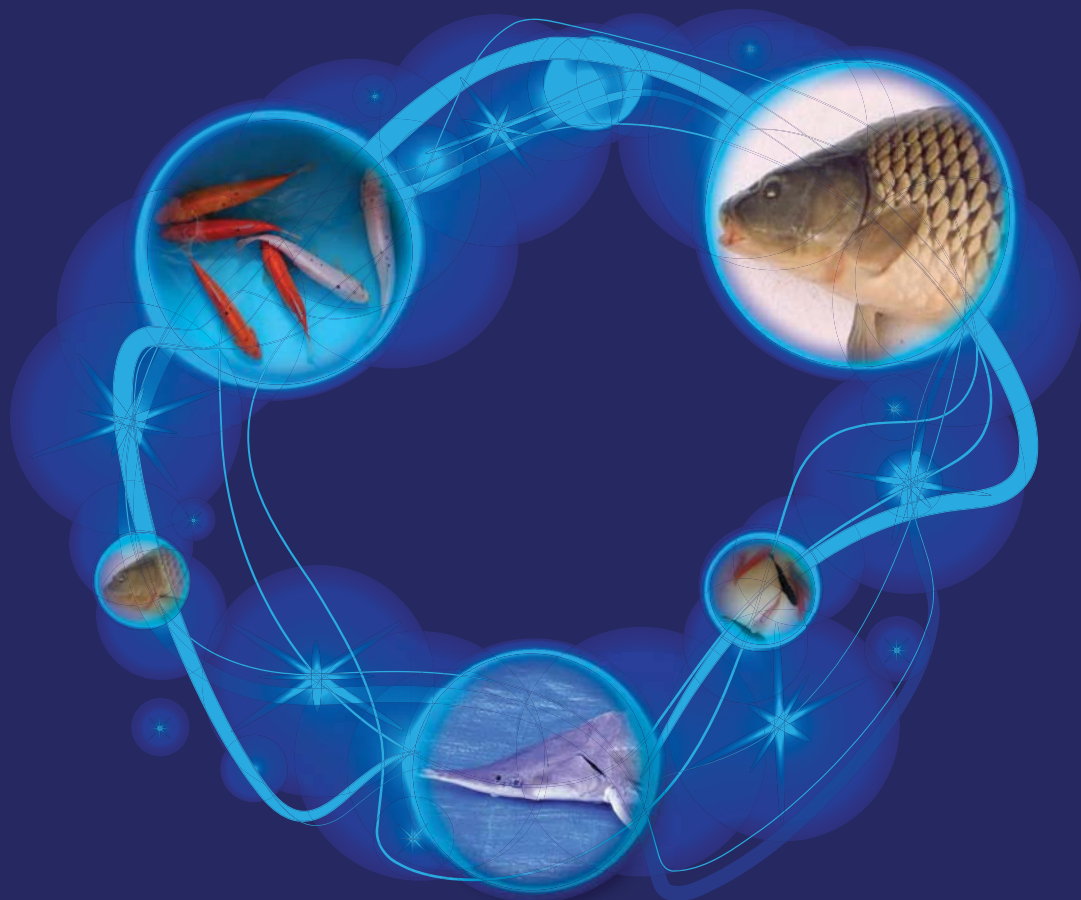




FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUĎEJOVICÍCH



Genetika a šlechtění ryb

*Martin Flajšhans, Martin Kocour, Petr Ráb, Martin Hulák,
Jaroslav Petr, Vendula Bohlen Šlechtová, Vlastimil Šlechta,
Miloš Havelka, Vojtěch Kašpar, Otomar Linhart*



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Genetika a šlechtění ryb

*Martin Flajšhans, Martin Kocour, Petr Ráb, † Martin Hulák, Jaroslav Petr,
Vendula Bohlen Šlechtová, Vlastimil Šlechta, Miloš Havelka,
Vojtěch Kašpar, Otomar Linhart*

Adresy autorů:

doc. Ing. Martin Flajšhans, Dr.rer.agr. (vedoucí autorského kolektivu), Ing. Martin Kocour, Ph.D., Ing. Martin Hulák, Ph.D., Ing. Miloš Havelka, Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D., prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany

prof. Ing. Petr Ráb, DrSc., Mgr. Vendula Bohlen Šlechtová, Ph.D., RNDr. Vlastimil Šlechta, CSc.

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Rumburská 89, 277 21 Liběchov

prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc.

Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6-Suchbát

Odborní externí oponenti:

prof. RNDr. František Marek, CSc.

Entomologický ústav BC AV ČR, v.v.i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

doc. Mgr. Pavel Stopka, Ph.D.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Viničná 7, 128 43 Praha 2

Odborný interní oponent:

Ing. Martin Pšenička, Ph.D.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany

Vydání a tisk publikace bylo uskutečněno za finanční podpory OP Rybářství:

Příprava a vydání odborných publikací 2011, reg. č. CZ.1.25/3.1.00/11.00303



Evropský rybářský fond
„Investování do udržitelného rybolovu“

Obsahová část publikace byla vytvořena za podpory projektů:

CENAKVA – Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz
(OP VaVpl, CZ.1.05/2.1.00/01.0024)

Reprodukce a genetika vybraných modelových druhů kostnatých a chrupavčitých ryb
(GAJU 046/2010/Z)

Chovatelské a environmentální aspekty akvakultury a hydrocenóz
(GAJU 047/2010/Z)

Vztahy mezi úrovní ploidie, velikostí genomu a buněk u modelových polyploidních ryb
s cytologickými a fyziologickými dopady na jejich ochranu a chov
(GAČR 523/08/0824)

Zachování biodiverzity u kulturních plemen kapra obecného
(NAZV QH82118)

Vydala:

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,
Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz

Grafický design a technická realizace: Comunica, a.s.

Fotografie na obálce: Miloš Havelka, Martin Flajšhans, Vojtěch Kašpar, Karel Burda

Odborný editor: Martin Flajšhans

Redakce: Pavlína Nováková, Zuzana Dvořáková

Vydání: 2. rozšířené upravené vydání

Náklad: 500 ks

Rok vydání: 2013

ABSTRAKT

Druhé upravené a rozšířené vydání monografie v deseti odborných kapitolách zpřístupňuje informace o domácích a zahraničních výsledcích výzkumu v genetice a šlechtění sladkovodních hospodářských druhů ryb s důrazem na druhy typické pro akvakulturu středoevropského regionu. Základy genetiky v ochraně biodiverzity vysvětlují obecné pojmy, zásady a metody genetické ochrany druhů, populací a plemen ryb, záchranné chovy ohrožených druhů a ochranu genetických zdrojů hospodářsky významných druhů ryb. Kapitola o genetických analýzách shrnuje základní cytogenetické a molekulárně-genetické postupy, včetně sekvenačních metod nové generace a jejich význam ve šlechtění a pro ochranu biodiverzity. Celá sekce této kapitoly se zabývá analýzou genetických vztahů mezi taxony s využitím DNA a různými softwary k výpočtu fylogenetických stromů. Kapitola o genetice kvalitativních znaků vysvětluje na konkrétních příkladech u jednotlivých druhů ryb autozomální a gonozomální dědičnost kvalitativních znaků, dědičnost znaků vázaných na pohlaví, ovládaných a ovlivněných pohlavím a genové interakce. Zabývá se rovněž mechanismy determinace pohlaví u ryb. Kvantitativní genetika u ryb objasňuje dědičnost a fenotypový projev užitkových vlastností, složky fenotypové variance, heritabilitu, heterózní efekt, inbreeding a odhady parametrů fenotypové a genetické variance, s bohatou dokumentací výsledků dosažených u různých druhů hospodářských ryb. Kapitola o polyploidii a genomových manipulacích u ryb souhrnně reflektuje různé typy polyploidie (evoluční, spontánní, indukované, alo- a autopolyploidie) a výskyt hybridních polyploidních komplexů, možnosti její indukce a způsoby analýzy, uniparentální dědičnost (gynogenezi, androgenezi), klonální reprodukci parentálních genomů a zvrát pohlaví, způsoby vyvolání gynogeneze, androgeneze a zvratu pohlaví a shrnuje současnou úroveň a možnosti využití polyploidních, gynogenetických a androgenetických ryb v akvakultuře. Kapitola o genovém transferu u ryb souhrnně vysvětluje základní pojmy a postupy při výběru vhodného genu, zhotovení genového konstruktu, klonování genů, volbu objektu a prostředků přenosu genu, detekci inkorporace a exprese genu a shrnuje dosavadní výsledky a možnosti budoucího využití transgenních ryb v akvakultuře. Kapitola o domestikaci a plemenitbě sleduje obecné rysy domestikace ryb a soustředí se na významné hospodářské druhy ryb pro středoevropský region a zahrnuje domestikaci kapra obecného, jeho historická a současná česká, evropská a světová plemena, a dále domestikaci a plemena lína obecného, pstruha duhového, sumce velkého a základy plemenitby ostatních hospodářských druhů ryb (síhů, jeseterů). Šlechtitelské programy u ryb zahrnují specifika šlechtitelské práce v akvakultuře, hybridizační postupy, čistokrevnou plemenitbu, selekci, využití molekulární genetiky ve šlechtitelské práci a organizaci šlechtitelských programů u ryb v ČR a ve světě. Testování užitkovosti a odhad plemenné hodnoty zahrnuje základní metodické postupy, matematické modely a postupy statistického zpracování dat analýzou variance a kovariance. Poslední kapitola o plemenitbě ryb a legislativě rozebírá aktuální znění plemenářského zákona a jeho prováděcích předpisů ve vztahu k rybářství, práva a povinnosti chovatelských subjektů na jednotlivých úrovních plemenářské práce, a vysvětluje dotační politiku státu ve šlechtění a plemenitbě ryb a ochraně genetických zdrojů.

Klíčová slova: genetika ryb, šlechtění, kvalitativní a kvantitativní znaky, ochrana, genetické analýzy, genomové manipulace, genový transfer, plemena, legislativa

ABSTRACT

The second updated and extended edition of the monograph in its ten specialized chapters gives information on both home and foreign results in research on genetics and breeding of commercial freshwater fish with the accent on species typical for Central European aquaculture. Basics of genetics in biodiversity conservation explain common terms, rules and methods for genetic conservation of fish species, populations and breeds, remedial culture of endangered species and conservation of genetic resources of commercially important fish species. Chapter on genetic analyses explains basic cytogenetic and molecular-genetic approaches including new generation sequencing approaches, and their importance for fish breeding and biodiversity conservation. Whole section of this chapter deals with genetic relationships among taxa and with softwares for computing phylogenetic trees. In the chapter on genetics of qualitative traits, topical examples of various fish species are used to explain autosomal and gonosomal inheritance, inheritance of sex-linked, sex-controlled and sex-limited phenotypes and gene interactions. Mechanisms of sex determination in fishes are explained. Quantitative genetics of fish explains inheritance and phenotypic expression of performance traits, phenotypic variation components, heritability, heterosis effect, inbreeding and estimates of phenotypic and genetic variation parameters, broadly documenting the results gained in various commercially important fishes. Chapter on polyploidy and genome manipulations in fish reviews and explains the different types of fish polyploidy (evolutionary- spontaneous-, induced-, allo- and autopolyploidy), hybrid polyploid complexes, possibilities of polyploidy induction and methods of analysis, uniparental inheritance (gynogenesis, androgenesis), clonal reproduction of parental genomes and sex reversal and their induction. Contemporary level and possibilities to utilize polyploid, gynogenic and androgenic fish in aquaculture are also summarized. Chapter on gene transfer reviews and explains the basic terms and approaches to selection of a proper gene, building the gene construct, gene cloning, choice of object and means of gene transfer, detection of gene incorporation and expression and concludes contemporary results and possibilities of future application of transgenic fish in aquaculture. Chapter on domestication and breeding explains general features of fish domestication and it is focused to commercial species important for Central European region; it involves domestication of common carp, its historical and contemporary breeds in the Czech Republic, in Europe and in the world, domestication and breeds of tench, rainbow trout, European catfish and the basics of breeding other commercially important species (coregonids, sturgeons). Breeding programmes of fish involve specificities of breeding work in aquaculture, hybridization approaches, pure-breeding, selection, application of molecular genetics in breeding and organization of fish breeding programmes in the Czech Republic and in the world. Performance testing and breeding value estimates involve basic methodical approaches, mathematic models, statistical processing the data with analysis of variance and covariance. The last chapter on fish breeding and legislation describes the importance of current valid version of the Animal Breeding Act and its directives for fishery, rights and duties of fish breeders and explains state policy in subventions for fish breeding and genetic resources conservation.

Keywords: fish genetics, breeding, qualitative and quantitative traits, conservation, genetic analyses, genome manipulations, gene transfer, breeds, legislation

PŘEDMLUVA KE 2. VYDÁNÍ

Po vydání naší monografie v roce 2008 jsme byli příjemně překvapeni zájmem o tuto knihu u studentů rybářských a příbuzných oborů jak na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích, tak i na tehdejší Mendelově zemědělské a lesnické univerzitě v Brně. Velmi nás potěšily i pozitivní ohlasy na tuto monografii ve vědecké obci.

Každý vědecký obor se, již ze své definice, vyznačuje vyvíjející se sumou vědomostí v čase a s vývojem nových poznatků jsou dosavadní znalosti a teoretické předpoklady často přehodnocovány. Totéž samozřejmě platí i v oblasti živočišné genetiky, s rapidně se rozvíjejícími „molekulárními“ obory. Ve světle tohoto konstatování tedy každý rukopis, snažící se o kompilaci a kritický komentář současných poznatků, musí být v době svého vydání již zastaralý. Nejinak je tomu i u naší monografie, která vznikala v letech 2006–2007. Od té doby již vyšlo několik zásadních přehledových prací například v oblasti indukované polyploidie, gynogeneze, androgeneze, determinace pohlaví u ryb aj., které pozměnily dílčí pohledy na danou oblast poznání, byly zveřejněny nové technologické postupy, vyšly nové metodiky uchování genetických zdrojů ryb a pozměněna byla i plemenářská legislativa. Stejně tak jsme cítili, že v našem původním textu chyběla celá část zabývající se genetickými vztahy mezi taxony a softwary k výpočtu a znázornění fylogenetických vztahů mezi nimi.

Rozhodli jsme se proto naši monografii upravit a doplnit o tyto poznatky pro druhé vydání.

Autoři
ve Vodňanech a v Liběchově, 2011

ABSTRAKT (M. Flajšhans)	5
Abstract	6
PŘEDMLUVA KE 2. VYDÁNÍ (M. Flajšhans, P. Ráb)	7
ÚVOD (M. Flajšhans, P. Ráb)	13
„KONZERVAČNÍ GENETIKA“, OCHRANA GENETICKÝCH ZDROJŮ A ZÁCHRANNÉ CHOBY (M. Flajšhans, P. Ráb)	17
2.1. Genofond	19
2.1.1. Vnitropopulační proměnlivost	20
2.1.2. Mezipopulační proměnlivost	22
2.1.3. Vnitrodruhovú genetická variabilita	23
2.2. Obecné zásady genetické ochrany druhů, populací a plemen ryb	23
2.3. Metody genetické ochrany populací / plemen ryb	27
2.4. Uchování a využití genetických zdrojů ryb v ČR	28
2.4.1. Postup programu od jeho založení v roce 1996	29
2.5. Ochrana genetické diverzity volně žijících druhů	33
NÁSTROJE PRO STUDIUM BIODIVERZITY A ŠLECHTĚNÍ RYB – GENETICKÉ ZNAKY A JEJICH ANALÝZY (P. Ráb, V. Šlechta, M. Hulák, V. Bohlen Šlechtová)	35
3.1. Hierarchie užívaných znaků a stavba genomu	38
3.2. Morfologické znaky	40
3.3. Karyotypové a chromozomové znaky	40
3.4. Polymorfní bílkoviny jako znaky a jejich analýza	45
3.4.1. Příčiny variability alozymů	45
3.4.2. Metody zjišťování variability proteinů	47
3.4.3. Využití variability proteinů	50
3.4.4. Metodika elektroforézy bílkovin (s přihlédnutím ke škrobové)	52
3.4.5. Výhody a nevýhody elektroforézy proteinů	58
3.5. Znaky na úrovni DNA – molekulární znaky, metody a jejich analýza	59
3.5.1. Izolace DNA	60
3.5.2. Amplifikační metody	61
3.5.3. RT-PCR (Real-Time) a kvantitativní qPCR	65
3.5.4. Elektroforetické metody – separace nukleových kyselin	66
3.5.5. Restrikční analýzy	68
3.5.6. PCR-RFLP	68
3.5.7. AFLP	69
3.5.8. Hybridizační metody	70

3.5.9. Fragmentační analýza mikrosatelitů	71
3.5.10. Sekvenování DNA	72
3.5.11. Nové metody	74
3.5.12. Principy použití molekulárních znaků	75
3.6. Analýza genetických vztahů mezi taxony s využitím DNA	76
3.6.1. Práce se sekvencemi DNA	77
3.6.2. Fylogenetické stromy	81
3.6.3. Metody rekonstrukce fylogeneze	86
3.6.4. Substituční modely	90
3.6.5. Testování spolehlivosti stromů	91
3.6.6. Rekonstrukce fylogenetických vztahů v praxi	91
3.6.7. Databáze nukleotidových sekvencí	93
3.6.8. DNA barcoding	94
3.6.9. Software nejčastěji používaný pro řešení fylogenetických problémů	95

GENETIKA KVALITATIVNÍCH ZNAKŮ U RYB

(M. Flajšhans, M. Havelka)

4

101

4.1. Autozomální dědičnost kvalitativních znaků	103
4.2. Genové interakce	106
4.2.1. Intraalelické interakce	107
4.2.2. Interaletické interakce	107
4.2.3. Pleiotropie, penetrance a expresivita	110
4.3. Determinace a diferenciacce pohlaví u ryb, gonozomální dědičnost kvalitativních znaků	112
4.3.1. Environmentální faktory ovlivňující pohlaví u ryb	113
4.3.2. Geneticky podmíněná determinace pohlaví u ryb	114
4.4. Dědičnost kvalitativních znaků vázaných na pohlaví, ovládaných a ovlivněných pohlavím	118

GENETIKA KVANTITATIVNÍCH ZNAKŮ U RYB

(M. Kocour)

5

123

5.1. Kvalitativní versus kvantitativní znaky, geny malého účinku, fenotypový projev	125
5.2. Složky fenotypové variance	127
5.2.1. Variance prostředí	127
5.2.2. Vztahy mezi genetickou složkou a prostředím	128
5.2.3. Variance genetické složky	129
5.2.4. Maternální variance	133
5.3. Heritabilita	133
5.4. Heteróza	135
5.5. Inbreeding	136
5.6. Odhady parametrů fenotypové a genetické variance	139
5.6.1. Odhad aditivní genetické variance užitím kovariance mezi rodičem a potomkem	140
5.6.2. Odhad aditivní genetické variance regrese fenotypové hodnoty potomků na fenotypovou hodnotu rodičů	140
5.6.3. Odhad aditivní genetické variance užitím fenotypové kovariance mezi sourozenci	140
5.6.4. Odhad míry závislosti mezi kvantitativními znaky – kovariance, korelace a regrese	143

POLYPLOIDIE A GENOMOVÉ MANIPULACE U RYB

(M. Flajšhans, P. Ráb, O. Linhart)

6

151

6.1. Polyploidie u ryb	153
6.2. Indukovaná polyploidie	168
6.3. Využití polyploidních ryb v akvakultuře	177
6.4. Uniparentální dědičnost a klonální reprodukce parentálních genomů	181
6.5. Využití gynogeneze a androgeneze v akvakultuře	186
6.6. Zvrat pohlaví	187

GENETICKÉ MODIFIKACE RYB

(J. Petr, V. Kašpar, M. Hulák)

7

197

7.1. Co je genetická modifikace?	199
7.2. Výběr vhodného genu	201
7.3. Genový konstrukt	201
7.4. Klonování genů	203
7.5. Objekt přenosu genu	204
7.6. Prostředky přenosu genů	205
7.6.1. Mikroinjekce	206
7.6.2. Elektroporace	207
7.6.3. Biolistické metody	208
7.6.4. Retrovirové vektory	208
7.6.5. Lipofekce	208
7.6.6. Spermie jako vektor	209
7.7. Detekce inkorporace a exprese genu	209
7.8. Využití geneticky modifikovaných ryb v akvakultuře	210
7.8.1. Intenzita růstu	211
7.8.2. Odolnost vůči nemocem	213
7.8.3. Odolnost vůči chladu	214
7.8.4. Změna metabolismu	214
7.8.5. Sterilita	215
7.8.6. Využití geneticky modifikovaných ryb ve farmacii a biomedicině	215

DOMESTIKACE A PLEMENITBA VÝZNAMNÝCH HOSPODÁŘSKÝCH DRUHŮ RYB

(M. Flajšhans)

8

221

8.1. Kapr obecný, <i>Cyprinus carpio</i> L.	224
8.2. Evropská historická plemena kapra	230
8.3. Současná plemena kapra chovaná v ČR	232
8.4. Další evropská a světová plemena kapra	236
8.5. Lín obecný, <i>Tinca tinca</i> L.	238
8.6. Pstruh duhový, <i>Oncorhynchus mykiss</i> Walbaum (1792)	240
8.7. Sumec velký, <i>Silurus glanis</i> L.	242
8.8. Plemenitba ostatních druhů ryb	243

ŠLECHTITELSKÉ PROGRAMY V AKVAKULTUŘE*(M. Kocour)***9****249**

9.1. Úvod do problematiky	251
9.2. Specifika šlechtitelské práce v akvakultuře	252
9.3. Čistokrevná plemenitba	254
9.4. Křížení (hybridizace)	255
9.4.1. Mezidruhovú hybridizace	255
9.4.2. Dialelní křížení	256
9.4.3. Vrcholové křížení	257
9.4.4. Reprodukční (kombinační) křížení	258
9.4.5. Souhrn a výsledky dosažené při křížení ve šlechtitelských programech	260
9.5. Selektce	261
9.5.1. Přírodní selektce	261
9.5.2. Umělá selektce	262
9.5.3. Předpověď selekční odezvy – genetický zisk	262
9.5.4. Realizovaná heritabilita	264
9.5.5. Selektční metody	265
9.5.6. Selektční strop	267
9.5.7. Výsledky selekčních experimentů v akvakultuře	268
9.6. Využití metod molekulární genetiky při šlechtitelské práci v akvakultuře	270
9.6.1. Určování rodičovství	270
9.6.2. Vyhledávání QTL (<i>Quantitative trait loci</i>) a MAS (<i>Marker assisted selection</i>)	271
9.7. Šlechtitelské programy v ČR a ve světě a jejich organizace	274

TESTOVÁNÍ UŽITKOVOSTI U RYB A ODHAD PLEMENNÉ HODNOTY*(M. Kocour)***10****283**

10.1. Testování užítkovosti ryb v České republice	285
10.1.1. Metodika při provádění kontrol užítkovosti	285
10.1.2. Základní statistické modely používané pro vyhodnocování výsledků při kontrolách užítkovosti	293
10.2. Testování užítkovosti ryb v dalších zemích	295

PLEMENITBA RYB A LEGISLATIVA, DOTAČNÍ PROGRAMY*(M. Flajšhans)***11****297**

11.1. Plemenářský zákon a prováděcí vyhlášky	299
11.2. Dotační programy	303

ÚVOD

M. Flajšhans, P. Ráb

ÚVOD

M. Flajšhans, P. Ráb

Sladkovodní a mořské rybářství spolu s akvakulturou dodávají lidstvu ročně 100–140 milionů tun ryb ke konzumním účelům, což podle údajů FAO představuje pro více než 2,6 miliardy lidí pokrytí přinejmenším 20 % jejich průměrného příjmu živočišných bílkovin. Podíl úlovků sladkovodního a mořského rybářství na celkové produkci ryb je v posledních dvaceti letech poměrně vyrovnaný a nelze očekávat jeho zvyšování. Snahy v tomto směru jsou právě opačné – v zájmu zachování biologické rozmanitosti rybích druhů a genetické proměnlivosti druhů lovených se mezinárodní i národní legislativy snaží „hospodářskou těžbu“ sladkovodních a mořských ryb omezovat a chránit rybolovné zdroje minimálními velikostními limity, úlovkovými množstevními kvótami, ochranou trdlišť, třecích migrací a řadou dalších opatření. I přesto již na řadě míst naší planety došlo ke kolapsu mořské těžby ryb.

Naproti tomu produkce akvakultury, jejíž majoritu tvoří produkce vodních živočichů (měkkýšů, koryšů a ryb) pro lidskou spotřebu, vykazuje v posledních desetiletích stálý růst a v roce 2005 dosáhla téměř 48 milionů tun. Akvakultura se tak stává nejrychleji rostoucím odvětvím živočišné výroby: její produkce od 70. let 20. století ročně roste o cca 8,8 % ve srovnání s 1,2 % nárůstem lovu ryb a 2,8 % nárůstem pozemní produkce živočišné výroby.

V druhovém spektru produkce sladkovodní akvakultury podle mezinárodní standardní statistické klasifikace vodních živočichů a rostlin (ISSCAAP) dominují na počátku 21. století kaprovité ryby (zejména tolstolobik bílý, *Hypophthalmichthys molitrix*; amur bílý, *Ctenopharyngodon idella*; kapr obecný, *Cyprinus carpio*; tolstolobec pestrý, *Aristichthys nobilis* a karas obecný, *Carassius carassius*) s celkovou produkcí 17 215 123 t, následování kategorií různých sladkovodních ryb (4 205 076 t), lososovitými rybami (1 828 760 t), tilapiemi a ostatními cichlidami (1 677 751 t), a dalšími. V rámci celosvětové produkce sladkovodní akvakultury kaprovití představují 40,7 %, různé sladkovodní ryby 10,0 %, lososovití 4,3 %, tilapie a ostatní cichlidy 4,0 % a zbytek je zastoupen měkkýši, koryši a dalšími živočichy.

Těchto pár čísel jsme na úvod uvedli proto, abychom ilustrovali stále rostoucí význam rybí akvakultury. Prvopočátky akvakultury můžeme datovat až k římským umělým nádržím (piscinám) k přechovávání ryb, k raně středověkým klášterním rybníkům, k humanistickým národohospodářům a rybníkářům 16. století (J. Dubravius, O. Strumieński, J. Taverner a další) a k prvním pokusům s umělým výtěrem pstruha obecného Stephanem Ludwigem Jacobim v Německu 18. století. Od té doby se zprvu intuitivní a empirický chov a vzájemné křížení rodičovských populací postupně měnil na šlechtitelský proces podložený vědeckými základy včetně užívání moderních matematických modelů ke statistickému hodnocení dat. Postupně bylo – a vlastně dodnes stále ještě je – odkrýváno dědičné založení kvalitativních znaků ryb jako ošupení, zbarvení, tvar ploutví apod. Jednotlivé vědecké postupy charakterizace plemen a techniky selekce, čistokrevné plemenitby či meziplenného křížení k projevu heterózního efektu se stávaly integrální součástí akvakultury. Během posledních padesáti let prošly genetické postupy založené na mezidruhovém křížení, technikách zvratu pohlaví a chromozomových manipulacích již experimentální fází a poloprovozním ověřováním a byly různou měrou přijaty sektory komerční akvakultury jeseterů, lososovitých, kaprovitých, sumeckovitých a ostnoploutvých ryb k produkci hybridů, monosexních (jednoplavnic) nebo triploidních ryb. Jsou rovněž známy metody produkce transgenních ryb, například GH-transgenního lososa nebo kapra (se vneseným genem růstového hormonu, GH) nebo AFP-transgenních ryb odolných proti podchlazení (se vneseným genem pro tvorbu proteinu bránícího mrznutí buněk, AFP). Licence ke komerční produkci transgenních ryb však nebyla zatím s výjimkou Kuby nikde jinde na světě udělena nebo alespoň žádné takové udělení nebylo zveřejněno.

Exponenciální rozvoj poznání v oblasti molekulární biologie živočichů v posledních dvou desetiletích vedl k vývoji celé řady diagnostických metod, pomocí nichž můžeme zkoumat evoluci druhů s nebyvalou

přesností (a případně revidovat jejich dosavadní taxonomické zařazení), studovat genetickou strukturu populací v rámci jednotlivých druhů nebo plemen, hodnotit úroveň jejich genetické proměnlivosti včetně analýzy historických a geografických dějů, jež tuto proměnlivost formovaly, určovat rodičovství, ale například i studovat vztahy vedoucí ke kompetici mezi jednotlivými rodiči při tvorbě nových generací potomstva. Stejně tak nám znalost molekulární biologie dává do rukou nástroje vedoucí k moderním technikám zvyšování užitkových vlastností, jako jsou například studium a využívání lokusů s vazbou na kvantitativní znaky (*quantitative trait loci*, QTL), selekce podle genetických markerů s vazbou na požadované vlastnosti (*marker-assisted selection*, MAS) a podobně, či nástroje vedoucí k moderním technikám zvyšování odolnosti vůči nemocem, jako jsou např. DNA vakcíny.

Na druhé straně je třeba mít na vědomí, že ani využívání moderních progresivních genetických metod nemůže být chápáno jako „univerzální všelék“ na všechny neduhy rybolovu a chovu ryb. Současná genetika ryb je moderní vědní disciplínou, všestranně použitelnou od uchování biologické rozmanitosti po produkci jednotlivých komodit akvakultury, ale potenciál jejího uplatnění právě v akvakultuře předpokládá zvládnutí biologických základů chovu jednotlivých druhů, jejich reprodukce, chovatelských technologií, výživy, při udržení optimálního zdravotního stavu a podmínek prostředí pro každý chovaný druh.

Tato monografie je po dlouhé době prvním souhrnem informací o genetice a šlechtění ryb vydaným v českém jazyce. V cizích jazycích vychází podobných textů hodně, zejména v angličtině, němčině, francouzštině a španělštině; většina z nich je však poplatných místní akvakultuře. Stejně tak i střeoevropský region je typický především svou rybníční akvakulturou. Snahou našeho autorského kolektivu bylo proto zpřístupnit informace o genetice a šlechtění sladkovodních hospodářských druhů ryb typických pro tento region.

Autoři

„KONZERVAČNÍ GENETIKA“, OCHRANA GENETICKÝCH ZDROJŮ A ZÁCHRANNÉ CHOVY

M. Flajšhans, P. Ráb

„KONZERVAČNÍ GENETIKA“, OCHRANA GENETICKÝCH ZDROJŮ A ZÁCHRANNÉ CHOVY

M. Flajšhans, P. Ráb

Konzervační genetika je českým ekvivalentem anglického výrazu „*conservation genetics*“, a ač tomuto termínu v běžné odborné mluvě rozumíme, nejedná se o výraz správný. Slovo „*conservation*“ znamená zachování, ochrana apod. Měli bychom tedy správně používat termín genetika v ochraně přírody, módně biodiverzity, v našem případě genetika v ochraně druhů a populací ryb. Všichni však cítíme, že se jedná o výraz poněkud dlouhý a česky nekorektní výraz „konzervační“ genetika je pro účely tohoto textu z praktických důvodů přijatelnější, chápeme-li ovšem jeho správný význam.

Konzervační genetika je tedy odvětvím genetiky, která je zaměřena k udržení a odborně podložené ochraně biodiverzity a k odborně podloženému šlechtění. Jako každá praktická disciplína, je syntézou poznatků zejména populační genetiky, ale i evoluční biologie, systematiky, molekulární biologie a ekologie, včetně molekulární ekologie (tj. fylogeografie a fylogenie), zootechniky apod. V obecném slova smyslu je udržení (konzervace) genetické proměnlivosti (variability) důležité pro celkovou životaschopnost (fitness) populací, protože snížení genetické proměnlivosti může vést v krajním případě až k vyhynutí populace, případně druhu.

2.1. Genofond

Základním pojmem konzervační genetiky je **genofond**. Rozumíme jím soubor všech genotypů jedinců, jež populaci nebo druh tvoří. Genofond je výsledkem dlouhodobých evolučních procesů, u domestikovaných nebo chovaných druhů, plemen a linií je pak výsledkem mnoha generací cílené i nezáměrné selekce. Genofond není neměnný, je to dynamický, v čase proměnlivý systém, který se nepřetržitě adapтуje na zcela specifické abiotické (fyzikální, chemické) a biotické podmínky svého prostředí. Za základní cíle ochrany genofondy je nutné považovat:

1. udržení dlouhodobě životaschopné populace, jinými slovy nepřipustit vyhynutí druhu – jedinečné a neopakovatelné evoluční linie;
2. udržení schopnosti neustále se přizpůsobovat měnícím se podmínkám prostředí, tj. udržet geneticky dané adaptační schopnosti a celou populaci/druh udržovat dlouhodobě geneticky „zdravou“;
3. udržení schopnosti další případné speciální události je konečným, velmi vzdáleným cílem všech ochranných opatření, snad **přesahujících** existenci lidského druhu.

Konzervační genetika je tedy při správném použití velmi mocným nástrojem ochrany populací a druhů a vedle zmíněné „evoluční“ **odpovědnosti** člověka za udržení kontinuity vývoje existujících druhů živých organismů na Zemi, má i pragmatický aspekt. Ten spočívá v uchování genetických a šlechtitelských zdrojů, tedy zdrojů, ze kterých lze čerpat při šlechtění. Známým případem je přišlechtění amurského sazana, *Cyprinus haematopterus* (resp. nyní *Cyprinus rubrofasciatus*) k evropským liniím kapra obecného, *C. carpio*, pro přenesení vloh jeho výrazné odolnosti vůči jarní virémii kapra. Nejdůležitější vlastností genofondy je jeho **genetická proměnlivost (variabilita)** a ústředním problémem konzervační genetiky je zachování co možná největší šíře této proměnlivosti. Je to proto, že evoluční přizpůsobivost druhů/populací je funkcí rozsahu genetické proměnlivosti. Ztráta této proměnlivosti má za následek ubývání, módně, avšak velmi výstižně se používá termín „eroze“ evoluční adaptability, což zvyšuje pravděpodobnost vyhynutí druhu/populace. Toto je případ ohrožených druhů či

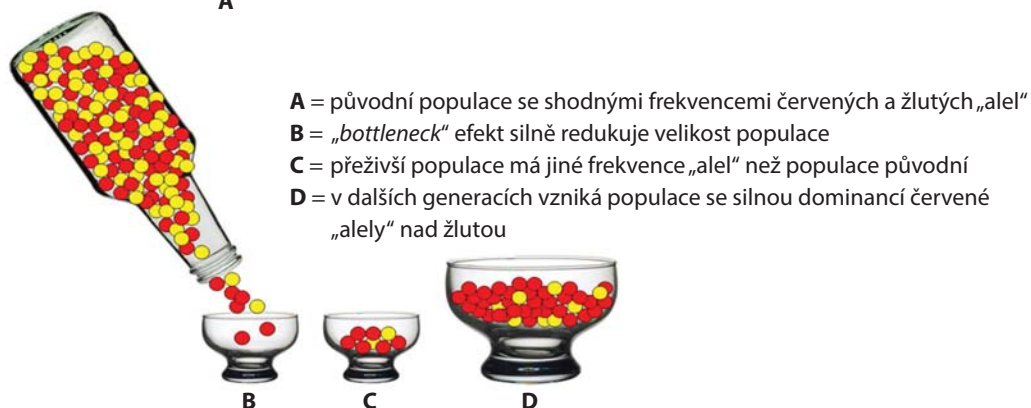
populací, protože jejich současný genofond představuje pouze část dříve většího a proměnlivějšího souboru. Jako příklad lze uvést současnou situaci populací ostroretky stěhovavé, *Chondrostoma nasus*, vysoce potamodromního druhu, jehož populace jsou vlivem lidských aktivit velmi fragmentovány. Podobně je tomu ovšem i u úzce endemitních forem s nevelkým nebo bodovým rozšířením, např. u endemitů v r. *Salmo*, *Barbus*, *Squalius* aj. ve středozevní oblasti. Proměnlivost genofonu je nutno posuzovat ve dvou složkách: vnitropopulační a mezipopulační.

2.1.1. Vnitropopulační proměnlivost

Vnitropopulační proměnlivost je studována především prostředky genetiky populací. **Velikost populace (N), tj. počet jedinců**, je důležitý faktor udržující úroveň proměnlivosti, z genetického hlediska je ještě důležitější **efektivní velikost populace (N_e)**. Hodnota N_e vyjadřuje počet rozmnožujících se jedinců v idealizované populaci, která by vykazovala stejné množství disperze frekvencí alel při náhodném genetickém driftu či stejnou úroveň inbreedingu jako v populaci, která je studována. Nepřesně řečeno, jedná se zhruba o tolik jedinců, jejichž genofond se předá do další generace. Protože je výpočet N_e nejčastěji založen na průměrném koeficientu inbreedingu, lze také používat definici pro tzv. **inbrední efektivní velikost** populace: je to taková velikost ideální populace, která vykazuje stejnou rychlost růstu inbreedingu (poklesu heterozygotnosti) za generaci jako populace skutečná. Hodnota N_e je většinou menší než hodnota N , protože ji ovlivňuje několik faktorů, zejména poměr pohlaví, počet potomků od jednotlivých rodičů, kolísání velikosti populace, hustota (disperze) populace atd. Minimální N_e je často diskutována v souvislosti se záchrannými chovy a šlechtěním pro optimální a genetickému „zdraví“ odpovídající rozsah chovné skupiny. Na tuto otázku však nelze jednoznačně odpovědět, protože vždy zcela záleží na biologii daného druhu. Jako příklad lze na jedné straně uvést druh halančíka *Cyprinodon diabolis*, který je endemitem jediného pramene (Devil's Hole) na jihozápadě USA a jeho početnost se pohybuje kolem 300 jedinců (z geologických důkazů dobře doložitelných) po několik tisíc generací. Druhým extrémem může být řada mořských druhů (např. sled' obecný, *Clupea harengus*, treska obecná, *Gadus morrhua* atd.), které jsou předmětem rybářské exploatace, kde i astronomické počty přežívajících dospělců jsou z genetického hlediska již malé. Kolaps lovu řady druhů v poslední době je toho důkazem a obnova dřívějších velkých populací je otázkou. Nicméně problém minimální možné velikosti N_e souvisí zřetelně s následujícími faktory: (1) délkou generačního intervalu, (2) počtem potomstva a (3) celkovou reprodukční strategií daného druhu. Je tedy zřejmé, že se hodnota N_e v závislosti na kombinaci těchto faktorů značně liší. U krátkověkých druhů postačuje v záchranných chovech menší velikost N_e (např. u nás blatňák tmavý, *Umbra krameri*), zatímco u dlouhověkých a pozdně pohlavně dospívajících druhů musí být hodnota N_e nepoměrně větší, a to i přes daleko větší plodnost. To se týká například téměř všech druhů jeseterovitých.

Význam hodnoty N_e pro úvahy o genetické struktuře populace vyvstane v souvislosti s **třemi úzce souvisejícími populačně genetickými procesy** v malých nebo zmenšujících se populacích, které „erodují“ rozsah genetické proměnlivosti:

1. **efekt hrdla láhve (bottleneck effect)**. Jedná se o náhlé, většinou dramatické snížení velikosti populace, kdy dojde k výběru (může být náhodný, ale i selektivní podle určitých genotypů) jen části genotypů z většího genofonu populace. Pro naše domácí poměry je to např. typický následek vytrávení toku, tedy likvidace genofonu jedinců po proudu od místa znečištění. Velikost genetického ochuzení (pauperizace) zbytkové populace závisí na rozsahu zmenšení populace, šíři původní genetické proměnlivosti a stupni náhodnosti při výběru během jevu (např. samice s jikrami mají nižší útekové možnosti). Jev má tak za následek ztrátu části určitých alel, kterými je porovnávána velikost tohoto efektu hrdla láhve (obr. 2.1.).



Obr. 2.1. Znáznornění „bottleneck“ efektu.

2. náhodný genetický posun (*genetic drift*) je jev, který se vyskytuje v mnoha přírodních populacích, může a nemusí být spjat s předcházejícím jevem. Je důsledkem toho, že v přírodě jsou velké populace ve skutečnosti rozděleny do subpopulací; čím je taková subpopulace menší, tím je větší efekt genetického posunu. Průvodními jevy jsou ztráta a na druhé straně fixace alel.

Jedná se o stochastický proces kombinovaný ovšem s faktory selektivity prostředí. Lze prokázat, že čím je delší období působení tohoto posunu, tím je větší ztráta genetické proměnlivosti náhodným ubýváním (ztrátou) některých alel v populaci a naopak fixací jiných alel. Náhodný genetický posun se ovšem velmi významně uplatňuje při **speciačních událostech**, kdy dojde k fragmentaci (fragmentacím) areálu původního druhu. Přitom fragmentace může být jak přirozená (např. říční pirátství, tvorba dočasných nádrží za závaly, změny povodí apod.), tak způsobená člověkem (umělé vodní nádrže nebo fragmentace rozsáhlých lesních masivů, jež se projevuje ve vodním režimu krajiny). Takovýmto způsobem např. vznikají lokálně omezené endemické druhy, kde problematika konzervační genetiky bývá nejpálčivější.

3. úzká příbuzenská plemenitba (*inbreeding*). Je pravděpodobně nejzávažnějším problémem malých a zmenšujících se populací. Na rozdíl od efektu hrdla láhve a náhodného genetického posunu sama o sobě nemá vliv na míru celkové genetické proměnlivosti, tj. nedochází k měřitelným ztrátám četnosti alel. Co však je na tomto procesu nejzávažnější, je to, že **zvyšuje míru homozygotnosti**, tj. úzkou příbuzenskou plemenitbou se převádí velmi rychle alely z heterozygotního do homozygotního stavu. To má za následek výrazné negativní ovlivnění vlastností souvisejících s rozmnožováním, jako je plodnost, oplozovací schopnost, nástup pohlavní dospělosti apod. Je ovšem patrné i postižení růstové rychlosti, snížení rychlosti růstu a výskyt růstových abnormit. Pro zamezení vlivu příbuzenské plemenitby se uvádí velikost N_e vyšší než 500, krátkodobě (několik generací) pak N_e kolem 50, vždy však záleží na konkrétním druhu/populaci (viz níže). V souvislosti s úzkou příbuzenskou plemenitbou se vyskytuje i další jev, který může snížit rozsah genetické proměnlivosti (tedy nejen převádění alel do homozygotního stavu), a to je **selekce**. Zatímco ve šlechtitelství je selekce pro dané vlastnosti hlavním nástrojem a předmětem pozornosti šlechtitelských genetiků, v konzervační genetice a v praktických ochrannářských programech je hlavním problémem **nezáměrná a náhodná selekce**. Tak bylo v řízeném experimentu u lososa obecného, *Salmo salar*, prokázáno, že již po třech generacích chovu s cílem neprovádět jakoukoliv selekci, se u samic projevila vyšší plodnost a u samců menší agresivita. Analýza případu pak ukázala, že vyšší plodnost samic byla způsobena bezděčnou snahou o lepší hospodářský výsledek líhně a nižší agresivita samců bezděčným výběrem těch, s kterými se snáze manipuluje. Výsledkem jsou pak vlastnosti vhodné pro umělé prostředí, tedy domestikace ryb, která ale nemusí být vhodná pro přirozené prostředí. To je případ uzavřených chovných cyklů, z nichž pochází násady používané k doplňování původních populací.

2.1.2. Mezipopulační proměnlivost

Studium mezipopulační proměnlivosti v konzervační genetice je oborem, kterým se zabývá především **fylogeografie**. Ta studuje prostorovou distribuci znaků, kterými jsou jednotlivé populace charakterizovány a jejich historický vývoj, tj. umožňuje rekonstruovat s dosud nebývalou přesností historii šíření populací a druhů zejména za použití především molekulárních (mitochondriálních i jaderných) znaků. Poznání fylogeografické struktury, tj. rozčlenění areálu druhu na geneticky odlišné populace se známou časovou a distribuční historií bylo zatím popsáno jen u nevelkého počtu druhů evropské ichtyofauny. Tyto dosavadní studie (např. u rodů *Barbus*, *Cottus*, *Salmo*, *Barbatula*, *Cobitis*, *Sabanejewia*, *Tinca*, *Thymallus*, *Lota* atd.) odhalily společný prvek, kterým je výrazný podíl historie při formování moderních populací sladkovodních ryb. Byla zjištěna příčinná souvislost mezi změnami jejich areálu v důsledku čtvrtohorních klimatických změn na jedné straně a množstvím genetické variability zjištěné uvnitř populací a zároveň stupněm divergence mezi populacemi na straně druhé. Geografická složka mezipopulační genetické variability je potom často diktována umístěním glaciálních refugií a kolonizačními cestami, které populace při svém šíření z těchto refugií využívaly. Na druhé straně jsou patrné výrazné rozdíly mezi detailními fylogeografickými vzory zjištěnými pro jednotlivé druhy, které pravděpodobně souvisejí s jejich rozdílnými nároky na prostředí a různými schopnostmi šíření. Jako příklad výše uvedeného lze uvést postglaciální šíření parmy obecné, *Barbus barbus* (Kotlík a kol., 2004). Tento druh má několik hluboce odlišných linií v oblasti kolem Černého moře, avšak pouze jediná z nich v recentním postglaciálu kolonizovala střed a západ Evropy. Proto jsou populace parmy obecné v naší oblasti velmi mladé a geneticky nediferencované mezi povodími. Tento poznatek pak lze uplatnit i v praktické ochraně a řízení jejich populací. Je tedy zřejmé, že právě dokonalá znalost fylogeografické struktury druhu a jeho populací je klíčová pro odborně podloženou ochranu druhů/populací, a proto zaujímá jedno z hlavních míst v konzervační genetice.

Prostorově izolované populace téhož druhu, mezi nimiž je malá nebo žádná genová výměna, mají tendenci se geneticky rozrůžňovat (viz výše – náhodný genetický posun), což v konečném důsledku vede ke speciaci. Přitom je nutné si uvědomit, že současnými metodami studia mezipopulační diverzity lze doložit genovou výměnu mezi populacemi asi v řádu 1 migrující jedince za 10 generací, tj. i v tak nízké frekvenci dochází ke genové výměně mezi populacemi. Poznání vývojové historie druhu, rychlost a cesty jeho šíření a genetická mezipopulační variabilita jsou tedy poznatkovou základnou, která v praktické rovině umožňuje odpovědět základní praktickou otázkou související s mezipopulační genetickou diverzitou – zda v záchranných chovech **udržovat geneticky charakterizované populace** nebo naopak, zda je mísit. Je to proto, že mísením takovýchto izolovaných nebo téměř izolovaných populací dochází k jevu, který se označuje jako **outbrední deprese**. Ta je způsobena narušením koadaptovaných genových souborů, jež jsou funkčně přizpůsobené zcela specifickým podmínkám dané populace. Nepřesně lze připodobnit projevy outbrední deprese projevům mezidruhového křížení, kde je tedy zřejmé, že čím jsou populace geneticky vzdálenější, tím silněji se efekty outbrední deprese projeví. Podobně jako u úzké příbuzenské plemenitby jsou nejmarkantnějšími projevy outbrední deprese poruchy plodnosti. Jako příklad téměř fatálního zanedbání péče o vnitrodruhovou genetickou diverzitu lze uvést dlouhodobou praxi chovu, dálkového převozu násad a zarybňování vod u pstruha potočního, *Salmo trutta*, a to i v celoevropském měřítku. Nejenže byla zanedbána ochrana jiných druhů rodu *Salmo* (kterých je v Evropě konzervativně 5, ale při použití jiného konceptu druhu až 26 – Kottelat a Freyhof, 2007), ale i jejich dílčích, někdy velmi lokálně adaptovaných populací pstruhů.

S mezipopulační genetickou proměnlivostí také souvisí problém zmíněný výše u praxe chovu a transferu násad pstruha potočního – **koncept druhu**, čili co rozumíme pod pojmem druh. Jinými slovy řečeno, zda-li se v konzervační genetice zabýváme skutečně druhem nebo pouze některými jeho **populacemi** a jaké uplatňujeme definice druhu. Tato otázka není vůbec triviální. Jinak se totiž praktická ochranná opatření a legislativa uplatňují u široce rozšířených druhů a jinak přirozeně u lokálně se vyskytujících endemických forem. Jestliže např. budeme považovat střevl potoční, *Phoxinus phoxinus*, za ši-

roce rozšířený druh, pak v ochranářských opatřeních lze brát v úvahu pouze mezipopulační genetickou diverzitu. Jestliže je však tento „druh“ jen kolektivním taxonem, tj. shrnuje pod jedním jménem několik skutečně odlišných druhů, pak je nutno ochranářská opatření zaměřit jinak a to na ochranu různých **druhů** střevlí (např. ve Francii žijí *P. bigerri*, *P. septimae* a *P. phoxinus*). Ač je problém konceptu druhu v souvislosti s mezipopulační a vnitrodruhovou genetickou diverzitou neobyčejně důležitý, přesto se vymyká rámci tohoto učebního textu. Zájemcům o tuto problematiku doporučujeme tyto specializované sborníky – Kottelat (1997), Nelson a Hart (1999), Ruffing a kol. (2002). V každém případě však je při vypracování ochranářských opatření daného druhu ryby **nutno konzultovat taxonoma specialistu**, zejména u drobných druhů ryb, jejichž druhová diverzita je v Evropě ještě nedostatečně známá (Kottelat a Freyhof, 2007).

2.1.3. Vnitrodruhová genetická variabilita

Kombinace údajů o vnitropopulační a mezipopulační genetické variabilitě druhu podá údaje o **vnitrodruhovém rozložení genetické variability**. Distribuce této genetické variability mezi lokalitami, mezi povodími a mezi hlavními identifikovanými liniemi druhu pak v praktické rovině určuje, odkud lze provádět posilování populací, případně provádět repatriační transfery. Vnitrodruhová genetická variabilita vedle historických evolučních důvodů je také silně ovlivněna obývaným habitatem, typem chování a migračními schopnostmi. Tak reofilní druhy obývající počátky toků (např. *Phoxinus*, *Alburnoides*, *Barbatula*, *Cottus*) mají obvykle daleko vyšší vnitropopulační genetickou diverzitu, než druhy obývající dolní úseky toků, např. parma obecná, a nejnižší bývá u druhů potamodromních (viz příklad ostroretky stěhovavé v kap. 2.1.). Podobně nízkou vnitrodruhovou diverzitu mají predátoři, např. štika obecná, *Esox lucius*, u které způsob života a reprodukční strategie způsobuje permanentní mezigenerační efekt láhve hrdla. Tyto údaje jsou proto nesmírně důležité pro přijetí konkrétních ochranářských opatření u daného druhu či plemene v případě šlechtitelství.

Závěrem lze říci, že znalost podstaty těchto procesů pak definují kroky, které mají upevnit nebo zvrátit faktory vedoucí k vyhynutí nebo ke snížení biodiverzity, jako je náhlé snížení velikosti populace, inbreeding, inbreední deprese, genetický drift, nahromadění škodlivých mutací, ztráta genetické proměnlivosti (heterozygotnosti), outbreední deprese, adaptace k nepůvodnímu prostředí nebo fragmentace populací a nechtěná selekce/domestikace. Svou roli zde samozřejmě sehrávají i špatná chovatelská rozhodnutí nebo nevhodné podmínky chovu, jež simulují řadu negativních přírodních a antropogenních procesů. Konzervační genetika je dnes rozsáhlým oborem, jehož všechny aspekty v tomto omezeném textu nemohly být hlouběji pojednány. Zájemce o tento obor může nalézt podrobné poučení v učebnici „*Introduction to Conservation Genetics*“ (Frankham a kol., 2007).

2.2. Obecné zásady genetické ochrany druhů, populací a plemen ryb

Obecné zásady konzervační genetiky u ryb lze úvodem shrnout v následujících odstavcích. Tyto zásady platí jak pro uchovávání ohrožených druhů ryb ve volných vodách, tak i vzácných plemen ryb.

1) Monitoring genetické struktury. Dříve, než se přistoupí k opatřením pro uchování ohroženého druhu nebo populace, je především potřeba zjistit, zda dotčený druh je na území státu monomorfní a geneticky homogenní nebo zda se jeho jednotlivé populace v jednotlivých povodích nebo jejich částech od sebe geneticky odlišují. Stejně tak u vzácného plemene je potřeba zjistit, zda se od sebe neliší jednotlivá chovná hejna. K monitoringu genetické struktury jsou používány odpovídající metody genetických analýz (analýza karyotypu, alozymů, mitochondriální a jaderné DNA), o nichž blíže pojednává kapitola 3. Výsledky analýz mohou o populacích dále vypovědět následující:

- genetickou čistotu druhu / populace / plemene / chovného hejna (přítomnost nebo nepřítomnost mezidruhových nebo meziplenných hybridů, případně genové introgrese);
- míru genetické variability (zda byla populace / plemeno / hejno založena z dostatečného počtu jedinců nebo zda a do jaké míry je inbrední);
- genetickou vzdálenost (odlišnost) jednotlivých populací / plemen / chovných hejn.

Do této doby je bezpodmínečně nutné zachovávat **předběžnou opatrnost**, kterou lze charakterizovat následujícími body:

- Na každou populaci / plemeno / chovné hejno je třeba pohlížet jako na potenciálně unikátní.
- Každou populaci / plemeno / chovné hejno je nutno reprodukovat samostatně.
- Generační ryby vždy brát z daného prostředí a po umělé reprodukci je do něho vracet.
- Pokud možno zamezit adaptaci potomstva na nepůvodní prostředí (zkrácením doby umělého odchovu na nezbytně nutnou dobu).
- Populace / plemena / chovná hejna nekřížit, nepřevážet ani nevysazovat na jiné lokality.

2) Populace musí být dostatečně velká. Jinak se při její reprodukci snižuje genetická proměnlivost a z generace na generaci se zvyšuje stupeň příbuznosti. Následující tabulka (tab. 2.1.) ukazuje procentický nárůst příbuznosti za jednu generaci v populaci s náhodným systémem reprodukce.

Tab. 2.1. Vztah velikosti rodičovské populace použité k reprodukci a míry inbredizace za generaci (upraveno dle Tave, 1986).

Počet samice	Počet samců																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	25	50	75	100	125	150	175	200	225	250	∞			
1	25,00	18,75	16,67	15,62	15,00	14,58	14,29	14,06	13,89	13,75	13,12	13,00	12,75	12,67	12,62	12,60	12,58	12,57	12,56	12,56	12,55	12,50			
2	18,75	12,50	10,42	9,38	8,75	8,33	8,04	7,81	7,64	7,50	6,88	6,75	6,50	6,42	6,38	6,35	6,33	6,32	6,31	6,31	6,30	6,25			
3	16,67	10,42	8,33	7,29	6,67	6,25	5,95	5,73	5,56	5,42	4,79	4,67	4,42	4,33	4,29	4,27	4,25	4,24	4,23	4,22	4,22	4,17			
4	15,62	9,38	7,29	6,25	5,62	5,21	4,91	4,69	4,51	4,38	3,75	3,62	3,38	3,29	3,25	3,22	3,21	3,20	3,19	3,18	3,18	3,12			
5	15,00	8,75	6,67	5,62	5,00	4,58	4,29	4,06	3,89	3,75	3,12	3,00	2,75	2,67	2,62	2,60	2,58	2,57	2,56	2,56	2,55	2,50			
6	14,58	8,33	6,25	5,21	4,58	4,17	3,87	3,65	3,47	3,33	2,71	2,58	2,33	2,25	2,21	2,18	2,17	2,15	2,15	2,14	2,13	2,08			
7	14,29	8,04	5,95	4,91	4,29	3,87	3,57	3,35	3,17	3,04	2,41	2,29	2,04	1,95	1,91	1,89	1,87	1,86	1,85	1,84	1,84	1,79			
8	14,06	7,81	5,73	4,69	4,06	3,65	3,35	3,12	2,95	2,81	2,19	2,06	1,81	1,73	1,69	1,66	1,65	1,63	1,62	1,62	1,61	1,56			
9	13,89	7,64	5,56	4,51	3,89	3,47	3,17	2,95	2,78	2,64	2,01	1,89	1,64	1,56	1,51	1,49	1,47	1,46	1,45	1,44	1,44	1,39			
10	13,75	7,50	5,42	4,38	3,75	3,33	3,04	2,81	2,64	2,50	1,88	1,75	1,50	1,42	1,38	1,35	1,33	1,32	1,31	1,31	1,30	1,25			
20	13,12	6,88	4,79	3,75	3,12	2,71	2,41	2,19	2,01	1,88	1,25	1,12	0,88	0,79	0,75	0,72	0,71	0,70	0,69	0,68	0,68	0,62			
25	13,00	6,75	4,67	3,62	3,00	2,58	2,29	2,06	1,89	1,75	1,12	1,00	0,75	0,67	0,62	0,60	0,58	0,57	0,56	0,56	0,55	0,50			
50	12,75	6,50	4,42	3,38	2,75	2,33	2,04	1,81	1,64	1,50	0,88	0,75	0,50	0,42	0,38	0,35	0,33	0,32	0,31	0,31	0,30	0,25			
75	12,67	6,42	4,33	3,29	2,67	2,25	1,95	1,73	1,56	1,42	0,79	0,67	0,42	0,33	0,29	0,27	0,25	0,24	0,23	0,22	0,22	0,17			
100	12,62	6,38	4,29	3,25	2,62	2,21	1,91	1,69	1,51	1,38	0,75	0,62	0,38	0,29	0,25	0,22	0,21	0,20	0,19	0,18	0,18	0,12			
125	12,60	6,35	4,27	3,22	2,60	2,18	1,89	1,66	1,49	1,35	0,72	0,60	0,35	0,27	0,22	0,20	0,18	0,17	0,16	0,16	0,15	0,10			
150	12,58	6,33	4,25	3,21	2,58	2,17	1,87	1,65	1,47	1,33	0,71	0,58	0,33	0,25	0,21	0,18	0,17	0,15	0,15	0,14	0,13	0,08			
175	12,57	6,32	4,24	3,20	2,57	2,15	1,86	1,63	1,46	1,32	0,70	0,57	0,32	0,24	0,20	0,17	0,15	0,14	0,13	0,13	0,12	0,07			
200	12,56	6,31	4,23	3,19	2,56	2,15	1,85	1,62	1,45	1,31	0,69	0,56	0,31	0,23	0,19	0,16	0,15	0,13	0,12	0,12	0,11	0,06			
225	12,56	6,31	4,22	3,18	2,56	2,14	1,84	1,62	1,44	1,31	0,68	0,56	0,31	0,22	0,18	0,16	0,14	0,13	0,12	0,11	0,11	0,06			
250	12,55	6,30	4,22	3,18	2,55	2,13	1,84	1,61	1,44	1,30	0,68	0,55	0,30	0,22	0,18	0,15	0,13	0,12	0,11	0,11	0,10	0,05			
∞	12,50	6,25	4,17	3,12	2,50	2,08	1,79	1,56	1,39	1,25	0,62	0,50	0,25	0,17	0,12	0,10	0,08	0,07	0,06	0,06	0,05	0,00			

Vysoká plodnost ryb, v porovnání s plodností teplokrevných hospodářských zvířat (skotu, koní, prasat aj.), může neinformovaného chovatele svést k domněnce, že k zajištění dostatečného počtu potomstva k rozmnožení druhu nebo pro další chov stačí použít k reprodukci relativně malého počtu rodičů. Tabulka však názorně ukazuje, že např. při reprodukci tří samců a tří samic je nárůst příbuznosti (inbreedingu) za jednu generaci 8,33 % a i při reprodukci deseti samců a deseti samic je nárůst příbuznosti stále ještě 2,5 %. Teprve při použití dvaceti samců a padesáti samic k reprodukci se chovatel dostane pod 1 % nárůstu příbuznosti za jednu generaci.

Populace, které mají dostatečnou genetickou proměnlivost, netrpí **inbrední depresí**. Ta vzniká křížením příbuzných jedinců a většinou znamená **redukci genetického zdraví** („fitness“) populace. Fitness je vysvětlována jako schopnost jedince určitého genotypu se reprodukovat a obvykle se dá vyjádřit podílem genů tohoto jedince ze všech genů příští generace. Fenotypově se inbrední deprese může projevit morfologickými změnami, fyziologickými změnami obvykle vedoucími ke snížené reprodukční schopnosti a zhoršené imunitě, v chovech ryb také pak sníženými užitkovými vlastnostmi.

Inbrední deprese často vzniká následkem **náhleho snížení velikosti populace** („bottleneck“ efekt, efekt hrdla láhve, viz kap. 2.1.1.). Pokud významná část populace uhynie nebo je jí bráněno v reprodukci (např. výstavbou bariér při třecích migracích) a velikost populace se řádově sníží, narůstá genetický drift v nepřímé úměře k velikosti populace a redukci počtu potenciálních dostupných jedinců k reprodukci se zvyšuje příbuznost v dalších generacích.

Ideální populace je nekonečně velká. Rybářská praxe však pracuje s populacemi, které mají konkrétní velikost. V tom případě se takové populace popisují efektivním počtem chovaných jedinců čili s **efektivní velikostí populace (N_e)**:

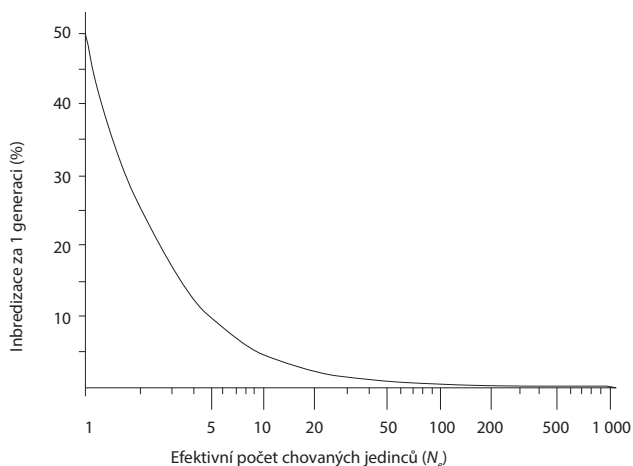
$$N_e = \frac{4 \text{ (počet samic) (počet samců)}}{\text{(počet samic) + (počet samců)}} \quad (1)$$

Pak můžeme nárůst koeficientu příbuznosti za 1 generaci páření vyjádřit jako:

$$\Delta F = \frac{1}{2N_e} \quad (2)$$

Snížováním N_e vzrůstá **genetický drift (posun)**, tj. náhodná změna v genové frekvenci. Dochází ke ztrátě některých (vzácných) alel a k fixaci ostatních. Obecným jevem malého N_e je vzrůst homozygotnosti inbreedingem a ztrátou alel (viz kap. 2.1.1.).

Obr. 2.2. názorně ukazuje, jak se s rostoucí velikostí rodičovské populace použité k reprodukci míra inbredizace za generaci snižuje. Podle materiálů FAO (FAO, 1981) by N_e k minimalizaci inbrední deprese za generaci (tj. 1 %) měla dosahovat počtu alespoň 50 jedinců. Vzhledem ke zranitelnosti rybí populace používá současná evropská praxe dvojnásobnou hodnotu. Tento počet odráží potřebnou efektivní velikost populace rodičů $N_e = 100$ jedinců při poměru pohlaví 1 : 1, při jejíž reprodukci inbrední deprese za generaci narůstá o 0,5 %. Zhruba od velikosti $N_e = 100$ již přestává být další snižování příbuznosti významné, zatímco pracnost reprodukce se zvyšujícím se počtem rodičů chovateli stále přibývá. K tomuto počtu se vzhledem ke specifčnosti chovu ryb v rybnících nebo nádržích, možným ztrátám onemocněním, otravou nebo znečištěním přítokové vody, pytlacením, únikem ryb při povodni apod. ročně připočítává 20 % rezerva. Základní chovnou jednotkou každého genetického zdroje ryb je tedy kmenové hejno o 120 kusech (Flajšhans a kol., 2009). Kmenové hejno sestává z generačních ryb, resp. z generačních a remontních ryb u druhů, kde je velikost kmenového hejna limitována zootechnickou náročností nebo vzácností jedinců daného genetického zdroje (sumec velký, vyza velká).



Obr. 2.2. Vztah velikosti rodičovské populace použité k reprodukci a míry inbredizace za generaci. Upraveno podle Tave (1986).

3) Populace se musí rozmnožovat jako celek. Cílem je zahrnout do reprodukce co nejvíce rodičovských genotypů a uchovat maximální možnou genetickou variabilitu populace. Reprodukce se provádí výhradně umělým výtěrem, při kterém jsou samčí i samičí pohlavní produkty odebírány individuálně, což je žádoucí pro zjišťování důležitých reprodukčních ukazatelů i pro způsob osemenování jiker. Osemenování jiker mlíčím se provádí tak, aby byla zajištěna maximální možná genetická variabilita vzniklého potomstva. Proto se provádí především tzv. individuální oplození, kdy se směs jiker od všech samic rozdělí rovnoměrně na počet částí rovnajících se počtu vytřených samců a každá z částí je osemeněna mlíčím jednoho samce. Teprve po oplození lze jednotlivé dávky smíchat a inkubovat společně. Ani dosavadní praxe tzv. „heterospermického osemenění“ (smísení dávek spermatu odebraného jednotlivým samcům a osemenění jiker touto směsí) nezaručuje, že spermie všech samců oplodní jikry přibližně stejným podílem (Kašpar a kol., 2007).

Jelikož je u některých druhů ryb technicky velmi složité rozmnožovat v jedné výtěrové sezóně všechny jedince celého kmenového hejna společně, navíc někteří jedinci nemusí být v příslušném roce (období) v dobré předvýtěrové kondici, je možné obnovu rozdělit na více časových období. Vždy je ale potřeba využít k reprodukci přednostně jiné jedince, než byli použiti v předchozím období. Např. u kapra obecného je doporučeno obnovu kmenového hejna zajistit z potomstva vzniklého z tří výtěrů generačních ryb kmenového hejna a v každém z výtěrů využít minimálně 15 samic a 25 samců (Flajšhans a kol., 1999).

Frekvence úplné obnovy kmenového hejna, tedy nahrazení všech ryb kmenového hejna novými jedinci, je druhově specifická a závisí na generačním intervalu druhu, početnosti genetického zdroje, způsobu jeho odchovu, zdravotním stavu kmenového hejna a na působení externích faktorů, které se promítají do výsledné početnosti stavů, jako jsou např. predace, úhyny, otravy, povodně apod. Pro jednotlivé genetické zdroje ryb jsou doporučeny tyto intervaly obnovy kmenového hejna:

- 3–4 roky u síha marény a síha peledě,
- 4–6 let u pstruha duhového a pstruha obecného f. potoční,
- 6–8 let u kapra obecného, lína obecného, sumce velkého, jesetera malého,
- pravděpodobně 20–25 let u vyzy velké.

4) Pro zachování genetické diverzity se také v rodičovské populaci **neprovádí selekce**. Výjimkou mohou být vážné veterinární důvody.

5) Je-li to možné, populaci / plemeno **chovat na více lokalitách**. Chov ryb je, vzhledem k jejich biologickým specifikům, snáze ovlivnitelný negativními faktory prostředí než chov většiny teplokrevných hospodářských zvířat. Chov genetického zdroje pouze na jednom místě v republice by proto byl riskantní. Pokud to situace umožňuje, každý genetický zdroj ryb má být udržován v živé genové bance ve dvou, maximálně třech kmenových hejnech, přičemž jednotlivá kmenová hejna jsou chována na oddělených lokalitách, v oddělených chovech různých chovatelů, nejlépe v chovech na různých povodích (Flajšhans a kol., 2009). Toto opatření slouží:

- k redukci nebezpečí ztráty genetického zdroje při nákaze, úhynech a úniku ryb při povodňových stavech;
- k možnosti osvětlení krve z druhého či třetího chovu téhož genetického zdroje při známkách ztráty genetické variability populace;
- k možnosti doplnění z jiného chovu téhož genetického zdroje nebo k převodnému křížení při zjištění výskytu meziplemenných hybridů.

2.3. Metody genetické ochrany populací / plemen ryb

- **Ochrana *in situ***. Všechny způsoby zachování genetické diverzity živých populací a plemen v prostředí, kde se populace vyvinuly nebo se normálně nacházejí (volné vody, chovy).
- **Ochrana *ex situ***. Zachování genetické diverzity populací a plemen *in vitro*, například kryokonzervací spermatu, embryí, buněk nebo tkání. U ryb v ČR již existuje kryobanka spermatu genetických zdrojů ve FROV JU, VÚRH ve Vodňanech. Naopak mražení blastomer, zárodečných kmenových buněk, embryí a oocytů ryb je celosvětově zatím na výzkumné úrovni. Dále sem patří ucelené zachovávání genetického materiálu *in vivo*, ale mimo typické prostředí, ve kterém se vyvinul (např. v trvalých agroturistických expozicích, zoologických zahradách apod.).
- **Kombinace obou přístupů**. Kryokonzervací gamet a jejich využíváním v reprodukci lze snížit počet odchovávaných jedinců.

K těmto aktivním formám ochrany genetické diverzity ryb patří i následující podpůrné činnosti:

- vedení **databanky (databáze) genetických zdrojů ryb**, obsahující soupisy genetických zdrojů a jejich volně žijících příbuzných včetně informací, které pomáhají blíže charakterizovat tyto zdroje. V České republice vede databázi genetických zdrojů ryb FROV JU, VÚRH ve Vodňanech;
- vedení **banky DNA** formou uskladnění tkáňových vzorků pro účely výzkumu, srovnávání a jako referenční vzorky k určení a potvrzení původu. Banku DNA genetických zdrojů ryb vede a jejich molekulárně-genetický popis realizuje Laboratoř genetiky ryb Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v.v.i., v Liběchově.

2.4. Uchování a využití genetických zdrojů ryb v ČR

Rozhodnutím ministra zemědělství byl dne 20. září 2003 vyhlášen Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu, zemědělství a lesní hospodářství. Jednou ze tří jeho součástí se stal i dosavadní Národní program ochrany genetických živočišných zdrojů (Národní program zvířat; od roku 1996). Jeho součástí je podprogram B.1.16. Ryby, pro uchování a využití genetických zdrojů ryb v ČR. Národní program je ustanoven podle § 14 zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon) a podle prováděcí vyhlášky č. 447/2006 Sb. k tomuto zákonu.

