

Genomové vlivy na rozmnožování

Základem pohlavního rozmnožování je schopnost uchovat soubor **dědičných** znaků s nejvyšší úrovní **proměnlivosti (variability)**

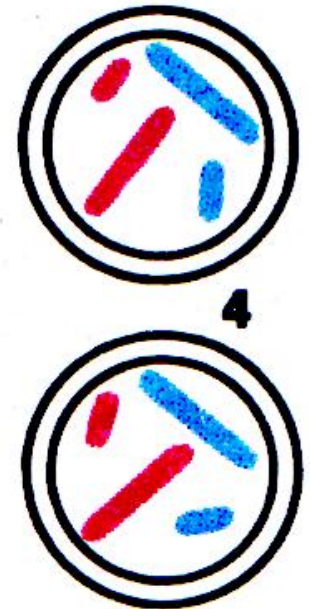
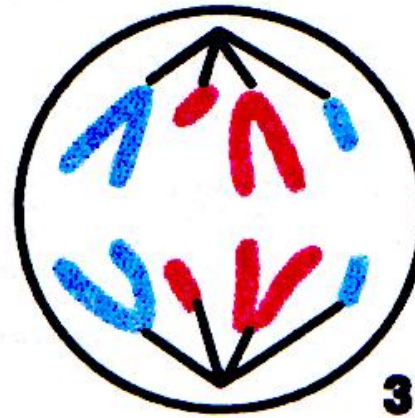
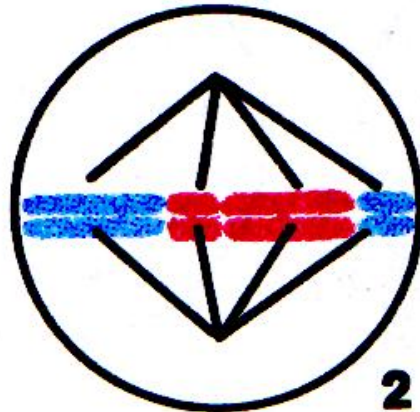
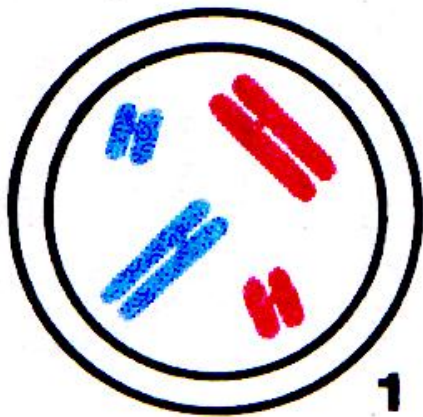
Pro pochopení základů je nutné si připomenout mitózu a meiozu jako základy cytologické dědičnosti.

Mitóza – nepřímé jaderné dělení se vznikem **dvou identických** dceřiných jader dvou chromatidových chromozomů ($2n$ - diploid).

Meióza – redukční dělení s **poloviční úrovní jadra**, tzn. výsledkem jsou 4 dceřiné jádra s jedno chromatidovými chromozomy (n - haploid).

