v tabulce je opět pouze orientační. Získala jsem ho při druhé návštěvě, kdy byly louže plné juvenilních jedinců krátce po metamorfóze. Pro dokumentaci a vzorek tkáně jsem jich tedy nachytala 31, ale ve skutečnosti byl počet velmi obtížně spočitatelný. Zajímavostí je, že se louže postupně posunují od dostavěného domu k vedlejšímu, který je nově ve výstavbě.

V sezóně 2011 už byla výstavba podél cesty dokončena, ale u jednoho z hotových domů byla vykopána trvalá odvodňovací strouha, kam se kuňky z louží očividně přesunuly. Zaznamenaný počet 9 kuněk je opět pouze orientační, neboť strouha byla plná juvenilních i adultních jedinců, které by šlo jen obtížně kvantifikovat.

Vitín (VIT, N 48°59'02'', E 14°22'47'') – se nachází nedaleko Třebína (asi 1 km). Leží zde rybník, který je ale zarostlý a vyskytují se zde ryby a kachny. V něm jsem žádnou kuňku nenalezla. Našla jsem ale několik jedinců v louži pod hrází, a to ve více sezónách.

Lokalita/Rok	2009	2010	2011
BOR 97	0*	4	0
BOC	2	1	1
CHU	-	15*	0*
KAP	-	15	7
KAP 2	-	6	0
OML	22	13	32*
OML 2	-	7	5
TRE	1*	0	-
TRE 09	9	31*	9*
VIT	5	0	1

Tab.1. Počty kuněk (bez druhového určení), které jsem našla a odchytila na jednotlivých lokalitách během tří sezón. Číslo označené symbolem * nevyjadřuje absolutní počet a je vysvětleno u popisu hodnocení každé lokality. Proškrtnuté pole značí, že v příslušném roce nebyla lokalita navštívena.

5.2 Hybridní index

Z fotografické dokumentace odchycených kuněk jsem pro všechny jedince spočítala hybridní index, který mohl nabývat hodnot od 0 do 13. Aproximací morfologických dat daných hybridním indexem a druhové příslušnosti analýzou alozymů provedených Havelkovou (1999, 2002) jsem určila orientační hodnoty pro přiřazení jedinců i populací na lokalitách ke druhu kuňka obecná (hodnoty 0-3,5), kuňka žlutobřichá (hodnoty 9-13) či mezi hybridy (<3,5 a >9). Tabulka s hodnotou hybridního indexu každého jednotlivce viz kapitola 9. (Přílohy, tab. 6.)

Lokalita/Rok	2009	2010	2011	celkem
TRE	0,5	-	-	0,5
TRE 09	1,33	3,42	2,3	2,95
VIT	2,2	-	-	2,2
OML	9,45	7,95	-	8,98
OML 2	-	8,5	8,7	8,58
BOC	11,25	9,5	12	11
BOR 97	-	6,875	-	6,875
KAP	-	10,56	8,64	9,95
KAP 2	-	11,25	-	11,25
CHU	-	11,03	-	11,03

Tab. 2. Průměrné hodnoty hybridního indexu na jednotlivých lokalitách v každé sezóně a celkově za 3 roky sledování. Proškrtnutá pole značí, že lokalita nebyla navštívena či jsem zde nenašla žádný exemplář kuňky.

Pomocí regresní rovnice získané klasifikační funkcí z hodnot hybridního indexu jsem získala procento správně klasifikovaných jedinců. Hodnota percent říká, jak lze jedince z jedné lokality odlišit od těch z jiných lokalit. Pokud je tato hodnota nulová a tudíž exempláře na lokalitě nemají specifický pattern, analýza je zařadila na lokalitu jinou, které svým hybridním indexem nejvíce odpovídají. Často jsou dokonce jedinci nalezení na jedné lokalitě dle hodnoty hybridního indexu přiřazeni na několik různých lokalit.

Lokalita TRE byla ze statistického hodnocení vyňata, jelikož byla vyhodnocena jako zaniklá. V roce 2009 na ní byl nalezen jediný jedinec a nacházela se velmi blízko lokalitě TRE 09, a tudíž nevykazuje variabilitu ani průkaznost.

	Percent	TRE 09	VIT	OML	BOC	BOR 97	KAP	KAP 2	CHU	OML 2
TRE 09	94,11765	48	0	3	0	0	0	0	0	0
VIT	0,00000	5	0	0	0	0	0	0	0	0
OML	74,28571	3	0	26	0	0	4	0	2	0
BOC	0,00000	0	0	2	0	0	0	0	2	0
BOR 97	0,00000	1	0	3	0	0	0	0	0	0
KAP	45,45454	1	0	7	0	0	10	0	4	0
KAP 2	0,00000	0	0	1	0	0	2	0	3	0
CHU	40,00000	0	0	2	0	0	7	0	6	0
OML 2	0,00000	0	0	11	0	0	0	0	1	0
Total	58,44156	58	0	55	0	0	23	0	18	0

Tab. 3. Procento správně zařazených jedinců. Ukazuje, kolik jedinců bylo dle hodnoty hybridního indexu zařazeno na lokalitu nálezů a kolik spadá na lokalitu jinou.

Tabulka znázorňující jednotlivé jedince, tedy do které lokality skutečně patří a do které lokality dle hodnoty hybridního indexu nejvhodněji zapadají, a to ve vztahu ke všem lokalitám, se nachází v Příloze (kap. 9., Tab.7.). Taková analýza ukazuje, jak je signál stabilní a jestli mezi skupinami je či není rozdíl.

Dále jsem testovala statisticky průkazné rozdíly mezi lokalitami. F test je hodnota testového kritéria, ze které se pak odvozuje hodnota průkaznosti p. Vzdálenosti mezi skupinami, tedy směr odlišnosti, ukazují Mahalanobisovy vzdálenosti.

OML 2									
CHU									15,4111
KAP 2								0,0775	10,9544
KAP						3,0469	3,9974		5,6225
BOR 97					12,36159	17,69128	21,02946		3,37177
BOC					13,10599	0,05777	0,00135		6,74756
OML				6,4330	5,3536	6,4295	11,4296	19,4025	0,2318
VIT			74,3498	66,2742	18,7044	94,3482	86,0236	112,6866	55,3846
TRE 09		0,5788	294,3558	96,6458	24,0177	305,1512	148,5143	304,4709	126,2348
	TRE 09	VIT	OML	BOC	BOR 97	KAP	KAP 2	CHU	OML 2

Tab. 4. Průkazné rozdíly mezi lokalitami, kde hodnoty vyjadřují F, tedy hodnotu testového kritéria.

OML 2									
CHU									0,000133
KAP 2								0,781136	0,001178
KAP						0,083012	0,047439		0,019046
BOR 97					0,000585	0,000045	0,000010		0,068370
BOC				0,000406	0,234587	0,810400	0,970727		0,010356
OML				0,012261	0,022085	0,012284	0,000929	0,000020	0,630924
VIT			0,000000	0,000000	0,000028	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
TRE 09		0,448013	0,000000	0,000000	0,000003	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
	TRE 09								
		VIT							
			OML						
				BOC					
					BOR 97				
						KAP			
							KAP 2		
								CHU	
									OML 2

Tab. 5. Hodnoty průkaznosti rozdílů mezi lokalitami, kdy hraniční hodnota $p=0,05$

6. Diskuse

6.1 Stav lokalit a počet kuněk

Zabývala jsem se sledováním 10 lokalit, na kterých došlo v letech 2009 až 2011 k výskytu některého z našich druhů kuněk. Jediná z nich, a to lokalita Třebín (TRE) se dá považovat za zaniklou, což potvrzuje předpoklad zmíněný v bakalářské práci (Straková, 2010). Všechny ostatní lze zatím považovat za stabilní. I když lokalita Borek (BOR 97) se ukázala být závislá na zvoleném způsobu hospodářského využití pole. Podmínky pro výskyt kuněk zde byly vcelku ideální, včetně blízkosti rybníka pro případ vyschnutí louží. Počet odchycených jedinců zde sice v době mé návštěvy nebyl nikdy vysoký, ale vzhledem k přítomnosti mnoha pulců se dá hromadnější výskyt úspěšně předpokládat. Lokalita Omlenička (OML, OML 2) je dlouhodobě nejstabilnější ze všech studovaných, protože výskyt kuněk je konstantní i za sezónně se měnících klimatických podmínek.