Genetický živočišný zdroj je definován v § 2, odst. 2 zák. č. 344/2006 Sb. (úplném znění novelizovaného plemenářského zákona č. 154/2000 Sb.) jako „...jedinec, sperma, vajíčko, embryo, popřípadě ostatní genetický materiál autochtonního nebo lokálně adaptovaného druhu, plemene nebo populace zvířete, nacházející se na území České republiky, mající význam pro výživu a zemědělství, pro uchování biologické a genetické rozmanitosti světového přírodního bohatství a pro umožnění jeho využívání pro potřeby současných i budoucích generací, zařazené do Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů zvířat významných pro výživu a zemědělství...“

Význam genetických živočišných zdrojů obecně je založen na skutečnosti, že původní, nezušlechtěná plemena si zachovávají řadu „primitivních“ vlastností, jako je přizpůsobivost k prostředí, odolnost klimatickým stresům, místním parazitům a patogenům a lepší využití místních potravních zdrojů. Naproti tomu moderní plemena, vyšlechtěná pro intenzivní průmyslovou produkci živočišných produktů, dosahují vysoké užitkovosti za cenu ztráty těchto primitivních vlastností (Flajšhans a kol., 2009).

Význam genetických zdrojů ryb spočívá v tom, že jsou součástí kulturního bohatství našeho národa, jsou výchozím materiálem pro šlechtění nových plemen a v případě potřeby i zdrojem genů využitelných pro zlepšení zdravotního stavu, kondice a dalších užitkových vlastností vysoce užitkových plemen.

Genetickým zdrojem ryb je tedy autochtonní nebo dlouhodobě adaptované plemeno, lokální populace nebo linie ryb. Tvoří je ryby téže populace, které:

- mají oboustranně známý, doložitelný původ,
- jsou zapsány v plemenářské evidenci příslušného plemene,
- jsou chovány v čistokrevné plemenitbě a za účelem zařazení jejich potomstva do genetického zdroje,
- svým fenotypem odpovídají standardu plemene.

Genetické zdroje jsou chovány v rámci místních produkčních systémů u jednotlivých účastníků programu. Jejich plemenitba a metody udržování jsou stanovené metodikami jednotlivých genetických zdrojů, které jsou nedílnou součástí programu a pro dané období jsou závazné.

Vzorkem genetického zdroje je vybraný jedinec nebo odebraný reprodukční materiál (semenné dávky, oocyty, embryo), popřípadě další tkáně, umožňující přenos a regeneraci genetického zdroje při zachování jeho genetického základu.

Genetické zdroje jsou charakterizovány plemennými standardy, schválenými příslušnými chovatelským sdruženími a dále **molekulárně-genetickým popisem**, zejména pomocí mikrosatelitních markerů. Jejich vlastnosti se hodnotí podle obecně závazných předpisů a podle schválených metodik jednotlivých plemen.

Účastník programu a pověřená osoba jsou povinni pravidelně **hodnotit vlastnosti genetického zdroje** způsobem a v rozsahu stanoveném metodikou jednotlivých genetických zdrojů, která se může lišit od způsobu kontroly užitkovosti stanoveného prováděcí vyhláškou. Účastník programu je povinen výsledky hodnocení každoročně předávat pověřené osobě.

Cílem programu je:

- udržovat původní plemena u těch druhů ryb, kde se k produkčním účelům používá převážně (poly)hybridů,
- udržovat původní druhy v případech, kdy intenzivní produkce mezidruhových hybridů způsobila vymizení čistých rodičovských druhů (síhové), nebo kdy jsou chovány druhy, mající hospodářský význam a přitom jsou v přírodě ohroženy (jeseteři).

2.4.1. Postup programu od jeho založení v roce 1996:

- 1) Identifikovat a popsat geneticky odlišné populace a plemena.
- 2) Založit živou genovou banku pro každé plemeno a udržovat ji za definovaných podmínek.
- 3) Založit jednotný systém značkování ryb a operativní evidence.
- 4) Založit banku spermatu pro potřeby programu.
- 5) Koordinovat a metodicky vést aktivity chovatelů.
- 6) Vyhodnocovat genetické analýzy a jejich výsledky zohlednit při každoroční věcné i finanční aktualizaci programu.
- 7) Prostřednictvím Rady genových živočišných zdrojů, seminářů a školení informovat tvůrce rybářské hospodářské politiky a chovatele.
- 8) Provádět výuku VŠ studentů a osvětovou činnost pro veřejnost.

Genetickými zdroji ryb jsou tyto druhy ve schválených formách a liniích:

- kapr obecný (Žďárský lysec Žď-L, Žďárský šupináč Žď-Š, Jihočeský kapr šupinatý C 73, Mariánskolázeňský kapr šupinatý ML, Milevský lysec MV, Jihočeský lysec BV, Telčský lysec Te, Pohořelický lysec PL, Třeboňský šupináč TŠ, C 434 a C 435),
- lín obecný (linie Modrá, Vodňanská, Tábořská, Mariánskolázeňská, Velkomeziříčská, Hlubocká, Kož. 92),
- pstruh duhový (PdM, PdD66, PdD75),
- pstruh obecný f. potoční (Šumavská a Tepelská populace),
- sumec velký (Vodňanský a Hodonínský) a
- čisté druhy: síh severní maréna, síh peleď, jeseter malý a vyza velká.

Chovný standard

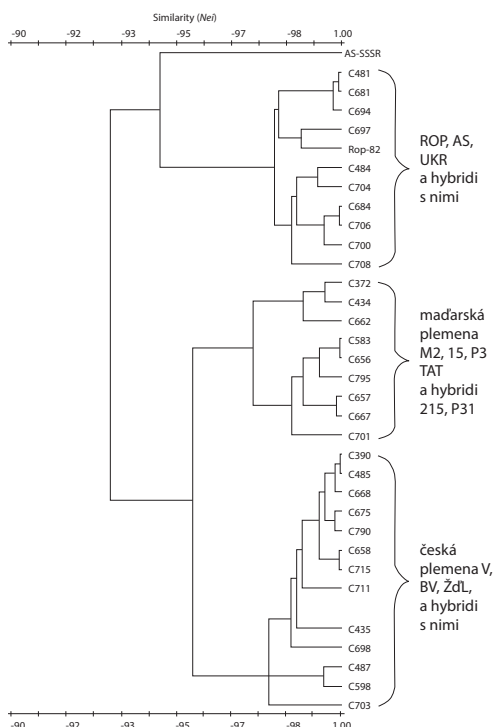
Chovný standard genetických zdrojů (GZ) kapra vychází z Pokorného a kol. (1995), lína z Kvasničky a Píchy (1985), lososovitých z Pokorného a kol. (2003).

U některých plemen jednotlivých GZ ryb nelze plemennou příslušnost a původ jednoznačně stanovit na základě prostého hodnocení ukazatelů exteriéru a touto metodou rovněž nelze stanovit meziplemenné a v některých případech ani mezidruhové hybridy, zvláště v následných filiálních generacích.

Genetické analýzy jsou proto nedílnou součástí programu udržování GZ ryb. Jsou legislativně stanoveny podle zákona č. 154/2000 Sb. ve znění pozdějších předpisů. Analýzy provádí Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., v Liběchově (ÚŽFG) ve spolupráci s FROV JU, VÚRH Vodňany. Podle zák. č. 154/2000 Sb. je také ÚŽFG oprávněnou osobou k ověřování původu u ryb. Provádějí se následující typy analýz:

Biochemicko-genetické analýzy polymorfních proteinů

Provádějí se u generačních a remontních ryb z periferní krve. V případě nutnosti se u nižších kategorií ryb (plůdek, násada, tržní ryba) analyzují rovněž proteinové systémy červeného a bílého svalu, jater, případně oka a mozku, odebraného po zabití ryby. Tyto analýzy jsou aplikovány u kaprovitých, lososovitých, u sumce a u síhů. Obr. 2.3. znázorňuje genetickou strukturu plemen a linií kapra chovaných ve VÚRH ve Vodňanech v 90. letech 20. století právě na základě jejich genetické podobnosti: všem studovaným skupinám je nejvíce vzdálen Amurský sazan (AS) jako odlišný druh (*Cyprinus rubrofasciatus*) a jemu nejbližší je shluk (*cluster*) plemen a hybridních linií z něj odvozených (Ropšinský kapr šupinatý, ROP; Ukrajinský kapr šupinatý, UKR aj.). Další dva odlišné shluky jsou tvořeny maďarskými a českými plemeny kapra a příslušnými hybridními liniemi.



Obr. 2.3. Příklad monitoringu genetické struktury plemen a linií kapra ve VÚRH ve Vodňanech na základě alozymové analýzy. Genetická podobnost podle Nei (1972). Z archivu V. Šlechtý (1992–93).

Molekulárně-genetická analýza (studium mitochondriální DNA metodou PCR-RFLP a jaderné DNA analýzou mikrosatelitů)

Provádějí se u všech věkových kategorií, u vykuleného plůdku z celých jedinců, u starších kategorií z periferní krve nebo odstřížku ploutve. PCR-RFLP může být vedle biochemických markerů u kapra obecného využívána k určení hybridů s Amurským sazanem a Ropšínským kaprem. Mikrosatelitní markery jsou zvláště vhodné vzhledem k vysokému stupni vzájemné příbuznosti evropských plemen kapra, nižší míře genetické variability plemen lína, vysokému stupni prokřížení populací u jednotlivých druhů lososovitých ryb apod.

Cytogenetická analýza ploidie průtokovou cytometrií a analýzou obrazu jader erytrocytů

Tato metoda je používána u těch genetických zdrojů, kde existuje riziko výskytu triploidních sterilních jedinců v chovu (lín obecný, pstruzi, sumec velký), a dále zejména u druhů, kde existuje riziko výskytu polyploidních mezidruhových hybridů (jeseteři). Provádí se u všech věkových kategorií, u vykuleného plůdku z celých jedinců, u starších kategorií ze vzorku periferní krve.

Depozice vzorků do genové banky

Při odběru vzorků tělních tekutin nebo tkání pro genetické analýzy pracovníci autorizované vědecké laboratoře zároveň od jednoho jedince deponují do genové banky:

- 0,1 ml krve a/nebo 50 mg odstřížku ploutve odebrané *in vivo* nebo
 - 100 mg buněčné tkáně odebrané *post mortem* (§ 4 vyhl. 447/2006 Sb.)
- Genovou banku spravuje autorizovaná vědecká laboratoř.

Chov *in situ*

Hlavní metodické zásady jsou:

- 1) Individuální značkování a operativní evidence generačních ryb v kmenovém hejnu (mikročipovými značkami, viz obr. 2.4., nebo alfanumerickými maticemi vymraženými v kapalném dusíku, v souladu s plemenářskou evidencí dle prováděcí vyhlášky).
- 2) Provádění genetických analýz nových hejn a remontů (budoucích generačních ryb) pro obnovu kmenového hejna.
- 3) Udržování každého GZ ryb minimálně ve dvou, lépe ve třech chovech (viz kap. 2.2.). Tyto chovy tvoří tzv. nukleus.
- 4) K obnově kmenového hejna daného GZ provádět hromadnou reprodukci generačních ryb.

Cíl šlechtění

U GZ ryb se šlechtění neprovádí. Cílem chovu *in situ* je udržet co nejširší genetickou proměnlivost daného GZ. Plemena zařazená do programu udržování genetických zdrojů mohou být dále šlechtěna až po naplnění zásad ochrany genetických zdrojů (vytvoření nukleu GZ).



Obr. 2.4. Mikročipové značky typu P.I.T. tags (pracovní frekvence 134,2 kHz) a sterilizovatelný aplikátor ke značkování generačních ryb. Z archivu M. Flajšhanse (1998).

Hodnocení jedinců

Hodnotí se parametry celé populace na základě statistické analýzy náhodně vybraného souboru min. 33 jedinců z každého opakování.

Dokumentace o genetickém zdroji

Účastník NP (chovatel)

- vede prvotní plemenářskou evidenci (výtěrové listy, odlovní a komorovou knihu),
- předává k 30. 6. každého roku Rybářskému sdružení České republiky hlášení o počtech plemených ryb dle plemenné příslušnosti a pohlaví,
- jako oprávněná osoba podle zák. č. 154/2000 Sb. ve znění pozdějších předpisů vede a zpracovává výsledky testování a posuzování za chovy, u nichž tuto činnost provádí,
- výsledky testování a posuzování dodává k 30. 11. každého roku Rybářskému sdružení České republiky, které zajišťuje jejich sumární zpracování.

Garantující subjekt předává Národnímu ref. středisku k 1. 12. každého roku údaje o:

- aktualizované databázi chovatelů a chovů jednotlivých GZ ryb,
- depozici krevních nebo tkáňových vzorků do genové banky v ÚŽFG AV ČR, v.v.i., v Liběchově,
- depozici ID kryokonzervovaných GZ ryb do kryobanky ve FROV JU, VÚRH ve Vodňanech,
- stavu uchování a využití GZ ryb formou výroční zprávy.



Obr. 2.5. Zamrazovací automat Planer Kryo 10, používaný ke kryokonzervaci semenných dávek ryb ve FROV JU ve Vodňanech. Z archivu M. Rodiny (2002).

Uchování *ex situ*

Odběr a zmrazování semenných dávek je postupně rozšiřováno na všechny GZ ryb. Zmrazuje se 10 ml spermatu od 1 mlíčka, zmrazování je prováděno v kryoautomatu Planer Kryo 10 series III (Planer, UK; viz obr. 2.5.), v 2 ml kryozkumavkách se zmrazovaným objemem 1 ml. Rovněž lze použít jednodušší metodu předmrazení spermatu v parách kapalného dusíku (cca 1–2 cm nad jeho hladinou) a přenesení dávek do kapalného dusíku. Motilita spermií s měřením jejich rychlosti je stanovena z videozáznamu pomocí analýzy obrazu. Hodnocení fertility spermií je prováděno v kontrolovaných inkubačních podmínkách při opakování 3–4× u 1 mlíčka s hodnocením procenta vykuleného váčkového plůdku a procenta malformací.

2.5. Ochrana genetické diverzity volně žijících druhů

Zatímco u hospodářsky důležitých druhů a plemen ryb je ochrana jejich genetické variability dána legislativně v zákoně o šlechtění a ochraně genových zdrojů, u volně žijících druhů se legislativně chrání pouze některé druhy a nikoliv jejich vnitrodruhová diverzita, ač je ochrana genofondu volně žijící ichtyofauny dobře propracována a metodicky zvládnuta (Hanel a Lusk, 2005), přesto však tyto snahy nenalézají odpověď u odpovědných orgánů (Zima a kol., 2006).

LITERATURA

- Hanel, L., Lusk, S., 2005. Ryby a mihule České republiky. Rozšíření a ochrana. Český svaz ochránců přírody, Vlašim, 447 s.
- Flajšhans, M., Linhart, O., Šlechtová, V., Šlechta, V., 1999. Genetic resources of commercially important fish species in the Czech Republic: Present state and future strategy. Special edition Genetics in Aquaculture VI, Aquaculture 173: 471–483.
- Flajšhans, M., Hulák, M., Kašpar, V., Rodina, M., Kocour, M., Gela, D., 2009. Metodika uchování genetických zdrojů ryb v živé genové bance. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 91, 35 s.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., 2007. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 617 pp.
- Kašpar, V., Kohlmann, K., Vandeputte, M., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Alavi, S.M.H., Hulák, M., Linhart, O., 2007. Equalization of sperm concentrations in a pool of sperm does not prevent large variance in males contribution in common carp progeny. Aquaculture 272 (S1): S204–S209.
- Kotlík, P., Bogutskaya, N.G., Ekmekci, F.G., 2004. Circum Black Sea phylogeography of *Barbus* freshwater fishes: divergence in the Pontic glacial refugium. Molecular Ecology 13 (1): 87–95.
- Kottelat, M., 1997. European freshwater fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR) with an introduction for non-systematics and comments on nomenclature and conservation. Biologia, Bratislava 52 (Suppl. 5): 1–271.
- Kottelat, M., Freyhof, J., 2007. Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat, Cornol, Switzerland, 646 pp.
- Kvasnička, P., Pícha, O., 1985. Plemenitba a šlechtění lína: Charakteristika výchozích populací. Bulletin VÚRH Vodňany 21 (3): 12–16.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. The American Naturalist 106: 283–292.
- Nelson, J.S., Hart, P.P.J.B. (Eds), 1999. The species concept in fish biology. Reviews in Fish Biology and Fisheries 9 (4): 1–386.
- Pokorný, J., Flajšhans, M., Hartvich, P., Kvasnička, P., Pružina, I., 1995. Atlas kaprů chovaných v České republice. Victoria Publishing, Praha, 69 s.
- Pokorný, J., Adámek, Z., Šrámek, V., Dvořák, J., 2003. Pstruhařství. Informatorium, Praha, 281 s.
- Ruffing, R.A., Kocovsky, P.M., Stauffer, Jr., J.R., 2002. Species concepts and speciation in fishes. Fish and Fisheries 3: 143–232.
- Sbírka zákonů ČR, 2006, částka 106. Zákon č. 344/2006 Sb. Úplné znění zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon), jak vyplývá z pozdějších změn. Tiskárna MV, Praha.
- Sbírka zákonů ČR, 2006, částka 145. Vyhláška MZe ČR č. 447/2006 Sb., o genetických zdrojích zvířat. Tiskárna MV, Praha.
- Sbírka zákonů ČR, 2007, částka 63. Vyhláška MZe ČR č. 199/2007 Sb., kterou se mění vyhláška č. 136/2004 Sb., kterou se stanoví podrobnosti označování zvířat a jejich evidence a evidence hospodářství a osob stanovených plemenářským zákonem. Tiskárna MV, Praha.
- Tave, D., 1986. Genetics for fish hatchery managers. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, USA, 299 pp.
- Zima, J., Kirschner, J., Ráb, P., Roudná, M., Staňková, J., Vilímová, J., 2006. Identifikace priorit a rozvoje kapacit pro plnění závazků České republiky vyplývajících z Úmluvy o biologické rozmanitosti. MŽP, Praha, 109 s.

NÁSTROJE PRO STUDIUM BIODIVERZITY A ŠLECHTĚNÍ RYB – GENETICKÉ ZNAKY A JEJICH ANALÝZY

P. Ráb, V. Šlechta, M. Hulák, V. Bohlen Šlechtová



NÁSTROJE PRO STUDIUM BIODIVERZITY A ŠLECHTĚNÍ RYB – GENETICKÉ ZNAKY A JEJICH ANALÝZY

P. Ráb, V. Šlechta, M. Hulák, V. Bohlen Šlechtová

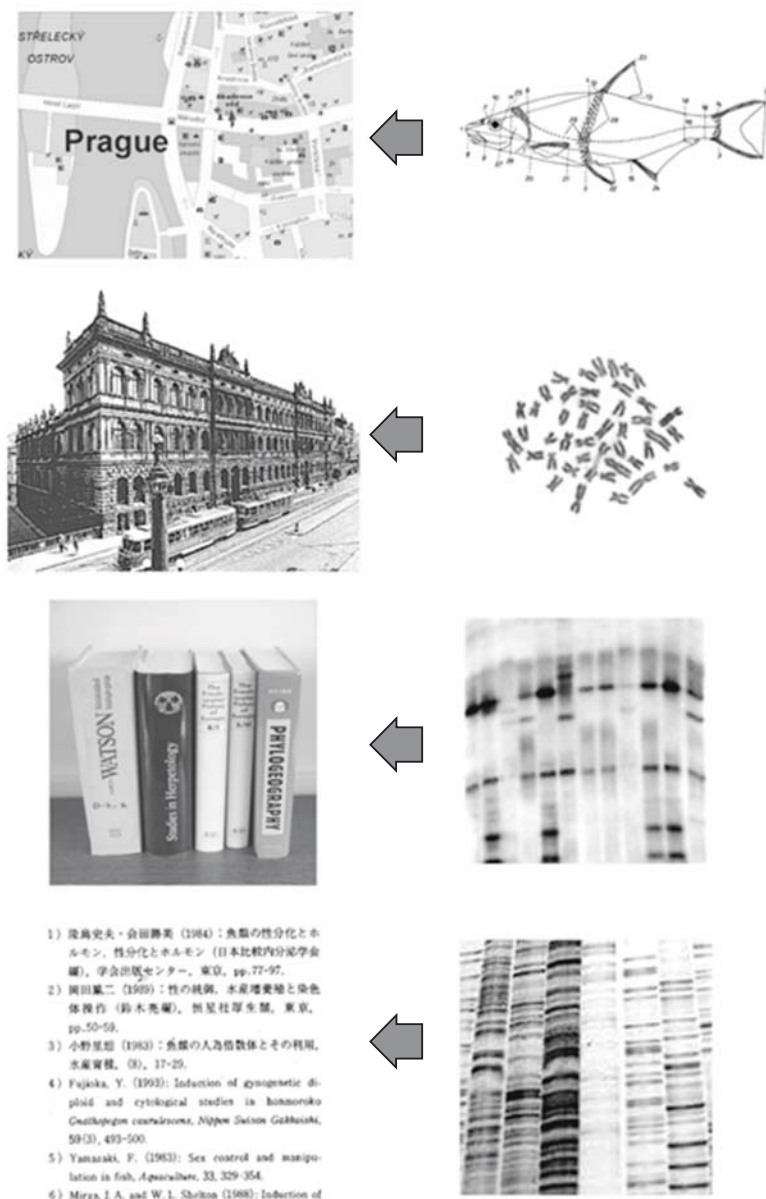
Evolučně uniformující vodní prostředí způsobuje, že mnoho druhů ryb má velmi podobný tělní stavbní plán. Ačkoliv to neplatí obecně (viz tvarová diverzita řady skupin mořských ryb), přece jen to platí především pro druhy ryb, jež jsou v regionu střední Evropy předmětem ochrany nebo rybářského zájmu. Kompetentní taxonom pracující s moderním konceptem druhu (např. Kottelat a Freyhof, 2007) dokáže najít zcela spolehlivé diagnostické znaky na vnějším povrchu těla, jako je typ a způsob ošupení, vzájemné postavení ploutví, poměry tělesných proporcí, barevné znaky aj. Používá tedy **znaky meristické**, které se dají spočítat (ploutevní paprsky, šupiny, obratle aj.) a **znaky plastické**, jež se musí měřit (míry, hmotnosti, indexy). V mnoha případech studia biologie i praxe šlechtění ryb je však možnost použití těchto znaků omezená, případně zcela nemožná, protože nedokáží odpovědět na mnoho důležitých otázek. Navíc vnější morfologické znaky mohou být ovlivněny během ontogenetického vývoje (např. počet obratlů), stavem rybího organismu (např. při hladovění) a do určité míry vnějším prostředím (např. pH vody). Tím se samozřejmě tento typ znaků nediskvalifikuje, není méněcenný, je a stále bude metodickou součástí studia biologie a šlechtění ryb, už jen proto, že před zavedením genetických metod bylo studium vnější i vnitřní morfologie (např. osteologie) ryb jediným nástrojem poznání jejich diverzity a bylo proto shromážděno pozoruhodné množství poznatků. Tyto morfologické znaky mají pochopitelně také svoji komponentu dědičnou, danou vlohami pro příslušný typ znaku; o dědičnosti znaků diskretních (kvalitativních) pojednává kapitola 4, o dědičnosti znaků spojitých (kvantitativních) kapitola 5.

Určitá omezenost výpovědní hodnoty morfologických tělesných znaků vedla vždy k hledání dalšího typu nástrojů studia ryb, počínaje znaky imunologickými (50. a 60. léta 20. století), přes znaky založené na polymorfních bílkovinách (např. typu enzymů, od 70. let 20. století dosud), až po mohutný současný nástup využití znaků obsažených přímo v genomu, tedy znaků, jež se označují jako molekulární¹ nebo molekulárně genetické. Použití těchto nemorfologických znaků není dosud široce rozšířeno a jejich výpovědní hodnota v různých přírodních situacích biologie ryb, případně v rybářských aplikacích, je stále ještě nepříliš dobře známa. Tato kapitola podá přehled genetických znaků, jejich hierarchii a jejich správné použití.

¹ V tomto textu budeme používat termín molekulární s vědomím, že se jedná o anglicismus odvozený od anglického adjektiva molecular, správně česky odvozené adjektivum od slova molekula je molekulový. I přesto však současná odborná čeština chápe termín molekulární především ve vztahu k naukám o genomu, zatímco molekulový ve vztahu k naukám chemickým a fyzikálním (např. molekulová hmotnost).

3.1. Hierarchie užívaných znaků a stavba genomu

Pro znázornění vzájemného vztahu znaků, které odpovídají jednotlivým úrovním organizace těla a organizace genomu, jsme použili srovnání uvedené na obr. 3.1.



Obr. 3.1. Srovnání mezi různými úrovněmi organizace genomu (vpravo) a různými úrovněmi informací obsažených v plánu města, v knihovně, v knihách a písmenech v knihách (nalevo) zjednodušeně podává vysvětlení vypovídací hodnoty různých genetických znaků. Podle Rába a kol. (2007).

Rozmanité **morfologické** (a to nejen meristické a morfometrické) **znaky lze přirovnat k plánu města**. Mnoho měst se liší jedno od druhého, některá jsou velká, některá jsou naopak malá. Jiná však byla navržena jedním architektem a jsou si velmi podobná velikostí, tvarem a uspořádáním. Tak třeba podoustve rodu *Vimba* (jako na obrázku) nebo všech pět druhů štik rodu *Esox* mají velmi podobný tělní plán. Tělní plán štik je příklad velmi úspěšného evolučního řešení dravce číhavého typu, protože je u pravých štik doložen již z pozdní křídy a je opakován u celé řady naprosto nepříbuzných skupin ryb.

Pokračujeme-li v našem příkladu, potom každé (slušné) město má knihovnu, jež uchovává informace, buď klasicky v knihách, nebo nověji na různých elektronických nosičích. **Architektura takové knihovny** potom odpovídá **chromozomové úrovni organizace genomu** – místu, kde jsou údaje uschovávány (= genetická informace), zpracovávány (= překládány do aminokyselin), násobeny (= např. regionálními duplikacemi), ztráceny (= např. delecemi), znovu nalezeny, vyměňovány (= např. translokacemi), případně ukradeny (= např. virovými vektory). V řadě studií různých biologických situací je důležité určit, zda architektura knihovní budovy je nová a moderní (= evolučně vysoce přeměněné chromozomové sádky) nebo velmi stará (= evolučně vysoce konzervované chromozomové sádky), případně má dva různé architektonické styly nepatříčně smíchané dohromady (= hybridní genomy). Naše přirovnání také ukazuje následující skutečnosti:

a) v různých městech jeden a tentýž architekt* postavil tu samou knihovnu (= např. morfologicky shodné karyotypy kaprovitých ryb podčeledi Leuciscinae),

b) podobná města mohou mít knihovny navrhované různými architekty (= morfologicky velmi podobné druhy mají velmi odlišné karyotypy (= např. lososovití s karyotypy typů A a B),

c) některá města mohou mít dvě i více knihoven (= polyploidní situace),

d) některé knihovny mohou být v rekonstrukci (= struktury karyotypů zřetelně korelované s dalšími faktory pozorovaná např. u anadromních lososovitých).

Knihovny obsahují knihy nebo jiné jednotky informačních prostředků (= **geny**), **odpovídají tedy genové úrovni organizace genomu**. Podobně jako v předešlé části lze určit že:

a) různé knihovny (= chromozomové sádky) v různých městech (= organizmech) mají tytéž knihy nebo obráceně,

b) v jakékoliv jednotlivé knihovně, může být několik kopií stejné knihy (= regionální, místní multiplikace určitých genů), zatímco jiné knihy mohou chybět (= evoluční ztráta genů).

V kontextu tohoto příkladu by bylo možno pokračovat v mnoha dalších srovnáních mezi **genovou výbavou genomu a knihovním (informačním) fondem dané knihovny**, a proto lze pokračovat další úrovní organizace genomu. Když **otevřeme knihu**, můžeme vidět **věty složené ze slov a slova složená z písmen**, to jsou všechny **znaky založené na sekvencích a jejich kombinacích**, z kterých je genom složen. Podobně jako je abeceda (evropského typu, u asijských tomu bývá jinak) složená jen z omezeného počtu písmen, je omezen i genetický kód kombinací nukleotidových tripletů. Z této skutečnosti potom vyplývá, že mnoho slov a vět se opakuje v nejrůznějších knihách (= např. repetitivní sekvence) a že jsou různé věty v jedné knize (= např. unikátní sekvence). Vidíme také, že můžeme rozumět smyslu

*„architektem“ je v evoluci míněn selekční tlak nebo kombinace selekčních tlaků. Bližším zájemcům o tuto problematiku doporučujeme knihy C. Richarda Dawkinse, např. *The Selfish Gene* (1976; česky vyšla jako *Sobecký gen*, 1998) nebo *The Blind Watchmaker* (1986; česky vyšla jako *Slepý hodinář*, 2002).

mnoha vět (a také jim rozumíme stále více, což souvisí s pokrokem genomických projektů sekvenujících celé genomy organismů), zatímco jiným větám stále ještě nerozumíme (byť čteme písmena) nebo musíme vynaložit značné úsilí o jejich přečtení (na obrázku znázorněné japonskými znaky).

Výše zmíněné a zjednodušené srovnání ukazuje, že každá biologická situace či realita vyžaduje různý nástroj (nebo jejich kombinaci), jenž popisuje danou úroveň organizace genomu. Výběr správného nástroje pro určitý typ studia má i **závažný aspekt praktický**. S každou úrovní od znaků morfologických po sekvence genomu stoupají

a) **náklady na řešení** a

b) **zvyšuje se komplikovanost výstupních dat** a jejich zpracování a s tím se zvyšují i nároky na jejich správnou interpretaci.

V následujících částech budou probrány znaky v různé úrovni organizace genomu.

3.2. Morfologické znaky

Prvními znaky použitými pro genetické analýzy byly morfologické znaky děděné mendelisticky, epigeneticky nebo jinak – každý znak, který je geneticky determinován lze považovat za genetický znak. Tyto znaky jsou však tématem kapitoly Genetika kvalitativních znaků, a proto se jimi zde zabývat nebudeme. Jen je třeba si uvědomit, že metodický vývoj i v této oblasti poskytuje pro různé oblasti studie biologie a šlechtění ryb mocné nástroje. Je to např. geometrická morfologie, jež dokáže pomocí matematické (počítačové) transformace měřených tělesných proporcí získat soubor velmi důležitých údajů. Jako příklad může sloužit pokus o geometricky morfologickou determinaci plemen českých kaprů (Petrtyl a kol., 2007).

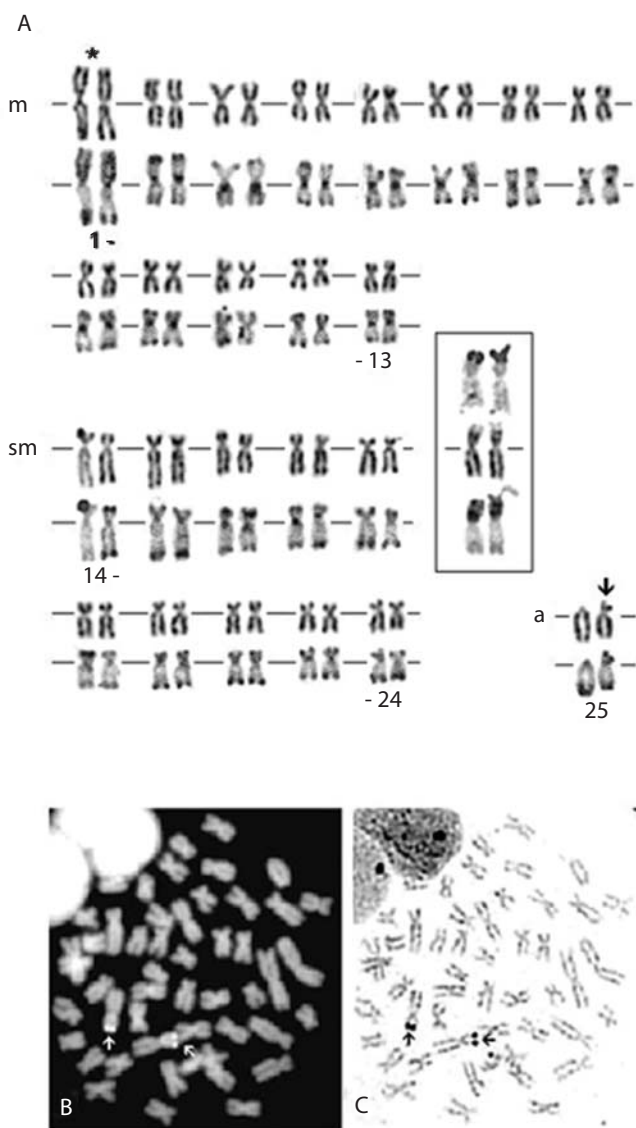
3.3. Karyotypové a chromozomové znaky

Chromozomy, nositelé dědičné informace organismu, jsou útvary, do kterých se organizuje během buněčného dělení materiál buněčného jádra. Chromozomy jsou tak útvary vysoce dynamické, které mění velmi rychle svou morfologii v průběhu buněčného cyklu, a proto se vyskytují v mnoha podobách, rovněž mezi chromozomy somatických a germinálních buněk jsou velké rozdíly. Nejčastěji je však studován chromozom od pozdní profáze do metafáze buněčného dělení, tedy takový, který vypadá jako X (dvouramenný chromozom) nebo V (jednoramenný chromozom). Tato skutečnost souvisí s dvěma metodologickými pokroky moderní cytogenetiky – objevem **hypotonizace** nativních dělících se buněk (kdy dojde k nabobtnání jader a tím k uvolnění a oddělení jinak nahloučených chromozomů) a **použitím vřetenkových jedů** typu kolchicinu (který inhibuje polymeraci mikrotubulů vazbou na tubulin, a blokuje tak tvorbu vřeténka, odtud název vřetenkový jed). Další velmi významnou metodickou pomůckou je **diferenciální barvení chromozomů**, které umožňuje daleko podrobnější a přesnější analýzu podélné struktury chromozomů. Tyto techniky se v zásadě dělí na dvě velké oblasti.

a) **Diferenciální techniky** využívají rozdílných vlastností euchromatinu (= zhruba oblastí s kódujícími sekvencemi) a heterochromatinu (= zhruba oblastí s nekódujícími, repetitivními krátkými sekvencemi) a dělí se na **konvenční** a **fluorescenční** podle typu použitého barviva chromozomové DNA. Použití digesce proteolytickými enzymy typu trypsinu a následné barvení jádrovým barvivem (např. Giemsovým) tvoří charakteristické proužky (G-pruhování), které jsou zobrazením raně a pozdě se replikujících segmentů chromozomů (replikonů) a proužky jsou charakteristicky stejné pro oba homologní chromozomy. Tento typ barvení se široce využívá v cytogenetice vyšších obratlovců, tj. ptáků a savců, a umožnil

(viz „typ barvení“) formulovat hypotézy o mezidruhové homologii jednotlivých chromozomů. U ryb (až na výjimky např. u úhořovitých ryb) však tento typ barvení žádné proužky nepůsobí pro jinou replikační organizaci chromozomů. Další technika spočívá v denaturaci a následné renaturaci ve speciálním pufru (C-pruhování), která vizualizuje oblasti hetero- a euchromatinu, které mají po této proceduře jinou afinitu k jadrovým barvivům (ne- i fluorescenčním). Tato technika je použitelná pro chromozomy všech obratlovců. Jinou konvenční technikou je impregnace stříbrem (AgNO_3), která detekuje místa na chromozomu, kde jsou uloženy mnohonásobné repetice pro hlavní ribozomální geny, tzv. organizátor jadérka („*Nucleolar Organizer Region*“, NOR). Také tato technika je obecná a lze ji aplikovat i na interfázni jádra, což bývá výhodné např. pro předběžný odhad ploidie. Fluorescenční techniky využívají specifické vazebné schopnosti různých typů fluorochromů na GC- nebo AT-specifické oblasti chromozomové DNA. Bývají to obvykle různá antibiotika (např. GC- specifická jako Chromomycin A3, Mithramycin M, Olivomycin nebo AT-specifická jako Actinomycin D, Distamycin A, 4',6'-diamidino-2-phenylindole – DAPI, quinacrin, metylénová zeřeň). Tato barviva se obvykle používají v kombinaci GC- a AT- specifických fluorochromů (např. CDD-pruhování: CMA3/DA/DAPI); tyto postupy se označují jako „*counter-stain enhanced fluorescence*“ (český ekvivalent neexistuje) a změnou filtrů senzitivních na daný fluorochrom lze tak na týchž chromozomech pozorovat různé struktury. Podobně jako u proteolytického působení na chromozomy, použití těchto postupů **přináší naprosto jiné vzory u vyšších a nižších obratlovců**. Zatímco oba typy fluorochromů na chromozomech ptáků a savců vizualizují proužky stejné jako nebo inverzní ke G-pruhům, čili recipročně zobrazují rané a pozdní se replikující úseky chromozomu, tak u nižších obratlovců GC-specifické fluorochromy zobrazují pouze místa hlavních ribozomálních genů a typ heterochromatinu bohatý GC-sekvencemi a AT-specifické fluorochromy typ heterochromatinu bohatý AT-sekvencemi. U paprskoploutvých ryb je vazba cytogeneticky vizualizovatelné GC-bohaté DNA s hlavními ribozomálními geny evolučně fixována od stupně Neopterygii (kostlíni a výše), protože u jeseterů tato vazba nalezena nebyla (Ráb a kol., 1999). Naproti tomu typy heterochromatinu bohaté AT-sekvencemi se vyskytují mezi rybami nahodile, což souvisí s vnitřní diferenciací genomu ryb; např. u lososovitých či halančíkovitých se tento typ heterochromatinu vyskytuje velmi často, naproti tomu u kaprovitých pozorován dosud nikdy nebyl.

Nemožnost vizualizovat příčné pruhování chromozomů ryb znemožnila u ryb to, co je již u ptáků a savců dávno běžné – totiž **stanovovat mezidruhové homologie chromozomů** či dokonce jejich jednotlivých úseků, dále studovat vnitrodruhovou proměnlivost chromozomů. Proto také znalosti o chromozomových evulucích v různých skupinách ryb jsou velmi omezené a jsou jen hypotézami. Jistou náhradou tohoto metodického omezení je použití tzv. **sekvenčního diferenciálního barvení** na chromozomech ryb. Tento postup spočívá v postupném barvení chromozomů jedné a téže metafáze různými technikami, a to tak, že se nejprve použije technika nejméně destruktivní k chromozomové DNA a poslední ta, která je destruktivní nejvíce; obvyklé je nejprve použití fluorochromů, poté jadrových barviv, následuje impregnace stříbrem a nakonec denaturační/renaturační barvení na heterochromatin. Po každém barvení je nutné vybrané metafázni chromozomy dokumentovat (nejlépe CDD kamerou na mikroskopu), preparáty chromozomů odbarvit a poté nabarvit další technikou, a takto se postupuje až do konce. Metodika vyžaduje dokonalou evidenci poloh metafází na chromozomech, důkladné laboratorní poznámky o detailech postupu, protože jen v nemnoha případech lze celou sekvenci barvení dokončit. Je tomu tak proto, že cytogenetika ryb ještě zdaleka nedosáhla úrovně standardů cytogenetiky vyšších obratlovců, přesto však úspěšné sekvenční barvení chromozomů ryb může přinést velké množství údajů použitelných v mnoha oborech studia ryb. Příklad sekvenčního (následného) postupu barvení a získaných informací je ukázán na obr. 3.2. V novější době lze kombinovat také sekvenční diferenciální barvení s metodami molekulární cytogenetiky.

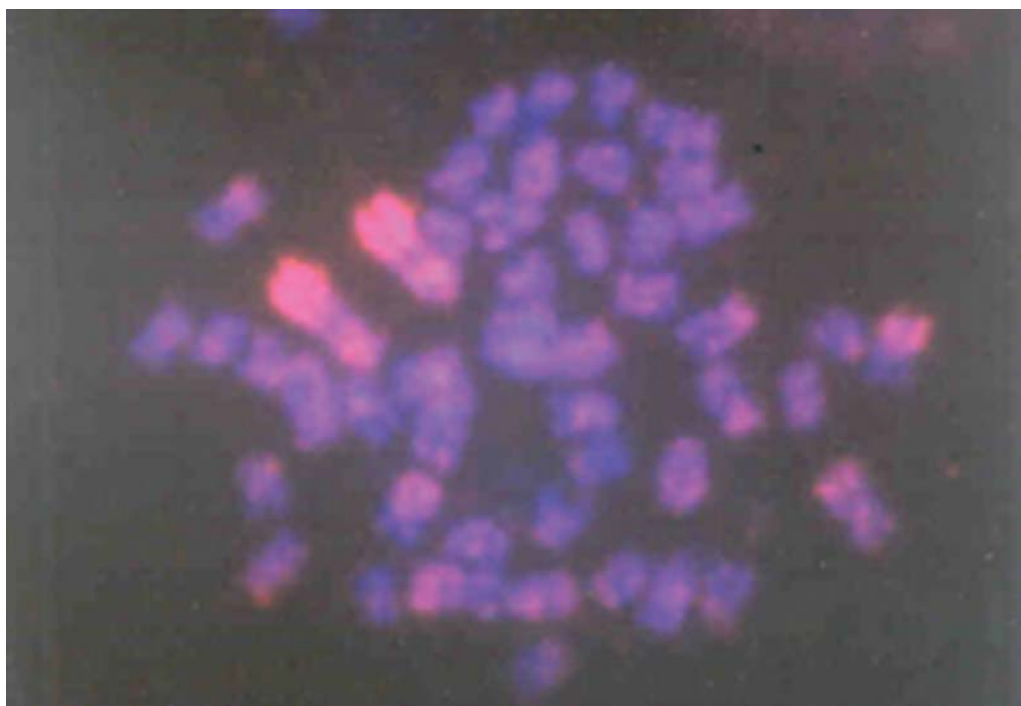


Obr. 3.2. Karyotyp (A) samce hrouzky Kesslerova, *Romanogobio kessleri*, sestavený ze sekvenčně barvených chromozomů Giemsovým barvivem (horní řada) a C-pruhovaných (dolní řada). Sekvenčně Chromomycin A3- (B) a Ag-impregnované (C) chromozomy téhož jedince ukazují, že důležité informace mohou být odvozeny i přesto, že se nezdaří provést úplný sekvenční barvicí protokol na jediné metafázi; zde kombinace dvou sekvenčních barvení (Giemsa a C-pruhování (A), Chromomycin A3 (B) a Ag-impregnace (C) ukazuje, že chromozomy nesoucí organizátory jadérka (tzv. NORy) obsahují velké pericentromerické bloky heterochromatinu bohatého GC-bázemi na kratším raménku (zarámován na A) a že místa s NORy jsou pozitivní po C-pruhování, fluorescenci Chromomycinem A3 a po impregnaci stříbrem (šípky na B a C). Tento jedinec je také homozygot pro úplně heterochromatinizované kratší rameno páru č. 1 (hvězdička – tento znak se vyskytuje u všech druhů hrouzek), ale heterozygot pro pericentrickou inverzi kratšího ramena jednoho homologu páru č. 25 (šípka – tato přestavba byla nalezena jen u rodu *Romanogobio*). Takové drobné přestavby nejsou odhalitelné při barvení jádrovými barvivy, např. Giemsovým barvivem. Podle Rábová a kol. (v tisku).

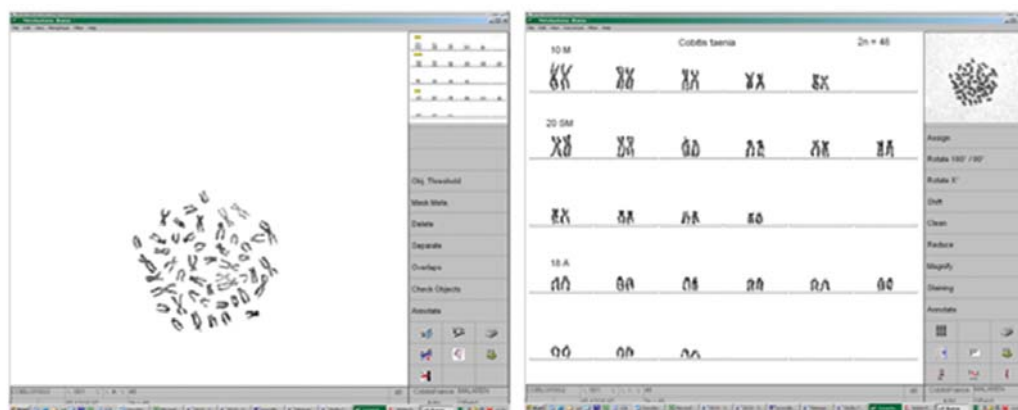
b) **Molekulárně cytogenetické techniky** jsou poslední velkou metodickou inovací počátku 90. let minulého století a i cytogenetika ryb se tak dostala na molekulární úroveň. Jedná se o zavedení technik, které umožňují cíleně vizualizovat určité úseky chromozomové DNA, a to od velikosti několika set bází nukleotidů (repetice nebo jednotlivé úseky genů) po sekvence celých chromozomů, případně celých genomů. Tyto techniky se označují jako **hybridizace *in situ***, kde hledaný úsek chromozomové DNA je vyhledáván specificky komplementárním úsekem DNA, tzv. mobilní sondou, která je buď přímo označena fluorochromem nebo je konjugována s malou signální molekulou (obvykle biotin nebo digoxigenin) a následně vizualizována imunochemickými metodami, tj. protilátkami konjugovanými s fluorochromem nebo s nefluorescenční látkou. Podle způsobu detekce sond se potom hovoří o **fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH)**, jestliže je hybridizační sonda detekována pomocí fluorochromů nebo ***in situ* hybridizaci (ISH)**, jestliže je hybridizační sonda detekována nefluorescenčně (např. peroxidázovým detekčním systémem). Celá oblast molekulární cytogenetiky ryb se velmi rychle vyvíjí, takže podat byť i jen stručný přehled by znamenalo automatické zastarání textu v době vydání. Tak v genomech mnoha druhů ryb byly lokalizovány pozice jednotlivých kopií genů, dále některé z repetitivních sekvencí jako jsou telomerické nebo *Alu* sekvence, případně místa s vysokým počtem repetitivních genů jako jsou 5S nebo 46S ribozomální geny a řada dalších typů sekvencí jako jsou transpozony atd. Novým přístupem k poznání chromozomové evoluce ryb je fyzická lokalizace genů, jejichž pozice na zcela určitých chromozomech či chromozomových ramenech byla odvozena z genomických projektů a studia vazebných map, např. u lososovitých ryb. Zatím nejnovější metodický pokrok je **mikrodisekce individuálních chromozomů** z metafáze na preparátu a příprava specifické celochromozomové, tzv. **malovací sondy** (*painting probe*) z této DNA (Phillips, 2007). Tento přístup otevírá zcela nové možnosti při studiu karyotypové diferenciace u ryb, protože nahrazuje nemožnost stanovit mezidruhové chromozomové homologie, jak ukazuje připojený obr. 3.3. Stejně tak se otevírá možnost studovat případné aberace chromozomů pro šlechtitelské účely. Rovněž se otevírá možnost použití **komparativní genomové hybridizace (CGH)**, případně **genomové *in situ* hybridizace (GISH)** např. pro porovnání obsahu transpozónů mezi dvěma genomy (Symonová a kol., 2013) nebo identifikaci chromozomů od jednotlivých parentálních forem v hybridních genomech (Majtanová a kol., 2012). Obě metody jsou po technické stránce shodné a liší se pouze v tom, že při CGH se značí fluorochromy obě celkové DNA porovnávaných druhů, zatímco u GISH pouze jedna.

Vyhodnocování cytogenetických informací, které bylo dříve manuální a velmi pracné, je dnes poloautomatizované a provádí se snímáním chromozomů digitálními CDD kamerami a dále se zpracovává pomocí speciálních softwarových programů, což umožňuje v krátké době shromáždit velké množství údajů (obr. 3.4.). Tak lze provádět rozsáhlé populační studie mnoha jedinců (např. při studiu genomového složení asexuálních hybridů ryb) nebo velkého množství buněk jedince (např. pro detekci úrovně chromozomových aberací po expozici sinicovými jedy).

Povaha cytogenetických údajů je dvojí. Jednak jsou **znaky morfologické**, z nichž nejdůležitější jsou diploidní počet chromozomů ($2n$), jejich klasifikace do jednotlivých typů chromozomů podle umístění centromery (metacentrické, submetacentrické, subtelocentrické a akrocentrické) a počtu chromozomových ramen. Dále jsou to umístění a velikost heterochromatinových bloků na chromozomech a počet a místa hlavních ribozomálních genů (*nucleolar organizing regions* – NORs), případně místa detekovaná různými molekulárními sondami. Jsou také **znaky genetické**, jsou to nositelé genetické informace, jejichž povaha zajišťuje přenos této informace z generace na generaci. Haploidní počet chromozomů (n) daného organismu je vlastně první a základní genomická informace – říká, kolik vazebných skupin genů tento genom obsahuje. Cytogenetické údaje mají široké využití v poznání evoluce genomu ryb, včetně polyploidizačních a hybridizačních událostí, jsou základem karyosystematiky (cytotaxonomie), sloužící jako další nástroj systematických disciplín (u ryb je to pro jejich karyotypovou rozrůzněnost neobyčejně



Obr. 3.3. Metafázní chromozomy plotice obecné, *Rutilus rutilus*, kde je ukázáno značení páru velkých subtelocentrických chromozomů, tzv „leuciscinního“ markeru. Malovací sonda (značená fluorochromem Spectrum Orange) pochází z mikrodisekce tohoto markerového chromozomu od stejného druhu. Drobné signály na jiných chromozomech pravděpodobně reprezentují všudypřítomné krátké repetitivní sekvence a transpozony, které jsou též detekovány sondou při absenci vhodné kompetitorové DNA v hybridizační směsi. Chromozomy jsou obarveny DAPI. Originál S. Kubičková a M. Rábová.



Obr. 3.4. Ukázka zpracování karyotypu na příkladu chromozomů sekavce pískového, *Cobitis taenia* (typová lokalita jezera Malären, Švédsko) pomocí specializovaného počítačového programu Ikaros firmy Metasystems. Levý obrázek ukazuje snímek obrazovky, kde jsou Giemsovým barvivem obarvené metafázní chromozomy, tak jak jsou exportovány do programu z mikroskopu. Pravý obrázek ukazuje snímek obrazovky s již sestaveným karyotypem této metafáze doplněným o grafické prvky.

významné). Tyto údaje jsou také důležité v genotoxických studiích, stejně jako v praktickém šlechtitelství ryb, zejména v genomových manipulacích. Závažnou nevýhodou cytogenetiky je to, že v počátečním stadiu metodiky preparace chromozomů se musí pracovat se živými, dělícími se buňkami, buď v živém organismu, nebo v buněčné kultuře. U ryb pak práce s živým materiálem může být logisticky velmi náročná, ne-li nemožná, stejně jako jsou dosud nestandardní buněčné a tkáňové kultivační techniky. Průřez posledními pokroky cytogenetiky ryb podává kniha *Fish Cytogenetics* (Pisano a kol., 2007).

3.4. Polymorfní bílkoviny jako znaky a jejich analýza

Proteiny – a zvláště enzymy – se staly jedním z prvních systémů molekulárních znaků, které byly úspěšně využívány pro popis genetické variability organismu.

Variabilita enzymů (obecně bílkovin) ve smyslu molekulární heterogenity byla zaznamenána již v padesátých letech, ale byla zprvu považována za projev přítomnosti nečistot v jednotlivých preparátech. Později byla rozpoznána Markertem a Møllerem (1959), kteří popsali heterogenitu jako přítomnost různých variant téhož enzymu, které mají shodnou funkci (tj. katalyzují tutéž reakci) a vyskytují se u stejného jedince. Tato definice zahrnuje následující varianty enzymu (tyto varianty se nazývají isozymy nebo isoenzymy):

- produkty různých genů reprezentujících různé lokusy, které obvykle vznikly duplikací příslušných genů nebo polyploidizací (duplikací celého genomu), případně hybridizací DNA. Během dalšího vývoje pak mohlo dojít k tomu, že v důsledku nahromaděných mutací jeden z genů pozbyl své funkce. Pokud mutace neznemožní enzymovou aktivitu příslušného proteinu, ale pouze pozmění jeho funkci či způsob jeho exprese, mohou obě varianty přežít selekci a specializovat se na různé funkce – např. v různých stádiích vývoje či v různých tkáních;
- varianty, které představují produkty různých alel jednoho lokusu (podskupina isozymů nazývaná alozymy). Ty vznikly náhodnou mutací, a pokud negativně neovlivní funkčnost genu, zůstanou v populaci zachovány;
- další isozymy představující přirozené molekulární kombinace prvních dvou skupin (u enzymů, které mají kvartérní strukturu – jsou složeny z více podjednotek = bílkovinných řetězců).

3.4.1. Příčiny variability alozymů:

Geneticky podložené (změnami v sekvenci nukleotidů v příslušném genu)

Alozymy mohou vzniknout bodovou mutací nebo delecí / insercí, které změní kódující sekvenci genu. To může mít – jako u každé mutace – pro „nový“ alozym tři důsledky:

- s největší pravděpodobností nová alela nebude funkční, což povede ke snížení životaschopnosti jedince a vyloučení nové alely z populace přírodním výběrem;
- pokud mutace (např. záměna aminokyseliny) neovlivní funkci enzymu (ke změně dojde v místě, kde to neovlivní ani aktivní centrum ani konformaci molekuly nutnou pro funkci), pak změna bude selekčně neutrální a výskyt nové alely se bude měnit jen v důsledku genetického driftu (náhodné změny frekvence výskytu);

- v případech (velmi vzácných), kdy mutace dá vzniknout enzymu, který bude fungovat s vyšší účinností nebo bude katalyzovat poněkud odlišnou reakci, může tato změna zvýšit životaschopnost jedince a bude tedy přírodním výběrem upřednostňována – její výskyt se může zvyšovat.

Posttranslační modifikace

Tyto modifikace mohou měnit výsledné vlastnosti molekuly (např. jejich primární či sekundární strukturu, celkový elektrický náboj apod.), a tím i chování alozymů při použití různých detekčních metod:

- výsledná molekula proteinu může na sebe vázat různé prostetické skupiny (příp. jejich různý počet) – sacharidy, lipidy, fosfátové zbytky apod., kdy změna vlastností molekuly závisí na charakteru příp. počtu navázaných prostetických skupin, na jejich vlastním elektrickém náboji atd.;
- polypeptidický řetězec na sebe může vázat různé funkční skupiny (acetylace, amidace, hydroxylace apod.), což rovněž může měnit výsledné vlastnosti molekuly;
- podobně může ke změnám vlastností dojít např. vazbou koenzymové molekuly na molekulu enzymu.

Různá kvarterní struktura

- některé enzymy mohou vytvářet aktivní molekuly z různého počtu podjednotek – např. NADP-závislá malátdehydrogenáza (MDHP nebo ME – „*malic enzyme*“) je obvykle tvořena čtyřmi podjednotkami, ale již dvě spojené podjednotky mohou vykazovat příslušnou enzymovou aktivitu;
- některé enzymy (jako např. lidská alkalická fosfatáza) vytvářejí enzymově aktivní molekuly – „polymery“ tvořené různým počtem těžé jednotky (v případě zmiňované alkalické fosfatázy až 10 i více);
- konformační změny – v sekundární nebo terciární struktuře bílkoviny mohou vést k výskytu tzv. sekundárních izozymů, které se objevují jako přidavné izozymy s odlišnou elektroforetickou pohyblivostí; k těmto změnám může docházet především při opakovaném zmrazování a rozmrazování vzorků.

Denaturační produkty

- tyto „varianty“ proteinů se objevují buďto v nevhodně uchovávaných vzorcích, kde dochází k autolýze buněk a následně proteinů vlastními lytickými enzymy uvolňovanými při destrukci buněčných struktur nebo v důsledku mikrobiálního rozkladu vzorků. Molekuly některých enzymů tak mohou měnit svoje vlastnosti (v našem případě elektroforetické chování) bez ztráty enzymové aktivity a dávají tak vzniknout vedlejším „izozymům“; postupně však dochází k vymizení enzymové aktivity a tím ke „ztrátě“ izozymů. K těmto procesům dochází tím rychleji, čím vyšší teplota je pro uchovávání vzorků použita. Některé enzymy ztrácejí v důsledku těchto procesů aktivitu již během několika týdnů, pokud jsou uchovávány i v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; proto se doporučuje vzorky uchovávat alespoň při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, ještě lépe v tekutém dusíku. Nejlepší ovšem je zpracovat vzorky čerstvé nebo v co nejkratší době po jejich odebrání;
- k degradaci bílkovin a následné změně jejich vlastností (i elektroforetického chování) dochází i působením vlastních lytických enzymů (proteináz, proteáz) v tkáňových extraktech při opakovaném zmrazování a rozmrazování vzorků nebo při jejich uchovávání při vyšších teplotách (např. i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.4.2. Metody zjišťování variability proteinů

Elektroforéza

Nejčastěji používanou metodou detekce polymorfních bílkovin je jejich elektroforetické dělení. Principem elektroforézy je rozdělování proteinů ve stejnosměrném elektrickém poli podle celkového elektrického náboje. Tento náboj je dán součtem nábojů ionizovatelných skupin (aminoskupin nebo karboxylových skupin) v postranních řetězcích aminokyselin, které tvoří molekulu bílkoviny, přičemž se uplatní především ty skupiny, které jsou při daném prostorovém uspořádání molekuly na jejím povrchu. Je jasné, že tento náboj se bude lišit podle pH prostředí, ve kterém se molekula vyskytuje. Proto je zapotřebí elektroforézu provádět za definovaných podmínek. Pro udržení dané iontové síly a stabilního pH během elektroforézy se tato provádí v nejrůznějších systémech pufrů, které se liší složením i koncentracemi jednotlivých složek. Nejčastěji používané pufrы obsahují organické báze – aminy (např. tris-[hydroxymetyl]aminometan, aminopropylmorfolin apod.), organické kyseliny (především kyselina citronová), ale i anorganické kyseliny a báze. Pufr rovněž zajišťuje vodivé spojení mezi elektrodami a oblastí vlastního dělení.

Nejstarším způsobem byla tzv. volná elektroforéza, která probíhala v roztoku (Tiselius, 1930). Dělení molekul v tomto uspořádání nebylo příliš účinné, proto se později použil nosič – chromatografický papír. Při této metodě se podařilo oddělit od sebe např. hlavní bílkovinné složky krevního séra. V 50. letech Smithies (1955) provedl první elektroforézy na nosiči tvořeném gelem z částečně hydrolyzovaného škrobu; tato metoda pak přinesla výrazné zvýšení rozlišovací schopnosti elektroforézy. Je doposud velice často používanou metodou elektroforetického dělení bílkovin. Postupně byly zavedeny i další elektroforetické metody používané při analýze bílkovin. Pro získání přehledu o elektroforetických technikách viz např. Andrews, 1986, Richardson a kol., 1986 nebo Rothe, 1994.

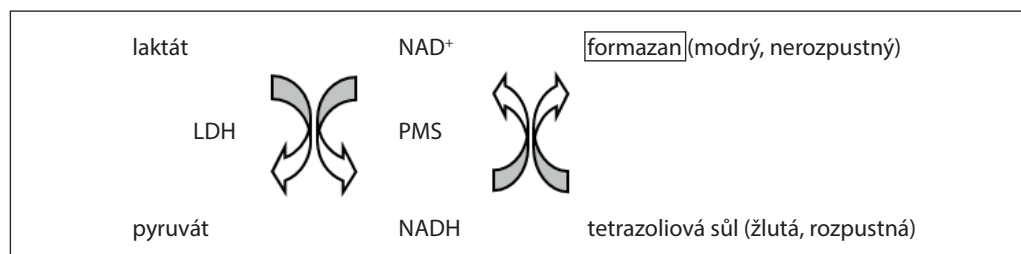
Během elektroforézy putují jednotlivé bílkoviny v elektrickém poli podle velikosti svého náboje příslušným směrem různou rychlostí, takže za určitou dobu dojde k jejich vzájemnému rozdělení. Po skončení elektroforézy pak v ideálním případě dostaneme nosič, ve kterém jsou zóny s jednotlivými proteiny.

Takto rozdělené zóny proteinů pak musíme nějakým způsobem zviditelnit (většina proteinů není barevná). Vzhledem k tomu, že dělíme vždy tkáňový extrakt, kde je směs nejrůznějších molekul (nejen bílkovin), máme několik možností:

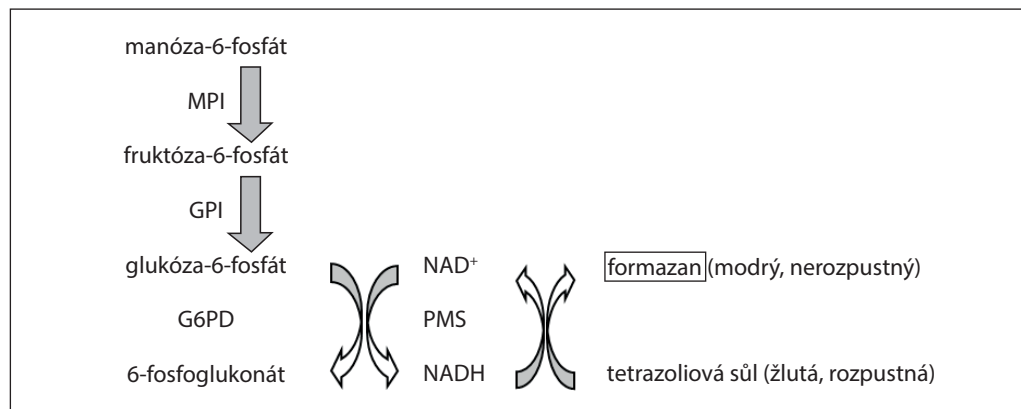
- obecné barvení proteinů, při kterém se obarví všechny proteiny na gelu (takto se barví např. svalové nebo sérové proteiny);
- specifické barvení určité skupiny proteinů, jako jsou např. lipoproteiny nebo glykoproteiny, kde barvíme v podstatě prostetickou skupinu – zde lipidy nebo sacharidy navázané na molekulu bílkoviny;
- barvicí reakce pro detekci enzymů, které využívají vznikajících produktů (nebo mizejících substrátů) enzymové reakce katalyzované příslušnými enzymy;
- chromogenní metody, kdy se reakcí odštěpí barevný produkt (např. kyselá fosfatáza odštěpí fosfatovou skupinu z fenolftalein fosfátu a uvolněný fenolftalein se v alkalickém prostředí obarví růžově – v místě, kde se elektroforézou rozdělila kyselá fosfatáza, dostaneme růžové proužky na bílém pozadí);
- fluorescenční metody, při nichž se uvolní fluoreskující produkt, který pak lze pozorovat za použití UV záření (např. esteráza odštěpuje z umbeliferyl acetátu fluoreskující methylumbeliferol a pod UV zářením vidíme svítící proužky na tmavém pozadí);

- chemická detekce využívá reakce produktu s nějakým barvivem za tvorby barevného precipitátu v místě výskytu příslušného enzymu (např. v případě acetylerázy se z naftylacetátu odštěpí naftol, který reaguje s rozpustným žlutým diazoniovým barvivem za vzniku nerozpustného hnědého azobarviva); negativní chemické metody využívají naopak nepřítomnosti barvitelné substance v místě, kde se příslušný enzym vyskytuje (např. amyláza štěpí škrob a v tom místě jej pak nelze obarvit jódem – dostaneme bílé proužky na modrém pozadí);
- tzv. histochemické metody (zavedené poprvé v r. 1957 Hunterem a Markertem), které využívají přímo reakce katalyzované v metabolismu příslušným enzymem (jsou enzymově specifické), na niž pak navazuje řetězec následných reakcí vedoucích k barevnému produktu – využívá se přenosu elektronů uvolněných při reakci až na výsledný produkt:

Při jednoduché detekci dehydrogenáz v místě lokalizace enzymu do reakce katalyzované enzymem (zde je jako příklad uvedena laktátdehydrogenáza – LDH) vstupuje substrát (laktát) a koenzym (NAD) a ze vzniklého NADH se elektron přes „přenašeč“ (fenazin metosulfát – PMS) přenesou na tetrazoliovou sůl, čímž vzniká formazan.



V případě, že toto schéma nelze použít (např. nevzniká redukováný koenzym jako NADH), je možné navázat i několik následných reakcí – přidáním enzymu (nebo i více) využívajícího vznikající produkt, a to tak, abychom se ve výsledku dostali opět k barevnému produktu – např. osvědčenému formazanu (viz následující schéma detekce manózafofosát isomerázy – MPI, kde je do reakční směsi přidána GPI = glukózafofosát isomeráza a G6PD = glukóza-6-fosfát dehydrogenáza, které využívají postupně vznikající meziproducty enzymových reakcí):



Pro různé metodiky vizualizace (barvení) proteinů bylo vydáno mnoho publikací – „kuchařek“, např. Harris a Hopkinsons, 1976, apod.

Elektroforézu můžeme podle uspořádání rozdělit na horizontální, vertikální a kapilárovou. Každý z těchto typů má své výhody i nevýhody – např. horizontální elektroforéza je metodicky jednodušší a může analyzovat více vzorků než vertikální; kapilárová spotřebuje minimální množství vzorku a dělení je účinnější, analyzuje ale jen jeden vzorek současně atd.

Podle typu nosiče, na němž elektroforéza probíhá, můžeme její metody rozdělit na následující:

- elektroforéza na škrobovém gelu (SGE = *starch gel electrophoresis*)

Nosič je tvořen gelem, který je připraven rozvařením částečně hydrolyzovaného škrobu (nejčastěji bramborového) o koncentraci obvykle kolem 10 % v příslušném pufru a nalitím do vhodné formy; pH pufrového systému je obvykle voleno tak, aby většina proteinů měla záporný náboj, takže při elektroforéze putují k anodě (pH bývá obvykle 6–9,5). (Pro speciální případy lze samozřejmě použít i jiné hodnoty pH – i do kyselých oblastí.) Po vychladnutí a ztuhnutí vytvoří makromolekuly škrobu molekulární síto, takže zde dochází k dělení bílkovin nejen podle celkového elektrického náboje, ale částečně i podle velikosti molekuly. Nejčastěji se používá v horizontálním uspořádání.

Výhodou této metody je relativní lác (zvláště pokud si připravujeme hydrolyzovaný škrob sami) a jednoduchost provedení. Další významnou předností oproti jiným nosičům pak je, že můžeme (podle použité formy) připravit gel o různé tloušťce (až 1 cm) a po skončení elektroforézy jej můžeme rozřezat na několik vrstev o tloušťce zhruba 2 mm. Na každé ze získaných vrstev pak můžeme detegovat jiný enzym – při jedné elektroforéze tak můžeme analyzovat až 5 různých enzymů. Kromě toho pro tento typ nosiče existuje v literatuře největší množství vyzkoušených metodik aplikovatelných pro široký okruh organizmů.

Relativní nevýhodou škrobové elektroforézy je nutnost vyzkoušet každou novou šarží hydrolyzovaného škrobu, a to jak na mechanické vlastnosti připraveného gelu, tak i na jeho dělicí schopnosti (škrob jakožto přírodní produkt se může svými vlastnostmi lišit jak podle místa, tak i podle doby vzniku a výroby).

- elektroforéza na agarovém / agarózovém gelu (AGE)

Výhodou tohoto typu nosiče je krátká doba potřebná k rozdělení proteinů (řádově ½–2 hodiny; pro srovnání – elektroforéza na škrobu 6–16 hodin, na polyakrylamidu 1–6 hodin) a snadnost přípravy gelu; nevýhodou je menší rozlišovací schopnost a relativně vysoká elektroendoosmóza, která snižuje dělicí schopnost. Tento typ nosiče dovoluje dělit molekuly výhradně na základě elektrického náboje, protože vzhledem k nízké koncentraci gelu (~ 1 %) se neuplatňuje vliv molekulového síta (polyakrylamidový gel má síťovou strukturu, která působí jako molekulové síto a vedle elektrického náboje dělí molekuly i podle velikosti; stejný efekt se projevuje částečně i u škrobového gelu).

- elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (PAGE)

Při vhodném uspořádání má tato metoda výhodu ve velice účinném dělení jednotlivých molekulárních variant bílkovin (agarózová elektroforéza rozliší v séru 5 různých bílkovin, škrobová asi 15, zatímco na polyakrylamidovém gelu jich můžeme najít až 19). Nevýhodou je jedovatost komponent – monomerů, větší pracnost a citlivost přípravy na vnější podmínky (přístup kyslíku apod.). Tuto metodu elektroforézy významně rozvinul a zdokonalil U. K. Laemmli (viz např. Laemmli, 1970)

- elektroforéza na gelu z acetátu celulózy (CAGE)

Výhodou této metody je její rychlost (doba trvání se pohybuje mezi jednou až několika málo hodinami); nevýhodou je to, že lze detekovat pouze jeden enzym najednou.

Další možné dělení je např. podle podmínek elektroforézy na nativní a denaturační (např. SDS-PAGE, kdy je do pufru přidán aniontový detergent dodecylsírán sodný – Sodium DodecylSulfate, který

odstraňuje rozdíly v elektrickém náboji molekul bílkovin, takže ty se potom dělí na základě velikosti molekuly – viz např. Shapiro a kol., 1967). Další možné uspořádání je třeba dvourozměrná (2D) elektroforéza zahrnující dvě následné elektroforézy podle různých vlastností proteinů (např. náboje a velikosti molekuly), které se prováděly ve dvou na sebe kolmých směrech (viz např. Kaltschmidt, 1971). Tyto sofistikovanější metody se však používají spíše pro detailní analýzu molekulových vlastností bílkovin a nově v proteomice.

Denaturační testy

Různé varianty bílkoviny jsou vzhledem k rozdílné struktuře odlišně citlivé k teplu – denaturují (a ztrácejí např. enzymovou aktivitu) při různých teplotách; toho bylo využíváno k rozlišení různých izozymů, které byly např. za použití elektroforézy neodlišitelné.

Imunologické metody

Různé varianty bílkoviny vzhledem k rozdílné molekulové struktuře indukují tvorbu různých protilátek; za jejich pomoci pak bylo možné (např. metodou imunoelektroforézy) jednotlivé varianty rozlišit pomocí imunologické reakce.

Kinetické metody

Různé izozymy se mohou účastnit enzymových reakcí v různých místech metabolismu nebo v různých buňkách či tkáních a mohou se tedy navzájem lišit svým kinetickým chováním při katalýze příslušných enzymových reakcí (rozdílné optimum např. teplotní, hodnoty pH, koncentrace substrátu nebo koenzymu apod.), čehož bylo rovněž využíváno pro jejich odlišení.

3.4.3. Využití variability proteinů

Využití zjištěné variability bílkovin zahrnuje široké pole biologických disciplín pokrývajících studium vnitrodruhových (vnitropopulačních i mezipopulačních) i mezidruhových vztahů, významu variability v adaptaci nebo evoluci taxonů, případně lze výsledky použít v systematice a taxonomii – viz např. Kirpichnikov, 1992; Park a Moran, 1994; Murphy a kol., 1996 a další.