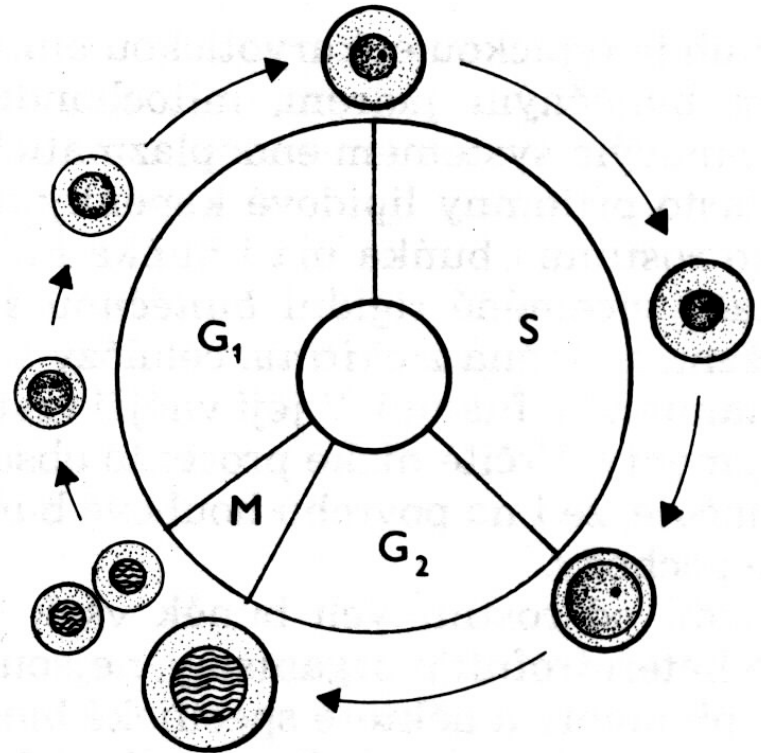
Mitóza

1 profáze, 2 metafáze, 3 anafáze, 4 telofáze



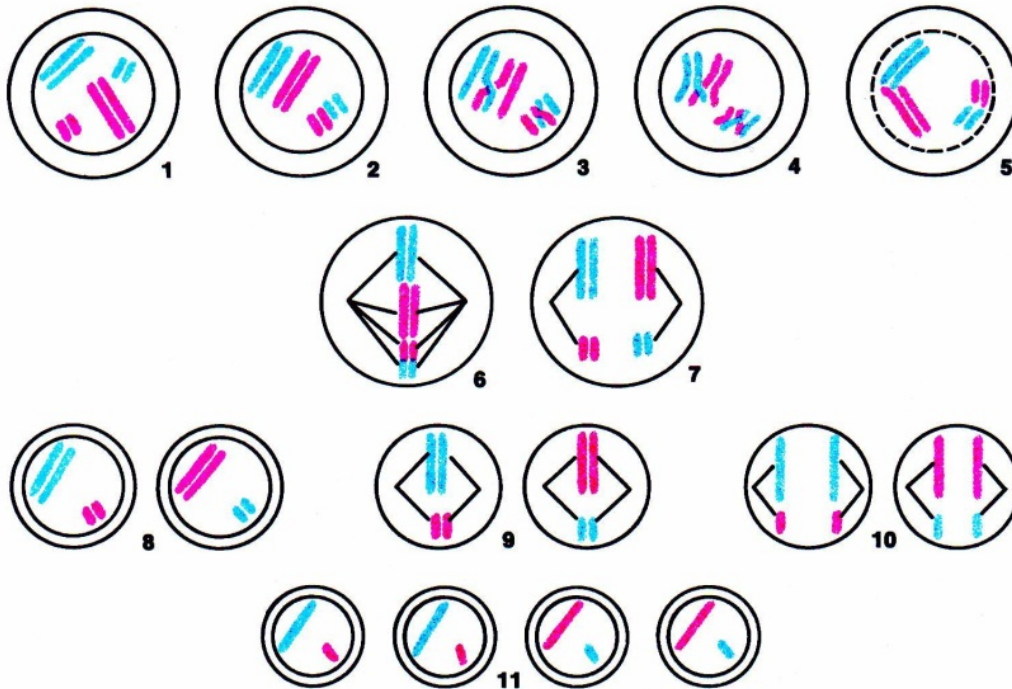
Obecné rozdělení buněčného cyklu

- Čtyři fáze
- Fáze S – syntéza DNA na dvojnásobek
- G₂ – klidové období (někdy G₀ – neboť fáze chybí)
- Fáze M – mitotický cyklus
- Fáze G₁ – růstová (někdy G₀ – neboť fáze chybí)



U mitotického průběhu rýhování embrya (morulaci) fáze G₁ a G₂ chybí

Meióza



I. Redukční dělení heterotypické

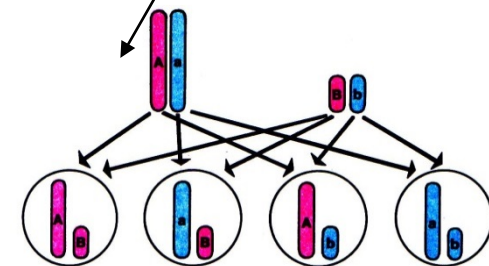
1. leptotene, 2. zygotene, 3. pachytene, 4. diplotene, 5. diakineze (1-5 heterotypická profáze)

6 heterotypická metafáze, 7 heterotypická anafáze

II. Redukční dělení homeotypické

8. homeotypická profáze, 9. homeotypická metafáze, 10. homeotypická anafáze, 11. tetráda haploidních gamet

Výsledkem je volná kombinovatelnost znaků



Šest základních možností vzniku genomových manipulací

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

Kombinace manipulačních možností

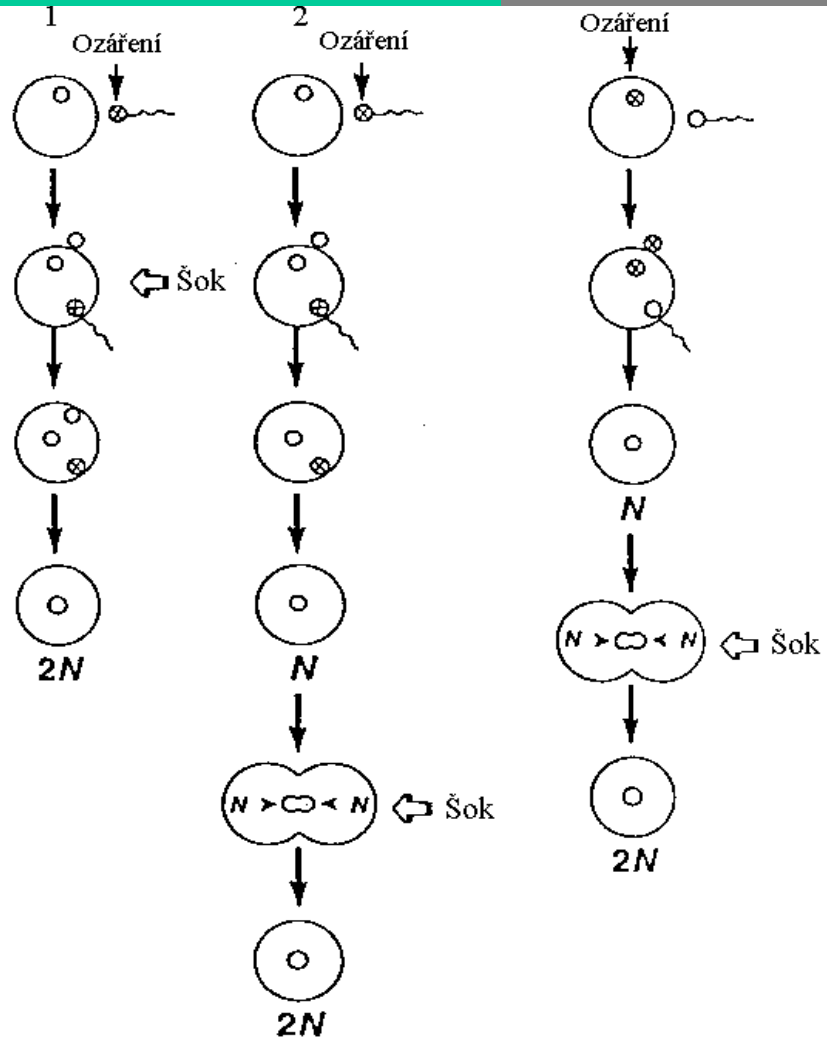
Diploid	•1
Haploid	•2,3 nebo 4
Meiotická gynogeneze	•2 a 5, 4 a 5
Mitotická gynogeneze	•2 a 6, 4 a 6
Androgenetický diploid	•3 a 6
Triploid	•1 a 5
Tetraploid	•1 a 6
Pentaploid	•1 a 5 jikra od 4n jikernačky
Hexaploid	•1,2/4 a 5 neredukovaná jikra od 3n jikernačky
Heptaploid	•1 a 5 neredukovaná jikra od 3n jikernačky