Poměrně významná změna na místě lokality Kaplice nádraží (KAP) se nezdá, mít pro kuňky žádné negativní důsledky a žáby se zde opakovaně vyskytují, i když v nevelkém počtu, což není, vzhledem k malému rozsahu plochy, nijak překvapivé. Velká změna habitatu proběhla i v Chuchelci (CHU). A ani zde by neměla mít na výskyt kuněk negativní vliv. Majitel rybníčku sice plánuje umístit do něj ryby, ale údajně pouze v malém počtu, který by neměl obojživelníky ohrozit. Pro potvrzení či vyvrácení tohoto očekávání by samozřejmě bylo třeba oblast dále sledovat.

Lokalita Třebín nová (TRE 09) byla objevena teprve v roce 2009, ale moje sledování naznačuje, že je stabilní a počet kuněk zde je jeden ze dvou nejvyšších zaznamenaných v průběhu studie zahrnující tři sezóny. Habitatové podmínky působily rozpaky, neboť šlo prakticky o staveniště s rozbahněnými loužemi, ve kterých jsou plastové plachty, dřevěné palety a různý stavební materiál (viz kapitola 9. Přílohy). Rozhodně to tedy nevypadá jako ideální místo pro výskyt citlivého až bioindikátorového druhu. Z hlediska výskytu obojživelníků bývají takové zástavby v krajině obecně považovány za škodlivé (Piálek, 1992; Vojar, 2007). Leč opakované nálezy kuněk z tohoto místa, a to v nemalém množství, takové přesvědčení vyvracejí.

Zároveň ale typ lokality vyvolával otázku, co nastane, až bude výstavba dokončena, což nastalo právě v sezóně 2011. Cesta, podél které se nové domy stavěly, už byla kompletně zastavěna. Ale přítomnost rybníka na druhé straně této cesty a umístění domů na bývalém poli vyvolalo nutnost vytvoření odvodňovací strouhy, aby se zabránilo podmáčení staveb. Tato strouha byla v letošní sezóně

kuňkami hojně obydlena a měla by být trvalým prostorem pro jejich výskyt. Rovněž proto, že je dost hluboká a neměla by tedy vysychat.

Samotný počet kuněk na lokalitách nevykazuje proti očekávání klesající tendenci. I když v sezóně 2011 nebyly, kromě dvou výše zmíněných případů (OML a TRE 09) nálezy příliš vysoké. To odpovídá suchému počasí, kdy byla hladina většiny louží výrazně snížena. Snižování počtu výskytu kuněk s dlouhodobějším trendem je vždy dané negativní změnou habitatu. To podporuje tezi formulovanou Vojařem (2007), že je ochrana ohrožených druhů často nelogicky zaměřena na jedince a ne na jejich biotopy. Přitom podmínky biotopu jsou určující pro výskyt všech obojživelníků.

Jako jeden z faktorů rozlišující kuňku obecnou od kuňky žlutobřiché bývá uváděna velikost preferovaných vodních ploch. Piálek (1992) to ve své práci zpochybňuje, podle něj jsou kuňky obecné na jaře pozorovány v malých loužích na podmáčených loukách. Barton (in verb ex Piálek, 1992) zase v Chorvatsku zaznamenal kuňky žlutobřiché ve velkých nádržích, typických pro kuňky obecné. Moje výzkumy tuto pochybnost prohlubují. Konkrétně jde o místa nálezů kuněk obecných, pro které mají být typické permanentní větší nádrže, nejčastěji rybníky (Zwach, 2009).

Během tří sezón se mi nepodařil žádný kuňky obecné v rybníce (ani jsem nezaznamela vokalizaci, jež by jejich přítomnost naznačovala), nýbrž jen v loužích či strouhách, což tedy v typickém habitatu kuňky žlutobřiché (Baruš & Oliva, 1992), i když se zmíněné vodní plochy obvykle nacházely v blízkosti velkého rybníka. Všechny tyto rybníky měly totiž zarostlé a zastíněné břehy, vykazovaly eutrofizaci a znečištění. Navíc se na nich obvykle vyskytovaly kachny či byly osazeny rybami. Zdá se tedy, že kuňky preferují drobné vodní plochy s vhodnějšími břehy a bez predačního tlaku a do rybníků se uchylují pouze, pokud by došlo k vyschnutí těchto menších nádržek.

Na lokalitách nelze zaznamenat žádnou péči o habitat, snad kromě Chuchelce (CHU), kde byla revitalizace rybníčku finančně podpořena z Evropské unie. Často má pouhé zarůstání vodní plochy za následek zaniknutí stanoviště. To je totiž podle mých sledování nejčastější příčina úbytku kuněk. Druhým nejčastějším problémem je osazení nádrže rybami a výskyt vodního ptactva, což na kuňky působí přímo predací anebo nepřímo znečištěním vody. Všechny tyto příčiny jsou v souladu s obecně známými trendy (Gollmann et al., 1997; Vojař, 2007).

6.2 Druhové rozložení hybridní zóny

Největší význam pro odlišení jednotlivých populací mají znaky z oblasti hrdla, břicha, třísel a stehen, což je v souladu s dřívějšími poznatky (Gollmann, 1984; Horák, 1997; Havelková, 2002). Ze 13 znaků ventrálních skvrn, které jsem analyzovala, se jako nejméně informativní jeví spojení skvrn předloktí a ramene. Ze 155 analyzovaných jedinců neměl žádný absenci tohoto spojení na obou končetinách (tedy stav 0, směřující k čistokrevné kuňce obecné) a pouze 4 chybělo toto spojení alespoň na jedné z nich.

Nižší variabilita a tudíž informativnost znaku byla do jisté míry potvrzena Havelkovou (2002), kde jí sice pomocí regresního koeficientu morfologických znaků a frekvence „variegátní“ alely f_v vyšel tento znak průkazný, ale s druhou nejnižší hodnotou. Jako znak průkazný se zcela nejnižší hodnotou v práci Havelkové (2002) vyšlo spojení skvrny holení a planární. Tento znak se v mé analýze jeví jako druhý nejméně proměnlivý mezi jedinci z odlišných lokalit.

Piálek (1992) ve své studii shromáždil data z 2682 nálezů kuněk. 1789 z nich bylo určeno jako kuňka obecná, 810 jako kuňka žlutobřichá a 83 jako hybridní jedinci. Mnou provedené odchvy 155 jedinců rodu *Bombina* vykazují převahu zástupců kuňky žlutobřiché (69, kuňka obecná 44 a 42 hybridů), což je v rozporu s obecně platnou informací, že v České republice je početnějším druhem kuňka obecná (Piálek, 1992). Tento rozpor však může být snadno vysvětlen jako artefakt vzniklý při výběru lokalit a sběru dat. Typicky „variegátní“ lokalita Omlenička (OML) byla totiž z důvodu podrobnějšího průzkumu navštěvována častěji a vždy byli odchyceni pokud možno všichni jedinci. Zatímco typicky „bobinová“ lokalita Třebín nová (TRE 09) byla navštěvována méně často a při velkém množství jedinců nebyli odchyceni a hodnoceni všichni (z důvodu juvenililty či časové a technické náročnosti, a v neposlední řadě i zbytečnému stresování žab, u kterých byla předpokládána druhová uniformita).

