

Ploidie u ryb a genomové manipulace

Polyploidie u ryb je neobyčejně důležitým evolučním mechanismem nepochybně přispívajícím k obrovské biodiversitě současných ryb. Rovněž snadnost, s jakou lze u ryb polyploidii různých stupňů a různými postupy experimentálně indukovat a také ve šlechtitelské a chovatelské praxi masově s úspěchem využívat svědčí o důležitosti tohoto biologického fenoménu, souvisejícím s evoluční plasticitou rybích genomů.

Biologická ploidie – $2n/1n$ cyklus – vyvinula se spolu s pohlavním rozmnožováním
Evoluční polyploidie – dříve $2n/1n$ cyklus změněn hybridizační událostí, přestárnutí jiker, fyzikální indukce

Přirozeně tetraploidní jedinci nalezeni v řadě rybích populací (druhů) např. kapr ($2n=100$), kde existuje řada kaprovitých se $2n=48-50$. Řada jeseterovitých je evolučně tetraploidní jeseter sibiřský, *Acipenser baeri* a j. ruský, *A. gueldenstaedti* evolučně oktaploidní

Polyploidii u ryb lze indukovat také experimentálně a to poměrně jednoduchými technikami. Takto indukované polyploidní formy ryb mají vhodné vlastnosti pro široké použití v akvakultuře (Piferrer a kol. 2009).

Genomové manipulace u ryb

Geneticky modifikované organismy (GMO)

Etika vzniku a využívání GMO u ryb a možný impakt vysazovaných nebo uniklých GMO na původní ichtyocenózy

V nejširším slova smyslu - vodní GMO jsou měkkýši, korýši a ryby vzniklí: šlechtěním, mezidruhovou hybridizací, genomovými manipulacemi a zvratem pohlaví, genovým transferem, produkcí chimér, nukleární transplantací

V ČR platí zákon č. 153/2000 Sb. o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty

Za genetickou modifikaci považováno pouze cílené vnesení cizorodého dědičného materiálu (tedy cizorodé DNA) do dědičného materiálu organismu způsobem, ke kterému nemůže dojít bez zásahu člověka, a který vede k opakovanému zmnožení vneseného materiálu spolu s organismem.

Genomové manipulace tomuto zákonu nepodléhají.

Šlechtění, ani genomové manipulace nespádají pod genetické modifikace.

Transgenní organismy (genové manipulace) ano!

Polyploidie = zmnožení počtu chromozomových sad

Triploidie = $3n$

Tetraploidie = $4n$

Pentaploidie = $5n$

Hexaploidie = $6n$

Heptaploidie = $7n$

Oktaploidie = $8n$

Nonaploidie = $9n$

Dekaploidie = $10n$ atd.

Autopolyploidie = uvnitř druhu

Alopolyploidie = mezidruhovým křížením (vede k asexuálnímu rozmnožování (gynogenéze, hybridogenéze, partenogenéze))

Hybridní komplexy (sekavec, karas, piskoř,...)

Evoluční polyploidie (jeseteři, kapr...)

Druhy genomové manipulace:

- metody indukující polyploidní stavy
- uniparentální dědičnost (meiotickou gynogenezí)
- klonování parentálních genomů (mitotickou gynogenezí a androgenezí)
- kombinace těchto postupů

Pro většinu živočišných druhů je karyotyp konstantní, ale:

- **Chromozomový polymorfismus**
- **Chromozomové aberace (mutace)**
 - Strukturní aberace**
 - Euploidie násobky sad chromozomů**
 - Aneuploidie (porucha dělení - chybný rozchod chromozomů - snížení nebo zvýšení počtu chromozomů)**
- **Spontánní polyploidie:** porucha meiózy (dělicího vřeténka), neoddělí se sekundární pólocyt, přezráním jiker, genetická predispozice k zadržení II.pólocytu (Jev přirozený u rostlin, nižších živočišných tříd u ryb rozsáhle zdokumentováno)
- **podmínky vzniku polyploidie lze navodit uměle...**

Indukce polyploidie

Mechanický, fyzikální nebo chemický zásah do vývoje oplozeného vajíčka (zygoty), působící poruchu dělicího aparátu (vřeténka), podle doby použití mající za následek zadržení (přifúzování) 2. pólocytu nebo duplikaci chromozomových sad v 1.mitóze bez rozejití do dceřinných buněk (blastomer).

Mechanické šoky (otřesy, napichování jiker) experimentálně u kapra 30.léta 20.stol. Malá účinnost, vysoká mortalita.

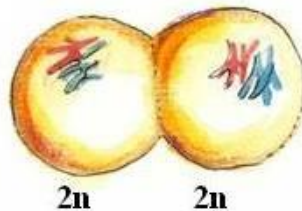
Fyzikální šoky

náhlou změnou teploty (teplotní šoky): teplý nebo studený šok (vystavení jiker teplé či studené lázni).

náhlou změnou hydrostatického tlaku (tlakové šoky) = vystavení jiker vysokému tlaku vody v tlakové jednotce

Chemické šoky - působení tzv. „vřeténkových jedů“ a dalších látek na dělicí aparát (kolchicin, kolcemid, cytochalazin B, inertní plyny - N₂O aj.)