Gynogeneze

Androgeneze

meiotická

mitotická



Ozáření - inaktivace genomu UV zářením, gama a X zářením

Šok - diploidní jedinec - nižší stupeň heterozygotnosti

Šok - diploidní homozygotní jedinec

Šok - diploidní homozygotní jedinec

Šoky - teplotní, tlakové

Triploidizace

Tetraploidizace

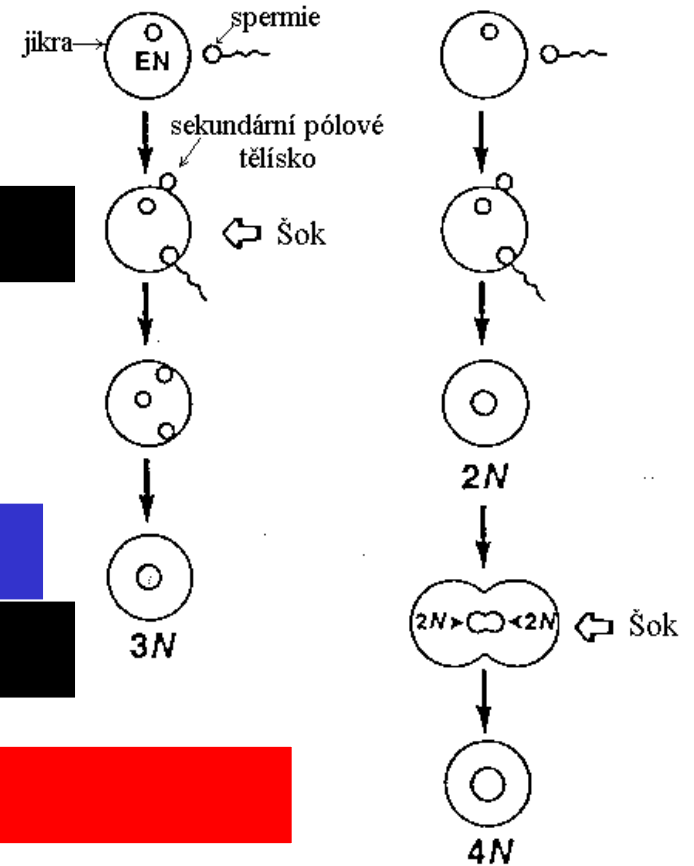
Normální aktivace

Šoky - teplotní, tlakové, elektrické

Triploidní jedinec

Šoky - teplotní, tlakové, elektrické

Tetraploidní jedinec



Induktory způsobující chromozomové manipulaci

Induktory destrující DNA: - fyzikální - UV, gama a X záření

- chemické - dimethylsulfát

Induktory aktivující biologický rozvoj:

- heterospermická inseminace – amur x tolstolobec, tilapie nilská x mosambická, lín x kapr ozářené spz,

- křížení - aktivace/oplození jiker spermatem druhů s nižším počtem chromozomů

- přirozená reprodukce - u „monosexních“ druhů

- dispermie - zvýšení heterozygotnosti produkce triploid/androgen

a) Induktory způsobující retenci polárního tělíska a supresi mitotického dělení:

- fyzikální (teplota, tlak, elektřina)

- chemické (cytochalasin B)

b) Induktory způsobující retenci polárního tělíska: - chemické (anestetikum, freon, rajský plyn)

c) Induktory způsobující supresi mitotického dělení - chemické (kolchicin)

Ploidní typy (IR – ozáření, spz=sperma)

HAPLOID - gynogenezí (aktivací IR homospecifickým spz) - tilapie

DIPLOID: GYNOGENESE

- Meiotická - aktivace IR homo nebo heterospecifickým spz + retence polárního tělíska - pstruh duhový
- Mitotická - aktivace IR homo nebo heterospecifickým spz + suprese mitot. dělení - kapr, tilapie
- Hybrid - aktivace neredukovaných hybrid jiker $2n$ x IR heterospecifickým spz - karas stříbřitý x kapr
- Křížení - aktivace IR homo nebo heterospecifickým spz + jikry od tetraploida - piskoř
- Přírozeně - aktivace heterospecifickým spz - lín jikernačka x kapr mlíčák