Předpokladem pro využití variability proteinů je předchozí analýza studované skupiny – tzn. v ideálním případě co největšího počtu jedinců ze skupiny na maximální množství lokusů, což je z hlediska praktického nemožné. Proto se – podle účelu, ke kterému se analýza používá – analyzuje buďto omezený počet jedinců na maximální počet lokusů (např. při hledání diagnostických lokusů, při studiu paternity) nebo naopak rozsáhlý vzorek pomocí několika vybraných lokusů (zkoumání původu, identifikace hybridů apod.). V některých případech (např. při studiu rozsahu variability, historie a struktury populací atd.) je však velký počet analyzovaných jedinců i lokusů nezbytný.

Kontrola dědičnosti, určení paternity

S pomocí několika vybraných lokusů lze u potomstva zjišťovat původ. Stejně lze záměrným párovým křížením rodičů se známým fenotypem určovat způsob dědění jednotlivých variant bílkovin ve vybraných lokusech. Samozřejmě to předpokládá předběžnou analýzu rodičů na předem vybrané lokusy.

Identifikační nástroj při šlechtitelských pokusech („značka“)

Při šlechtitelských hybridizačních pokusech je zvláště u ryb velkým problémem identifikace potomstva. Vzhledem k nemožnosti individuálního značení byl tento problém řešen tím, že potomstvo po různých rodičích bylo chováno a testováno odděleně, což vnášelo do pokusu vliv prostředí. Použití variabilních proteinů jakožto nástroje značení jedinců tento problém odstranilo, protože tyto

varianty jsou jednoduše kodominantně dědičné a při vhodném výběru rodičovských párů (předem analyzovaných) můžeme jejich potomstvo chovat v tomtéž prostředí bez problému s jejich následným rozlišením.

Populační studie – struktura populací, variabilita uvnitř populací a mezi nimi

Vzhledem k předpokladu, že fenotyp (včetně izozymového profilu) vzniká na základě interakce genotypu a konkrétního prostředí, v němž organismus žije, musí v případě výskytu druhu v různých oblastech s rozdílným prostředím docházet postupně (v důsledku náhodných mutací a výběru) ke vzniku variability proteinů uvnitř druhu a k výskytu rozdílů ve frekvencích jednotlivých variant mezi populacemi uvnitř druhu.

Genetickou proměnlivost dané populace lze vyjádřit pomocí několika parametrů, jako je průměrný počet alel na lokus, poměr (procento) variabilních lokusů nebo průměrná heterozygotnost. Rozdíly v genetické variabilitě mezi populacemi pak lze vyjádřit indexy genetické podobnosti (nebo vzdálenosti), které lze počítat na základě různých vstupních předpokladů (např. genetická vzdálenost podle Cavalli-Sforza a Edwards, 1967; Nei, 1972; Cavalli-Sforza a Edwards, 1967; Rogers, 1972 atd.).

Odlišení druhů (významné u kryptických druhů), určování hranic rozšíření druhu, určení mezi-druhově hybridizace

Na základě předchozích analýz je třeba vytipovat tzv. diagnostické alely – alely, které jsou pro ten který druh (taxon) charakteristické, jsou v rámci tohoto druhu fixovány. Na základě výskytu těchto alel je pak možné určit hranice areálu výskytu určitého druhu, vymezit oblasti, kde se stýká s jiným (příbuzným) druhem a odhalit výskyt případných mezidruhových hybridů. V přirozených populacích se hybridy vyskytují obvykle ve víceméně úzké oblasti kolem hranice, kde se stýkají dva druhy. Četnost výskytu hybridů se napříč hybridní zónou mění a podle charakteru této změny lze pak usuzovat na vznik, historii a charakter hybridní zóny a na faktory ovlivňující vznik hybridů i samotné zóny.

Pomocí diagnostických alel můžeme zjišťovat výskyt hybridů i u hospodářsky důležitých druhů (ev. poddruhů) a sledovat tak druhovou čistotu jednotlivých chovů.

Zjišťování migrací, fylogeografické studie, historie šíření druhů

Pomocí studia variabilních bílkovin a sledováním populačních struktur s použitím vytypovaných alel můžeme odhadovat historii vývoje jednotlivých populací a druhu jako celku, sledovat historii šíření druhu v areálu rozšíření případně i vliv geologických událostí na strukturu populací a druhu jako celku.

Okraje oblasti rozšíření druhu se obecně vyznačují sníženou genetickou variabilitou v důsledku tzv. efektu zakladatele (*founder effect*), kdy nová populace (ev. populace, která osídlila novou lokalitu) vzniká z malého počtu jedinců a její výchozí genetická variabilita je tedy omezena.

Studium vzniku nových druhů, fylogenetické studie

Správné určení a vymezení druhu je nezbytným předpokladem pro analýzu fylogenetických vztahů. V této oblasti jsou data získaná analýzou variability bílkovin vhodná pro zkoumání vztahů mezi druhy (ev. nižšími taxony – poddruhy, populacemi) a blíže příbuznými rody. Přestože v současné době je při studiu fylogenetických vztahů v centru zájmu použití molekulárních technik (hlavně sekvencí různých úseků DNA), použití elektroforézy bílkovin je i přes svá omezení stále vhodným metodickým přístupem k fylogenetickým analýzám.

3.4.4. Metodika elektroforézy bílkovin (s přihlédnutím ke škrobové)

Odebrání tkáně

Vzorky pro elektroforetickou analýzu bílkovin je nutné odebrat od živých jedinců (krev, biopsie, kousky ploutve) nebo co nejdříve po jejich usmrcení, aby nedošlo k autolýze buněk a následné lýze bílkovin – ideální je odběr vzorků přímo v terénu, pokud to není možné, je vhodné ulovené jedince dopravit do laboratoře buďto živé nebo alespoň na ledu; vzhledem k tomu, že v různých tkáních může být rozdílná aktivita různých enzymů a různé zastoupení jejich molekulárních forem, je třeba k prvotní analýze odebrat více tkání (např. různé zastoupení izozymů v srdeční tkáni a bílých svalových vláknech, existence tkáňově specifických izozymů v játrech, retině, spermích atd.)

Uchování při nízké teplotě

Vzhledem k teplotní citlivosti většiny bílkovin (enzymů zvláště) je třeba odebrané vzorky až do zpracování uchovávat při co nejnižší teplotě – ideální je v tekutém dusíku (-196 °C) případně v hlubokomrazicích boxech při -80 °C; krátkodobě (2 týdny až měsíc) lze vzorky uchovat i v normálním mrazicím boxu při ca -20 °C, některé citlivější bílkoviny však již začínají denaturovat a enzymy ztrácet svou aktivitu (pak se můžeme setkat s výskytem „variability“ v důsledku denaturačních změn v konformaci molekul).

Homogenizace

Bílkoviny vhodné k elektroforetické analýze (rozpustné) jsou uvnitř buněk v cytosolu nebo v organelách, je proto třeba převést je do roztoku; tyto tkáňové extrakty se připravují homogenizací vzorku tkáně s pufrům v určitém poměru (v závislosti na koncentraci bílkovin v tkáni) a centrifugací homogenátu pro získání čirého roztoku. Homogenizaci lze provádět buďto homogenizátorem (vysokootáčkové elektrické dokážou rozbít i organely) nebo ručním rozdrčením tkáně zmrazené v tekutém dusíku. Pufr slouží jednak jako rozpouštědlo bílkovin, jednak pro udržování standardních podmínek (iontová síla, pH) a může obsahovat látky stabilizující strukturu bílkovin ev. enzymovou aktivitu. Výsledné homogenáty lze po krátkou dobu (řádově dny) uchovat zmrazené ev. do druhého dne v chladničce (pokud se s nimi bude druhý den ještě pracovat, je lépe je zbytečně nezmrazovat, protože opakované zmrazování a rozmrazování může změnit kvartérní strukturu bílkovin příp. je denaturovat). Tekuté vzorky jako krevní sérum, sliny apod. se samozřejmě homogenizovat nemusejí – na gel se aplikují tak, jak je získáme.

Aplikace vzorku na médium

Čirý tkáňový extrakt je třeba umístit na gel, aby bylo možné provést elektroforetické dělení bílkovin. Extrakt se může nanášet pipetou do jamek předem připravených v gelu (agaróza, vertikální polyakrylamid), speciálním aplikátorem (nebo mikropipetou) na povrch gelu (agaróza, celulozoacetát) nebo nasáknutý do obdélníčku silnějšího filtračního papíru na povrch gelu (agaróza, horizontální polyakrylamid) nebo do příčného řezu v gelu (horizontální škrob). Aby bylo možné sledovat průběh elektroforézy, je vhodné spolu se vzorky aplikovat na gel i barvičku – nejlépe takovou, která putuje rychleji než bílkoviny (nejčastěji se používá bromfenolová modř). Pak podle ní snadno zjistíme čas nutný pro úplný průběh elektroforézy.

Vlastní elektroforéza

Gel s aplikovanými vzorky se umístí do elektroforetické aparatury (v případě nutnosti je třeba zajistit chlazení gelu), gel se vodivě spojí s pufrem v nádobách s elektrodami (většinou můstky z filtračního papíru nebo inertní tkaniny nasáklými v příslušném pufru), případně se zakryje (plastovou fólií ev. víkem) proti vysychání a celá aparatura se připojí ke zdroji stejnosměrného napětí. Moderní laboratorní elektroforetické zdroje napětí mají nezávislou regulaci napětí, proudu (příp. i výkonu), nastavitelné horní hranice těchto hodnot s automatickým přepínáním a některé i nastavitelnou dobu trvání elektroforézy. Hodnoty napětí a proudu se volí podle složení pufru, typu a koncentrace gelu a podle druhu elektroforézy – většinou se hodnoty nastavují tak, aby dělení bylo co nejrychlejší, ale nedocházelo k přehřívání gelu; dobu trvání elektroforézy je potřeba určit empiricky (pomůže nám přitom barvička, kterou jsme nasadili na gel spolu se vzorky). Obecně platí, že čím větší je proud procházející gelem, tím více se gel zahřívá, přičemž může vysychat (mění se podmínky dělení) a bílkoviny mohou denaturovat; se zvyšujícím se napětím se zlepšuje dělení jednotlivých bílkovin (do určité hodnoty napětí – pak se již začne uplatňovat vliv molekulového síta gelu).

Barvení

Po skončení elektroforézy vypneme zdroj napětí, odpojíme aparaturu a vyjmeme gel. Gely polyakrylamidové, agarové/agaróзовé a celulózoacetátové barvíme přímo zvoleným způsobem; gely škrobové můžeme rozříznout na vrstvy o síle ca 2 mm (počet podle tloušťky původního gelu) a každou vrstvu můžeme barvit jiným způsobem – tak z jednoho gelu získáme informace až o pěti různých systémech bílkovin.

Nejčastěji používané typy barvení jsou obecné barvení bílkovin a enzymově specifické barvení.

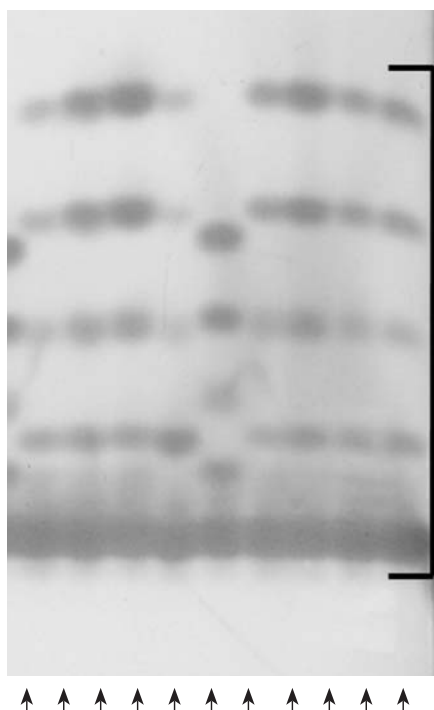
Pro obecné barvení bílkovin se nejčastěji používá roztok amidočerní (Amido Black 10B) ve směsi ethanolu, kyseliny octové a vody (celulózoacetátové a škrobové gely) nebo Coomassie Brilliant Blue (pro polyakrylamidové gely); tato barviva se obecně vážou na proteiny (denaturované směsi, v níž je barvivo rozpuštěno), pozadí gelu je pak třeba většinou odbarvit pomocí téže směsi. Takto se barví bílkoviny v séru a svalovém extraktu.

Při enzymově specifickém barvení se gel buďto ponoří do roztoku (pufru) obsahujícího všechny komponenty enzymové reakce včetně navazujících barvicích reakcí (celulózoacetátové, agarové/agaróзовé a polyakrylamidové gely) nebo se použije agar-gelové metody, kdy v pufru se rozvaří ca 1 % agaru, po částečném ochlazení se přidají další nutné komponenty a roztokem se přelije gel (jeho řezná plocha – škrobové gely). Po ztuhnutí agarové vrstvy na rozhraní gelu a agaru probíhá vlastní detekční reakce a výsledný barevný produkt difunduje do agarové vrstvy, která může být ev. uchována pro dokumentaci. Většina těchto barvicích reakcí musí probíhat při teplotě 37 °C a ve tmě, protože reakce využívající tetrazoliové soli (spolu s fenazin metosulfátem) jsou citlivé na světlo a vzniklo by barevné pozadí, na němž by skvrny v místě výskytu enzymů nebyly zřetelné.

Reálný elektroforetogram (zymogram) pak vypadá nějak podobně jako na obr. 3.5.

Čtení gelů, interpretace

Po dosažení požadovaného obarvení gelu (ev. odbarvení pozadí) je potřebné gel dokumentovat (dnes nejlépe pomocí digitálního záznamu – fotoaparát, kamera CCD; u barvení pomocí agar-gelové metody lze agar stáhnout z gelu pomocí silnějšího filtračního papíru, usušit a uchovat jako dokumentaci). Je také vhodné gel vyhodnotit zrakem a vzhledem k odlišnému mechanismu snímání obrazu okem a digitální kamerou je zapotřebí sledovat vývoj barvení a v případě nutnosti (velké rozdíly v intenzitě slabých a silných zón na gelu) zaznamenat též gel několikrát v různých fázích barvení.



kladný pól elektroforézy

oblast vyhodnocování zymogramu

↑ směr migrace bílkovin

← „start“ (místo nasazení vzorků)
záporný pól elektroforézy

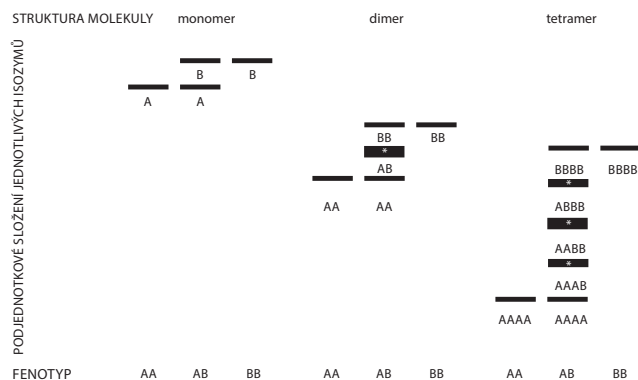
jednotlivé vzorky (tkáňové extrakty
různých jedinců nasazené na gel)

Obr. 3.5. Elektroforetogram. Z archivu V. a V. Šlechtových.

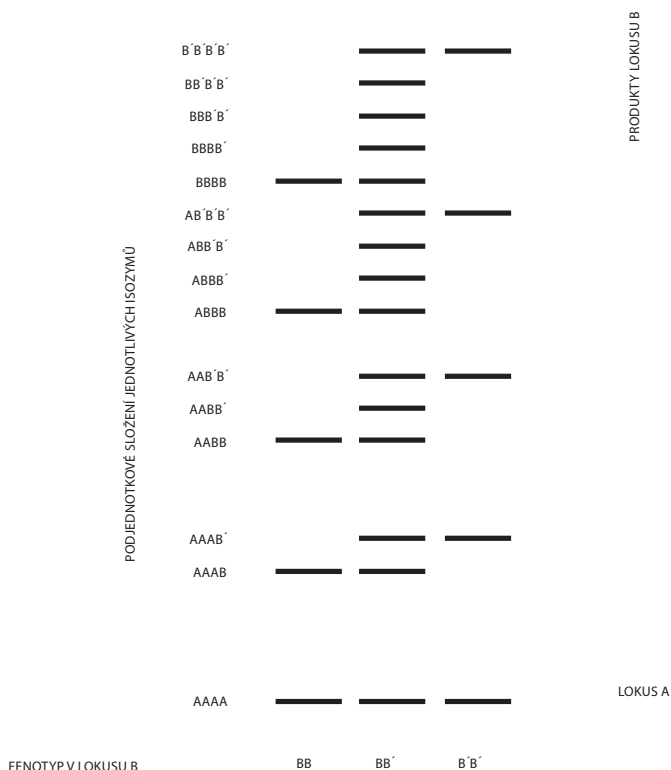
Vyhodnocení obarveného gelu (tzv. elektroforetogramu ev. zymogramu, jedná-li se o enzym) vyžaduje předběžnou znalost struktury daného proteinu/enzymu, znalost ploidní úrovně organismu a povědomí o počtu lokusů, které daný protein/enzym kódují, o jejich vnitrobuněčné lokalizaci a o tom, které z nich jsou v analyzované tkáni aktivní. Výhodou je, že většina těchto bílkovinných znaků je kodominantní, tzn. že u heterozygotního jedince se exprimují a na obarveném gelu se mohou objevit obě varianty bílkoviny (pokud je elektroforéza za daných podmínek schopna tyto varianty rozlišit). Výjimkou jsou tzv. nulové alely – tj. molekulové varianty enzymu, které nevykazují příslušnou enzymovou aktivitu, a tedy je nelze histochemickým barvením na gelu zviditelnit.

Zymogram je složen z „proužků“, které představují bílkoviny – produkty jednotlivých alel (alelomorfy), alel z různých lokusů a v případě existence kvartérní struktury molekuly i vzájemné kombinace produktů jednotlivých alel. Na základě výše uvedených znalostí a zkušenosti s interpretací elektroforetogramů pak lze jednotlivé vzorky vyhodnotit co do genetické konstituce v analyzovaných lokusech. Je potřeba rozeznat a označit alelomorfy, které se pojmenují (nejlépe podle své relativní pohyblivosti vzhledem ke standardu, kterým obvykle bývá nejčastěji se vyskytující alelomorfa, jejíž pohyblivost je brána jako 100; méně často se označují písmeny), a to pro všechny detekované lokusy.

Pokud jde o kvartérní strukturu, část známých enzymů je monomerních (molekula je tvořena jedinou podjednotkou), převážná část enzymů je však dimerních (mají dvě podjednotky), mnoho jich je tetramerních (čtyři podjednotky); v duplikovaných genomech polyploidních či hybridních forem pak jsou známy komplikovaněji složené elektroforetogramy. Z těchto skutečností pak musí vycházet i jejich interpretace (viz následující schémata hypotetických elektroforetogramů jako příklad – obr. 3.6. a 3.7.).

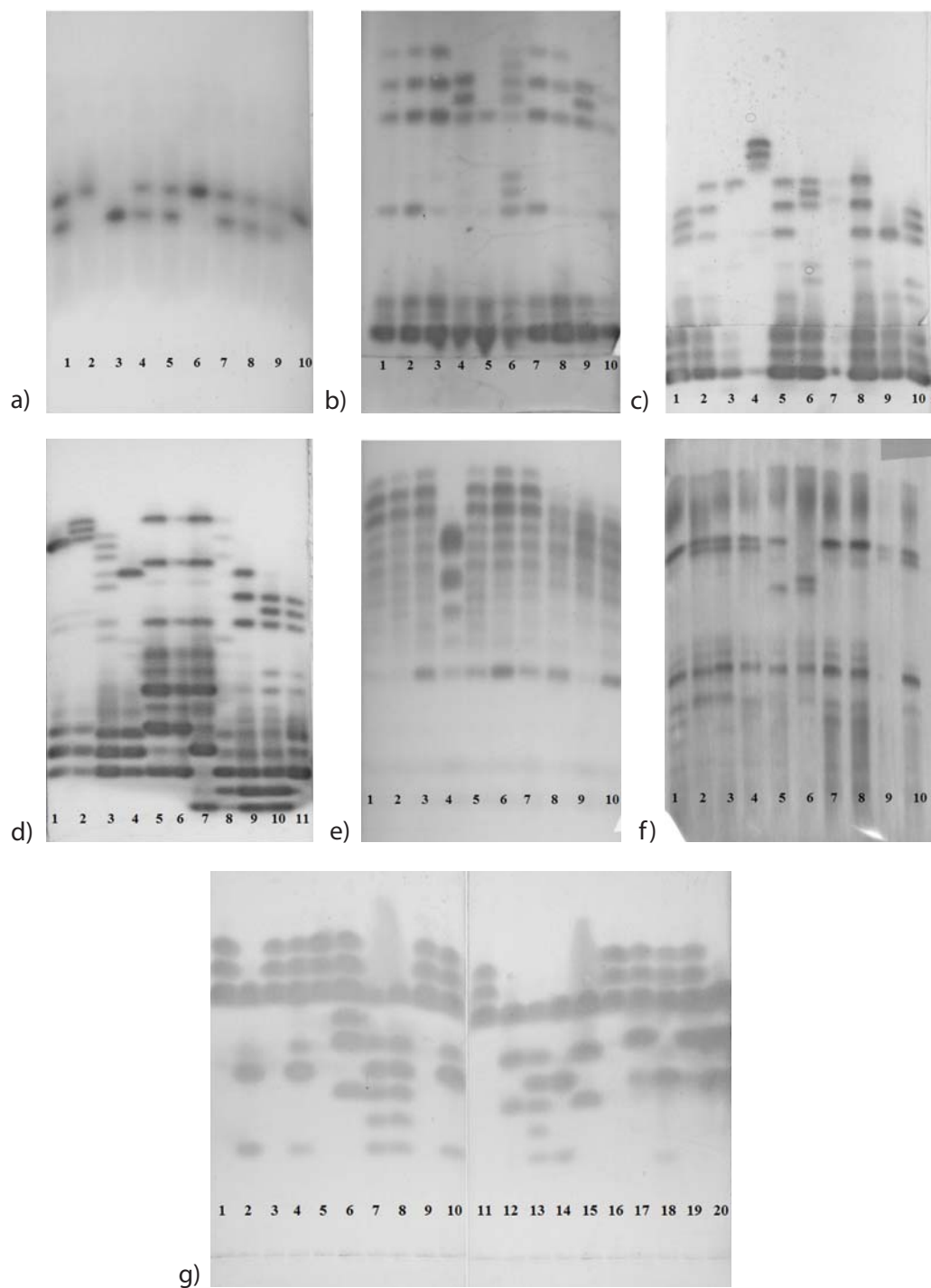


Obr. 3.6. Obrázek schématicky znázorňuje hypotetické elektroforetogramy bílkovin s různou kvartérní strukturou, znázorněn je vzhled elektroforetických vzorů jedinců s různými alelami vždy jednoho lokusu (alely jsou označeny A a B stejně jako bílkovinné řetězce – podjednotky, jejichž syntéza je těmito alelami řízena). Hvězdičkou jsou označeny isozymy, které vznikly kombinací obou typů podjednotek, bez označení jsou alelomorfy. (Stejný vzor bychom dostali i v případě dvou monomorfních lokusů.)



Obr. 3.7. Obrázek ukazuje hypotetický elektroforetogram bílkoviny (enzymu), která má tetramerní kvartérní strukturu (např. laktátdehydrogenázy, LDH). V tomto případě máme produkty dvou lokusů, z nichž jeden je monomorfní (lokus A), druhý polymorfní (lokus B se dvěma alelami – B a B⁺). Krajní vzorky jsou jedinci homozygotní pro různé alely lokusu B, uprostřed je heterozygot; na gelu je vidět přítomnost všech 15 možných isozymů – kombinací produktů všech tří alel.

Pro ilustraci dané problematiky uvádíme vybrané ukázky skutečných zymogramů (obr. 3.8.a–g).



Obr. 3.8.

a) Ukázka zymogramu fosfoglukomutázy (PGM) – enzymu s monomerní strukturou v erytrocytech kapra (třetí vzorek zleva je homozygot s fenotypem 086/086; druhý, šestý a poslední jsou homozygoti 100/100; ostatní jedinci jsou heterozygoti 086/100).

b) Zymogram glukózafosfát isomerázy (GPI), která má dimerní kvarterní strukturu ve svazech sekavců rodu *Cobitis*. Na gelu jsou vidět tři oblasti izozymů: dolní (hned nad startem), která je produktem v tomto případě monomorfního lokusu (aktivního v bílých svalových vláknech); nejrychlejší, kde lze vidět polymorfismus v dalším lokusu (červená svalová vlákna a játra) a prostřední, kde se vyskytují izozymy vzniklé kombinací podjednotek řízených z obou lokusů. Polymorfismus v rychlejším lokusu zleva doprava: 087/087/113 (tři jedinci); 087/100/100; 087/087; 087/100/113; 087/087/113 (dva jedinci); 087/087; 087/087/113.

c) A následující gel.

d) Oba gely ukazují polymorfismus glukózafosfát isomerázy (GPI) ve svazech sekavců rodu *Cobitis*. Na druhém gelu je vidět variabilita v obou lokusech. Lokus pod startem je exprimovaný v bílém svalu; izozymy v daných podmínkách putují opačným směrem – ke katodě. Polymorfismus v rychlém lokusu (červený sval) zleva doprava – gel c): 060/074; 060/080; 080/080; 087/100/100; 060/080; 074/080; 067/080/080; 060/080; 060/060; 060/074; gel d): 100/100; 100/113; 060/087/100; 080/080; 060/113 (tři vzorky); 074/080/113; 060/080; 060/074 (dva vzorky).

V případě gelů b), c) a d) se jednalo o analýzu sekavců různých druhů a jejich hybridů, přičemž někteří hybridy byli triploidní (proto se zde mohou vyskytovat tři alely v jednom lokusu – viz vzorky 4 a 7 na gelu c) a vzorky 3 a 5 na gelu d); navíc je u některých jedinců možné odhadnout i ploidii. Předchozími analýzami bylo zjištěno, že některé alely jsou druhově charakteristické, a to: alely 060, 067, 074 a 080 pro druh *Cobitis strumicae*, alela 087 pro *C. taenia* a *C. tanaitica* a alely 100 a 113 pro *C. elongatioides*. Tyto gely jsou ukázkou využití analýzy izozymů k rozlišení příbuzných druhů a identifikaci jejich hybridů.

e) Zymogram laktátdehydrogenázy (LDH) v erytrocytech kapra (LDH tvoří tetramerní molekuly). Nejpomalejší izozym je produkt monomorfního lokusu LDH-A, nejrychlejších pět izozymů (ev. jeden nejrychlejší u čtvrtého vzorku zleva) jsou produkty duplikovaného lokusu LDH-B (označeného jako B1, který je rovněž monomorfní a B2, který má dvě alely), mezi tím jsou izozymy vzniklé kombinací produktů lokusů A a B. Polymorfismus v lokusu B2 (zleva): 100/100 (3 vzorky), 080/080; 100/100 (3 vzorky), 080/100 (3 vzorky).

Kapr jakožto evolučně tetraploidní druh má exprimované některé duplikované lokusy a v důsledku toho mohou být zymogramy mnohem komplikovanější (obzvláště v případě existence variability ve více lokusech).

f) Příklad nespecifického barvení bílkovin krevního séra kapra s ukázkou polymorfismu transferinu; zleva DD, DE (3x), DI, GI, DD (2x), DE (2x). Varianty transferinů se tradičně značí písmeny.

g) Zymogram isocitrát dehydrogenázy (IDH) v játrech pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Fenotypy zleva: 100/100/114/114; 040/100/100/100; 100/100/100/114; 040/100/100/114; 100/100/114/114; 071/100/100/114; 040/071/100/100 (dva vzorky); 100/100/100/114; 040/100/100/114; 100/100/100/114; 071/100/100/100; 040/071/100/100; 040/100/100/100; 071/71/100/100; 100/100/114/114; 075/100/100/114; 040/100/100/114; 075/100/100/114; 075/075/100/100.

Pstruh duhový je evolučně tetraploidní druh, který v historii prodělal duplikaci genomu. Některé jeho lokusy se stále chovají jako tetrasomické, což je případ právě isocitrát dehydrogenázy, kde se mohou v daném lokusu exprimovat až čtyři alely najednou.

Statistické zpracování

Data o fenotypovém složení každého jedince získaná pomocí elektroforézy bílkovin je zapotřebí zpracovat a vyhodnotit, abychom dostali smysluplné výsledky. Vyhodnocení se provádí pomocí genetických statistických programů, do nichž lze většinou zadávat přímo individuální fenotypová data podle lokusů a s jedinci sdruženými do skupin podle studovaných taxonů (chovů, linií, populací, druhů apod.). Z nich programy počítají různé parametry podle taxonů – frekvence alel v jednotlivých lokusech, procento polymorfních lokusů, průměrný počet alel na lokus, průměrnou heterozygotnost, genetickou rovnováhu uvnitř skupin, genetické vzdálenosti či podobnosti taxonů atd. Jedním ze základních programů, který poskytuje širokou škálu vyhodnocení individuálních fenotypových dat, je BIOSYS (verze 1 – Swofford a Selander, 1981, verze 2 – Swofford a Selander, 1997), kromě toho existuje mnoho

dalších – např. GENETIX (Belkhir a kol., 1996–2002), ARLEQUIN (Schneider a kol., 2000), PowerMarker (Liu a Muse, 2005) a další, které provádějí víceméně podobné výpočty.

Většina programů pro další zpracování dat (např. fylogenetickou analýzu) používá algoritmy, které vyžadují diskrétní znaky jako vstupní parametry. Vzhledem k obtížnému převodu dat získaných elektroforézou bílkovin na diskrétní znaky jsou pro další využití nejvhodnější právě tabulky genetických vzdáleností či podobností, které produkuje většina zmiňovaných programů. Z nich potom vycházejí další výpočty – konstrukce stromů znázorňujících podobnost taxonů (dendrogramy) nebo jejich evoluční příbuznost (fylogramy), stanovení míry výměny alel (migrace apod.), sledování historie vývoje taxonu apod.

3.4.5. Výhody a nevýhody elektroforézy proteinů

Výhody:

- + jednoduchá a relativně levná metodika;
- + rozsáhlá metodická literatura;
- + možnost detekce variability v několika lokusech najednou;
- + za vhodných podmínek možnost detekce variability v několika enzymových systémech pomocí jedné elektroforézy.

Nevýhody:

- ✗ nutnost čerstvého nebo hluboce zmrazeného vzorku (nedenaturované proteiny); zde vznikají problémy při získávání vzorků v terénu, kdy je třeba je uchovávat při nízké teplotě až do doby, než se dostaneme zpět do laboratoře (tj. je třeba vozit sebou mrazák nebo kontejner s větším dusíkem);
- ✗ vzorky většiny tkání je nutné odebrat invazivními metodami – po usmrcení jedince, pouze vzorky krve lze úspěšně odebrat (např. z cév ocasního násadce, ve výjimečných případech přímo ze srdce) bez ohrožení života odebíraných jedinců; v některých případech je možné odebrat pomocí biopsie vzorek svalu nebo i jater; tyto relativně neinvazivní metody však lze použít pouze u větších jedinců a u druhů, které nejsou citlivé k manipulaci;
- ✗ přestože existují metodiky pro detekci více než tří stovek bílkovin / enzymů, stále to představuje analýzu pouze malého zlomku genomu – nelze zachytit mutace, které nejsou transkribovány nebo převedeny do struktury proteinu (introny, regulační oblasti apod.); rovněž nejsou detekovány změny v sekvencích, které nekódují syntézu funkčních bílkovin;
- ✗ ne všechny změny struktury genu se projeví ve změně struktury proteinu (což souvisí s tzv. degenerovaností genetického kódu) a dále ne každá změna struktury proteinu se projeví ve změně jeho vlastností (budťo se zamění např. původní elektricky neutrální aminokyselina za jinou neutrální, nebo se změna struktury nemusí projevit ve vnějším náboji molekuly); obecně se odhaduje, že asi 25 % záměn aminokyselin lze detekovat elektroforézou;

- ✖ ne všechny frakce, které se po elektroforéze jeví na gelu jako stejné, musejí představovat to-
tožný protein (rozdílné proteiny mohou mít stejný nebo téměř stejný celkový elektrický náboj
a metoda je nemusí rozlišit) – zde je výhodné a doporučené použít pro analýzu týchž vzorků
více pufrových systémů, které mohou variabilitu skrytou v jednom systému odhalit; i přesto má
elektroforéza to omezení, že jejím užitím můžeme detekovat pouze rozdíly a nikoliv podobnost
(na druhé straně pak rozdíly v elektroforetických vzorech nemusejí odrážet genetické rozdíly, jak
již bylo vysvětleno výše);
- ✖ většinou lze analyzovat jen rozpustné (globulární) proteiny; ostatní (např. strukturní svalové pro-
teiny nebo proteiny oční čočky) lze různými metodami převést do rozpustného stavu, ovšem zde
nelze vyloučit strukturní změny;
- ✖ pozice alelomorf na elektroforetogramu je vždy relativní, takže je nutná standardizace a srovnávání
výsledků mezi jednotlivými pracovišti v testech na jednom místě, případně výměny determina-
ných vzorků;
- ✖ použití dat z elektroforézy bílkovin je omezeno na zkoumání rozdílů / podobností u příbuzných
druhů ev. nepříliš vzdálených rodů; v případě vzdálenějších taxonů můžeme dostávat zkreslené
výsledky vzhledem k tomu, že zde mohlo během evoluce dojít k opakovaným (i zpětným) muta-
cím v tomtéž místě, které se překrývají, a tím mohou snižovat zdánlivou rychlost evoluce; druhým
případem pak může být zkoumání struktury populací a mezipopulační rozdíly uvnitř druhu, kdy
v některých případech může být genetická variabilita v rámci studovaných systémů bílkovin velmi
nízká (až nulová) a daný nástroj pak nelze použít.

3.5. Znak na úrovni DNA – molekulární znaky, metody a jejich analýza

Molekulární, resp. molekulárně-genetické metody jsou z historického hlediska nejmladší, současně
však nejdynamičtější se rozvíjející součástí metodologického aparátu molekulární biologie a genetiky
organizmů.

Velkým skokem z úrovně biochemického polymorfizmu na úroveň DNA byly práce zaměřené
na analýzu mitochondriální DNA s využitím metody RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).
Analýza maternálně děděné mtDNA pomocí RFLP se stala základem fylogenetických studií a ověřování
mikrotaxonomického členění rybích druhů. Poslední dvě dekády 20. století přinesly značný technický
a metodologický pokrok, který znamenal průlomový moment v molekulárních analýzách. Širokého
uplatnění se tyto techniky dočkaly až po objevení metody PCR (*Polymerase Chain Reaction*) v letech
1985–88. Automatizace technologických postupů (syntéza požadovaných úseků DNA, analýza nuk-
leotidových a proteinových sekvencí) umožnila aplikaci molekulárních metod v masovém měřítku.
Molekulární metody začaly ve velkém měřítku pronikat i do systematiky ryb, populačních studií, eto-
logie, fylogeografie, šlechtění ryb, přičemž se staly jejich neoddělitelnou součástí. Ke studiu genetické
variability rybích populací se začaly využívat analýzy sekvencí (pořadí nukleotidů) mitochondriálních
genů (mtDNA), ale i nukleárních sekvencí (scnDNA). Tyto typy analýz nám neustále přinášejí důležité
poznatky o evoluční historii a diverzitě rybích populací, o působení např. přirozeného výběru a ná-
hodného genetického posunu (driftu), selekce a inbreedingu na příslušné populace a plemena, resp.
konkrétní DNA sekvence. V neposlední řadě aplikace molekulárních metod se zaměřením na lokusy
hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) přinesla významné informace v oblasti populačních
procesů a molekulární evoluce.

Celkově můžeme konstatovat, že studium DNA přináší několik významných výhod:

- především můžeme přímo studovat genotyp konkrétního organismu, a ne jen jeho fenotypový projev;
- variabilita genomu nám dává možnost volby takové sekvence, která je pro naše účely žádoucí, resp. molekulární metody zpravidla umožňují jejich aplikaci pro jakýkoli typ DNA, resp. RNA;
- odkrývají neomezené množství kvantifikovatelné variability;
- metody jsou víceméně univerzální pro všechny organismy, tvoří porovnatelné typy dat a lze použít stejnou charakteristiku (např. ribozomální RNA sekvenci);
- spojují řadu donedávna oddělených disciplín: molekulární biologii, fylogenetiku, fylogeografii, systematiku a taxonomii, ekologickou genetiku, konzervační biologii apod.;
- umožňují rozlišit homologii a analogii (homologie – přítomnost podobného fenotypového anebo genotypového znaku u různých druhů vyvinutých ze společného předka, analogie – přítomnost podobných znaků u značně odlišných druhů, které vznikly vývojem unikátním pro každý druh, tj. podobnost je důsledkem jiných faktorů než společného předka (např. konvergentní evoluce).

V této kapitole se zabýváme popisem nejrozšířenějších molekulárních metod a aplikací, které nacházejí nebo mohou najít uplatnění v rybářském výzkumu.

3.5.1. Izolace DNA

a) Izolace nukleových kyselin

V současnosti existuje velké množství různých modifikací základních izolačních metod nukleových kyselin (**NK**). Před samotnou izolací nukleových kyselin si musíme uvědomit několik hlavních zásad, které mají všeobecnou platnost. V první řadě je to typ organismu, se kterým pracujeme (např. Eukaryota a Prokaryota), a jaká část daného organismu je zdrojem nukleových kyselin. Prvním krokem izolace NK je získání suspenze jednotlivých buněk nebo shluků buněk narušením buněčné stěny (fyzikálně, enzymaticky) a následným uvolněním buněčného obsahu. Poté je nutné odstranit maximum nežádoucích balastních komponentů vhodnými purifikačními metodami (vázáni kationtů kovů chelatačními činidly, enzymatická degradace proteinů proteinázou apod.) k získání co nejčistší DNA nebo RNA.

Nukleové kyseliny je teoreticky možné izolovat z jakékoli části eukaryotického organismu (např. jikry, sperma, krev, stěry z ústní dutiny, trus, šupiny apod.). Často lze izolovat DNA i z muzejních preparátů. Velmi dobrým zdrojem jsou hlavně tkáně fixované v etanolu (nejlépe ve 100% etanolu). Naopak izolace DNA z tkání, které přišly do styku s formaldehydem, často končí neúspěchem. DNA lze rovněž extrahovat i z velmi starých vzorků (řádově tisíce let), např. z kostí a fosilií při vykopávkách, jedná se o tzv. **archeologickou DNA**.

Volba metody izolace DNA závisí na tom, jak budeme izoláty DNA (RNA) dále používat. Snaha zjednodušit laboratorní protokoly vedla k celé řadě modifikací izolace nukleových kyselin. V některých případech postačuje DNA (RNA) nižší kvality, resp. nižší koncentrace. V extrémních případech lze použít i buněčný lýzát. Pro praktickou izolaci se v současnosti využívá celá řada protokolů a komerčně vyráběných souprav (DNA, RNA kitů) na izolaci z krve, různých tkání, resp. agarózových gelů. Izolované nukleové kyseliny lze uchovávat ve zředěné formě nebo ve formě koncentrovaných zásobních roztoků krátkodobě při 0–4 °C, či dlouhodobě při -20 až -80 °C.

b) Stanovení koncentrace a čistoty získaného vzorku DNA a RNA

Po izolaci DNA (RNA) je vhodné ověřit čistotu izolátu (např. fotometricky v UV oblasti, spektroskopicky apod.). V běžné praxi se dnes používají dvě základní metody. Je-li množství DNA nebo RNA malé ($< 25 \text{ mg.l}^{-1}$) nebo pokud vzorek obsahuje příliš mnoho nečistot, tak koncentrace nukleových kyselin může být zjištěna z intenzity fluorescence emitované ethidiumbromidem v porovnání se vzestupnou řadou standardních vzorků DNA o koncentraci od 0,5 do 50 mg.l^{-1} . Touto metodou lze možné zjistit i velmi malé množství DNA (RNA), např. 1–5 ng DNA. Při spektrofotometrickém měření se vzorek nejprve naředí destilovanou vodou a následně se měří intenzita fluorescence při vlnových délkách 260 a 280 nm. To umožní hodnocení čistoty vzorku, přičemž očekávané poměry absorbancí 260/280 jsou 1,8 pro DNA a 2,0 pro RNA.

3.5.2. Amplifikační metody**a) Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

První myšlenky o možnosti umělé syntézy většího množství DNA lze datovat už k objevu DNA polymerázy (1955). Vynález **PCR** koncem 80. let 20. století vyvolal obrovskou revoluci v oblasti molekulární biologie. Polymerázová řetězová reakce je metoda, která umožňuje selektivně amplifikovat (namnožit) žádoucí úsek DNA *in vitro* i bez molekulárního klonování. Metoda je založena na mnohonásobné amplifikaci templátové molekuly DNA, která je dosažena opakováním tří kroků: **denaturace** templátu, **hybridizace** se syntetizovanými oligonukleotidovými primery a **prodlužováním** primerů termostabilní DNA – polymerázou. Princip metody objevil v roce 1986 **Kary Mullis**, biochemik kalifornské firmy Cetus Corporation, a metodicky ji v následujícím roce dopracoval s matematikem Fredem Faloona (Mullis a kol., 1986; Mullis a Faloona, 1987). Do komerční podoby byla metoda PCR dopracována kolektivem firmy Cetus, vedeným Henry Erlichem. Od té doby se stala PCR téměř nepostradatelnou v každé molekulárně-biologické laboratoři.

Metoda PCR znamenala obrovský přínos pro základní a aplikovaný výzkum a její autor byl oceněn v roce 1993 Nobelovou cenou za chemii. Vzhledem k tomu, že při tepelné denaturaci DNA zpočátku docházelo také k denaturaci DNA polymerázy, bylo nezbytné při každém cyklu tento enzym znovu přidávat. Významnou inovací bylo zavedení polymerázy izolované z termofilní gramnegativní bakterie *Thermus aquaticus*, která je při vysokých teplotách stabilní, proto také dostala název *Taq* polymeráza (Innis a kol., 1988). Zavedení PCR do laboratorní praxe způsobilo doslova revoluci v molekulárně orientovaném výzkumu, je přirovnáváno k „molekulárnímu xeroxování“.

b) Základní principy PCR

Požadovaný úsek, který chceme amplifikovat, vymežíme pomocí dvou primerů. Primery (syntetické jednovláknové oligonukleotidy o průměrné délce 17–30 bází) jsou komplementární k sekvencím, které se nacházejí na okraji množeného úseku a leží na opačných vláknech DNA tak, že jsou orientované svými 3' konci k sobě. První primer (+ orientace, tzv. „forward primer“) se váže na jedno vlákno DNA, druhý (- orientace, tzv. „reverse primer“) se váže na druhé komplementární vlákno denaturované DNA. V dalším průběhu reakce termostabilní DNA polymeráza prodlužuje oba primery a syntetizuje vlákna DNA. V jednom cyklu PCR se počet molekul zdvojnásobí. Empiricky zjištěná efektivita cyklu se pohybuje mezi 60–80 %. Prakticky to znamená, že po 30–40 cyklech lze dosáhnout amplifikaci 10^5 – 10^6 , čili z původních např. několika desítek až stovek kopií DNA můžeme získat řádově nanogramy až mikrogramy cílené sekvence, což je většinou dostatečné množství pro detekci a další zpracování. Amplifikace DNA v PCR je cyklický proces, ve kterém se 20x až 40x opakují 3 kroky:

1. Denaturace: roztok se zahřeje na teplotu 92–95 °C a dochází k disociaci fragmentů dvouřetězcové DNA (dsDNA) na jednotlivé řetězce.

2. Hybridizace – připojení („*annealing*“) primerů: Tento krok je z celého procesu nejdůležitější, protože na správném navázání primerů závisí úspěch celé PCR reakce. Teplota annealingu se zpravidla liší v závislosti např. na délce a složení bází primerových párů. Obvykle se teplota pohybuje v rozmezí 45–60 °C, v extrémních případech 37 °C nebo naopak 72 °C. Doba trvání je krátká, 15–60 s.

3. Polymerace – syntéza (**extenze**) nových vláken DNA: dochází zde k vlastní syntéze nových řetězců, navazujících na 3' konce primerů. Reakce je katalyzovaná např. *Taq* polymerázou při teplotě 72 °C. Při této teplotě se volné nukleotidy začleňují do vznikajícího řetězce přibližně rychlostí 35 nukleotidů za sekundu. Délka této fáze je závislá na délce syntetizovaného fragmentu. Obvykle 30 až 90 s.

Všeobecný předpoklad je: čím více cyklů, tím je PCR lepší. Nemusí to ale platit vždy, zejména jsou-li kladeny vysoké nároky na přesnost amplifikace (např. na následné sekvenování DNA), a také když je amplifikovaný úsek velmi dlouhý (čím více bází, tím vyšší pravděpodobnost chybného začlenění nukleotidů). V uvedených případech se dosahuje lepších výsledků menším počtem cyklů, resp. prodloužením doby denaturace, v jejímž průběhu musí být disociovány delší fragmenty templátové DNA. Celá PCR probíhá v programovatelném cyklu („*thermal cycler*“), který je schopný rychle a s velkou přesností měnit teplotu reakce dle námi zvoleného programu.

c) Primery pro PCR

Primery jsou oligonukleotidy komplementární k templátovému vláknu, vymezující svou polohou na templátové DNA úsek, který bude amplifikován. Výběr správné sekvence primerů rozhoduje o úspěšnosti PCR. Výsledkem chybného návrhu primerů je buď úplně neúčinná nebo nespecifická amplifikace. Při návrhu primerů je potřeba dodržet několik základních požadavků:

1. Musí být navrženy tak, aby hybridizovaly na jednotlivých řetězcích svými 3' konci proti sobě a tak ohraničily úsek určený pro amplifikaci.

2. Obvyklá délka primerů se pohybuje v rozmezí 17 až 25 bází a výjimečně může délka primerů dosáhnout až 80 bází. Naopak pro některé typy aplikací (např. RAPD) jsou primery dlouhé jen 10 bází. Na druhé straně, když jsou primery příliš dlouhé a nepurifikované, může nastat zvýšení počtu nesprávně zařazených bází do oligonukleotidů.

3. Teplota tání („*melting temperature*“; T_m) obou primerů by měla být stejná nebo co nejpodobnější. Obvykle se teplota tání pohybuje v rozmezí 45 až 60 °C, tzn. aby na jedné straně zabezpečila hybridizaci, ale zároveň aby byl hybrid stabilní při teplotě polymerace (72 °C).

4. Sekvence primerů by neměla obsahovat repetitivní sekvence, z důvodu vyloučení možnosti, že primery budou nasedat zároveň na více místech.

5. Primery by měly být přísně komplementární k sekvenci templátu na 3' konci primerů (počátek polymerace) a naopak na 5' konci mohou být modifikovány.

6. Je nezbytně nutné vyvarovat se také sekvenční komplementaritě uvnitř sekvence primerů, aby se zabránilo tvorbě sekundárních struktur, které by mohly komplikovat průběh PCR.

7. Obsah G- a C-bází by měl být shodný a měl by se pohybovat v rozsahu 40–60 %.

8. Optimální koncentrace primerů v PCR reakci se pohybuje v rozmezí 0,1–0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

9. Purifikace primerů není podmínkou, avšak v případě potřeby se mohou primery přechistit extrakcí organickými rozpouštědly nebo použitím HPLC.

10. Velmi důležitým parametrem PCR je teplota annealingu (T_a) – hybridizace primerů s komplementárním místem templátu. Teplota a čas annealingu závisí na složení bází, délce a koncentraci primerů. T_a by měla být 5–10 °C pod T_m (teplota tání) hybrida primer-templát. Přibližně se dá odhadnout tak, že budeme brát v úvahu 4 °C pro každou G- a C-bázi a 2 °C pro A- a T-báze: $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$. K přesnějším výpočtům můžeme použít programy volně dostupné na internetu (např. **Primer3**).

Ani při striktním dodržení všech uvedených podmínek nelze vždy zaručit úspěšný průběh PCR. U některých druhů jsou sekvence bází v místě vazby primeru a templátu velmi proměnlivé, což může vést u jednoho nebo několika vzorků k selhání PCR (zdánlivá „nulová alela“). Primery mají také za určitých podmínek schopnost tvorby primer-dimerů, dvouvláknových fragmentů o velikosti přibližně stejné jako je součet velikostí obou primerů. Přesný mechanismus jejich tvorby není zcela objasněn. V případě výskytu těchto artefaktů je lze minimalizovat použitím nižší koncentrace primerů a enzymu.

d) termostabilní DNA polymeráza

Tento enzym je klíčovým prvkem celé reakce. Jeho aktivita při vysokých teplotách PCR významně ovlivňuje výtěžek reakce. Velkým přínosem pro PCR reakci představoval objev termostabilních polymeráz, které zefektivnily celý proces amplifikace. Samotné DNA polymerázy vyžadují pro svou činnost přítomnost templátu DNA, specifické primery, deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP), Mg^{2+} , K^+ a optimální pH. K nejznámějším DNA polymerázám patří **Taq DNA polymeráza**. Taq polymeráza byla izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Je odolná vůči teplotám do 95 °C, přičemž reakční optimum vykazuje v intervalu 70–80 °C, naopak při 37 °C vykazuje nepatrnou aktivitu. V PCR reakčním roztoku si zachovává asi 50 % své aktivity po 130 min při 92,5 °C; resp. 60 % aktivity po 50 PCR cyklech, a při denaturaci 95 °C po 20 sek. v každém cyklu. Taq polymeráza **nemá 3' → 5' opravnou exonukleázovou aktivitu**, což působí chyby při polymeraci. Vyšší přesnosti syntézy lze dosáhnout úpravou podmínek PCR.

Kromě Taq polymerázy jsou komerčně dostupné i jiné termostabilní DNA polymerázy. Jednou z nich je např. **Stoffelové fragment DNA polymerázy**, který vykazuje lepší teplotní stabilitu, je aktivní při nižších koncentracích K^+ a ve velkém rozpětí koncentrací Mg^{2+} . **VENT_RTM** DNA polymeráza izolovaná z *Thermococcus litoralis* pracuje s chybou 5–15× menší než Taq polymeráza. Vysoká přesnost VENT_RTM polymerázy je způsobena **3' → 5' exonukleázovou aktivitou**. Tato aktivita může být za určitých podmínek nevýhodná, protože způsobuje odbourávání primerů předtím, než si splní svůj úkol. Po hodinové inkubaci při 95 °C si zachovává 90 % svojí aktivity, což ji také předurčuje pro přesnou syntézu dlouhých fragmentů (několik kb). Z dalších dostupných DNA polymeráz můžeme ještě připomenout např. **rTth** DNA polymerázu, **Pfu** enzym nebo **Amplitaq** (rekombinantní forma Taq polymerázového genu).

e) Templátová DNA

Množství templátové DNA potřebné pro amplifikaci se pohybuje v rozmezí nanogramů až mikrogramů. Obecně lze PCR uskutečnit z jedné buňky, avšak při překročení určité koncentrace DNA účinnost PCR klesá. Při snížení potřebné koncentrace vznikají často nežádoucí produkty, zapříčiněné např. **cross-kontaminacemi** z předcházejících amplifikací. Pro úspěšnou PCR není nezbytná absolutně čistá DNA. Můžeme také použít hrubé buněčné lyzáty, např. buňky přímo lyzované v 1% SDS nebo krátkým povařením v destilované vodě. Kromě DNA lze jako templát použít i RNA, přičemž se používá deoxyribonukleáza / DNáza, která nejdříve odstraní DNA a zbylá RNA, či pouze mRNA je použita k syntéze cDNA enzymem reverzní transkriptáza k syntéze cDNA.

f) Nukleotidy

Koncentrace nukleotidů se pohybuje v rozsahu 50 až 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, přičemž nadměrné koncentrace vedou ve vyšší míře k chybně zařazeným nukleotidům (*thermodynamic infidelity*).

g) Reakční tlumivý roztok

Standardní reakční roztok obsahuje směs deoxynukleosidtrifosfátů (dNTP, čili směs dATP, dCTP, dGTP a dCTP), primery, DNA polymerázu, MgCl_2 . Koncentrace hořčnatých iontů má nejvýznamnější vliv na specifitu amplifikace. Za optimální se považuje koncentrace 1–2 mmol.l^{-1} . Nadbytek Mg^{2+} iontů vede k akumulaci nespecifických produktů a naopak nízká koncentrace redukuje nebo úplně eliminuje výtěžek reakce. Pro každý templát a pár primerů je proto vhodné stanovit optimální koncentraci Mg^{2+} empiricky (koncentrační řada). Je potřeba zohlednit také fakt, že dNTP vázou ionty hořčíku, proto by měla být koncentrace Mg^{2+} o 0,5–1,0 mmol.l^{-1} vyšší než koncentrace celkových dNTP. V reakčním roztoku se mohou vyskytovat i různé typy aditiv, které slouží k potlačení některých nepříznivých faktorů a zvýšení efektivity PCR. Jedná se především o detergenty (NP-40, Tween-20, Triton X-100), které potlačují tvorbu sekundárních struktur a mohou také zvýšit stabilitu enzymu. K stabilizaci enzymu lze do reakční směsi přidat buď albumin bovinního séra (BSA) nebo želatinu. Přidání dimetylsulfoxidu (DMSO) nebo glycerolu usnadňuje denaturaci a zlepšuje podmínky zchlazení. Kromě zmíněných aditiv se v některých protokolech přidávají i jiná aditiva (např. formamid, sulfát amonný), všeobecně však platí, že příliš mnoho aditiv naopak reakci zamezí. Finální koncentrace aditiv se pohybují v rozmezí 0,1–1,0 % celkové reakční směsi, avšak konkrétní koncentrace je většinou nutné empiricky vyzkoušet.

h) Specifita amplifikace a modifikace PCR

Specifita PCR reakce je především dána vhodným výběrem primerů. Primery delší než 18 bází by teoreticky měly zabezpečit dostatečnou specifitu amplifikovaného úseku. Ve skutečnosti se ale někdy setkáváme s nespecifickou hybridizací („**mispriiming**“), které lze předejít přidáním co nejnižší koncentrace primerů nebo co nejvyšší teplotou annealingu, snížením koncentrace hořčíku a množství enzymu. Důvodem tvorby nespecifických produktů může být aktivita polymeráz při laboratorní teplotě, kdy templátová DNA není denaturována, tzn. že primery se mohou nespecificky navázat na templát. Tento jev lze eliminovat udržováním PCR mixu při nižších teplotách (0–4 °C) nebo použít tzv. „**Hot start**“ PCR. Metoda Hot start PCR spočívá v přidání polymerázy až po denaturaci nebo její aktivaci přidáním Mg^{2+} iontů po denaturaci, kdy jsou vlákna DNA úplně separována. Alternativou horkého startu je „**studený start**“. Při tomto způsobu PCR se k eliminaci tvorby nespecifických produktů a primer-dimerů využívá monoklonální **TaqStart** protilátka, která se váže na Taq polymerázu, a tím blokuje její aktivitu. Po zahřátí na denaturační teplotu se ruší vazba enzym – protilátka a polymeráza může syntetizovat příslušné úseky DNA.

Jednou z dalších forem PCR je např. tzv. „**Nested PCR**“. V tomto případě se nejprve amplifikuje úsek, kde templátem je dsDNA. Následuje další PCR, tzv. „*nested*“ reakce, kde templátem je produkt reakce předcházející. Při první reakci se použije první řada oligonukleotidů, v druhé „*nested*“ reakci se použijí oligonukleotidy, které jsou navrženy na fragmenty získané prostřednictvím první PCR.

Asymetrická PCR představuje jednu z dalších modifikací PCR, která umožňuje preferenční syntézu jen jednoho vlákna z duplexu DNA tím, že jeden z primerů je v nadbytku. Jako produkt amplifikace vzniká jednovláknová DNA vhodná např. pro přímé sekvenování. Tuto metodu lze také kombinovat s „*Nested PCR*“. Z praktického hlediska zajímavou modifikací představuje tzv. multiplexová PCR reakce. Jedná se o velmi výkonnou metodu PCR, která umožňuje např. amplifikaci několika mikrosatelitních lokusů v jedné reakci. Prakticky to znamená, že namísto např. pěti samostatných PCR reakcí můžeme amplifikovat pět vybraných lokusů společně v jedné reakci.

ch) Kontaminace v PCR

Vysoká senzitivita PCR a vysoké množství amplifikované DNA přináší s sebou riziko kontaminace PCR produktů. Toto nebezpečí se zvyšuje, když pracujeme např. s velmi nízkými koncentracemi nebo s problematickými templáty. Ve většině případů se ale jedná o kontaminaci produkty z předcházející amplifikace (tzv. „*carry over*“), která vzniká např. vlivem aerosolu, uvolněného otevřením zkumavky, přičemž se kontaminuje prostředí laboratoře, sklo apod. Kapka aerosolu obsahuje přibližně 105 kopií DNA. Kromě uvedeného typu kontaminace může také dojít ke kontaminaci mezi vzorky v jedné sérii (tzv. **cross-contamination**). Zabránit kontaminacím PCR lze dodržováním maximální čistoty, oddělením prostoru pro izolaci templátové DNA, používáním sterilních zkumavek, sterilizací prostředí UV světlem apod. Velmi jednoduchý postup detekce kontaminace je např. používání tzv. negativní kontroly v PCR tak, že do jedné ze zkumavek přidáme místo templátu čistou destilovanou vodu. Výjimečně lze použít i PCR pozitivní kontrolu, kdy se do další PCR zkumavky přidá místo templátu produkt z předešlé úspěšné PCR amplifikace nebo produkt z referenční laboratoře nebo z genové banky.

3.5.3. RT-PCR (Real-Time) a kvantitativní qPCR

Detekce a analýza molekul RNA patří k důležitým molekulárně-biologickým postupům. Adaptace amplifikačních technik umožňuje relativně nenáročnou analýzu mRNA tím, že po reverzní transkripci následuje amplifikace cDNA pomocí PCR. **RT-PCR** představuje modifikaci PCR, při které se jako templát využívá RNA. V prvním kroku se odstraní genomická DNA enzymem deoxyribonukleáza, aby nedošlo ke kontaminaci nukleárními geny a k amplifikaci pseudogenů z DNA. Následně je RNA přepsána enzymem reverzní transkriptázou do cDNA, a ta je následně namnožena pomocí normální PCR. Využití RT-PCR je poměrně široké, nejčastěji se používá k velmi přesné detekci a kvantifikaci konkrétní mRNA v různých tkáních, či ke kvantifikaci genové exprese. Na rozdíl od klasické PCR, Real-Time PCR vyžaduje použití speciálního cyklu, který dokáže změřit množství fluorescenčně značených sond navázaných na fragmenty DNA, které vznikají po dobu amplifikačních cyklů.

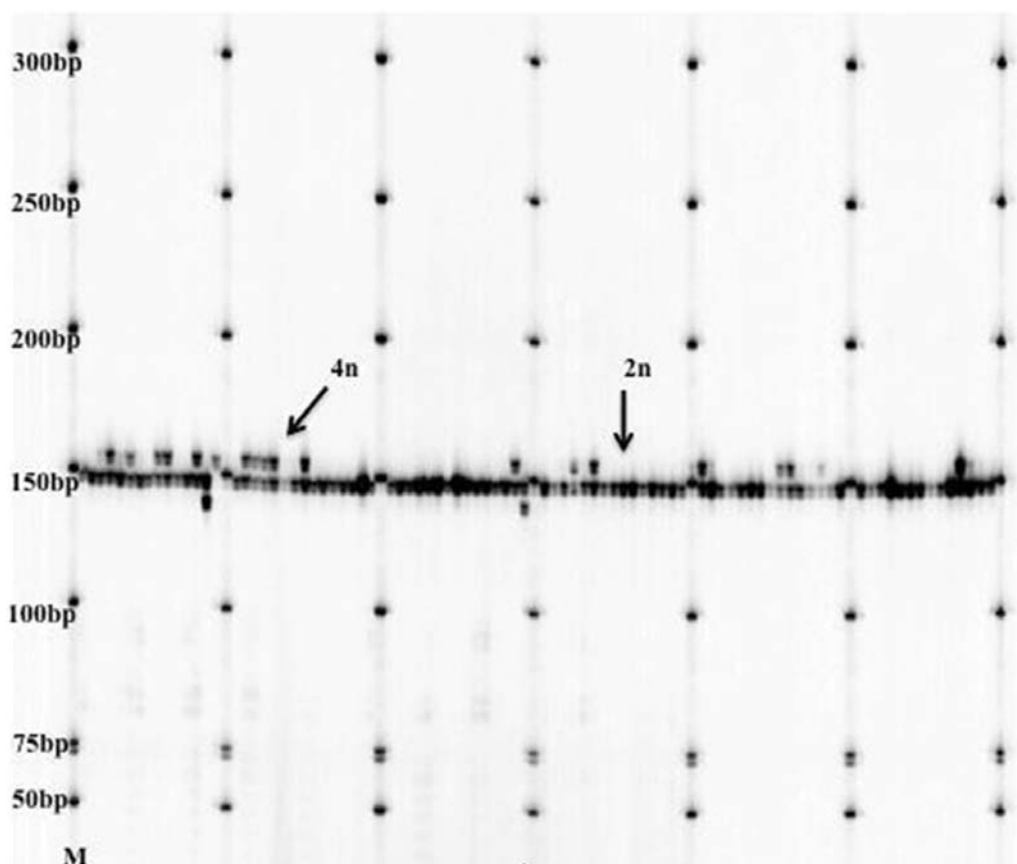
3.5.4. Elektroforetické metody – separace nukleových kyselin

Při elektroforetické separaci nukleových kyselin využíváme vlastnost pentózofosfátové kostry všech nukleových kyselin, které nesou záporný náboj, což umožňuje migraci amplifikovaných fragmentů v elektrickém poli od katody k anodě. Z uvedených důvodů lze produkty amplifikačních a restrikčních reakcí (fragmenty DNA) separovat podle jejich relativní molekulové hmotnosti a velikosti náboje prostřednictvím elektroforézy fragmentů v gelu. Kratší fragmenty migrují rychleji a urazí tak větší vzdálenost než fragmenty delší. Mnohé aplikace využívají agarózové gely, které bývají většinou horizontálně umístěné a úplně ponořené v elektroforetickém pufru (nejčastěji Tris-borát-EDTA nebo TBE). K samotné vizualizaci DNA fragmentů využíváme fluorescenční barviva. Fluorescenční barvivo (nejčastěji etidium bromid) se po přidání do gelu váže na DNA a vzniklé fragmenty je poté možné vizualizovat v UV světle pomocí transiluminátoru. Fluorescenční barvivo (např. etidium bromid) je taktéž možné u elektroforézy s rychlým během přidávat přímo do vzorku před separací. Tím se zamezí silnému signálu pozadí.

a) Elektroforéza na agarózovém gelu (*Agarose Gel Electrophoresis – AGE*). Metoda AGE separuje částice na základě jejich elektrického náboje. Koncentrace agarózy je většinou 1–2 %, ve specifických případech se používají i koncentrace 2–3× vyšší. Do formy je vnořen hřeben, který po ztuhnutí gelu odstraníme. Přitom se vytvoří jamky, do kterých se pipetují vzorky.

b) PAGE (polyakrylamidová gelová elektroforéza): Druhým nejčastějším elektroforetickým médiem v molekulární biologii je polyakrylamidový gel (denaturační, obvykle s močovinou nebo nedenaturační; obr. 3.9.). Polyakrylamidové gely vznikají katalytickou polymerací dvou monomérů, akrylamidu a N, N'-metylen bisakrylamidu (bis). Gel je tvořen dlouhými vlákny polymerovaného akrylamidu navzájem spojenými vlákny bisakrylamidu. Jedná se o vertikální elektroforézu, při které směs akrylamidu a bisakrylamidu polymeruje v pufru (TAE) pomocí volných radikálů poskytovaných persulfátem amonným (APS), který způsobuje homolytické štěpení vazeb O-O. K urychlení polymerace se používá volná zásada TEMED (tetrametylendiamin), který katalyzuje tvorbu volných radikálů persulfátu amonného. Polymerace se neuskuteční při nízkém pH nebo přítomnosti O₂. Koncentrace obou složek určuje velikost pórů ve výsledném gelu – čím je akrylamid koncentrovanější, tím jsou póry menší. Použitá koncentrace akrylamidu se liší dle velikosti separovaných fragmentů DNA od 3,5 % (fragmenty 1–2 kb) až po 20 % gely pro separaci malých fragmentů 10–100 bp.

c) DGGE (denaturační gradientová gelová elektroforéza): jedná se o metodu, která umožňuje separaci DNA molekul v polyakrylamidovém gelu na základě odlišné sekvence (liší se v jednom nukleotidu). Gel obsahuje lineární gradient formamidu a močoviny. Dvouvláknová DNA putuje rychlostí určenou její molekulovou hmotností až do doby, než vstoupí do té části gelu, kde koncentrace denaturačních látek způsobí denaturaci dsDNA na jednovláknové molekuly. Tím se výrazně změní její pohyblivost. Konečná pozice fragmentu DNA v gelu závisí na denaturačním bodu („melting point“). Fragmenty identické velikosti mohou být takto separovány na základě odlišné sekvence v gelech s gradientem denaturačního činidla. Gely mají fixní koncentraci akrylamidu (akrylamid : bisakrylamid = 37,5 : 1) v TAE pufru s lineárním gradientem denaturačního činidla (100% = 40% formamid a 7 mol.l⁻¹ urea). Používají se dva typy DGGE: paralelní gely, ve kterých se zvyšuje koncentrace denaturačních činidel lineárně shora dolů ve dvou samostatných paralelních gelech (první 10–50%, druhý 40–80%); a **perpendikulární** gely, ve kterých se zvyšuje koncentrace denaturačních činidel lineárně zleva doprava napříč gelem. Následná detekce se vykonává barvením stříbrem a etidumbromidem.



Obr. 3.9. Příklad fragmentační analýzy mikrosatelitního lokusu LS-19 jesetera malého použitím polyakrylamidové gelové elektroforézy (LiCor). 4n – tetrasomický vzor lokusu LS-19 (t.j. reprezentován 4 proužky na gelu). 2n disomický vzor lokusu LS-19 (t.j. reprezentován 2 proužky na gelu). M – molekulární marker o velikosti 300 bp (t.j. 300 bazických párů) Z archivu M. Hulák

e) SSCP (jednovláknový konformační polymorfizmus) představuje relativně jednoduchou a velmi citlivou a efektivní techniku detekce mutací. Metoda je založena na principu odlišné migrace jednovláknových molekul DNA, které se liší svojí sekundární strukturou (konformací) v nativním polyakrylamidovém gelu (obvykle 6%, v TBE pufru). Unikátní konformace jednovláknového fragmentu DNA jsou dány intramolekulárními interakcemi uvnitř DNA sekvence. Tato konformace je závislá na teplotě a iontové síle. Celkově můžeme konstatovat, že tato vysoce citlivá technika zachycuje téměř 100% mutací v DNA fragmentech menších než 200 bází a 80% mutací v DNA fragmentech menších než 400 bází. Optimální velikost PCR produktů je 150 bází pro detekci mutací, přičemž větší PCR produkty jsou vhodné ke sledování polymorfismu.

f) RAPD (randomly amplified polymorphic DNA). Je založena na PCR, při které se používají velmi krátké primery (deset nukleotidů) a nízké teploty zchlazení. Tyto primery se dají téměř univerzálně použít pro prakticky jakýkoliv organismus. Do reakční směsi pro PCR se přidá jen jeden primer, který má pro svou malou délku řadu komplementárních míst v různých částech genomu. S velkou

pravděpodobností vznikne směs fragmentů o různé délce, které lze posléze elektroforeticky analyzovat. Soubor proužků na gelu, představujících jednotlivé fragmenty může vytvářet např. druhově specifický vzor, popřípadě při použití více primerů mohou být v některých případech rozlišeny např. populace nebo jedinci.

Značnou výhodou RAPD je její univerzalita, relativně nízká cena a poměrně jednoduché technické vybavení. Přes uvedené výhody má ale RAPD některé problematické vlastnosti. Jednou z nich je nízká opakovatelnost jednotlivých experimentů. Metoda je totiž velmi citlivá i na nepatrné kontaminace. Určitým řešením, vedoucím k odstranění těchto nedostatků, je několikanásobné opakování experimentu s analýzou jen těch fragmentů, které se objevily ve všech opakováních. Jednou z dalších komplikací je také dominance fragmentů, které v konečné fázi znemožňují odlišení heterozygotů od dominantních homozygotů. Přes zmíněné nevýhody bývá RAPD vhodným nástrojem např. při vyhledávání pohlavních (sex) markerů.

3.5.5. Restrikční analýzy

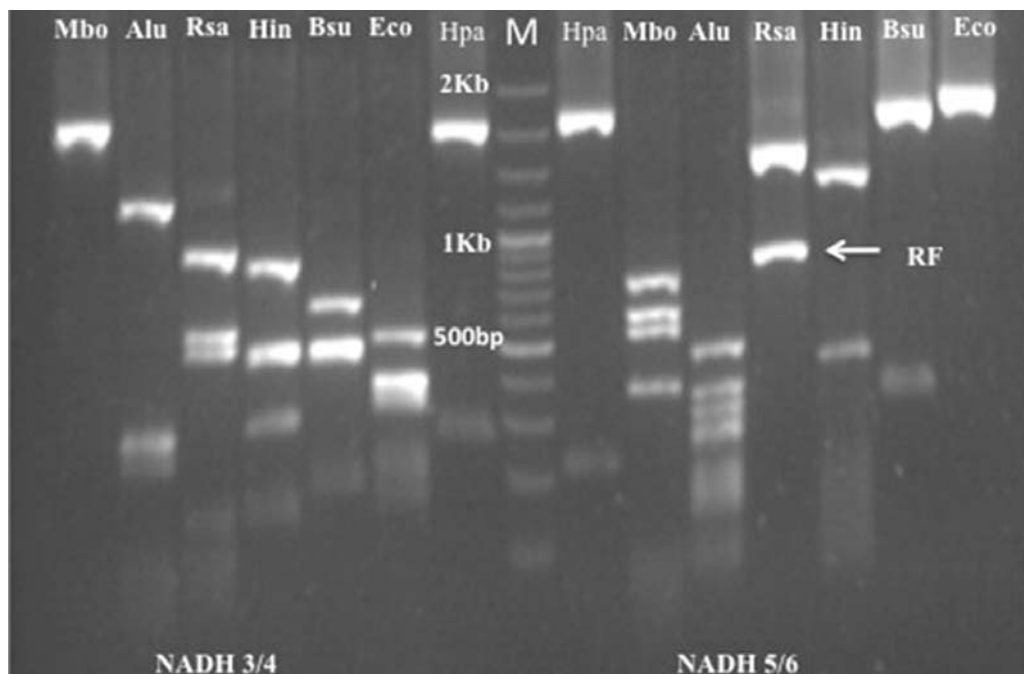
Pojmem restrikční analýzy rozumíme soubor technik, využívajících specifických vlastností *restrikčních endonukleáz* (restriktáz). Tyto enzymy jsou schopné se vázat na specifické rozpoznávací sekvence dsDNA, dlouhé přibližně 4–6 bp, přičemž oba řetězce štěpí buď uvnitř, nebo blízko téhle sekvence. Rozpoznávací sekvence mohou být unikátní (např. u enzymu *EcoRI*), nebo neurčité (např. *HindIII*), kde jeden nebo více nukleotidů v sekvenci je libovolných. Místo štěpení DNA se označuje jako *restrikční místo*. Samotný počet restrikčních míst na analyzované DNA závisí na její velikosti, sekvenci a také na délce rozpoznávané sekvence. Kratší sekvence se budou vyskytovat častěji než sekvence dlouhé. U mnohých endonukleáz jsou restrikční místa na komplementárních řetězcích vzájemně posunuta, což umožňuje jejich jednoduché spojení s jinými fragmenty pomocí enzymu ligázy.

