

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ  
VE VODŇANECH

## PRODUKCE TRIPLOIDNÍCH LÍNŮ

EDICE | METODIK





JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ VE VODŇANECH  
Oddělení genetiky a šlechtění ryb se šlechtitelskou stanicí

M. FLAJŠHANS, O. LINHART

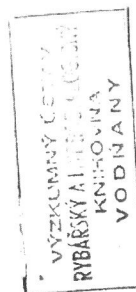
## PRODUKCE TRIPLOIDNÍCH LÍNŮ

č. 62

Vodňany

2000

ISBN 80-8588-29-0



## 1. Úvod

Pojem *triploidie* je charakterizován přítomností tří sad chromozomů v somatických buňkách jedince. Tento stav může za určitých okolností u ryb po oplodnění oocytem vzniknout samovolně (viz např. Kvasnička a Flajšhans, 1992), a nebo může být cíleně vyvolán řadou fyzikálních nebo chemických zásahů neboť šoků do vývoje zárodku krátce po oplodnění. Takové umělé navození triploidní konstituce nazýváme *triploidizací*.

U triploidních ryb obecně je v závislosti na pohlaví a stupni vývoje pohlavních orgánů, resp. jejich sterilizace dosahováno větší konečné velikosti triploidů a jejich rychlejšího růstu. To bylo prokázáno např. u lososovitých (Thorgaard a Gall, 1979; Lincoln a Scott, 1984; Lincoln, 1987), u lina obecného (Flajšhans et al. 1993a,b; Korvini-Kossakowski, 1993; Flajšhans, 1997) i u dalších druhů. V testech užítelnosti triploidů však nebyly získány zcela jednoznačné výsledky. Příkazně zvýšení finální hmotnosti triploidů proti diploidům popsali u pstruha duhového např. Chourrou et al. (1986), Ihsen et al. (1990) a další, u lososa obecného např. Benfey a Suterlin (1984), u kapra obecného Taniguchi et al. (1986) a Mejza et al. (1993), u lina obecného Flajšhans et al. (1993b), u sumečka skvrnitého Wolters et al. (1982). Řada dalších studií naproti tomu růstový potenciál triploidů pro akvakulturu nepotvrdila: nepřikazné růstové rozdíly nebo nižší růst triploidů proti diploidům zjistili u pstruha duhového a mořské formy pstruha obecného Bonnet et al. (1997); u kapra obecného Gervai et al. (1980), Chertias et al. (1994), Flajšhans et al. (1994); u sumce velkého Linhart et al. (2000). Řada autorů dosla ke stejnému výsledku u tilapie rodu *Oreochromis* (viz přehled Nair, 1993).

Většina těchto studií se shoduje v tom, že triploidní jedinci dosahují vyšší výtežnosti a nižšího gonadosomatického indexu (relativní podíl hmotnosti gonád vůči živé hmotnosti) vzhledem k nižšímu stupni vývoje gonád triploidů, a dále v konstatování vyšší růstové schopnosti triploidních jikernáčků proti triploidním mlíčákům u druhů, kde je rozdílná růstová schopnost projevem pohlavního dimorfismu.

Na rozdíl od diskutabilní růstové schopnosti triploidů je nesporným přínosem pro akvakulturu skutečnost, že během reprodukčního období u triploidů nedochází k odčerpávání energetických zásob ze svaloviny, a proto její vybarvení a obsah tuků zůstávají vysoké a obsah vody ve svalovině je nižší než u diploidů (Lincoln, 1987). Pro vyrovnanou kvalitu tržního produktu tak pouze ve Francii v roce 1996 bylo vyprodukováno 4 000 t tržního triploidního pstruha duhového a dalších 600 t tržního triploidního pstruha potocišního (Haffray et al., 1997).

Sterilita triploidních ryb se rovněž s výhodou využívá při vysazování nepůvodních druhů ryb do volných vod tam, kde legislativní aspekty ochrany původní ichtyofauny nepovolují vysazovat jedince schopné rozmnožování. Triploidní amur blý je takto používán k eliminaci přemnožených vodních porostů v USA (viz přehled Mikešové, 1995) a na Novém Zélandě (McCarter, 1988); triploidní siven americký, který je autochonní pouze na východě Severní Ameriky, je takto pro vyšší odolnost proti chladu vysazován do rybářských revířů na pacifickém pobřeží (Cotley-Smith, 1991), aj.

## Lektoroval:

Ing. Petr Ráb, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, 277 21 Liběchov

## Adresy autorů:

Ing. Martin Flajšhans, Ing. Otomar Linhart, DrSc., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, oddělení genetiky a šlechtění ryb se šlechtitelskou stanicí, 389 25 Vodňany  
e-mail: [flajshans@vuth.jcu.cz](mailto:flajshans@vuth.jcu.cz) [linhart@vuth.jcu.cz](mailto:linhart@vuth.jcu.cz)

V edici Metodík vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech s podporou projektu ER0960996051 a J06 96:126100001 – Naklad: 150 ks – Tisk: Tiskárna Public – M. Kreuz, 389 01 Vodňany

Svobodová, Z., Pravda, D., Paláček, J., 1986, Jednotné metody hematologického vyšetření ryb, VÚRH, edice Metodik, č. 22, 36 s.