DIPLOID: ANDROGENESE

- Přírozeně - aktivace heterospecifickým spz kapr jikernačka x amur bílý mlíčák
- Mitotická - aktivace IR jiker homo/heterospecifickým spz + suprese mitot. dělení - pstruh, kapr/ tilapie nilská x tilapie aurea
- Křížení - aktivace IR jiker homospecifickým spz od tetraploidního samce - pstruh
- Hybrid - aktivace IR jiker x neredukovaných hybridů spz $2n$ - karas stříbřitý x kapr
- Dispermií - aktivace IR jiker x 2 spermie - jeseter malý x j. sibiřský

TRIPLOIDIE

- Přirozeně - spontánně retencí polárního tělíska - lín
- Křížení - tetraploidní jikernačka/mlíčák x diploidní mlíčák/jikernačka – piskoř, pstruh duhový
- Indukce meiotická - homospecifické spz a retence polárního tělíska - lín, kapr
- Hybrid - heterospecifické spz a retence polárního tělíska - kříženci piskořů
- Dispermie - homospecifické/heterospecifické 2 spz - tolstolobec bílý x pestrý
- Monosexní - X/Y spz a retence polárního tělíska - kapr/rájovec
- Trigenomická - nerdukovaná jikra hybrida $2n$ x spz třetího druhu - trihybrid medaka (halančík)
- Gynogeneze - heterospecifické spz x nerdukované jikry $3n$ (karas stříbřitý x kapr)

TETRAPLOIDIE

- Křížení - tetraploidní jikernačka x tetraploidní mlíčák - piskoř
- Indukce meiotická - spz - tetraploidního mlíčáka x retence polárního tělíska - jikry - pstruh
- Indukce mitotická - suprese mitotického dělení - kapr, lín, pstruh
- Gynogeneze meiotická - spz IR u jiker tetraploidní jikernačky - piskoř
- Gynogeneze mitotická - spz IR u jiker tetraploidní jikernačky - piskoř
- Hybrid - oplození nerdukované hybridní jikry $2n$ x nerdukované hybridní spz $2n$ (karas stříbřitý x kapr)

PENTAPLOIDIE

- Křížení - oplození neredukované jikry $4n$ x normální spz - pstruh duhový
- Indukce meiotická - spz diploidní mlíčák x jikra tetraploidní jikernačka+retence polárního tělíska - piskoř

HEXAPLOIDIE

- Křížení - oplození neredukované jikry $4n$ x spz tetraploidní mlíčák $2n$ - pstruh duhový
- Indukce meiotická - spz tetraploidního mlíčák x jikra tetraploidní jikernačka+retence polárního tělíska - piskoř

HEPTAPLOIDIE

- Indukce meiotická - spz diploidní mlíčák x jikra „hexaploidní“ nebo $3n$ jikernačka+retence polárního tělíska - piskoř

Metody určení ploidní úrovně

- průtoková cytometrie, cell counter - kvantifikace DNA u čerstvých nebo fixovaných vzorků
- karyotypy - vždy používaná pro určení přesné úrovně
- velikost jader erytrocytů - čerstvé nebo fixované buňky
- podle počtů NORs - organizátorů jadérek - méně přesné (4n pstruh duhový 2 NOR, 3n kapr - 3-2 NOR, 3n tilapie - 3-2 NOR, kapr 2N - játra 1 NOR 95 % a 2 NOR 5 %, ploutev 50/50 % 1/2 NOR.
- Molekulární markry - používá se
- transplantace - u klonů a inbredních linií

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

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



Barva jako vhodný mákr ukazatel
indukce androgeneze, gynogeneze,
triploidie

Ošupení u kapra



GYNOGENEZE

Inaktivace genomu u kapra

Ozařování UV

- ředění spermatu - KUROKURA, fyziologický roztok pro kapra
- úroveň ředění podle hustoty spermatu - 1:6 - 1:10 - kapra, jiné druhy od 1:4 do 1:100
- Petriho miska průměr 8 cm, objem 2 ml - max. rozprostření
- rotace Petriho misek
- dávka 4000 μJ x 100 x cm^2 , nebo 1600 μW x cm^2 po dobu 6 min

Ozařování Gama

- dávka 1200 Gy po dobu do 2 hodin podle výkonu zářiče

Šoky v průběhu gynogeneze

Meiotická

- kapra - 40 °C, 1,5 min, 2-4 min po aktivaci; 0-4 °C, 45-60 min, 1-9 min po aktivaci (ink. 20 °C)
- lín - 0-2 °C, 30 min, 5 min po aktivaci (ink. 20 °C)
- tilapie nilská - 41 °C, 3,5 min, 5 min po aktivaci; 14 °C, 60 min, 5 min po aktivaci; 600 atm., 2 min, 7 min (ink. 25 °C)
- pstruh duhový - 26 °C, 20 min, 25 min po aktivaci; 650 atm, 6-10 min, 5 min po aktivaci (ink. 10 °C)
- veslonos americký - 35 °C, 2 min, 16-18 min po aktivaci (ink. 16-18 °C)

Mitotická

- kapr - 40,5 °C, 1,5 min, 26/32 min po aktivaci (ink. 24/20 °C)
- tilapie nilská - 41 °C, 3,5 min, 27,5-30 min po aktivaci; 600 atm., 2 min, 40-50 min po aktivaci (ink. 25 °C)
- pstruh duhový - 550 atm., 4 min, 40 min po aktivaci (ink. 10 °C)