3.5.6. PCR-RFLP

Proměnlivost velikosti restrikčních fragmentů podléhajících v populaci mendelovské segregaci se všeobecně označuje jako polymorfismus délky restrikčních fragmentů, zkráceně RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). Použitím RFLP lze identifikovat alely na základě přítomnosti nebo absence restrikčního místa. Právě analýzy RFLP mtDNA nahradily v 80. letech 20. století dosud často používané alozymy. Metoda RFLP se skládá ze dvou základních kroků:

- 1. Amplifikace** konkrétního úseku DNA pomocí páru primerů. Často se používají primery komplementární k začátkům a koncům kódujících oblastí genů nebo kolem nekódujících mezigenových oblastí.

- 2. Restrikce** (nastříhání): jedná se o restrikci namnoženého úseku pomocí enzymů restrikčních endonukleáz, které specificky štěpí DNA (obr. 3.10.). Např. enzym *EcoRI* stříhne DNA vždy, pokud najde sekvenci 3' – GAATTC – 5'. Pokud se takové místo nachází ve studovaném úseku DNA jednou, detekujeme při následné elektroforéze místo jednoho proužku dva. Pokud ale bylo toto místo změněno např. mutací, k nastříhání nedojde a proužek bude jeden.



Obr. 3.10. Elektroforetická separace PCR-RFLP produktů (RF) dvou mitochondriálních genů (NADH3/4 a NADH5/6) kapra obecného použitím sedmi restrikčních endonukleáz (Eco 471 (Eco), BsuRI (Bsu), HinfI (Hin), RsaI (Rsa), AluI (Alu), MboI (Mbo), HpaII (Hpa). M – molekulární marker o velikosti 2 kb (t.j. 2 000 bazických párů) z archivu M. Huláka.

3.5.7. AFLP

AFLP (amplified fragment length polymorphisms) je metoda, která používá PCR v kombinaci se štěpením produktů restrikčními enzymy. Na rozdíl od předcházející metody (**RAPD**) tato metoda vyniká vysokou mírou opakovatelnosti. Nevýhodou proti RAPD je vyšší cena i technická náročnost. Významnou výhodou AFLP je ale schopnost rychle generovat velké množství polymorfních markerů, a to i u druhů, u kterých nemáme žádnou předcházející genetickou informaci. Samotná metoda probíhá v několika následujících krocích. Při prvním kroku je DNA štěpena dvěma restrikčními enzymy. Rozpoznávací místo jednoho z nich je krátké (např. enzym *MseI* rozpoznává sekvenci TTAA), naopak druhá restriktaza vyhledává sekvenci delší a štěpí méně často (např. *EcoRI* rozpoznává sekvenci GAATTC). Tímto způsobem je zaručeno, že vznikne dostatek fragmentů, které budou na jednom konci odstřiženy jiným enzymem než na druhém konci. V témž kroku se na konce fragmentů enzymem ligázou připojí krátké nástavce (**adaporty**). Adaporty jsou krátké úseky DNA o známé sekvenci, které se vážou na konce fragmentů vytvořeného příslušnou restrikční endonukleázou, od které se také odvozuje jejich název (např. ***MseI* adaptor**). Restrikční štěpení a připojování adaptorů probíhá současně. Opětovné spojení odštěpených fragmentů je blokováno stálou přítomností restriktazy. Sekvence adaptorů jsou voleny tak, aby je restriktaza neodštěpila od fragmentů. Navázáním adaptorů získáváme fragmenty, které mají na koncích známé sekvence, a tedy je můžeme následně amplifikovat pomocí PCR. Samotných fragmentů s adaptory vzniká více, než potřebujeme k analýze, a je tedy nezbytné vyselektovat menší množství fragmentů. To se prakticky provádí prostřednictvím dvou PCR. Při první PCR (**preselektivní amplifikace**) se používají primery, které mají sekvenci komplementární k sekvenci adaptorů, jsou však o jednu bázi delší.

Tímto způsobem vybereme jen skupinu fragmentů, které mají na koncích před připojeným adaptorem tuto konkrétní bázi. V druhé PCR se používají ještě delší primery (obvykle ještě o dvě báze delší), čímž se opět zvýší selektivita amplifikace. Zmíněným způsobem selekce se obvykle získávají desítky různých fragmentů, které lze posléze analyzovat na polyakrylamidových gelech nebo mnohem přesnějším způsobem s použitím automatického sekvenátoru.

3.5.8. Hybridizační metody

Nukleové kyseliny mohou i za podmínek *in vitro* hybridizovat a podle reakčních podmínek produkovat hybridní molekuly DNA $\times$ DNA, DNA $\times$ RNA, RNA $\times$ RNA se vzájemně komplementárními řetězci. Samotná hybridizace se provádí na pevných nosičích, na kterých je polynukleotid navázán a je současně schopen hybridizace i přes pomalou a relativně málo efektivní kinetiku hybridizační reakce. Mezi různé varianty hybridizace patří např. dot-, blot- a slot-hybridizace, Southernův přenos (**Southern blotting**), hybridizace RNA (**Northern blotting**) a *in situ* hybridizace. Přenosu DNA na pevný nosič předchází depurinace, alkalická denaturace a neutralizace. Přenos se následně uskutečňuje buď jednoduchou difúzí na základě kapilárních sil, za pomoci vakua nebo působením elektrického proudu (**electroblotting**). Imobilizace vzorků se nejčastěji provádí na membránách z nitrátu celulózy nebo z nylonu. Malé fragmenty (do 1 500 bp) se přenesou na membránu při použití difúze kapilární silou do 2 hodin, větší fragmenty (nad 15 kb) vyžadují i více než 15 hodin. Permanentní fixace na membránu se docílí např. použitím UV světla. Vlastní hybridizace znamená reasociaci příslušných dvojic bází podle specifického pořadí nukleotidů se sondou značenou radioaktivním nebo neradioaktivním markerem. Jedná se buď o úseky DNA (dvou nebo jednovláknové) klonované pomocí bakteriálního vektoru nebo o syntetické oligonukleotidy. Méně často se používají tzv. ribosondy (cRNA). Senzitivita hybridizace závisí na čtyřech hlavních faktorech: délce (počtu bází), komplementaritě sondy, koncentraci sondy navázaného markeru, koncentraci testované DNA přenesené a fixované na membráně. Metody založené na hybridizační schopnosti nukleových kyselin se široce využívají např. při studiu exprese a struktury genů, mutagenese apod.

dot-, blot- a slot-hybridizace: názvy jsou odvozeny od tvaru jednotlivých vzorků nanesených na membránu: dot- velmi pravidelný okrouhlý tvar, slot- velmi pravidelný protáhlý tvar, blot- ručně nanesený vzorek náhodného tvaru.

a) Southernova transferová hybridizace (Southern blotting) nebo Southernův přenos. Je jednou ze základních metod identifikace specifických fragmentů DNA na bázi hybridizace molekul nukleových kyselin. Metoda byla pojmenována dle objevitele **Eduarda M. Southerna** (Edinburgh University, 1975). Princip metody spočívá v několika následujících krocích: po naštěpení DNA jedním nebo několika restrikčními enzymy (restriktázami) jsou vzniklé fragmenty separovány na agarózovém gelu. Posléze jsou dvouřetězcové štěpy denaturovány roztokem NaOH, výsledné jednořetězcové fragmenty jsou z elektroforetického bločku přeneseny vertikálně orientovaným kapilárním přenosem v prostředí vhodného pufru na nitrocelulóзовou nebo nylonovou membránu, na které se fixují. Tenhle krok představuje vlastní „**blotting**“. Membrána s navázanými fragmenty se následně ponoří do roztoku se značenou sondou. Vzniklé hybridní fragmenty můžeme identifikovat přiložením fotografického filmu na membránu (v případě radioaktivního značení) nebo chemiluminiscencí, či fluorescenčním barvením (biotinylované sondy).

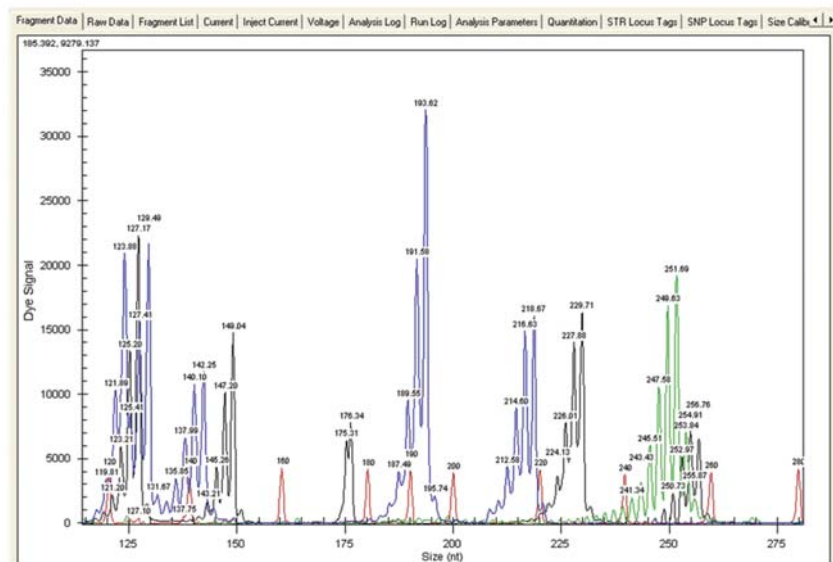
b) Northern blotting: jedná se o metodu hybridizace fragmentů RNA. Nejčastěji se aplikuje k vyhodnocování genové exprese konkrétních mRNA. Kvantifikace resp. semikvantifikace se provádí srovnáním s referenční hybridizační sondou.

c) Western blotting představuje imunologickou metodu hybridizace značených sond s fragmenty proteinů.

3.5.9. Fragmentační analýza mikrosatelitů

Mikrosatelity představují krátké tandemové repetice DNA, nejčastěji o délce 2–6 bazických párů. Běžně jsou pro ně používány zkratky **STRs** (*short tandem repeats*), **SSR** (*simple sequence repeats*), nebo **VNTRs** (*variable number of tandem repeats*). Podle délky repetice dělíme mikrosatelity na **dinukleotidové** (např. CACACACA), **trinukleotidové** (např. ATGATGATGATG), případně **tetranukleotidové** (např. CATGCATGCATGCATG) atd. Většinu mikrosatelitů v genomu obratlovců (30–60 %) tvoří pravděpodobně dinukleotidové repetice, přičemž se nejčastěji vyskytují motivy (AC)_n nebo (AT)_n. DNA sekvence mikrosatelitů jsou vysoce náchylné k mutacím, a to díky mechanismu nerovnoměrné rekombinace a „skluzu“ polymerázy na repetici. Zmíněný mechanismus mění počet repetic (opakování), v průběhu replikace mikrosatelitů. Prakticky to znamená, že mikrosatelity se nacházejí v různých variantách (alelách) v rámci jedné populace nebo druhu.

Výše uvedené skutečnosti dělají z mikrosatelitů užitečné genetické markery, neboť délka repetice (alely) může být snadno zjišťována pomocí amplifikace metodou PCR, s oligonukleotidovými primery umístěnými v unikátní sekvenci obklopující repetici. Následné určení délek jednotlivých alel umožňuje tzv. **fragmentační analýza** – prostřednictvím elektroforetického dělení na polyakrylamidovém gelu (PAGE). To znamená, že PCR produkty (amplifikované fragmenty), jsou elektroforeticky separovány a porovnávány se standardy o známé molekulární velikosti – délky fragmentů jsou pak určovány pomocí programu na zpracování digitálního obrazu. Další možností je využití automatického sekvenátoru pro analýzu délek amplifikovaných fragmentů (obr. 3.11.). Automatický sekvenátor využívá kapilární elektroforézy analyzovaného vzorku společně se standardem. Princip analýzy spočívá v detekci fluorescenčně značených fragmentů DNA. Program sekvenátoru pak detekuje délku alel amplifikovaných mikrosatelitních lokusů na základě porovnání s délkami fragmentů obsažených ve standardu.



Obr. 3.11. Příklad penta-plexové fragmentační analýzy mikrosatelitních lokusů [zelené píky lokus Cca24 (240–250bp); modré píky lokusy MFW 13(13–145bp) a MFW 7 (194–219); černé píky lokusy MFW 6 (127–149) a Cca 67 (230–260)] kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). Výstup z fragmentační analýzy z automatického sekvenátoru CEQ 8000 BeckmanCoulter (z archivu M. Huldka).

Využití mikrosatelitů v genetice a šlechtění ryb je velmi široké. Jako kodominantní markery (délka každého mikrosatelitu je děděna mendelisticky), jsou distribuované po celém genomu, resp. multialelické a relativně početné, a jednoduše amplifikovány během PCR. Z uvedených důvodů se mikrosatelity úspěšně využívají při výzkumech analýzy rodičovství (parentage analysis), identifikaci klonů, populačně-genetických studiích, při analýzách genového toku (migracích), nebo v ochranářské, ekologické a evoluční genetice.

3.5.10. Sekvenování DNA

Pod pojmem sekvenování DNA si zjednodušeně můžeme představit identifikaci pořadí jednotlivých nukleotidů v polydeoxyribonukleotidovém řetězci. Do poloviny 70. let 20. století byly analyzovány sekvence jen velmi krátkých fragmentů DNA o délce 15–20 bp. Průlomovým rokem pro sekvenování DNA se stal rok 1977, kdy byly nezávisle publikovány dvě metody sekvenace DNA, shodou okolností v témže ročníku vědeckého časopisu PNAS (Maxam a Gilbert, 1977; Sanger a kol., 1977). Jednotlivé metody byly následně pojmenovány podle svých objevitelů:

a) MAXAM-GILBERTOVA (chemická) metoda sekvenace (*chemical cleavage procedure*) je založena na báze specifické chemické degradaci řetězce DNA, který byl na konci označen. Jedno vlákno DNA (resp. fragment DNA) je ve čtyřech variantách vystaveno chemickému činidlu, které specificky narušuje vazby u konkrétního nukleotidu. Po uskutečnění reakce se produkty rozdělí v sekvenačním gelu s rozlišovací schopností 1 báze a sekvence nukleotidů analyzovaného řetězce DNA se odčítá na vizualizovaném elektroforetogramu.

b) SANGEROVA (enzymatická) metoda (*chain termination method, dideoxy method*) je založena na modifikované polymerázové reakci. Reakční směsi jsou čtyři: ve všech je ssDNA („single stranded DNA“; denaturovaná dsDNA) s funkcí matrice, DNA polymeráza bez nukleázové aktivity, primery, směs dNTP a jeden ze čtyř odlišných dideoxynukleotidů (ddNTP). U ddNTP se jedná o analogy normálních deoxynukleosidtrifosfátů (dNTP), kterým na 3'-uhlíku deoxyribózy chybí OH-skupina, a proto k nim DNA polymeráza nemůže navázat další nukleotid. Pokud v průběhu syntézy nukleotidového řetězce dojde k náhodné inkorporaci dideoxynukleotidů (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), replikace se zastaví. Takovým způsobem se nasyntetizuje určité spektrum různě dlouhých komplementárních řetězců zakončených na 3' konci vždy tím ddNTP, který byl v dané variantě reakční směsi použit. Produkty polymerázové reakce se posléze elektroforeticky rozdělí na sekvenačním gelu. Sekvence nukleotidů v analyzované DNA se stanoví analýzou vizualizovaných elektroforetogramů. Sekvence čtená ve směru od čela startu je sekvencí 5' → 3' komplementární k matričnímu řetězci.

Dalším pokrokem v oblasti sekvenování DNA bylo zavedení automatických sekvenátorů, které znamenaly podstatné zjednodušení a časovou úsporu analýz, a tím i rozšíření možností experimentálních prací a analyzovaných sekvencí DNA. Princip sekvenování s použitím sekvenátoru zůstává stejný jako u Sangerovy metody, nepoužíváme však např. radioaktivní značení, ale každý stopovací prekurzor je označen jinou fluorescenční barvičkou. To znamená, že každý z ddNTP má navázaný jiný fluorochrom, který je možné odlišit na základě různých emisních spekter. Zařazení ddNTP do řetězce způsobí ukončení syntézy molekuly DNA. V reakci vzniká směs různě dlouhých produktů. Po přečištění od volných nukleotidů je vzorek rozdělen na kapilární elektroforéze, která je součástí automatického sekvenátoru. Fotooptický systém přístroje zajistí automatické přečtení sekvence, se kterou je možné díky příslušnému softwaru dále pracovat.

V neposlední řadě, významný příspěvek k sekvenaci DNA přinesly firmy poskytující sekvenační servis – tzv. továrny na sekvence (MacroGen – www.macrogen.com, Genomex – www.genomex.com a jiné), které významně redukuje čas a investice v podobě automatického sekvenátoru.

c) Sekvenační metody nové generace

Od počátku 21. století se začaly vyvíjet sekvenační metody nové generace (z anglického „*Next-Generation Sequencing*“ = NGS), které můžeme považovat za nástupce dosavadních sekvenačních postupů využívajících Sangerovu sekvenační metodu. První takto popsanou metodou se stala technologie tzv. masivního paralelního sekvenování, jejíž obecný princip se stal základem pro následující platformy NGS. Další vyvinutou technologií byla metoda pyrosekvenování (454/Roche) a postupně se začaly vyvíjet další sekvenační metody od různých společností. Patří mezi ně Illumina HiSeq, SOLiD™, Helicos Heliscope™ a doposud nejnovější metoda sekvenace jednotlivých molekul DNA Pacific SMRT™. Postup ve vývoji výpočetní techniky a bioinformatiky vedl ke snížení nákladů na sekvenování a také umožnil rozvoj celogenomového sekvenování. V následujícím textu přinášíme stručný přehled několika sekvenačních platform NGS.

Masivně paralelní sekvenování

Masivně paralelní sekvenování (podle anglického „*Massively Parallel Signature Sequencing*“ = MPSS) je základní sekvenační metoda nové generace, která na základě počtu jednotlivých mRNA molekul, produkováných každým genem, analyzuje úroveň genové exprese ve vzorku. Technologie MPSS řeší dvě zásadní otázky: fyzické oddělení jednotlivých fragmentů nukleových kyselin a vlastní čtení sekvence. První otázka je řešena pomocí emulzní PCR (emPCR) nebo amplifikace ve shlucích. Při emPCR dochází k vytvoření tzv. mikroreaktorů, v nichž jsou uzavřeny všechny potřebné komponenty pro PCR (nukleotidy, enzym polymerázy a primery). Následně dochází ke klonální amplifikaci – všech molekul DNA vytvořených v mikroreaktoru z jediné molekuly templátu. Druhá otázka – čtení sekvence – je u dostupných zařízení řešena dvěma metodami: sekvenační syntézou („*sequencing by synthesis*“) a sekvenováním založeném na ligaci („*ligation based sequencing*“). Označené PCR produkty (amplikony) získané z cDNA jsou amplifikovány tak, aby každá příslušná mRNA molekula dávala asi 100 000 amplikonů s jedinečnou značkou. Každé označení sekvence (MPSS značka) v datovém souboru MPSS se srovnává se všemi ostatními značkami a identické značky jsou počítány. Úroveň exprese jakéhokoli genu se vypočítá vydělením počtu označení určitého genu celkovým počtem označení pro všechny mRNA, přítomné v datovém souboru.

Pyrosekvenace (metoda 454/Roche)

Pyrosekvenace je jednou z prvních sekvenačních metod nové generace, která se začala rozvíjet jako alternativa ke klasické Sangerově metodě. Již v roce 1987 P. Nyrén navrhl, jak lze monitorovat aktivitu DNA polymerázy pomocí bioluminiscence. Trvalo téměř jedenáct let, než společnost 454 Life Sciences uvedla metodu pyrosekvenace do praxe. Technologie firmy Roche FLX Genome Sequencer (FLX GS) byla první komerčně dostupné zařízení pro masivní paralelní sekvenování. V roce 2011 přichází na trh další FLX GS série Titanium, která umožňuje zlepšení výkonu prodloužením čtecího rámce, který je srovnatelný s kapilární Sangerovou metodou. Tento typ sekvenace kombinuje jednotlivé extra dlouhé řetězce s jedinečnými párovými konci o délce 20 kb, 8 kb a 3 kb. Během sekvenace *de novo* se vytváří vysoce kvalitní uspořádání s větším pokrytím kompletního genomu.

Life Technologies (AB) SOLiD™ System

Od října roku 2007 je možné sekvenování pomocí technologie AB SOLiD™. Je využito jedinečného sekvenačního procesu katalyzovaného DNA ligázou. Zkratka SOLiD™ uvádí, že přístroj této technologie pracuje na principu ligace oligonukleotidů (z anglického „*Sequencing by Oligo Ligation and Detection*“). Nové modely firmy AB (5500 a 5500xl SOLiD™ System) slibují sekvenaci s přesností nad 99,99%. Sekvenční přístroj technologie AB SOLiD přečte řetězec o délce 25–35 bp. Přečtení dat o velikosti 3–4 gigabáze obvykle trvá pět dní. Systém je také schopen přečíst sekvenční až 300 milionů fragmentů o délce dvakrát 50 bází („*mate-pairs*“), v jednom běhu trvajícím 12–14 dní tak generuje až 30 gigabází.

Technologie, které byly popisovány výše, vyžadují pro přesnou sekvenci DNA dostatečně silný světelný signál amplifikovaných fragmentů DNA. V některých případech může docházet z důvodu nižší intenzity světelného signálu k chybám v sekvenaci, čímž se mění četnost a množství různých fragmentů DNA, které existovaly před amplifikací. Sekvenací jednotlivých molekul DNA je teoreticky možné dosáhnout miniaturizace do řádu nanometrů s minimální spotřebou reagentů. Přímá detekce jednotlivých molekul DNA není náročnou sekvenační metodou a předpokládá se její dobrá realizovatelnost ve veřejných laboratořích. Pomocí této technologie je umožněna rychlá sekvenace malého množství DNA bez nutnosti předchozí amplifikace molekuly DNA, čímž je zařazena do sekvenační skupiny třetí generace. V posledním desetiletí byly vyvinuty techniky pro detekci a analýzu jednotlivých molekul DNA, které obsahují systém pro citlivou detekci jediného fotonu. V následujícím textu přinášíme stručný popis dvou dostupných technologií pro přímou detekci jednotlivých molekul DNA.

Helicos Biosciences HeliScope™

Sekvenační platforma HeliScope™ byla vyvinuta společností Helicos Biosciences. Komerčně dostupná se stala až v roce 2007. HeliScope™ pracuje na principu tzv. přesného sekvenování jednotlivých molekul DNA (z anglického „*True Single Molecule Sequencing*“ = tSMS™) a dokáže analyzovat mnoho milionů jednotlivých fragmentů DNA současně, což vede k sekvenační rychlosti až 1 Gb za den. Před samotnou sekvenací se vzorek DNA štěpí na fragmenty o délce 100–200 bp a poté se připojují adaptéry s fluorescenční značkou na polyadeninovém 3' konci. Denaturované řetězce jsou na 3' koncích hybridizovány příslušnými oligonukleotidy a následně uchycovány na povrchu destičky (z anglického „*cell-flow*“). Destička je schopna zachytit až 100 × 106 templátů na čtverečním centimetru. Pro samotnou sekvenaci je na destičku přidána DNA polymeráza a jeden ze čtyř fluorescenčně značených dNTPs. Polohové souřadnice zachycených řetězců jsou zaznamenány CCD kamerou a před dalším sekvenováním je fluorescenční značení odstraněno a odplaveno.

Pacific Biosciences SMRT™

V roce 2009 byla představena dosud nejnovější platforma NGS, SMRT™ (z anglického „*Single Molecule Real-Time Sequencing*“) od společnosti Pacific Biosciences. Sekvenování pomocí této technologie probíhá v reálném čase a využívá přirozený proces replikace DNA. Současně také probíhá katalyzované začlenění komplementárních fluorescenčně značených dNTPs. Reakce jsou měřeny současně v tisících uspořádaných „neřízených vlnových vedeních“ (z anglického „*zero-mode waveguides*“ = ZMWs), což jsou dutiny v čipu o průměru 10–50 nm, které mají nanofotonickou strukturu a snižují pozadí fluorescence. Tím je umožněno použití vysokých koncentrací značených dNTPs potřebných k podpoře rychlého průběhu sekvenování.

3.5.11. Nové metody

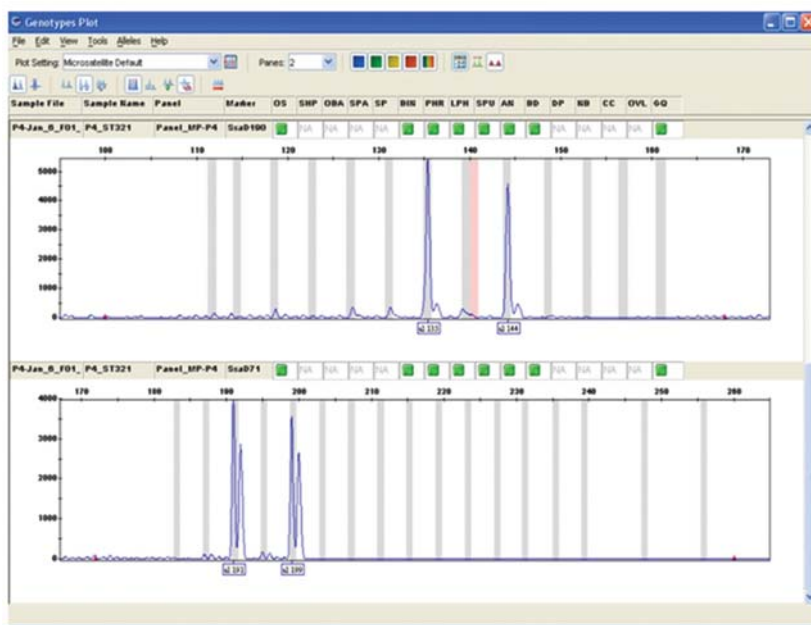
Z nově se vyvíjejících molekulárních metod, resp. metod využívaných v oblasti komparativní genetiky a transkriptomiky modelových druhů ryb (např. zebřička pruhovaná, *Danio rerio*, halančík ryžovištní, *Oryzias latipes*, losos obecný, *Salmo salar* aj.), lze uvést DNA (genové) čipy, *strand displacement amplification*, PCR-pouch, NASBA, *TaqMan*, *branched DNA*, CFLP (*cleavage fragment length polymorphism*) a jiné. Nejvíce perspektivní jsou metody, které integrují do jednoho homogenního systému amplifikaci a detekci průběžným měřením (např. fluorescencí) a vyhodnocováním už v průběhu PCR. Jednou z takových perspektivních technik jsou např. prostorově adresné oligonukleotidové matice – **DNA čipy**. Takové matice se připravují *in situ* pomocí fotolitografie a chemické syntézy oligonukleotidů na pevném, např. skleněném nosiči. Samotné čipy umožňují na principu alelově specifické oligonukleotidové hybridizace opakované a rychlé testování buď na základě jednoduché přítomnosti nebo sekvenační

analýzy fluoresceinem značených nukleových kyselin. Amplifikaci cílové DNA pomocí PCR může podle potřeby předcházet hybridizační fáze. Hustota oligonukleotidové matice a její informační kapacita je limitována prostorovým rozlišením, v němž mohou být jednotlivé oligonukleotidové sekvence na čipu imobilizovány, syntetizovány a detekovány po hybridizaci. V současnosti dosahované rozlišení 20 mm umožňuje umístění 400 000 různých oligonukleotidových sekvencí na plochu 1,6384 cm². Toto rozlišení je dostatečné např. k úplnému sekvenování 16 kb mitochondriálního genomu.

3.5.12. Principy použití molekulárních znaků

Použití tohoto typu znaků je neobyčejně rozsáhlé a stále více se uplatňuje v nejrozmanitějších odvětvích biologie včetně studia biologie, ochrany a šlechtění ryb. Proto je vhodnější uvést několik obecných zásad výběru znaku a velikosti analyzovaného vzorku. Především čím variabilnější je znak, tím větší musí být zkoumaný vzorek, tak aby byl spolehlivě charakterizován základní soubor. Typickým příkladem je použití mikrosatelitů jako populačně genetických znaků, kde jeden lokus může mít až několik desítek alel (viz obr. 3.12.), a proto vzorek musí být založen na mnoha jedincích.

Dále musí být vzata v úvahu mutační rychlost znaku, jeho evoluční neselektivita nebo selektivita, úroveň variability, jeho procentuální účast v genomu, povaha informace, již potřebujeme získat. O tomto tématu existuje mnoho prací a upozorňujeme na některé z posledních vyčerpávajících přehledů a návodů – Sunnucks (2000) a Chenuil (2006). Shrnutí těchto principů je uvedeno v následující tabulce (tab. 3.1.).



Obr. 3.12. Výsledek fragmentační analýzy jedince pstruha obecného ST321 ze sekvenátoru ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, Inc.), zobrazený v programu GeneMapper v3.7. Jedná se o mikrosatelitové lokusy SsaD190 a SsaD71, každý zastoupený dvěma alelami. Pro oba lokusy je tedy jedinec ST321 heterozygotní. Tyto mikrosatelity byly amplifikovány společně s dalšími dvěma fragmenty v jedné reakci, tzv. „multiplex PCR“.

Tab. 3.1. *Vhodnost jednotlivých analytických metod k různým typům studií (podle Chenail, 2006).*

Znak /Typ studie	Polymorfismus bílkovin	mtDNA	Jedinečné sekvence DNA	Rozptýlené repetitivní motivy	Satelitní DNA, jednotlivé VNTR	Multi-satelity	Mikro-satelity	RAPD
Rodokmen, paternita	dostatečný	nevhodný	dobrý	nevhodný	vynikající	vynikající	dobrý až vynikající	dobrý
Vnitrodruhové populační struktury	vynikající	dobrý	dobrý	nevhodný	dobrý	dobrý	vynikající	diskutabilní
Mezidruhové rozdíly, hybridizace	dobrý	velmi dobrý	dostatečný	dobrý	nevhodný	nevhodný	nevhodný	nevhodný
Fylogeneze	dostatečný	vynikající	dobrý	vynikající	nevhodný	nevhodný	nevhodný	nevhodný
Důležité vlastnosti znaku								
Relativní rychlost evoluce	mírná	rychlá	variabilní	mírná až rychlá	mírná až rychlá	mírná až rychlá	rychlá	rychlá
Množství zjištěných lokusů	102–103	1	>106	105–106	104	104	104–105	?
% genomu	5% <	10% <	30–70 %	asi 20%	5–20%	5–20%	5–20%	?
Nutnost usmrcení zvířete	většinou ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

3.6. Analýza genetických vztahů mezi taxony s využitím DNA

Předpokladem pro analýzy fylogenetických vztahů je skutečnost, že všechny formy života mají společný původ a současný stav je výsledkem vývoje – změn vlastností, znaků apod., které lze teoreticky vysledovat do minulosti. Potom můžeme předpokládat, že na základě míry podobnosti jednotlivých znaků můžeme odhadnout i míru příbuznosti studovaných taxonů, případně vysledovat historii jejich vzniku a vývoje, odhadnout dobu, kdy se vývojově oddělily navzájem a vyslovit předpoklady o vlastnostech a znacích jejich předka.

Sekvence (pořadí nukleotidů v molekule DNA) je jedním z důležitých znaků charakterizujících každého jedince. Výhodou studia sekvencí DNA je to, že studujeme vlastně přímo genom organismu (a ne pouze vnější znaky, které mohou být výsledkem působení mnoha faktorů – i vnějších). Dále je přínosem – vzhledem ke komplexnosti molekuly DNA, že si můžeme zvolit ten její úsek, který bude podle svých vlastností nejvhodnější k použití pro řešení konkrétního problému. Vzhledem k tomu, že vývoj každé skupiny, každého taxonu (a vlastně každého organismu) je výsledkem jedinečné historie, umožňuje nám použití metod analýzy DNA relativně přesně taxony identifikovat a rozlišit je navzájem i přes jejich případnou vnější podobnost, která může být pouze výsledkem konvergentního vývoje. Na druhé straně je molekula DNA tak univerzální, že umožňuje použití její analýzy při řešení problémů v celém spektru organismů.

K rekonstrukci genealogických vztahů lze využít různé typy genetických dat: nukleotidové a proteinové sekvence nebo alozymová či restriční data (Avise, 2004). Tato kapitola je zaměřena převážně na metody analýzy sekvencí nukleových kyselin, protože právě tyto znaky jsou v dnešní době nejčastějším zdrojem dat pro rekonstrukce fylogenetických vztahů.

V organizmech máme k dispozici v podstatě dva typy sekvencí DNA – sekvence úseků jaderné DNA a sekvence mitochondriální (u rostlin ještě plastidové) DNA. Mitochondriální DNA je u živočichů charakteristická tím, že je předávána pouze po mateřské linii (existují i vzácné výjimky) a je haploidní; vyznačuje se (v některých úsecích) vysokou frekvencí mutací a evoluční rychlostí, a je proto vhodná pro studium evolučních vztahů především u vzdálenějších taxonů. Jaderná DNA může být použita ke studiu evolučních vztahů jak vzdálených taxonů, tak i k popisu např. mezipopulační variability téhož taxonu – zde záleží na výběru úseku DNA, který pro daný účel použijeme. Tzv. nekódující úseky (sekvence) vykazují vysokou mutační rychlost, tedy i vysokou variabilitu a mohou být využity při studiu blízké příbuzných taxonů; jiné úseky jaderné DNA jsou naopak vysoce konzervativní, s nízkou mutační rychlostí a jsou s výhodou použitelné pro analýzu vztahů vzdálenějších skupin.

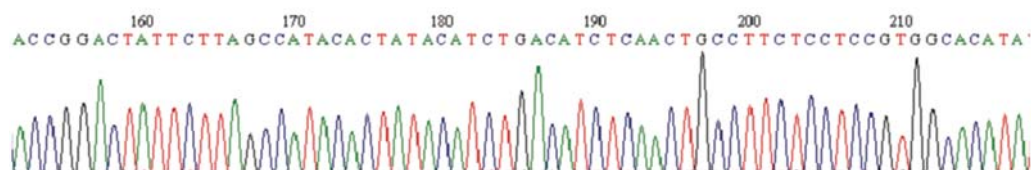
3.6.1. Práce se sekvencemi DNA

Sekvence úseku DNA, který jsme si pro naše účely zvolili, a které získáme příslušnými metodami (izolace DNA, PCR vybraného úseku, sekvenace) u vybraných skupin organismů, musíme nějakým způsobem zpracovat, vzájemně porovnat, najít shody či rozdíly a ty potom příslušnými metodami vyhodnotit.

Assembling

Mnoho úseků DNA nejsme schopni sekvenovat naráz – záleží na délce studovaného úseku, kvalitě vzorku DNA, rozlišovací schopnosti přístroje a mnoha dalších okolnostech. V takovém případě musíme danou sekvenci u vzorku analyzovat po částech. Přitom musíme dbát na to, aby se jednotlivé úseky dostatečně překrývaly, aby bylo možné je spolehlivě a správně spojit dohromady. Výslednou sekvenci pak můžeme podrobit dalším analýzám.

Sekvenací vzorků jako zástupců taxonů, které jsme vybrali pro realizaci našeho záměru, získáme **chromatogramy** (obr. 3.13.). Chromatogram na obrázku je výstup z kapilárového sekvenačního přístroje, který grafickým způsobem ukazuje pořadí bazí ve studovaném úseku DNA.



Obr. 3.13. Chromatogram – grafický výstup z kapilárového automatického sekvenátoru (část).

V případě kratších úseků DNA (dejme tomu o délce do 500 bp) je obvykle dostačující provést sekvenaci za použití jednoho primeru. Vzhledem k tomu, že čtecí délka kapilár v automatickém sekvenátoru je omezená (záleží na typu sekvenačního přístroje, délce samotné kapiláry, kvalitě DNA a dalších faktorech), je delší úseky DNA nutno sekvenovat po částech, za použití několika primerů, abychom pokryli celou délku požadovaného úseku. Sekvenační primery by měly být navrženy tak, aby se dílčí úseky získané jednotlivými sekvenacemi překrývaly. Pro každý vzorek a úsek DNA tak získáme několik překrývajících se chromatogramů, jejichž sesazením pak získáme celou výslednou sekvenci. Tomuto

procesu se říká **assembling** a můžeme ho provádět „ručně“ tak, že si otevřeme zároveň všechny získané chromatogramy a odpovídající textové zápisy sekvencí a hledáme koncové překryvy sami, nebo můžeme použít speciálně k tomuto účelu vytvořených programů, které nám sekvenace sesadí automaticky. Obr. 3.14. ukazuje překryv dvou chromatogramů jednoho genu konkrétního vzorku získaných sekvenací za použití dvou primerů (*forward* a *reverse*). Nicméně i v případě automatického sesazování je nutné sekvence pečlivě projít a odhalit případné chyby, protože ne vždy je chromatogram ukázkový. Výsledná sekvence pro následné použití je vždy ve formě textového zápisu pořadí nukleotidů. Šikovným a uživatelsky přátelským programem pro automatické sesazování sekvencí je SeqMan (z programového balíku Lasergene firmy DNASTAR, viz obr. 3.14.), který je licencovaný a poměrně drahý. Dalším vhodným, často používaným a navíc volně přístupným softwarem je BioEdit (Hall, 1999).



Obr. 3.14. Assembling dvou chromatogramů získaných sekvenací úseku DNA za použití dvou sekvenačních primerů. Program SeqMan umožňuje automatické sesazování.

Alignment

Prvním krokem analýzy samotných sekvencí bývá porovnání – „sesazení“ získaných sekvencí. Sekvence (nukleové kyseliny, ale i proteiny) se srovnávají pomocí tzv. **alignmentu**. Co je alignment? Z evolučně-biologického hlediska je alignment hypotéza o posícní homologii nukleotidů či aminokyselin (Xia, 2000; Lemey a kol., 2009). V praxi se jedná o srovnání sekvencí pod sebou tak, aby jejich homologické úseky byly seřazeny pod sebou ve stejném sloupci. Rozlišujeme mezi alignmentem párovým (*pairwise*

alignment), kdy srovnáváme pouze dvě sekvence, a mnohonásobným (*multiple alignment*), což je srovnání tří a více sekvencí.

Následující příklad uvádí srovnání dvou sekvencí (párový alignment):

Taxon 1 ATTCCGGTGCGT

Taxon 2 ATTGCGGTACGA

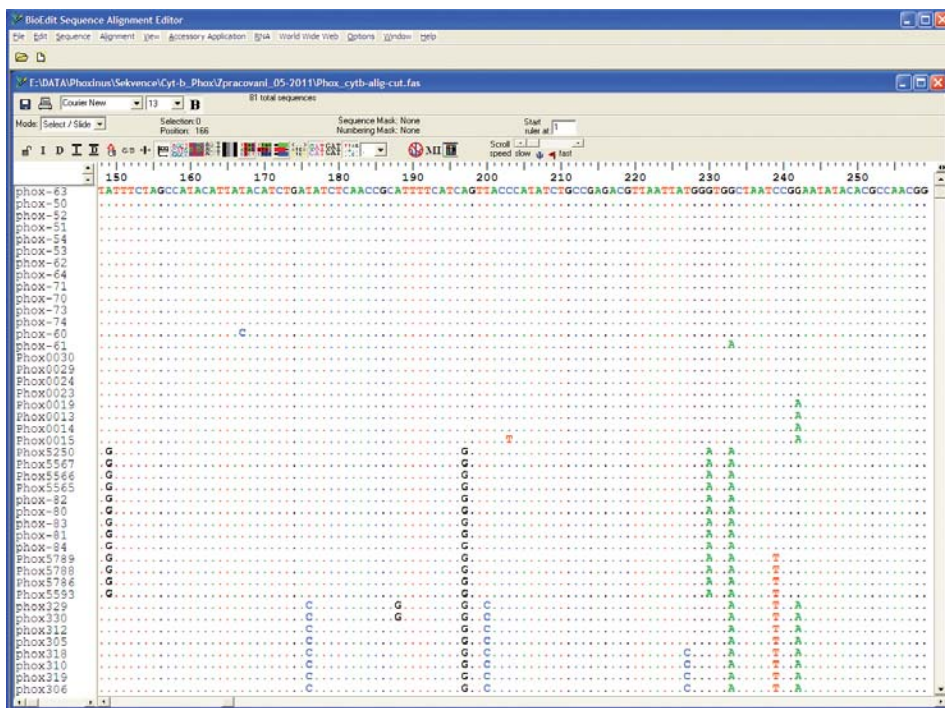
Výše uvedené srovnání je možné zapsat také následujícím způsobem. Tečka v alignmentu znamená shodnou bazi v konkrétní pozici sekvencí:

Taxon 1 ATTCCGGTGCGT

Taxon 2 . . . G . . . A . . A

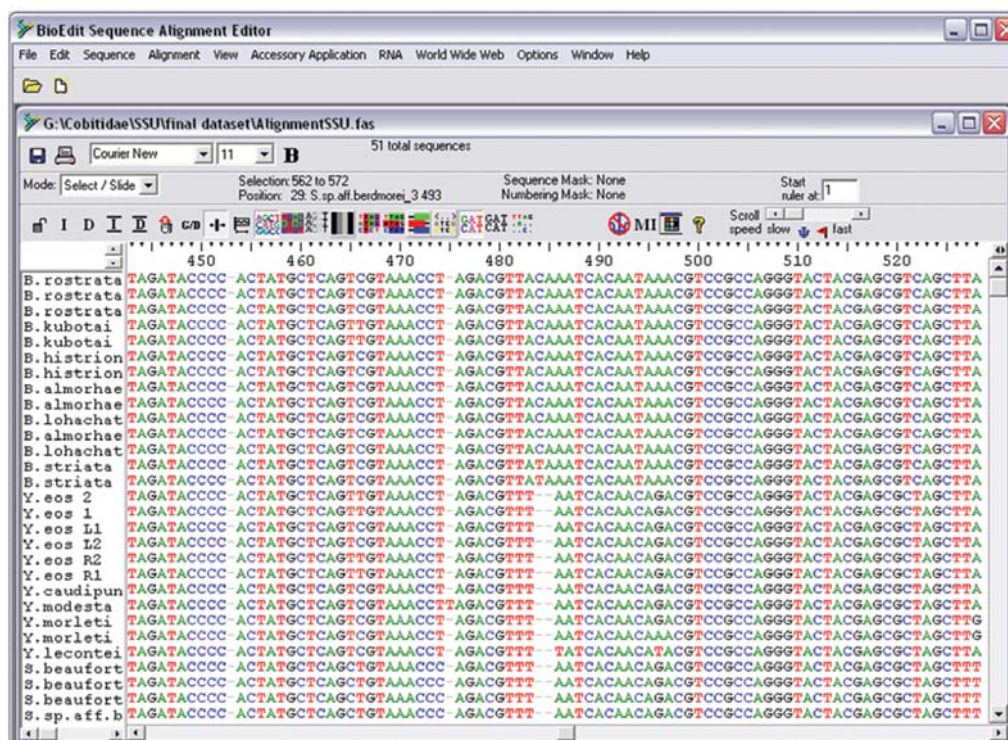
V praxi, pro účely rekonstrukce genealogických vztahů mezi taxony se používá zejména mnohonásobný alignment. Vytvoření optimálního alignmentu je základním kamenem pro následné rekonstrukce genealogických vztahů mezi taxony.

V případě kódujících nukleotidových sekvencí (úseky DNA, které jsou při translaci přepisovány do bílkovin) je situace jednoduchá. V těchto sekvencích zřídka dochází k inzercím či deletcím (všeobecně nazýváme indely, do české molekulárně-fylogenetické hantýrky byl z angličtiny přejat pojem gapy), protože by došlo k posunu čtecího rámce a tedy závažné mutaci většinou neslučitelné se životem. Homologní pozice lze tedy v případě kódujících sekvencí nalézt relativně snadno (obr. 3.15.). Nicméně je vhodné zkontrolovat homologii jednotlivých pozic např. přeložením do proteinového alignmentu (přeložíme sekvenci bazí za pomoci kodonů do sekvence aminokyselin).



Obr. 3.15. Příklad mnohonásobného alignmentu kódujících sekvencí. Nukleotidy, které v jednotlivých pozicích následujících sekvencí odpovídají sekvenci první, jsou nahrazeny tečkou.

Z hlediska alignmentu nastává složitější situace u tzv. nekódujících sekvencí, neboť v těchto případech se s indely setkáváme velmi často (obr. 3.16.). Mezi nekódující sekvence řadíme DNA, která není prepisována v proteiny, jako jsou např. introny; někdy má tato DNA regulační funkci, někdy její funkci neznáme a označujeme ji za tzv. *junk* DNA. Na hranici mezi kódující a nekódující DNA se řadí geny pro různé druhy funkční RNA, jako jsou geny pro rRNA či tRNA – nekódují sice proteiny, ale přesto jsou prepisovány.



Obr. 3.16. Příklad mnohonásobného alignmentu nekódujících sekvencí. Mezery v alignmentu představují gapy. V těchto pozicích došlo v průběhu evoluce u některých taxonů k inserci či deleci nukleotidů.

Alignment několika kratších kódujících úseků DNA je proces, který je možné zvládnout i vlastními silami. Alignment velkého množství dlouhých a značně variabilních, zejména nekódujících sekvencí je však proces operativně relativně náročný a vyžaduje použití některého z výpočetních algoritmů vytvořených k tomuto účelu. Mezi tyto postupy patří např. dynamické programování, které je pro velké množství sekvencí časově velice náročné. V praxi jsou častěji využívány tzv. progresivní metody. Progresivní metody získají nejprve porovnáním všech párů sekvencí (párovým alignmentem) matici podobností, podle níž je vytvořen pomocný strom (*guide tree*). Na základě tohoto stromu pak vytvoří skupiny nejpodobnějších sekvencí a postupně přidávají sekvence méně příbuzné, až dospějí k finálnímu výsledku. Jedním z nejčastěji používaných softwarů pro alignment sekvencí založeným na principu progresivní metody je uživatelsky komfortní program ClustalX (Thompson a kol., 1997). Dalším oblíbeným programem je BioEdit, který vedle mnoha jiných funkcí zahrnuje také algoritmus programu Clustal. Za přesnější (zato ale pomalejší) variantu progresivní metody se považuje algoritmus programu T-Coffee (*Tree-based Consistency Objective Function For alignment Evaluation*) (Notredame a kol., 2000).

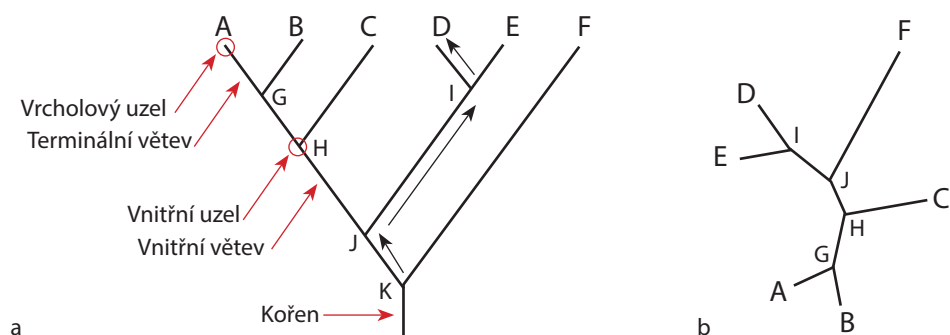
Interpretace alignmentu

Za předpokladu, že dvě sekvence sdílejí společného předka a jedná se o sekvence homologické, neshoda v konkrétní pozici je interpretována jako bodová mutace, ke které v průběhu evoluce u jedné ze sekvencí došlo. Obdobně, vmezeřený gap interpretujeme jako indel, kdy u jedné ze sekvencí došlo k inzerci či delecii. Pozorujeme-li v jednotlivých nukleotidech shodu, předpokládáme, že nukleotidy zůstaly ve stejné formě, v jaké se nacházejí u nejbližšího společného předka. Ve skutečnosti však situace nebývá tak jednoduchá, jako je popsáno v tomto odstavci, ale je nutné používat nejrůznějších korekcí, jak bude uvedeno později v oddíle o evolučních modelech.

3.6.2. Fylogenetické stromy

Genealogické vztahy mezi taxony se graficky znázorňují nejčastěji pomocí fylogenetických stromů.

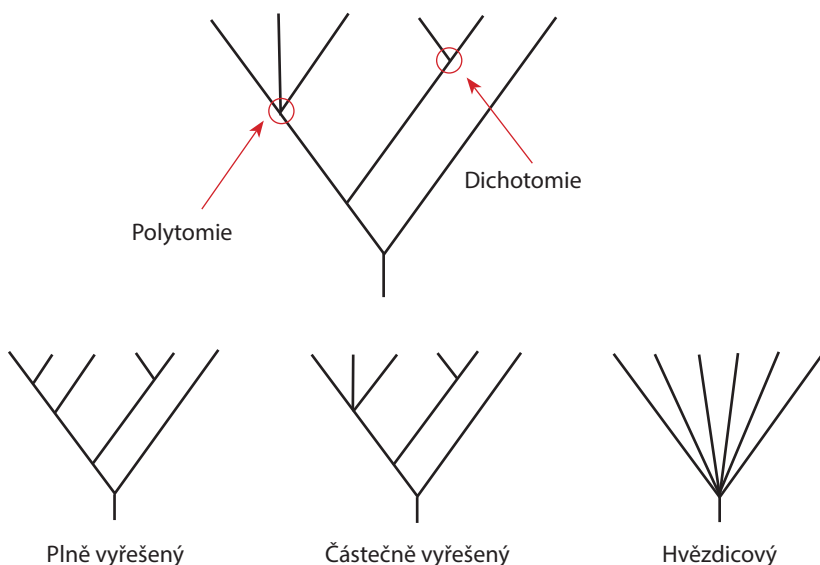
Fylogenetický strom je grafické znázornění hypotézy o genealogických vztazích mezi jednotlivými taxony, o nichž předpokládáme, že mají jednoho společného předka. Anatomie stromu je popsána v obr. 3.17.a.



Obr. 3.17. Struktura fylogenetického stromu (a) s kořenem a (b) bez kořene. Oba stromy mají stejnou topologii. A, B, C, D, E a F představují vrcholové uzly, neboli OTUs. G, H, I, J a K reprezentují uzly vnitřní, jinak také nazývané HTUs. K pak představuje kořenový uzel. Nezakořeněný strom nemá žádný kořenový uzel. Šipky v zakořeněném stromu znázorňují směr evoluce, strom bez kořene ukazuje pouze vzájemné fylogenetické vztahy.

Vrcholové neboli **terminální uzly** představují recentní taxony, často obecně nazývané operační taxonomické jednotky (*operational taxonomic units* = OTUs). Každé větvení neboli **vnitřní uzel** představuje hypotetického společného předka (*hypothetical taxonomic units* = HTUs) a každá **větev** evoluční linii, tedy vztah mezi relevantními taxony. K vrcholovým uzlům vedoucí větve se nazývají terminální (Wiley, 1981; Page a Holmes, 1998).

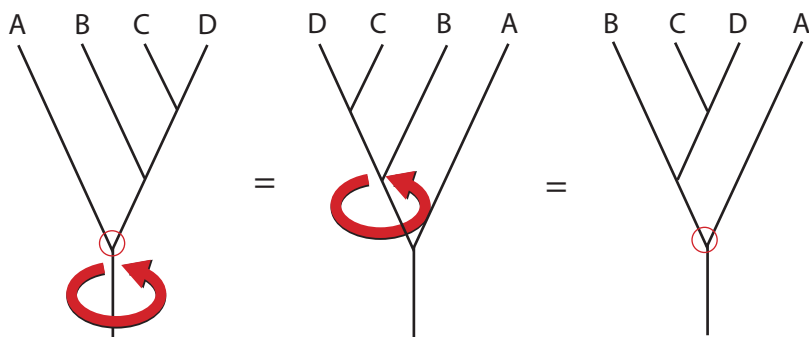
Setkávají-li se ve vnitřním uzlu pouze tři větve, hovoříme o **bifurkaci** či **dichotomii**. V případě více větví se jedná o **polytomii** a takový uzel je považován za nevyřešený. Strom obsahující pouze dichotomie označujeme jako **plně vyřešený** (*fully resolved*), strom obsahující pouze jeden vnitřní uzel se označuje jako **hvězdicový** (*star tree*) – viz obr. 3.18.



Obr. 3.18. Dichotomie, polytomie a různě vyřešené stromy.

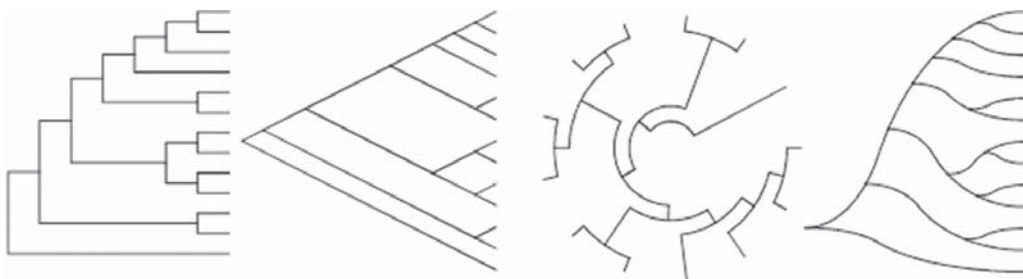
Skupina taxonů sdílejících společného předka má **monofyletický** původ a nazývá se monofyletická linie neboli klád (*clade*). Často používaný pojem *cluster* (klast, shluk) nemusí vždy odpovídat monofyletické linii. Na obr. 3.17.a. taxony A, B a C tvoří společně cluster, mají nejbližšího společného předka H a mají proto monofyletický původ. O skupině, jež sice sdílí nejbližšího společného předka, ale nezahrnuje všechny jeho potomky, mluvíme jako o **parafyletické** (na obr. 3.17.a. např. taxony B a C). Skupina zahrnující taxony různého fylogenetického původu, tedy nesdílející nejbližšího společného předka (na obr. 3.17.a. např. taxony A a E) se nazývá **polyfyletická**. Taxony sdílející nejbližšího společného předka označujeme jako **sesterské** (na obr. 3.17.a. jsou jednoduchým příkladem sesterských taxonů A a B; hierarchicky vyššímu taxonu A + B + C je sesterský taxon D + E).

Postup větvení uzlů popisuje **topologie stromu**. Všechny větve je možné volně otáčet, aniž by se topologie stromu změnila (obr. 3.19).



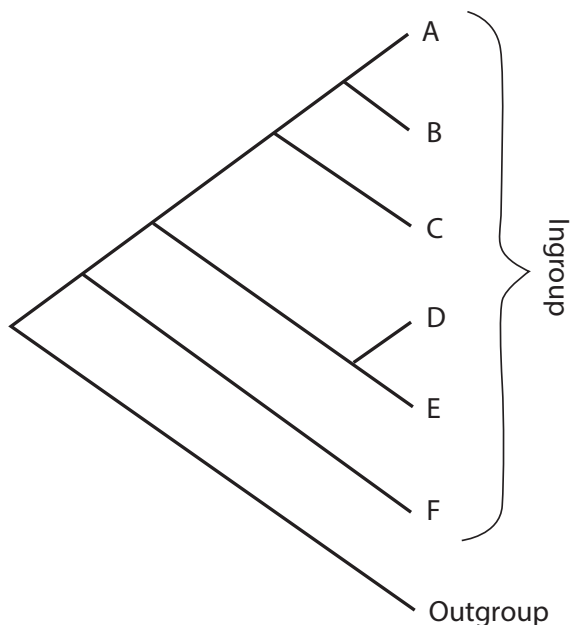
Obr. 3.19. Topologie fylogenetického stromu s kořenem. Všechny tři stromy mají identickou topologii, ačkoliv jsou některé z větví otočeny o 180° podél podélné osy.

Můžeme se setkat i s různými tvary fylogenetických stromů. Obr. 3.20. ukazuje několik možných tvarů stejné topologie, přičemž nejčastěji používaným grafickým znázorněním fylogenetických vztahů v současných vědeckých publikacích je první z uvedených.



Obr. 3.20. Různé způsoby grafického znázornění téže topologie.

Nezakořeněný fylogenetický strom (obr. 3.17.b.) znázorňuje pouze vzájemné vztahy mezi taxonomickými jednotkami bez specifikace jejich společného předka, neindikuje tedy směr evolučního procesu. V nezakořeněném stromu tedy žádný z uzlů nepředstavuje společného předka všech zahrnutých OTUs. Abychom mohli určit směr evoluce ve stromu, strom musí mít tzv. **kořen** reprezentující společného předka. Strom je možné „zakořenit“, pokud jeden nebo více taxonů zahrnutých v datovém souboru představuje tzv. **outgroup**, tedy taxon či taxony nejvíce vzdálené všem ostatním. Této operaci říkáme **outgroup rooting**. Zbytek taxonů pak tvoří tzv. **ingroup** (obr. 3.21.).



Obr. 3.21. Znázornění zakořeněného stromu za použití outgroupu.

Kořenový uzel je ten, který spojuje outgroup a ingroup a představuje hypotetického společného předka obou skupin. Vedle této metody existuje i jiný způsob, jak zakořenit strom, metoda tzv. **midpoint rootingu**. Tato metoda se používá v případě, že nemáme k dispozici outgroup (např. jsou-li všechny dostupné outgroupy příliš vzdálené a alignment s nimi by byl nejednoznačný). Za předpokladu, že evoluční rychlost podél různých linií v datovém souboru je podobná, kořen bude umístěn ve středu větve spojující dvě nejvzdálenější OTUs.

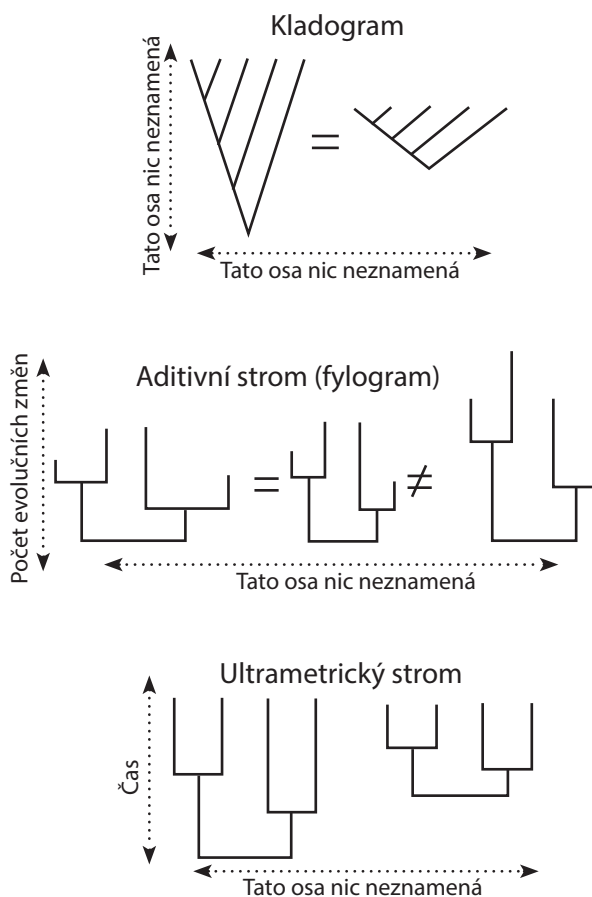
Výběr geneticky příliš vzdáleného outgroupu může vést k topologickým chybám ve výsledném stromu, protože jednotlivé pozice ve vybraném úseku DNA mohou být tzv. **saturovány** mnohonásobnými mutacemi (včetně mutací zpětných), takže předchozí informace v těchto pozicích může být překryta. Na druhou stranu není vhodné použít ani outgroup příliš blízký ingroupu. Nejlepší volbou je použití hned několika outgroupů. Jak bylo uvedeno výše, alternativním řešením je použití metody *midpoint rooting*, ale pouze za předpokladu, že všechny použité taxony mají alespoň přibližně stejnou evoluční (mutační) rychlost (Felsenstein, 2004).

V souvislosti s fylogenetickými stromy se můžeme setkat s několika dalšími termíny, pomocí kterých se různé typy stromů charakterizují (obr. 3.22.):

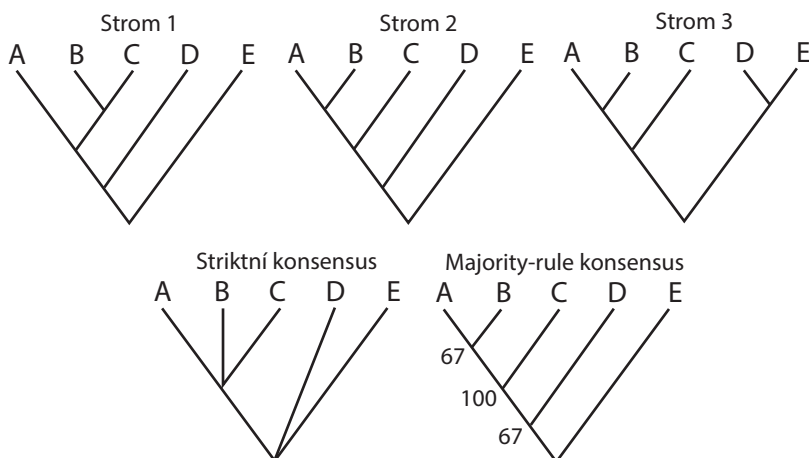
- **Dendrogram** – široký pojem používaný obecně pro diagramovou reprezentaci genealogických vztahů.
- **Kladogram** – fylogenetický strom vytvořený pomocí kladistických metod. Tento typ stromu znázorňuje pouze topologii (tedy postup větvení založený na principech odrážejících příbuznost taxonů), délky větví zde neodpovídají relativnímu počtu změn či časové přímce.
- **Aditivní strom** neboli **fylogram** – fylogenetický strom, kde délka větví proporčně odpovídá počtu změn či genetickým vzdálenostem. Délka větví tak ukazuje míru podobnosti, potažmo příbuznosti mezi příslušnými taxonomickými jednotkami.
- **Ultrametrický strom** – typ stromu, kde jsou všechny terminální uzly stejně vzdáleny (ekvidistantní) od kořene. Speciálním typem ultrametrického stromu je **chronogram** (*time tree*), který je vztažen k časové přímce. Délky větví zde proporčně odpovídají době vývoje taxonů od společného předka.

Dalším pojmem, který je třeba vysvětlit, je **konsensuální strom** (*consensus tree*). Konsensuální strom sumarizuje společnou informaci obsaženou ve dvou či více různých stromech získaných např. různými metodami. Existuje několik přístupů tvorby konsensuálního stromu, zde uvádíme pouze dva nejběžněji používané: **striktní** a **majority-rule** (obr. 3.23.).

Striktní konsensus ukazuje pouze ty uzly, které se vyskytují ve všech uvažovaných topologiích. V opačném případě budou ve výsledném konsensu považovány za nevyřešené (polytomie). U *majority-rule* konsensu je nutno stanovit minimální procento výskytu shodných větvení v použitých stromech (např. 50 %). Pokud se konkrétní větvení vyskytne ve více než 50 % všech uvažovaných stromů, bude považováno za vyřešené a ve výsledném konsensuálním stromu se objeví jako dichotomie. V opačném případě se toto větvení za vyřešené nepovažuje a ve výsledném stromu bude zobrazeno jako polytomie. Ve výsledném konsensu se pro každou dichotomii uvádí hodnota (např. v procentech), která odpovídá frekvenci jejího výskytu v souboru všech uvažovaných stromů.



Obr. 3.22. *Různé typy stromů.*

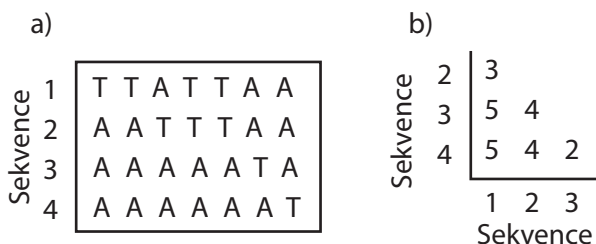


Obr. 3.23. *Rozdíl mezi striktním a majority-rule konsensem mezi stromy 1, 2 a 3.*

3.6.3. Metody rekonstrukce fylogeneze

Rekonstrukce fylogenetických vztahů není tak přímočará a jednoduchá, jak bychom občas rádi očekávali. Ačkoliv máme k dispozici spoustu různých metod, žádná z nich nezaručuje, že získaný strom je právě ten „správný“. Při výběru metody je třeba brát v úvahu povahu datového souboru, který chceme analyzovat a účel analýzy.

Způsoby rekonstrukce fylogenetických vztahů za použití molekulárních znaků mohou být rozděleny podle typu dat, se kterými pracují, na **distanční** a **diskrétní**. Distanční metody nejprve konvertují jednotlivé alignované sekvence do matice párových distancí podle jejich vzájemné podobnosti či rozdílnosti. Tato matice teprve slouží jako vstupní soubor pro příslušnou metodu konstrukce stromu. Tzv. diskrétní metody uvažují každou nukleotidovou pozici v alignmentu jako samostatný znak. Obr. 3.24. ukazuje alignment sekvencí DNA (a) a korespondující matici genetických (nekorigovaných) vzdáleností (b). Diskrétní metoda (např. metoda maximální parsimonie, o níž se dočtete níže) považuje každou pozici za samostatný znak, který může nabývat různých stavů (čtyři stavy v případě DNA – A, C, G a T, u nekódujících sekvencí je možné zahrnout jakožto pátý stav potenciální indel). Při konstrukci stromu pak program pracuje přímo s touto informací. (Page a Holmes, 1998; Nei a Kumar, 2000; Zima a kol., 2004). Na obr. 3.24. jsou v případě použití distančních metod párové rozdíly mezi sekvencemi převedeny do distanční matice, teprve ta slouží jako podklad pro konstrukci samotného stromu.



Obr. 3.24. Diskrétní data (a) a distanční data (b) z nich vypočtená.

Podle způsobu konstrukce stromů pak rozlišujeme **klastrovací** (neboli shlukové) **algoritmy**, které obvykle vedou k vytvoření jediného stromu, a metody **kritéria optimálnosti**, které využívají určitého definovaného kritéria, podle něhož pak porovnávají různé stromy a hledají mezi nimi ten optimální. Mezi klastrovací algoritmy patří např. metody **UPGMA** (*unweighted pair-group method using arithmetic averages* – nevážená párová metoda aritmetických průměrů) a **NJ** (*neighbour joining* – metoda připojení souseda). Metody kritéria optimálnosti zahrnují např. **maximální úspornost** (*maximum parsimony* = MP), **maximální věrohodnost** (*maximum likelihood* = ML), **bayesovskou analýzu** (*Bayesian analysis* = BAY), či metodu **minimální evoluce** (*minimum evolution* = ME). Přehled obecně užívaných metod a jejich rozdělení podle typů dat a metody konstrukce stromu je uveden na obr. 3.25.

		Typ dat	
		distance	znaky
Metoda konstrukce stromu	kastrovací algoritmus	UPGMA NJ	
	kritérium optimálnosti	ME	MP ML BAY

Obř. 3.25. Některé obecně používané fylogenetické metody rozdělené podle typu konstrukce stromu a typu použitých dat.

Jak bylo řečeno výše, metody pracující s diskretními znaky považují každou nukleotidovou pozici v alignmentu za samostatný znak a jednotlivé nukleotidy v určité pozici jsou považovány za různé stavy tohoto znaku. Sekvence DNA o délce 1 200 bp (párů bazí) tedy bude mít 1 200 znaků, kde každý může nabývat čtyř (v případě indelů pěti) stavů. Obvykle jsou jednotlivé znaky analyzovány nezávisle, takže každý sloupec v alignmentu je považován za nezávislou realizaci evolučního procesu.

Oproti tomu distanční metody začínají výpočtem nějakého měřítka genetické podobnosti či vzdálenosti mezi každým párem sekvencí. Na základě tohoto výpočtu program vytvoří matici genetických vzdáleností, která je následně použita pro konstrukci fylogenetického stromu. Tyto metody jsou vhodné pro rychlou analýzu zejména velkých datových souborů nebo pro rekonstrukce genealogických vztahů mezi blízkými příbuznými jedinci, případně jako výchozí krok (konstrukce výchozího stromu) pro metody kritéria optimálnosti. Metody založené na distančních maticích jsou schopné zohlednit některé charakteristiky sekvenčních dat za použití tzv. evolučních modelů, kterými se budeme zabývat později.

Distanční metody v podstatě pomíjejí možnost využití diskretních znaků, tedy nukleotidových pozic, a tím ztrácejí část informace potřebné k rekonstrukci charakterových stavů jednotlivých ancestrálních uzlů. Hlavní výhodou distančních metod je – jak již bylo uvedeno výše – časová nenáročnost potřebná k výpočtu výsledného stromu, což je užitečné při analýze zejména velkých datových souborů. Dále jsou vhodné pro rekonstrukce genealogických vztahů blízkých příbuzných OTUs (např. při vnitrodruhových analýzách).