Svobodová, Z., Kolářová, J., Flajshans, M., 1998, The first findings of the differences in complete blood count between diploid and triploid tench, *Tinca tinca* L., Acta Vet. Brno, 67, 243-248.

Taniguchi, N., Kijima, A., Tamura, T., Takegami, K. and Yamasaki, I., 1986, Color, growth and maturation in ploid manipulated fancy carp, *Aquaculture*, 57, 321-328.

Thorgaard, G.H., Gall, G.A.E., 1979, Adult triploids in a rainbow trout family, *Genetics*, 93, 961-973.

Wolters, W.R., Chrisman, C.L., Libey, G.S., 1982, Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), *J. Fish Biol.*, 20, 253-258.

## Poděkování

Výzkumné práce, na jejichž základě vznikla tato metodika, byly umožněny autorům díky projektu Ministerstva zemědělství ČR, NAZV č. EP0960996051 a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR, č. CEZ:106/98:126100001.

Poděkování autorů náleží lektorovi a Ing. Marku Rodinovi za technickou spolupráci.

## 2. Charakteristika triploidního lina

Exterierová charakteristika triploidního lina byla publikována samostatně jako Metodika VÚRH (Kvasnička a Flajshans, 1992).

U samčího pohlaví (jikernaček) je triploidie spojena s retardací vývoje ovarií, a tím se sterilitou. Při makroskopickém vyšetření triploidních tržních linů v reprodukčním období, tj. linů čtyřletých a starších, jsou ovariá viditelná jako dva tenké provazce tkáně. Často jsou obalena tukovými depozity v břišní dutině. Svou velikostí a strukturou odpovídají ovariá triploidních jikernaček v tržní velikosti ovariím juvenilních diploidních jikernaček v druhém roce života. V histologickém nálezu převažuje výskyt zárodečných buněk (oogonií), z vyšších stádií oogeneze lze zjistit oocyt v protoplazmatickém růstu a vzácně oocyt ve vakulizaci.

U samčího pohlaví (mlíčáků) je triploidie spojena s částečnou retardací vývoje varlat. Při makroskopickém vyšetření triploidních tržních linů v reprodukčním období, tj. linů čtyřletých a starších, jsou varlata viditelná buď podobně jako u triploidních jikernaček jako dva tenké bělavé provazce tkáně nebo jejich makroskopický obraz může odpovídat diploidním mlíčákům ve třetím roce života. Častý je výskyt tukových depozit v břišní dutině. V histologickém nálezu převažuje výskyt zárodečné tkáně (spermatogonií). Lze však nalézt všechna vývojová stadia spermatogeneze. Spermiie triploidních linů jsou aneuploidní a nejsou schopny oplození.

U triploidních linů je retardovaný růst gonád spojen s akcelarováním somatickým růstem oproti rybám diploidním v období jejich pohlavního dozrávání, neboť energie získávaná z potravy je předisponována ve zvýšené míře do somatického růstu.

V kontrole uživatosti tak triploidní jikernačky lina v tržní velikosti nad 400 g dosáhly o 13,52% vyšší hmotnosti než diploidní jikernačky stejného původu a jejich gonadosomatický index byl čtvrtinový vůči těmto diploidním jikernačkám (Flajshans et al., 1995). Triploidní mlíčáci v tržní velikosti dosáhli až o 23,66% vyšší hmotnosti než diploidní mlíčáci stejného původu, ale jejich gonadosomatický index tvořil 60% hodnoty diploidních mlíčáků.

Podmínkou manifestace akcelarování somatického růstu triploidních linů je vhodný způsob odchovu, v monokultuře nebo ve vhodné zvolené polykultuře, např. s býložravými rybami. Podle Sedláčka (1999) se např. při nevhodné polykultuře silná potravní konkurence kapra projevila na růstové depresi triploidních mlíčáků 2,6krát silněji než u diploidních mlíčáků a na růstové depresi triploidních jikernaček až 2,9krát silněji než u diploidních jikernaček.

## 3. Umělá indukce triploidie

### 3.1. Hormonální stimulace generačních linů

Předem vybrané jikernačky lina se stimuluji k vývěru jednorázovou vnitrosvalovou injekcí roztoku Kobarelinu [syntetického analogu (D-Ala<sup>6</sup>)LH-RH Pro NHEU] ve fyziologickém roztoku v dávce 5 µg.kg<sup>-1</sup> živé hmotnosti ryby. Injekce se provádí obdobně jako u kapra, tj. ze strany pod hřbetní ploutev. K ovulaci dojde při teplotě vody 22 – 25 °C za 24 až 30 hodin (Kouril et al., 1986).

Stimulace mlíčáků lina ke spermiaci se provádí jednorázovou vnitrosvalovou injekcí kapří hypofýzy, rozeřené a rozpuštěné ve fyziologickém roztoku, v dávce 1,0 mg.kg<sup>-1</sup> živé hmotnosti ryby. Optimální doba k odběru spermatu je po 24 hodinách, případně ještě i po 48 hodinách působení hormonu při teplotě vody 21 – 22 °C (Linhart a Billard, 1995).

### 3.2 Příprava imobilizačního roztoku pro spermie lina

Imobilizační roztok pro spermie lina podle Linharta a Kvasničky (1992) se připravuje vždy čerstvý pro každý výěr podle následujícího rozpisu:

na 1 litr destilované vody:

- 5 g NaCl
- 2 g KCl
- 8 g glycerinu

Před odběrem spermatu plníme imobilizačním roztokem jednorázové 10-20 ml injekční stříkačky do poloviny objemu. Injekční stříkačky s roztokem můžeme uchovávat v lednici maximálně po dobu 48 hodin, dvě hodiny před odběrem spermatu je vyjme z lednice a ponecháme při pokojové teplotě (cca. 20°C).