Líhnivost v průběhu gynogeneze

Homologní sperma

- Meiotická - pstruh duhový (šok teplý 48%, tlakový 60 %), kapr (šok teplý 29%, chladový 38 %), tilápie nilská (šok teplý 19%, chladový 20, tlakový 27 %),
- Mitotická - pstruh duhový (šok tlakový 5 %), kapr, KOI (šok teplý 1-15%), tilápie nilská (šok teplý 1-2%, tlakový 1-2 %),

Heterologní sperma

- Meiotická - pstruh duhový divoký typ x albinotický (teplý šok 63 %), lín x kapr (chladový šok 21 %)
- Mitotická - tilapie nilská x kapr (tlakový šok 25 %)

Příklad změny líhnivosti při různé technice gynogeneze u piskoře

- jikernačka 2n x mlíčák 2n, spz homologní IR - 41 % po 6 měsících 10 %
- jikernačka 2n meiotická gynogeneze šok x mlíčák 2n, spz heterologní IR - 47 % po 6 měsících 4%
- jikernačka 4n x mlíčák 2n, spz heterologní IR - 31 % po 6 měsících 2%
- jikernačka 4n x mlíčák 2n, spz homologní IR - 4 % po 6 měsících pod 1 %

Parametry gynogenetických ryb

Meitoická (ME) gynogeneze - tzv. heterozygotní gynogeneze, možnost produkce heterozygotů, imbrední deprese je na úrovni 2 křížení bratr x sestra, potomstvo x rodiče.

Mitotická (MI) gynogeneze - tzv. homozygotní gynogeneze - produkce klonů za dvě generace, imbrední deprese na úrovni 3-4 křížení bratr x sestra, potomstvo x rodiče.

a) Růst

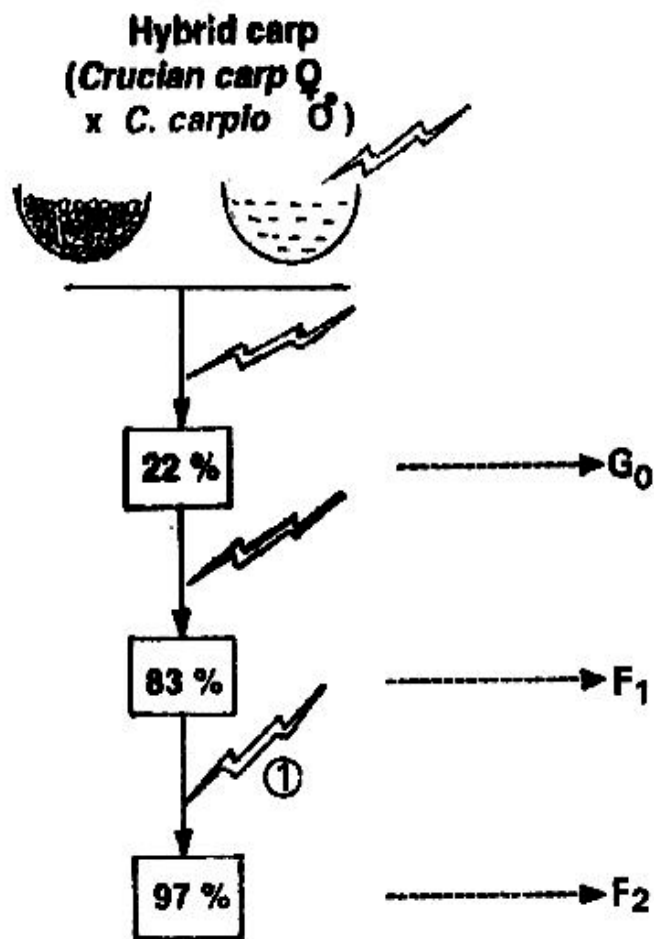
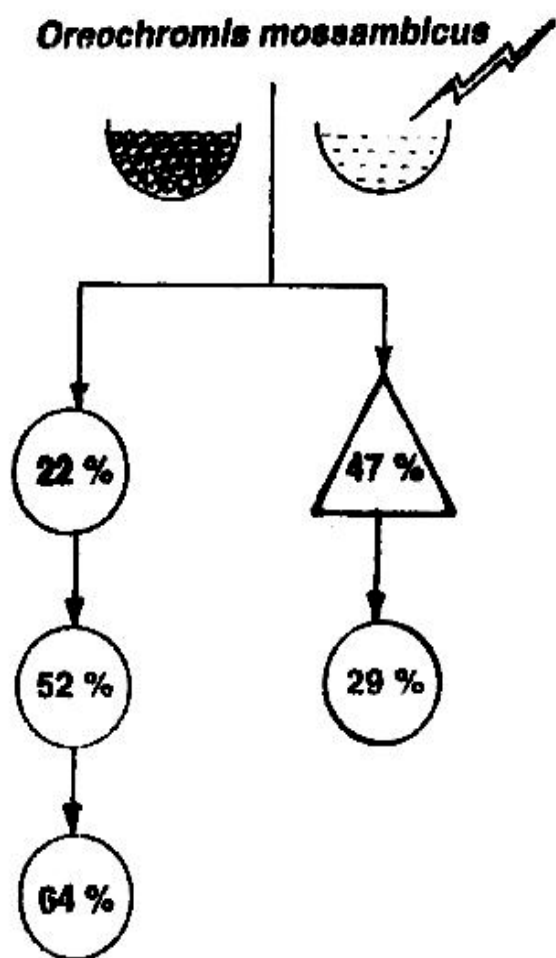
- pstruh duhový ME gynog. - 1 %, MI gynog. - 47 % (sníženo přežití a GSI na polovinu)
- kapr obecný ME gynog. - 22%
- Lín obecný ME gynog F1 - 20 % (vyšší GSI, zvýšení mateřského efektu), F2 - 50 % (vyšší GSI)
- piskoř ME gynog - 60 %
- *Plecoglossus altivelis* – aju východní ME gyn + 2 %, MI +15 %
- *Clarias macrophalus* ME gyn +18 %