Do určité míry to ale pomáhá vysvětlit závěr vyslovený Piálkem (1992), že na rozdíl od obvykle čistokrevných okrajových populací kuněk žlutobřichých, u populací k. obecných se vyskytuje jistý podíl cizích alel, z čehož se dá usuzovat na průnik těchto alel hlouběji do areálu druhého druhu. To je v souladu s poznatkem, že genová introgrese může zasahovat do vzdálenosti 260 až 280 km (Szymura & Barton, 1991). Příčinou druhové disproporce by mohla být např. větší mobilita jedinců kuňky žlutobřiché během rozmnožovací sezóny, zejména samců (Michalowski, 1964).

Štefka (2003) poukazuje na fakt, že rozlišení jedinců na základě morfologických znaků nemusí být vždy zcela spolehlivé. Zejména u kuňky obecné existuje v utváření ventrálních skvrn velká variabilita, jejíž vnitrodruhová velikost je srovnatelná s velikostí na úrovni jediné populace (Gollmann et al., 1993). Může tedy poměrně snadno dojít k záměně za hybridní jedince.

Dle celkové průměrné hodnoty hybridního indexu (viz kap. 5.2, Tab.2.) pro populace lze za příslušné ke kuňce obecné považovat populace z TRE (i když zde šlo vlastně o jediný exemplář), TRE 09 a VIT. Výskyt typicky hybridní populace jsem zaznamenala pouze na lokalitě BOR 97. OML a OML 2 dosahují hodnoty hraničící mezi populací hybridní a náležící ke kuňce žlutobřiché. Již bez pochyb se jako populace kuňky žlutobřiché dají označit ty, vyskytující se na lokalitách KAP, KAP 2, BOC a CHU.

Porovnáním těchto závěrů s těmi učiněnými Havelkovou (2002), i když společné hodnocení se týká pouze 6 z nich, dochází ke shodě v případě TRE, OML, CHU a KAP. Lokalita Borek (BOR 97) indikuje posun od hranice čistokrevné kuňky obecné hlouběji do hybridních hodnot, což ale může být způsobeno nízkým N v mojí analýze. Bočkov (BOC), který podle mé analýzy vychází poměrně jistě jako místo výskytu čistokrevných kuněk žlutobříchých, dosahuje u Havelkové (2002) hodnot hybridních, i když blíže kuňce žlutobřiché, než kuňce obecné.

Významnější rozdíl v hybridním indexu mezi sezónami jsem zaznamenala na lokalitě TRE 09, kdy v roce 2010 byla hodnota vyšší, než v letech ostatních. Možným vysvětlením může být to, že jsem analyzovala jedince juvenilní, kdy hranice ventrálních skvrn ještě nemusely být zcela vytvořeny. V Bočkově je mezi sezónami 2010 a 2011 také patrný rozdíl, ale opět zde může hrát roli to, že šlo v obou případech o jediný exemplář a tudíž v průměru nebyla žádná variabilita. Příčina rozdílu zaznamenaného ve stejných sezónách v Kaplici nádraží (KAP) není zcela jasná.

Podle statistického hodnocení průkaznosti specifity lokalit založené na diskriminační analýze hybridního indexu je nejjednoznačnější lokalitou Třebín nová (TRE 09), i když několik jedinců analýza vyčlenila do lokality OML, což odpovídá tomu, že tito jedinci měli hodnotu HI nečekaně vysokou. Naopak všichni jedinci nalezení ve Vitíně (VIT) spadají pod TRE 09, a lokalita VIT nemá statisticky průkazný specifický pattern a tudíž není smysluplná.

Druhá nejprůkaznější lokalita se nachází v Omleničce (OML). Několik jedinců bylo zařazeno ke KAP a několik k TRE 09 (měli naopak neobvykle nízkou hodnotu HI). Podle očekávání byla OML 2 ohodnocena jako statisticky neprůkazná, kdy 1 exemplář spadá pod CHU a všichni ostatní do OML.

Lokalita Bočkov (BOC) byla rovněž vyhodnocena jako neprůkazná a jedinci zde nalezení byli rovnoměrně rozděleni do OML a CHU. Třetí nejprůkaznější lokalitou se ukázala být Kaplice nádraží (KAP). 1 exemplář, zařazený do TRE 09, měl HI 4,5. Několik dalších z KAP bylo přiřazeno k OML a CHU. KAP 2 je další neprůkaznou lokalitou a její zástupci byli přiřazeni ke KAP, OML a CHU. Sama lokalita Chuchelec je čtvrtou průkazně samostatnou lokalitou, i když několik zdejších exemplářů bylo zařazeno k OML a KAP.

Lokalitu Borek (BOR 97) jsem podle průměrného HI vyhodnotila jako hybridní, i když tento průměr vznikl součtem hodnot blízkých hranicím oběma rodičovským druhům. Statisticky byla pak tato lokalita vyšla neprůkazně a jedinci zde chycení byli přiřazeni k lokalitám představujícím výskyt rodičovských druhů, tedy TRE 09 a OML.

Statistická neprůkaznost většiny lokalit není zvlášť překvapivá, obvykle se tyto nacházejí velmi blízko těch průkazných (někdy dokonce na dohled) a tudíž se dá usuzovat na stejné, či přinejmenším blízké zdrojové populace. Tyto neprůkazné populace jsou většinou pouze technickým odlišením jednotlivých lokalit v oblasti, která je geograficky malá, leč pro výzkum zase rozlehlá. Bylo tedy vhodné jí rozdělit do několika lokalit, aniž by to ale předpokládalo druhové rozdíly mezi nalezenými exempláři. Přiřazení jedinců dle specifického patternu tvořeného hybridním indexem z místa nálezu k lokalitě jiné vždy odpovídalo geografické blízkosti a kromě BOR 97 i blízkosti průměrné hodnoty HI.

Rovněž výše uvedené ohodnocení lokalit na hybridní či příslušné k rodičovskému druhu kuňce obecné či kuňce žlutobřiché sleduje geografický gradient umístění lokalit (viz kap. 9.1 Mapy lokalit), kdy poblíž Českých Budějovic se nalézají kuňky obecné, směrem na jih hybridní populace a v jižní části zóny v okolí Omlenice a Kaplice kuňky žlutobřiché. Toto rozložení je ve shodě s předchozími studii hybridní zóny (Horák, 1997; Havelková, 1999, 2002; Štefka, 2000, 2003)

7. Závěr

- navštívila jsem 10 lokalit mezi Českými Budějovicemi a Kaplicí, na kterých byl v předchozích letech potvrzen výskyt některého z našich druhů kuněk
- zjistila jsem počty kuněk, které se na těchto lokalitách nacházely (kromě několika výjimek šlo o počet všech jedinců, které se podařilo nalézt)
- nalezené exempláře jsem odchytila, změřila a následně jsem žáby i lokality vyfotografovala
- odebrala jsem vzorky tkáně a uchovala je pro případné genetické zpracování
- popsala jsem stav daných lokalit
- na základě ventrálních skvrn odečtených z fotografií jsem pro každého jedince spočítala hybridní index
- ze 155 jedinců odchycených během let 2009-2011 se dá 44 považovat za čistokrevné kuňky obecné, 69 za kuňky žlutobřiché a 42 za hybridní
- provedla jsem statistické zhodnocení lokalit dle hodnoty hybridního indexu kuněk, které se zde vyskytovaly
- z 10 lokalit patří 3 k druhu kuňky obecné (TRE, TRE 09 a VIT), 1 je prokazatelně hybridní (BOR 97), 2 na pomezí hybridní u kuňky žlutobřiché (OML, OML 2) a 4 patří ke k. žlutobřiché (BOC, KAP, KAP 2 a CHU)
- průkaznost lokalit dle hybridního indexu odpovídá poloze na geografickém gradientu zóny a průměrným hodnotám HI
- jako průkazně samostatné lokality byly statisticky vyhodnoceny TRE 09, OML, KAP a CHU, naopak neprůkazné jsou lokality VIT, BOC, BOR 97, KAP 2 a OML 2