### 3.3 Anestézie, umělý výěr a odběr pohlavních produktů

Před umělým výěrem generální ryby anestézuje vhodným přípravkem pro ryby (např. 2-phenoxyethanol, Merck, v současné době dodává JU VÚRH Vodňany; dávkování 1-3 ml na 10 l vody).

Generální ryby se vytírají klasickou suchou metodou. Při výěru mlíčka se snažíme rybu nejdříve zbavit moči masáží břišní partie od břišních ploutví směrem k ocasu. Moč je bezbarvá a při výěru se uvolňuje proudem. Sperma bývá moči kontaminováno a přítomnost spermatu poznáme podle bělavého nebo opalizujícího zbarvení tekutiny. V tom případě již tekutinu odsáváme. Jinak odsáváme během masáže břišní partie mlíčka od prvních ploutví směrem k ocasu kapky ejakulovaného spermatu. Sperma vždy odsáváme do jednorázových plastových 10-20 ml injekčních stříkaček s přebýtkem imobilizačního roztoku maximálně do poměru spermatu : imobilizačnímu roztoku 1 : 2. Injekční stříkačky se spermatem v imobilizačním roztoku uchováváme do doby použití v lednici nebo v přenosném polystyrenovém tepelně izolovaném kontejneru s chladičnými vložkami nebo drceným ledem při teplotě 0 až -4°C, nejdéle však po dobu 4 – 5 hodin.

Při výěru jikernáček odebráme jikry do předem zvážených suchých misek a jikry se váží. Přepočtem (v 1 g jiker je cca. 1 600 kusů jiker) se zjišťuje pracovní plodnost jikernáček, což je důležité k vyhodnocení účinnosti chlazeného šoku. Údaje se zaznamenávají do výěrových listů. Misky s jikrami se přikryjí čistou vlnkou utěrkou. Tímto způsobem je možné krátkodobě (půl hodiny až 1 hodinu) uchovávat např. ve stínu na chladné podlaze linač.

### 3.4 Osemenění, oplození, aktivace gamet a odlepkování jiker

Před oplozením se dávky spermatu v imobilizačním roztoku od jednotlivých mlíček smísí v suché čisté odměrné nádobě a dále se pracuje s tzv. heterospermatem. Heterosperma na jikry dáváme velkoobjemovou mikropipetou, čistou injekční stříkačkou nebo klasickou pipetou.

Protože se kvalita jiker od různých jikernáček může lišit, přednostně pracujeme s navázanou směsí jiker od různých jikernáček. Směs jiker oplozujeme heterospermicky v dávce 2 ml heterospermatu v imobilizačním roztoku i u každých 100 g jiker. Aktivace se provádí okamžitě po osemenění pomocí desetinasobného množství vody, než bylo množství heterospermatu v imobilizačním roztoku. K aktivaci používáme čistou vodu z linač o teplotě

Korwin-Kossakowski, M., 1993. Lin triplodální - možliwa przyczyna niepowodzenia tarlowych. Komunikaty Rybackie, 6: 11-12.

Kouřil, J., Barth, T., Hamáček, J., Flegel, M., 1986. Induced ovulation in tench, *Tinca tinca* L. by various LH-RH synthetic analogues: Effect of site of administration and temperature. *Aquaculture*, 54: 37-44.

Kvasnička, P., Flajšhans, M., 1993. Metoda morfologické identifikace triploidů v remonitních hejnech lina. Vodňany, VÚRH, edice Metodik, č. 42, 8 s.

Linhart, O., Kvasnička, P., 1992. Artificial insemination of tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture and Fisheries Management*, 23: 125-130.

Linhart, O., Billard, R., 1995. Biology of gametes and artificial reproduction in common tench (*Tinca tinca* L.). A review. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 42(1-2): 37-56.

Linhart, O., Gela, D., Flajšhans, M., Duda, P., Rodina, M., Novák, V., 2000. Enzyme treatment a way for elimination of egg stickiness in tench, *Tinca tinca* L. *Aquaculture* (v tisku).

Linhart, O., Haffray, P., Ozouf-Costaz, C., Flajšhans, M., Vandepitte, M., 2000. Triploidization of European catfish (*Silurus glanis* L.) with heat-, cold-, hydrostatic pressure shock and growth experiment. *Aquaculture* (v tisku).

Lecommandeur, D., Haffray, P., Philippe, L., 1994. Rapid flow cytometry method for ploidy determination in salmonid eggs. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25: 345-350

Lincoln, R.F., 1987. Triploid rainbow trout. *Trout news* (MAFF Lowestoft), 1: 13-16.

Lincoln, R.F., Scott, A.P., 1984. Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 25: 385-392.

Mair, G.C., 1993. Chromosome-set manipulation in tilapia – techniques, problems and prospects. *Aquaculture*, 111: 227-244.

McCarter, N., 1988. Verification of the production of triploid grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) with hydrostatic pressure. *New Zealand J. Marine & Freshwater Research*, 22: 501-505.