DIPLOID

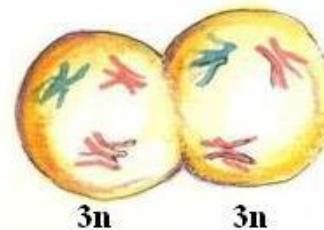
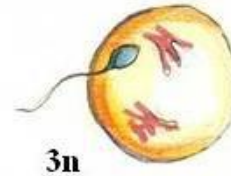
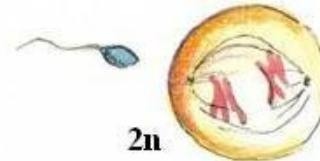


Fertilisation

Meiosis II

Mitosis I

TRIPLOID



Early shock

Retention of second polar body (3n)

Expulsion of second polar body (2n)

Šok = 3 parametry

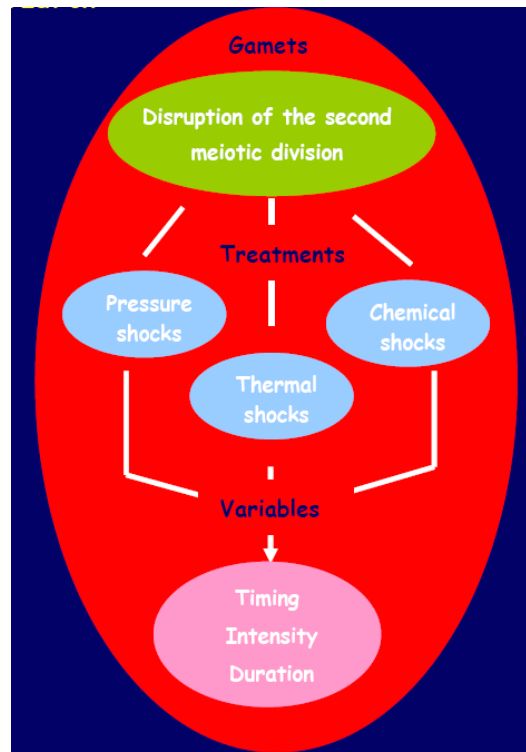
- 1) čas začátku šoku po aktivaci gamet**
- 2) expoziční doba**
- 3) teplota vody NEBO hydrostatický tlak NEBO koncentrace chemikálií**

Čas začátku šoku

závisí na druhu ošetření (meiotické nebo mitotické) druhu ryby a teplotě aktivačního roztoku nebo vody, v níž byly gamety aktivovány a oplozené jikry inkubovány do začátku šoku.

•Expoziční doba a teplota (tlak)

- Čím vyšší teplota (tlak), tím kratší expoziční doba.**
- Jinak se snižuje účinnost šoku a zvyšuje se mortalita jiker.**
- Nižší teploty (tlaky) po delší dobu mají nízkou účinnost, ale nezvyšují mortalitu jiker.**



Typ šoku	Začátek šoku po aktivaci gamet	Intenzita šoku	Expozice
tlakový	2 – 7 min u teplomilných druhů	62 MPa (rozsah 58 – 85 MPa)	2 – 6 min
	15 – 20 min u studenomilných druhů		
chladový	2 – 7 min u teplomilných druhů	-1°C až +4°C u druhů mírného pásma n. teplovodních	2 – 20 min (většina případů)
	15 – 20 min u studenomilných druhů		35 min až 3h u studenovodních druhů
teplý	2 – 7 min u teplomilných druhů	34°C až 41°C u druhů mírného pásma nebo teplovodních	45 s až 3,5 min
	15 – 20 min u studenovodních druhů	24°C až 32°C	10 – 25 min