8. Použitá literatura

- ANDERSON, E. (1953). Introgressive hybridization. *Biological Review*, 28:280-307
- ANDERSON, E., HUBRICHT, L. (1938). Hybridization in *Tradescantia* III. The evidence for introgressive hybridization. *American Journal of Botany*, 25:396-402
- ARNOLD, M.L., 1997. Natural hybridization and evolution. New York, Oxford University Press
- ARNTZEN, J.W. (1978). Some hypotheses on postglacial migrations of the firebellied toad, *Bombina bombina* (Linnaeus) and the yellow-bellied toad, *Bombina variegata* (Linnaeus). *Journal of Biogeography*, 5:339-345
- BARTON, N.H. (2001). The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*, 10:551-568
- BARTON, N.H., GALE, K.S. (1993). Genetic analysis of hybrid zones. *Heredity*, 43:341-359
- BARTON, N.H., HEWITT, G.M. (1985). Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:113–148.
- BARTON, N.H., HEWITT, G.M. (1989). Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, 341:497–503
- BARUŠ, V., OLIVA, O. (1992): Fauna ČSFR. Obojživelníci. ACADEMIA. Praha
- BECKMANN, J.S., WEBER, J.L. (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, 12: 627–631
- BEEBEE, T.J.C., ROWE, G. (2004). An introduction to molecular ecology. Oxford University Press, New York
- BRANDON, R.A. (1977). Interspecific hybridization among Mexican and United States salamanders of the genus *Ambystoma* under laboratory conditions. *Herpetologica*, 33:133-152

- DUELLMANN, W.E., TRUEB, L. (1994). *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press: Baltimore, 31
- DOBZHANSKY, T. (1937). *Genetics and the origin of species*. New York: Columbia University Press
- DOWLING, T.E., SECOR, C.L. (1997). The role hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annual Review Ecology and Systematics*, 28:593-619
- ENDLER, J.A. (1977). *Geographic variation, speciation and clines*. Princeton NJ: Princeton University Press
- GOLDSTEIN, D.B., SCHLÖTTERER, C. (1999). *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford
- GOLLMANN, G. (1981). Zur hybridisierung der einheimischen Unken (*Bombina bombina* (L) und *Bombina variegata* (L), Anura, Discoglossidae). Dissertation. Univ. Wien:84 pp
- GOLLMANN, G. (1984). Allozymic and morphological variation in the hybrid zone between *Bombina bombina* and *Bombina variegata* (Anura, Discoglossidae) in north-eastern Austria. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 22(1):51-64
- GOLLMAN, G. (1987). *Bombina bombina* and *Bombina variegata* in the Mátra mountains (Hungary): new data on dostrubution and hybridization (Amphibia: Anura: Discoglossidae). *Amphibia-Reptilia*, 8:213-224
- GOLLMAN, G. (1996). Structure and dynamics of a hybrid zone in *Bombina* (Amphibia: Anura: Discoglossidae). *Izrael Journal of Zoology*, 42(2):121-133
- GOLLMANN, G., SZYMURA, J.M. (1986). Geographische variabilität der hybridzone zwischen Rotbauch- und Gelbbauchunke. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*, 79:171-172
- GOLLMANN, G., ROTH, P., HÖDL, W. (1988). Hybridization between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *Bombina variegata* in the karst regione of Slovakia and

Hungary: morphological and allozyme evidence. *Journal of Evolutionary Biology*, 1(1):3-14

GOLLMANN, G., BORKIN, L.J., ROTH, P. (1993). Genic and morphological variation in the fire-bellied toad, *Bombina bombina* (Anura: Discoglossidae). *Zoologische Jahrbuecher Systematik*, 120:129–136

HARRISON, R.G. (1990). Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7: 69-128

HARRISON, R.G. (1993). Hybrids and hybrid zones: historical perspective. In: Harrison, R.G. (ed): Hybrid zones and the evolutionary process. NY: Oxford University Press, New York, pp 3-12

HAVELKOVÁ, P. (1999). Genetická analýza hybridní zóny kuňky obecné (*Bombina bombina*) a kuňky žlutobřiché (*Bombina variegata*) v Předšumaví. [Bakalářská práce], 19 pp., Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, katedra zoologie

HAVELKOVÁ, P. (2002). Genetická analýza hybridní zóny mezi *Bombina bombina* a *Bombina variegata* v Předšumaví. [Diplomová práce], 27 pp., Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, katedra zoologie

HEWITT, G.M. (1988). Hybrid zones – natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology and Evolution*, 3:158–167.

HOFMAN, S., SZYMURA, J.M. (2000). Inheritance of allozyme loci in *Bombina*: second linkage group established. *Biochemical Genetics*, 38(7-8):267-274

HOFMAN, S., SZYMURA, J.M., 2007. Limited mitochondrial DNA introgression in a *Bombina* hybrid zone. *Biological Journal of the Linnean Society*, 91:295–306

HORÁK, A. (1997). Hybridizace mezi kuňkou obecnou (*Bombina bombina*) a kuňkou žlutobřichou (*Bombina variegata*) v Předšumaví. [Bakalářská práce], 22 pp., Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, katedra zoologie

HOWARD, D.J. (1993). Reinforcement: origins, dynamics and fate of an evolutionary hypothesis. In Harrison, R.G. (ed.): Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press, pp 46-69

HUBBS, C.L. (1955). Hybridization between fish species in nature. *Systematic Zoology*, 4: 1-20

KALVATCHEV, Z., DRAGANOV, P. (2005). Single-strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis: A rapid and sensitive method for detection of genetic diversity among virus population. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19(3)

KRUUK, L.E.B., GILCHRIST, J.S., BARTON, N.H. (1999). Hybrid dysfunction in fire-bellied toads (*Bombina*). *Evolution*, 53:1611–1616.