Metody kritéria optimálnosti, jak již bylo zmíněno, vybírají ze sady všech možných stromů podle určitého skóre. Rekonstrukce fylogeneze těmito metodami sestává ze dvou kroků: (1) určení kritéria optimálnosti, tj. hodnoty, která je přiřazena stromům a je následně použita k jejich srovnání a (2) vytvoření specifických algoritmů pro výpočet tohoto skóre a pro určení stromu či souboru stromů, které mají nejlepší hodnoty skóre podle tohoto kritéria. Tak např. při hledání „nejlepší“ topologie mezi generovanými stromy za použití metody maximální pravděpodobnosti (*maximum likelihood* – ML) získáme ML skóre pro každý strom a jako optimální je vybrán ten, který má nejlepší likelihood skóre.

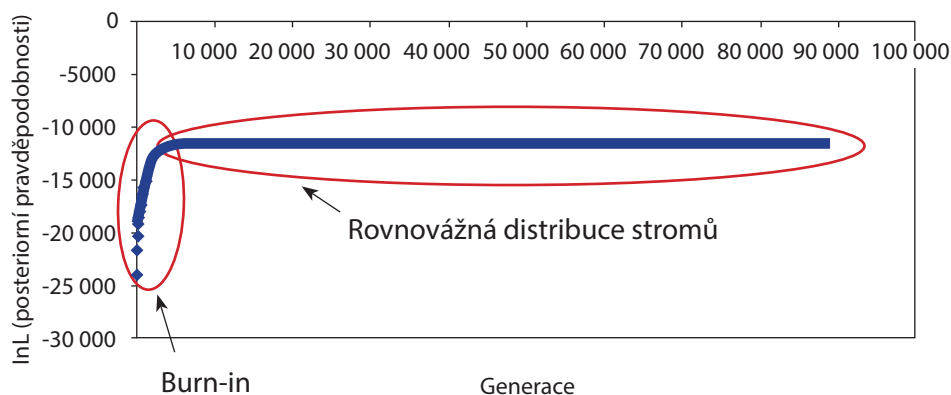
Vzhledem k tomu, že tyto metody porovnávají velké množství alternativních topologií, jsou velice náročné nejen z hlediska času potřebného k výpočtu, ale vyžadují i kvalitní a výkonný hardware a software.

Následujících několik odstavců velice stručně charakterizuje některé **nejznámější metody využívání při rekonstrukci fylogenetických vztahů**.

- **UPGMA** je zkratka pro *unweighted pair group method with arithmetic means*. Jedná se snad o nejstarší a z hlediska algoritmu nejjednodušší metodu používanou ke konstrukci dendrogramů z distančních dat. Patří do skupiny klastrovacích neboli shlukovacích analýz. OTUs jsou seskupovány do klastřů (shluků – *clusters*) na základě vyhledávání nejnižších hodnot v matici genetických vzdáleností. Nově vytvořený klastr nahrazuje v distanční matici původní korespondující OTUs a počítají se vzdálenosti mezi nově vytvořeným klastrem a ostatními OTUs v matici. Tento proces se opakuje do té doby, než jsou všechny OTUs zahrnuty do jednoho klastru. V metodě UPGMA je distance nově vytvořeného klastru průměrem distancí původních OTUs, které nahrazuje. Uvedený proces průměrování genetických distancí zahrnuje předpoklad stejné evoluční rychlosti podél všech větví, což je ve skutečnosti často porušeno. V případě, že se evoluční rychlosti podél větví liší, poskytuje metoda UPGMA často nesprávnou topologii. UPGMA se v dnešní době, kdy pro konstrukce stromů ze sekvenčních dat existují další, často spolehlivější metody, používá už jen např. k analýzám alozymových dat.
- **Metoda neighbor-joining (NJ)** je metodám klastrovací analýzy příbuzná, nepředpokládá však stejnou evoluční rychlost podél větví, délka větví ve finálním stromu tedy odpovídá relativním genetickým vzdálenostem mezi OTUs. Dalším rozdílem je, že neshlukuje nejbližší OTUs, ale v principu se snaží minimalizovat délku vnitřních větví a tím celkovou délku výsledného stromu. Konstrukce stromu začíná hvězdicovým stromem, propojujícím jediným uzlem všechny OTUs, tedy stromem bez vnitřních větví. V prvním kroku dosadí do stromu první vnitřní větve a spočítá délku výsledného stromu. Tuto operaci provede pro všechna možná spojení všech možných dvojic OTU. Ve finále bude vybrána ta vnitřní větev, která poskytne strom s nejkratší délkou všech větví. Tento proces spojování dvou OTUs (*neighbors*) s nejkratší možnou vnitřní větví se opakuje, dokud algoritmus nedosáhne finálního, plně rozlišeného stromu.
- Metoda **maximální úspornosti (parsimonie – maximum parsimony, MP)** vyhledává strom s nejmenším počtem evolučních změn (tedy v případě sekvencí DNA s nejmenším počtem nukleotidových substitucí) nutných k vysvětlení vstupního datového souboru (alignmentu sekvencí). MP patří do skupiny metod, jež uvažují vstupní alignment jakožto matici diskrétních znaků, které jsou představovány jednotlivými nukleotidovými pozicemi. Pro konkrétní topologii je pro každý znak spočteno nejmenší množství nutných evolučních změn podél větví, kterých je zapotřebí k vysvětlení pozorovaného stavu znaku na terminálním uzlu. Součet hodnot pro všechny znaky nám udává délku stromu, která je kritériem optimálnosti této metody. Jako nejlepší je vybrán strom (event. stromy) s minimálním výsledným skóre, tedy ten / ty nejkratší. V základní variantě tato metoda vyžaduje konstrukci všech možných fylogenetických stromů (za užití tzv. exaktních algoritmů) a jejich následné ohodnocení, což je pro větší počet taxonů proces časově nesmírně náročný (a pro opravdu velké soubory dat v rozumně přijatelném čase prakticky neproveditelný). Pro zefektivnění prohledávání prostoru stromů lze použít některou z tzv. heuristických metod, která je schopna prohledávání omezit pouze na „nadějně“ stromy. (Pozor na záměnu pojmů proces vyhledávání stromu a kritérium optimálnosti. Zatímco procesů k vyhledání nejlepšího stromu je více, kritérium optimálnosti, podle kterého je vybírán nejlepší strom z pomyslného prostoru, je neměnné.) Rozlišujeme několik různých typů MP, např. váženou a neváženou, Fitchovu, Wagnerovu, Dollovu či Camin-Sokalovu parsimonii. Jednotlivé typy parsimonií se liší předpoklady týkajícími se změn stavů znaků (např. uvažují možnost zpětných mutací, rozdílnou pravděpodobnost změn mezi různými nukleotidy) či hodnocením informativnosti jednotlivých znaků. Metoda MP je relativně snadno pochopitelná a výpočetně nenáročná. Nevýhodou této metody je

její citlivost na tzv. **long branch attraction**, což je fenomén některých fylogenetických analýz, kdy jsou rychleji vyvíjející se evoluční linie nesprávně interpretovány jako blízkce příbuzné bez ohledu na jejich skutečný evoluční vztah. V případě souboru sekvencí DNA může tato situace nastat tehdy, kdy se dvě (nebo více) sekvencí vyvíjejí výrazně rychleji než ostatní. Existují pouze čtyři typy nukleotidů a v případě vysoké mutační rychlosti se zvyšuje pravděpodobnost opakovaných substitucí v jenom místě a tedy toho, že dvě takto se vyvíjející sekvence budou mít v této pozici náhodně stejný nukleotid bez ohledu na počet mutací, ke kterým v daném evolučním čase v tomto místě došlo. V takovém případě může metoda MP tuto ve skutečnosti náhodnou shodu (homoplasii) interpretovat mylně jako společný odvozený znak (synapomorfii, homologii) a dvě tyto sekvence pak zařadí jako blízkce příbuzné.

- **Metoda maximální pravděpodobnosti** (*maximum likelihood*, ML) používá jako kritérium optimálnosti pravděpodobnost (označovanou písmenem *L* podle anglického *likelihood*), že platí hypotéza představovaná konkrétním fylogenetickým stromem pro data, která máme k dispozici. Za nejlepší je považována ta topologie, která data vysvětluje s nejvyšší pravděpodobností. Metoda ML vyžaduje celkem tři součásti: vedle (1) vstupních dat a (2) fylogenetického stromu s definovanou topologií a délkou větví navíc ještě (3) explicitní evoluční model, na jehož základě určuje pravděpodobnost jednotlivých evolučních změn. Stejně jak bylo popsáno u metody MP, je u ML k samotnému vyhledání nejlepší topologie nutno vybrat vhodný algoritmus. Předností metody ML je, že v případě správného použití je vůči výše popsanému problému *long-branch attraction* a jiným odchylkám od modelových předpokladů relativně imunní. Díky tomu jsou fylogenetické stromy získané touto metodou považovány za věrohodnější než stromy získané alternativními metodami. Nevýhodou ML je její vysoká výpočetní (a tedy i časová) náročnost a dlouhou dobu byla považována za metodu velmi pomalou a díky tomu v případě velkých datových souborů občas i nuceně opomíjenou. V relativně nedávné době však byl zveřejněn program GARLI (*Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference*) (Zwickl, 2006), který je v porovnání s jinými programy z časového hlediska relativně nenáročný.
- **Bayesovská analýza** je další metoda kritéria optimálnosti pracující s diskrétními znaky, od ML a MP se však koncepčně liší – na rozdíl od těchto metod není cílem Bayesovské analýzy vyhledání jednoho optimálního stromu. Tato metoda je blízkce příbuzná pravděpodobnostním metodám. Liší se tím, že pracuje s původní domněnkou (distribucí apriorních pravděpodobností určité hodnoty, tzv. *priors*, což je v případě fylogenetických analýz počáteční strom) a s aktualizovanými domněnkami, tzv. **posteriorními pravděpodobnostmi**. Princip Bayesovské metody spočívá ve výpočtu posteriorních pravděpodobností (tedy pravděpodobností vypočtených na základě určitých předpokladů a na základě toho, co jsme o charakteru studovaných dat zjistili). Tato metoda začíná náhodným či uživatelem specifikovaným stromem s určitou topologií, délkami větví a substitučními parametry, které společně definují počáteční stav. Modifikací délek větví a topologie je navržen nový stav, pro který je vypočítána nová pravděpodobnost. Je-li pravděpodobnost tohoto stromu vyšší než původní hodnota, je tento stav akceptován, v opačném případě zůstává stav původní a program propočítává nové modifikace. Posteriorní pravděpodobnosti jednotlivých stromů jsou z pomyslného prostoru získány náhodným výběrem vzorků za použití metody nazývané **Markov chain Monte Carlo (MCMC)**, která se při výběru řídí výše uvedeným kritériem. Tímto způsobem získáme soubor stromů definovaných posteriorními pravděpodobnostmi. Vzhledem k charakteru metody je v průběhu vyhledávání relativně rychle dosaženo rovnovážné distribuce hypotéz. Posteriorní pravděpodobnosti stromů obdržené v každém kroku (generaci) lze vynést do grafu (osa X představuje generace, osa Y odpovídající pravděpodobnosti, viz obr. 3.26.). Ty stromy, jejichž pravděpodobnosti jsou v oblasti před dosažením stabilní hladiny, vyřadíme z následující analýzy (*burn-in*). Ze zbývajících stromů sestavíme konsenzus, který je výsledným stromem Bayesovské analýzy.



Obr. 3.26. Změny posteriorních pravděpodobností stromů získaných v průběhu Bayesovské analýzy.

Nejběžněji užívaným programem analyzujícím data pomocí této metody pro účely rekonstrukce fylogeneze je MrBayes (Huelsenbeck a Ronquist, 2001), který nabízí možnost prohledávání prostoru stromů několika řetězci MCMC simultánně. Jednotlivé řetězce si navzájem předávají informace o prohledaném prostoru, což celý proces urychluje. Tento přístup se označuje jako **Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo, MCMCMC, MC³**. Bayesovský přístup se aktuálně těší velké přízni a mnoho studií zabývajících se fylogenetickými problémy používá k jejich řešení tento algoritmus.

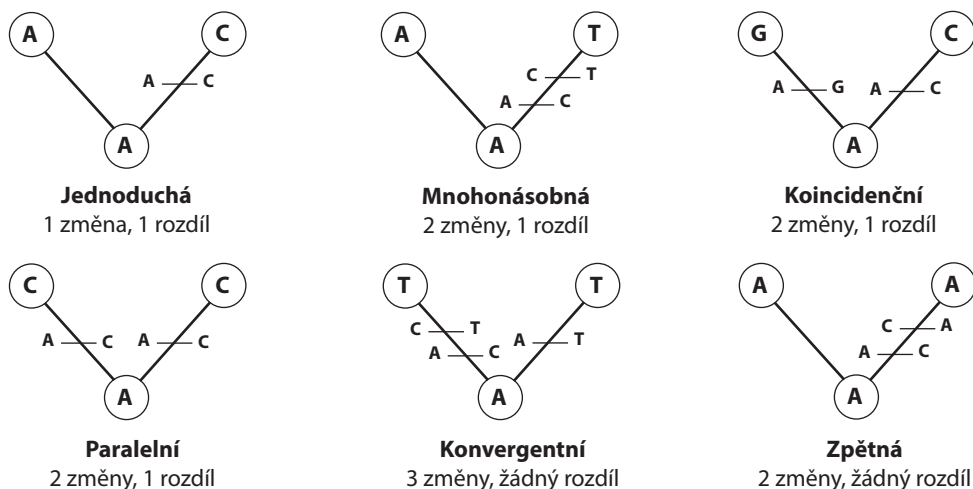
3.6.4. Substituční modely

V souvislosti s metodou maximální pravděpodobnosti a v odstavci uvádějícím distanční metody jsme se krátce zmínili o modelech evoluce sekvencí. Nejjednodušším způsobem vyjádření vztahu dvou sekvencí je jejich procentuální podobnost či rozdílnost, případně podíl (p) dvou odlišných nukleotidových sekvencí. Tuto hodnotu udává jednoduchý matematický vztah $p = n_d / n$, kde n je celkový počet nukleotidových pozic v sekvenci a n_d počet odlišnýchází. Tato jednoduchá lineární vzdálenost se nazývá **p-distance**.

V reálu však p-distance téměř nikdy neodpovídá skutečným evolučním změnám. Jsou-li kupříkladu dvě sekvence příliš vzdálené (divergentní), je velmi pravděpodobné, že v jedné nukleotidové pozici došlo k opakovaným substitucím, které maskují substituce předchozí. Díky těmto mnohonásobným mutacím jsou sekvence ve skutečnosti vzdálenější, než můžeme odvodit z aktuálního procentuálního rozdílu mezi nimi – dochází k podhodnocení skutečných genetických rozdílů.

Alignment sekvencí nám ukazuje pouze aktuální stav, tedy shody či rozdíly mezi sekvencemi, nikoliv však evoluční změny (mutace), které se udály mezi příbuznými sekvencemi po odštěpení od společného předka. Obr. 3.27. ukazuje různé typy evolučních změn, které se mohou skrývat za pozorovaným aktuálním stavem – shodou či rozdílem v konkrétních nukleotidových pozicích dvou homologních sekvencí. Tři příklady v horní řadě mají v dané posici odvozených sekvencí různé nukleotidy. V prvním případě bylo této změny dosaženo jediným mutačním krokem (jednou transverzí z adeninu na cytosin). V druhém a třetím příkladu došlo ke dvěma mutačním krokům. Spodní řada demonstruje, že pozorovaná absence rozdílu v konkrétní pozici dvou sekvencí nemusí nutně znamenat, že v průběhu evoluce nedošlo k žádným mutacím. Tyto skryté změny nám může pomoci zohlednit použití evolučního modelu.

Různé evoluční modely mohou brát v potaz např. různou frekvenci rozdílných typů nukleotidových změn, frekvenci nukleotidů, či odlišnou substituční rychlost v různých pozicích alignmentu.



Obr. 3.27. Různé typy evolučních změn, které se mohou skrývat za pozorovaným aktuálním stavem (dole výchozí – ancestrální stav, nahoře homologické nukleotidy potomstva).

3.6.5. Testování spolehlivosti stromů

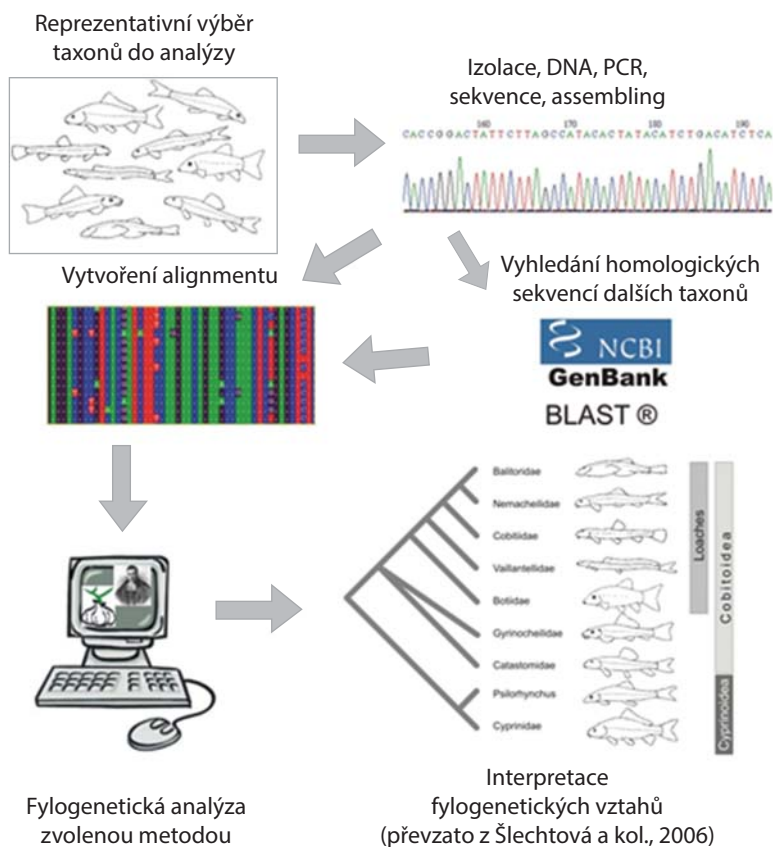
Použitím vybrané metody rekonstrukce genealogických vztahů získáme fylogenetický strom. Vzhledem k tomu, že strom bude výstupem vždy, bez ohledu na to, zda odráží skutečné evoluční vztahy, je třeba ověřit, jak dalece se můžeme spolehnout na jeho správnost. Jinými slovy je třeba získat statistické odhady spolehlivosti jednotlivých dichotomických větvení.

Nejčastěji používaným statistickým testem jsou neparametrické metody opakovaného výběru, kam patří metody **bootstrap** a historicky starší **jackknife** (Graur a Li, 2000; Felsenstein, 2004). V principu obě metody postupují tak, že z původního datového souboru opakovaně generují náhodné pseudovzorky. Z každého nově vytvořeného souboru (pseudovzorku) je zkonstruován strom, takže ve výsledku získáme množství stromů korespondující počtu opakování neboli replikací (např. tisíce replikacemi tedy získáme tisíce stromů). Z této sady stromů se vytvoří jeden konsenzuální strom, ve kterém hodnoty procentuálního zastoupení jednotlivých větvení slouží jako měřítko jejich spolehlivosti. Obě výše uvedené metody se liší způsobem opakovaného výběru. Jackknife opakovaně generuje pseudovzorky původního souboru dat tak, že buď náhodně odstraňuje část všech znaků (dejme tomu část nukleotidových pozic z celého původního alignmentu) nebo část taxonů. Oproti tomu metoda bootstrapu vytváří pseudovzorky velikostí shodné s původním alignmentem náhodným přeházením pořadí znaků (sloupců v alignmentu).

3.6.6. Rekonstrukce fylogenetických vztahů v praxi

Teorie metod a postupů rekonstrukce fylogeneze je nesmírně obsáhlé a komplexní téma, které přesahuje rámec této kapitoly. V následující kapitole proto jen stručně nastíníme postup a zájemce, kteří by popsání metody chtěli prakticky používat nebo mají zájem o hlubší poznání problematiky, odkazujeme na příslušnou odbornou literaturu.

V kostce, jaká je tedy vlastně cesta od definovaného problému k výslednému stromu? Schéma na obr. 3.28. stručně ilustruje jednotlivé kroky vedoucí od výzkumného záměru ke kýženému výsledku.



Obr. 3.28. Zjednodušené schéma postupu při rekonstrukci fylogeneze.

Výběr reprezentativních taxonů a vhodných markerů pro analýzu je nutno přizpůsobit našemu vědeckému záměru. Je důležité vzít v úvahu několik aspektů, např. hodláme se zabývat analýzou vnitrodruhových vztahů nebo je naším cílem rekonstrukce fylogeneze na úrovni druhů či dokonce vyšších taxonů? V souvislosti s tím je třeba věnovat pozornost i výběru vhodného markeru: je lepší použít některý z úseků mtDNA nebo bude vhodnější některá oblast jaderné DNA? Potřebujeme spíše variabilnější nebo konzervativnější úsek? Jsou pro námi vybranou oblast DNA k dispozici již publikované primery? Lze ve veřejných databázích sekvencí vyhledat odpovídající sekvence taxonů, které by nám mohly posloužit jako srovnávací či doplňující materiál pro naše analýzy? Je to v našem případě nutné?

Po přípravě našeho projektu se můžeme pustit do laboratorních procedur, které nám poskytnou potřebná data – sekvence. Soubor našich sekvencí můžeme případně doplnit o data získaná z některé veřejně přístupné databáze (např. NCBI GenBank, EMBL-Bank apod.). Pro další postupy je třeba ze získaných dat vytvořit vstupní soubor ve formě věrohodného alignmentu (přičemž formát tohoto souboru musí vyhovovat příslušnému programu, který pro analýzu budeme používat). Dále potřebujeme vybrat vhodnou metodu na fylogenetické zpracování alignmentu, tj. metodu, která z našeho alignmentu provede extrakci fylogenetického signálu a díky níž obdržíme fylogenetický strom, eventuálně stromy. Poté následuje to hlavní a podstatné – interpretace fylogenetických vztahů.

Interpretace fylogenetických stromů

Poté, co jsme se „prokousali“ celým procesem od získání sekvence až ke kýženému výsledku v podobě dejme tomu fylogenetického stromu, čelíme důležitému úkolu, kterým je jeho interpretace. Jaké informace lze vyčíst z fylogenetického stromu a které jsou ty nejdůležitější? V první řadě nás bude nejspíše zajímat topologie stromu a délky jednotlivých větví, jak věrohodné je jeho větvení a kde je kořen stromu. Abychom mohli popsat topologii stromu, je třeba znát termíny, které byly vysvětleny v části pojednávající o fylogenetických stromech (monofyletický, polyfyletický a parafyletický taxon, dichotomie, sesterské taxony aj.). Aspektem, který je nutné při interpretaci výsledku fylogenetické analýzy brát v úvahu, je statistická podpora jednotlivých větvení neboli uzlů, nejčastěji uváděná jako procentuální zastoupení konkrétního uzlu v souboru všech stromů generovaných např. metodou bootstrappingu. Vnitřní uzly s nízkou statistickou podporou či uzly, které nejsou statisticky podpořené, nebereme v úvahu a vztahy mezi relevantními taxony považujeme za nevyřešené. Vědecké závěry by měly být postaveny pouze na základě statisticky dobře podpořené fylogenie.

3.6.7. Databáze nukleotidových sekvencí

Rozvoj technik sekvenování vyústil v založení velkého množství nezávislých databází nukleových kyselin a proteinů, z nichž jedna z nejvýznamnějších a nejvíce využívaných je databáze GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) založená v roce 1982 při Národním centru pro biotechnologické informace („National Center for Biotechnology Information“, NCBI) zřízeném v rámci Národní lékařské knihovny (NLM) v USA. Databáze je veřejně přístupná a v současnosti obsahuje více než 135 milionů záznamů nukleotidových sekvencí nejrozličnějších organismů. Je možné v ní vyhledávat podle organismu, podle názvu úseku DNA, názvu kódovaného proteinu, podle klíčových slov a mnoha dalších parametrů. Vyhledané sekvence je pak možné použít jako srovnávací pro usnadnění práce s našimi sekvencemi, případně lze vyhledat příslušnou sekvenci pro taxon, který chceme použít jako *outgroup*.

Součástí této databáze jsou nástroje pro prohledávání sekvencí. Ty je možné najít jako balíček tzv. prohledávačů BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*) na internetové stránce <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>. BLAST umožňuje porovnávat dotazovanou sekvenci s knihovnou nebo databází sekvencí podle zadaných kritérií a prohledávat oblasti homologie mezi dvěma sekvencemi. Programem je možno porovnat sekvence nukleotidů v DNA (eventuelně RNA či posloupnost aminokyselin v proteinech) a vypočítat statistickou významnost shody.

Databáze GenBank je jednou z databází zahrnutých do projektu *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*, která zahrnuje ještě *DNA DataBank of Japan* (DDBJ) a *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL). Tyto databáze jsou denně synchronizovány, takže obsahují nejnovější záznamy.

Kromě výše uvedených existují další univerzální internetové databáze jako RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) nebo specializované databáze jako *Zebrafish Project* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_erio/).

Na dalším obrázku (obr. 3.29.) je ukázka zápisu v databázi GenBank, jak je možné ji získat pomocí vyhledávání.

```

Phoxinus eos mitochondrial D-loop, partial sequence
GenBank: U34408.1
FASTA Graphics
Go to:
LOCUS       U34408                  180 bp    DNA        linear    VRT 05-FEB-1998
DEFINITION   Phoxinus eos mitochondrial D-loop, partial sequence.
ACCESSION    U34408
VERSION      U34408.1   GI:2706881
KEYWORDS     .
SOURCE       mitochondrion Phoxinus eos (northern redbelly dace)
  ORGANISM   Phoxinus eos
              Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
              Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Ostariophysi;
              Cypriniformes; Cyprinidae; Phoxinus.
REFERENCE    1 (bases 1 to 180)
  AUTHORS    Toline, C.A. and Baker, A.J.
  TITLE      Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the
              northern redbelly dace (Phoxinus eos)
  JOURNAL    Mol. Ecol. 4 (6), 745-753 (1995)
  PUBMED     8564012
REFERENCE    2 (bases 1 to 180)
  AUTHORS    Toline, C.A. and Baker, A.J.
  TITLE      Direct Submission
  JOURNAL    Submitted (21-AUG-1995) Department of Zoology, University of
              Toronto and Center for Aquatic Ecology, Illinois Natural History
              Survey, 607 E. Peabody Drive, Champaign, IL, 61820 USA and
              Department of Ornithology, Royal Ontario Museum, Ontario, Canada
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..180
                       /organism="Phoxinus eos"
                       /organelle="mitochondrion"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /db_xref="taxon:42663"
                       /note="This segment of the control region, located at the
                       3' end of the L strand was amplified with a primer located
                       inside the tRNA (phe) gene"
     D-loop            <1..>180
ORIGIN
  1 atatatatat aaggttcggt gaggaagag tgaatatgtt atgcacttga tagagtaata
  61 tgtaattctt aaggtatgtc atttaataat gaacctaat taatccatgc aaggaagtgc
  121 accctcttga tatattaatt gtgtttacac tctgaaatgc aagatgaatg gcaacaaaaa
//

```

Obr. 3.29. Příklad záznamu sekvencí z databáze GenBank. Záznam uvádí taxon (v tomto případě se jedná o střevli druhu *Phoxinus eos*), o jak dlouhý úsek které sekvence se jedná (180 bp oblasti D-loop mitochondriální sekvence), publikační zdroj sekvence a další informace.

3.6.8. DNA barcoding

V relativně nedávné době se vedle rekonstrukcí genealogie objevila další metoda využití DNA sekvencí, tzv. *DNA barcoding* („čárový kód“ DNA). Jedná se taxonomickou metodu, která je založená na určování druhů pomocí krátkých úseků DNA. Na rozdíl od molekulární fylogenetiky, jejímž hlavním cílem je poskytnout podklady pro klasifikaci živých organismů, je účelem této metody identifikovat pomocí sekvence DNA neznámý vzorek. Jako čárový kód se v tomto smyslu považuje takový úsek DNA, v jehož sekvenci se druhy zkoumaného taxonu od sebe liší co nejvíce a jedinci druhu mezi sebou naopak co nejméně. Ukázalo se, že pro živočichy je nejvhodnějším úsekem asi 650 bp dlouhý úsek mitochondriálního genu – podjednotky I cytochrom oxidasy c (COI). V praxi se tato metoda využívá k určení těžko identifikovatelných druhů, např. máme-li k dispozici pouze část materiálu, k identifikaci larev, obsahu žaludku či fekálií, nebo k identifikaci fosilií. Čárový kód DNA se využívá také k identifikaci kryptických druhů (tj. druhů obtížně rozlišitelných na základě morfologie) či odhadu druhové diverzity na určitém území. Použití čárového kódu DNA dokonce už hrálo roli i v záchraně lidských životů. Dva lidé se v Chicagu přiotrávili rybí konzervou. Otázkou bylo, zda byla konzerva zkažená či neobsahovala maso některého z jedovatých druhů ryb. Vzhledem k tomu, že identifikace ryby podle masa je velmi obtížná, mohl řeše-

ní nabídnout právě „čárový kód“. Sekvence COI získaná z konzervy byla srovnána s rozsáhlou databází rybích COI a zjistilo se, že ve skutečnosti šlo o velmi jedovatou rybu fugu. Produkt byl okamžitě stažen z trhu, a tím se předešlo dalším otravám (Tautz a kol., 2003; Čepička, 2008; Cohen a kol., 2009).

V poslední době se objevují snahy o nalezení dalších úseků DNA, které by byly rovněž použitelné pro *barcoding* analýzu organismů – pro obratlovce se např. zkouší úseky mitochondriálních genů pro 12S-rRNA / 16S-rRNA nebo COX1- úsek genu pro cyklooxygenázu.

3.6.9. Software nejčastěji používaný pro řešení fylogenetických problémů

Snad nejobsáhlejší, přehledně tříděný seznam fylogenetických programů (včetně jejich stručného popisu) je možné najít na stránkách **Joe Felsenstein Laboratory** (<http://evolution.genetics.washington.edu/philip/software.html>) – viz obr. 3.30. Programy jsou zde tříděny (a je možné je vyhledávat) podle použité metody, podle určitého typu dat nebo podle počítačového systému.



Obr. 3.30. Úvodní obrázek webových stránek „Joe Felsenstein's list of phylogeny programs“.

Existuje i mnoho dalších stránek – jak s přehledem nejrůznějších programů pro použití ve fylogenetických výpočtech, tak i stránek programů specializovaných.

Příklady přehledových stránek:

<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/software.html> (Rod Page Laboratory)

<http://en.bio-soft.net/tree.html>

<http://www.ucmp.berkeley.edu/subway/phylo/phylosoft.html>

<http://bioweb2.pasteur.fr/phylogeny/intro-en.html>

<http://www.math.canterbury.ac.nz/bio/pages/PhyloFiles/software.html>

a mnoho dalších.

V následujícím přehledu jsou uvedeny a stručně popsány některé z nejdůležitějších a nejběžněji používaných programů pro rekonstrukce fylogeneze. Některé z nich mají široké spektrum využití, jiné jsou zaměřeny na specifický problém či konkrétní metodu. Některé programy jsou schopné pracovat s různými formáty a různými typy vstupních dat (soubor sekvencí, alignment sekvencí, matice vzdáleností), jiné vyžadují formát specifický. Některé z programů rovněž umožňují exportovat data nebo výsledky ve formátech použitelných v dalších programech. Pro konkrétní požadavky každého programu – např. co se týká typu příp. formátu vstupních dat – je samozřejmě třeba nastudovat manuál.

Program	Autoři	Internetová stránka	Popis
	D.L. Swofford ¹⁾	http://paup.csit.fsu.edu/	Tento software je použitelný pro širokou oblast metod, zahrnuje MP, distanční metody, ML a různé statistické testy a ukazatele. Placený
	J. Felsenstein ²⁾	http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html	Programový balík zahrnující např. MP, ML, distanční metody atd. (pro DNA i proteiny). Freeware
	S. Kumar, K. Tamura, M. Nei, I. Jakobsen ³⁾	http://www.megasoftware.net/	MP, distanční metody, ML, statistické testy, editace dat, editace stromů a další. Freeware
	T. Hall ⁴⁾	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html	Editor sekvencí s mnoha molekulárně-biologickými funkcemi: alignment, BLAST vyhledávání, vyhledávání restrikčních míst aj. Freeware
	J.D. Thompson ⁵⁾	http://mac.softpedia.com/get/Math-Scientific/ClustalX.shtml	Alignment sekvencí (na rozdíl od verze Clustal W disponuje pro uživatele komfortním rozhraním). Freeware
	J. Huelsenbeck ⁶⁾	http://mrbayes.sourceforge.net/	Konstrukce stromů na základě Bayesovské analýzy. Freeware
	D. Zwickl ⁷⁾	http://code.google.com/p/garli/	ML (velmi rychlý algoritmus). Freeware
	R.D.M. Page ⁸⁾	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html	Program pro grafické znázornění fylogenetických stromů a manipulaci s nimi. Freeware
	F. Chevenet a kol. ⁹⁾	http://www.treedyn.org/	Dynamický program pro grafické znázornění a anotaci fylogenetických stromů. Freeware
	M. Clement, D. Posada, K. Crandall ¹⁰⁾	http://darwin.uvigo.es/software/tcs.html	Rekonstrukce genealogických vztahů formou minimum spanning tree a haplotypových sítí. Freeware
	A. Röhl, P. Forster, H.-J. Bandelt ¹¹⁾	http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm	Program pro konstrukci haplotypových sítí. Vhodné zejména pro vnitrodruhová data. Freeware
	D. Posada ¹²⁾	http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html http://darwin.uvigo.es/software/software.html	Program testující statistické modely evoluce sekvencí DNA. Je třeba spolupráce s programem PAUP. Freeware
	L. Excoffier, S. Schneider, D. Roessli ¹³⁾	http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/	Všestranný program pro analýzu populačně genetických dat. Freeware

¹⁾ Swofford (2003), ²⁾ Felsenstein (1989), ³⁾ Tamura a kol. (2007), ⁴⁾ Hall (1999), ⁵⁾ Thompson a kol. (1997), ⁶⁾ Huelsenbeck a Ronquist (2001),

⁷⁾ Zwickl (2006), ⁸⁾ Page (1996), ⁹⁾ Chevenet a kol. (2006), ¹⁰⁾ Clement a kol. (2000), ¹¹⁾ <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>,

¹²⁾ Posada a Crandall (1998), ¹³⁾ Excoffier a Schneider (2005)

Závěr

Na závěr je třeba zdůraznit, že tato kapitola je pouze stručným úvodem do problematiky rekonstrukce genealogických vztahů mezi taxony a pro to, aby byl člověk schopen nastíněné metody skutečně zodpovědně používat a získané výsledky správně interpretovat, je třeba hodně praxe a dalšího studia. V následujícím přehledu je uvedena literatura vhodná pro rozšíření obzoru v této oblasti, která byla zároveň použita jako zdroj informací pro sepsání této kapitoly.

LITERATURA

- Andrews, A.T., 1986. *Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications*. Clarendon Press, Oxford, UK, 455 pp.
- Awise, J.C., 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA, 684 pp.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 1996–2002. GENETIX 4.04, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W.F., 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* 21: 550–570.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1660.
- Cohen, N., Deeds, J.R., Wong, E.S., Hanner, R.H., Yancy, H.F., White, K.D., Thompson, T.M., Wahl, M., Pham, T.D., Guichard, F.M., Huh, I., Austin, C., Dizikes, G., Gerber, S.I., 2009. Public Health Response to Puffer Fish (Tetrodotoxin) Poisoning from Mislabeled Product. *Journal of Food Protection* 72: 810–817.
- Čepička, I., 2008. Spasí taxonomii využití „čárového kódu“ DNA? *Vesmír* 87: 294.
- Excoffier, L.G.L., Schneider, S., 2005. Aha!rlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–50.
- Felsenstein, J., 1989. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164–166.
- Felsenstein, J., 2004. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA, 664 pp.
- Graur, D., Li, W.-H., 2000. *Fundamentals of molecular evolution*. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA, 481 pp.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Harris, H., Hopkinson, D.A., 1976. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North-Holland Publication Co., Amsterdam, Holland, 600 pp.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Hunter, R.L., Markert, C.L., 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125: 1294–1295.
- Chenuil, A., 2006. Chossing the rigth molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica* 127: 101–120.
- Chevenet, F., Brun, C., Banuls, A.L., Jacq, B., Christen, R., 2006. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7: 439.
- Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H., Brow, M.A.D., 1988. DNA sequencing with thermus-aquaticus DNA-polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85: 9436–9440.
- Kaltschmidt, E., 1971. Ribozomal proteins. XIV. Isoelectric points of ribozomal proteins of *E. coli* as determined by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 43: 25–31.
- Kirpichnikov, V.S., 1992. Adaptative nature of intrapopulation biochemical polymorphism in fish. *Journal of Fish Biology* 40: 1–16.
- Kottelat, M., Freyhof, J., 2007. *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, Cornol, Switzerland, 646 pp.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

- Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.-M., 2009. The phylogenetic handbook. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 723 pp.
- Liu, K., Muse, V., 2005. PowerMarker: Integrated Analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21 (9): 2128–2129.
- Markert, C.L., Møller, F., 1959. Multiple Forms of Enzymes: Tissue, Ontogenetic, and Species Specific Patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 45: 753–763.
- Majtánová, Z., Choleva, L., Symonová, R., Ráb, P., 2012. Molecular cytogenetic identification of parental genomes in triploid hybrid spined loaches (*Cobitis*, Cypriniformes). In: Book of Abstracts, 20th ICACGM, 25–28 April 2012, Cordoba, Spain, p. 141.
- Maxam, A.M., Gilbert, W., 1977. New method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74: 560–564.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro – the polymerase chain-reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263–273. Part 1.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain-reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335–350.
- Murphy, R.W., Sites, J.W., Buth, D.G., Jr., Haufler, C.H., 1996. Proteins: Isozyme electrophoresis. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds), *Molecular Systematics*, 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, UK, pp. 51–120.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106: 283–292.
- Nei, M., Kumar, M., 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford, UK, 352 pp.
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J., 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* 302 (1): 205–17.
- Page, R.D.M., 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357–358.
- Page, R.D.M., Holmes, E., 1998. *Molecular evolution. A phylogenetic approach*. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, 352 pp.
- Park, L.K., Moran, P., 1994. Developments in molecular techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4: 272–299.
- Petrtyl, M., Kalous, L., Šlechtá, V., 2007. Differentiation of breeds and lineages of common carp (*Cyprinus carpio*) with usage of geometric morphometry. In: Book of Abstracts, European Congress of Ichthyology, ECI XII, Cavtat, Croatia, 9–13 September, p. 9.
- Phillips, R.B., 2007. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to genome mapping. In: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G. (Eds), *Fish Cytogenetics*. Science Publisher, Inc., Enfield, New Hampshire, USA, pp. 455–471.
- Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G., 2007. *Fish Cytogenetics*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, 518 pp.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Ráb, P., Rábová, M., Reed, K.M., Phillips, R.B., 1999. Chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the primitive semionotiform fish, longnose gar *Lepisosteus osseus*. *Chromosome Research* 7 (6): 475–480.
- Ráb, P., Bohlen, J., Rábová, M., Flajšhans, M., Kalous, L., 2007. Cytogenetics as a tool in fish conservation: the present situation in Europe. In: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G., (Eds), *Fish Cytogenetics*. Science Publisher, Inc., Enfield, New Hampshire, USA, pp. 215–241.
- Rábová, M., Volker, M., Pelikánová, Š., Ráb, P., (v tisku). Sequential chromosome bandings in fishes. In: Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Almeida Foresti, L., Pisano, E., Kapoor, B.G. (Eds), *Techniques of Fish Cytogenetics*. Science Publisher, Inc., Enfield, New Hampshire, USA.

- Richardson, B.J., Baverstock, B.R., Adams, M., 1986. Allozyme electrophoresis. A Handbook for Animal Systematics nad Population Studies. Academic Press, Sydney, Australia, 410 pp.
- Rogers, J.S., 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics*, Univ. Texas Publ. 7213: 145–153.
- Rothe, G.M., 1994. Electrophoresis of Enzymes: Laboratory Methods (Springer Lab Manuals). Springer, Berlin, Germany, 307 pp.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 74: 5463–5467.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L., 2000. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Shapiro, A.L., Viñuela, E., Maizel, J.V., Jr., 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 28: 815–820.
- Smithies, O., 1955. Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochemical Journal* 61: 629–641.
- Sunnucks, P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. *About Trends in Ecology & Evolution* 15: 199–203.
- Swofford, D.L., Selander, R.B., 1981. BIOSYS-1: A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in populatiron genetics and systematics. *Journal of Heredity* 72: 281–283.
- Swofford, D.L., Selander, R.B., 1997. Biosys-2. A computer program for the analysis of allelic variation in genetics. University of Illinois, Urbana, Illinois, USA.
- Swofford, D.L., 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Symonová, R., Majtánová, Z., Sember, A., Staaks, G.B.O., Bohlen, J., Freyhof, J., Rábová, M., Ráb, P., 2013. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evolutionary Biology* 13: 42, doi:10.1186/1471-2148-13-42
- Šlechtová, V., Bohlen, J., Freyhof, J., Ráb, P., 2006. Molecular phylogeny of the Southeast Asian freshwater fish family Botiidae (Teleostei: Cobitoidea) and the origin of polyploidy in their evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 529–541.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599.
- Tautz, T., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R.H., Vogler, A.P., 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 70–74.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876–4882.
- Tiselius, A., 1930. Study of the electrophoresis of proteins by the moving boundary method. *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis* IV, 7 (4): 1–107.
- Wiley, E.O., 1981. Phylogenetics: the theory and practice of phylogenetic systematics. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Xia, X., 2000. Data analysis in molecular biology and evolution. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts, USA, 277 pp.
- Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P., Piálek, J., 2004. Genetické metody v zoologii. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Karolinum, Praha, 240 s.
- Zwickl, D.J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin, USA, 125 pp.

GENETIKA KVALITATIVNÍCH ZNAKŮ U RYB

M. Flajšhans, M. Havelka

GENETIKA KVALITATIVNÍCH ZNAKŮ U RYB

M. Flajšhans, M. Havělka

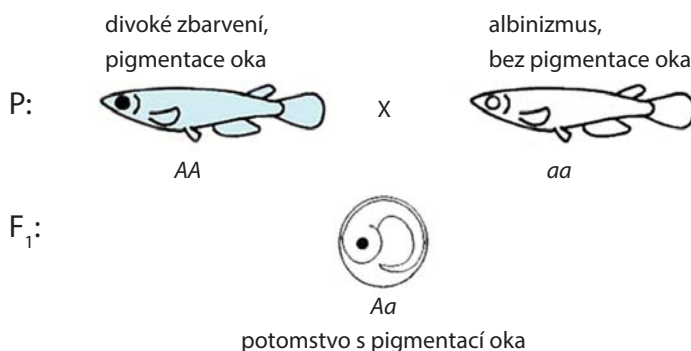
Kvalitativní znaky organismů obecně kóduje jeden nebo několik málo definovaných genů velkého účinku. Tyto geny jsou nazývány **monogeny** (jeden pár alel na jednom lokusu určuje jeden znak) či **oligogeny** (2 a více párů alel, zpravidla ne více než 4, umístěných na dvou a více lokusech, určují jeden znak). Jejich fenotypový projev je obvykle alternativní (znak se buď projeví, nebo neprojeví). U ryb se mezi kvalitativní znaky zahrnuje například zbarvení těla nebo oka, barevné znaky na trupu, hlavě nebo ploutvích, ošupení, tvar ploutví apod. Vliv prostředí na expresi genů velkého účinku je obvykle nevýznamný nebo málo významný.

- Pokud je jeden znak kódován jedním nebo více geny, geny leží na nepohlavních chromozomech (autozomech) a každý gen leží na jiném chromozomu, hovoříme o klasickém mendelistickém pojetí dědičnosti.
- Pokud geny leží na pohlavních chromozomech, jedná se o dědičnost vázanou na pohlaví.
- Pokud je jeden znak kódován více geny, které se ve svých projevech ovlivňují, hovoříme o genových interakcích.
- Pokud sledujeme více než jeden gen a tyto geny leží na stejném chromozomu, jedná se o vazbu vloh.

4.1. Autozomální dědičnost kvalitativních znaků

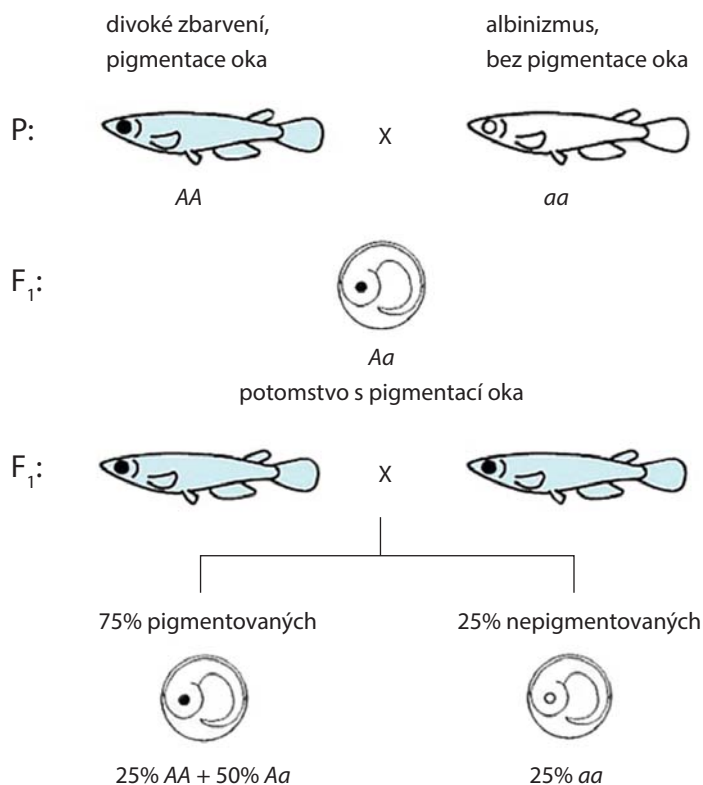
U diploidního potomka sestává alelický pár z jedné alely matky a jedné alely otce. Přenos těchto alel na potomka podléhá Mendelovým zákonům.

- První Mendelův zákon hovoří o **uniformitě F_1 hybridů**. Při vzájemném křížení dvou homozygotů vznikají potomci jednotného genotypu i fenotypu. Obr. 4.1. ukazuje křížení dvou homozygotů halančíka rýžovištního, *Oryzias latipes* (divoce zbarveného s pigmentací oka AA s albinem s nepigmentovaným okem aa), kdy vzniká divoce zbarvený heterozygot s pigmentovaným okem (Aa), pokud je mezi alelami vztah úplné dominance a recesivity (alela A je dominantní, alela a recesivní).



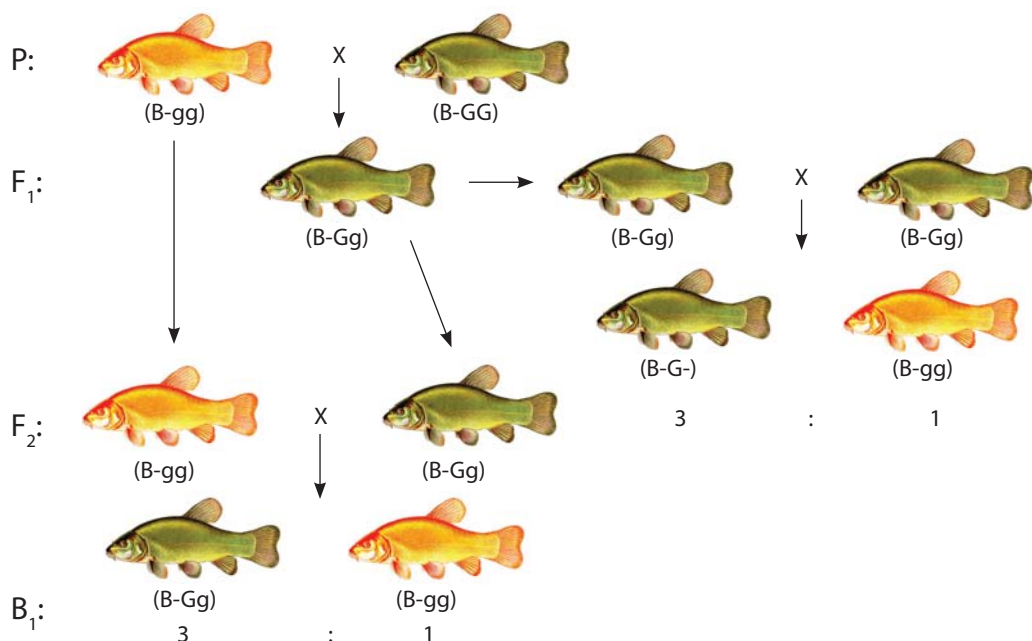
Obr. 4.1. Monohybridizmus s dominancí u halančíka rýžovištního (medaky). Upraveno podle Tave (1986). P, rodičovská generace; F_1 , 1. filialní generace.

- Druhý Mendelův zákon hovoří o **náhodné segregaci genů do gamet**. Zůstaneme u předchozího příkladu halančíka. Křížením divoce zbarvených F_1 heterozygotů s pigmentovaným okem (Aa) může být potomstvu předána dominantní alela (A) nebo recesivní alela (a) se stejnou pravděpodobností (obr. 4.2.). Dochází k segregaci (štěpení) genotypů v potomstvu (25 % dominantní homozygot AA , 50 % heterozygot Aa , 25 % recesivní homozygot aa ; genotypový štěpný poměr je 1 : 2 : 1), což se navenek projeví i vyštěpením dvou různých fenotypů (divoce zbarvený s pigmentovaným okem u dominantních homozygotů a heterozygotů, albinotický bez pigmentace oka u recesivních homozygotů, fenotypový štěpný poměr je 3 : 1).



Obr. 4.2. Monohybridizmus s dominancí u halančíka rýžovištního (medaky). Křížení F_1 generace. Upraveno podle Tave (1986).

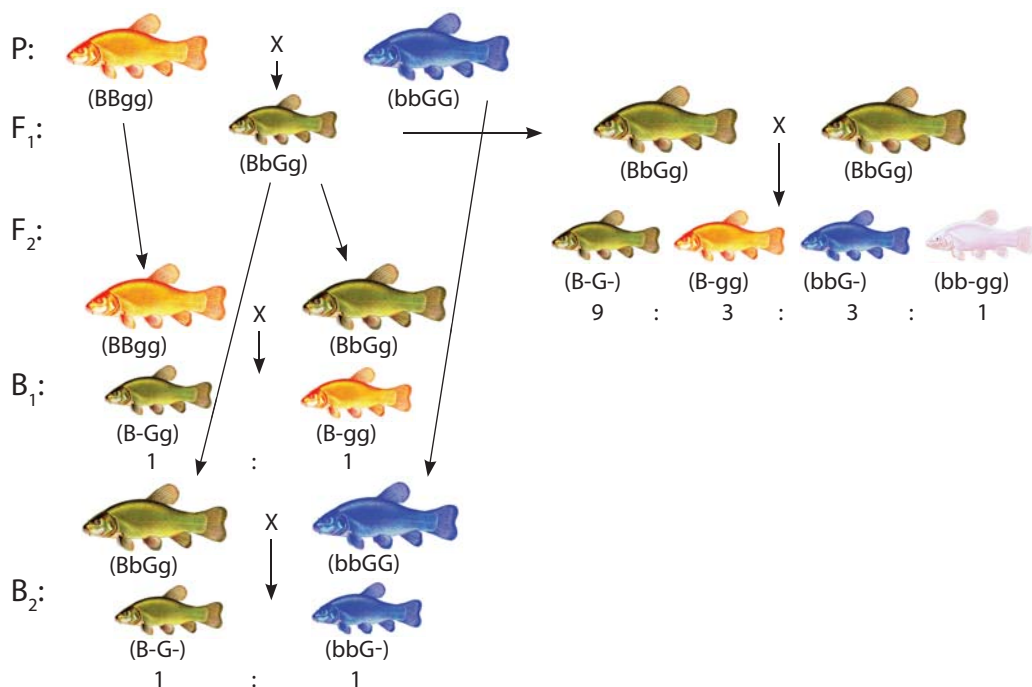
Na tomto základě byla také popsána **dědičnost zlatého a modrého zbarvení u lína obecného** (Kvasnička a kol., 1998), podmíněná dvěma různými geny. Modré zbarvení je způsobeno mutací jednoho genu, negativně ovlivňující produkci červených a žlutých pigmentů. Zlaté zbarvení je způsobeno mutací druhého genu, ovlivňující negativně produkci melaninu a guaninu nebo koncentraci melanoforů a guanoforů. Sytost zbarvení od světle žluté po tmavě červenou je dána distribucí červených a žlutých pigmentů, ovlivnitelnou vnějšími vlivy, zatímco tmavé skvrny na hlavách, ploutvích a na hřbetní partii ryb jsou dány distribucí melaninu (obr. 4.3.).



Obr. 4.3. Schéma ověření dědičnosti zlatého zbarvení u lína Kvasničkou a kol. (1998). P: nalezená zlatá samice byla křížena se zeleným samcem, získání F₁ zelení heterozygoti. Jejich vzájemným křížením se v F₂ vyšťepili zelení a zlatí líni v poměru 3 : 1. Zpětným křížením F₁ zeleného heterozygota se zlatou matkou v B₁ (1. backcross generaci) se vyšťepili zelení a zlatí líni v poměru 1 : 1.

Obě zbarvení se mohou projevit pouze v homozygotní konstituci příslušného genu (**bbGG- modré zbarvení; B-gg zlaté zbarvení**) a jsou recesivní vůči divokému zbarvení (B-G-). Divoký (zelený) fenotyp odpovídá teoretickým genotypům **BBGG** (dominantní homozygot v obou vlohách); **BBGg** (homozygot ve vloze pro modré a heterozygot ve vloze pro zlaté zbarvení); **BbGG** (heterozygot ve vloze pro modré a homozygot ve vloze pro zlaté zbarvení) nebo **BbGg** (heterozygot v obou vlohách).

- Třetí Mendelův zákon hovoří o **volné kombinovatelnosti vloh**. Při zkoumání dihybridizmu (dvou genů současně) rovněž dochází k pravidelné segregaci. Zůstaneme u předchozího příkladu dědičnosti barev u lína. Křížením zlatého (**BBgg**) a modrého (**bbGG**) lína získáme divoce zbarvené (zelené) potomstvo (dihybridy **BbGg**), které bude heterozygotní v obou vlohách. Každá z těchto ryb může tvořit 4 různé gamety (**BG, Bg, bG, bg**). Při vzájemném křížení z těchto gamet vzniká 16 různých zygotických kombinací, které zjistíme, když si jednotlivé gamety a jejich kombinace vypíšeme do Punnettova čtverce. Některé z kombinací dostaneme opakovaně, celkem vzniká devět různých genotypů v poměru 1 : 2 : 1 : 2 : 4 : 2 : 1 : 2 : 1. Těchto 9 genotypů se projeví čtyřmi fenotypy (dominantní v obou vlohách, dominantní ve vloze pro modré a recesivní ve vloze pro zlaté zbarvení, recesivní ve vloze pro modré a dominantní ve vloze pro zlaté zbarvení, recesivní v obou vlohách). Fenotypový šťepný poměr je 9 : 3 : 3 : 1 (obr. 4.4.). Vyšťepí se zde alampický fenotyp, takovým jedincům chybějí iridocyty a v juvenilním stádiu na nich lze pozorovat prosvítající segmentovanou svalovinu.



Obr. 4.4. Schéma ověření dihybridizmu u lína Kvasničkou a kol. (1998). P: křížením zlaté samice s modrým samcem vznikli F₁ zelení heterozygoti. Jejich vzájemným křížením se v F₂ vyštepili zelení (divoce zbarvení), zlatí, modří a alampičtí líni v poměru 9 : 3 : 3 : 1. Zpětným křížením F₁ zeleného heterozygota se zlatým (B₁) nebo modrým (B₂) rodičem se vyštepili zelení a zlatí nebo zelení a modří líni vždy v poměru 1 : 1.

Při odchovu jednotlivých okrasných mutací ryb ve venkovních nádržích a plůdkových výtažnících se však skutečně zjištěný fenotypový štěpný poměr může od očekávaného štěpného poměru lišit, resp. zastoupení jednotlivých barevných fenotypů může být nižší vůči divokému zbarvení, než bylo očekáváno. Může k tomu přispívat i nižší % přežití barevných forem (resp. negativní pleiotropní vliv genů pro okrasné zbarvení na přežití plůdku) a zejména predace, protože barevné formy ryb mohou být pro predátory lépe viditelné nebo přitažlivější.

4.2. Genové interakce

Genové interakce jsou vztahy mezi geny nebo alelami. Rozlišují se interakce mezi alelami uvnitř alelického páru na určitém lokusu, tzv. **intraalelické interakce**, a vztahy mezi (dvěma a více) alelickým páry, tzv. **interaletické interakce**.

4.2.1. Intraalelické interakce

- Interakce dvou alel na určitém lokusu může mít různý charakter, označovaný jako typ dědičnosti:
- **Dominantní dědičnost** je přenášena dominantní alelou. Znak, který je výsledkem působení dominantní alely, má dominantní dědičnost (např. divoké zbarvení u lína, viz výše).
 - **Recesivní dědičnost** mají znaky, které jsou výsledkem působení recesivních alel (např. modré zbarvení u pstruha duhového, zlaté a modré zbarvení u kapra a lína, bílé zbarvení u lína, albinismus u halančíka rýžovištního, sumečka skvrnitého, pstruha duhového).
 - **Úplná dominance** je stav, kdy dominantní alela (A) tvoří jiný genový produkt než recesivní alela (a). Dominantní homozygot (AA) a recesivní homozygot (aa) se manifestují odlišně (viz např. dominantní divoké pigmentované a recesivní albinotické nepigmentované zbarvení halančíka). V heterozygotním genotypu (Aa) se znak projevuje stejně jako v homozygotním genotypu (AA).
 - **Neúplná dominance** představuje částečný projev mutantní alely (a) ve fenotypu heterozygota [např. u zlatého karase průhlednost šupin dominantního homozygota, zbarvení kaliko u heterozygota a neprůhlednost šupin (normální vzhled) recesivního homozygota].
 - **Kodominance** je typem dědičnosti, při kterém se dvě různé alely téhož alelického páru plně projeví ve fenotypu heterozygota. To se děje např. u genů, které determinují vznik antigenů nebo proteinů. Takoví heterozygoti mají dva různé antigeny nebo proteiny, homozygoti pouze jeden.
 - **Superdominance** je stav, kdy výsledný efekt působení dvou různých alel téhož alelického páru je u heterozygota vyšší než u kteréhokoliv z homozygotů.
 - **Aditivita** je stav, kdy žádná z alel není dominantní a obě přispívají stejně k produkci fenotypu. Heterozygotní fenotyp je středem mezi oběma homozygotními fenotypy. Projev autozomálních genů s aditivitou se těžko odlišuje od neúplné dominance. Jedinou možností je rozlišit, zda je projev heterozygotního fenotypu střední mezi oběma homozygotními fenotypy, či zda se více blíží některému z nich. Příkladem aditivity je např. gen G u pstruha duhového (Tave, 1986), jež produkuje tyto fenotypy:

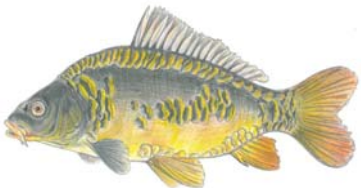
Genotyp	Fenotyp
$G'G'$	zlatý
$G'G$	palomino
GG	normální pigmentace

4.2.2. Interaletické interakce

Při interaletické interakci určitý znak vznikne nebo se projeví na základě vztahu mezi dvěma a více alelickými páry. Fenotypový projev genů, které jsou v interakci, může být ovlivněn různým způsobem (Romanovský a kol., 1985). Nejčastěji bývá jeden gen funkčně nadřazen jinému genu (epistatické interakce) nebo je fenotypový projev závislý na komplementárním spolupůsobení genů (komplementární interakce) nebo geny v interakci působí protisměrně (kompenzační interakce). Jednotlivé typy interakcí se projevují charakteristickými posuny ve fenotypových štěpných poměrech v F_2 a podle těchto odchylek lze usoudit na typ interakce.

- **Dominantní epistáze.** Dominantní alela nadřazeného (epistatického) alelového páru potlačuje projev dominantní alely podřízeného (hypostatického) genu, ať již je tento gen v homozygotní nebo heterozygotní konstituci. Teoretický dihybridní štěpný poměr fenotypů v F_2 ($9 A-B- : 3 A-bb : 3 aaB- : 1 aabb$) je tudíž změněn na $12 : 3 : 1$. U hospodářských druhů ryb je nejvýznamnějším fenotypem řízeným epistází **fenotyp ošupení u kapra obecného**. Již od dob Josefa Šusty (1882, tedy více než 120 let) je kapr lysého fenotypu žádanější na západoevropském trhu než šupinatý. Na asijském trhu je tomu naopak (Tave, 1986). Schopnost produkovat kapra žádaného typu ošupení má tedy bezprostřední dopad na ekonomiku a tržní realizaci chovu. Ošupení kapra je řízeno dvěma geny, S (*squamatus*) a N (*nudus*), přičemž N je epistatický. Gen N také vykazuje neúplnou dominanci a v dominantní homozygotní konstituci je letální, nositelé NN hynou.

Gen S řídí šupinatost a gen N modifikuje typ ošupení. Alela S je úplně dominantní nad alelou s . Dominantní fenotyp řízený alelou S je šupinatý, recesivní fenotyp řízený alelou s se projevuje redukcí počtu šupin a zvětšením zbylých šupin (lysce). Přítomnost alely N mění šupinatého kapra na řádkového lysce a lysého kapra na hladkého (obr. 4.5.). Alela n nemá vliv na typ ošupení. Geny S a N mají rovněž pleiotropní účinky na řadu fyziologických vlastností kapra, což bude zmíněno dále.

Fenotyp		Genotyp
šupinatý		$SSnn, SSnn$
lysý		$ssnn$
řádkový		$SSNn, SsNn$
hladký		$ssNn$

Obr. 4.5. Genotypy a fenotypy ošupení kapra obecného. Upraveno podle Kirpičnikova (1981), ilustrace ryb Lucie Mrázová (kapr obecný šupinatý), Pavla Hanusová (kapr obecný lysý, řádkový a hladký).

- **Inhibice** je typem dominantní epistáze. Dominantní alela jednoho genu (inhibitoru) inhibuje fenotypový projev dominantní i recesivní alely dalšího nebo dalších genů, tento gen však nemá vlastní fenotypový projev. Fenotypový štěpný poměr dihybrida v F_2 je 13 : 3.
- **Recesivní epistáze.** Recesivně homozygotní konstituce epistatického genu je nadřazena nad jakoukoliv konstitucí druhého (hypostatického) genu. Fenotypový projev hypostatického genu je závislý na funkci a produktu dominantní alely epistatického genu. Fenotypový štěpný poměr dihybrida v F_2 je 9AB : 3 Ab : 4 ab. Recesivní epistázi je řízena např. barva oka u mexických teter (Characidae). Černá, hnědá a růžová barva oka jsou řízeny geny *ab* a *bw* (Sadoglu a McKee, 1969, in Tave, 1986). Lokus *ab* je epistatický v tom, že genotyp *abab* produkuje růžové oči bez ohledu na genotyp genu *bw*. Dominantní alela *ab*⁺ dovoluje genotypu *bw* produkovat buď hnědé, nebo černé oči.
- **Dvojitá recesivní epistáze (komplementární faktory, komplementarita).** Pro realizaci znaku je nutná přítomnost alespoň jedné z dominantních alel (A-B-) každého z komplementárních genů. Znak tedy najdeme u jedinců s genotypem *AaBb*, *AABb*, *AaBB*, *AABB*. Naopak u jedinců, kde je jedna alela v homozygotně recesivní kombinaci, znak nepozorujeme – *aabb*, *aaBb*, *aaBB*, *Aabb*, *AAbb*. Fenotypový štěpný poměr dihybrida v F_2 je 9 : 7.
- **Kompenzace.** Účinek dvou alel na stejný znak je protisměrný. Každá alela v dominantním genotypu podmiňuje určitý fenotyp, pokud jsou však v genotypu zastoupeny oba geny alespoň jednou dominantní alelou, účinek genů se kompenzuje, a to vede ke třetímu fenotypu. Fenotypový štěpný poměr dihybrida v F_2 je 3 Ab : 3 aB : 10 ab.
- **Reciproká interakce.** Interakce bez změny štěpných poměrů. Oba geny se projevují samostatně, k interakci dochází až na úrovni fenotypu.

Působení genů v interakci může ovlivňovat nejen kvalitativní fenotypový projev, ale může se uplatnit i v intenzitě fenotypového projevu. Spolupůsobení více genů se označuje jako tzv. **multiplicitní faktory, multiplicitní interakce**. Tyto genové interakce se vyznačují stejnosměrným působením dominantních alel různých genů, označovaných jako alely **aktivní**, zatímco recesivní alely bývají funkčně **neutrální**. Pro své stejnosměrné působení jsou geny obvykle označovány stejným písmenem a alelické páry se rozlišují numerickými indexy ($A_1A_1A_2A_2\dots A_nA_n$). Podle toho, kolik alelických párů působí na vznik daného znaku, hovoří se o faktorech duplicitních, triplicitních atd., až multiplicitních. Pro intenzitu fenotypového projevu je rozhodující, zda se účinek duplicitních genů kumuluje (sčítá) nebo ne (Romanovský a kol., 1985).

- **Duplicitní faktory nekumulativní s dominancí.** Jestliže se účinek duplicitních genů nekumuluje, stačí k vyvolání určitého fenotypového projevu přítomnost jedné dominantní alely z kteréhokoliv alelického páru. Dihybrid v F_2 fenotypově segreguje v poměru 15 : 1.
- **Duplicitní faktory kumulativní s dominancí.** Maximální intenzita fenotypového projevu je dána součinností dominantních alel, alespoň jedné z každého alelického páru (A_1A_2 -). Samy o sobě dominantní alely každého duplicitního (multiplicitního) genu ($A_1a_2a_2$, $a_1a_1A_2$ -) zajišťují projev vlastnosti s nižší intenzitou. Homozygotně recesivní stavy v alelických párech představují třetí fenotyp. Dihybrid v F_2 fenotypově segreguje v poměru 9 : 6 : 1.
- **Duplicitní faktory kumulativní bez dominance.** Jsou příkladem genové interakce, kdy se rozšiřuje počet fenotypových tříd v segregujícím potomstvu. Intenzita fenotypového projevu závisí na počtu

přítomných dominantních alel v genotypu, účinky jednotlivých dominantních alel se sčítají bez ohledu na příslušnost k jednotlivým genům. Nasčítaný výsledek působení jednotlivých genů se označuje jako aditivní účinek genů. Z kombinatoriky dihybridního křížení vyplývá, že ze 16 možných zygotických kombinací je v F_2 pouze jedna homozygotně dominantní v obou alelických párech ($A_1A_1A_2A_2$), čtyři mají po třech dominantních alelách ($2A_1A_1A_2a_2$ a $2A_1a_1A_2A_2$), šest jich má po dvou dominantních alelách ($1A_1A_1a_2a_2$, $4A_1a_1A_2a_2$ a $1a_1a_1A_2A_2$), čtyři po jedné dominantní alele ($2A_1a_1a_2a_2$ a $2a_1a_1A_2a_2$) a jedna nemá ani jednu dominantní alelu ($a_1a_1a_2a_2$). Vzniká pět rozdílných fenotypových tříd podle klesající intenzity fenotypového projevu v poměrném zastoupení 1 : 4 : 6 : 4 : 1.

Přehledová tab. 4.1. shrnuje fenotypové štěpné poměry u F_2 dihybrida vzniklého křížením dvou heterozygotních rodičů (podle Tave, 1986, upraveno).

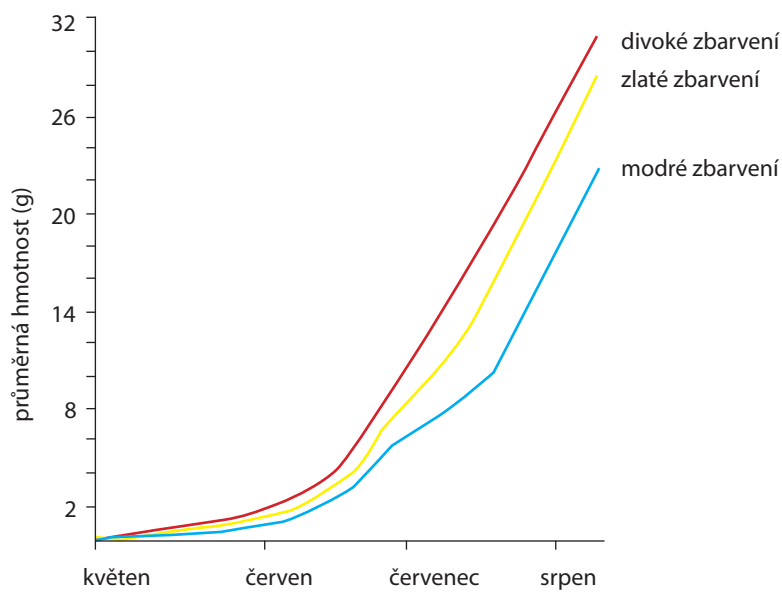
Tab. 4.1. Typy genových interakcí a fenotypové štěpné poměry u F_2 dihybrida vzniklého křížením dvou heterozygotních rodičů (podle Tave, 1986, upraveno).