Metody určení ploidní úrovně

- **průtokový cytometr - kvantifikace DNA u čerstvých nebo fixovaných vzorků**

- karyotypy - vždy používaná pro určení přesné úrovně

- coulter counter - podle objemu buňky

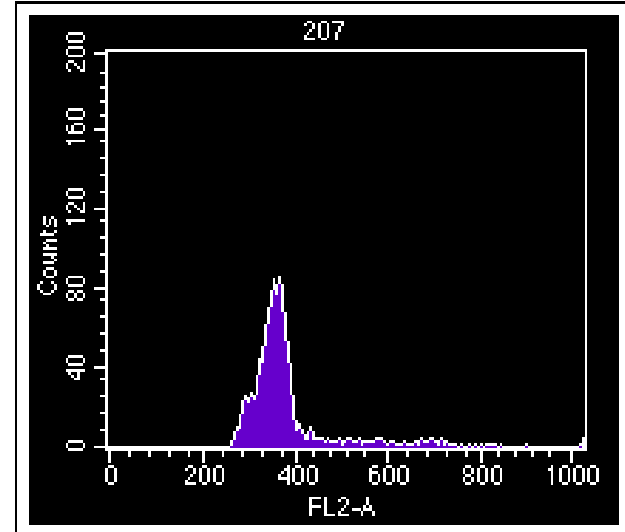
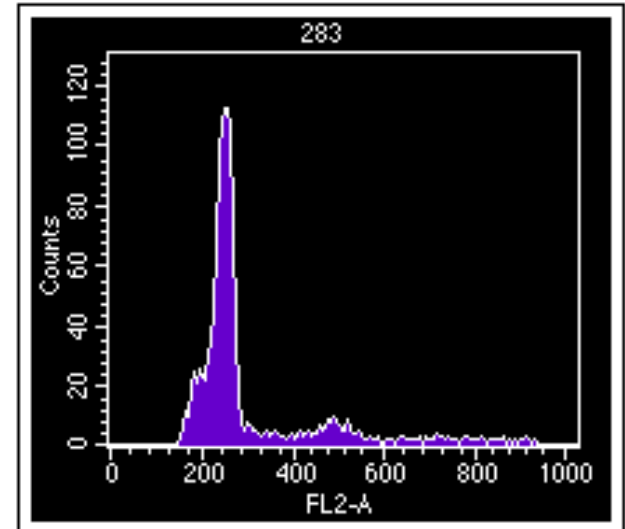
- velikost jader erytrocytů - čerstvé nebo fixované buňky

- podle počtů NORs - organizátorů jadérek (místo na chromozómu, v interfázi tam dochází k syntéze RNA). Lín 2n (A) 1-2 NOR, 3n (B) 1-3 NOR

- DNA finger printing

Neinvazní - erytrocyty (větší jedinci), ploutev, kůže, fous, sperma

Invazní - erytrocyty (menší jedinci), orgány, celý jedinec, blastodisk, jikra po oplození



Metody určení ploidní úrovně

- průtokový cytometr - kvantifikace DNA u čerstvých nebo fixovaných vzorků

- karyotypy - vždy používaná pro určení přesné úrovně



Metody určení ploidní úrovně

- průtokový cytometr - kvantifikace DNA u čerstvých nebo fixovaných vzorků

- karyotypy - vždy používaná pro určení přesné úrovně

- coulter counter - podle objemu buňky

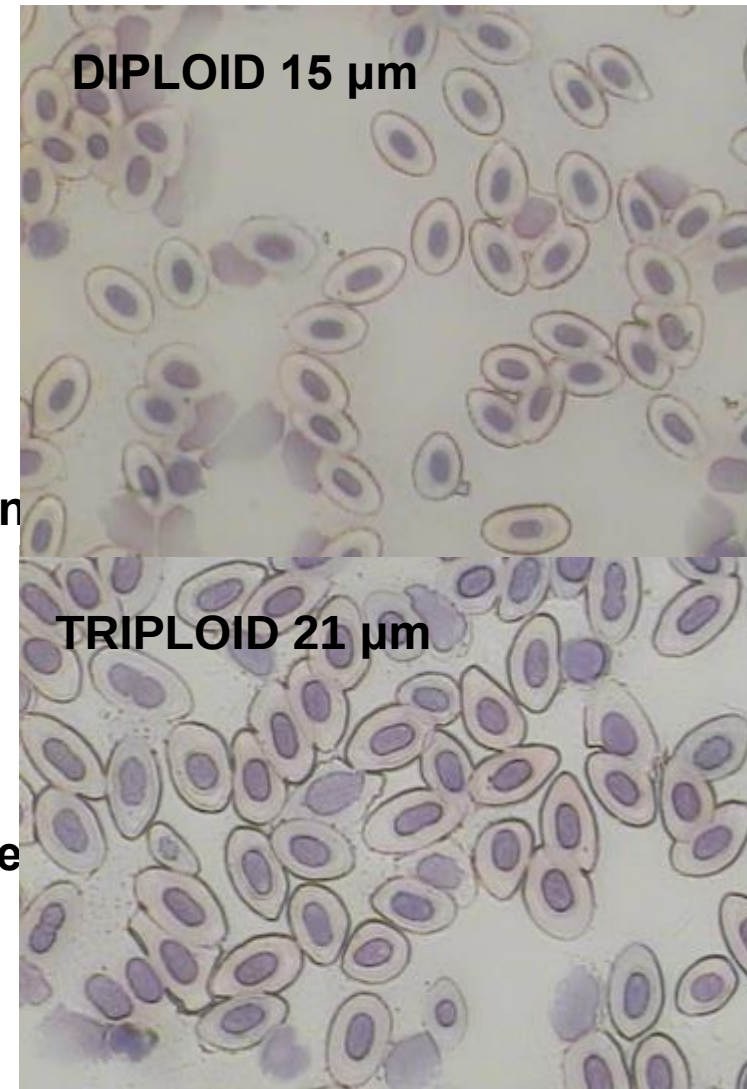
- **velikost jader erytrocytů - čerstvé nebo fixované buňky**