LÁC, J. (1961). Rozšírenie kuncov na Slovensku a problematike ich vzájomného kríženia. *Biologické práce*, 7(3):1-32

LIOU, L.W., PRICE, T.D. (1994). Speciation by reinforcement of premating isolation. *Evolution*, 48:1451-1459

MACCALLUM, C.J. (1994). Adaptation and habitat preference in the hybrid zone between *Bombina bombina* and *Bombina variegata* in Croatia. PhD. Thesis, University of Edinburgh

MACCALLUM, C., NÜRNBERGER, B., BARTON, N.H., SZYMURA, J.M. (1998). Habitat preference in a *Bombina* hybrid zone in Croatia. *Evolution*, 52(1):227-239

MADĚJ, Z. (1964). Studies on the fire-bellied toad (*Bombina bombina*) and yellow-bellied toad (*Bombina variegata*) of Upper Silesia and Moravian Gate. *Acta Zoologica cracoviensia*, 9 (3):291-336

MADĚJ, Z. (1966). Kumaki (*Bombina* Oken, 1816) Beskidu Niskiego i terenów przyległych. *Acta Zoologica cracoviensia*, 11(10):335-350

MADĚJ, Z. (1967). Zmienosc kumaka nizinnego (*Bombina bombina* Linnæus, 1761) na Pojezierzu Suwalskim. *Acta Zoologica cracoviensia*, 12(12):345-368

MAYR, E. (1942). Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York

MAYR, E. (1963). Animal species and Evolution. Cambridge, Mass: Harvard University Press

MICHALOWSKI, J. (1961). Studies on species characters in *Bombina bombina* (L) and *Bombina variegata* (L): I. Applying the L:T indicator to the classifying purposes. *Acta Zoologica cracoviensia*, 6(3):51-59

MICHALOWSKI, J. (1964). Isolationmechanismen und Bastardierungsmöglichkeiten bei den Amphibien. *Biologisches Zentralblatt*, 83:561-585

MICHALOWSKI, J., MADĚJ, Z. (1969). Studies on the relationships of *Bombina bombina* (Linnaeus) and *Bombina variegata* (Linnaeus). III. Taxonomic characters in both species from laboratory and in interspecific hybrids. *Acta Zoologica cracoviensia*, 14(9):173-203

MORESCALCHI, A. (1965). Osservazioni sulla cariologia di *Bombina*. *Bollettino di Zoologia*, 32:07–219

NEFF, B.D., GROSS, M.R. (2001). Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*, 55:1717–1733

NÜRNBERGER, B., HOFMAN, S., FÖRG-BREY, G., PRAETZEL, G., MACLEAN, A., SZYMURA, J. M., ABBOTT, C.M., BARTON, N.H. (2003). A linkage map for the hybridising toads *Bombina bombina* and *B. variegata* (Anura: Discoglossidae). *Heredity*, 91:136–142.

OLMO, E., MORESCALCHI, A., STINGO, V., ODIERNA, G. (1982). Genome characteristics and the systematics of Discoglossidae (Amphibia, Salientia). *Monitore Zoologico Italiani*, 16:283–299.

PABIJAN, M., SPOLSKY, CH., UZZELL, T., SZYMURA, J.M. (2008). Comparative Analysis of Mitochondrial Genomes in *Bombina* (Anura; Bombinatoridae). *Journal of Molecular Evolution*, 67:246–256

PASTEUR, N., PASTEUR, G., BONHOME, F., CATALAN, J., BRITTON-DAVIDIAN, J. (1988). Practical isosyme genetics. Ellis Horwood Limited, Chichester: 215 pp

PATERSON, H.E.H. (1985). The recognition concept of species. In E. Vrba (ed): Species and speciation. Transvaal Museum. Pretoria: 21-28

PIÁLEK, J. (1992). Revize rodu *Bombina* v Československu. [Kandidátská disertační práce]. Ústav systematické a ekologické biologie ČSAV v Brně

PRIMMER, C.R., RAUDSEPP, B.P., MOLLER, A.P., ELLEGREN, H. (1997). Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research*, 7:471–482

NIXON, K.C., WHEELER, Q.D. (1990). An amplification of the phylogenetic species koncept. *Cladistic*, 6:211-223

RAND, D.M., HARRISON, R.D.(1989). Ecological genetics of mosaic hybrid zone, mitochondrial, nuclear and reproductive differentiation of crickets by soil type. *Evolution*, 43:197-210

RIESEBERG, L.H., BUERKLE, C.A. (2002). Genetic mapping in hybrid zones. *American Naturalist*, 159:36-50

SEARLE, J.B. (1986). Factors responsible for karyotypic polymorphism on the common shrew, *Sorex araneus*. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Science*, 229:277-298

SLATKIN, M. (1981). Estimating levels of gene flow in natural populations. *Genetics*, 99:323-335

SLATKIN, M. (1985). Gene flow in natural populations. *Annual Review Ecology and Systematics*, 16:393-430

SPOLSKY, C., SZYMURA, J.M., UZZELL, T. (2006). Mapping *Bombina* mitochondrial genomes: the conundrum of Carpathian *B. variegata*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 44:100–104.

STEBBINS, G.L. (1959). The role of hybridization in evolution. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 103:231-251

STRAKOVÁ, H. (2010). Revize lokalit hybridní zóny kuněk (*Bombina bombina* a *B. variegata*) jižně od Českých Budějovic. [Bakalářská práce], 24 pp., Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, katedra biologických disciplín

STURGEN, B. (1959). Eidonomische Untersuchungen an *Bombina* Oken (Amphibia: Discoglossidae) aus dem Gurghiu-Tale (Siebenbürgen). *Zoologische Jahrbuecher Systematik*, 86(4-5):383-394

STURGEN, B., 1980. Geographical variation of the fire-bellied toad (*Bombina bombina* (L)) in the USSR (Amphibia, Anura, Discoglossidae). *Zool. Abh. Staatl. Mus. Tierk. Dresden*, 36(5):101-115

SZYMURA, J.M. (1976). Hybridization between discoglossid toads *Bombina bombina* and *Bombina variegata* in Southern Poland as revealed by the electrophoretic technique. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 14:227-236

SZYMURA, J.M. (1977). Nasze kumaki (*Bombina* Oken, 1816) istotnie tworzą mieszańce w przyrodzie. *Przegląd Zoologiczny*, 21(2):144-147

SZYMURA, J.M. (1983). Genetic differentiation between hybridizing species *Bombina bombina* and *Bombina variegata* (Salientia, Discoglossidae) in Poland. *Amphibia-Reptilia*, 4:137-145

SZYMURA, J.M. (1988). Regional differentiation and hybrid zones between firebellied toads *Bombina bombina* (L.) and *Bombina variegata* (L.) in Europe. Rozprawy habilitacyjne no. 147. Kraków: Uniwersytet Jagielloński [in Polish]

SZYMURA, J.M. (1993): Analysis of hybrid zones with *Bombina*. In: Harrison R, (ed): Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press, New York, pp. 261-289

SZYMURA, J.M., BARTON, N.H. (1986). Genetic analysis of a hybrid zone between the fire-bellied toad, *Bombina bombina* and *B. variegata*, near Cracow in southern Poland. *Evolution*, 40:1141–1159.

SZYMURA, J.M., BARTON, N.H. (1991). The genetic structure of the hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*: comparisons between transects and between loci. *Evolution*, 45: 237–261

SZYMURA, J.M., FARANA, I. (1978) Inheritance and linkage analysis of five enzyme loci in interspecific hybrid of toadlets, genus *Bombina*. *Biochemical Genetics*, 16:307-319

SZYMURA, J.M., UZZELL, T., SPOLSKY, C. (2000). Mitochondrial DNA variation in the hybridizing fire-bellied toads, *Bombina bombina* and *B. variegata*. *Molecular Ecology*, 9:891–899

ŠTEFKA, J. (2000). Analýza rodu *Bombina* v Předšumaví. [Bakalářská práce], 20 pp., Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, katedra zoologie

ŠTEFKA, J.(2003): Ecological aspects of hybridization between fire-bellied toads *Bombina bombina* and *Bombina variegata*. [Mgr. Thesis], 27 pp., University of South Bohemia, Faculty of Biological Sciences, Department of Zoology

VASARA, E., SOFIANIDOU, T.S., SCHNEIDER, H. (1991). Bioacoustic analysis of the yellow-bellied toad in northern Greece (*Bombina variegata scabra* L., Anura, Discoglossidae). *Zoologischer Anzeiger*, 226(5/6):220-236

VOJAR, J. (2007): Ochrana obojživelníků. Český svaz ochránců přírody.