Mejza, T., Malczewski, B., Koldras, M., Bieniarz, K., 1993. Wyniki badań nad populacjami poliploidalnymi karpia. *Komunikaty Rybackie*, 2: 19-20.

Mikešová, J., 1995. Možnosti přirozené reprodukce amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) v nových místech jeho rozšíření vlivem introdukce. *Bull. VÚRH Vodňany*, 31(4): 124-132.

Sedláček, P., 1999. Studium vybraných morfologických, fyziologických a užitkových parametrů triplodního lina obecného (*Tinca tinca* L.). Diplomová práce MZLU Brno, 81 s.

## 6. Použitá literatura

- Benfey, T.J., Sutterlin, A.M., 1984 Growth and gonadal development in triploid landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 41: 1387-1392.
- Bonnet, S., Haffray, P., Blanc, J.M., Vallée, F., Vauchez, C., Fauré, A., Fauconneau, B., 1999. Genetic variation in growth parameters until commercial size in diploid and triploid freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and seawater brown trout (*Salmo trutta*). Aquaculture, 173: 359-375.
- Corley-Smith, G.E., Tsumura, K., Siemans, M., Godin, T.J., Donaldson, E.M., McKeown, B.A., 1991. Preservation of wild stocks by triploid sterilization of introduced brook trout (*Salvelinus fontinalis*). In: NATO-ASI Genetic Conservation of Salmonid Fishes, Moscow (Idaho) and Pullmann (Washington), USA, June 24 - July 5, 1991.
- Flajšhans, M., 1997. A model approach to distinguish diploid and triploid fish by means of computer-assisted image analysis. Acta Vet. Brno, 66: 101-110.
- Flajšhans, M., Ráb, P., Dobosz, S., 1992. Frequency analyses of active NORs in nuclei of artificially induced triploid fishes. Theor. Appl. Genet., 85, pp.68-72.
- Flajšhans, M., Kvasnička, P., Ráb, P., 1993a. Genetic studies in tench (*Tinca tinca* L.). A high incidence of spontaneous triploidy. Aquaculture, 110: 243-248.
- Flajšhans, M., Linhart, O. and Kvasnička, P., 1993b. Genetic studies of tench (*Tinca tinca* L.): induced triploidy and tetraploidy and first performance data. Aquaculture, 113: 301-312.
- Flajšhans, M., Kvasnička, P., Linhart, O., 1994. Charakteristika užítkovosti uměle indukovaného triploidního kapra (*Cyprinus carpio* L.). Bull. VÚRH Vodňany 30(2): 56-63.
- Gervai J., Péter, S., Nagy, A., Horvath, L., Csányi, V., 1980. Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio* L. J. Fish Biol., 17: 667-671.
- Haffray, P., Vauchez, C., Rault, P., Reiffay, M., 1997. Transfer of know-how for genetic improvement of fish commercial broodstocks in France from 1991 to 1996. In: McAndrew (Ed.) Vllth. Int. Symposium on Genetics in Aquaculture, 24-28 June 1997, Univ. Stirling, Scotland. Book of Abstracts, 1 p.
- Cherfas, N.B., Gomelsky, B., Ben-Dom, N., Peretz, Y., Hulata, G., 1994. Assessment of triploid common carp (*Cyprinus carpio* L.) for culture. Aquaculture, 127: 11-18.
- Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G. and Renard, P., 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females - potential of tetraploid fish. Theor. Appl. Genet., 72: 193-206.
- Ihsen, P.E., McKay, L.R., McMillan, I. and Phillips, R.B., 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: Cyrogenetic and fisheries applications. Trans. Amer. Fish. Soc., 119: 698-717.

20°C, při vyšší nebo nižší teplotě vody se zrychluje nebo zpomaluje II. fáze meiotického dělení a chladový šok tak může zvýšit mortalitu jiker nebo snížit množství indukovaných triploidního plůdku. *Od okamžiku aktivace gamet se měří čas!*

Po 2 minutách od aktivace gamet se provede odlepkování enzymem alkalázou (Alcalase, Merck EC 3.4.21.14.) podle metodiky Linhart et al. (2000). Podle kvality vody v líně se enzym dávákuje následovně:

- 7.5 – 10 ml enzymu (nižší dávka pro čistiší vodu) do
- 992,5 – 990 ml vody z líně o teplotě 20°C

Přidává se 100 ml roztoku enzymu na 100 g jiker, roztok se přilije do misky s jikrami, z nichž byla předem slita voda. Odlepkování se provádí opatrným mícháním jiker s enzymem po dobu 2 min.

Těsně před ukončením odlepkování se enzym slije a přesně dvě minuty od začátku odlepkování se jikry 3krát po sobě propláchnou čistou vodou z líně o teplotě 20°C. Po zbývající dobu do 5 minut od aktivace gamet do počátku šoku jsou jikry inkubovány opět v čisté vodě při teplotě 20°C. Ve 4 min 30 s po aktivaci gamet začneme slévat z jiker přebytečnou vodu.

### 3.5 Triploidizace chladovým šokem

Předem je nutno si připravit ve velké nádobě zásobu vody s dostatečným množstvím ledové tříště. Teplota vody s ledovou tříští musí být +2°C.

Chladový šok u jiker navodíme 5 min po aktivaci gamet přidáním vody s ledovou tříští o teplotě +2°C. Teplotu pravidelně kontrolujeme a udržujeme opakovaným přidáváním vody s ledovou tříští. Působení chladového šoku jsou jikry vystaveny po dobu 35 min. Během této doby občas promícháme jikry krouživými pohyby misky.