- podle počtů NORs - organizátorů jadérek (místo na chromozómu, v interfázi tam dochází k syntéze RNA). Lín 2n (A) 1-2 NOR, 3n (B) 1-3 NOR

- DNA finger printing

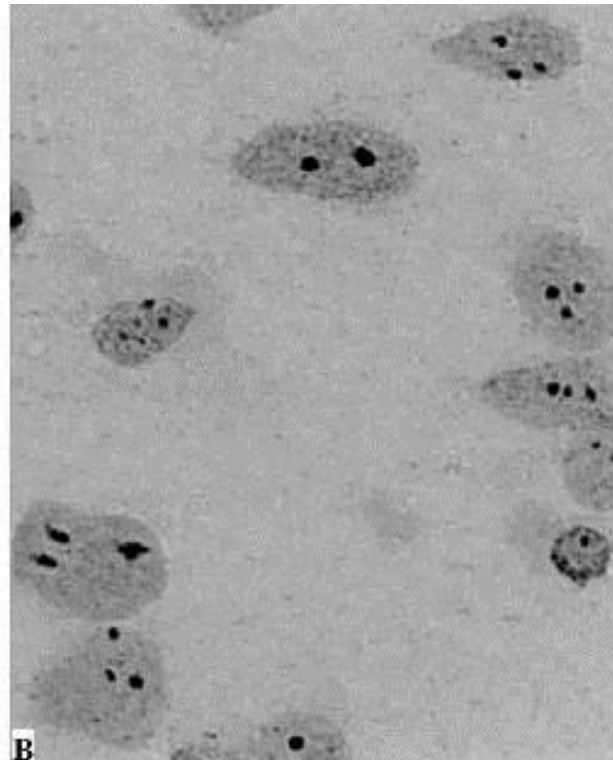
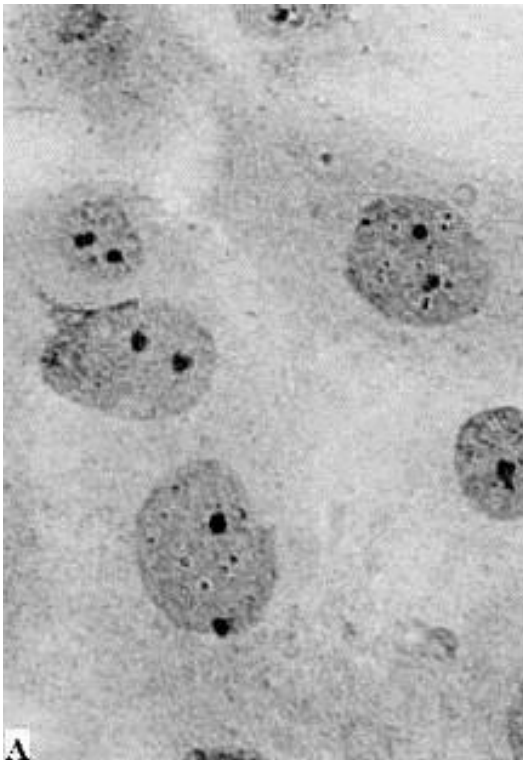
Neinvazní - erytrocyty (větší jedinci), ploutev, kůže, fous, sperma

Invazní - erytrocyty (menší jedinci), orgány, celý jedinec, blastodisk, jikra po oplození



Metody určení ploidní úrovně

- průtokový cytometr - kvantifikace DNA u čerstvých nebo fixovaných vzorků
- karyotypy - vždy používaná pro určení přesné úrovně
- coulter counter - podle objemu buňky
- velikost jader erytrocytů - čerstvé nebo fixované buňky
- podle počtů NORs - organizátorů jadérek (místo na chromozómu, v interfázi tam dochází k syntéze RNA). Lín 2n (A) 1-2 NOR, 3n (B) 1-3 NOR**