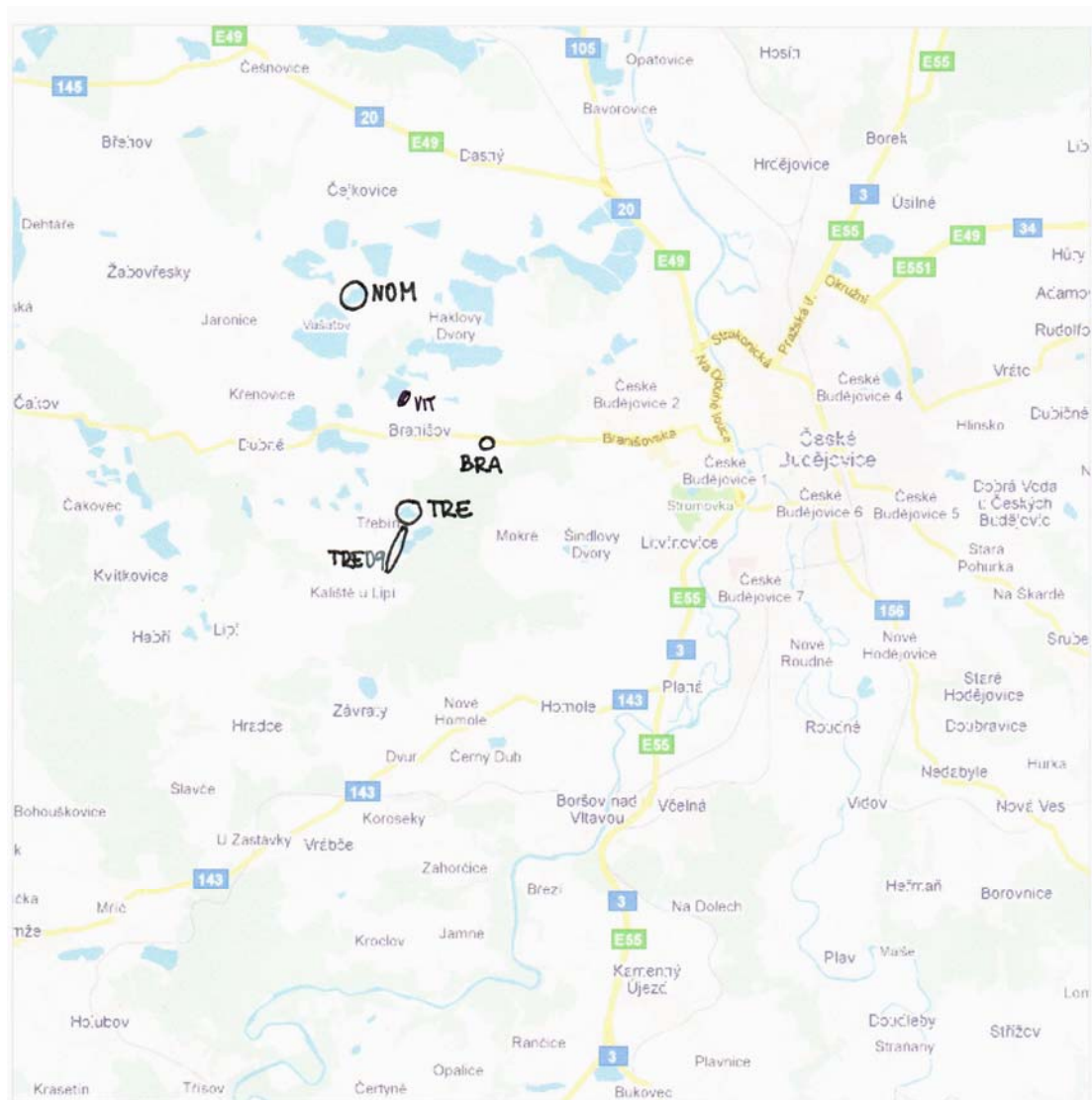
WERNER, F. (1897). Reptilien und Amphibien Oesterreich-Ungarns und der Occupationsländer. A. Pichler's Witwe & Sohn, Wien: 162 pp.

WILSON, A.C., CANN, R.L., CARR, S.M. et al. (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26:375–400

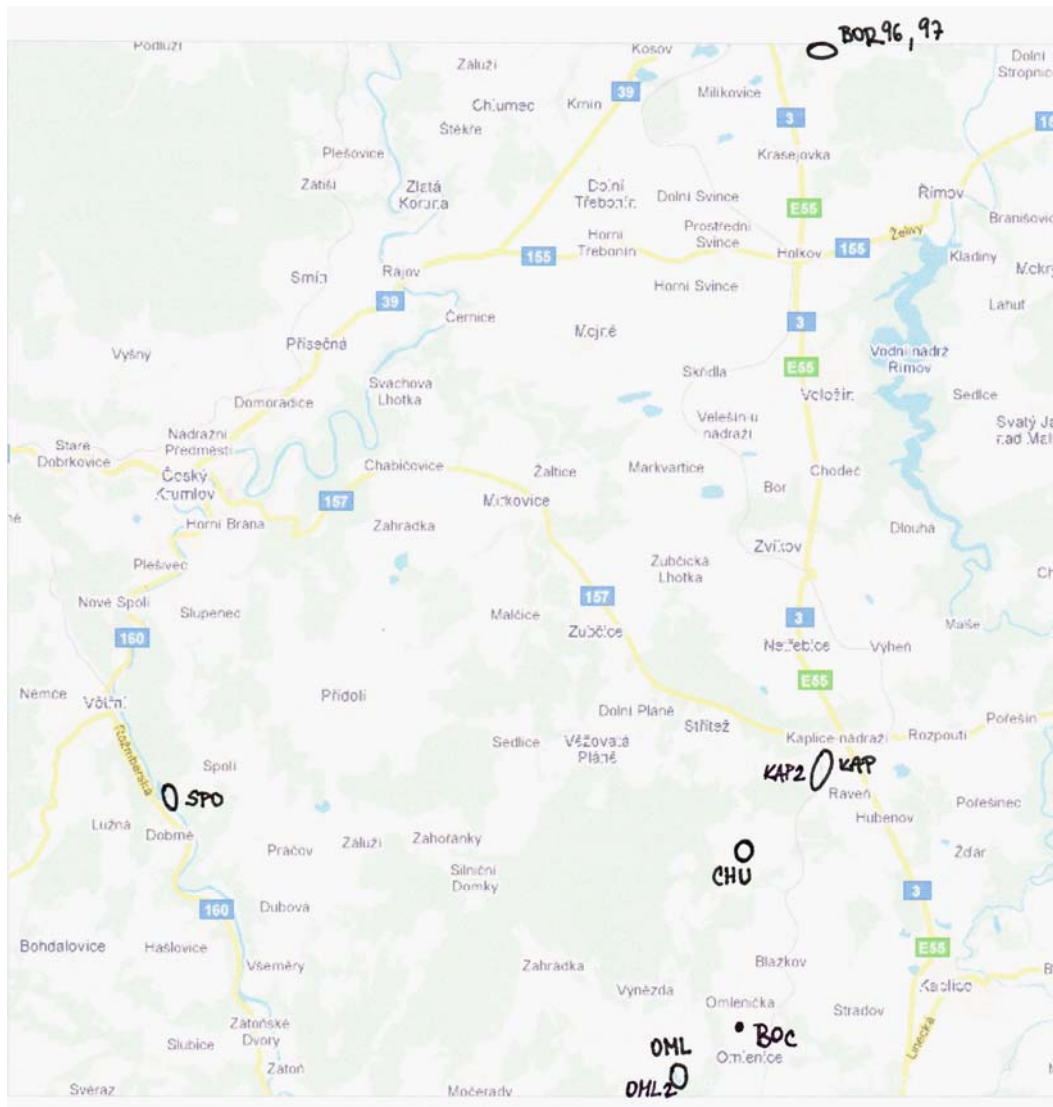
ZWACH, I. (2009). Obojživelníci a plazi České republiky. GRADA, 493 pp