Po ukončení šoku po 35 minutách, tedy celkem po 40 min od aktivace gamet slijeme vodu s ledovou tříští z jiker a jikry vysazujeme do líhářských aparátů (např. Žugských lahvi o objemu 7-10 l), zásobovaných vodou o teplotě cca 20°C.

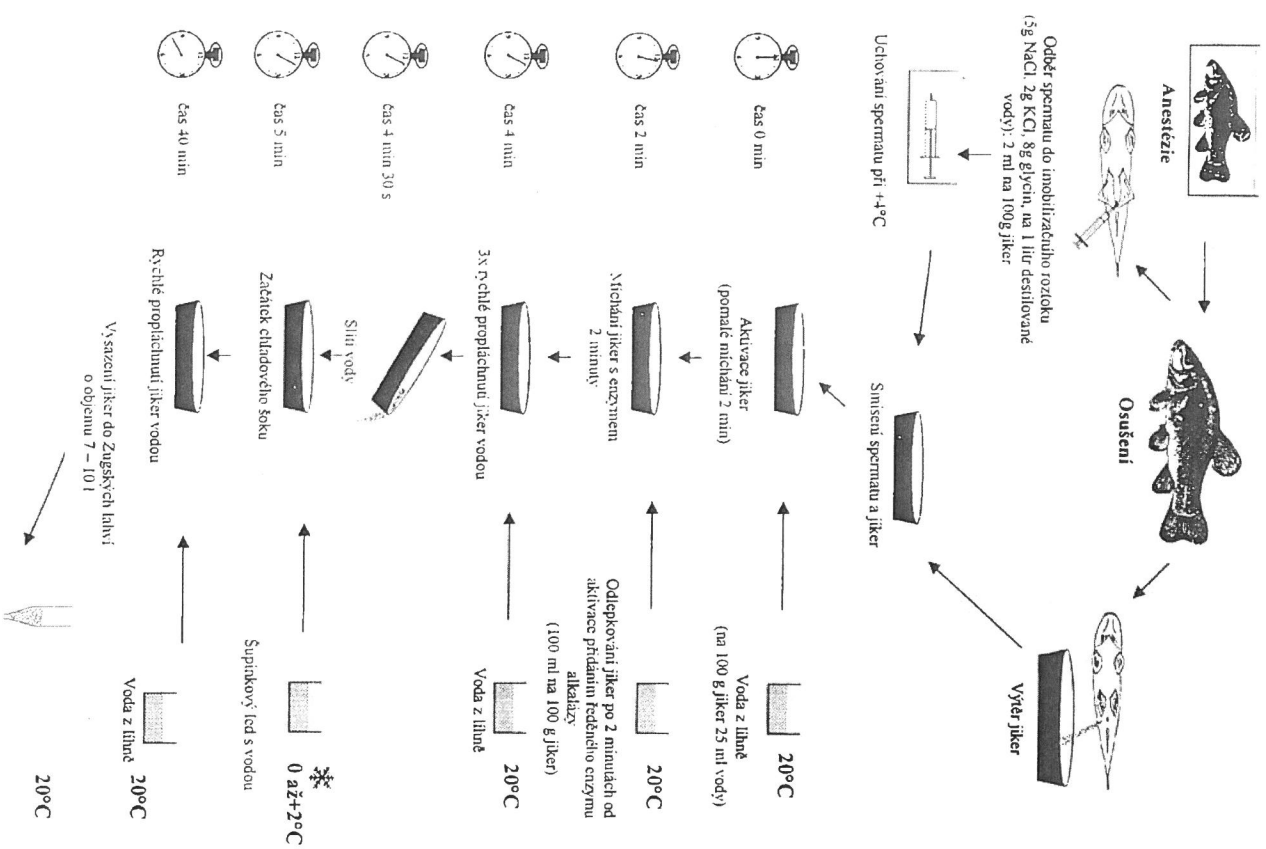
Rekapitulace celého postupu umělého výtěru, oplození, aktivace gamet, odlepkování a triploidizace je uvedena na obr. 1. Touto metodou lze získat 100% triploidního plůdku lina.