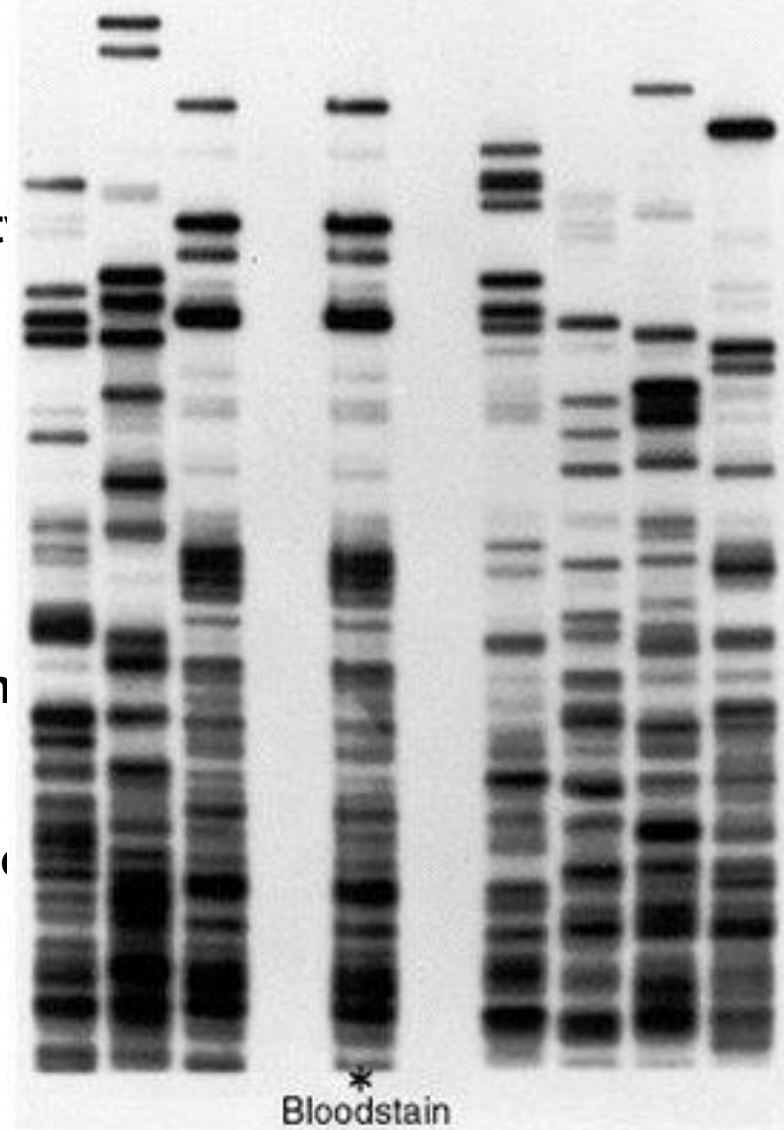
e, fous, sperma
edinec, blastodisk, jikra po

Metody určení ploidní úrovně

- průtokový cytometr - kvantifikace DNA u čerstvých nebo fixovaných vzorků
- karyotypy - vždy používaná pro určení přesné úrovně
- coulter counter - podle objemu buňky
- velikost jader erytrocytů - čerstvé nebo fixované buňky
- podle počtů NORs - organizátorů jadérek (míst chromozómu, v interfázi tam dochází k syntéze RNA). Lín 2n (A) 1-2 NOR, 3n (B) 1-3 NOR
- **DNA finger printing**

Neinvazní - erytrocyty (větší jedinci), ploutev, kůže, fous, sperma

Invazní - erytrocyty (menší jedinci), orgány, celý jedinec, blastodisk, jikra po oplození



Možnosti využití polyploidních ryb (3n, 4n)

První hypotézy = rychlejší růst triploidních obratlovců a jejich větší konečná velikost v závislosti na větších rozměrech buněk.

Vyvráceny již studiemi polyploidních obojživelníků (Fischberg, 1944; Fankhauser 1945, Ihssen et al., 1990), a růstovými studiemi triploidních ryb: vzrůst velikosti buněk je kompenzován poklesem jejich počtu.

Větší konečná velikost triploidních ryb a jejich rychlejší růst = v závislosti na pohlaví a stupni vývoje pohlavních orgánů, resp. jejich sterilitě (nižší stupeň kvalitativního i kvantitativního vývoje gamet a aneuploidní počet chromozómů v nich)

lososovité ryby (Thorgaard a Gall, 1979; Lincoln a Scott, 1984; Allen et al., 1986; Benfey et al., 1986; Lincoln, 1986, 1987)

lín obecný (Flajšhans et al, 1993a,b; Korwin - Kossakowski, 1993; Flajšhans, 1997)

Testy užítkovosti triploidů

Průkazné zvýšení finální hmotnosti triploidů proti diploidům:

pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*). Thorgaard et al. (1982), Chourrout et al. (1986), Ihssen et al. (1990) a další

losos obecný (*Salmo salar*) např. Benfey a Sutterlin (1984)

kapr obecný (*Cyprinus carpio*) Taniguchi et al. (1986), Mejza et al. (1993)

lín obecný - Flajšhans et al. (1993)

sumeček skvrnitý (*Ictalurus punctatus*) Wolters et al. (1982)

Ústřice (*Crassostrea gigas*) Staley et al. (1981)

Sterilita triploidních ryb:

při vysazování nepůvodních druhů ryb do volných vod tam, kde legislativní aspekty ochrany původní ichtyofauny nepovolují vysazovat jedince schopné rozmnožování.

triploidní amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*) - eliminace přemnožených vodních porostů v USA (Mikešová, 1995) a na Novém Zélandě (McCarter, 1988)

triploidní siven americký (*Salvelinus fontinalis*) - pro vyšší odolnost proti chladu vysazován do rybářských revírů na pacifickém pobřeží (Corley - Smith, 1991), aj.