9. Přílohy

9.1 Mapy lokalit



Mapa 1. Lokality v okolí Českých Budějovic



Mapa 2. Lokality jižně od Českých Budějovic

9.2 Tabulky

1.	2	TRE 09	2009
2.	0,5	TRE 09	2009
3.	1	TRE 09	2009
4.	1	TRE 09	2009
5.	1,5	TRE 09	2009
6.	3	TRE 09	2009
7.	0,5	TRE 09	2009
8.	1,5	TRE 09	2009
9.	1	TRE 09	2009
10.	0,5	TRE 09	2009
11.	2,5	VIT	2009
12.	1,5	VIT	2009

13.	2	VIT	2009
14.	2	VIT	2009
15.	3	VIT	2009
16.	7	OML	2009
17.	9	OML	2009
18.	8	OML	2009
19.	10	OML	2009
20.	8,5	OML	2009
21.	10	OML	2009
22.	11	OML	2009
23.	10,5	OML	2009
24.	10,5	OML	2009
25.	10	OML	2009
26.	10	OML	2009
27.	6,5	OML	2009
28.	9,5	OML	2009
29.	10	OML	2009
30.	8,5	OML	2009
31.	9,5	OML	2009
32.	11	OML	2009
33.	9	OML	2009
34.	12	OML	2009
35.	11,5	OML	2009
36.	7,5	OML	2009
37.	8,5	OML	2009
38.	13	BOC	2009
39.	9,5	BOC	2009
43.	6	OML	2010
44.	6,5	OML	2010
45.	5,5	OML	2010
46.	9,5	OML	2010
47.	8	OML	2010
48.	10	OML	2010
49.	10	OML	2010
50.	10	OML	2010
51.	8,5	OML	2010
52.	5,5	OML	2010
53.	9	BOR 96	2010
54.	4	BOR 96	2010
55.	8	BOR 96	2010
56.	6,5	BOR 96	2010
57.	2	TRE 09	2010
58.	1,5	TRE 09	2010
59.	1,5	TRE 09	2010
60.	1,5	TRE 09	2010
61.	3	TRE 09	2010
62.	1	TRE 09	2010
63.	4	TRE 09	2010
64.	2	TRE 09	2010
65.	1	TRE 09	2010
66.	5	TRE 09	2010
67.	3	TRE 09	2010

68.	2	TRE 09	2010
69.	3,5	TRE 09	2010
70.	3	TRE 09	2010
71.	3	TRE 09	2010
72.	6	TRE 09	2010
73.	2,5	TRE 09	2010
74.	6,5	TRE 09	2010
75.	3,5	TRE 09	2010
76.	4,5	TRE 09	2010
77.	4,5	TRE 09	2010
78.	3	TRE 09	2010
79.	3,5	TRE 09	2010
80.	3	TRE 09	2010
81.	4,5	TRE 09	2010
82.	4	TRE 09	2010
83.	4,5	TRE 09	2010
84.	7	TRE 09	2010
85.	3	TRE 09	2010
86.	4	TRE 09	2010
87.	5	TRE 09	2010
88.	7	KAP	2010
89.	10	KAP	2010
90.	12	KAP	2010
91.	12	KAP	2010
92.	9	KAP	2010
93.	10,5	KAP	2010
94.	10,5	KAP	2010
95.	10	KAP	2010
96.	11	KAP	2010
97.	10,5	KAP	2010
98.	12	KAP	2010
99.	11	KAP	2010
100.	11,5	KAP	2010
101.	10,5	KAP	2010
102.	11	KAP	2010
103.	11,5	KAP 2	2010
104.	12	KAP 2	2010
105.	12,5	KAP 2	2010
106.	11	KAP 2	2010
107.	9,5	KAP 2	2010
108.	11	KAP 2	2010
109.	12	CHU	2010
110.	9,5	CHU	2010
111.	10,5	CHU	2010
112.	9,5	CHU	2010
113.	11	CHU	2010
114.	11	CHU	2010
115.	11	CHU	2010
116.	11	CHU	2010
117.	10,5	CHU	2010
118.	11,5	CHU	2010
119.	11,5	CHU	2010

120.	12	CHU	2010
121.	11,5	CHU	2010
122.	12	CHU	2010
123.	11	CHU	2010
124.	9	OML 2	2010
125.	7,5	OML 2	2010
126.	10	OML 2	2010
127.	11,5	OML 2	2010
128.	7,5	OML 2	2010
129.	6	OML 2	2010
130.	8	OML 2	2010
131.	9,5	BOC	2010
132.	7,5	OML 2	2011
133.	10	OML 2	2011
134.	9,5	OML 2	2011
135.	8	OML 2	2011
136.	8,5	OML 2	2011
137.	11	KAP	2011
138.	10,5	KAP	2011
139.	7,5	KAP	2011
140.	10,5	KAP	2011
141.	9,5	KAP	2011
142.	4,5	KAP	2011
143.	7	KAP	2011
144.	12	BOC	2011
145.	5	TRE 09	2011
146.	1,5	TRE 09	2011
147.	1	TRE 09	2011
148.	1,5	TRE 09	2011
149.	2	TRE 09	2011
150.	3	TRE 09	2011
151.	2,5	TRE 09	2011
152.	2,5	TRE 09	2011
153.	2,5	TRE 09	2011
154.	1,5	TRE 09	2011
155.	0,5	TRE	2009

Tab. 6. Přehled jedinců s hodnotou hybridního indexu, lokalitou a rokem nálezu.

	Obsev.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
2	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
3	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
4	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
5	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
6	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
7	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
8	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2

9	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
10	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
* 11	VIT	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
* 12	VIT	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
* 13	VIT	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
* 14	VIT	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
* 15	VIT	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
16	OML	OML	OML 2	KAP	BOR 97	TRE 09	CHU	KAP 2	BOC	VIT
17	OML	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
18	OML	OML	OML 2	KAP	BOR 97	CHU	KAP 2	BOC	TRE 09	VIT
19	OML	OML	KAP	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
20	OML	OML	KAP	OML 2	CHU	BOR 97	KAP 2	BOC	TRE 09	VIT
21	OML	OML	KAP	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 22	OML	KAP	CHU	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 23	OML	KAP	OML	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 24	OML	KAP	OML	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
25	OML	OML	KAP	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
26	OML	OML	KAP	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
27	OML	OML	OML 2	BOR 97	TRE 09	KAP	CHU	VIT	BOC	KAP 2
28	OML	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
29	OML	OML	KAP	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
30	OML	OML	KAP	OML 2	CHU	BOR 97	KAP 2	BOC	TRE 09	VIT
31	OML	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 32	OML	KAP	CHU	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
33	OML	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 34	OML	CHU	KAP	KAP 2	OML	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 35	OML	CHU	KAP	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
36	OML	OML	OML 2	KAP	BOR 97	CHU	TRE 09	KAP 2	BOC	VIT
37	OML	OML	KAP	OML 2	CHU	BOR 97	KAP 2	BOC	TRE 09	VIT
* 38	BOC	CHU	KAP	KAP 2	BOC	OML	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 39	BOC	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
40	OML	OML	TRE 09	BOR 97	OML 2	KAP	VIT	CHU	BOC	KAP 2
41	OML	OML	OML 2	BOR 97	TRE 09	KAP	CHU	VIT	BOC	KAP 2
* 42	OML	TRE 09	OML	BOR 97	OML 2	VIT	KAP	CHU	BOC	KAP 2
43	OML	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
44	OML	OML	OML 2	KAP	BOR 97	CHU	KAP 2	BOC	TRE 09	VIT
45	OML	OML	KAP	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
46	OML	OML	KAP	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
47	OML	OML	KAP	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
48	OML	OML	KAP	OML 2	CHU	BOR 97	KAP 2	BOC	TRE 09	VIT
* 49	OML	TRE 09	OML	BOR 97	OML 2	VIT	KAP	CHU	BOC	KAP 2
50	OML	OML	KAP	OML 2	CHU	BOR 97	KAP 2	BOC	TRE 09	VIT
* 51	OML	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
52	OML	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 53	BOR 96	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 54	BOR 96	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
* 55	BOR 96	OML	OML 2	KAP	BOR 97	CHU	KAP 2	BOC	TRE 09	VIT