### 3.6 Opatření během inkubace jiker

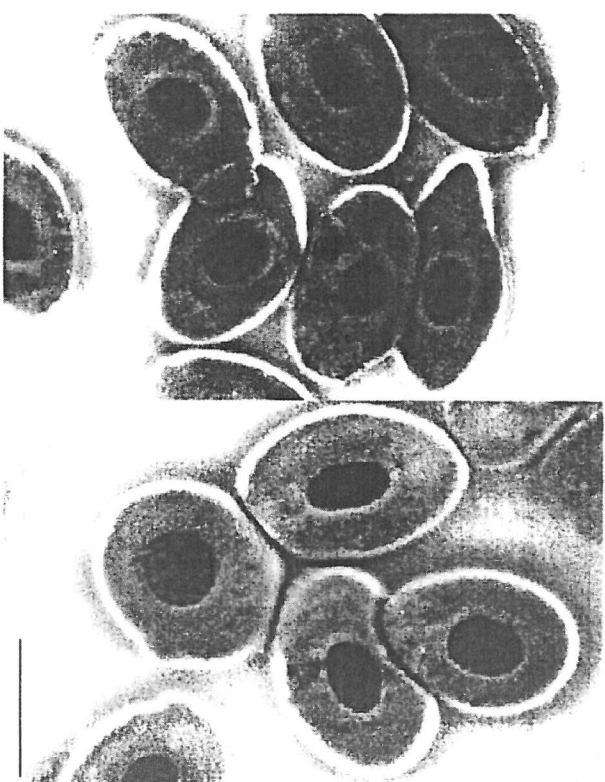
Vzhledem k tomu, že triploidizace chladovým šokem může zvýšit mortalitu jiker proti kontrole, při čemž za kontroly (tj. 100% živých jiker) považujeme klasicky odinkubované jikry z těchto generačních ryb a téhož výtěru, je třeba věnovat zvýšenou pozornost odebrání mrtvých jiker z inkubačních aparátů a protipišňovým koupelím jiker do stadia očních bodů. Další postup odpovídá konvenci metodě inkubace jiker a kulení plůdku. Údaje o mortalitě jiker a kulení plůdku se zaznamenávají do výřetrových listů.

## 4. Výhodnocení účinnosti triploidizace

Účinnost triploidizace lze zjistit stanovením ploidie v souboru vzorků minimálně 33 kusů lina. V dostatečně velkém souboru vzorků lze % triploidů ve vzorku považovat za % úspěšnosti indukce triploidie.



Obr. 1: Schéma umělého výtěru, osemnění, oplodnění, aktivace gamet a hromadné triploidizace jiker lina chladyým šokem



Obr. 4: Digitalizovaný snímek erytrocytů diploidního (vlevo) a triploidního (vpravo) lina. Barvení Giemsa – Romanowski. Mikroskop Olympus BHS, objektiv NCSPlan dry x100, digitální kamera Sony DXC 9100P. Měřítko 10 µm (podle Svobodové et al., 1998).

## 5. Upozornění

Tato metodika je určena *pouze* k účelům produkce triploidního lina v uzavřených chovných systémech. Autoři upozorňují všechny potenciální zájemce o vysazování triploidních ryb do volných vod (sportovních revírů), že tak nelze učinit bez souhlasu státních orgánů ochrany přírody a dalších institucí dle platné legislativy. Lze předpokládat, že určitá opatření přinese „zákon o geneticky modifikovaných organismech“, který je v době vzniku této metodiky teprve navrhován. Vzhledem k tomu, že o chování uměle vysazovaných triploidních ryb v přirozených ichtyocenózách volných vod je dosud známo poměrně málo, autoři to nemohou doporučit.

#### 4.3. Stanovení ploidie měřením jader erytrocytů počítačovou analýzou mikroskopického obrazu

Metoda je podrobně popsána v publikacích Flajshansa (1997) a Svobodové et al. (1998). Zde popsaný postup platí pro programy analýzy obrazu Cue 2 (Galai Inc., Israel) a MicroImage 3.0.1 for Windows (Olympus) při práci ve světlém poli optického mikroskopu.

*Příprava preparátů z krve lina:*

Krevní nátěr se zhotoví podle Svobodové et al. (1986). Nátěr se nechá oschnout a fixuje se přelitím metanolem s následným sušením na vzduchu při pokojové teplotě. Barvení se provádí běžným způsobem v květech 10% roztokem Giemsa-Romanowski v Sörrensenově pufru (pH 6,8) na 15 min. Přebytek barviva se odstraní oplachem, 10 min sáním preparátů v destilované vodě a novým oplachem v destilované vodě. Nátěr lze pozorovat po oschnutí, imerzní olej je možno aplikovat po 24 hodinách.

*Nastavení a kalibrace systému:*

Základní nastavení kamery a programu provádějí servisní technici příslušných firem při zaškolení. Pro korektní měření je nutné si s použitím objektu o známé velikosti (např. objektivového mikrometru, mřížky v Bürkerově komůrce, aj.) předem vypracovat kalibrace vzdálenosti pro všechny používané kombinace objektivů, projekтивů a kamerových adaptérů. Tyto kalibrace je pak nutné navolit v programu při každé změně prvku.

*Prahování (Thresholding):*

Prahování objektů v obrazu nastavujeme tak, aby byla naprahována jádra erytrocytů. Díry v naprahovaných objektech, vzniklé nestejnou kondenzací chromatinu, vyplníme příkazem „Vypln díry (Fill Holes)“.

*Nastavení tvarového filtru:*

Pro měření jader erytrocytů lina obvykle postačuje nastavení intervalu hodnot plochy objektů od  $6 \mu\text{m}^2$  do  $25 \mu\text{m}^2$  a intervalu hodnot tvarového faktoru od 0,7 (elipsa) do 1,0 (kruh).

*Princip a hodnocení:*

Při počítačové analýze mikroskopického obrazu je obraz zorného pole mikroskopu přenesen digitální kamerou do počítače a zpracováván příslušným programem. Objekt vybrané programem podle předem zadaných parametrů můžeme měřit jednotlivě, jako sumu objektů v 1 zorném poli nebo jako sumu objektů z více zorných polí buď přímo v příslušném programu analýzy obrazu nebo po načtení do databáze (např. v programu Excel). Pro hodnocení ploidie u lina obvykle postačí změření plochy jader u 100 jader erytrocytů v krevním nátěru u každé hodnocené ryby.