b) Poměr pohlaví

- 100:0 - kapr, lín, pstruh duhový
- 94-7: 6-3 pstruh duhový, kapr, tilapie nilská, zebřička pruhovaná (vyšší příbuznost)
- 50 : 50 kapr MI gyn, tilapie nilská
- 50-67:33-50 tilapie aurea - typ abraxa

Přežití gynogenetického potomstva tilápie se zvyšuje

Oplozenost se zvyšuje u gynogenetického potomstva hybridogenezí karasa stříbřitého a kapra obecného



kroužek - mitotická gynogeneze

trojuhelník – meiotická gynogeneze

čtverec - aktivace hybridních 2n vajíček

ANDROGENEZE

Inaktivace genomu

Ozařování UV kapr

- ředění jiker (jsou lepkavé) - fyziologický roztok pro jeseterovité
- úroveň ředění podle hustoty - 8 ml : 1 g, Petriho miska průměr 8 cm
- rotace Petriho misek
- dávka 2000 μJ x 100 x cm^2 , nebo 800 μW x cm^2 po dobu 6 min

Záření gama nebo X

- kapr - X záření 25-30 kR (kR – kilo rady)
- pstruh duhový - gama záření 40 kR

Ošetření v průběhu androgeneze

- Šoky - tlakové (pstruh duhový, piskoř), teplé - kapr, tilapie
- Dispermie - jikra kapra x spermie karas stříbřitý; jikra jesetera malého x sperma jesetera sibiřského

Použití spermatu, líhnivost a kontrola

- pstruh duhový - inbrední šok v mitóze 7%; outbrední šok v mitóze 9 %
- kapr - outbrední šok v mitóze 9-15 %; karas stříbřitý 1 %
- tilapie nilská - outbrední po rozmrazení 3 %

Příklad dosažení poměru pohlaví u pstruha duhového při využití 9 androgenetických samců

Předpoklad 100 % samců nebo 100 % jikernaček

Výsledek 5x 100 % samců

1x 100 % samic

1x 6 % samic a 94 % samců

1x 91 % samic a 9 % samců

1x 75 % samic a 25 % samců

TRIPLOIDIE

1. Oplození normální - přirozený výskyt triploidů - lín, karas stříbřitý, poecilie

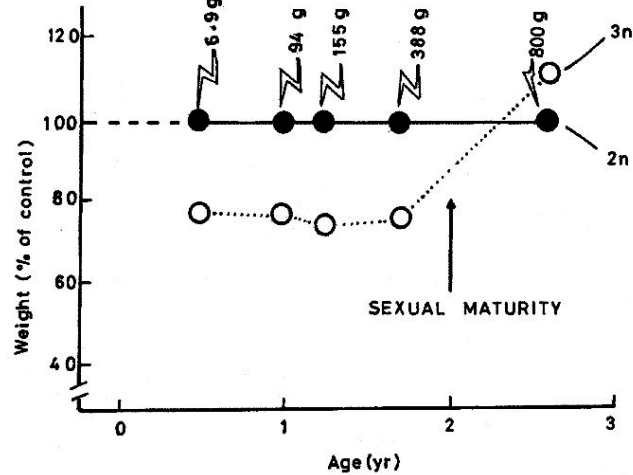
2. Indukce - šokem retence polového tělíska

- pstruh duhový - 26-27 °C, 20 min a 25 min po aktivaci
- kapr - tlakový šok 490-560 atm, 5 min po 1 min po aktivaci, studený šok 0-2 °C, 40 min a 5 min po aktivaci
- lín - studený šok 0-2 °C, 40 min a 2-5 min po aktivaci
- sumec velký - studený šok 6 °C, 20 min a 9 min po aktivaci

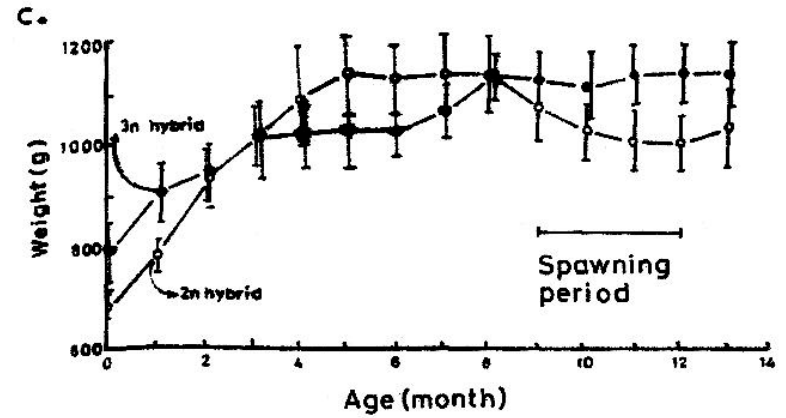
Výsledek od 80 - 100 % triploidů s líhivostí až 80 % podle jednotlivých druhů, obvykle ovšem do 20 %.