Fenotypový štěpný poměr	Typ genové interakce
<i>jeden autozomální gen</i>	
3 : 1	úplná dominance
1 : 2 : 1	neúplná dominance; aditivita; kodominance
<i>dva autozomální geny produkující fenotypy intraalelickými interakcemi</i>	
9 : 3 : 3 : 1	dva geny s úplnou dominancí
3 : 6 : 3 : 1 : 2 : 1	dva geny, z toho jeden s úplnou dominancí a druhý buď s aditivitou, neúplnou dominancí nebo kodominancí
1 : 2 : 1 : 2 : 4 : 2 : 1 : 2 : 1	dva geny, v jakékoli kombinaci genů s aditivitou, kodominancí nebo neúplnou dominancí
<i>dva autozomální geny produkující fenotypy interalelickými interakcemi</i>	
1 : 4 : 6 : 4 : 1	duplicitní faktory kumulativní bez dominance
12 : 3 : 1	dominantní epistáze
9 : 3 : 4	recesivní epistáze
9 : 6 : 1	duplicitní faktory kumulativní s dominancí
15 : 1	duplicitní faktory nekumulativní s dominancí
9 : 7	dvojitá recesivní epistáze, komplementarita
13 : 3	inhibice
10 : 3 : 3	kompenzace

4.2.3. Pleiotropie, penetrance a expresivita

- **Pleiotropie** je stav opačný k výše popsaným případům interalelických interakcí. Jako pleiotropní působení se označuje stav, kdy jeden gen působí na projev více znaků. Jednotlivé geny mají zpravidla jeden primární účinek, na který může navazovat řada druhotných fenotypových projevů. Přiložený obrázek 4.6. (Tave, 1986) shrnuje výsledky negativního pleiotropního působení genů pro okrasné zbarvení (zlaté, modré) u kapra obecného na jeho růstové vlastnosti. Ke stejným závěrům dospěli Kvasnička a kol. (1998) u okrasných forem zlatého, modrého a bílého lína obecného.

Kirpičnikov (1981) shrnul negativní pleiotropní účinky genů kódujících ošupení u kapra obecného (S a N) na řadu fyziologických vlastností s bezprostředním dopadem na užitkovost jednotlivých fenotypů ošupení kapra. Relativní hodnoty jednotlivých ukazatelů v tab. 4.2. pro lysý, řádkový a hladký fenotyp jsou vztaženy k šupinatému fenotypu (= 100 %).



Obr. 4.6. Příklad negativních pleiotropních účinků genů pro zlaté a modré zbarvení na hmotnostní růst kapra obecného. Podle Tave (1986), upraveno.

Tab. 4.2. Negativní pleiotropní účinky genů kódujících ošupení u kapra obecného na jeho různé fyziologické vlastnosti a jejich odraz ve vlastnostech užitkových. Podle Kírpičnikova (1981).

Pleiotropní účinky	Fenotypy a genotypy ošupení			
	šupinatý SSnn, Ssnn	lysý ssnn	řádkový SSNn, SsNn	hladký ssNn
Hmotnost K ₁ v dobrých podmínkách (%)	100	93–96	85–88	79–80
Hmotnost K ₁ v nepříznivých podmínkách (%)	100	83–94	42–70	37–72
Hmotnost K ₂ (%)	100	94–96	86–91	83–84
Prům. počet měkkých paprsků v hřbetní ploutvi (ks)	18,8	18,7	16,4	15,4
Prům. počet měkkých paprsků v řitní ploutvi (ks)	4,96	5,0	3,82	3,56
Prům. počet žaberních tyčinek (ks)	88,6	83,5	82,3	83,2
Prům. počet požerákových zubů (ks)	9,22	9,58	7,63	7,44
Schopnost regenerace ploutví (%)	100	76	39	19
Počet erytrocytů (10 ⁶ buněk v 1 ml)	1,93	1,99	1,76	1,69
Hemoglobin (g/%)	9,02	8,87	8,18	8,28
Přežití při kyslíkovém deficitu (min)	210	210	132	132
Imunologická reaktivita	rychlá	rychlá	pomalá	pomalá
Odolnost k jarní virémii	–	zvýšená	–	snížená
Intenzita metabolismu tuků	nízká	nízká	vysoká	velmi vysoká
Celkové přežití K ₁ v dobrých podmínkách (%)	100	91–98	87–93	80–92
Celkové přežití K ₁ v nepříznivých podmínkách (%)	100	93–95	36–37	28–60

Vztahy mezi geny obvykle určují expresi fenotypů, tj. který ze dvou nebo více fenotypů se projeví. Někdy však konkrétní genotyp nevyprodukuje očekávaný fenotyp. V tom případě se o dotyčném genu hovoří jako o genu, který vykazuje proměnlivou penetranci nebo proměnlivou expresivitu.

- **Penetrance** odpovídá procentu jedinců, kteří vykazují očekávaný fenotyp. Projeví-li se tento fenotyp vždy, penetrance je 100%. Projeví-li se tento fenotyp jen u poloviny jedinců, penetrance je 50% atd.
- **Expresivita** odpovídá fyzickému projevu fenotypu, tj. rozsahu fenotypové exprese. Některé fenotypy nejsou proměnlivé vůbec; jiné se u různých ryb exprimují různou měrou. Příkladem může být alela S u tilápie, *Oreochromis aureus*, která u heterozygotů Ss působí deformace hřbetní ploutve (prosedlanost hřbetu). Tato alela se vyznačuje proměnlivou expresivitou. Prosedlaný fenotyp se může projevit od nepatrných známek (chybějící první ploutevní paprsek) až po úplnou absenci hřbetní ploutve (Tave, 1986).

4.3. Determinace a diferenciacie pohlaví u ryb, gonozomální dědičnost kvalitativních znaků

Na úvod je nutné si uvědomit rozdíl mezi diferenciací a determinací pohlaví. **Diferenciacie pohlaví** je samotný jev, při kterém dochází k tvorbě pohlavních buněk (oocyty či spermie) z buněk zárodečných. Oproti tomu determinace pohlaví je pojem, poukazující na faktory, které podmiňují, jaké pohlavní buňky se budou u daného jedince vyvíjet.

Rozvoj genetiky v druhé polovině dvacátého století nám umožnil nahlédnout do samotné podstaty života na naší planetě. Ukázalo se, že pohlaví je primárně determinováno chromozomy, někdy i morfoloicky odlišnými, které nesou geny zodpovědné za vznik jednoho či druhého typu pohlaví. Jedná se tedy o **geneticky podmíněnou determinaci pohlaví**. U nižších obratlovců jako jsou ryby, plazi a obojživelníci je dnes již poměrně dobře popsán i vliv vnějšího prostředí (teplota, sociální uspořádání skupiny atd.) na výsledné pohlaví jedince. V tomto případě hovoříme o **environmentální determinaci pohlaví**.

Ryby jsou jednou z nejplastičtějších skupin živočichů co se různorodosti determinace a diferenciacie pohlaví týče a to i přesto, že dodnes nebyly ani zdaleka objasněny všechny principy determinace a diferenciacie pohlaví u této druhově nejpočetnější skupiny obratlovců. Je také zajímavé, že u ryb nalezneme všechny modely determinace pohlaví, které byly v průběhu předchozích tří tisíc let navrhovány pro obratlovce obecně. U několika set rybích druhů je popsán jak synchronní, tak asynchronní hermafroditismus. U ryb byly také popsány různorodé systémy chromozomového určení pohlaví s více či méně diferenciovanými pohlavními chromozomy. V neposlední řadě diferenciacie pohlaví je u některých rybích druhů ovlivněna teplotou, pH vody, počtem samců či samic v populaci či jinými sociálními faktory a také obsahem hormonů ve vodě či v podávaném krmivu.

Objasnění systému determinace pohlaví může u hospodářsky významných druhů ryb výrazně přispět k zvýšení jejich produkce (produkce monosexuálních populací) a u některých ohrožených druhů může pomoci k jejich záchraně, či znovunavrácení do volných vod. Dodnes je popsáno značné množství potenciálních mechanismů determinace pohlaví u ryb a tyto mechanismy vykazují značné odlišnosti a zvláštnosti.

Gonozomální dědičnost určuje dědičnost znaků uložených na pohlavních chromozomech (gonozómech). Jsou to především znaky určující pohlaví nebo jeho funkčnost, ale gonozomálně se dědí i další dědičné vlohy, včetně vloh pro některé nemoci. Přítomnost pohlavního chromozomu v zygote je rozhodující nejen pro určení pohlaví, ale také pro vytvoření těch znaků, jejichž genetická informace je v daném pohlavním chromozomu zakódována.

Znaky vázané neúplně na pohlaví mají geny umístěné v homologických částech pohlavních chromozomů. V tomto úseku dochází ke crossing-overu, takže u obou pohlaví se znak vyskytuje se stejnou

četností. Znaky na pohlaví vázané úplně jsou kontrolovány geny v heterologických částech pohlavních chromozomů.

Pohlaví u gonochoristů je obvykle určeno vzájemnou kombinací pohlavních chromozomů. U ryb bylo popsáno více než devět typů chromozomového určení pohlaví (viz přehled Tave, 1986). V některých případech bylo popsáno i spoluurčení pohlaví geny ležícími na nepohlavních chromozomech (Komen a kol., 1992).

4.3.1. Environmentální faktory ovlivňující pohlaví u ryb

Doposud byl studován pouze malý počet environmentálních faktorů, které by mohly ovlivnit pohlaví u ryb. Stejně tak není zcela známo, zda změna podmínek prostředí ovlivňuje přímo determinaci pohlaví, tedy jeho genetickou podstatu, nebo až samotnou diferenciaci pohlavních buněk v průběhu gametogeneze. I přes tyto nejasnosti zde zmíníme pár základních informací týkajících se environmentální determinace pohlaví.

Teplota

Teplota je jedním z hlavních environmentálních faktorů, které ovlivňují pohlaví jedinců některých druhů ryb. Pokud je tedy výsledné pohlaví jedince ovlivněno teplotou, mluvíme o teplotně závislé determinaci pohlaví. U velké většiny termosensitivních druhů ryb dojde vlivem vyšší teploty k výraznému nárůstu počtu samců v populaci. Tento jev je většinou způsoben inaktivací enzymu aromatázy (viz dále) a podporuje předchozí tvrzení o propojení environmentálních a genetických faktorů v případě determinace pohlaví u ryb. Tento typ teplotně závislé determinace pohlaví je popsán u některých druhů z čeledi gavúnovití (Atherinidae), dále u některých zástupců čeledi Poeciliidae, cichlid rodu *Apistogramma* a *Tilapia* a v neposlední řadě také u karase stříbřitého, *Carassius auratus*, piskoře dálnovýchodního, *Misgurnus anguillicaudatus* a úhoře říčního, *Anguilla anguilla*. Z hospodářsky významných druhů je výsledné pohlaví jedinců teplotou ovlivněno u mořáka evropského, *Dicentrarchus labrax*, kdy se z jedinců chovaných v průběhu embryonální a larvální periody při teplotě mezi 19–22 °C (běžná teplota odchovu je 14 °C) vyvinou takřka ve sto procentech samci (Piferrer a kol., 2005). Stejně je tomu u tilapie nilské, *Oreochromis niloticus*, kde vyšší teplota inkubace způsobí enormní nárůst samců v následné populaci (Abucay a kol., 1999).

Podobně je tomu u sumečka tečkovaného, *Ictalurus punctatus*. V případě tohoto druhu způsobí zvýšená teplota inkubace a raného odchovu výrazně vyšší procento samic v populaci (Patino a kol., 1996). V případě platýse *Paralichthys olivaceus* jak vysoká (26 °C), tak i nízká teplota (15 °C) během embryonální periody vede k vývoji monosexní celosamčí populace. Pokud je však teplota během vývoje držena na obvyklé hodnotě 20 °C, v následné populaci se vyskytnou jak samci, tak samice (Yamamoto, 1999).

Teplotně závislá determinace pohlaví u ryb má také přímou souvislost s globálním oteplováním naší planety. Pokud dojde k zvýšení teploty v určitém biotopu, kde se vyskytují teplotně sensitivní druhy ryb, může to ovlivnit pohlavní strukturu dalších populací. Takovýto stav pak může ohrozit přežití celé populace, či dokonce celého druhu. Je tomu tak například v případě gavúnovce argentinského, *Odonesthes bonariensis*, jednoho z hospodářsky významných rybích druhů v Jižní Americe. U tohoto druhu bylo prokázáno, že již zvýšení teploty o 1,5 °C může vést k výraznému nárůstu počtu samců v populaci. Následně bylo zjištěno, že v oblastech jeho přirozeného výskytu došlo v průběhu minulých desetiletí k nárůstu průměrné roční teploty vody až o 4 °C a k narušení původního poměru pohlaví 1 : 1 na 3 : 1 ve prospěch samců. Tento fakt, spolu s intenzitním rybolovem, je považován za hlavní faktor výrazného poklesu stavu populací tohoto druhu ryb.

pH

Vliv pH na výsledné pohlaví jedinců byl prokázán u některých cichlid rodu *Apistogramma*. Nižší pH okolo 4,5 vede k nárůstu počtu samců v populaci ve srovnání s normálním stavem (pH 6,5; Römer a Beisenherz, 1996). Opačným případem jsou někteří pestríci rodu *Pelvicachromis*, kde vyšší pH (hodnoty nad 8) vedou až k dvoutřetinovému nárůstu počtu samců v populaci (Rubin, 1985). Vliv pH na výsledné pohlaví byl diskutován také u živorodky tříbarevné (*Poecilia melanogaster*) a u mečovky mexické (*Xiphophorus helleri*; Rubin, 1985).

Denzita populace a sociální faktory

Také denzita populace může mít vliv na utváření pohlaví. Například v případě úhoře amerického, *Anguilla rostrata*, bylo prokázáno, že při vysoké populační hustotě převládají v populaci samci a při nízké populační hustotě samice. Předpokládá se, že se jedná o jakousi formu adaptace, kdy velké množství menších samců obývá příbřežní partie poblíž výtěrových lokalit a naopak velké samice jsou rovnoměrně rozprostřeny po celém areálu rozšíření tohoto druhu (Krueger a Oliveira, 1999). Obdobně je tomu i u úhoře říčního, který se vyskytuje takřka na celém území Evropy včetně České republiky. U tohoto druhu se ve sladkých vodách vyskytují takřka výhradně samice. Samci obývají vody brakické či úplně slané. K vývoji výhradně samičího pohlaví dojde i v případě, že jsou larvy úhoře odloveny ještě v mořské vodě a jsou uměle vysazeny do vod sladkých. To odpovídá teorii, že sladká voda stimuluje u tohoto druhu vývoj samičího pohlaví, zatímco slaná voda vývoj samčího pohlaví. Tento fakt poukazuje na salinitu jako na další faktor, který může ovlivňovat utváření pohlaví u některých druhů ryb. Opačně než u úhoře amerického je tomu u některých druhů mihulí, kde při vysoké intenzitě růstu jedinců převládají samci, naopak při poklesu intenzity růstu dojde k poklesu počtu samců v populaci, k nárůstu počtu samic a následně k zvýšení početnosti celé populace (Beamish, 1993).

V případě jednoho druhu korálových ryb se ve velké skupině ryb rozmnožují pouze největší samci a samice. Pokud však samice uhynie nebo opustí skupinu, z jejího druhu se stává samice a největší samci z hejna přebírají jeho místo (Shapiro, 1994). V neposlední řadě samice druhu hlaváče *Trimma okinawae* může změnit své pohlaví na samčí v případě poklesu samců v populaci, ale může se z ní stát také zpětně samice v případě, že se do populace velcí samci vrátí (Sunobe a Nakazono, 1993).

V takovýchto případech musí ryby reagovat na změnu podmínek velice rychle. Tito jedinci bývají hermafrodité nesoucí gonády obojího typu. Jeden typ pohlaví má zpravidla převahu, právě v závislosti na vnějších podmínkách. Pokud dojde k změně podmínek vnějšího prostředí, dochází u výše zmíněných jedinců k pozastavení vývoje dosavadního typu gonád. Následně dojde k aktivaci vývoje gonád opačného pohlaví.

4.3.2. Geneticky podmíněná determinace pohlaví u ryb

Pohlavní chromozomy

Obecně lze říci, že jednou z nejvhodnějších cest pro objasnění mechanismu pohlavní determinace živočišných druhů je stanovení jejich karyotypů a nalezení pohlavních chromozomů (Devlin a Nagahama, 2002). Pouze u 3 000 rybích druhů byl stanoven jejich karyotyp a pouze u deseti procent z nich byly nalezeny cytogeneticky rozdílné pohlavní chromozomy. Typy pohlavních chromozomů u ryb jsou značně variabilní, prodělaly relativně primitivní evoluci ve srovnání s ostatními obratlovci (Volf a kol., 2007), a většina druhů ryb nemá dodnes zcela vyvinuté heteromorfní pohlavní chromozomy (Devlin a Nagahama, 2002).

U ryb se setkáváme jak se samčími, tak i se samičími heterochromozomy a dále s částečně či dokonce plně autozomálním chromozomovým určením pohlaví.

Mezi druhy, u kterých nesou heterochromozomy samci, je dominantním typem chromozomového určení pohlaví **typ *Drosophila***, kdy pohlavní chromozomy X a Y jsou cytogeneticky rozdílné, avšak diploidní počet chromozomů je pro obě pohlaví shodný. Samičí gameta nese vždy chromozom X, samčí gameta nese buď chromozom X nebo Y.

Tento typ chromozomového určení pohlaví byl popsán u celé řady hospodářsky významných druhů ryb např. u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*; Colihueque a kol., 2001), či hlavatky podunajské (*Hucho hucho*; Ráb a kol., 1994), dále u karase stříbřitého (*Carassius auratus*; Kirpichnikov, 1981), či u živorodek *Poecilia reticulata* (Nanda a kol., 1990) a *Xiphophorus maculatus* (Foerster a Anders, 1977).

Pokud došlo v průběhu evoluce ke ztrátě Y chromozomu u samců, hovoříme o **typu XO**, kde samci mají o jeden chromozom méně než samice. Tento typ chromozomového určení pohlaví byl prokázán např. u slunečnice zelené, *Lepomis cyanellus*, která patří do stejné čeledi jako u nás žijící slunečnice pestrá, *Lepomis gibbosus*, nebo okounek pstruhový, *Micropterus salmoides*.

Dále se u chromozomového určení pohlaví typu *Drosophila* setkáváme u ryb s **mnohonásobným chromozomovým určením pohlaví**, kdy je Y chromozom součástí autozomálních chromozomů a samci mají tedy nižší počet chromozomů než samice. Je tomu tak např. u drska většího, *Zingel zingel*, z povodí řeky Moravy (Halačka a kol., 2007) a dále u některých druhů z řádu Characiformes (Bertollo a kol., 2004), Gymnotiformes (Almeida-Toledo a kol., 2000), a útesových ryb rodu *Chromis* z řádu Perciformes (Molina a Galetti, 2002).

Obdobné systémy chromozomového určení pohlaví jako u typu *Drosophila* lze nalézt i u **typu *Abraxas*** s tím rozdílem, že zde pohlavní heterochromozomy WZ mají vždy samice a samci nesou chromozomy ZZ. Tento typ určení pohlaví mají např. úhoř říční, *Anguilla anguilla* (Passakas, 1981), tilápie *Oreochromis aureus* (Mair a kol., 1991) a některé akvarijní druhy jako např. zebříčka pruhovaná, *Danio rerio* (Sharma a kol., 1998) a živorodka velkoploutvá, *Poecilia velifera* (Nanda a kol., 1993).

Zajímavý typ chromozomového určení pohlaví mají platy rodu *Xiphophorus*. Tyto druhy mají **systém determinace pohlaví postavený na třech pohlavních chromozomech**. Samci nesou pohlavní chromozomy XY a YY, zatímco samice XX, XW a YW. Předpokládá se, že gen zodpovědný za vznik samčího pohlaví se vyskytuje na všech pohlavních chromozomech, ale pouze na Y chromozomu je aktivní. Na zbývajících chromozomech je jeho exprese blokována supresorovými autozomálními geny, popřípadě supresorem na W chromozomu. To vysvětluje samičí fenotyp u YW jedinců.

Typ chromozomového určení pohlaví lze u ryb orientačně ověřit i pomocí gynogeneze, tedy genomové manipulace, kdy se daný jedinec vyvíjí pouze z mateřského genomu. Pokud jsou pohlavní heterochromozomy nesený samcem (tedy u typu *Drosophila*), dojde po aplikování metody gynogeneze k produkci celosamičí populace právě proto, že byl inaktivován otcovský genom, čímž došlo i k inaktivaci genů na Y chromozomu zodpovědných za vývoj samčího pohlaví. V případě typu *Abraxas* však nese heterochromozomy samice, tudíž se po aplikaci gynogeneze mohou v potomstvu objevit jak samci, tak samice, v některých případech s výraznou převahou samic (např. jeseterovité ryby). Celá problematika determinace pohlaví systému *Abraxas* u rybích druhů je značně komplikovaná a výrazně přesahuje rozsah tohoto textu. Pro zájemce o hlubší studium této problematiky lze doporučit práci Devlin a Nagahama, 2002.

4.3.2.1. Geny spjaté s determinací pohlaví u ryb

Jak je patrné, samotné chromozomy nejsou přímo odpovědné za vznik jednoho či druhého pohlaví. To co určuje, zda se z daného jedince bude vyvíjet samec či samice, je přímo řízeno jedním či více geny, které leží na chromozomech, a to ať už na chromozomech pohlavních, či na autozomech. Ruku v ruce s rozvojem molekulární genetiky se podařilo nalézt některé geny, které jsou u ryb přímo spojeny

s mechanismem determinace pohlaví, či jej nepřímo ovlivňují. Jak už zde bylo uvedeno, evoluce genu ryb je ve srovnání s jinými obratlovci odlišná, tudíž u nich nedošlo k tak dokonalé diferenciaci pohlavních chromozomů, s čímž je úzce spjata i diferenciacie samotných genů zodpovědných za determinaci pohlaví. Neznamená to, že se takové geny v genomu ryb nenacházejí. Nejsou však tak striktně diferencované, jako je tomu například u savců.

DMRT geny

DMRT jsou geny, které kódují tzv. DM doménu či oblast. U bezobratlých je tento úsek na chromozomu považován za hlavní oblast zodpovědnou za diferenciaci pohlaví. U kuřat je *DMRT1* gen lokalizován na Z chromozomu, ale ne však již na W chromozomu a je tudíž také považován za jeden z možných genů zodpovědných za utváření pohlavní diferenciacie u ptáků obecně. U lidí je tento gen lokalizován na devátém chromozomu spolu s dvěma dalšími geny z DM oblasti, a to konkrétně s geny *DMRT2* a *DMRT3*. Pokud dojde k delecii tohoto úseku na chromozomu, může i u lidí dojít ke zvratu pohlaví. Takoví jedinci jsou pak genotypově muži, mají tedy pohlavní chromozomy XY, ale fenotypově se projevují spíše jako „ženy“. Tito jedinci nemají často vyvinuté pohlavní orgány, a pokud ano, tak jen částečně. Jsou také zpravidla mentálně retardovaní a dochází u nich k trigonocephalii. Kompletní DMRT geny byly nalezeny i u značného množství kostnatých ryb.

Halančík rýžovištní, *Oryzias latipes* (medaka japonská), je první obratlovec mimo třídu savců, u kterého byl identifikován gen zodpovědný za determinaci pohlaví na molekulární úrovni. U medaky byly nalezeny všechny tři DMRT geny. Tyto tři geny mají stejnou strukturu jako u lidí a jsou lokalizované poblíž telomerického konce devátého autozomu. V průběhu evoluce tohoto modelového organismu došlo k duplikaci této oblasti s DMRT geny a celý fragment byl přepsán na další chromozom, ze kterého se později vyvinul Y-chromozom. Z chromozomu, u kterého nedošlo k této inzerci, se vyvinul X-chromozom. Autozomální kopie tohoto genu je dnes nazývána jako *DMRT1a*, zatímco kopie která je lokalizována na Y-chromozomu, je nazývána jako *DMRT1bY*, také někdy nazývaná jako DMY. Samice mají tedy dvě alely genu *DMRT1a*, zatímco samci mají ještě navíc jednu kopii *DMRT1bY*. K intenzivní expresi tohoto genu dochází těsně před diferenciací gonád a mutace tohoto úseku ještě před diferenciací pohlaví vede ke zvratu ze samců na samice. *DMRT1aY* je tudíž považován za hlavní gen zodpovědný za diferenciaci pohlaví u tohoto druhu.

U platy *Xiphophorus maculatus* byly nalezeny a analyzovány dva typy DMRT genů. Zajímavé je, že jeden z těchto genů *DMRT2* má velice podobné introny jako DMRT geny medaky a lidí. Tyto introny mají v tomto genu shodné umístění. Tento fakt může být velice zajímavý především z hlediska evoluce a utváření pohlaví u živočišných druhů obecně. Na druhou stranu je nutno říci, že DMRT geny nemají u platy (*Xiphophorus maculatus*) výrazný vliv na diferenciaci pohlaví. To nasvědčuje tomu, že k duplikaci *DMRT1* genu, která vedla ke vzniku *DMRT1aY* genu zodpovědného za determinaci pohlaví u medaky, došlo až v době, kdy byl tento druh zcela evolučně oddělen od plat.

Sox geny

V této genové rodině je zakódováno několik vývojových regulátorů důležitých jak pro diferenciaci pohlaví, tak i pro vývoj celého organismu (Bowler a kol., 2000). U savců bylo nalezeno a popsáno celkem dvacet Sox genů, které byly v závislosti na podobnosti jejich nukleotidových sekvencí rozděleny do osmi skupin (Schepers a kol., 2002). Gen *Sry*, který je úzce spjatý se *Sox3* genem, je lokalizován na Y-chromozomu a je považován za striktně savčí, kdežto gen *Sox3* je rozšířen naskrz živočišnou říší (Galay-Burgos a kol., 2003). Gen *Sox3* je u savců lokalizován na X-chromozomu a předpokládá se, že je jakýmsi supresorovým genem samčího vývoje (Graves, 2006). Dalším genem ze Sox genové rodiny je gen *Sox9*, který je u savců zodpovědný za vývoj testes a jeho abnormální exprese vede ke zvrátům pohlaví či k poruchám celkového vývoje jedince (Clarkson a Harley, 2002).

U mořčáka *Dicentrarchus labrax* byl nalezen jak gen *Sox3*, tak i dvě izoformy genu *Sox9* (Galay-Burgos a kol., 2003), jejich vztah k diferenciaci pohlaví u tohoto druhu však nebyl dosud prokázán.

U zebřičky pruhované, *Danio rerio*, byly izolovány dva *Sox9* geny, konkrétně *Sox9a* a *Sox9b* a byly u nich také objeveny rozdíly v úrovni jejich exprese u dospělých jedinců. Zatímco se gen *Sox9a* exprimuje v mozku, v ledvinách, ve svalech a v testes, gen *Sox9b* se u tohoto druhu exprimuje pouze v ováriích (Jeyasuria a Place, 1998). Z tohoto vyplývá, že gen *Sox9* může mít přímý vztah k diferenciaci pohlaví u zebřičky pruhované. *Sox* geny byly objeveny také u plat, ale jejich vazba na diferenciaci pohlaví zde nebyla prokázána.

gen *CYP19*

Produktem genu *CYP19* je enzym aromatáza (*P450arom*), který je produkován především v mozku a v gonádách. Jeho funkce byla studována u velké řady obratlovců a bylo zjištěno, že je přímo odpovědný za konverzi androgenů na estrogény. U mnoha obratlovců je aktivita tohoto enzymu přímo úměrná úrovni vývoje pohlavních orgánů (Jeyasuria a Place, 1998). Aktivita tohoto enzymu je u embryí některých druhů ryb přímo ovlivňována teplotou. U těchto druhů je pak možné ovlivňovat poměr pohlaví výsledných jedinců změnami teploty v průběhu jejich embryonálního vývoje.

U mnoha kostnatých ryb byly izolovány dvě izoformy tohoto enzymu, a to konkrétně *P450aromA* a *P450aromB*, také někdy označované jako *cyp19a* a *cyp19b*. Obě tyto formy byly například objeveny u mořčáka. Bylo také zjištěno, že izoforma *P450aromA* se u tohoto druhu objevuje ve vysoké koncentraci v ováriích a naopak ve velice nízké koncentraci v testes a mozku, zatímco izoforma *P450aromB* se vyskytuje ve vysokých koncentracích v tělních tkáních a ledvinách (Piferrer a kol., 2005). Je tedy vysoce pravděpodobné, že aromatáza má zásadní roli pro diferenciaci pohlaví u mořčáka.

U zebřičky pruhované byly také nalezeny dvě izoformy aromatázy (*P450aromA* a *P450aromB*). Isoforma *P450aromA* je dominantně exprimována v ováriích, zatímco aromatáza *P450B* je u zebřičky striktně exprimována v mozku. Použitím inhibitoru aromatázy, nebo zvýšením teploty vody nad 35 °C dojde u zebřiček k degeneraci vývoje ovocytů, k vyčerpání aromatázy z tělního oběhu a k aktivaci diferenciaci spermatogonií.

U medaky byl také prokázán vliv aromatázy na výsledné pohlaví jedince podobně jako u ostatních zmiňovaných rybích druhů, ale bylo také prokázáno, že zvraty pohlaví mohou být u medaky vyvolány spíše změnami ve struktuře samotného *CYP19* genu, než pouhou změnou teploty.

FTZ-F1 geny

FTZ (fushi tarazu) geny a jejich exprese hrají zásadní roli v rané embryogenezi u octomilky *Drosophila melanogaster*. *FTZ-F1* je pak klíčovým regulátorem exprese genů *FTZ*. Obdobu tohoto regulačního faktoru *FTZ-F1* byla identifikována u mnoha kostnatých ryb jako např. u lososa čavyči, *Oncorhynchus tshawytscha* (Liu a kol., 1997), u sivena alpského, *Salvelinus alpinus* (Hofsten a kol., 2002), u tilápie nilské, *Oreochromis niloticus* (Yoshiura a kol., 2003), u halančíka rýžovištního, *Oryzias latipes* (Watanabe a kol., 1999) a u zebřičky pruhované, *Danio rerio* (Hofsten a Olsson, 2005). Funkce celé této skupiny genů *FTZ* spočívá u kostnatých ryb ve vlivu na samotnou reprodukci, především pak na produkci steroidů.

U halančíka rýžovištního a u tilápie nilské je *FTZ-F1* faktor regulátorem intenzity exprese aromatázy. U zebřičky pruhované byly identifikovány čtyři *FTZ-F1* geny. Tyto geny ovlivňují aktivaci a zároveň inhibici gonadotropních hormonů a mají také přímý vztah k produkci steroidních hormonů. Jeden z těchto genů, gen *ff1d* se výrazněji exprimuje v testes než v ováriích, a to především v Leydigových a Sertoliho buňkách.

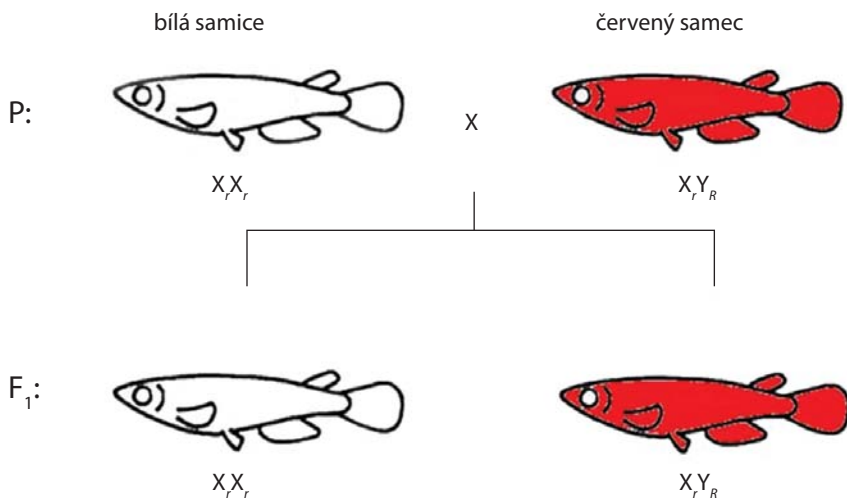
Na závěr je nutné podotknout, že determinace pohlaví u ryb není záležitostí pouze jednoho hlavního genu. Na výsledném pohlaví jedince se může podílet velké množství genů, které mohou být spolu více

či méně propojeny. Pouze pokud dojde k převládnutí projevu jednoho genu nad ostatními, může být pohlaví determinováno pouze jedním lokusem a mohou se tak vyvinout diferencované pohlavní chromozomy. Nicméně systém determinace pohlaví u ryb je obecně méně závislý na jednotlivých genech, je celkově plastičtější a variabilnější, než je tomu u savců.

Znalost typu určení pohlaví má význam především pro samotný chov, plemenitbu a využití genomových manipulací (produkce potomstva s uniparentální dědičností gynogenezí nebo androgenezí) při realizaci šlechtitelského programu. Dále, v případě růstových rozdílů mezi oběma pohlavími, k tvorbě monosexních obsádek rychleji rostoucího pohlaví buď sexací (tříděním podle projevu pohlavního dimorfizmu) nebo hormonálním zvratem pohlaví nebo kombinací gynogeneze a hormonálního zvratu pohlaví. U druhů s odlišným chromozomovým určením pohlaví se k tvorbě monosexních obsádek rychleji rostoucího pohlaví využívá mezidruhově hybridizace (tilápie).

4.4. Dědičnost kvalitativních znaků vázaných na pohlaví, ovládaných a ovlivněných pohlavím

Znaky vázané na pohlaví jsou kódovány geny lokalizovanými na pohlavních chromozomech. Tedy geny vázané na chromozom Y se dědí z otce na syna. U genů vázaných na X chromozom uvádí Tave (1986) dědičnost křížem, kdy při recipročných kříženích rodičů genotyp otce určuje fenotypy dcer a naopak, genotyp matky určuje fenotypy synů. Určitým, ale netypickým příkladem **dědičnosti znaků vázaných na pohlaví** může být i dědičnost červeného a bílého zbarvení u halančíka rýžovištního (obr. 4.7.). Tento druh má systém pohlavních chromozomů *Drosophila* (XX/XY). Alela pro bílou barvu (r) je vázaná na chromozom X. Dominantní alela (R) je vázaná na chromozom Y. Na obrázku je F_1 generace křížení mezi bílou jikernačkou (X_rX_r) a červeným mlíčákem (X_rY_R).



Obr. 4.7. Dědičnost znaku (zbarvení) vázaná na pohlaví u halančíka rýžovištního. Upraveno podle Tave (1986).

Znaky ovládané pohlavím jsou kódovány geny lokalizovanými v nepohlavních chromozomech. Projevují se pouze u jednoho pohlaví.

	Genotyp		
	<i>AA</i>	<i>Aa</i>	<i>aa</i>
samec	projeví se	projeví se	neprojeví se
samice	neprojeví se	neprojeví se	neprojeví se

Znaky ovlivněné pohlavím jsou také kódovány geny lokalizovanými v nepohlavních chromozomech. Projevují se u obou pohlaví v různé míře.

	Genotyp		
	<i>AA</i>	<i>Aa</i>	<i>aa</i>
samec	projeví se	projeví se	neprojeví se
samice	projeví se	neprojeví se	neprojeví se

LITERATURA

- Abucay, J.S., Mair, G.C., Skibinski, D.O.F., Beardmore, J.A., 1999. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture 173: 219–234.
- Almeida-Toledo, L.F., Daniel-Silva, M.F.Z., Lopez, C.E., Toledo-Filho, S.D.A., 2000. Sex chromosome evolution in fish. II. Second occurrence of an X1X2Y sex chromosome system in Gymnotiformes. Chromosome Research 8: 335–340.
- Beamish, F.W.H., 1993. Environmental sex determination in southern brook lamprey, *Ichthyomyzon gagei*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 50: 1299–1307.
- Bertollo, L.A.C., Oliveira, C., Molina, W.F., Margarido, V.P., Fontes, M.S., Pastori, M.C., Falcao, J.N., Fenocchio, A.S., 2004. Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). Heredity 93: 228–233.
- Bowles, J., Schepers, G., Koopman, P., 2000. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. Developmental Biology 227: 239–255.
- Clarkson, M.J., Harley, V.R., 2002. Sex with two SOX on: SRY and SOX9 in testis development. Trends in Endocrinology and Metabolism 13: 106–111.
- Colihueque, N., Iturra, P., Estay, F., Diaz, N.F., 2001. Diploid chromosome number variations and sex chromosome polymorphism in five cultured strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 198: 63–77.
- Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. Aquaculture 208: 191–364.
- Foerster, W., Anders, F., 1977. Chromosome complements from different subspecies and species of Xiphophorus. Zoologischer Anzeiger 198: 167–177.
- Galay-Burgos, M., Llewellyn, L., Mylonas, C.C., Canario, A.V.M., Zanuy, S., Sweeney, G.E., 2003. Analysis of the Sox gene family in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 137: 279–284.
- Graves, J.A., 2006. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. Cell 124: 901–914.
- Halačka, K., Vetešíň, L., Lusk, S., Mendel, J., Papoušek, I., 2007. The X1X1X2X2/X1X2Y multiple sex chromosome system in the *Zingel zingel* (Pisces: Perciformes) from the Morava River (Czech Republic). Caryologia 60: 222–225.
- Hofsten, J.V., Karlsson, J., Jones, I., Olsson, P., 2002. Expression and Regulation of *Fushi Tarazu* Factor-1 and Steroidogenic Genes During Reproduction in Arctic Char (*Salvelinus alpinus*). Biology of Reproduction 67: 1297–1304.
- Hofsten, J.V., Olsson, P., 2005. Zebrafish sex determination and differentiation: Involvement of FTZ-F1 genes. Reproductive Biology and Endocrinology 3: 63.
- Jeyasuria, P., Place, A.R., 1998. Embryonic brain-gonadal axis in temperature-dependent sex determination of reptiles: a role for P450 aromatase (CYP19). Journal of Experimental Zoology 281: 428–449.
- Kirpičnikov (Kirpichnikov), V.S., 1981. Genetic bases of fish selection. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 410 pp.
- Komen, J., Deboer, P., Richter, C.J.J., 1992. Male sex reversal in gynogenetic XX females of common carp (*Cyprinus carpio* L.) by a recessive mutation in a sex-determining gene. Journal of Heredity 83: 431–434.
- Krueger, W.H., Oliveira, K., 1999. Evidence for Environmental Sex Determination in the American eel, *Anguilla rostrata*. Environmental Biology of Fishes 55: 381–389.

- Kvasnička, P., Flajšhans, M., Ráb, P., Linhart, O., 1998. Inheritance studies of blue and golden varieties of tench (Pisces: *Tinca tinca* L.). Journal of Heredity 89: 553–556.
- Liu, D., Drean, Y.L., Ekker, M., Xiong, F., Hew, C.L., 1997. Teleost *FTZ-F1* homolog and its splicing variant determine the expression of the salmon gonadotropin $\text{II}\beta$ subunit gene. Molecular Endocrinology 11: 877–890.
- Mair, G.C., Scott, A.G., Penman, D.J., Skibinski, D.O.F., Beardmore, J.A., 1991. Sex determination in the genus *Oreochromis*: 2. Sex reversal, hybridisation, gynogenesis and triploidy in *O. aureus* Steindachner. Theoretical and Applied Genetics 82: 153–160.
- Molina, W.F., Galetti, P.M., 2002. Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5s rRNA genes. Genetics and Molecular Biology 25: 373–377.
- Nanda, I., Feichtinger, W., Schmid, M., Schroeder, J.H., Zischler, H., Epplen, J.T., 1990. Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. Journal of Molecular Evolution 30: 456–462.
- Nanda, I., Scharlt, M., Epplen, J.T., Feichtinger, W., Schmid, M., 1993. Primitive sex chromosomes in poeciliid fishes harbor simple repetitive DNA sequences. Journal of Experimental Zoology 265: 301–308.
- Passakas, T., 1981. Comparative studies on the chromosomes of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) and the American eel (*Anguilla rostrata* Le Sueur). Folia Biologica 29: 41–58.
- Patino, R., Davis, K.B., Schoore, J.E., Uguz, C., Struessmann, C.A., Parker, N.C., Simco, B.A., Goudie, C.A., 1996. Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. Journal of Experimental Zoology 276: 209–218.
- Piferrer, F., Blázquez, M., Navarro, L., González, A., 2005. Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). General and Comparative Endocrinology 142: 102–110.
- Ráb, P., Šlechtá, V., Flajšhans, M., 1994. Cytogenetics, cytotaxonomy and biochemical genetics of Huchonine salmonids. Folia Zoologica 43: 97–107.
- Romanovský, A., Činčerová, A., Čížek, F., Dvořák, P., Kaprálek, F., Kubišta, V., Nedvídek, Z., Opatrný, Z., Pazourek, J., Pikálek, P., Seifert, J., Slavíková, Z., Váňa, J., Závada, V., 1985. Obecná biologie. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 695 s.
- Römer, U., Beisenherz, W., 1996. Environmental determination of sex in *Apistogramma* (Cichlidae) and 2 other fresh-water fishes (Teleostei). Journal of Fish Biology 48: 714–725.
- Rubin, D.A., 1985. Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). Copeia 1985 (1): 233–235.
- Shapiro, D.V., 1994. Sex change in fishes: how and why? In: Short, R.V., Balaban, E. (Eds), The Differences Between the Sexes. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 105–131.
- Sharma, K.K., Sharma, O.P., Tripathi, N.K., 1998. Female heterogamety in *Danio rerio* (Cypriniformes: Cyprinidae). Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Sect. B 68: 123–126.
- Schepers, G.E., Teasdale, R.D., Koopman, P., 2002. Twenty pairs of *sox*: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human *sox* transcription factor gene families. Developmental Cell 3: 167–170.
- Sunobe, T., Nakazono, A., 1993. Sex change in both directions by alteration of social dominance in *Trimma okinawae* (Pisces: Gobiidae). Ethology 94: 339–345.
- Šusta, J., 1898. Fünf Jahrhunderte der Teichwirtschaft zu Wittingau. Stettin. S. 4 u.f.
- Tave, D., 1986. Genetics for fish hatchery managers. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, USA, 299 pp.

- Volff, J.-N., Nanda, I., Schmid, M., Shartl, M., 2007. Governing sex determination in fish: regulatory putsches and ephemeral dictators. *Sexual Development* 1: 85–99.
- Watanabe, M., Tanaka, M., Kobayashi, D., Yoshiura, Y., Oba, Y., Nagahama, Y., 1999. Medaka (*Oryzias latipes*) FTZ-F1 potentially regulates the transcription of P-450 aromatase in ovarian follicles: cDNA cloning and functional characterization. *Molecular and Cellular Endocrinology* 149: 221–228.
- Yamamoto, E., 1999. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 173: 235–246.
- Yoshiura, Y., Senthilkumaran, B., Watanabe, M., Yuichi, O., Kobayashi, T., Nagahama, Y., 2003. Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction. *Biology of Reproduction* 68: 1545–1553.

GENETIKA KVANTITATIVNÍCH ZNAKŮ U RYB

M. Kocour

GENETIKA KVANTITATIVNÍCH ZNAKŮ U RYB

M. Kocour

5.1. Kvalitativní versus kvantitativní znaky, geny malého účinku, fenotypový projev

Kvantitativní genetika je vědní obor zabývající se **kvantitativními znaky**. Kvantitativní znaky jsou takové znaky, které je možno nějakým způsobem změřit (kvantifikovat) a vyjádřit číselnou hodnotou. Mezi kvantitativní znaky patří většina sledovaných užitkových vlastností ryb, jako je růst (vyjádřený délkou či hmotností), přežití, plodnost, jateční výtěžnost, kvalita masa apod. Snaha o zvyšování užitkovosti jednotlivých vlastností ryb je v popředí zájmu chovatelů na celém světě, a proto je kvantitativní genetika jedním z nejdůležitějších oborů genetiky ryb. Vztah mezi mendelistickou dědičností a kvantitativními znaky není tak zřejmý jako u kvalitativních znaků či alelových frekvencí v populacích. Přesto není důvod, aby dědičnost kvantitativních znaků nevycházela ze stejných principů.

Jak již bylo řečeno v předchozích kapitolách, **kvalitativní znaky** (např. barva těla u lína, ošupeení u kapra apod.) jsou určeny geneticky jedním či několika geny lokalizovaných na jednom či více lokusech.

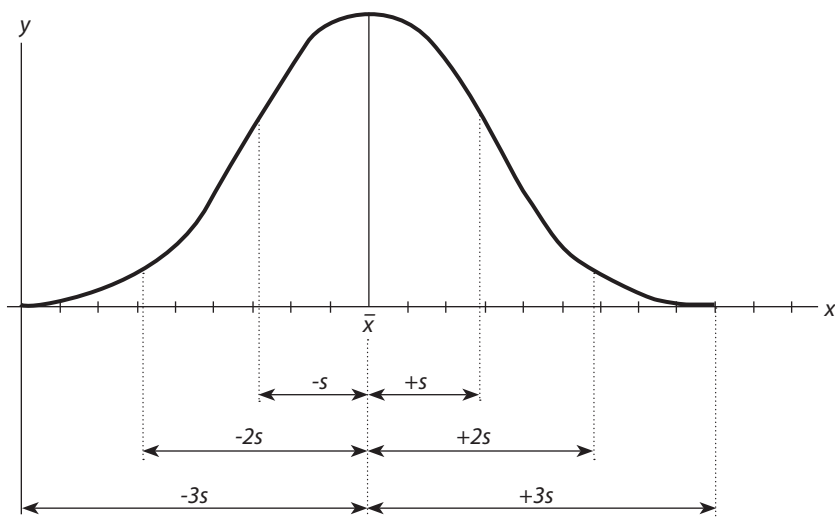
Kvantitativní znaky jsou založeny více geny, většinou neznámého počtu, lokalizovaných na více lokusech a každý z nich se na výsledném projevu podílí neznámou měrou. Takovéto geny jsou nazývány **polygeny** nebo také **geny s malým účinkem**. Na výsledném projevu (**fenotypu**) kvantitativních znaků se kromě jiného významně podílejí také vlivy vnějšího prostředí. Daný genotyp (soubor všech genů) jedince (populace, plemene) je u těchto znaků možno chápat pouze jako vrozenou predispozici k maximálně možnému projevu daného kvantitativního znaku (**příklad 5.1.**).

Fenotypové hodnoty sledovaných kvantitativních znaků v populaci vykazují tzv. **kontinuální** neboli **plynulou proměnlivost (variabilitu)**, kterou zjistíme při měření dostatečného počtu jedinců v populaci. Většina kvantitativních znaků v populaci vykazuje tzv. **normální rozdělení** hodnot nebo je s takovým rozdělením u měřených znaků pro zjednodušení často počítáno.

Příklad 5.1. Hmotnost ryb závisí na složitých metabolických procesech v organismu ovlivňovaných množstvím enzymů a dalších látek. Bílkovinné složky enzymů jsou kódovány geneticky a na všechny procesy je zapotřebí velké množství energie. energii a ostatní důležité látky přijímají ryby v potravě z vnějšího prostředí. Rychlost metabolismu je zase řízena teplotou. Takže jedinec či plemeno (populace) s dobrým genetickým založením u kapra obecného neporoste rychleji než jedinec (plemeno, populace) s obecně horšími užitkovými vlastnostmi, pokud nebude (nebudou) mít zajištěny dostatečný přísun potravy, optimální teplotu vody, kvalitu vody, prostor apod. Na druhou stranu geneticky stejná (podobná) populace ryb (např. potomstvo pocházející z jednoho výtěru jednoho plemene) náhodně rozdělená do dvou lokalit může vykazat výrazně odlišnou průměrnou velikost a hmotnost ryb v rybníce, kde jsou lepší potravní podmínky.

Normální rozdělení pozorovaných hodnot u sledovaných kvantitativních znaků můžeme vyjádřit tzv. **Gaussovou křivkou**. Základními charakteristikami naměřených hodnot sledovaného znaku (hmotnosti, délky těla apod.) v souboru (populaci apod.) jsou průměr ($\bar{x}$) a směrodatná odchylka (s). Směrodatná odchylka udává rozsah **proměnlivosti** – variability na obě strany: Průměr $\pm s$ zahrnuje 68 % všech naměřených hodnot daného souboru. Uvnitř rozmezí vymezeného hodnotami $\bar{x} \pm 2s$ leží 95 % všech pozorování a rozmezí vymezené $\bar{x} \pm 3s$ zahrnuje prakticky všechna pozorování dané populace, tj. 99,7 % případů (obr. 5.1.).

Studium variability (proměnlivosti) kvantitativních znaků v populacích se opírá o výsledky biometrických měření sledovaných vlastností (**fenotypové hodnoty – fenotyp**) a o zpracování získaných dat složitými matematickými modely při využití počítačových statistických programů. V současné době se pro studium proměnlivosti kvantitativních znaků začínají stále více využívat i molekulárně-biologické metody.



Obr. 5.1. Gaussova křivka vyjadřující rozdělení fenotypových hodnot kvantitativních znaků v populaci.

Závěrem je potřeba podotknout, že rozdělování znaků na kvantitativní a kvalitativní je do určité míry pouze konvenční. Mezi kvalitativními a kvantitativními znaky nelze nalézt vždy ostrou hranici. Nejdůležitější rozlišovací znaky mezi kvalitativními a kvantitativními znaky jsou pro přehlednost znázorněny v **tab. 5.1**. Otázkou zůstává, kolik genů se na fenotypovém projevu jednotlivých kvantitativních znaků podílí. V počátcích rozvoje kvantitativní genetiky se předpokládalo, že postačí identifikovat pouze několik málo lokusů či genů pro vysvětlení genetické variability vysoce komplexních kvantitativních znaků a tyto pak cílenou selekcí fixovat. Později se však ukázalo, že se studiem genetického pozadí kvantitativních znaků je to mnohem složitější. Z nedávných výzkumů vyplynulo, že počet genů, které mají vliv na konečnou fenotypovou hodnotu kvantitativního znaku, se pohybuje mezi 100–300 (Falconer a Mackay, 1996). Jiné studie hovoří o nižších číslech, ale pozadí těchto experimentů je nejasné.

Tab. 5.1. Základní rozdíly mezi kvalitativními a kvantitativními znaky.

Kvalitativní znaky	Kvantitativní znaky
- Jsou založeny malým počtem genů velkého účinku - V populaci jsou fenotypy jednotlivých genotypů rozděleny do jasně specifikovaných tříd – <i>diskontinuální proměnlivost</i> - Fenotyp není vůbec nebo jen velmi mírně modifikován podmínkami prostředí	- Jsou založeny velkým počtem genů malého účinku - V populaci přechází fenotypy jednotlivých genotypů plynule jeden v druhý – <i>kontinuální proměnlivost</i> - Fenotyp je významně ovlivňován podmínkami prostředí

5.2. Složky fenotypové variance

V úvodu této kapitoly bylo naznačeno, že v každé populaci vykazují hodnoty kvantitativních (měřitelných) znaků (**fenotyp**) různou míru proměnlivosti (variability), a že fenotyp je výsledkem působení genetické složky (genotypu) a vnějšího prostředí.

$$P = G + E \quad (3)$$

kde **P** je fenotyp (z angl. *Phenotype*), **G** je složka genetická a **E** je složka prostředí (z angl. *Environment*)

Zjištěná variabilita znaku v populaci se vyjadřuje jako **variance** (rozptyl), neboli čtverec odchylek od průměru populace. Fenotypovou varianci v populaci můžeme tedy vyjádřit jako:

$$\sigma_p^2 = \sigma_g^2 + \sigma_e^2 \quad (4)$$

kde σ_p^2 je variance fenotypová, σ_g^2 je variance genetická a σ_e^2 je variance prostředí.

5.2.1. Variance prostředí

Složka σ_p^2 se na celkové varianci výsledného fenotypu všech kvantitativních znaků podílí v chovu ryb velmi podstatně. Všechny sledované znaky mohou být prostředím ovlivněny ve všech fázích vývoje jedince od oplození až do doby, kdy jsou hodnoty sledovaných znaků zjišťovány. Výsledek při studiu genetické variance těchto znaků závisí na tom, zda jsme varianci prostředí schopni přímo kvantifikovat, nebo spíše zda jsme schopni zajistit srovnatelné podmínky prostředí pro všechny sledované skupiny. Mnoho výsledků dosažených při experimentálních šlechtitelských programech v minulosti jsou dnes nepoužitelné, protože není jasné, jak byla variance prostředí v konečném výsledku zohledněna nebo zda s ní bylo vůbec počítáno (**viz příklad 5.2.**).

Příklad 5.2. Srovnáváme růst dvou populací kapra obecného – selektované a neselektované, a každá ze skupin byla nasazena do jednoho či dvou rybníků. Zjištěný výsledek dosaženého růstu vyjádřený hmotností naznačoval, že selektovaná populace dosáhla průkazně vyšší růst i přežití. Je takovýto výsledek objektivní? Odpověď zní – v žádném případě. Ze statistického hlediska byl počet opakování nízký, protože při zohlednění všech možných faktorů vnějšího prostředí a jejich rozdílů mezi rybníky s odlišnými skupinami není možno říci, zda výsledek zjištěných fenotypových hodnot byl způsoben více vlivy prostředí či vlivy genetickými. Tyto dvě složky nejsme schopni oddělit a ani nejsme schopni říci, zda byly podmínky prostředí v rybnících s odlišnými skupinami srovnatelné. Nabízí se tedy otázka, jak vyrovnat vlivy prostředí mezi porovnávanými skupinami či oddělit varianci prostředí od variance genetické. Na obě otázky bude odpovězeno podrobněji v dalších kapitolách. Základem k dosažení co nejobjektivnějších výsledků je **vhodný experimentální model**.

Faktory podílející se na varianci prostředí můžeme rozdělit na **faktory trvalé (permanentní** nebo také **systematické)** a **dočasné (temporální nebo náhodné vlivy)**, jak je patrné v **tab. 5.2**. Variance **náhodných vlivů** u porovnávaných skupin může být stabilizována opakováními měřeními sledovaného znaku v čase nebo měřeními hodnot u velkého počtu jedinců a na více lokalitách (místech, podnicích, rybnících apod.). Opakování je v tomto případě nejideálnějším řešením, protože účinek a míra variance těchto faktorů na celkovém fenotypu je prakticky neodhadnutelná. **Systematické vlivy prostředí** není možno minimalizovat opakováními měřeními nebo by těchto opakování muselo být tolik, že je to z praktického hlediska nerealné. Tyto vlivy zahrnují faktory, které jsou společné pro určitou skupinu ryb nebo které se liší v jednotlivých letech. Příkladem systematických vlivů podílejících se na celkové fenotypové varianci jsou věk ryb, pohlaví, klimatické podmínky, krmení, chovatelská technologie apod. Hranice mezi náhodnými a trvalými vlivy není pevná a některé faktory mohou být za určitých okolností náhodné a za jiných trvalé.

Tab. 5.2. *Genetické a environmentální složky fenotypové variance (podle Gjedrema, 2005).*

Složka	Příklady
Trvalá variance prostředí	Věk Pohlaví Prostředí (rybník, klecový chov atd.) Chovatelské podmínky (podnik) Potrava
Dočasná variance prostředí	Nemoci Stres Soupeření Teplota Chyby v měření Další vlivy
Genetická variance	Genotyp

Základem při provádění všech experimentů ve šlechtitelských programech je snaha testovat všechny sledované skupiny za stejných podmínek prostředí. V praktických podmínkách je ale zajištění vyrovnaných podmínek nemožné, zejména v chovech rybníčních. V rybníkářství je růst ryb závislý z velké části na příjmu přirozené potravy a počáteční přežití váčkového plůdku závisí na připravenosti rybníka (teplota vody, rozvoj přirozené potravy související s přirozenou bonitou rybníka a způsobem obhospodařování, onemocnění, množství predátorů – dravých ryb, hmyzu, ptáků, později savců apod.) (**Příklad 5.3.**). V chovech s řízeným prostředím, v recirkulačních systémech nebo v intenzivních chovech, kde ryby rostou výhradně z předkládaného krmiva a kvalitu vody je možno optimalizovat, je mnohem snadnější zajistit vyrovnané podmínky prostředí pro všechny testované skupiny. V případech, kdy není možné zajistit stejné systematické vlivy prostředí, je nezbytné přistoupit ke korekci naměřených fenotypových hodnot.

Příklad 5.3. *V okolí Pohořelic (ČR) dosahuje kapr při stejném způsobu hospodaření ve všech věkových kategoriích vyšší konečnou hmotnost ve srovnání s podhorskou oblastí Žďáru nad Sázavou, a to díky delšímu vegetačnímu období, kdy je kapr schopen přijímat potravu a růst. Naopak plůdek kapra je schopen v jednom ze dvou vedle sebe ležících rybníků dosáhnout i trojnásobné hmotnosti za předpokladu, že bude v mnohem řidší obsádce, což zajistí všem jedincům vyšší potravní nabídku a více prostoru.*

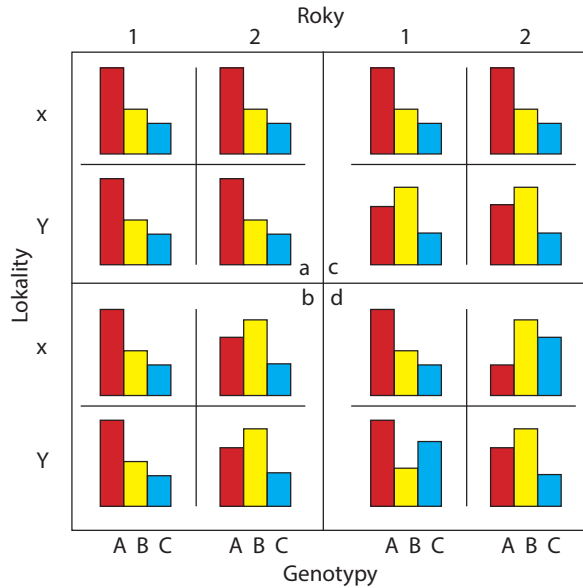
5.2.2. Vztahy mezi genetickou složkou a prostředím

Variance výsledného fenotypu může být rovněž ovlivněna vzájemnými vztahy mezi variancemi genetické složky a variancí prostředí. V tomto ohledu rozlišujeme:

a) **Korelace mezi genotypem a prostředím.** Tento jev může nastat v případech, kdy jsou lepší genotypy podpořeny lepším prostředím. Příkladem může být situace, kdy třeba geneticky rychleji rostoucí skupina ryb A dostává relativně více krmiva, aby byl projev lepšího genotypu v celkovém fenotypu umocněn. Ale i při srovnatelném krmení i dalších podmínkách prostředí by skupina A dosáhla lepšího růstu než skupina B. Pokud vznikne korelace, zvyšuje se fenotypová variance dvojnásobkem kovariance genotypových hodnot a odchylek prostředí ($2cov_{GE}$).

b) **Interakce mezi genotypem a prostředím (σ^2_{GE}).** Pokud rozdílné genotypy reagují na změnu podmínek prostředí různým způsobem, vzniká interakce mezi genotypem a prostředím. V tomto smyslu se neho-

voří o lepších či horších podmínkách, spíše o určité konkrétní situaci ve srovnání s předchozí (obr. 5.2.). Podle dostupných literárních zdrojů se názory na význam interakcí genotypu a prostředí v chovu ryb značně liší, a proto není možno učinit nějaký obecný závěr. Většina studií hovoří o podílu interakcí na celkové fenotypové variabilitě na úrovni několika desetin %. Vyšší hodnoty interakcí byly zaznamenány u kapra obecného v extenzivních či polointenzivních chovech s podílem přirozené potravy podílející se na růstu ryb. I přes tato zjištění je s interakcí mezi genotypem a prostředím nezbytné počítat při plánování šlechtitelských programů.



Obr. 5.2. Příklad interakcí genotypu s prostředím. Tři různé genotypy (A, B, C) ve dvou letech (1, 2) a na dvou odlišných lokalitách (X, Y); a) bez interakcí; b) interakce genotypů s roky; c) interakce genotypů s lokalitami; d) interakce genotypů s roky i lokalitami (Nečásek a Cetl, 1979).

Fenotypovou varianci můžeme na základě předchozích skutečností vyjádřit jako:

$$\sigma_p^2 = \sigma_g^2 + \sigma_{EP}^2 + \sigma_{ET}^2 + \sigma_{GE}^2 + 2cov_{GE} \quad (5)$$

5.2.3. Variance genetické složky

Proměnlivost dědičných faktorů můžeme rozdělit na tři základní složky, jejichž velikost závisí na genetických vztazích mezi členy polygenních systémů. Nejjednodušším vztahem mezi polygeny je aditivita (**aditivní působení genů**). Dále rozlišujeme neaditivní působení genů, které v sobě zahrnuje **dominanci** a **genové interakce**. Konečný rozklad fenotypové variance je pak možno vyjádřit jako:

$$\sigma_p^2 = \sigma_A^2 + \sigma_D^2 + \sigma_I^2 + \sigma_{EP}^2 + \sigma_{ET}^2 + \sigma_{GE}^2 + 2cov_{GE} \quad (6)$$

kde σ_p^2 je variance fenotypová, σ_A^2 je aditivní složka genetické variance, σ_D^2 je složka dominance genetické variance, σ_I^2 je složka interakcí genů genetické variance, σ_{EP}^2 je variance trvalých vlivů prostředí, σ_{ET}^2 je variance dočasných vlivů prostředí, σ_{GE}^2 je variance interakce genotypu a prostředí a $2cov_{GE}$ je korelace mezi genotypem a prostředím.

Aditivní složka genetické variance

Princip aditivity spočívá v prostém sčítání účinku jednotlivých aktivních alel. Neutrální alely zodpovídají za základní fenotypovou hodnotu znaku, kterou aktivní alely zvyšují o určitý počet jednotek. Tento model je u kvantitativních vlastností nejrozšířenější. Ve výjimečných případech může být účinek alel multiplikativní, tzn. že počet účinných alel výslednou fenotypovou hodnotu nepřičítá, ale násobí, a místo aritmetické řady dostáváme řadu geometrickou. Aditivní složka je příčinou podobnosti mezi příbuznými jedinci a je nejvíce ovlivňována fenotypovou selekcí. Počet možných fenotypových i genotypových tříd je tím vyšší, čím více alelových párů se podílí na dané vlastnosti (**příklad 5.4.**).

Příklad 5.4. Zjednodušte projev jakéhokoliv kvantitativního znaku a řekněme-si, že na jeho výsledném projevu se nepodílí vliv prostředí ani žádná ze závislostí mezi genotypem a prostředím. V tom případě, je-li znak kódován jedním genem (s možnými alelami A,a), můžeme pozorovat 3 různé genotypy ($AA; Aa; aa$) a rovněž 3 fenotypy (aa – základní hodnota znaku; Aa – základní hodnota zvýšena o jednu jednotku; AA – základní hodnota zvýšena o 2 jednotky). Pokud je znak kódován dvěma geny s volnou kombinovatelností (s možnými alelami A,a,B,b) a stejným účinkem na fenotypový projev, můžeme pozorovat 9 různých genotypů ($AABB; AaBB; AaBb; aaBB; aaBb; AABb; AAbb; Aabb; aabb$) a 5 různých fenotypových tříd (1. fenotyp – $AABB$; 2. fenotyp – $AaBB, AABb$; 3. fenotyp – $aaBB, AaBb, AaBb$; 4. fenotyp – $Aabb, aaBb$ a 5. fenotyp – $aabb$). V případě, kdy je znak kódován třemi páry alel, můžeme očekávat 27 genotypů a 7 fenotypových tříd. Obecně platí, že při n alelických párech můžeme očekávat 3^n genotypových a $2n+1$ fenotypových tříd.

Ve skutečnosti se ale nemusí všechny alelové páry podílet na projevu kvantitativního znaku stejnou měrou. Dále existuje vliv prostředí a vztahy mezi genotypem a prostředím. Vezmeme-li v úvahu vztahy dominance či neúplné dominance mezi alelickými páry, můžeme očekávat obrovské množství různých fenotypových tříd, které způsobují kontinuální proměnlivost fenotypových hodnot kvantitativních znaků. Aditivní varianci můžeme za určitých okolností jako jedinou snadno vypočítat z naměřených dat a pro odhadování možnosti selekce, tedy výpočet heritability, je počítáno právě s touto složkou genetické variability. U většiny druhů ryb tvoří aditivní variance významnou část celkové fenotypové variance růstových vlastností, a proto je možno selekcí na vyšší růst dosáhnout velmi dobré výsledky při zvyšování genetického potenciálu ryb.

Neaditivní složka genetické variance

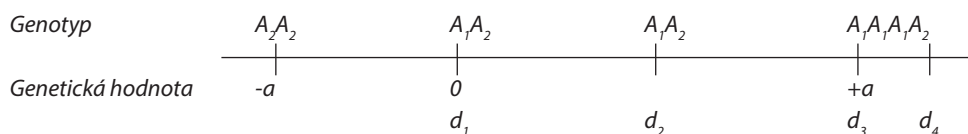
Neaditivní složka genetické variance zahrnuje, jak již bylo řečeno, varianci dominance a varianci interakcí mezi geny.

Variance dominance zahrnuje všechny genetické účinky lokusů (alelického páru / alelických párů), které jsou způsobeny vzájemnými vztahy alel uvnitř těchto lokusů. Má se za to, že variance dominance je způsobena již výše zmiňovanými vztahy dominance, neúplné dominance či superdominance mezi jednotlivými alelickými páry uvnitř lokusů. Teorii podporují studie, při kterých bylo zjištěno, že tam, kde neexistují mezi alelami téhož lokusu vztahy dominance, rovná se variance aditivní složky hodnotě celkové genetické proměnlivosti (Falconer a Mackay, 1996).

Vzájemný vztah mezi dominantí a prostou aditivitou je možno popsat na následujícím modelu. Předpokládejme, že máme jednoduchý lokus s alelami (A_1, A_2). Genetickou hodnotu homozygotního páru A_1A_1 vyjádříme jako $+a$, genetickou hodnotu homozygotního páru A_2A_2 jako $-a$ a heterozygotní kombinaci A_1A_2 vyjádříme hodnotou d . Alelu A_1 předpokládejme jako tu, která (je-li přítomna) zvyšuje pů-

vodní genetickou hodnotu, alela A_2 hodnotu snižuje. Zmíněnou situaci si můžeme jednoduše graficky vyjádřit (obr. 5.3.).

Za základní **genetickou hodnotu** (číselné vyjádření vlivu genotypu na projev sledovaného znaku) pokládáme bod 0 ležící uprostřed úsečky homozygotních párů alel A_1A_1 a A_2A_2 (obr. 5.3.). Hodnota d (heterozygotního páru A_1A_2) bude závislá na stupni dominance mezi alelami A_1 a A_2 . Pokud mezi alelami neexistuje žádná dominance, hodnota d se rovná 0 a jde o klasické aditivní působení genů. Pokud je A_1 dominantní vůči A_2 , hodnota d bude kladná, pokud je A_2 dominantní vůči A_1 , hodnota d bude záporná. Pokud mezi alelami existuje vztah úplné dominance, bude se d rovnat $+a$ nebo $-a$. Pokud mezi nimi existuje vztah neúplné dominance bude hodnota d ležet mezi 0 a $+a$ nebo 0 a $-a$ a v případě superdominance bude d větší než $+a$ nebo menší než $-a$.



Podmínky

$d = 0$ není-li mezi A_1 a A_2 žádný vztah dominance (d_1)

$0 < d < +a$ je-li A_1 neúplně dominantní vůči A_2 (d_2)

$d = +a$ je-li A_1 plně dominantní vůči A_2 (d_3)

$d > +a$ je-li mezi A_1 a A_2 vztah superdominance (d_4)

Obr. 5.3. Vyjádření genetické hodnoty heterozygotního alelického páru podle stupně dominance. Převzato od Falconera a Mackayho, 1996.

Variance dominance je s největší pravděpodobností zodpovědná za **heterózní efekt (heterózu)** a předpokládá se, že u některých druhů ryb (např. kapr obecný) se právě dominance podílí největší měrou na celkové genetické varianci hybridů.

Variance interakce zahrnuje genetické účinky vzniklé působením epistatických interakcí mezi geny. V polygenním systému se pravděpodobně vyskytuje mnohem širší spektrum interakcí rozličného typu ve srovnání s oligogeny. I přesto bychom měli mluvit spíše o interakcích statistické povahy. V praxi se počítá jen s interakcemi nižších řádů, především dvougenových, ostatní jsou pro svoji složitost opomíjeny.

U dvougenových interakcí můžeme pozorovat tři typy interakcí:

1) Epistatický vztah dvou lokusů s homozygotními alelickými páry (např. $A_1A_1B_1B_1$, $A_2A_2B_2B_2$, $A_2A_2B_1B_1$ nebo $A_1A_1B_2B_2$) s aditivními účinky – typ AA

2) Epistatický vztah dvou lokusů s heterozygotními alelickými páry ($A_1A_2B_1B_2$) s dominantními účinky – typ DD

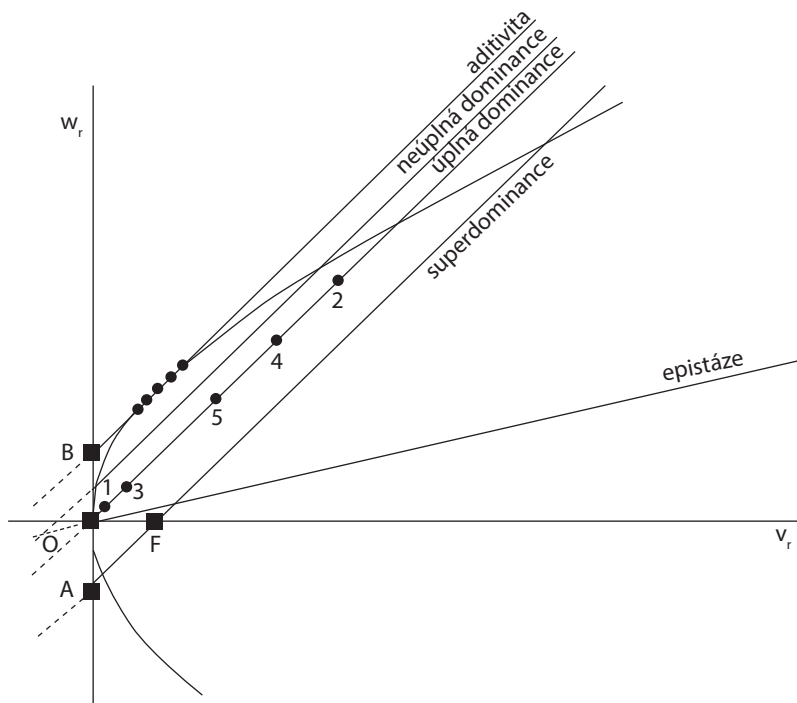
3) Epistatický vztah lokusů s homozygotním a heterozygotním alelickým párem (např. $A_2A_2B_1B_2$, $A_1A_1B_1B_2$, $A_1A_2B_2B_2$, $A_2A_2B_1B_1$) – typ AD

U třígenových systémů jsou čtyři možnosti (AAA, AAD, ADD, DDD), u čtyřgenových je 5 možností (AAAA, AAAD, AADD, ADDD, DDDD) atd. U interakcí polygenních systémů je velmi složité odhadnout množství variance, kterou generují. U jednoduchých experimentů je začleněna variance interakcí do

variance dominance, proto se obě variance společně označují jako neaditivní složka genetické variance. Nicméně pokud chceme kvantifikovat i tuto složku genetické variance, musíme vycházet z analýzy údajů získaných při schématu diallelního křížení (křížení všech skupin se všemi) (**tab. 5.3.** a **obr. 5.4.**).