Hypotéza produkce 100 % triploidního potomstva křížením tetraploidních a diploidních rodičů.

pstruh duhový - Chourrout a Nakayama (1987) triploidní potomstvo s lepší růstovou schopností a % přežití než triploidi indukovaní fyzikálními šoky.

Problém odchovu tetraploidních rodičů pro vysokou homozygotnost a citlivost vůči vnějším podmínkám (např. Thorgaard, 1992).

Další výhody triploidů

Vyrovnaná kvalita tržního produktu:

během reprodukčního období u triploidů nedochází k odčerpávání energetických zásob ze svaloviny

vybarvení svaloviny a obsah tuku zůstávají vysoké

obsah vody ve svalovině nižší než u diploidů (Lincoln, 1987)

Pouze ve Francii v roce 1996 vyprodukováno 4 000 t tržního triploidního pstruha duhového a dalších 600 t tržního triploidního pstruha potočního (Haffray et al., 1997).

Vznikají komerční firmy na produkci triploidních ryb.

Uniparentální dědičnost

Potomstvo nese genetickou informaci pouze 1 z rodičů

Gynogeneze - potomstvu se předává jaderná genetická informace (jaderná DNA) matky, pohlaví potomstva se (neuvažujeme-li případy autozomálního spoluurčení pohlaví) řídí určením pohlaví matky. Např. u ryb s chromozomovým určením pohlaví typu *Drosophila* (XX/XY) je všechno potomstvo XX = monosexní (celosamičí) potomstvo.

Androgeneze - potomstvu se předává jaderná genetická informace (jaderná DNA) otce, pohlaví potomstva se (neuvažujeme-li případy autozomálního spoluurčení pohlaví) řídí určením pohlaví otce. Např. u ryb s chromozomovým určením pohlaví typu *Drosophila* (XX/XY) je potomstvo XX a YY.

Přirozená gynogeneze

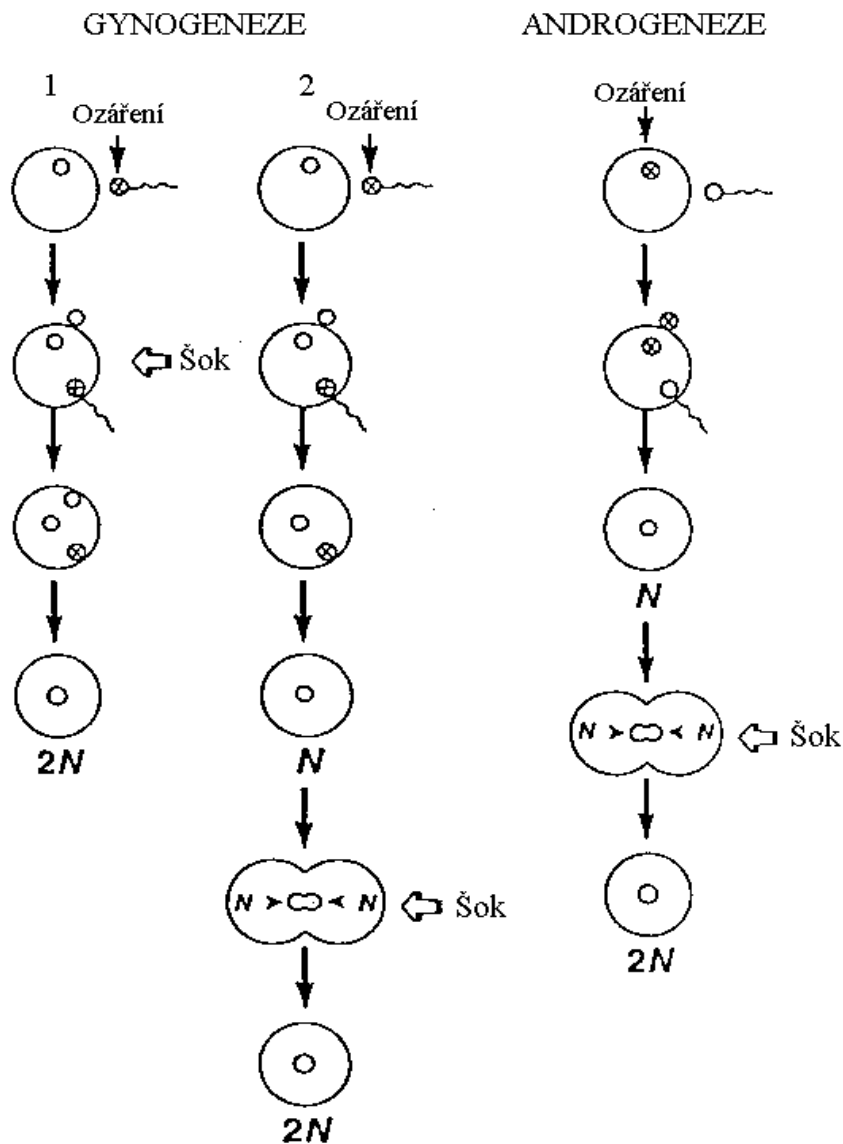
- je jedním ze způsobů rozmnožování ryb.