Růst triploidů

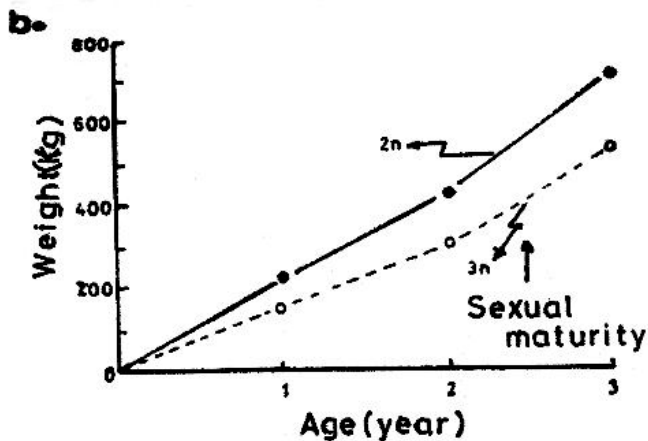
Pstruh duhový



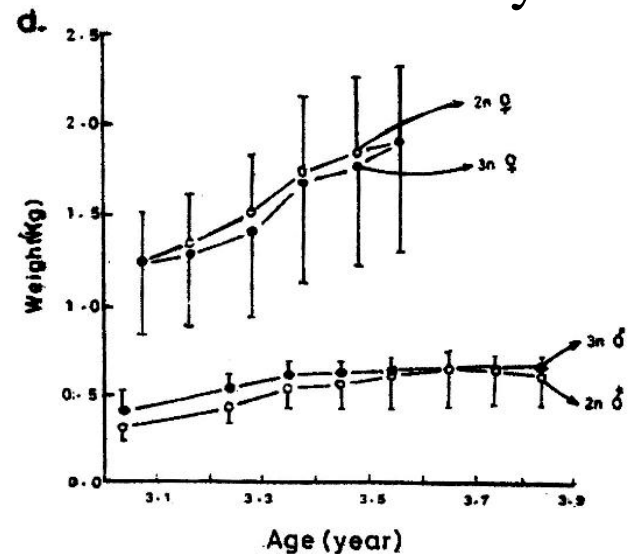
platýs



Mořský cejn



Pstruh duhový



Růst triploidů ve vztahu k diploidům

- před pohlavní zralostí - pstruh duhový 0,80-0,90; sumec velký 0,7-1,4; karas stříbřitý 1,12-1,15; okoun žlutý 0,93-1,0
- po dosažení pohlavní zralosti - pstruh duhový 1,1-1,35; kapr 0,84-1,13; lín 1,14-1,24; sumce velký 0,94; tilápie nilská 1,0-1,32;
- především salmonidae a cyhlidae rostou rychleji u ostatních není jednoznačné

Poměr pohlaví u triploidů

- karas stříbřitý 100:0, kapr 40:60, parma 0:100

GSI - lín samec 2n 0,6; 3n 0,3; samice 2n 5,2; 3n 1,3;

- kapr samec 2n 5,4; 3n 1,1; samice 2n 7,5; 3n 1,4;

- tilápie nilská 2n 0,5; 3n 0,3; samice 2n 2,5; 3n 0,1;

Endokrinní profil

- mezi 2n a 3n mlíčáky není zásadní rozdíl
- mezi 2n a 3n jikernačkami - 17 beta estradiol, vitelogenin, 11 keto testosteron - velmi nízká úroveň

Spermatogeneze u triploidů - pstruh duhový - abnormality u spermií, různá délka spermií, lín - nízká koncentrace spermií, různá délka, nižší procento pohyblivých, kapr – velké spermie a málo pohyblivé spermie, tilápie - velmi rozdílná velikost spermií