Tab. 5.3. Schéma diallelního křížení pěti skupin (plemen, linií) a statistické parametry potřebné pro grafickou analýzu.

Testované skupiny a jejich kříženci						Variance řady kříženců	Kovariance řady kříženců	Průměr
	A	B	C	D	E			
A	A×A	A×B	A×C	A×D	A×E	V_{rA}	W_{rA}	$\bar{x}_1$
B	B×A	B×B	B×C	B×D	B×E	V_{rB}	W_{rB}	$\bar{x}_2$
C	C×A	C×B	C×C	C×D	C×E	V_{rC}	W_{rC}	$\bar{x}_3$
D	D×A	D×B	D×C	D×D	D×E	V_{rD}	W_{rD}	$\bar{x}_4$
E	E×A	E×B	E×C	E×D	E×E	V_{rE}	W_{rE}	$\bar{x}_5$



Poznámky: Se stoupajícím počtem recesivních alel stoupají hodnoty V_r a W_r a naopak. Poměr W_r/V_r souvisí se stupněm dominance. Při $W_r/V_r = 2$ není dominance přítomna, při $W_r/V_r = 1$ se jedná o úplnou dominanci a při $W_r/V_r < 1$ o superdominanci. Má-li přímka přibližně sklon 45° , není interakce přítomna.

Obr. 5.4. Odhad genetických charakteristik grafickou analýzou diallelního křížení. Potřebné hodnoty V_p (variance rodičů), V_r (variance řad kříženců s určitým rodičem), W_r (kovariance řad kříženců s určitým rodičem) se získají rozбором diallelní tabulky (tab.5.3.). Vzájemný vztah mezi těmito statistickými hodnotami je dán rovnicí $W_r^2 = V_r \cdot VP$. Tato rovnice paraboly vymezuje prostor, který zahrnuje všechny hodnoty W_r/V_r (Nečádek a Cetl, 1979).

5.2.4. Maternální variance

V některých případech při hodnocení kvantitativních znaků u potomstva zohledňujeme i tzv. maternální varianci, neboli varianci způsobenou vlivem matek (samic, u ryb také jikernaček). Tato variance se nachází na hranici mezi genetickou a negenetickou (environmentální) variancí, neboť se na ní podílejí obě složky. U savců je tento vliv mnohem výraznější a zahrnuje vlivy v období prenatalním i postnatalním. U ryb, koryšů a měkkýšů se maternální variance (**maternální efekt**) projevuje především ve velikosti a kvalitě jiker, které mají vliv na procento oplozenosti, líhivosti, odolnost váčkového plůdku a jeho počátečním růstu. Na zmiňovaných ukazatelích se největší měrou podílí celkový zdravotní stav jikernaček v období výtěru, stáří ryb, velikost jiker, obsah zásobních látek v jikře apod. Některé z těchto efektů mají genetický základ, některé jsou silně ovlivněny podmínkami prostředí.

Rozdíl ve vlivu velikosti jiker na počáteční růst plůdku byl prokázán u lososovitých ryb, tlamouna, sumečka skvrnitého i kapra obecného (Gjedrem, 2005). Jiní autoři tento vliv nepotvrdili (např. Vandeputte a kol., 2004). Obecně platí, že čím větší je průměrná velikost jiker, tím větší variabilita se v této velikosti vyskytuje a tím větší rozdíly v počátečním růstu plůdku můžeme očekávat. Maternální efekt se s věkem ryb výrazně redukuje, až ztrácí. Velikost maternální variance je také ovlivněna způsobem chovu či druhem ryb (koryšů, měkkýšů). U koryšů, či tlamounů (tilápií) se matky starají o své jikry (vajíčka) a pečují o narozené potomstvo. U těchto druhů je tedy možné předpokládat vyšší maternální efekt. Maternální efekt byl odhadnut ve výši 5 % z celkové fenotypové variance u plůdku lososa obecného ve stáří 190 dní, ale ve stáří 2 let byl podíl maternální variance již menší než 1 %. Maternální efekt u tlamounů byl odhadnut až ve výši 7–13 % z celkové fenotypové variance. Přesto je obecně maternální efekt pokládán za nevýznamný (Gjedrem, 2005).

5.3. Heritabilita

Heritabilita je jeden z nedůležitějších parametrů při šlechtitelské práci, zejména uvažujeme-li o selekčním programu. Heritabilita udává, jak velký podíl na celkové fenotypové varianci v populaci má genetická složka. Heritabilita neboli **dědivost** má pro každý znak v populaci jedinců nenahraditelnou a neopakovatelnou hodnotu. Vypočtená hodnota pro daný znak v populaci A za konkrétních jasně specifikovaných podmínek nemusí být platná pro stejný druh ryby v populaci B či C a dokonce ani v populaci A chované za jiných podmínek. Přesto se vypočtené hodnoty heritability určitého znaku např. hmotnosti u atlantského lososa v populaci A zobecňují a pokládají za platné pro celý druh. Hodnota zjištěná u populace A by měla být pokládána jen za možný předpoklad, že v populaci B či C tomu může být podobně. Před zahájením selekčního programu v populaci B či C by pro každou z nich měla být heritabilita odhadnuta zvlášť.

Heritabilitu kvantifikujeme **koeficientem heritability (h^2)**. V širším slova smyslu můžeme koeficient dědivosti vyjádřit jako podíl celkové genetické variability na fenotypové variabilitě:

$$h^2 = \sigma_g^2 / \sigma_p^2 \quad (7)$$

kde σ_g^2 je variance genetické složky a σ_p^2 je celková fenotypová variance.

Jelikož ale tato hodnota zahrnuje i varianci dominance a epistatických interakcí, které na selekci ne-reagují, využívá se heritabilita v širším smyslu jen u vysoce příbuzných jedinců s rodičovskými genotypy (tedy klonů, vysoce inbredních linií, mitotických gynogenů apod.).

Ve většině případů využíváme heritabilitu v užším slova smyslu, která udává podíl aditivní genetické variance na celkové fenotypové varianci.

$$h^2 = \sigma_A^2 / \sigma_p^2 \quad (8)$$

kde σ_A^2 je aditivní genetická variance a σ_p^2 je celková fenotypová variance.

Hodnoty koeficientu heritability mohou nabývat hodnot $0 \leq h^2 \leq 1$. Pokud zjištěná hodnota leží mimo tento interval, došlo při odhadu heritability k chybě. Pokud se zjištěná hodnota blíží 0, je podíl genetické variance (rozptyl) daného znaku v populaci nízký a více se uplatňují vlivy prostředí. V tomto případě je výhodnější zaměřit se na optimalizaci podmínek prostředí. Pokud je hodnota koeficientu heritability blízká k 1, je podíl genetické variance na projevu znaku značný a cílenou selekcí je možno danou vlastnost v populaci vylepšit (**tab. 5.4.**).

Tab. 5.4. Rozdělení heritability podle výše odhadnutého koeficientu (Minvielle, 1990).

Heritabilita	Hodnota h^2 sledovaného znaku	Účinek selekce na danou vlastnost	Optimalizace prostředí
Nízká	0–0,2	nízký	velmi účinná
Střední	0,2–0,4	dobrý	účinná
Vysoká	více než 0,4	velmi dobrý	méně účinná než neúčinná

Z výše uvedených skutečností o heritabilitě je možno konstatovat, že (Falconer a Mackay, 1996):

- heritabilita neměří množství, kterým geny ovlivňují vlastnost;
- heritabilita neměří relativní důsledky genů a prostředí na vlastnost;
- heritabilita nemá neměnný podíl v rámci druhu u různých populací a u stejných populací v různých prostředích;
- heritabilita není stejná pro všechny vlastnosti v populaci;
- heritabilita nevypovídá o hodnotě jedince;
- heritabilita je měřítkem velikosti variability genetické složky determinující danou vlastnost v populaci, tedy říká něco o různorodosti fenotypů;
- pokud se $h^2 = 0$, neznamená to, že vlastnost není geneticky ovlivněna. Všechny vlastnosti mají genetické pozadí, protože organizmy jsou vystaveny podle informací uchovaných v genech. V tomto případě je jen genetická variance (rozptyl) znaku v populaci nulový, znak je geneticky plně fixován a odchylky jsou způsobeny jen vlivem prostředí;
- pokud se $h^2 = 1$, neznamená to, že prostředí vlastnost neovlivňuje. Variance prostředí jen v daném konkrétním případě neovlivnila fenotypovou hodnotu v populaci. Změna prostředí může způsobit změnu v podílu rozptylu jednotlivých složek.

Odhady koeficientu heritability

V praxi pro odhad koeficientu heritability potřebujeme znát aditivní genetickou varianci příslušného kvantitativního znaku. Aditivní genetickou varianci můžeme stanovit s využitím statistických metod (např. „Animal model“) z fenotypových dat získaných při vhodně konstruovaných experimentech (**kapitola 5.6.**). Přesnější metodou je stanovení realizované heritability z výsledků selekčního pokusu (**kapitola 9.5.4.**). Přehled zjištěných koeficientů heritability u akvakulturních organizmů je znázorněn v **příloze 5.1.**

5.4. Heteróza

Heteróza je jev, který má úzkou návaznost na varianci neaditivní složky genetické proměnlivosti (σ^2_d a σ^2_i) a vyskytuje se zejména při křížení geneticky vzdálených plemen téhož druhu či inbredních linií. Tento jev, označovaný také jako **hybridní zdatnost** nebo **heterózní efekt**, se projevuje u organismu jako celku a jeho výsledkem je zlepšení celé řady fyziologických funkcí. Jeho nevýhodou je dočasnost, tzn. že se objevuje zpravidla jen u první filiální generace (F_1). Z tohoto důvodu je heterózy využíváno zejména pro produkci užitkových populací (určených pro konzumaci).

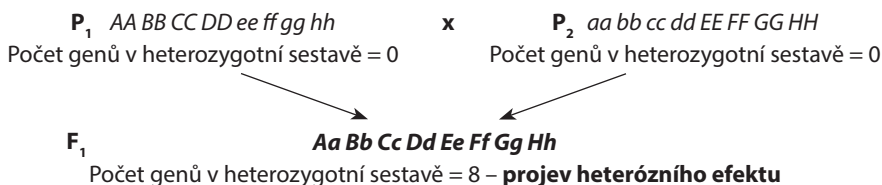
Na vysvětlení projevu hybridní zdatnosti existují dodnes tři hypotézy. Dvě z nich, **hypotéza dominance** a **heterozygotnosti** (superdominance), stály původně proti sobě, ale v současnosti jsou si blízké nebo se alespoň nevyklučují. Tou třetí je **hypotéza epistáze** (Moll a Stubber, 1974).

Hypotéza dominance vychází z aditivního působení genů se vztahy dominance uvnitř alelických párů, které se scházejí v hybridním genotypu generace F_1 ve větším počtu než v rodičovských genotypech. Hypotéza předpokládá, že geny zodpovědné za vitalitu a růst jsou dominantní a geny, které jsou škodlivé k jedinci samotnému, jsou recesivní. Křížením vhodných rodičů s rozdílnými sadami dominantních alel potomek následně vykazuje vysoký heterózní efekt (obr. 5.5.). Dle této teorie by mělo být možné heterózní efekt fixovat. O možnosti fixace lze uvažovat ale jen v případech, kdy je počet komplementárních genů malý. V úvodu této kapitoly bylo však řečeno, že počet genů a tedy alelických párů podílejících se na výsledném fenotypovém projevu je velký (několik desítek až set). Takže pravděpodobnost segregace žádoucích genotypů v F_2 generaci je velmi nízká (Tsafaris, 1995). Navíc je situace zkomplikována vazbou genů, přičemž příznivé dominantní alely jsou často vázány s nepříznivými alelami jiných genů a zvyšování homozygotnosti v populaci vyvolává naopak sníženou vitalitu ryb, tzv. inbrední depresi.



Obr. 5.5. Schématické znázornění vzniku heterózního efektu podle hypotézy dominance.

Teorie superdominance při projevu heterózního efektu předpokládá, že existují lokusy, i když relativně vzácné, které pokud se sejdou v heterozygotní sestavě u F_1 generace, způsobí vyšší vitalitu potomstva v porovnání s rodiči, kteří mají geny v homozygotní konstituci (obr. 5.6.). Takto získanou vlastnost však není možné fixovat použitím inbreedingu (Tsafaris, 1995). Uplatnění superdominance u kvantitativních znaků je velice obtížné prokázat, i když zdánlivá superdominance způsobená nealelickými interakcemi a ztrátou vazbové rovnováhy běžně přispívá k heteróze (Jinks, 1983). Hulata (1995) předpokládá, že hlavní roli v neaditivní genetické varianci u kapra obecného hraje právě superdominance.



Obr. 5.6. Schématické znázornění vzniku heterózního efektu podle hypotézy superdominance.

Výši heterózního efektu uvádíme většinou jako procentickou relativní hodnotu, která vyjadřuje podíl mezi průměrnou fenotypovou hodnotou sledovaného znaku u potomstva a fenotypovou hodnotou rodičů nebo spíše fenotypovými hodnotami rodičovských populací (podrobněji bude vysvětleno v kapitole o šlechtitelských programech) (Dvořák, 1992).

- Je-li průměrná hodnota sledovaného znaku u hybridů vyšší než průměrná hodnota znaku u výkonější rodičovské populace, mluvíme o **skutečném heterózním efektu**.

$$F_1 > P_1 > P_2 \text{ nebo } F_1 > P_2 > P_1$$

- Je-li průměrná hodnota sledovaného znaku u hybridů vyšší než hodnota získaná průměrem hodnot od obou rodičovských populací, mluvíme o **hypotetickém heterózním efektu**.

$$F_1 > \frac{P_1 + P_2}{2}$$

- Je-li průměrná hodnota sledovaného znaku u hybridů vyšší než průměrná hodnota mateřské populace, mluvíme o **obyčejném heterózním efektu**.

$$F_1 > P_1$$

- Je-li průměrná hodnota sledovaného znaku u hybridů vyšší než průměrná hodnota otcovské populace, mluvíme o **specifickém heterózním efektu**.

$$F_1 > P_2$$

- Je-li průměrná hodnota sledovaného znaku u hybridů nižší než průměrná hodnota horší rodičovské populace, mluvíme o **hybridní depresi**.

$$F_1 < P_1 < P_2 \text{ nebo } F_1 < P_2 < P_1$$

Kvalifikovaných odhadů heterózních efektů v akvakultuře dosáhneme u vhodně modelovaných experimentů nazývaných **testy užítkovosti**. Podle zvoleného typu křížení jsme schopni odhadovat jen některé z možných typů zmiňovaných heterózních efektů. Pozorované fenotypové hodnoty kříženců jsou navíc kombinací aditivní i neaditivní složky fenotypové variance, neboť je při některých typech křížení nejsme schopni od sebe při statistické analýze oddělit a především neznáme ani genetické pozadí rodičů. Ve šlechtitelské praxi tyto okolnosti zpravidla zanedbáváme a při projevu lepší užítkovosti u hybridů odlišných plemen či linií, např. u kapra obecného, hovoříme obecně o heterózním efektu. Komplexní analýzu jednotlivých složek fenotypové variance můžeme provést jen při dialelním křížení.

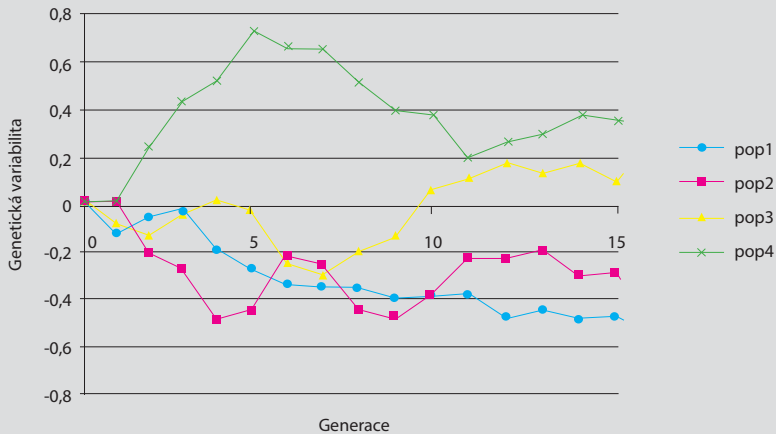
5.5. Inbreeding

Inbreeding je důsledkem rozmnožování příbuzných jedinců. Projevuje se ve více či méně uzavřených populacích o relativně nízkém počtu jedinců, jako jsou například generační hejna ryb na rybích farmách nebo u divokých populací, které jsou od ostatních populací stejného druhu izolovány bez možnosti migrací nebo jen s malým počtem migrací. Důsledkem inbreedingu je zvyšování homozygotnosti a pokles heterozygotnosti v populacích, čímž se zvyšuje riziko výskytu letálních či jinak nežádoucích genů v homozygotně recesivní sestavě. Tento jev se nazývá **inbrední deprese** a vede k celkovému poklesu **reprodukční zdatnosti (fitness)** – zhoršení fyziologických funkcí, schopnosti reprodukce, odolnosti atd.

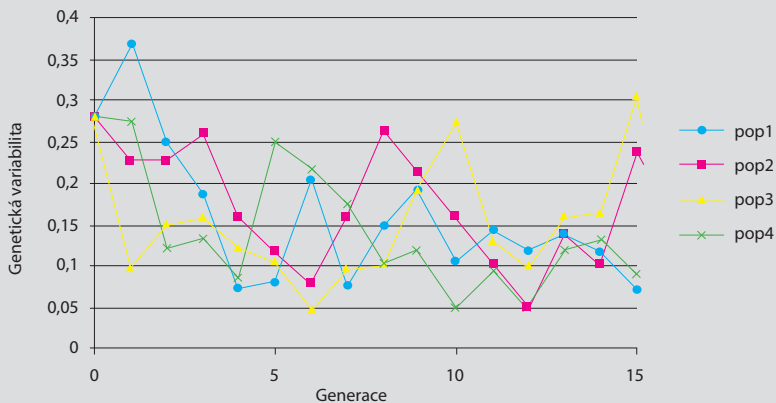
Při inbreedingu dochází ke změně genotypových frekvencí, ale ne ke změně frekvence alel. Inbreeding se v chovech ryb bezesporu běžně objevuje více než u jiných hospodářských zvířat. Vysoká reprodukční schopnost ryb totiž umožňovala zakládat generační hejna ryb jen z několika jedinců odchycených

z divokých populací. I dnes se běžně v chovatelské praxi pro obnovu generačních hejn používá nízký počet rodičů. Přes obecnou škodlivost může hrát inbreeding společně s dalšími faktory (genetický drift, selekce, mutace, migrace atd.) významnou roli při tvorbě nových plemen či linií (**příklad 5.5.**).

Příklad 5.5. Předpokládejme, že máme **idealizovanou populaci** s počáteční genetickou hodnotou 0 a genetickou variabilitou 0,3. Pokud z této populace vybereme 4 velmi malé subpopulace (10 samců a 10 samic), které budeme odděleně rozmnožovat, dojde s největší pravděpodobností ke změně četnosti alel (**genetickému driftu**) v selektovaných populacích. Po x -tém počtu generací budou mít některé populace vyšší genetickou hodnotu, jiné nižší, ale celková průměrná genetická hodnota všech populací se bude rovnat původní populaci, tedy 0 (**obr. 5.7.**). Dalším efektem bude zvyšování (rozdružňování) genetické variability mezi populacemi. Naopak variabilita uvnitř plemen se bude snižovat (**obr. 5.8.**). Oba tyto jevy – změna genetické hodnoty a změna genetické variability jsou přímým následkem inbreedingu. V konečném důsledku můžeme získat čtyři odlišné linie či plemena. (Převzato od Gjedrema, 2005).



Obr. 5.7. Změna genetické hodnoty v průběhu generací po genetickém driftu.

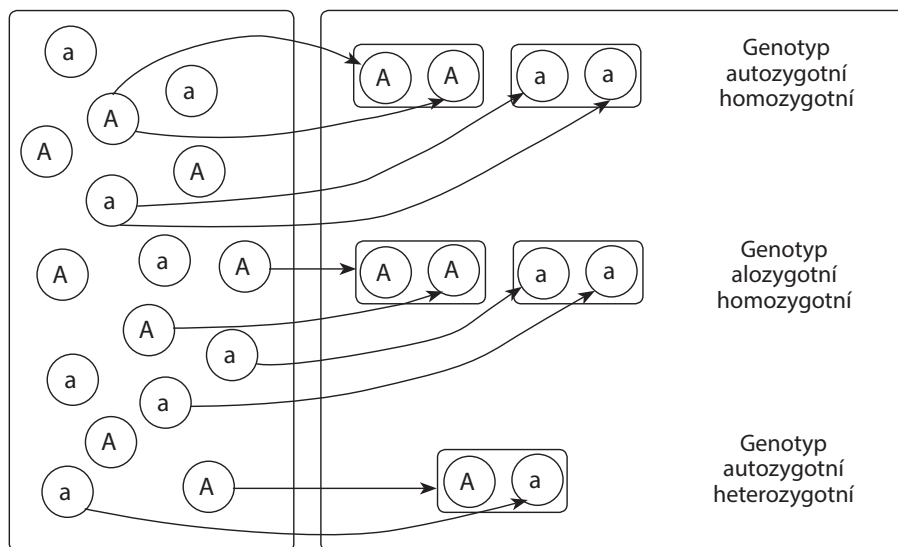


Obr. 5.8. Vývoj genetické variance uvnitř populací v průběhu generací po genetickém driftu.

Ryby, koryši a měkkýši jsou obecně k účinkům inbreedingu, tedy inbrední depresi, méně citlivé než vyšší organismy (ptáci, savci apod.). I přesto je nutno extrémním důsledkům inbreedingu předcházet, protože inbrední deprese může i v chovu ryb způsobit velké ekonomické ztráty. Stupeň inbreedingu vyjadřujeme **koeficientem inbreedingu ΔF** (viz kapitola 2.2.). Koeficient inbreedingu udává pravděpodobnost, s jakou jsou dvě alely na jednom lokusu u daného jedince stejného původu (tedy, že obě pochází od stejného předka). Z tohoto hlediska rozlišujeme alely jednoho alelického páru (na jednom lokusu) jako **autozygotní** a **alloyzgotní**. Autozygotní alely jsou identické podle původu, tzn. že vznikly replikací jedné alely v jednom ze společných předků. Alloyzgotní jsou takové, které nepochází z replikace jediné alely společného předka. Vztah alel v genotypech nové populace vzhledem k původní je vyjádřen schematicky na obr. 5.9.

Jak již bylo dříve naznačeno, v akvakultuře bývá efektivní velikost populace malá kvůli vysoké reprodukční schopnosti chovaných organismů. Velmi důležitý je také poměr mezi použitými samci a samicemi. **Efektivní velikost populace (N_e)** můžeme vyjádřit vzorcem (viz kapitola 2.2.), ze kterého je patrné, že pokud k reprodukci využijeme pouze jednu samici nebo jednoho samce, nebude efektivní velikost populace nikdy větší než 4, bez ohledu na to, kolik jedinců druhého pohlaví se reprodukce zúčastní. Z obecného hlediska je nejvýhodnější používat k reprodukci stejný počet samců i samic, protože pak se efektivní velikost populace rovná počtu použitých jedinců. Z praktického hlediska není ale vždy toto řešení možné, a proto se doporučuje použít co nejvyrovnanější poměr pohlaví, protože s ohledem na efektivní velikost populace jen velmi těžce nahradíme malý počet jedinců jednoho pohlaví velkým počtem jedinců pohlaví druhého.

Je zřejmé, že v uzavřených populacích plemenných ryb se při šlechtitelské práci postupnému inbreedingu a ztrátě genetické variability jen těžko ubráníme. Správným managementem můžeme ale inbreeding zpomalit. Mezi nejdůležitější opatření patří:



Obr. 5.9. Vztah alel v genotypech nové populace vzhledem k původní
(Převzato z Urban, <http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/pop/popul6.html>).

- Používat pro obnovu generačních ryb a pro tvorbu rodičovských populací co nejvíce rodičů s poměrem pohlaví blížícím se 1 : 1. Jako obecné pravidlo pro minimální efektivní velikost populace v akvakultuře se uvádí $N_e = 100$, což představuje koeficient inbreedingu na úrovni 0,5 % za jednu generaci.
- Používat od každé matky při obnově populací přibližně stejné množství jiker (podle váhy či objemu) a směsný vzorek těchto jiker proporcionálně rozdělit na počet skupin odpovídající počtu otců a provést individuální oplození. Tímto postupem zajistíme maximálně možný počet rodin v budoucí populaci a omezíme nadprůměrné prosazení otců s nejkvalitnějším spermatem.
- Vybírat vyrovnaný počet jedinců obojího pohlaví pro účely reprodukce z co nejvíce různých rodin. Tento systém je však možný jen v případech, kdy máme údaje z rodokmenu. V běžné praxi máme tyto údaje k dispozici jen ojediněle, a proto se doporučuje (nejedná-li se o selekční programy) provádět alespoň náhodný výběr budoucích rodičů z remontních hejn bez jakýchkoliv selekčních kritérií (eliminují se pouze mínus varianty jedinců, tedy jedinci ve špatném zdravotním stavu, s deformacemi, s atypickým tvarem těla apod.).
- Přidávat do generačních hejn jedince nepříbuzné (z divokých populací, jiných nepříbuzných hejn apod.). To lze jen v případech, kdy známe původ jedinců, aby nedošlo ke smíchání dvou odlišných plemen či linií a je potřeba počítat se skutečností, že u populací selektovaných pro určité vlastnosti může dojít zařazením nových jedinců ke ztrátě genetické hodnoty této populace.

5.6. Odhady parametrů fenotypové a genetické variance

Pro účely šlechtitelské práce je velmi důležité vědět, jak se na projevu sledovaného užitkového znaku podílejí jednotlivé složky fenotypové variance. Podle výše odhadů jednotlivých parametrů lze usuzovat na úspěch použitých šlechtitelských metod či uvažovat o změně podmínek prostředí. Ze šlechtitelského hlediska je nejdůležitější oddělit varianci genetickou od variance způsobené prostředím. U většiny kvantitativních znaků je genetická variance založena na varianci aditivní složky, a proto je její vyčíslení nejdůležitější. Vyčíslení aditivní genetické variance je možno provést na základě podobnosti mezi příbuznými jedinci. Konkrétně se porovnávají pozorované (statistické) kovariance mezi fenotypovými hodnotami jedinců v populaci s využitím statistických metod. K odhadu biologických variancí jednotlivých složek (např. aditivní genetické variance) se využívají statistické variance jednotlivých složek. Tyto složky se odhadují z fenotypových hodnot analýzou variance (ANOVA) s využitím genetických tříd (např. otce, matky apod.).

V této souvislosti je potřeba si uvědomit rozdíl mezi pozorovanou (statistickou) variancí jednotlivých komponentů, které jsou odvozeny ze statistických odhadů, a biologickou variancí složek, které se vztahují k jednotlivým efektům daného genetického modelu. Otázkou zůstává, za jakých podmínek je kovariance mezi příbuznými jedinci totožná se skutečnou genetickou variancí v populaci? Pro příklad uveďme vztah mezi dvěma příbuznými jedinci. Fenotypovou kovarianci těchto jedinců můžeme vyjádřit jako:

$$\sigma_{PxPy} = \sigma_{GxGy} + \sigma_{ExEy} + \sigma_{GxEy} + \sigma_{GyEx} \quad (9)$$

kde σ_{PxPy} je fenotypová kovariance mezi jedinci X a Y, σ_{GxGy} je genetická kovariance mezi jedinci, σ_{ExEy} je kovariance prostředí mezi jedinci, σ_{GxEy} a σ_{GyEx} jsou kovariance mezi genotypem jednoho jedince a prostředím druhého (Gjedrem, 2005).

Abychom mohli pokládat fenotypovou kovarianci za výsledek genetické kovariance, musí platit, že variance σ_{ExEy} , σ_{GxEy} a σ_{GyEx} nejsou průkazně odlišné od 0. Pokud tomu tak není, může při odhadu genetické kovariance dojít k chybě.

5.6.1. Odhad aditivní genetické variance užitím kovariance mezi rodičem a potomkem

$$\sigma_A^2 = 2 \cdot \sigma_{PoPp} \quad (10)$$

kde σ_A^2 je aditivní genetická variance, σ_{PoPp} je fenotypová kovariance mezi potomkem a rodičem (Gjedrem, 2005).

Odhad v tomto případě může být ovlivněn variancí interakcí mezi geny a v případě výpočtu na základě fenotypových hodnot mezi matkou a potomkem i maternálním efektem. Tento model se rovněž nedoporučuje používat v případech, kdy jsou rodiče selektováni, protože v tomto případě dochází ke snížení fenotypové kovariance mezi rodičovskými fenotypy, následně ke snížení kovariance mezi rodiči a potomstvem a výsledná genetická variance pak může být podhodnocena (Gjedrem, 2005).

5.6.2. Odhad aditivní genetické variance regresí fenotypové hodnoty potomků na fenotypovou hodnotu rodičů

$$\sigma_A^2 = \sigma_P^2 \cdot 2b_{o/s} \text{ nebo } \sigma_A^2 = \sigma_P^2 \cdot 2b_{o/D} \quad (11)$$

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (12)$$

kde σ_A^2 je aditivní genetická variance, σ_P^2 je fenotypová variance v populaci, $b_{o/s}$ a $b_{o/D}$ je regresní koeficient potomka na fenotypovou hodnotu otce nebo matky, x_i je fenotypová hodnota rodiče, y_i fenotypová hodnota potomka, $\bar{x}$ je průměrná fenotypová hodnota rodičovské populace, $\bar{y}$ je průměrná fenotypová hodnota potomků (Gjedrem, 2005).

Výhodou tohoto modelu je skutečnost, že odhad v tomto případě není ovlivněn selekcí rodičů, ale potomstvo musí zůstat neselektováno a rozmnožování nesmí být asortativní (výběrové). Stále ale zůstává možnost ovlivnění výsledku variancí epistatických interakcí a kovariancí prostředí a kovariancí mezi vlivy genetickými a prostředím. U druhů s předpokládaným maternálním efektem je vhodnější používat regresí potomků vůči otcům (Gjedrem, 2005).

5.6.3. Odhad aditivní genetické variance užitím fenotypové kovariance mezi sourozenci

Odhady složek fenotypové variance jsou při využití tohoto modelu nejpřesnější a nejflexibilnější. Výhodou této metody je, že je prováděna z dat získaných u jedné generace v jednom čase a ze stejného důvodu je vhodnější i při odhadu parametrů jateční výtěžnosti. Přesnost odhadu je však závislá na zvoleném schématu páření (křížení) rodičů. Pro přesnost odhadu je nutno využít v rámci technických možností co největší počet rodičů a získat od nich co nejvíce skupin sourozenců a polosourozenců. U druhů s možností umělého výtěru je tato situace mnohem jednodušší, u mnoha akvakulturních druhů není však technika umělého výtěru zvládnuta. V tom případě je nezbytné volit jiné způsoby páření jednotlivých rodičů. Dalším faktorem pro volbu typu schématu páření je skutečnost, zda jsme schopni zajistit synchronizovaný výtěr, počet dostupných rodičů od každého pohlaví a také pro který znak chceme aditivní genetickou variance odhadnout (Gjedrem, 2005).

Podle systému páření rodičů (tvorby rodin) rozeznáváme čtyři základní schémata (Gjedrem, 2005):

- 1. **Schéma jednotlivých párů** (*angl. Single pairs design*)
- 2. **Schéma hierarchické** (*angl. Nested design*)
- 3. **Schéma faktoriální** (*angl. Full factorial design*)
- 4. **Schéma částečně faktoriální** (*angl. Partly factorial design*)

Schéma jednotlivých párů je nejjednodušší způsob, při kterém jsou spermatem jednoho samce (otce) oplodněny jikry jedné samice (matky). Výsledkem jsou jen skupiny vlastních sourozenců (sourozenci s oběma stejnými rodiči) bez vzájemných příbuzenských poměrů (obr. 5.10.). Při tomto schématu nemohou být jednotlivé složky fenotypové variance přesně odhadnuty, protože dochází k jejich překrývání a nelze je statisticky oddělit. Toto schéma lze použít jen v případě, kdy očekáváme nízké hodnoty neaditivní genetické variance a jiných efektů než aditivní variance (Gjedrem, 2005).

Matky	Otcové				
	1	2	3	4	5
1					
2					
3					
4					
5					

$$\sigma_{fs}^2 = \frac{1}{2} \sigma_{fs}^2 + \frac{1}{4} \sigma_D^2 + \sigma_M^2 + \sigma_c^2$$
$$\sigma_A^2 = 2\sigma_{fs}^2$$

Obr. 5.10. Způsob páření rodičů při schématu jednotlivých párů a odhad jednotlivých parametrů.

Schéma hierarchické se běžně používá ve šlechtitelských programech ryb. Při tomto schématu je sperma jednoho otce použito k oplození jiker několika matek (obr. 5.11.). Vznikají skupiny vlastních sourozenců i polosourozenců (skupiny sourozenců s jedním stejným rodičem). Počet skupin vlastních sourozenců je roven počtu použitých matek, počet skupin polosourozenců je roven počtu použitých otců. Při tomto schématu se variance otců a matek rovná čtvrtině aditivní genetické variance, ale u matek může být odhad zkreslen neaditivní genetickou variancí, maternální variancí a v případě odděleného chovu skupin vlastních sourozenců do skupinového označení i vlivem podmínek prostředí. Ve výjimečných případech můžeme použít opačné hierarchické schéma, tedy rozdělení jiker jedné matky na více porcí a oplození každé porce spermatem jednoho otce. V tomto případě bude odhad aditivní genetické variance méně přesný, protože může být ovlivněn maternálním efektem (Gjedrem, 2005).

Matky	Otcové		
	1	2	3
1			
2			
3			
4			
5			
6			

$$\sigma_s^2 = \frac{1}{4} \sigma_A^2$$
$$\sigma_d^2 = \frac{1}{4} \sigma_A^2 + \frac{1}{4} \sigma_D^2 + \sigma_M^2 + \sigma_c^2$$
$$\sigma_A^2 = 4\sigma_s^2$$

Obr. 5.11. Způsob páření rodičů při hierarchickém schématu a odhad jednotlivých parametrů.

Při **schématu plného faktoriálního křížení** je sperma každého otce použito k oplození jiker více matek a zároveň jsou jikry každé matky rozděleny na více porcí a oplozeny spermatem více otců (obr. 5.12.). Opět získáme skupiny vlastních sourozenců i polosourozenců. Počet skupin vlastních sourozenců odpovídá součinu použitých matek a otců. Počet skupin polosourozenců se společným otcem je roven počtu použitých samic a počet skupin polosourozenců se společnou matkou je roven počtu použitých samců (Gjedrem, 2005). Toto schéma je nejvhodnější vzhledem k přesnosti odhadovaných hodnot aditivní i neaditivní genetické variance. Nevýhodou faktoriálního schématu je nižší počet testovaných rodičů, který je omezen dostupností odchovných ploch (nádrží) atd., nebo musíme používat drahé metody určování původu potomků s využitím metod molekulární biologie, kdy držíme více rodin ve společných obsádkách.

Matky	Otcové				
	1	2	3	4	5
1					
2					
3					
4					
5					

$$\begin{aligned}\sigma_s^2 &= \frac{1}{4} \sigma_A^2; \sigma_d^2 = \frac{1}{4} \sigma_A^2 + \sigma_M^2 \\ \sigma_{sd}^2 &= \frac{1}{4} \sigma_D^2 + \sigma_C^2 \\ \sigma_A^2 &= 4\sigma_s^2; \sigma_D^2 = 4\sigma_d^2 \\ \sigma_M^2 &= \sigma_d^2 - \sigma_s^2\end{aligned}$$

Obr. 5.12. Způsob páření rodičů při plném faktoriálním schématu a odhad jednotlivých parametrů.

Částečně faktoriální schéma můžeme využít jako vhodnou alternativu mezi hierarchickým a plně faktoriálním schématem (obr. 5.13.). Vzhledem k počtu odchovných ploch jsme schopni otestovat více rodičů než u faktoriálního křížení a na druhou stranu dosáhneme lepšího příbuzenského propojení mezi skupinami sourozenců a polosourozenců oproti hierarchickému schématu (Gjedrem, 2005).

Matky	Otcové				
	1	2	3	4	5
1					
2					
3					
4					
5					

Obr. 5.13. Způsob páření rodičů při částečně faktoriálním schématu.

5.6.4. Odhad míry závislosti mezi kvantitativními znaky – kovariance, korelace a regrese

Při statistických analýzách fenotypových dat kvantitativních znaků a pro účely šlechtitelské práce, zvláště pro selekční postupy, je důležité znát vzájemnou závislost dvou či více kvantitativních znaků. Vztah mezi dvěma znaky X a Y může být vyjádřen jako **kovariance** (cov_{xy}), **korelace** (r_{xy}) nebo **regrese** (b_{xy}) (Gjedrem, 2005). **Kovarianci** je možno vyjádřit rovnicí:

$$cov_{xy} = \Sigma(X - \bar{X})(Y - \bar{Y})/N - 1 \quad (13)$$

kde X a Y jsou fenotypové hodnoty kvantitativních znaků a N je počet pozorování

Korelace (r_{xy}) vyjadřuje podíl kovariance k součinu směrodatných odchylek znaků X a Y a patří mezi nejpoužívanější parametry.

$$r_{xy} = cov_{xy} / \sigma_x \sigma_y = \Sigma(X - \bar{X})(Y - \bar{Y}) / \sqrt{(\Sigma d_x^2)(\Sigma d_y^2)} \quad (14)$$

kde d_x a d_y jsou rozdíly hodnoty znaku X , respektive Y od průměru.

Koeficient regrese znaku X na znaku Y vyjádříme rovnicí:

$$b_{xy} = cov_{xy} / \sigma_x^2 = \Sigma d_{xy} / \Sigma d_x^2, \text{ jednoduchá regresní rovnice je pak } Y = a + b_{xy}X. \quad (15, 16)$$

Závislost dvou znaků ve šlechtitelské práci vyjadřovaná zpravidla jako korelace je způsobena genetickou kovariancí i kovariancí prostředí. Proto můžeme při znalosti potřebných dat odhadnout **korelaci genetickou i fenotypovou**. Odhad se provádí podobným způsobem jako při odhadu jednotlivých složek fenotypové variance u jednoho znaku. Genetická i fenotypová korelace nabývají hodnot v intervalu od **-1** do **1**. Hodnoty blízké **1** znamenají vysoký stupeň pozitivní závislosti jednoho znaku na druhém (tzn. při zvyšování hodnoty jednoho znaku se zvyšuje i hodnota druhého znaku). Hodnoty blízké **-1** znamenají vysoký stupeň negativní závislosti jednoho znaku na druhém (tzn. při zvyšování hodnoty jednoho znaku se snižuje hodnota druhého znaku). Při hodnotách kolem **0** jsou oba znaky na sobě nezávislé.

Příkladem vysoké kladné genetické korelace je závislost hmotnosti na délce těla. U pstruha duhového i u kapra obecného byla korelace u těchto znaků odhadnuta na úrovni 0,98 (Gunnæs a Gjedrem, 1978; Vandeputte a kol., 2004.). Hodnoty korelací mezi znaky se liší v závislosti na druhu ryby i experiment od experimentu.

LITERATURA

- Ankorion, Y., Moav, R., Wohlfarth, G.W., 1992. Bidirectional mass selection for body shape in common carp. *Genetique, Selection, Evolution* 24: 43–52.
- Benzie, J.A.H., Kenway, M., Trott, L., 1997. Estimates for the heritability of size in juvenile *Penaeus monodon* prawns from half-sib matings. *Aquaculture* 152: 49–53.
- Bolivar, R., 1999. Estimation of response to within-family selection for growth in Nile tilapia. *Dissertation Abstracts International Part B: Science and Engineering*: 60 (3): 934.
- Bongers, A.B.J., Ben-Ayed, M.Z., Doulabi, B.Z., Komen, J., Richter, C.J.J., 1997. Origin of variation in isogenic, gynogenetic, and androgenetic strains of common carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Experimental Zoology* 277: 72–79.
- Crenshaw, J.W., Jr., Heffernan, P.B., Walker, R.L., 1991. Heritability of growth rate in the southern bay scallop (*Argopecten irradians concentricus*, Say 1822). *Journal of Shellfish Research* 10: 55–63.
- Davis, C.V., 2000. Estimation on narrow-sense heritability for larval and juvenile growth traits in selected and unselected sub-lines of eastern oysters, *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* 19: 613.
- Dvořák, J., 1992. *Genetika hospodářských zvířat*. VŠZ Brno, 268 s.
- Eknath, A.E., Dey, M.M., Rye, M., Gjerde, B., Abella, T.A., Sevilleja, R., Tayamen, M.M., Reyes, R.A., Bentsen, H.B., 1998. Selective breeding of Nile tilapia for Asia. *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production* 27: 89–96.
- El-Ibiary, H.M., Joyce, J.A., 1978. Heritability of body size traits, dressing weight and lipid content in channel catfish. *Journal of Animal Science* 47: 82–88.
- Elvingson, P., Nilsson, J., 1992. Phenotypic and genetic parameters of body and compositional traits in Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Dr. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden*, 1–13 pp.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. *Introduction to quantitative genetics*. 4th edition. Longman, Harlow, UK, 464 pp.
- Fjalestad, K.T., Gjedrem, T., Carr, W.H., Sweeney, J.N., 1997. Final report: the shrimp breeding program. Selective breeding of *Penaeus vannamei*. *AKVAFORSK Rep. No. 17/97*, 85 pp.
- Gall, G.A.E., Huang, N., 1988. Heritability and selection schemes for rainbow trout: body weight. *Aquaculture* 73: 43–56.
- Gall, G.A.E., Bakar, Y., 2002. Application of mixed-model techniques to fish breed improvement: analysis of breeding-value selection to increase 98-day body weight in tilapia. *Aquaculture* 212: 93–113.
- Gjedrem, T., 2005. *Selection and breeding programs in aquaculture*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 364 pp.
- Gjedrem, T., Gjøslen, H.M., 1995. Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to furunculosis, BKD and coldwater vibriosis. *Aquaculture Research* 26: 129–134.
- Gjedrem, T., Salte, R., Gjøslen, H.M., 1991. Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon to furunculosis. *Aquaculture* 97: 1–6.
- Gjerde, B., 1984. Response to individual selection for age at sexual maturity in Atlantic salmon. *Aquaculture* 38: 229–240.
- Gjerde, B., 1986. Growth and reproduction in fish and shellfish. *Aquaculture* 57: 37–55.
- Gjerde, B., Gjedrem, T., 1984. Estimates of phenotypic and genetic parameters for carcass traits in Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture* 36: 97–110.
- Gjerde, B., Schaeffer, L.R., 1989. Body traits in rainbow trout. II. Estimates of heritabilities and phenotypic and genetic correlations. *Aquaculture* 80: 25–44.

- Gjerde, B., Roer, J.E., Lein, I., Stoss, J., Refstie, T., 1997. Heritability for body weight in farmed turbot. *Aquaculture International* 5: 175–178.
- Gjerde, B., Terjesen, B.F., Barr, Y., Lein, I., Thorland, I., 2004. Genetic variation for juvenile growth and survival in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 239: 167–177.
- Gunnes, K., Gjerdem, T., 1978. Selection experiment with salmon IV. Growth of Atlantic salmon during two years in the sea. *Aquaculture* 24: 161–174.
- Haley, L.E., Newkirk, G.F., Waugh, D.W., Doyle, R.W., 1975. A report on the quantitative genetics of growth and survivalship of the American oyster, *Crassostrea virginica* under laboratory conditions. In: 10th Eur. Symp. Mar. Biol., Ostend, Belgium, September 17–23, 1: 221–228.
- Heffernan, P.B., Walker, R.L., Ryan, M., 1993. Second heritability estimate of growth rate in the southern bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (Say 1829). *Journal of Shellfish Research* 12: 151.
- Hulata, G., 1995. A review of genetic improvement of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and other cyprinids by crossbreeding, hybridization and selection. In: Billard, R., Gall, G.A.E. (Eds), *The Carp Symposium*, September 6–8, 1993, Budapest, Hungary. *Aquaculture* 129: 143–155.
- Chevassus, B., Dorson, M., 1990. Genetics of resistance to disease in fishes. *Aquaculture* 85: 83–107.
- Ibarra, A.M., Ramirez, J.L., Ruiz, C.A., Cruz, P., Avila, S., 1999. Realized heritabilities and genetic correlation after dual selection for total weight and shell width in Catarina scallop (*Argopecten ventricosus*). *Aquaculture* 175: 227–241.
- Jarayabhand, P., Thavorniyutikarn, M., 1995. Realized heritability estimation on growth rate of oyster, *Saccostrea cucullata* Born, 1778. *Aquaculture* 138: 111–118.
- Jarimopas, P., 1990. Realized response of Thai red tilapia to 5 generations of size-specific selection for growth. *Proceedings of the second Asian fisheries forum*, Tokyo, Japan, April 17–22, pp. 519–522.
- Jinks, J.L., 1983. Biometrical genetics of heterosis. In: Frankel, R. (Ed.), *Heterosis-reappraisal of theory and practice*. Springer Berlin Heidelberg, New York, USA, 290 pp.
- Jonasson, J., Stefansson, S.E., Gudnason, A., Steinarsson, A., 1999. Genetic variation for survival and shell length of cultured red abalone (*Haliotis rufescens*) in Iceland. *Journal of Shellfish Research* 18: 621–625.
- Kause, A., Ritola, O., Paananen, T., Mantysaari, E., Eskelinen, U., 2003. Selection against early maturity composition: a quantitative genetic analysis in rainbow trout. *Aquaculture* 211: 65–79.
- Kinghorn, B.P., 1983. Genetic variation in food conversion efficiency and growth in rainbow trout. *Aquaculture* 32: 141–155.
- Kirpichnikov, V.S., 1999. *Genetics and Breeding of Common Carp*. INRA Editions, Paris, 97 pp.
- Kocour, M., Mauger, S., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., Vandeputte, M., 2007. Heritability estimates for processing and quality traits in common carp (*Cyprinus carpio*) using a molecular pedigree. *Aquaculture* 270: 43–50.
- Lannan, J., 1972. Estimating heritability and predicting response to selection for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 62: 62–66.
- Minvielle, F., 1990. *Principes d'amélioration génétique des animaux domestiques*. INRA, Paris, France, 211 pp.
- Moav, R., Wohlfarth, G., 1976. Two way selection for growth rate in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genetics* 82: 83–101.
- Moll, R.H., Stuber, C.W., 1974. Quantitative genetics – empirical results relevant to plant breeding. In: Brady, N.C. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, San Francisco, USA, pp. 277–313.
- Nečásek, J., Cetl, I., 1979. *Obecná genetika*. 1. vydání. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 565 s.

- Nenashev, G.A., 1966. The determination of heritability of different characters in fishes. *Genetika* 11: 100–108.
- Nenashev, G.A., 1969. Heritability of some selective characters in Ropsha carp. *Izvestija Gosudarstvennovo Nauchno-isledovatelskovo Instituta Ozerovo i Rybnovo Hosajstva (GOSNIORH)* 65, 185–195.
- Nilsson, J., 1992. Genetic variation in resistance of Arctic char to fungal infection. *Journal of Aquatic Animal Health* 4: 36–47.
- Ponzoni, R.W., Hamzah, A., Tan, S., Kamaruzzaman, N., 2005. Genetic parameters and response to selection for live weight in the GIFT strain of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 247: 203–210.
- Reagan, R.E., 1979. Heritability and genetic correlations of desirable commercial traits in channel catfish. Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station Research Report 5 (4), Mississippi State University, MS, USA. 1–4 pp.
- Rye, M., Refstie, T., 1995. Phenotypic and genetic parameters of body size traits in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Research* 26: 875–885.
- Rye, M., Gjerde, B., 1996. Phenotypic and genetic parameters of composition traits and flesh colour in Atlantic salmon. *Aquaculture Research* 27: 121–133.
- Rye, M., Lillevik, K.M., Gjerde, B., 1990. Survival in early life of Atlantic salmon and rainbow trout: estimates of heritabilities and genetic correlations. *Aquaculture* 89: 209–216.
- Rye, M., Storebakken, T., Gjerde, B., Ulla, O., 1994. Efficient selection for colour in Atlantic salmon. *Norsk Fiskeoppdrett* 11A: 22–24.
- Saillant, E., Dupont-Nivet, M., Haffray, P., Chatain, B., 2006. Estimates of heritability and genotype-environment interactions for body weight in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) raised under communal rearing conditions. *Aquaculture* 254: 139–147.
- Silverstein, J.T., Bosworth, B.G., Waldbieser, G.C., Wolters, W.R., 2001. Feed intake in channel catfish: is there a genetic component? *Aquaculture Research* 32 (Suppl. 1): 199–205.
- Smíšek, J., 1979. Výzkum exteriéru, heritability a biochemických hodnot v genetice kapra v ČSSR. *Bulletin VÚRH Vodňany* 15 (1): 3–12.
- Suarez, J.A., Gitterle, T., Angarita, M.R., Rye, M., 1999. Genetic parameters for harvest weight and pond survival in *Litopenaeus vannamei*. European Aquaculture Society, Special Publication. No. 27, June 1999: 232–233.
- Tanck, M.W.T., Vermeulen, K.J., Bovenhuis, H., Komen, H., 2001. Heredity of stress-related cortisol response in androgenetic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 199: 283–294.
- Tave, D., Smithermann, R.O., 1980. Predicted response to selection for early growth in *Tilapia nilotica*. *Transactions of the American Fisheries Society* 109: 439–445.
- Toro, J.E., Newkirk, G.F., 1991. Response to artificial selection and realized heritability estimate for shell height in the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Aquatic Living Resources* 4: 101–108.
- Tsaftaris, S.A., 1995. Molecular aspects of heterosis in plants. *Physiologia Plantarum* 94: 362–370.
- Urban, T., [online]. Virtuální svět genetiky 3 – principy genetiky populací a kvantitativních znaků. <<http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/index.html>> Navštíveno 1. června 2012.
- Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., De Guerry, D., Rodina, M., Gela, D., Vallod, D., Chevassus, B., Linhart, O., 2004. Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 235: 223–236.
- Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S., Rodina, M., Launay, A., Gela, D., Dupont-Nivet, M., Hulák, M., Linhart, O., 2008. Genetic variation for growth at one and two summers of age in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): Heritability estimates and response to selection. *Aquaculture* 277: 7–13.

Příloha 5.1. Odhady heritability kvantitativních znaků u některých druhů živočichů chovaných v akvakultuře.

$\bar{X}$ – průměrná hodnota; **CV** – variační koeficient; (O) – výpočet podle komponentů variance otců; (M) – výpočet podle komponentů variance matek; **S.E.** – střední chyba; **Odhad** – h^2 byl odhadován z dat příbuzných jedinců;

Realizovaná – h^2 byl odhadován z výsledků selekčního experimentu. Převzato od Gjedrem (2005), doplněno.

Znak	X	CV	$h^2 \pm S.E.$	Metoda	Autor / Autoři
Losos obecný					
Hmotnost (kg)	6,6	29	(O) $0,35 \pm 0,10$ (M) $0,32 \pm 0,09$	Odhad	Rye a Refstie (1995)
Výtěžnost (%)	90	4	(O) $0,03 \pm 0,02$ (M) $0,02 \pm 0,02$	Odhad	Gjerde a Gjedrem (1984)
	93,6	1	(O) $0,20 \pm 0,07$ (M) $0,18 \pm 0,08$	Odhad	Rye a Gjerde (1996)
Barva masa (body)	3,6	16	(O) $0,01 \pm 0,03$ (M) $0,17 \pm 0,04$	Odhad	Gjerde a Gjedrem (1984)
	3,3	18	(O) $0,09 \pm 0,05$ (M) $0,16 \pm 0,08$	Odhad	Rye a Gjerde (1996)
	7,7	18	(O) $0,47 \pm 0,13$	Odhad	Rye a kol. (1994)
Obsah tuku (%)	15,6	16	(O) $0,30 \pm 0,09$ (M) $0,38 \pm 0,10$	Odhad	Rye a Gjerde (1996)
Kondiční faktor	1,21	13	(O) $0,31 \pm 0,09$ (M) $0,30 \pm 0,09$	Odhad	Rye a Gjerde (1996)
Přežití (%)			(O) $0,08 \pm 0,02$	Odhad	Rye a kol. (1990)
Odolnost vůči furunkulóze			(O) $0,48 \pm 0,17$	Odhad	Gjedrem a kol. (1991)
			(O) $0,16 \pm 0,12$	Odhad	Gjedrem a Gjœen (1995)
Věk pohlavního dospívání			(O) $0,48 \pm 0,20$	Realizovaná	Gjerde (1984)
			(O) $0,20$	Odhad	Gjerde a Gjedrem (1984)
			(O) $0,07$	Odhad	Gjerde (1986)
Pstruh duhový					
Hmotnost při dospívání (kg)	1,9	25	(O) $0,20 \pm 0,10$ (M) $0,57$	Odhad	Gall a Huang (1988)
Hmotnost ve věku 2,5 let (kg)	3,4	21	(O) $0,21$ (M) $0,41$	Odhad	Gjerde a Schaeffer (1989)
Výtěžnost (%)	83,3	6	(O) $0,01 \pm 0,05$ (M) $0,14 \pm 0,07$	Odhad	Gjerde a Gjedrem (1984)
	87,3	2	(O) $0,36$ (M) $0,42$	Odhad	Gjerde a Schaeffer (1989)
Barva masa (body)	4,3	15	(O) $0,27$ (M) $0,29$	Odhad	Gjerde a Schaeffer (1989)
	3,4	23	(O) $0,06 \pm 0,08$ (M) $0,28 \pm 0,09$	Odhad	Gjerde a Gjedrem (1984)
Kondiční faktor	1,6	10	(O) $0,19$ (M) $0,34$	Odhad	Gjerde a Schaeffer (1989)
Obsah tuku (%)	14,8	17	(O) $0,47$ (M) $0,19$	Odhad	Gjerde a Schaeffer (1989)
Odolnost proti VHS			(O) $0,69 \pm 0,25$	Odhad	Chevassus a Dorson (1990)
Věk pohlavního dospívání			(O) $0,13 \pm 0,14$	Odhad	Gjerde a Gjedrem (1984)
			$0,12-0,34 \pm 0,03$	Odhad	Kause a kol. (2003)
Hmotnost			$0,21-0,27 \pm 0,03$	Odhad	Kause a kol. (2003)
Konzumace potravy	1,4	24	(O) $0,41 \pm 0,13$	Odhad	Kinghorn (1983)

Znak	X	CV	$h^2 \pm S.E.$	Metoda	Autor / Autoři
Kapr obecný					
Hmotnost			0,21–0,30	Odhad	Smišek (1979)
Hmotnost			0,0–0,51 $\pm$ 0,08	Odhad	Nenashev (1966)
Hmotnost (kg)	1,55	22	0,70 $\pm$ 0,08	Odhad	Kocour a kol. (2007)
Hmotnost (g)	680	24	0,31–0,44	Odhad	Vandeputte a kol. (2008)
Hmotnost, 110 dní			0,09	Odhad	Tanck a kol. (2001)
Hmotnost, 13 měs.			0,58	Odhad	Bongers a kol. (1997)
Hmotnost (g), 56 dní	5,5	29	0,33 $\pm$ 0,07	Odhad	Vandeputte a kol. (2004)
Růst			0,08–0,33	Realizovaná	Vandeputte a kol. (2008)
Vyšší růst			0	Realizovaná	Moav a Wohlfarth (1976)
Nižší růst			0,3	Realizovaná	Moav a Wohlfarth (1976)
Délka těla (mm)			0,04–0,55	Odhad	Smišek 1979
			0,04–0,55 $\pm$ 0,08	Odhad	Nenashev (1966)
			0,50	Odhad	Bongers a kol. (1997)
	300	8,3	0,21–0,33	Odhad	Vandeputte a kol. (2008)
Délka těla, 110 dní			0,11	Odhad	Tanck a kol. (2001)
Délka těla (mm), 56 dní	54	11	0,33 $\pm$ 0,08	Odhad	Vandeputte a kol. (2004)
Výška těla			0,42–0,69	Odhad	Smišek 1979
Poměr výška/délka			0,0–0,75 $\pm$ 0,09	Odhad	Nenashev (1966)
			0,33–0,47 $\pm$ 0,10	Odhad	Ankorion a kol. (1992)
			0,32 $\pm$ 0,06	Odhad	Kocour a kol. (2007)
Kondiční faktor (FK), 8 týdnů			0,37 $\pm$ 0,07	Odhad	Vandeputte a kol. (2004)
Kondiční faktor (FK), 110 dní			0,37	Odhad	Tanck a kol. (2001)
Odolnost proti jarní virémii			0,15–0,20	Odhad	Kirpichnikov (1999)
Odolnost vůči stresu			0,6	Odhad	Tanck a kol. (2001)
Obsah tuku (%)			0,22	Odhad	Nenashev (1969)
			0,14–0,15	Odhad	Smišek (1979)
	5,2		0,58 $\pm$ 0,09	Odhad	Kocour a kol. (2007)
Výtěžnost (%)	67,2		0,28 $\pm$ 0,06	Odhad	Kocour a kol. (2007)
Výtěžnost fileťů s kůží (%)	41,1		0,38 $\pm$ 0,09	Odhad	Kocour a kol. (2007)
Výtěžnost fileťů bez kůže (%)	32,1		0,21 $\pm$ 0,07	Odhad	Kocour a kol. (2007)

Znak	X	CV	$h^2 \pm S.E.$	Metoda	Autor / Autoři
Tlāmoun					
Hmotnost (g), 90 dní	19	27	(O) $0,04 \pm 0,06$ (M) $0,04 \pm 0,08$	Odhad	Tave a Smithermann (1980)
Hmotnost			0,32	Realizovaná	Jarimopas (1990)
Hmotnost, 16 týdnů			0,38	Odhad	Bolivar (1999)
Hmotnost, 90 dní			(O) 0,23 (M) 0,53	Odhad	Eknath a kol. (1998)
Hmotnost (klecový chov)	181		(O) 0,30 (M) 0,83	Odhad	Ponzoni a kol. (2005)
Hmotnost (g) rybníční chov	291		(O) 0,39 (M) 0,93	Odhad	Ponzoni a kol. (2005)
Hmotnost, 98 dní			$0,20 \pm 0,04$	Odhad	Gall a Bakar (2002)
Přežití (%)			0,08	Odhad	Eknath a kol. (1998)
Sumečci					
Hmotnost (g), samice, 48 týdnů	237	24	(O) $0,52 \pm 0,42$	Odhad	El-Ibiary a Joyce (1978)
Hmotnost (g), samci, 48 týdnů	328	27	(O) $0,27 \pm 0,37$ (M) $0,51 \pm 0,37$	Odhad	El-Ibiary a Joyce (1978)
Výtěžnost (%), samice	69	2	(O) $0,08 \pm 0,25$ (M) $0,47 \pm 0,36$	Odhad	El-Ibiary a Joyce (1978)
Výtěžnost (%), samci	68	2	(O) $0,00 \pm 0,27$ (M) $0,50 \pm 0,32$	Odhad	El-Ibiary a Joyce (1978)
Obsah tuku (%)			(O) $0,61 \pm 0,78$ (M) $0,64 \pm 0,37$	Odhad	Reagan (1980)
Příjem krmiva			0,41	Odhad	Silverstein a kol. (2001)
Siven alpský					
Hmotnost (g)	651	36	(O) $0,52 \pm 0,17$ (M) $0,38 \pm 0,14$	Odhad	Nilsson (1992)
	439	37	(O) $0,45 \pm 0,19$ (M) $0,45 \pm 0,20$	Odhad	Nilsson (1992)
Kondiční faktor	2	11	$0,24 \pm 0,15$	Odhad	Elvingson a Nilsson (1992)
Obsah tuku (%)	20	12	$0,06 \pm 0,08$	Odhad	Elvingson a Nilsson (1992)
Barva	1	46	$0,28 \pm 0,17$	Odhad	Elvingson a Nilsson (1992)
Mořčák evropský					
Hmotnost			(O) $0,29 \pm 0,13$	Odhad	Saillant a kol. (2006)
Treska obecná					
Hmotnost (g)	25	38	$0,29 \pm 0,27$	Odhad	Gjerde a kol. (2004)
Přežití (%)			$0,00 \pm 0,14$	Odhad	Gjerde a kol. (2004)
Kambala (platýz)					
Hmotnost (g)	829	36	(O) $0,70 \pm 0,19$ (M) $0,45 \pm 0,28$	Odhad	Gjerde a kol. (1997)

Znak	X	CV	$h^2 \pm S.E.$	Metoda	Autor / Autoři
Krevety					
Hmotnost (g)	4	70	(O) $0,10 \pm 0,002$ (M) $0,39 \pm 0,004$	Odhad	Benzie a kol. (1997)
	18	17	(O) $0,76 \pm 0,15$ (M) $0,71 \pm 0,05$	Odhad	Fjalestad a kol. (1997)
	16	22	(O) $0,40 \pm 0,09$	Odhad	Suarez a kol. (1999)
Přežití (%)	66		(O) $0,13 \pm 0,05$	Odhad	Suarez a kol. (1999)
Ústřice					
Hmotnost (g)	24	34	$0,28 \pm 0,06$	Realizovaná	Jarayabhand a Thavornnyutikarn (1995)
			(O) $0,11-0,24$	Odhad	Toro a Newkirk (1991)
			(O) $0,33 \pm 0,19$	Odhad	Lannan (1972)
			$0,08 \pm 0,25$	Odhad	Haley a kol. (1975)
			$0,10-0,15$	Odhad	Davis (2000)
			(O) $0,34 \pm 0,12$	Odhad	Toro a Newkirk (1991)
Délka lastury (mm)			(O) $0,19 \pm 0,07$	Odhad	Toro a Newkirk (1991)
Hřebenatky					
Hmotnost (g)			0,37	Realizovaná	Heffernan a kol. (1993)
			$0,43 \pm 0,09$	Odhad	Ibarra a kol. (1999)
	47	26	$0,59 \pm 0,13$	Odhad	Ibarra a kol. (1999)
	61	21	0,21	Odhad	Crenshaw a kol. (1991)
Ušně					
Délka lastury (mm)	51		0,34		Jonasson a kol. (1999)
Přežití (%)	10		0,11		Jonasson a kol. (1999)

POLYPLOIDIE A GENOMOVÉ MANIPULACE U RYB

M. Flajšhans, P. Ráb, O. Linhart

6

POLYPLOIDIE A GENOMOVÉ MANIPULACE U RYB

M. Flajšhans, P. Ráb, O. Linhart

6.1. Polyploidie u ryb

Polyploidie u ryb, nebo přesněji u všech oploutvených studenokrevných obratlovců, je neobyčejně důležitým evolučním mechanismem nepochybně přispívajícím k překvapující a obrovské biodiverzitě 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, souvisejícího s evoluční plasticitou rybích genomů. Přitom však je jen málo jevů v biologii a genetice ryb obecně spojených s tak neúplnými a zlomkovitými, někdy značně zkreslenými znalostmi, jako je tomu právě u polyploidie ryb. Tato kapitola proto zamýšlí podat ucelený, i když stručný přehled o mechanismech vzniku polyploidie, zejména kauzálního vztahu mezi hybridizačními událostmi a zvýšením stupně ploidie a o výskytu polyploidie u různých skupin ryb od těch nejvíce ancestrálních po moderní skupiny.

Co je to polyploidie – evoluční vs. biologická ploidie

Snad největší nedorozumění spojené s termínem polyploidie je nerozlišování mezi biologickou a evoluční úrovní ploidních stupňů; v tomto smyslu je termín polyploidie svým způsobem homonymem označujícím dvě různé věci. Přes početné výjimky (bezobratlí), naprostá většina živočichů (Metazoa) má duplikovanou sádku chromozomů, tedy $2n$, jsou **biologicky diploidní**. Tato situace se evolučně vyvinula spolu s mechanismem pohlavního rozmnožování. Vývoj jejich gamet (gametogeneze) pro pohlavní rozmnožování se pak uskutečňuje pomocí meiotického buněčného dělení (meiózy) zahrnující dvě následná jaderná dělení, ale pouze jeden cyklus replikace DNA, což umožňuje segregaci jedné kopie každého homologního chromozomu do každé nové gamety. Přítomnost jedné sady chromozomů v gametě (**haploidie**, $1n$) a pohlavní rozmnožování zajišťují znovunastolení diploidního stavu celého nového organismu v každé generaci. V tomto smyslu každý organismus, který vykazuje takovéto **diploidní/haploidní cykly** přes každou generaci, je biologicky diploidní a to bez ohledu na počet chromozomů/obsah DNA v jádře. Jinými slovy bez ohledu na evolučně ploidní stav genomu. **Polyploidie** je potom multiplikace (zmnožení, znásobení) celé chromozomové sádky (tj. např. n , $2n$, $3n$...) nad normální haploidní či diploidní sádku chromozomů. Dále je nutné si uvědomit, že **polyploidie vzniká jako vedlejší efekt** jiných procesů biotických i abiotických, případně i v jejich kombinaci. Takovýmito příčinami jsou zejména hybridizační události (zejména mezidruhová hybridizace určitého typu), přestárnutí gamet, fyzikální, zejména teplotní vlivy atd. Takové spontánní polyploidizační události, ať již způsobené jakkoliv, nebo přesněji výsledky těchto událostí, se za určitých podmínek mohou fixovat v evoluci a mít potom za následek vznik taxonů (tj. druhů, rodů, linií, čeledí atd.), které jsou **evolučně polyploidního původu**, byť se u nich vyskytoval dříve zmíněný **diploidní/haploidní cyklus** u každé generace a dotýčný organismus byl tak **biologicky diploidní**. V tomto smyslu je tedy termín **evoluční polyploidie smysuplným jen ve fylogenetickém smyslu**, např. abychom mohli konstatovat, že genom kapra obecného je evolučně tetraploidního původu ($2n = 100$), musíme mít údaje o tom, že existuje řada druhů jiných kaprovitých ryb, jejichž genom je evolučně diploidní ($2n = 48-50$).

Něco málo historie

Poznatek, že u ryb se vyskytuje polyploidie, není tajemství vyrvané matce přírodě v poslední době. Ve skutečnosti to bylo známo již v samých počátcích cytogenetických a cytologických studií u ryb. Sajiho Makino, zakladatel deskriptivní cytogenetiky ryb, na 6. Výročním setkání Japonské genetické společnosti v roce 1933 v Hirošimě přednesl předběžnou zprávu o počtu chromozomů 104 u kapra obecného (dnes víme, že to byl druh *Cyprinus rubrofuscus*; Makino, 1934). Tento vysoký počet chromozomů u kapra obecného prakticky současně potvrdila Prokofieva (1934), skvělá cytogenetička pionýrského období, jejíž data jsou tak kvalitní, že je lze použít tak, jak byla publikována. Srovnáním počtu chromozomů u kapra a dalších druhů kaprovitých ryb s 50 chromozomy Makino (1939) poprvé zmínil možnost, že kapr je tetraploidního původu. Další podezření, že přirozeně se vyskytující polyploidní ryby skutečně existují, přinesl další pionýr cytogenetiky ryb G. Svärdson (1945), který si povšiml velmi rozdílného počtu chromozomů (~ 60, 80, 100) u lososovitých ryb (a korušek, o kterých se ještě donedávna předpokládalo, že jsou s lososovitými blízce příbuzní). Svärdson formuloval hypotézu, že lososovití mají základní haploidní počet chromozomů $n = 10$ a druhy s ~ 60 chromozomy jsou hexaploidní, ty s ~ 80 chromozomy jsou oktaploidní a ty se ~ 100 chromozomy jsou dekaploidní. Jinými slovy, považoval genomy lososovitých za klasickou polyploidní sérii tak, jak je tomu u značné části vyšších rostlin; tato hypotéza přetrvávala poměrně dlouho a byla vyvrácena na základě měření obsahu jaderné DNA, ukazující velmi podobné hodnoty tohoto ukazatele pro druhy se zcela rozdílnými počty chromozomů (Rees, 1964). Tato pionýrská doba shromažďování dat o různých počtech chromozomů a velikosti genomů u ryb vyústila ve famózní teorii S. Ohna (1970) v knize "*Evolution by gene duplication*", kde významná role polyploidie v evoluci ryb (a dalších obratlovců) byla přesvědčivě potvrzena. Nicméně však přesné evoluční mechanismy a cesty, jak dosáhnout a udržet vyšší ploidní stupně v evoluci, zůstávaly do značné míry nejasné. Souběžně se skupinou S. Ohna se však Schultz (1969) zabýval gynogenetickým rozmnožováním rybky živorodky křížené, *Poecilia formosa*. Oficiální český název je hrůzný, nicméně správně ukazuje na hybridní původ. Její anglický název *Amazon molly* je půvabnější, protože se vztahuje nikoliv k řece Amazonce, ale ke kmeni bájeslovných Amazonek, kde byly pouze ženy, a odkazuje tak ke skutečnosti, že v populacích této rybky se vyskytují pouze samice. Tento autor studoval živorodky v přírodě i experimentálně a byl mezi prvními, kdo si povšiml vztahu mezi mezidruhovou hybridizací, asexualitou a polyploidií ("*strong relationship shared by hybridization, unisexuality and polyploidy*"; Schultz 1980, p. 325). Krátce nato objevili diploidně-polyploidní komplex v rodě *Cobitis* v okolí Moskvy Vasil'ev a Vasil'eva (1982). Takřka souběžně obdobný diploidně-polyploidní komplex u kaprovité ryby *Squalius alburnoides* na Iberském poloostrově popisuje Collares-Pereira (1984a,b) a Collares-Pereira a kol. (1995). Podobně ovšem probíhaly objevy polyploidních forem karasů rodu *Carassius* jak v Evropě (např. Lieder, 1955, 1959; Golovinskaja a kol., 1965; Cherfas, 1966), tak v Asii (např. Kobayashi a kol., 1970, 1973). Toto objevitelské období pak skončilo velmi významnou, dodnes nepřekonanou konferencí "*Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*" (Dawley a Bogard, eds. 1989), která shrnula dosavadní znalosti o této problematice, a to nejen u ryb, ale u obojživelníků a plazů, kde byly obdobné poměry objeveny také. Dosud takovýchto hybridních komplexů, kde se vyskytují jak parentální formy, tak jejich různě ploidní hybridy, kteří se rozmnožují některou formou partenogeneze, bylo u nižších obratlovců objeveno přes 80 (Alves a kol., 2001). Je však téměř jisté, že jich existuje daleko více, jejich kryptická povaha je totiž činí bez genetických nástrojů studia jen velmi nesnadno odhalitelnými a není divu, že korelace laboratoře disponující vhodnými genetickými nástroji a výskytem takového komplexu je velmi vysoká, přitom objevování těchto forem ryb neustává (např. Schmidt a kol., 2011). Z biologicko-populačních vlastností dobrou indikací přítomnosti takového komplexu je naprostá dominance samic nebo přítomnost jedinců různé ploidie na stejné lokalitě (např. Drozd a kol., 2010).