Samice určitého druhu ryby se vytírá se samcem jiného druhu, ale otcovský druh se nepodílí na genotypu potomstva. Přítomnost spermie pouze spouští vývoj vajíčka.

Přirozená gynogeneze u ryb zdokumentována u některých druhů (Horváth a Orbán, 1995)

Řada polyploidních populací kaprovitých ryb se gynogenetickým rozmnožováním udržuje (*Carassius*, *Misgurnus*, *Cobitis*, ...)

Indukovaná gynogeneze a androgeneze



Indukovaná meiotická gynogeneze

Použití spermatu s inaktivovanou DNA a retencí pólového tělíska

Touto metodou lze vytvářet inbrední linie s mírou inbredizace za generaci rovnou 3 - 4 generacím plemenitby sourozenců nebo 6 - 7 generacím plemenitby polosourozenců (Falconer, 1989).

U druhů s chromozómovým určením pohlaví typu *Drosophila* lze získat 100% samičího potomstva (pomineme-li vzácné případy “sex modifying genes”, Mair, 1993; “masculinization gene”, Komen et al., 1995).

Průkazně rozdílná růstová schopnost projevem pohlavního dimorfismu (vyšší růstová schopnost):

pstruh duhový, kapr obecný - Horváth a Orbán, 1995

lín obecný - Flajšhans et al., 1998

Poptávka po samičích pohlavních produktech (jikrách)

Meiotická gynogeneze/Mitotická gynogeneze

Homologní sperma (ozář. sperma stejného druhu)

MeiG - pstruh duhový (šok teplý 48%, tlakový 60 %), kapr (šok teplý 29%, chladový 38 %), tilápie nilská (šok teplý 19%, chladový 20, tlakový 27 %),

MitG - pstruh duhový (šok tlakový 5 %), kapr, KOI (šok teplý 1-15%), tilápie nilská (šok teplý 1-2%, tlakový 1-2 %)

Heterologní sperma (ozář.sperma jiného druhu)

MeiG - pstruh duhový divoký typ x albino. (teplý šok 63%), lín x kapr (chladový šok 21 %)

MitG - tilapie nilská x kapr (tlakový šok 25 %)

Androgeneze

Inaktivace genetické informace:

UV záření

**naředění jiker - fyziologický roztok, přirozená nebo syntetická
ovariální plazma**

**úroveň ředění podle hustoty - 8 ml : 1 g, Petriho miska prům. 8 cm
rotace Petriho misek**

**dávka 2000 mikro J x 100 x cm², nebo 800 mikro W x cm² po dobu
6 min**

Gama nebo RTG záření

kapr - RTG záření 25-30 kR

pstruh duhový - gama záření 40 kR

Využití ve šlechtitelském programu a v ochraně genofondu

Ohrožené druhy nebo mizející čistá rybí plemena:

Použití gynogeneze k získání potomstva, jsou - li k dispozici pouze jikernačky.