Ovogeneze

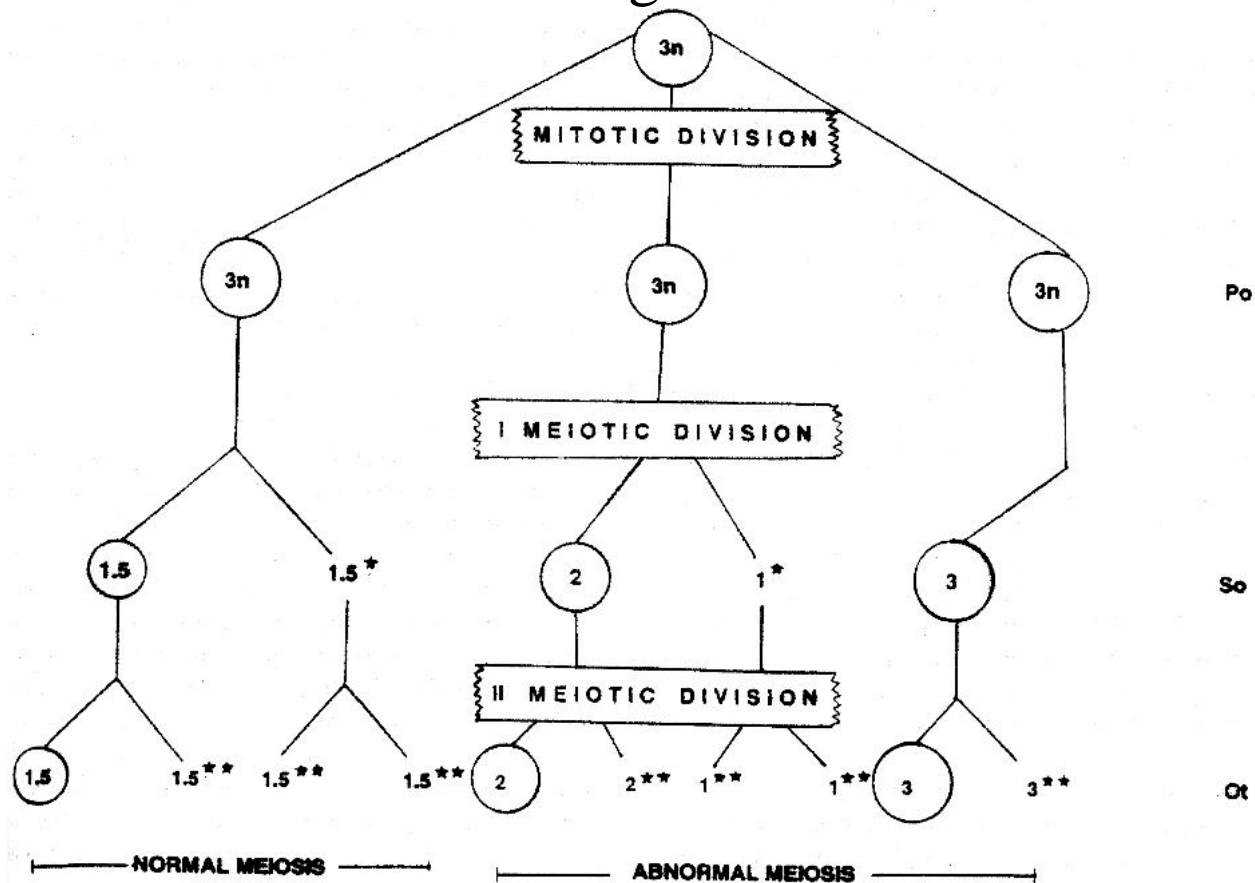


Figure 17. Oogenesis in triploids. O=oocyte/ootid; * =I polarbody; ** =II polarbody; Po=primary oocyte; So=secondary oocyte; Ot=ootid/oocyte (Source: Zhang et al., 1992b; Lu & Chen, 1993; Wu et al., 1993; Arai et al., 1995; Kurita et al.,1995) Galbreath & Thorgaard, 1995).

Hybridní triploidi a jejich reprodukce

- losos obecný x pstruh obecný - F1hybrid x losos nebo pstruh obecný = triploid
- karas stříbřitý x kapr - F10hybrid x kapra = triploid, schopný reprodukce, poměr pohlaví 1:1
- amur bílý x 4n (červený kapr x amur bílý) - zpětné křížení na amura bílého - výsledek triploidní mlíčáci a jikernačky plně fertlní
- amur bílý x 4n (červený kapr x amur bílý) - výsledek triploidní mlíčáci a jikernačky plně fertlní

Triploidní hybridi lososovitých ryb rostou rychleji než diploidní druhy.

Fyziologické funkce 3n - stejná respirační úroveň u triploidů, zvýšený hemoglobin, nižší počet červených krvinek, v lárvalním stádiu postupně dochází k poklesu počtu triploidních buněk oproti diploidním.

TETRAPLOIDIE

Přirozená nebo indukovaná

- indukce viz. Šoky při mitotické gynogenezi
- kapr - 40,5 °C, 1,5 min, 26/32 min po aktivaci (inkubace 24/20 °C)
- tilápie nilská - 41 °C, 3,5 min, 27,5-30 min po aktivaci; 600 atm., 2 min, 40-50 min po aktivaci (ink. 25 °C)
- pstruh duhový - 550 atm., 4 min, 40 min po aktivaci (ink. 10 °C)

Ploidní úroveň při křížení pstruha duhového

- 4n x 4n 3 % 2n, 92 % 4n, 1 % 6n a 5 % ostatní a
- 4n x 4n - šok ME- 21 % 2n, 5 % 4n, 51 % 6n
- 4n x 2n - 2% 2n, 92 % 3n, 6 % 6n
- 4n x 2n - šok ME - 21 % 2n, 53 % 5n
- 4n x 2n - IR, šok ME - 12 % 4n
- 4n x 2n - IR, 81 % 2n, 4 % 4n

Ploidní úrovně u piskoře ? Je potřeba doplnit!!!

(jikernačka x mlíčák; IR - ozáření)

- $2n \times 2n$
- $4n \times 4n$
- $2n \times 4n$
- $4n \times 2n$
- $4n \times 2n$ šok
- $4n \times 2n$ IR
- $4n \times$ kapr IR
- $4n \times$ kapr IR, šok
- $2n \times$ *Gnathopogon elongatus* – hrouzenka protáhlá IR
- $2n \times$ *Gnathopogon elongatus* IR, šok

Vliv velikosti jiker u piskoře na přežití

Růst tetraploidů pomalejší u lososovitých ryb - F1 o 50 %, F2 o 20 %, F3 obdobná

Důvod produkce tetraploidů - možnost produkce triploidů křížením s tetraploidy