Přesnost měření je závislá na kvalitě preparátu a barvení. Hodnota plochy jader diploidního erytrocytu lina dosahuje  $10,5 \pm 1,3 \mu\text{m}^2$ , hodnota plochy jader triploidního erytrocytu lina dosahuje  $16,5 \pm 1,7 \mu\text{m}^2$ . Velikostní rozdíly diploidních a triploidních erytrocytů lina jsou znázorněny na obr. 4.

- % triploidů v souboru vzorků = počet triploidů / počet linů v souboru vzorků  $\times 100$

Ploidii u lina lze stanovit u následujících kategorií těmito metodami:

- U rozplavaného plůdku kvantifikaci oblastí organizátoru jadérka v interfázních buňkách (Flajshans et al., 1992) nebo stanovením relativního obsahu DNA průtokovou cytometrií (Lecommandeur et al., 1994).
- U vyšších kategorií lina z krevního vzorku (bez nutnosti zabíjet) kvantifikaci oblastí organizátoru jadérka v interfázních buňkách (Flajshans et al., 1997), stanovením relativního obsahu DNA průtokovou cytometrií, měřením jader erytrocytů počítačovou analýzou mikroskopického obrazu (Flajshans, 1997; Svobodová et al., 1998).
- U vyšších kategorií lina ze vzorku svaloviny stanovením relativního obsahu DNA průtokovou cytometrií.

#### 4.1 Stanovení ploidie kvantifikací oblastí organizátoru jadérka v interfázních buňkách

Metoda je podrobně popsána v článku Flajshansa et al. (1992).

*Příprava preparátů z plůdku:*

Používá se liní plůdek těsně před přechodem na exogenní výživu, každý kus plůdku se umístí na odmaštěné podložní mikroskopické sklo do kapky 60% kyseliny octové a rozeře se po skle pomocí druhého přiklopeného podložního skla jedním táhlým pohybem. Preparát se nechá oschnout a fixuje se přelitím metanolem s následným sušením na vzduchu při pokojové teplotě.

*Příprava preparátů z krve:*

Krevní nátěr se zhotoví podle Svobodové et al. (1986). Nátěr se nechá oschnout a fixuje se přelitím metanolem s následným sušením na vzduchu při pokojové teplotě.

*Příprava roztoků:*

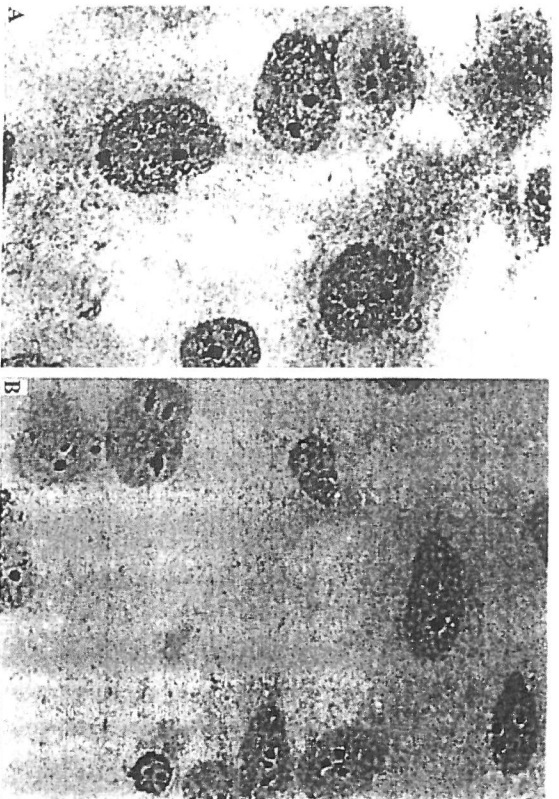
- Roztok A = 50% roztok  $\text{AgNO}_3$  (4 g  $\text{AgNO}_3$  v 8 ml destilované vody). Uchovávat v temnu.
- Roztok B = 2% roztok želatiny (2 g želatiny rozpustit ve 100 ml destilované vody s 1 kapkou kyseliny mravenčí). Uchovávat v lednici a rozehrát před použitím.

*Barvení:*

Opatrným nakapáním smíchat na preparátu roztoky A:B v poměru 2:1, přikrýt krycím sklem a umístit na plotěnku temperovanou na  $40^\circ\text{C}$ . Preparát zežloutne a začne hnědnout. Průběžně lze pozorovat změnu na buňkách: optimálně nabarvené buňky jsou žluté a jadérka světle hnědá. Prebytečné barvivo a krycí sklo se smyje pod tekoucí vodou. Preparát lze pozorovat po oschnutí, imerzní olej je možno aplikovat po 24 hodinách.

*Princip a hodnocení:*

Barvení sířibrem vizualizuje zbytky Ag-barvitelného rRNA-proteinového komplexu syntetizovaného oblastí organizátoru jadérka (Nucleolar Organizer Regions – NORs) v předělové interfázi, a proto identifikuje jen aktivní NORs. V buňkách diploidních ryb můžeme pozorovat 1 nebo 2 aktivní NORs a v buňkách triploidů 1, 2 nebo 3 aktivní NORs (obr. 2). U triploidního lina se počet buněk se 3 aktivními NORs pohybuje kolem 40%.