* 56	BOR 96	OML	OML 2	BOR 97	TRE 09	KAP	CHU	VIT	BOC	KAP 2
57	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
58	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
59	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
60	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
61	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
62	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
63	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
64	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
65	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
66	TRE 09	TRE 09	OML	BOR 97	VIT	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
67	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
68	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
69	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
70	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
71	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
* 72	TRE 09	OML	TRE 09	BOR 97	OML 2	KAP	VIT	CHU	BOC	KAP 2
73	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
* 74	TRE 09	OML	OML 2	BOR 97	TRE 09	KAP	CHU	VIT	BOC	KAP 2
75	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
76	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
77	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
78	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
79	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
80	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
81	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
82	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
83	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
* 84	TRE 09	OML	OML 2	KAP	BOR 97	TRE 09	CHU	KAP 2	BOC	VIT
85	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
86	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
87	TRE 09	TRE 09	OML	BOR 97	VIT	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
* 88	KAP	OML	OML 2	KAP	BOR 97	TRE 09	CHU	KAP 2	BOC	VIT
* 89	KAP	OML	KAP	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 90	KAP	CHU	KAP	KAP 2	OML	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 91	KAP	CHU	KAP	KAP 2	OML	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 92	KAP	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
93	KAP	KAP	OML	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
94	KAP	KAP	OML	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 95	KAP	OML	KAP	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
96	KAP	KAP	CHU	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
97	KAP	KAP	OML	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 98	KAP	CHU	KAP	KAP 2	OML	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
99	KAP	KAP	CHU	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 100	KAP	CHU	KAP	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
101	KAP	KAP	OML	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
102	KAP	KAP	CHU	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT

* 103	KAP 2	CHU	KAP	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 104	KAP 2	CHU	KAP	KAP 2	OML	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 105	KAP 2	CHU	KAP	KAP 2	OML	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 106	KAP 2	KAP	CHU	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 107	KAP 2	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 108	KAP 2	KAP	CHU	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
109	CHU	CHU	KAP	KAP 2	OML	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 110	CHU	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 111	CHU	KAP	OML	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 112	CHU	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 113	CHU	KAP	CHU	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 114	CHU	KAP	CHU	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 115	CHU	KAP	CHU	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 116	CHU	KAP	CHU	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 117	CHU	KAP	OML	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
118	CHU	CHU	KAP	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
119	CHU	CHU	KAP	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
120	CHU	CHU	KAP	KAP 2	OML	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
121	CHU	CHU	KAP	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
122	CHU	CHU	KAP	KAP 2	OML	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 123	CHU	KAP	CHU	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 124	OML 2	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 125	OML 2	OML	OML 2	KAP	BOR 97	CHU	TRE 09	KAP 2	BOC	VIT
* 126	OML 2	OML	KAP	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 127	OML 2	CHU	KAP	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
* 128	OML 2	OML	OML 2	KAP	BOR 97	CHU	TRE 09	KAP 2	BOC	VIT
* 129	OML 2	OML	TRE 09	BOR 97	OML 2	KAP	VIT	CHU	BOC	KAP 2
* 130	OML 2	OML	OML 2	KAP	BOR 97	CHU	KAP 2	BOC	TRE 09	VIT
* 131	BOC	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 132	OML 2	OML	OML 2	KAP	BOR 97	CHU	TRE 09	KAP 2	BOC	VIT
* 133	OML 2	OML	KAP	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 134	OML 2	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 135	OML 2	OML	OML 2	KAP	BOR 97	CHU	KAP 2	BOC	TRE 09	VIT
* 136	OML 2	OML	KAP	OML 2	CHU	BOR 97	KAP 2	BOC	TRE 09	VIT
137	KAP	KAP	CHU	OML	KAP 2	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
138	KAP	KAP	OML	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 139	KAP	OML	OML 2	KAP	BOR 97	CHU	TRE 09	KAP 2	BOC	VIT
140	KAP	KAP	OML	CHU	OML 2	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 141	KAP	OML	KAP	OML 2	CHU	KAP 2	BOC	BOR 97	TRE 09	VIT
* 142	KAP	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
* 143	KAP	OML	OML 2	KAP	BOR 97	TRE 09	CHU	KAP 2	BOC	VIT
* 144	BOC	CHU	KAP	KAP 2	OML	BOC	OML 2	BOR 97	TRE 09	VIT
145	TRE 09	TRE 09	OML	BOR 97	VIT	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
146	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
147	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
148	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
149	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2

150	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
151	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
152	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
153	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2
154	TRE 09	TRE 09	VIT	BOR 97	OML	OML 2	KAP	CHU	BOC	KAP 2

Tab. 7. Přehled jednotlivých jedinců, lokality jejich skutečného nálezu (observed) a lokality, kam byli zaklasifikováni nejlépe (1), jako druhá v pořadí (2), atd. * označuje jedince, kteří byli klasifikováni do jiné než reálné lokality.

9.3 Fotografie



Foto. 1. a 2. (vpravo) ukazuje zástupce s nejnižší (0,5) a nejvyšší (13) hodnotou HI, a tedy zástupce čistokrevných rodičovských druhů.



Foto. 3. Lokalita Borek (BOR 97) – louže v poli. Sezóna 2009.



Foto. 4. Lokalita BOR 97 v sezóně 2010.



Foto. 5. Lokalita BOR 97 v sezóně 2011.



Foto. 6. Lokalita Bočkov (BOC) v roce 2010



Foto. 7. Chuchelec (CHU) – revitalizovaný rybník, sezóna 2010.



Foto. 8. Lokalita CH v sezóně 2011. V popředí lze vidět množství pulců.



Foto. 9. Kaplice nádraží (KAP), sezóna 2010.



Foto. 10. Lokalita KAP 2 – louže v poli v kolejích zanechaných zemědělskými stroji, sezóna 2010.



Foto. 11. Omlenička (OML), vypuštěný rybník se zbylými loužemi. Sezóna 2009.



Foto. 12. Omlenička (OML) – koleje po zemědělských strojích.



Foto. 13. Lokalita OML 2 na okraji lokality Omlenička, 2010.



Foto. 14. Lokalita OML 2 v sezóně 2011.



Foto. 15. Lokalita Třebín nová (TRE 09). Staveniště rodinného domu, louže po technických dtrojích a stavebním materiálu.



Foto. 16. Lokalita TRE 09 v sezóně 2010 – posunuta o několik desítek metrů k dalšímu staveništi.



Foto. 17. Lokalita TRE 09 v roce 2011. Po dokončení staveb kuňky přebývají v odvodňovací strouze.



Foto. 18. Lokalita Vitín (VIT), louže vedle rybníka, 2009.



Foto. 19. Lokalita VIT v sezóně 2011. Kuňky byly opět jen v louži pod rybníční hrází.