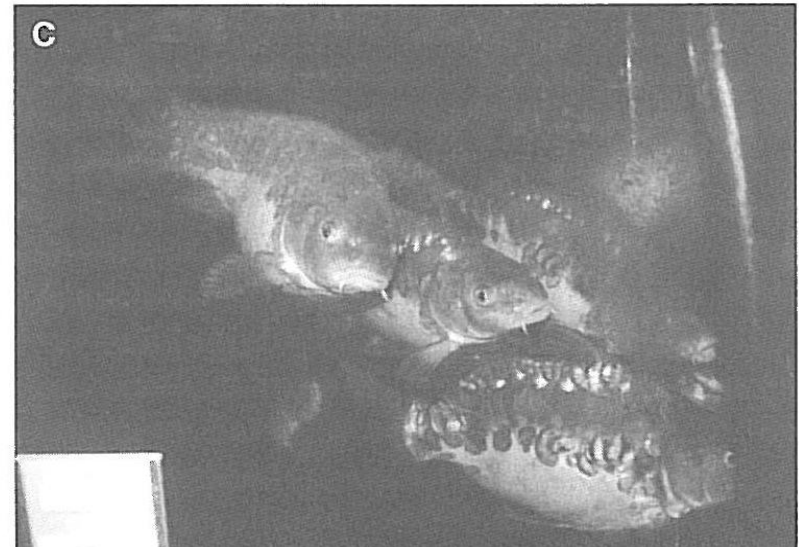
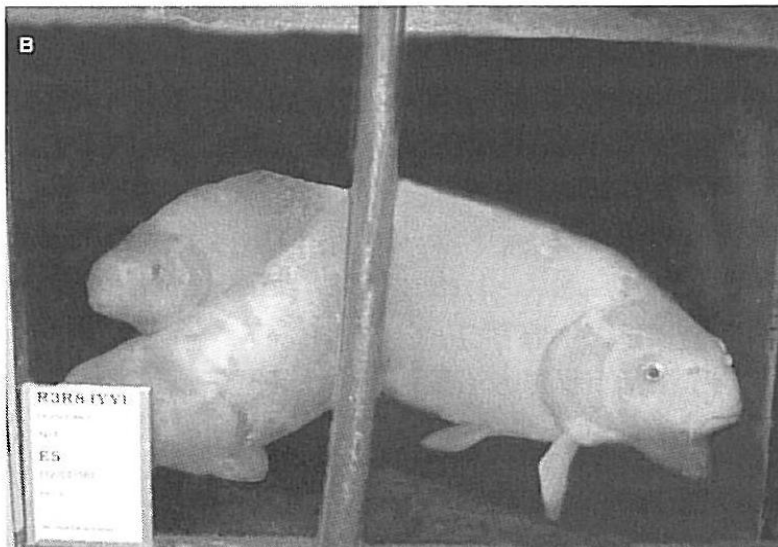
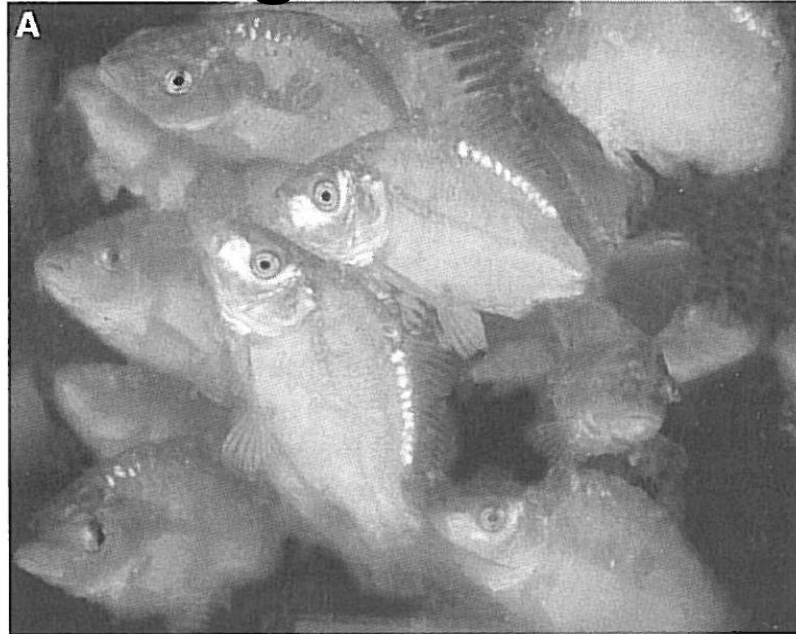
Použití kryokonzervovaného spermatu a metody androgeneze k rekonstrukci genomu jedinců mizející linie nebo plemena např. kapr obecný - Zandieh Doulabi et al. (1997) i příbuzného druhu (v případě možnosti vzniku plodného mezidruhového hybrida - Grunina et al., 1997)

Parentální klony: mitotickou gynogenezí nebo androgenezí - homozygotní potomstvo nesoucí genetickou informaci matky (G1 - 100% XX) nebo otce (A1 - 50% XX, 50% YY) opakovaným ošetřením mateřské (G2 - 100% XX) nebo otcovské (A2 - 100% YY) klonální linie, eliminovány subletální a letální geny.

Vzájemné křížení a vyhledávání specifické kombinační návaznosti: produkce vysoce užitkových kříženců k chovu

(např. Linhart et al., 1993; Mair, 1993; Horváth a Orbán, 1995)

Homozygotní klonované populace – izogenní linie



Limitováno:

relativně nízkou oplozeností danou nutností inaktivovat DNA druhé rodičovské gamety

Vysokou embryonální mortalitou díky zásahům v období 1. mitózy, nutným k reduplikaci rodičovského genomu na diploidní úroveň.

Použitím $2n$ spermií indukovaně tetraploidních mlíčáků odpadá nutnost rediploidizace, zvýšení % přežití androgenetického plůdku. pstruh duhový - Thorgaard et al. (1990)

Použití polyspermie (resp. dispermie) u dvou druhů jeseterovitých (Rekubratskij et al., 1997 a Grunina et al., 1998).

Shrnutí základních možností vzniku genomových manipulací

- | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Normální oplození | 4. Sperma jiného druhu |
| 2. Inaktivovaný genom spermií | 5. Retence polárního tělíska |
| 3. Inaktivovaný genom jiker | 6. Suprese prvního mitotického dělení |

Kombinace manipulačních možností

Diploid •1

Haploid •2,3 nebo 4

Meiotická gynogeneze •2 a 5, 4 a 5

Mitotická gynogeneze •2 a 6, 4 a 6

Androgenetický diploid •3 a 6

Triploid •1 a 5

Tetraploid •1 a 6

Pentaploid •1 a 5 jikra od 4n jikernačky

Hexaploid •1,2/4 a 5 neredukovaná jikra od 3n jikernačky

Heptaploid •1 a 5 neredukovaná jikra od 3n jikernačky

Atd.