Obr. 2: Kvantifikace oblastí organizátorů jadérka. Scannem digitálně rozlišené tkáně diploidního (A) a triploidního (B) lina ve stadiu rozplavání plůdek. Barvení AgNO<sub>3</sub>. Mikroskop Olympus BHS, objektiv NCSPlan dry x100, projekтив x5, mikrofotografický Olympus PM10AK

#### 4.2 Stanovení ploidie podle relativního obsahu DNA průtokovou cytometrií

Metoda je podrobně popsána v článku Lecommandeura et al. (1994). Zde popsaný postup platí pro fluorescenční barvení jaderné DNA lina 4',6-diamidino-2-fenylindolem (DAPI) za použití komerčních kitů fy. Partec GmbH (Německo) pro měření na průtokovém cytometru Partec Ploidy Analyzer.

*Příprava preparátů = plůdku nebo ze svaloviny lina:*

Používá se lina plůdek těsně před přechodem na exogenní výživu. Z usmrcených větších ryb se vypreparuje cca 1 mm<sup>3</sup> svaloviny. Pro pozdější analýzu lze plůdek nebo celé ryby hluboce zmrazit v hliníkové folii. Plůdek nebo tkáň se umísť do čisté hodinové sklo a rozstříhá anatomickými nůžkami naplocho na menší kousky v 0,8 ml fyziologického roztoku. Přidá se 200 µl vychlazeného roztoku DAPI Solution A a pokračuje se v rozměňování tkáně nůžkami. Čistou Pasteurovou pipetou se odsaje tekutá fáze s uvolněnými a lyzovanými buňkami a přefiltruje se přes 30µm filtr CellTrics™ (Partec GmbH, Německo) do 3,5 ml zkumavky pro průtokovou cytometrii. Ve zkumavce by měl být asi 1 ml přefiltrované suspenze.

Přidá se 1 ml roztoku DAPI Solution B a obsah se krátce rozetře na třepací. Nechá se inkubovat minimálně 10 min při pokojové teplotě. Po inkubaci se vzorek přenes do

lednice. Vzorky zpracovávají pokud možno v den přípravy. Nabarvené vzorky lze analyzovat maximálně do 24 hod.

*Příprava preparátů = krev lina:*

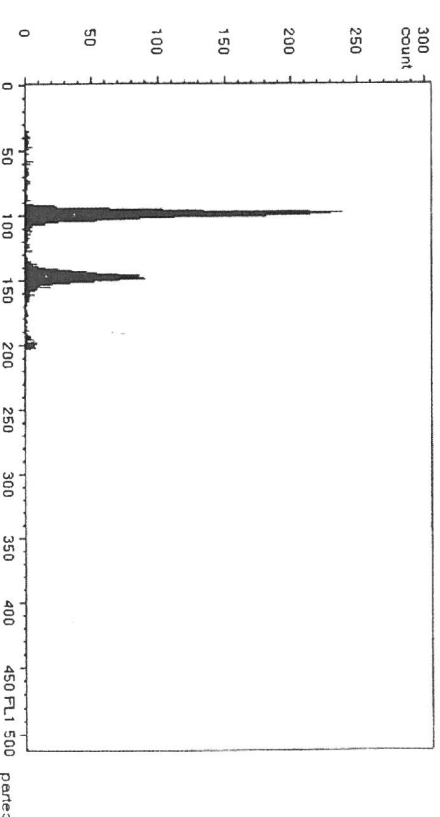
Do 3–5 ml zkumavky odměříme 1 ml fyziologického roztoku a přidáme 20 µl nativní heparinizované krve. Obsah krátce promícháme na třepací. Přidáme 1ml roztoku DNA Staining Solution D-AP1 a obsah znovu krátce rozetřeme na třepací. Necháme inkubovat minimálně 10 min při pokojové teplotě. Po inkubaci vzorek přeneseme do lednice. Vzorky zpracovávají pokud možno v den přípravy. Nabarvené vzorky lze analyzovat maximálně do 24 hod.

*Princip a hodnocení:*

Během barvení jsou buňky značeny fluorescenčním barvivem, tedy jaderná DNA barvivem DAPI. Intenzita fluorescence emitované značenou částicí je proporcionální jejímu obsahu DNA. Výsledný histogram na monitoru průtokového cytometru popisuje distribuci měřené buněčné substance, tedy počet buněk s definovaným obsahem DNA. Množství měřené buněčné substance, tedy DNA, je přiřazováno až 4096 třídám kvantit. Třídám kvantit v histogramu jsou představovány kanály na ose X histogramu.

Při rutinním zjišťování relativního obsahu DNA nejprve změníme referenční vzorek o známé ploidii (diploidní) a odečteme číslo kanálu, jemuž je přiřazeno průměrné množství DNA, představované vrcholem histogramu. Při měření neznámých vzorků pak srovnáváme hodnoty; představuje-li například výsledek měření diploidního lina vrchol histogramu na kanálu 100, pak se vrchol histogramu DNA triploidního lina bude objevovat kolem hodnoty kanálu 150, protože triploidní lin má 1,5krát více jaderné DNA než lin diploidní (obr.3).

File: 376  
14.12.99 12:59:44  
Total Count: 2983



Obr. 3: Stanovení relativního obsahu DNA průtokovou cytometrií. Směsný vzorek krev diploidního (kanál 100) a triploidního lina (kanál 150). Barvení DAPI. Ploidy Analyzer Partec