Téměř souběžně s objevováním přírodních polyploidních forem ryb se objevila velká řada experimentů, které ukázaly, že **polyploidii u téměř všech ryb lze indukovat také experimentálně**, a to poměrně jednoduchými technikami, a že takto indukované polyploidní formy ryb mají vhodné vlastnosti pro široké použití v akvakultuře (Piferrer a kol., 2009); podrobnější výklad této problematiky je podán v další části této monografie. Zmiňujeme se o této oblasti experimentálně indukované polyploidie u ryb hlavně proto, že snadnost, s jakou lze indukovat polyploidii u ryb uměle, evidentní plasticita a tolerance rybích genomů k vyšším ploidním stupňům spolu s velkým počtem publikovaných studií o těchto formách ryb do značné míry znesnadnily poznání přírodních mechanismů vzniku, evolučního udržení a také rozšíření polyploidie u ryb. Tyto všechny aspekty, spolu s velmi chabou znalostí recentního stavu taxonomie, systematiky a fylogeneze ryb a biodiverzity ryb obecně do značné míry ovlivnily kvalitu posledních dvou recentních přehledových prací (Leggat a Iwama, 2003; Le Comber a Smith, 2004) o polyploidii u ryb. Jakkoliv je užitečné tyto práce přečíst, je na místě především kritický pohled na tyto texty. V předkládaném textu se snažíme těmto chybám vyvarovat, a proto jsou podkapitoly o polyploidii důsledně děleny na polyploidii vyskytující se v přírodě a její experimentální indukci.

Evoluce genomu, biodiverzita ryb a polyploidizace

Tato stručná kapitola má za cíl pouze upozornit, nikoliv však detailněji komentovat skutečnost, že s největší pravděpodobností dnešní neuvěřitelná funkční a fylogenetická rozrůzněnost obratlovců, spolu s obrovskou biodiverzitou současných ryb, je kauzálně spojována s několika polyploidizačními událostmi v počátku evolučního vývoje obratlovců. Tyto poznatky přinesla velmi rychle se rozvíjející genomika, tedy detailní poznání genového obsahu genomů různých organismů. Srovnávací genomické analýzy totiž ukázaly, že řada genů, třebaže nefunkčních nebo i s jinou recentní funkcí, je u obratlovců znásobena, opakuje se v několika kopiích a jediným přijatelným vysvětlením tohoto stavu by mohly být právě dávne polyploidizační události. Evoluce genomu obratlovců tedy pravděpodobně mohla být spojena s třemi epizodami totálních duplikací genomu – první u samého vzniku obratlovců samých, druhá u vzniku čelistnatých (Gnathostoma). Tyto události se v literatuře označují jako 2R („two rounds“) hypotéza. Poslední epizoda – 3R hypotéza – potom nastala u vzniku kostnatých ryb (Teleostei), tedy dnes bezkonkurenčně nejpočetnější skupiny obratlovců, po jejich divergenci od předků dnešních jeseterů (*Acipenser*) a veslonosů (*Polyodon*), případně kostlínů (*Lepisosteus*, *Atractosteus*; např. Volff, 2005; Froschauer a kol., 2006). Jakkoliv jsou tyto hypotézy s rozšiřujícím se čtením genomů dnes dále potvrzovány, ne všichni odborníci s tím bezvýhradně souhlasí. Donoghue a Purnell (2005) vznášejí závažnou námitku, že genomické údaje byly získány ze současných organismů a že spojovat genomové duplikace s objevem řady překvapivě nových znaků neobstojí tváří v tvář dnes už velmi dobrému geologickému záznamu dokládajícímu evoluci raných obratlovců. Na závěr této čistě informační kapitoly je také nutno uvést, že detailním porovnáním genových syntení (tj. výskytu genů ve shodných vazebných skupinách) z přečtených celých genomů člověka (*HSA – Homo sapiens*), kura domácího (*GGA – Gallus gallus*), dania pruhozaného (*DRE – Danio rerio*), fugu (*TNI – Tetraodon nigroviridis*) a medaky čili halančíka rýžovištního (*OLA – Oryzias latipes*) umožnilo zrekonstruovat pravděpodobný hypotetický haploidní počet chromozomů u vertebrálního protokaryotypu ($n = 11$), tetrapodního protokaryotypu ($n = 18$) a také protokaryotypu Teleostei (bez jeseterů; $n = 12$; Kohn a kol., 2006). Tyto hypotetické konstrukce velmi dobře odpovídají poměrům nalezeným ve skutečnosti. Tak např. bahníci (*Protopterus*) a řada ocasatých obojživelníků (Caudata) mají (stále ještě) počet chromozomů $2n = 36$ a většina koncoústých ryb pak $2n = 48$, což pak téměř potvrzuje 3R hypotézu. Jeseterovité ryby, snad z litoosti, že byly vynechány z této třetí totální duplikace genomu, se s tím vypořádaly, jak uvidíme dále, jinak a ukázaly doslova všem ostatním obratlovcům „zač je té polyploidie loket“ (Symonová a kol., 2010a,b).

Rozšíření evoluční polyploidie u ryb

Jakkoliv je polyploidie u ryb velmi významná jak pro poznání genomu ryb a jeho evoluce, tak pro její praktické využití ve šlechtitelství a v chovu ryb, musíme otevřeně konstatovat, že o skutečném rozšíření polyploidie u ryb toho mnoho nevíme. Oploutvení rybovití obratlovci jsou nejvíce diverzifikovanou skupinou obratlovců (z nichž ovšem jedna skupina opustila vodu a přizpůsobila se životu na souši; nemylme se, vy všichni čtenáři tohoto textu nejste nic než nějakou delší evolucí pozměněné násadoploutvé ryby!) zejména s ohledem na stále dosud ještě neznámý počet existujících druhů dosahující dnes dobře přes 35 000 taxonomicky známých druhů, a též s ohledem na počty skutečně existujících fylogenetických linií. Třebaže data o genomech ryb jsou velmi fragmentární, jak ukazují údaje o počtech chromozomů (v rozsahu od $2n = 12$ u *Gonostoma bathyphylum* do $2n = 446$ u *Ptychobarbus dipogon*) a obsahu DNA v jádře (v rozsahu od 0,38 pgDNA/1C* u některých čtverzubců fugu po 132,83 pgDNA/1C u bahňáka východoafrického, *Protopterus aethiopicus*). Přestože bylo v poslední době nashromážděno mnoho údajů o genomech ryb, tato data jsou známa jen u méně než 10 % této obrovské rybí diverzity. Jak bude stručně ukázáno dále, známé případy výskytu evoluční polyploidie u ryb se nepravidelně vyskytují u příčnoustých (Chondrichthyes, tedy chimér, žraloků a rejnoků), dále u obou základních divergencí ryb, tedy násadoploutvých (Sarcopterygii) a nejpočetnější dnes existující skupiny paprskoploutvých (Actinopterygii), u těchto posledních pak (s výjimkou Atheriniformes and Cyprinodontiformes) ne výše než u Protacanthopterygii (Esociformes + Salmoniformes, tj. u basálních Euteleostei, tedy pravých koncoústých ryb). Zda výše popsaná distribuce evoluční polyploidie u ryb odráží skutečnost či je jen projevem nedostatku příslušných dat, není dnes známo.

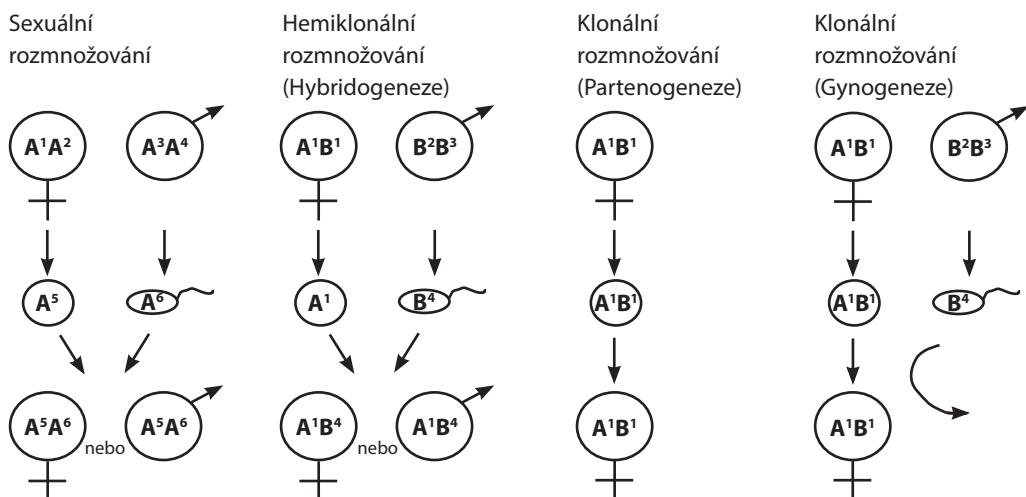
Autopolyploidie a alopolyloidie

V přírodě se vyskytující polyploidie u ryb, jakkoliv je to složitý jev, má dvě základní formy: **autopolyploidii** (jež znamená multiplikaci celé homospecifické sádky chromozomů) a **alopolyploidii** (multiplikaci celé heterospecifické sádky chromozomů), a to jak v lichých, tak i v sudých násobcích. K **autopolyploidii** mohou vést některé **poruchy gametogeneze** (např. premeiotická endoreduplikace chromozomové sady následovaná dvěma meiotickými děleními, potlačení/selhání první nebo druhé fáze meiotického dělení nebo selhání rozchodu mitotických chromozomů), **poruchy procesu oplození** (polyspermické oplození) a stárnutí ovulovaných oocytů, při němž vznikají změny v jejich cytoskeletární organizaci (poruchy organizace jádra a jadérka, poruchy tvorby cytoskeletárních mikrotubulů) vedoucí k chromozomovým aberacím u potomstva, které mohou vést i k potlačení druhé fáze meiotického dělení, přičemž se neuskuteční oddělení druhého pólóvého tělíska. Autopolyploidní stav může rovněž vzniknout **různými vlivy prostředí** působícími poruchy v procesu fertilizace gamet (Purdom a Lincoln, 1973; Purdom, 1983; Thorgaard, 1983; Yamazaki, 1983; Thorgaard, 1986; Donaldson a Benfey, 1987; Chourrout, 1987; Benfey, 1989; Ihssen a kol., 1990; Pandian a Koteeswaran, 1998 a další).

Pokud ke zmnožení chromozomových sad dochází při mezirodové nebo mezidruhové hybridizaci, jedná se o **alopolyploidii**, jež má za následek změnu normálního bisexuálního typu rozmnožování na některý typ rozmnožování asexuálního (gynogeneze, hybridogeneze, partenogeneze). Vzhledem k tomu, že se o těchto termínech budeme dále běžně zmiňovat, je na obr. 6.1. schéma ukazující specifika jednotlivých typů rozmnožování ve srovnání s rozmnožováním pohlavním.

* 1C = C-hodnota (C-value), která odpovídá haploidnímu jádru gamety nebo polovině diploidního jádra somatické buňky před S-fází. Bližze viz Gregory, T.R. (2012). Animal Genome Size Database (www.genomesize.com)

Pokud k mechanismům působícím autopolyploidní nebo alopolyploidní stavy dochází přirozeně, tj. bez zásahu člověka, hovoříme o **spontánní polyplodii**. Spontánní polyplodie je u ryb velmi častým a širouce dokumentovaným jevem (Benfey, 1989; Ihssen a kol., 1990; Pandian a Koteeswaran, 1998 a další). O spontánní triploidii se dále zmíníme v poslední části této sekce.



Obr. 6.1. Základní mechanismy rozmnožování obratlovců: Při sexuálním rozmnožování redukuje meióza ploidní úroveň z diploidní fáze (somatická buňka) na fázi haploidní (pohlavní buňka). Splynutí dvou pohlavních buněk (spermie a vajíčka) obnovuje diploidní úroveň somatické tkáně vyvíjejícího se jedince. Další mechanismy řadíme mezi takzvané asexuální rozmnožování, které je typické pozměněným průběhem meiózy či její úplnou absencí a je známé u některých mezidruhových hybridů: Při hybridogenezi vyloučí jedinci ze zárodečných pohlavních buněk genom jednoho z rodičovských druhů a v pohlavních buňkách přenáší genom pouze druhého rodiče (odtud hemiklonální rozmnožování). Hybridní stav je v potomstvu obnoven splynutím pohlavní buňky hybridu a pohlavní buňky sexuálního druhu během společného páření právě s druhem, jehož genom byl hybridem v pohlavních buňkách vyloučen. Klonální rozmnožování udržuje somatické i pohlavní buňky na stejné ploidní úrovni. Při partenogenezi produkují samice neredukovaná vajíčka, která se vyvíjí v potomstvo přímo, bez asistence samce. Při gynogenezi tvoří samice rovněž neredukovaná vajíčka, ta však potřebují přítomnost samčího jedince blízkého druhu, jehož spermie aktivuje vývoj vajíčka v potomstvo, ale nepřispívá do potomstva samčí DNA. Avšak občasné pravé oplodnění neredukovaného vajíčka spermií zvyšuje ploidní úroveň jedince, vzniká tak například z diploidního rodiče triploidní potomek. Vysvětlivky: velké písmeno ilustruje jeden haploidní genom; odlišná písmena symbolizují různé druhy; čísla (1–6) rozlišují jednotlivé genomy odvozené z rekombinace řádného meiotického cyklu; svislé šipky symbolizují tvorbu rodičovských pohlavních buněk, které se mohou vyvinout v potomka buďto přímo nebo pravým oplodněním vajíčka spermií samce (šikmá šipka) nebo pouhou aktivací vajíčka. Upraveno podle Cholevy a kol. (2012).

Přehled výskytu polyplodie u jednotlivých skupin ryb

Vzhledem k tomu, že následující část bude značně popisná, byl by seznam odkazů na primární zdroje neúměrně rozsáhlý a jistě by nepřispěl k přehlednosti tohoto učebního textu. Proto volíme stručnější cestu, a sice odkaz na obsáhlé recentní kompendium *Fish Karyotypes – A Check List* (Arai, 2011), které shrnuje dosavadní znalosti o genomech ryb, tedy o diploidním počtu chromozomů (2n), struktuře karyotypu a obsahu DNA; naprostou většinu odkazů na zdroje uváděných informací je zde možné nalézt.

Mihule

Recentní mihule jsou potomci dávné skupiny bezčelistnatých obratlovců Cephalaspidomorphi doložené od spodního Siluru. Dnešní zástupci mají antitropické rozšíření a jsou děleni do 3 čeledí – Petromyzontidae (38 druhů na severní polokouli), Geotriidae (1 druh *Geotria australis* na jižní polokouli) a Mordacidae (3 druhy na jižní polokouli; Lang a kol., 2009). Jejich genomy obsahují buď velké množství malých chromozomů $2n = 164\text{--}174$ (Petromyzontidae), $2n = 174\text{--}184$ (Geotriidae) nebo přibližně poloviční počet $2n = 76$ (Mordacidae). Tyto počty chromozomů by mohly odpovídat evolučnímu diploidně tetraploidnímu vztahu, avšak velikost jejich genomu je přibližně stejná (asi polovina velikosti lidského genomu), takže vysvětlením asi spíše bude nějaký typ chromozomových přestaveb. Přesto však měření obsahu DNA u mihulí jsou velmi starého data, navíc jen u některých druhů mihulí, překvapení proto nejsou vyloučena.

Chiméry, žraloci, rejnoci – Chondrichthyes

Genomová diverzita této skupiny starobylých ryb je známa jen velmi zlomkovitě, diploidní počet chromozomů či velikost genomu je známa jen přibližně u 5,7 % současně žijících druhů (Stingo a Rocco, 2001; Schwartz a Maddock, 2002). Přesto ale i tyto velmi omezené údaje ukazují na obrovský rozsah počtu chromozomů $2n = 28$ až 106 a velikosti genomu 3 až 34 pg DNA/1C; s výjimkou ocasatých obojživelníků a bahníků se tak jedná o vůbec největší genomy obratlovců. Tyto poměry také zřetelně napovídají, že řada polyploidizačních událostí musela hrát a jistě stále hraje význačnou roli v evoluci genomu těchto obratlovců.

Bahníci – Ceratodontiformes

Recentní bahníci jsou starobylé formy násadoploutvých ryb (Sarcopterygii) s rozšířením v Jižní Americe, Africe a Austrálii a jsou řazeni do 3 čeledí – Ceratodontidae (jediný druh bahník australský *Neoceratodus forsteri*), Lepidosirenidae (jediný druh bahník jihoamerický *Lepidosiren paradoxa*) a Protopteridae (africký rod *Protopterus* se 4 druhy). Bahníci by mohli také sloužit jako učebnicový příklad (což tímto činíme) neznalosti rybích genomů. Pro zjištění počtu chromozomů a velikosti genomu byl u bahníka jihoamerického prozkoumán jediný exemplář, u bahníka australského 9 jedinců a u afrických bahníků celkem 11 jedinců 3 druhů. Bahníci mají obrovské genomy a afričtí a jihoamerický navíc mají počty chromozomů blízké hypotetickému tetraploidnímu karyotypu: bahník jihoamerický $2n = 38/ \sim 250$ pg DNA/1C, u afrických druhů *P. annectens* a *P. aethiopicus* $2n = 34/ \sim 80$ pg DNA/1C, ale další africký druh *Protopterus dolloi* je evolučně tetraploidní s $2n = 68/ \sim 165$ pg DNA/1C. Zda se jedná o auto- či allopolyploidii není možné pro fragmentárnost údajů stanovit. Naproti tomu bahník australský má rovněž obrovský genom s ~ 100 pg DNA/1C, ale $2n = 54$ a rovněž karyotyp má velmi odlišné složení než ostatní bahníci blížící se stavbou spíše latimerii podivné *Latimeria chalumnae*, která má $2n = 48$, z nichž většina jsou mikrochromozomy. Genomy bahníků by bezpochyby mohly přispět k hlubšímu poznání evoluce genomu tetrapodních linií obratlovců a je proto s podivem, že se jejich studiu věnuje tak malá pozornost.

Paprsoploutvé ryby – Actinopterygii

Jeseteři a veslonosi – Acipenseriformes

Jeseteři a veslonosi jsou nejstarší dnes žijící skupinou paprsoploutvých ryb, jsou žijícími zkamenělinami, rybami, které doslova „zapomněly vymřít“. Dnešních 27 žijících druhů se dělí do dvou čeledí – jeseteři a lopatonosi Acipenseridae (25 druhů) a veslonosi (2 druhy – veslonos americký, *Polyodon spathula*, a dnes již prakticky vyhubený veslonos čínský *Psephurus gladius*). Již v jedné z předcházejících kapitol jsme se zmínili, že třetí totální duplikace genomu u této linie obratlovců proběhla až po oddělení jeseterovitých ryb. Chromozomy u těchto ryb také nemají, s výjimkou kostlínů, obdobu u ostatních paprsoploutvých. Jejich karyotypy jsou složeny z menšího počtu makrochromozomů a velkého počtu mikrochromozomů postupně klesajících velikosti, podobně jako je tomu např. u ptáků. Počty chromozomů pak

svědčí o velké úloze polyploidizačních událostí při formování genomu jeseterovitých ryb a rozeznáváme mezi nimi celkem 4 ploidní úrovně vyskytující se v přírodě, což bylo celkem bezpečně prokázáno pomocí karyologických studií, průtokovou cytometrií relativního i absolutního obsahu DNA a dalšími, zejména mikroskopickými denzitometrickými metodami stanovení obsahu DNA v jádře. Jsou to paleotetraploidní druhy s $2n = 120$ (*Acipenser stellatus*, *A. ruthenus*, *A. oxyrinchus*, *A. nudiiventris*, *A. sturio*, „*Huso*“ *huso*, *Pseudoscaphirhynchus kaufmanni*, *Scaphirhynchus platorhynchus*), paleooktaploidní druhy s ~ 240 chromozomy (*A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. dabryanus*, *A. fulvescens*, *A. medirostris*, *A. naccari*, *A. persicus*, *A. schrenckii*, *A. sinensis*, „*Huso*“ *dauricus*), dále paleononaploidní druhy s ~ 270 chromozomy (*A. transmontanus*, *A. mikadoi*) a dokonce je znám i druh paleododekaploidní s ~ 360 chromozomy (*A. brevirostrum*). Jsou to tedy ryby, jejichž někteří zástupci mají jedny z největších počtů chromozomů mezi obratlovci. Genomy jeseterů však v souvislosti s polyploidí vykazují ještě další zvláštnost. Druhy různých ploidních úrovní se jak v přírodě, tak v zajetí bez problému kříží a výsledkem je potomstvo s intermediární ploidní úrovní, např. křížením jesetera malého, *A. ruthenus* ($2n = 120$) a jesetera ruského, *A. gueldenstaedtii* ($2n \sim 240$) vznikne kříženec s $2n \sim 180$ chromozomy. Tím však tato bizarní historie zdaleka nekončí, tyto kříženci jsou plně fertilní a dávají potomstvo v závislosti s ploidní úrovní druhého rodiče opět intermediární úrovně: např. křížením křížence s $2n \sim 180$ chromozomy a jesetera malého, *A. ruthenus* ($2n = 120$) vznikne kříženec s $2n \sim 150$ chromozomy, zatímco křížením tohoto křížence s jeseterem ruským, *A. gueldenstaedtii* ($2n \sim 240$) vznikne kříženec s $2n \sim 210$ chromozomy. Takto se podařilo zkonstruovat celou polyploidní sérii jedinců počínaje (paleo) $4n \sim 120$, (paleo) $5n \sim 150$, (paleo) $6n \sim 180$, (paleo) $7n \sim 210$, (paleo) $8n \sim 240$, (paleo) $9n \sim 270$, (paleo) $10n \sim 300$, (paleo) $11n \sim 330$ (tato kombinace nebyla dosud nalezena nebo zkonstruována, teoreticky může vzniknout křížením úrovní 240×420), (paleo) $12n \sim 360$, (paleo) $13n \sim 390$, (paleo) $14n \sim 420$ (Symonová a kol., 2010). Experimentálně byl také vytvořen triploid u druhu *A. brevirostrum* (~ 360 chromozomů) s 540 chromozomy (Arai, ústní sdělení), tedy obratlovec s vůbec nejvyšším známým počtem chromozomů! Vysvětlení zjevných a nápadných rozdílů ~ 30 chromozomů mezi jednotlivými ploidními úrovněmi může spočívat v možnosti, že tyto „semi-haploidní“ jednotky s ~ 30 chromozomy stále ještě odrážejí původní haploidní genom dnes již vyhynulého evolučně diploidního předka jeseterů a to také podporuje hypotézu V. P. Vasil'eva (1999), že současní jeseteři mohou být hybridního původu cestou retikulární speciace. Polyploidie jeseterů je tedy s vysokou pravděpodobností zřejmě alopolyploidii. Celá tato obrovská ploidní hybridní diverzita jeseterů má také praktický aspekt v chovech jeseterovitých. Vzhledem k tomu, že prakticky všechny druhy jeseterů jsou v přírodě ohrožené, je velká většina druhů předmětem akvakultury a přírodní populace často podporovány dotacemi z odchovů. Bez znalosti úrovně ploidie či hybridní povahy takovýchto násad je tato praxe z dlouhodobého hlediska značně riziková protože o fertilitě těchto hybridů v dalších generacích není nic známo.

Oba druhy dnes žijících veslonosů, veslonos americký *Polyodon spathula*, a veslonos čínský *Psephurus gladius*, jsou paleotetraploidní druhy s $2n = 120$ chromozomy. Přitom detailní rozbor karyotypu a dalších chromozomových znaků veslonosa amerického (Symonová a kol., 2010) překvapivě ukazuje, že makrochromozomy jsou většinou organizovány ve čtveřicích, stejně jako další znaky, např. místa ribozomálních genů, ukazují umístění vždy na čtyřech chromozomech. To by naznačovalo, že se jedná o autopolyploidní stav a tedy evoluční tetraploidie veslonosů je jiného původu než u jeseterů.

Ostariophysy

Tato skupina, nemající české jméno, zahrnuje 5 řádů, 68 čeledí, přes 1 000 rodů s více jak 8 000 převážně primárně sladkovodními druhy ryb. Nejvíce známých polyploidních forem ryb vůbec se pak nachází u jednoho z těchto řádů – máloostní Cypriniformes, několik polyploidních ryb se vykytuje také u sumců Siluriformes, naproti tomu u zbývajících řádů (trnobříší Characiformes, nahohřbeti Gymnotiformes a maloústí Goniorhynchiformes) nebyly polyploidní formy nalezeny, a to přes poměrně podrobný cytologický a cytogetický průzkum.

Kaprovítí – Cyprinidae

Jedna z druhově nejpočetnějších čeledí ryb (více než 220 rody a více než 2 500 druhů, nové však stále přibývají) v sobě zahrnuje na 10 hlubokých vývojových divergencí (He a kol., 2008), které jsou někdy považovány za samostatné čeledi (Chen a Mayden, 2009). Polyploidní formy byly nalezeny jen ve dvou z nich: Leuciscinae a Cyprininae. U první skupiny byly objeveny 2 hybridní polyploidní komplexy – i) komplex jelců *Squalius „alburnoides“* (druhové jméno pochází z doby před objevem hybridního charakteru) v jižní části Iberského poloostrova vzniklý poměrně starou hybridizací druhů jelců *S. pyrenaicus* nebo (v jiné části areálu) *S. carolitertii* s dnes již vymřelým druhem rodu *Anaocypris* komplex obsahuje diploidní ($2n = 50$), triploidní ($3n = 75$) a tetraploidní ($4n = 100$) hybridní samce a samice, kteří se rozmnožují „propustnou“ formou hybridogeneze (dochází k částečné genové rekombinaci), v některých případech kombinovanou s běžným pohlavním rozmnožováním (viz dále), a ii) komplex střevlí *Chrosomus* ve východní části Severní Ameriky, který vznikl křížením druhů *Ch. eos* a *Ch. neogaeus*, komplex obsahuje diploidní ($2n = 50$) a triploidní ($3n = 75$) obou kombinací *Ch. 2n eos/Ch. n neogaeus* a *Ch. 2n neogaeus/Ch. n eos* hybridní samice, které se rozmnožují gynogeneticky.

Další skupinou s významným výskytem polyploidních druhů je podčeleď Cyprininae. Tato skupina tvoří přibližně polovinu všech druhů kaprovitých a obsahuje několik fylogenetických linií blížeji příbuzných rodů, pro které nemáme česká jména; užijeme proto anglické názvy. Evolučně tetraploidní formy ($2n = 100$) se vyskytují v „barbine lineage“ u západopalearktických rodů *Aulopyge*, *Barbus*, *Luciobarbus*, asijských *Acrossocheilus*, *Barbodes*, *Catlocarpio*, *Percocypris*, *Probarbus*, *Spinibarbus*, *Pseudobarbus*, *Tor* a 2 jihoafrických rodů *Pseudobarbus*, *Barbus*, evolučně hexaploidní ($2n = 150$) západopalearktických rodů *Capoeta*, *Varicorhinus* a panafrického rodu *Labeobarbus* a není pochyb, že polyploidní formy budou nalezeny i u dalších zástupců plemene. Dále se evolučně tetraploidní formy ($2n = 100$) vyskytují v „cyprinine lineage“ u eurasijských rodů kapr *Cyprinus*, karas *Carassius* a východoasijských rodů *Sinocyclocheilus*, *Carassioides* a *Procypris*. V případě karasů se však tato evoluční tetraploidie kombinuje se skutečností, že druhy karasů mezi sebou hybridizují a vzniklo tak více hybridních polyploidních komplexů rozšířených od Japonska po Evropu, kde se vyskytují jak triploidní ($3n \sim 146\text{--}164$), tak tetraploidní ($4n \sim 200$) formy, většinou samice, ale v některých populacích se vyskytují i samci, kteří se rozmnožují „propustnou“ formou gynogeneze (dochází k částečné genové rekombinaci), v některých případech kombinovanou s běžným pohlavním rozmnožováním. Vlastní mechanismy rozmnožování však čekají na detailní vysvětlení, nicméně je zřejmé, že u některých populací dochází k přeměně asexuálního rozmnožování na rozmnožování bisexuální s normální rekombinací genomů. Rovněž není příliš jasno, které hybridizující parentální druhy karasů dávají vznik těmto asexuálním polyploidním komplexům, protože i) systematika a taxonomie asijských karasů není příliš dobře známa a ii) karasi jsou předmětem populačních transferů po staletí, takže rekonstrukce původního populačního profilu je téměř nemožná. V případě karasů tedy vidíme, že se „sčítají“ dva typy polyploidie: tetraploidie fixovaná evolucí a triploidie (nebo tetraploidie) způsobená hybridizací. Pro úplnost dodáme, že pravděpodobně se podobný hybridní polyploidní komplex vyskytuje u některých endemických druhů rodu kapr *Cyprinus* ve východní Číně, popis situace je však nejasný a neumožňuje učinit bližší závěr. Výlučně polyploidní formy zahrnuje „schizothoracin lineage“, skupina parmám příbuzných ryb, která obývá vysokohorské vody ve střední Asii. Vyskytují se zde nejen evolučně tetraploidní rody ($2n = 96\text{--}100$) *Chuanchia*, *Diptychus*, *Gymnocypris*, *Gymnodyptichus*, *Platypharodon*, *Schizopygopsis*, *Schizothorax*, *Schizothoraichthys* a v některých rodech, např. *Schizothorax* ($2n = 150$) formy evolučně hexaploidní, ale byl nalezen druh *Ptychobarbus dipogon*, který je evolučně triploidním derivátem hexaploidní úrovně $2n = 446$, který je tak obratlovcem s nejvyšším dosud přirozeným známým počtem chromozomů! Zbývá tedy otázka, zda jsou tyto početné polyploidní formy auto- či allopolyploidního původu. Podrobnější rozbor duplikovaných genů genomu kapra obecného ukazuje (Larhammar a Risinger, 1994), že se zřejmě jedná o allopolyploidní původ a že polyploidiza-

ce mohla nastat před asi 16 milióny let, tedy někdy v Miocénu. Dále je také nutné odpovědět, zda se jednalo o jednu polyploidizační událost a potom rozrůznění do různých rodů a druhů nebo zda se jednalo o události nezávislé. Fylogenetické analýzy ukazují, že polyploidizační události se udály nezávisle na sobě (např. Tsigenopoulos a kol., 2002) a výskyt vyšších ploidních stupňů také ukazuje, že se tyto události vyskytovaly opakovaně v jediné linii. např. v rodě *Capoeta*, který je evolučně hexaploidní, zatímco blíže příbuzné *Barbus* a *Luciobarbus* jsou evolučně tetraploidní (Levin a kol., 2012). Navíc tato poslední studie nasvědčuje jasně, že se jedná o alopolyploidii.

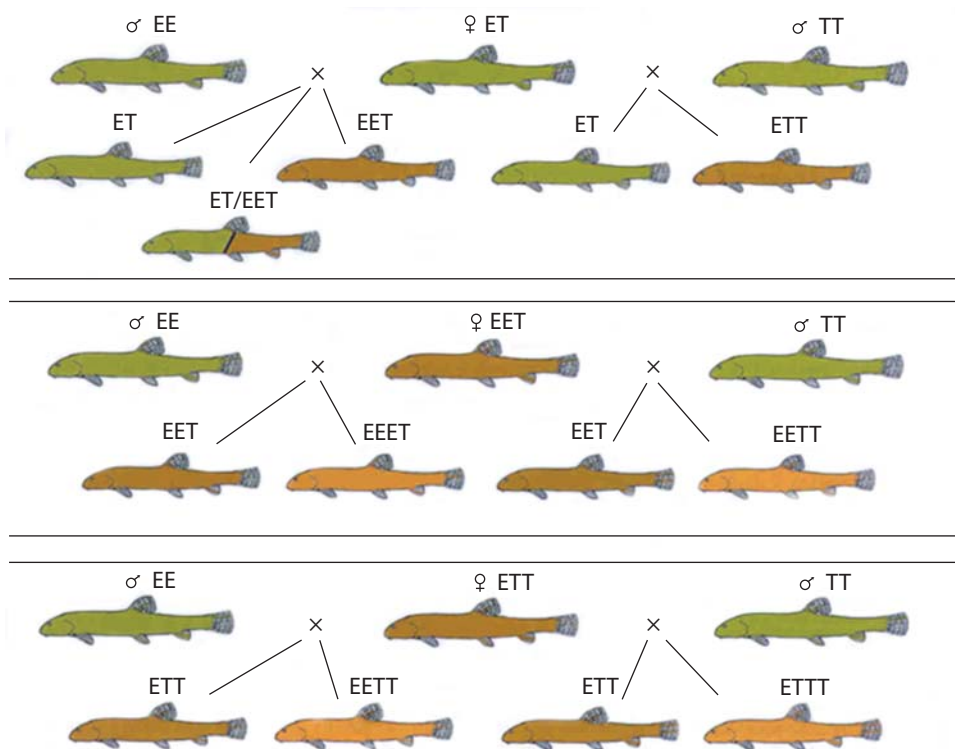
Pakaprovcovití – Catostomidae

Tato nevelká čeleď (13 rodů s více než 70 druhy) obývá především Severní Ameriku, ale 2 druhy se vyskytují v Asii – druhotně ze Severní Ameriky rozšířený pakaprovec obecný *Catostomus catostomus* v nejvýchodnější Sibiři a původní, nejstarobylější druh čeledi rezatka čínská, *Myxocyprinus asiaticus* ve velkých čínských řekách. Celá tato skupina je evolučně tetraploidního původu ($2n = 100$) a rozbor exprese některých duplikovaných genů svědčí pro původ allotetraploidní.

Sekavcovití – Cobitidae

Eurasijská čeleď benticky žijících ryb malých rozměrů s asi 18 rody a více než 130 druhy se dělí na hluboce vývojově dělené „southern lineages“ a daleko mladší skupinu „northern clade“ (Šlechtová a kol., 2006). Polyploidní formy byly dosud nalezeny pouze v té druhé skupině druhů, a to pouze u dvou rodů: sekavec *Cobitis* a piskoř *Misgurnus*. Nebudeme se zabývat stále nevyřešenou skutečností, že s největší pravděpodobností rod *Cobitis* zahrnuje několik vývojových linií, které v budoucnu doznají statusu nově popsaného rodu, činíme tak jen pro upozornění na případné nomenklatorické změny v budoucnu. V tomto rodě bylo objeveno více hybridních polyploidních komplexů: i) v Evropě je to komplex vzniklý opakovanými starobylými, ale i současnými hybridizacemi druhů *C. taenia* ($2n = 48$), *C. elongatoides* ($2n = 50$), *C. tanaitica* ($2n = 50$) a *C. pontica* ($2n = 50$), ve východní části areálu komplexu (okolí Moskvy) se přidává *C. melanoleuca* ($2n = 50$), v jižní části (jižní Bulharsko a přilehlé Řecko) pak *C. strumicae* ($2n = 50$; Choleva a kol., 2008), komplex vedle parentálních, pohlavně se množících forem, zahrnuje rovněž diploidní ($2n = 49, 50$), triploidní ($3n = 73, 74, 75$) a tetraploidní ($4n = 96, 97, 98, 99, 100$) hybridní (povětšinou) samice (počty chromozomů záleží na složení genomu daného hybridu, povšimněme si, že jeden z druhů má $2n = 48$, proto taková variabilita), u diploidních a triploidních bylo prokázáno gynogenetické rozmnožování (obr. 6.2.), o způsobu rozmnožování tetraploidních forem nejsou bližší údaje, ii) v Koreji byl objeven hybridní polyploidní komplex vzniklý zřejmě recentní hybridizací *C. sinensis* ($2n = 48$) a *C. longicorpus* ($2n = 50$), komplex vedle parentálních, pohlavně se množících forem, zahrnuje rovněž diploidní ($2n = 49, 50$), triploidní ($3n = 73, 74$) samice, u nichž byla prokázána gynogeneze jako způsob rozmnožování. K tomuto komplexu je nutné dodat, že jeho poznání je daleko menší než u evropských komplexů, dále že jméno *C. sinensis* zřejmě zahrnuje několik druhů a není jisté, který je parentálním druhem, a že *C. longicorpus* je nyní řazen do (parafyletického) rodu *Iksookimia*. Na rozdíl od situace hybridních komplexů na kontinentu, v Japonsku se vyskytuje několik tetraploidních forem ($2n = 96–100$), které se množí pohlavně – jedná se diploidně-tetraploidní komplexy, *C. striata*, *C. biwae* (zde tzv. velká rasa vyskytující se pouze v jezeře Biwa má $2n = 96$); přes pečlivý průzkum nebyly nikdy nalezeny triploidní formy. Fylogenetická analýza mitochondriálních a několika nukleárních genů prokázala, že tetraploidní formy v komplexu *C. striata* vznikly velmi dávnou hybridizací, jedná se tedy o alopolyploidii, zatímco tzv. velká rasa *C. biwae* z jezera Biwa vznikla autotetraploidii (Saitoh a kol., 2010). Zřejmě obdobné poměry existují i u rodu piskoř *Misgurnus*. Několik východoasijských druhů je evolučně diploidních (*M. mohoity*, *M. nikolskyi*, *M. mizolepis*, *M. (Parmisgurnus) dabryanus*), ale u piskoře dálnovýchodního *M. anguillicaudatus* byly vedle diploidních forem ($2n = 50$) nalezeny i triploidní ($3n = 75$) a tetraploidní ($4n = 100$) samice, a to jak v Japonsku, tak v Číně. Zatímco pro triploidní

formy byla prokázána jako forma rozmnožování gynogeneze (Morishima a kol., 2008), a tedy přítomnost hybridního polyploidního komplexu dosud neznámých parentálních druhů, u tetraploidních forem vše nasvědčuje autotetraploidii (Li a kol., 2011). U evropského piskoře pruhovaného *M. fossilis* byly nalezeny jak diploidní formy ($2n = 50$), tak formy tetraploidní ($2n = 100$), avšak i formy triploidní a kupodivu i intermediární mezi triploidní a oběma dalšími formami (Drozd a kol., 2010), vysvětlení dosud není, avšak dobrou hypotézou je autotetraploidie s následnými změnami genomu v evoluci.



Obr. 6.2. Výsledky experimentálního křížení diploidních a triploidních hybridních biotypů sekavců (ET, EET, ETT) se samci rodičovských druhů na příkladu druhů *C. taenia* (TT) a *C. elongatoides* (EE) jejichž výsledkem je opět vznik hybridních biotypů. Podobné poměry panují i mezi *C. taenia* a *C. tanaitica* anebo mezi *C. elongatoides* a *C. tanaitica* ukazující zdroj velké hybridní diversity unisexuálních klonů sekavců v přírodě. Někdy jsou nalezeny i diploidní/triploidní mosaiky, a to i v přírodě. Podle Rába a kol. (2007).

Sekavkovití – Botiidae

Tato skupina byla ještě do nedávna řazena mezi sekavcovité ryby, Cobitidae, je však velmi odlišnou linií nadčeledi Cobitoidea (Šlechtová a kol., 2007). Sekavky jsou známé chovatelům tropických akvarijních ryb, především sekavka nádherná, *Chromobotia macracanthus*. Čeleď má dnes 9 rodů s 50 druhy a je dělena do 2 podčeledí – Leptobotiinae a Botiinae. Z hlediska tématu této kapitoly je pak zajímavé, že všichni dosud studovaní zástupci Leptobotiinae jsou evolučně diploidní ($2n = 50$), zatímco zástupci Botiinae jsou evolučně tetraploidní ($2n = 100$). Vzhledem k tomu, že Botiinae je monofyletická linie, lze předpokládat jednu dávovou polyploidizační událost, zda auto- či allotetraploidní není dnes jasné, některé předběžné údaje o lokalizaci hlavních ribozomálních genů u tetraploidů by mohly svědčit pro prvou možnost (Sember, ústní sdělení).

Pancéřníčkovití – Callichthyidae

Pancéřníčci jsou rovněž ryby známe chovatelům tropických ryb, z nich především rod pancéřníček *Corydoras*. Je to rod druhové nesmírně početný, dosud bylo popsáno více jak 150 druhů a neustále jsou objevovány další. Z hlediska výskytu polyploidie věrohodné údaje nejsou k dispozici, přesto však neuvěřitelné rozpětí počtu chromozomů od $2n = 40$ u *C. nattereri* přes $2n = \sim 100$ u např. *C. agassizi*, *C. julii*, *C. metae* až po $2n = 134$ u druhu *C. aeneus*, stejně jako rozpětí velikosti genomů od 1,1 pgDNA/1C u *C. cf. simulans* po 8,8 pgDNA/1C u *C. metae* svědčí o tom, že se zde vyskytují polyploidní formy (Taylor a Alexandrou, 1012). Ušběrného (= zahrnuje několik navzájem obtížně rozeznatelných druhů) druhu *C. aeneus* se vyskytuje diploidně polyploidní komplex s neznámým způsobem rozmnožování (Turner a kol., 1992).

Pakeříčkovcovití – Heteropneustidae

Malá čeleď sumcovitých ryb s jedním rodem a asi 3 druhy. Zde byly u druhu pakeříčkovec dvoupásý, *H. fossilis*, nalezeny formy haploidní $n = 30$, diploidní ($2n = 56/57/58$), triploidní ($3n = 87$) a tetraploidní ($4n = 116$), a co je zajímavé, u obou pohlaví. Bohužel žádný další údaj o této zřetelně zajímavé ploidní situaci publikován nebyl (Pandian a Koteeswaran, 1999).

Lososovití – Salmonidae

Lososovití ryby jsou z hlediska polyploidie nejvíce studovanou skupinou ryb. Je to skupina relativně malá, má asi 11 rodů s ne více než 100 druhy, které tvoří 3 vývojové linie – Thymallinae (lipani), Coregoninae (síhové) a Salmoninae (pstruzi, lososi, siveni a hlavatky) – a v tomto pořadí se od sebe oddělovaly. Předpokládá se, že u předka všech lososovitých ryb došlo k autotetraploidní události, což bylo opakovaně potvrzeno analýzou duplikovaných genů a jejich exprese, v novější době také pomocí genomického přístupu. Dále se předpokládá značná starobylost této tetraploidizace (Ramsden a kol., 2003), genomy lososovitých jsou proto do značné míry re-diploidizované. Předpokládá se, že původní evolučně diploidní předek lososovitých měl $2n = 50$ jednoramenných chromozomů, tedy počet ramen (NF, *fundamental number of arms*) rovněž 50. Po tetraploidizaci měl předek všech lososovitých $2n = 100$ a počet ramen rovněž 100. Přitom je zajímavé, že hypotetickou chromozomovou sádku diploidního předka mají recentní zástupci rodu štika *Esox*, tedy zástupci sesterského řádu Esociformes. Diferenciace genomů lososovitých se poté ubírala dvěma cestami: i) „*fusion branch*“ je charakteristická pro Coregoninae a Salmoninae, kde dochází ke snížení počtu chromozomů cestou fúzí jednoramenných chromozomů, při zachování počtu ramen genomu hypotetického předka kolem 100 a ii) „*inversion branch*“ u Thymallinae, kde naopak se zachoval počet chromozomů odpovídající počtu chromozomů genomu hypotetického předka kolem 100, ale počet ramen se zvýšil inverzemi chromozomů, kterými se cetromery přesunuly z konců chromozomů ke středu, čímž se z jednoramenných chromozomů staly dvojramenné. Je ale zajímavé, že tento proces probíhal nezávisle na sobě v různých liniích Coregonine a Salmoninae a že je možno karyotypy lososovitých zařadit do několika charakteristických kategorií v závislosti na velikosti strukturní reorganizace genomu v evoluci:

AA („*ancestra*“ A) – $2n = 82-96$, NF ≈ 110 – *Brachymystax*, *Hucho* (jsou nejstarobylejší)

A – $2n = 78-84$, NF ≈ 100 – *Prosopium*, *Coregonus*, *Salvelinus*, *Salmo* (je nejčastější)

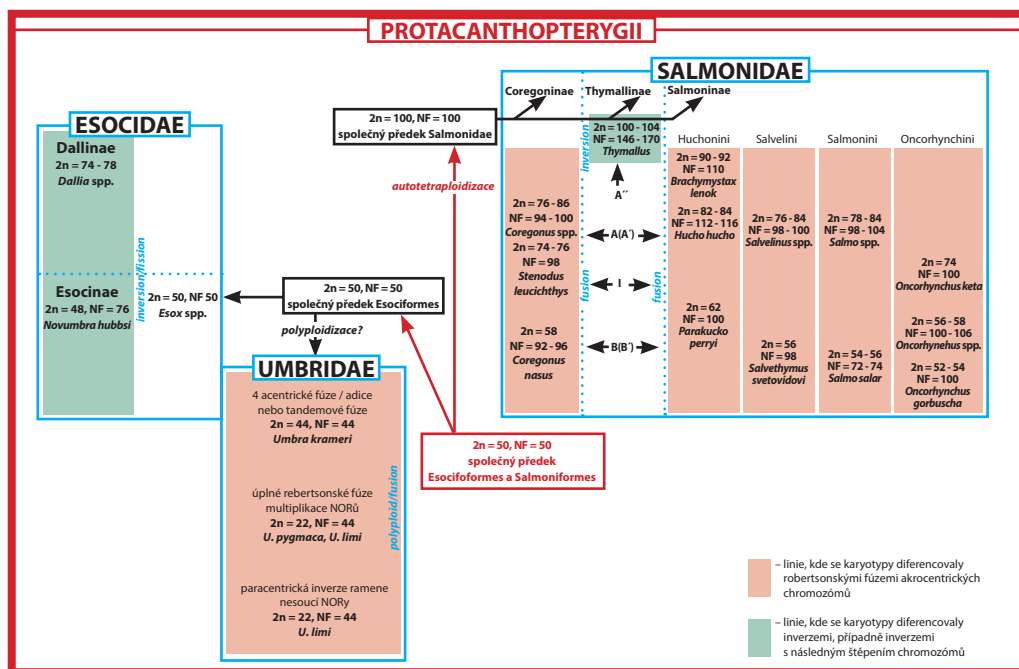
B – $2n \approx 60$, NF ≈ 104 – *Prosopium*, *Coregonus autumnalis*, *Parahucho perryi*, *Salvethymus svetovidovi*, *Oncorhynchus spp.*

C – $2n = 98-102$, NF $\approx 146-178$ – *Thymallus*

D(B) („*derived*“ B) – $2n = 54-58$, NF = 72–74 – *Salmo salar*

Je zajímavé, že typy B a D(B) mají striktně anadromní formy nebo druhy, jež jsou výsledkem starší intralacustriní speciace a tento nápadný paralelismus lze pravděpodobně vysvětlit shodnými populačně genetickými specifiky obou typů lososovitých (Phillips a Ráb, 2001).

PROTACANTHOPTERYGII



Obr. 6.3. Hypotetická chromozomová evoluce u dvou sesterských řádů Esociformes a Salmoniformes ukazuje nápadné paralelní trendy diferenciacie v obou řádech, u Salmoniformes po tetraploidizaci (Ráb, 2004).

Oba sesterské řády Esociformes a Salmoniformes jsou basálními skupinami nejpočetnější skupiny dnes žijících moderních ryb – Euteleostei. Polyploidní formy však byly nalezeny jenom v jedné jejich čeledi (obr. 6.3.).

Živorodkovití – Poeciliidae

Je velká skupina (na 40 rodů a přes 300 druhů) drobných rybek, kde polyploidní formy byly nalezeny u dvou rodů *Poecilia* a *Poeciliopsis*. V rodě *Poeciliopsis* byl objeven hybridní polyploidní komplex vzniklý zřejmě recentní hybridizací druhů *P. monacha*, *P. lucida*, *P. occidentalis* a *P. viriosa*, kde se vyskytují diploidní ($2n = 48$) a triploidní ($3n = 72$) formy s různými kombinacemi genomů uvedených druhů v hybridních genomech a rozmnožují se hybridogeneticky. Na závěr našeho přehledu uvádíme poněkud podrobněji případ živorodky křížené „Amazon molly“, *Poecilia formosa*, jedná se totiž o vůbec první nález klonálního, asexuálně se množícího obratlovce. Tato drobná rybka rozšířená na východním pobřeží Mexika a Texasu byla popsána Girardem již v roce 1859, ale nikdo od té doby nenalezl samce tohoto druhu. Přitom samci téměř všech druhů čeledi Poeciliidae se od samic nápadně odlišují gonopodiem – zkostrnatělým pářícím orgánem vzniklým z řitní ploutve, a dají se proto velmi snadno rozpoznat. Když v roce 1932 zveřejnili Hubbs a Hubbs podrobnosti o jejich neobvyklé reprodukční biologii, téměř okamžitě byl tento objev zásadně zpochybněn – obratlovci se přece nemohou rozmnožovat nějakou formou partenogeneze, jako je tomu u rostlin nebo u hmyzu, protože jsou evolučně příliš pokročilí na to, aby u nich mohla existovat podobně „primitivní“ forma rozmnožování. Dnes je bez jakýchkoliv pochyb prokázáno, že tato rybka vznikla křížením druhů *P. mexicana* a *P. latipinna* (v některých oblastech také s některými dosud neidentifikovanými druhy např. *P. limantouri*), její populace jsou

tvořeny diploidními ($2n = 46$) a triploidními ($3n = 69$) formami, vzácně jsou nalézány i formy tetraploidní ($4n = 92$), a množí se výlučně gynogeneticky, v některých případech byla prokázána mírná propustnost, tedy částečné genové rekombinace. Celý příběh této ryby s posledními výsledky nejnověji podává Lampert a Scharlt (2008).

Závěrečné poznámky

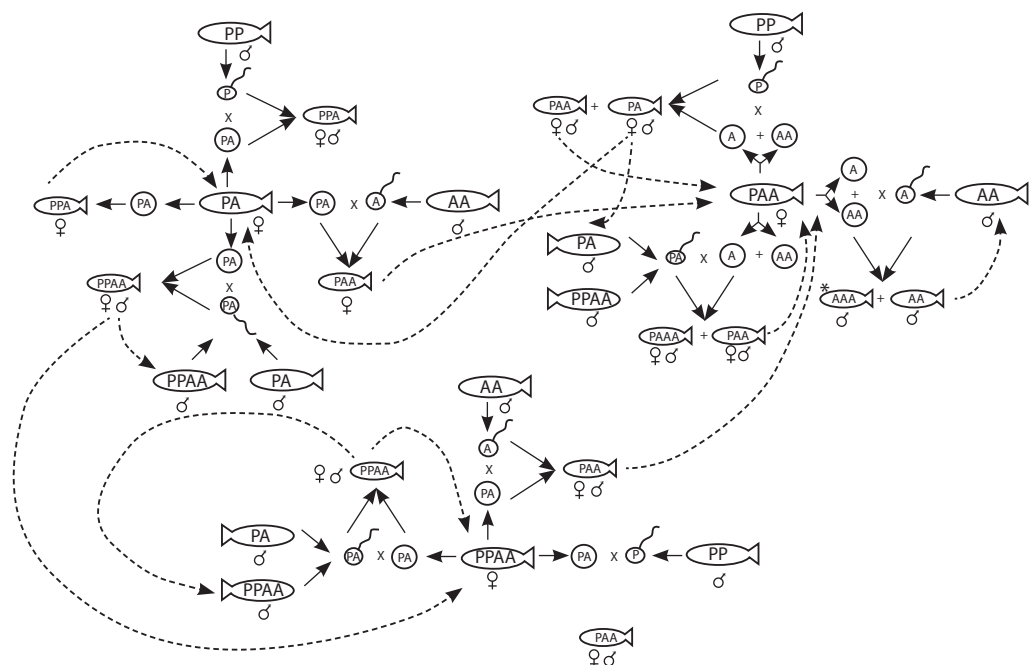
Pro úplnost našeho přehledu je nutné dodat, že jsou známy ještě další dva hybridní komplexy s určitou formou asexuálního rozmnožování, nebyly však u nich studovány detailně ploidní úrovně. Prvním je hybridní komplex *Menidia clarkhubbsi* (gavúnovití Atherinidae), který je zřejmě gynogeneticky se množícím hybridem druhů *M. beryllina* a předkem druhu *M. peninsulae*, u této formy jsou zřídka nalézány triploidní formy (Echelle a kol., 1989). Druhým, recentně objeveným komplexem je hybridní systém několika druhů hlaváčů rodu *Hypseleotris* (hlavačkovití Eleotridae), kde se na základě analýzy mikrosatelitových markerů předpokládá hybridogenetická reprodukce, ale různé ploidní formy popsány zatím nejsou (Schmidt a kol., 2011).

Mechanismy vzniku polyploidie – hybridizace, asexuální fáze a vznik pohlavního rozmnožování u nově vzniklého polyploidního druhu

Ve výše uvedeném přehledu jsme ukázali, že případy prokázané autopolyploidie u ryb jsou velice vzácné (Salmonidae, velká rasa *C. biwae*, tetraploidní formy *M. fossilis*, *M. anguillicaudatus*, snad *P. dolloi* a veslonosi), naproti tomu ostatní a početné případy lze jednoznačně přisoudit druhému typu, allopolyploidizaci, který vzniká mezidruhovou hybridizací. Naskytá se tedy otázka, jakým mechanismem vzniká vyšší, tetraploidní stupeň, když víme, že prvotním následkem hybridizace je vznik hybridního organismu, který ale v těchto případech produkuje v dospělosti neredukovaná, tedy diploidní vajíčka, z nichž část po stimulaci spermií vytvoří klonálně se množící potomky, ale u části dojde k inkorporaci genomu spermie a tedy ke vzniku triploidie (Choleva a kol., 2012). Studie evolučních aspektů dynamiky těchto komplexů ukazují, že takovéto hybridní polyploidní komplexy, jež vznikají jako důsledek nahodilých hybridizačních událostí, jsou v některých případech skutečně "slepé vývojové uličky". V jiných případech však evidentně představují přechodná stadia **adaptivní despeciace**, kde hybridní a navíc polyploidní forma nalezne svojí ekologickou niku a srovnatelně rychlejší reprodukci než formy pohlavní převládne v populaci. V dalším vývoji hybridního asexuálně se množícího komplexu pak může vzniknout nový, tetraploidní druh s pohlavním rozmnožováním **prostřednictvím tzv. triploidního mostu**. Ve skutečnosti to lze vidět nejméně na dvou případech. Obr. 6.4. ukazuje velmi komplikovaný reprodukční systém komplexu *S. alburnoides*, kde lze vidět, že systém je schopen (vzácně) generovat i tetraploidní samce a samice, které se množí pohlavně. Takto s velkou pravděpodobností vzniká nový druh s evolučně tetraploidní úrovní a počíná si dále jako biologicky diploidní druh, kde haploidní úroveň gamet odpovídá předešlé diploidní úrovni předka.

Dalším příkladem takového přechodu od asexuálního do pohlavního rozmnožování spojeným se zvýšenou ploidí jsou zřejmě poměry v řadě populací karasů. V rámci tohoto teoretického rámce pak můžeme konstatovat, že ve skutečnosti máme před sebou raná (např. *Phoxinus*, *Cobitis*), pokročilá (např. *Squalius*, *Carassius*) a terminální (např. *Barbus*, *Cyprinus* a celou řadu dalších rodů evolučně tetraploidních kaprovitých, pakaprovcovitých) stadia takových procesů a rovněž rekurentní opakování téhož procesu, kdy dochází k dalšímu zvýšení ploidie (např. u jeseterů, evolučně hexaploidních *Carassius*, *Labeobarbus*, *Varicorhinus*, „*schizothoracine lineage*“) až po triploidní derivát evolučně hexaploidní úrovně $2n = 446$ u druhu *Ptychobarbus dipogon*, který je zřejmě dokladem třech takovýchto cyklů. Je tedy více než pravděpodobné, že existuje kauzální vztah mezi hybridizací a zvýšením ploidní úrovně,

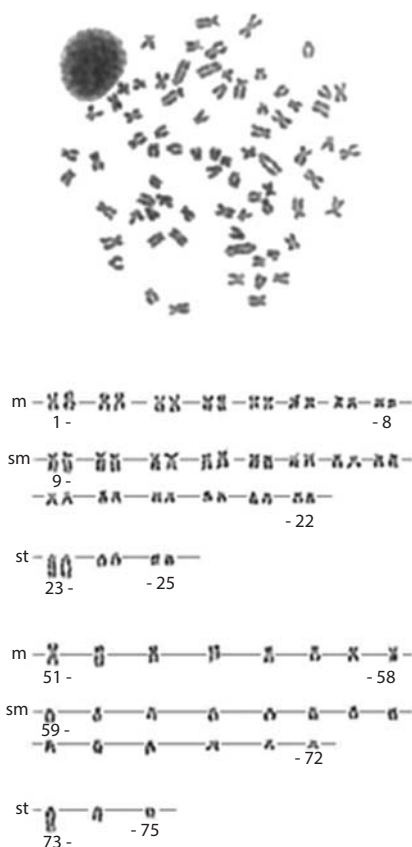
že se jedná o poměrně častý jev, ke kterému došlo a dochází v evoluci genomu ryb často. Tento předpokládaný mechanismus sám o sobě není překvapivý, protože podobným způsobem vznikají početné allopolyploidní druhy rostlin (např. Krahulec a kol., 2010), překvapivé je však to, že se tento speciální mechanismus vyskytuje i u obratlovců.



Obr. 6.4. Předpokládané reprodukční vztahy různých forem hybridů s různou ploidií a různým složením hybridního genomu komplexu *Squalius 'alburnoides'*, kde je zřejmé, že genomy parentálních forem jsou cyklicky ztraceny, získávány a/nebo nahrazovány. Podle Alves a kol. (2001).

Spontánní triploidie

Spontánní triploidie je u ryb velmi běžný jev, pozorovaný u značného počtu druhů ryb (Benfey, 1989), zejména u druhů s vnějším oplozením, není však na tyto omezen a může se vyskytnout i u druhů s vnitřním oplozením. Tomu nasvědčuje například i nález triploidního jedince žraloka vouskatého, *Ginglymostoma cirratum*, který byl identifikován pomocí průtokové cytometrie (Kendall a kol., 1994). V zásadě záleží pouze na dostatečné velikosti analyzovaného vzorku dané populace, ať již přírodní či v chovu, aby byl takový triploidní jedinec nalezen. Příklad je uveden na obr. 6.5., kdy byl takový jedinec nalezen mezi 10 studovanými jedinci jelce proudníka, *Leuciscus leuciscus*, z řeky Dyje (Ráb a kol., 2007). Jinými příklady od nás jsou dosud nepopsaný druh mřenky *Barbatula* sp. (Collares-Pereira a kol., 1995) z řeky Poprad, pstruh duhový forma „Kamloops“, *Oncorhynchus mykiss* (Flajšhans a Ráb, 1987) z chovu pstruhařství v Liběchově či lín obecný, *Tinca tinca*, z některých chovů v jižních Čechách (Flajšhans a kol., 1993). Mechanismus vzniku spontánní triploidie spočívá v chybném průběhu oplození a následných procesů formování samčího prvojádra, které před syngamií čeká na dokončení II. meiotického dělení, vydělení 2. polárního tělíska a tvorbu samičího prvojádra, v případě spontánní triploidie však nedojde k vydělení 2. polárního tělíska a výsledkem je triploidní organizmus.



Obr. 6.5. Triploidní metafázní buňka $3n = 75$ (nahore) a odpovídající karyotyp jedince jelce proudníka *Leuciscus leuciscus* z řeky Dyje sestavený z chromozomů barvených Giemsovým barvivem. Tři haploidní genomy mají shodnou strukturu karyotypu, jak je obvyklé u kaprovitých podčeledi Leuciscinae, takže bez použití dalších genetických analýz nelze bezpečně zjistit, zda se v tomto případě jedná o autotriploidii (AAA) nebo allotriploidii (AAB). Podle Rába a kol. (2007).

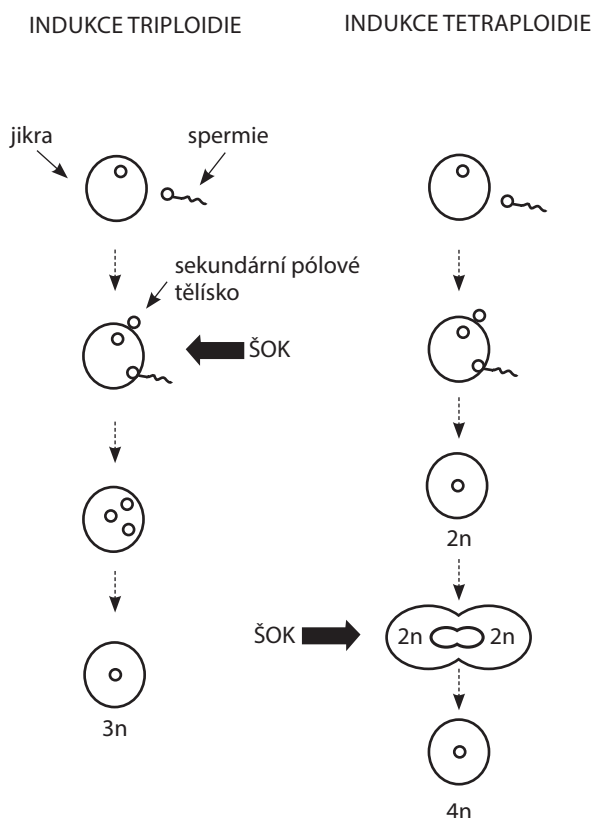
Shrnutí

V předcházejících sekcích jsme ukázali, že ač o rozšíření polyploidie u ryb toho mnoho nevíme, protože je prozkoumáno necelých 10 % diverzity genomů ryb, přesto je zřejmé, že tento jev hrál významnou roli v evoluci ryb. Je také pravděpodobné, že polyploidní formy ryb, nápadně časté u starobyklých linií oploutvených studenokrevných obratlovců (žraloků, chimér, rejnoků, jeseterů, veslonosů) nebo starobyklých linií paprskoploutvých (kaprovití, sekavcovití, pakaprovcovití, někteří sumci, lososovití) či násadoploutvých (*Protopterus dolloi*) ryb, mohou představovat evoluční experimenty s polyploidizací genomu, tak jak je známa u zrodu Teleostei (3R hypotéza), a že se zřejmě u moderních ryb polyploidní formy nevyskytují. Ukázali jsme také, že autopolyploidních ryb je zřetelně velmi málo, převažující formy polyploidie – allopolyploidie – souvisí s mezidruhovou hybridizací a poukázali jsme na kauzální vztah mezi takovou hybridizací a zvýšením ploidní úrovně v evoluci, které evidentně nastávalo i vícekrát za sebou. Ukázali jsme také, že genomy ryb jsou velmi plastické vůči nahodilým změnám ploidie spontánními mechanismy.

6.2. Indukovaná polyploidie

Různé mechanismy vedoucí k umělému navození polyploidie u ryb byly v průběhu 20. století intenzivně studovány a od 70. let celosvětově využívány k produkci neplodných rychle rostoucích nebo plodných polyploidních ryb a měkkýšů pro potřeby sladkovodní a mořské akvakultury.

Umělé navození polyploidního stavu se nazývá **polyploidizace**. Nejčastěji se v podmínkách rybí akvakultury cíleně vyvolává triploidní (**triploidizace**), méně často pak tetraploidní stav (**tetraploidizace**), a to pomocí některého z řady fyzikálních nebo chemických zásahů do vývoje zygoty. Tyto zásahy jsou celosvětově označovány jako fyzikální nebo chemické šoky. Z obrázku 6.6. je vidět, že šok pro indukci triploidie musí postihnout období 2. fáze meiózy a depolymerací tubulinových vláken vřeténka zabránit oddělení 2. pólového tělíska. Výsledný organismus má tři sady chromozomů: 1 sadu ze samičího prvojádra, 1 sadu ze sekundárního pólového tělíska a 1 sadu ze samčího prvojádra. Šok k indukci tetraploidie musí postihnout cytokinezi 1. mitotického dělení (1. rýhování) a depolymerací tubulinových vláken vřeténka zabránit rozdělení duplikovaných sad chromozomů do dceřinných buněk (blastomer). Výsledný organismus má čtyři sady chromozomů: po dvou ze samičího a samčího prvojádra. Obecně platí, že postup aplikace šoku pro indukci triploidie je shodný s postupem rediploidizace při meiotické gynogenezi a postup aplikace šoku pro indukci tetraploidie je shodný s postupem rediploidizace při mitotické gynogenezi nebo androgenezi. O těchto metodách bude pojednáno dále.



Obr. 6.6. Schéma indukce triploidie a tetraploidie. Z archivu O. Linharta.

Šok

Polyploidizační šok je fyzikální nebo chemický zásah do vývoje zygoty, působící poruchu dělicího aparátu (vřeténka), který podle času použití od oplození a aktivace gamet způsobí zadržení (přifuzování) 2. pólového tělíska nebo duplikaci chromozomových sad v 1. mitóze bez následného rozchodu do dceřiných buněk. **Mechanické šoky** (otřesy, napichování jiker) byly experimentálně testovány u kapra obecného ve 30. letech 20. století, mají však malou účinnost a vyvolávají vysokou mortalitu. **Chemické šoky** jsou založené na působení vřeténkových jedů (mitostatik, známých např. z onkologie: kolchicinu, kolcemidu, cytochalazinu B aj.) a inertních plynů (N_2O) na dělicí aparát buňky. V akvakultuře ryb se však používají minimálně. Nejčastěji jsou pro svou účinnost používány další **fyzikální šoky**. Některé příklady použití současného využití fyzikálních šoků k indukci triploidie, eventuálně k rediploidizaci při meiotické gynogenezi u ryb lososovitých (pstruh duhový) a kaprovitých (karp obecný, lín obecný) v rybářství ČR uvádí tab. 6.1.

Tab. 6.1. Typy, principy a použití tří typů fyzikálních šoků. Podle Flajšhanse a Linharta (2000), Linharta a kol. (1991, 2001) a Flajšhanse a kol. (2010).

Typ fyzikálního šoku	Princip	Příklad použití	
		Pro lososovitě	Pro kaprovité
Teplotní – teplý	vystavení jiker teplé lázni	z 10 °C do 26 až 29 °C na dobu 20 min	z 20 °C do 40 až 41 °C na dobu 1 až 2 min
Teplotní – chladový	vystavení jiker ledové lázni	nepoužívá se v praxi	z 20 °C do 0 až 4 °C na dobu 35 min
Tlakový	vystavení jiker vysokému tlaku vody v uzavřené tlakové jednotce	hydrostatický tlak > 600 at (> 60,8 MPa) na dobu 1 až 4 min	hydrostatický tlak 518 at (52,47 MPa) na dobu 1,5 až 2 min

Aplikace teplého nebo chladového šoku je provozně jednoduchá (je potřeba pouze ohřát vodu v lázni termostatem nebo ji ochladit ledem, jikry do ní přenést a pak vyjmout), k tlakovému šoku je nutná speciální tlaková jednotka, do jejíž uzavíratelné komory se nalijí oplozené jikry s vodou a tlak vody se zvýší na požadovanou hodnotu pomocí připojeného kompresoru, ruční pumpy nebo z připojených lahví s tlakovým plynem. Tlakové jednotky o objemu do 10 l jiker jsou komerčně dostupné pro chovatele např. ve Francii, Kanadě, USA aj. Také v České republice byl v roce 2012 zaregistrován užitečný vzor pro tlakovou jednotku k indukci polyploidie u ryb (Flajšhans a kol., 2012). Piferer a kol. (2009) ve svém přehledu o indukci polyploidie a biologii a využití polyploidních ryb a měkkýšů v akvakultuře, zahrnujícím druhy mořské i sladkovodní, druhy reprodukcující se v teplé vodě (> 20 °C), studené vodě (< 20 °C) i druhy mírného pásma (~ 20 °C), konstatovali poměrně úzký časový interval pro optimální začátek šoku k indukci triploidie po aktivaci gamet, shodný pro všechny tři typy fyzikálních šoků. Přes obrovské rozdíly ve velikosti jiker jednotlivých cílových druhů, od objemu cca 0,5 µl u pelagických jiker mořských druhů ryb po objem jikry cca 180 µl u některých druhů lososovitých, tyto autoři rovněž konstatovali překvapivě úzký interval optimálních hodnot hydrostatického tlaku k indukci triploidie (tab. 6.2.).

Každý šok je charakterizován třemi proměnnými a kombinace jejich hodnot je zásadní k dosažení maximálního počtu polyploidních jedinců (% polyploidů v potomstvu) a maximálního procenta přežití plůdku. Jsou to:

• **Doba aplikace po oplození a aktivaci gamet** (čas začátku šoku): závisí na druhu ryby a teplotě vody při inkubaci jiker. Rychlost raného vývoje se s teplotou vody nelineárně mění. Standardní teplota vody k inkubaci jiker kapra obecného, lína obecného a sumce velkého je 20 °C, pro jikry pstruha duhového a dalších lososovitých ryb je 10 °C. Při těchto teplotách například u kapra a lína začátek šoku 5 min po aktivaci gamet postihne 2. fázi meiotického dělení a indukuje triploidii, počátek šoku 43,5 min po aktivaci gamet postihne cytokinezi 1. mitotického dělení a indukuje tetraploidii. Pro pstruha duhového má šok k indukci triploidie u jiker inkubovaných v 10 °C začít 20–40 min po aktivaci gamet a šok k indukci tetraploidie ve 4 h 30 min (Lincoln a Bye, 1984; Ihssen a kol., 1990). Při použití jiných než standardních inkubačních teplot je nutné optimální čas začátku šoku přepočítat s pomocí údaje o délce mitotického cyklu τ_0 (Detlaff a Detlaff, 1961).

• **Intenzita šoku** (teplota, tlak): podstatným způsobem ovlivňuje výsledek indukce polyploidie, jak procenta polyploidů, tak i jejich přežití. Vyšší teplota (tlak) indukuje vyšší procento polyploidů, ale zároveň neúměrně zvyšuje embryonální mortalitu a naopak, použitím snížené teploty lze dosáhnout vysokého procenta přežití, ale nízké efektivity indukce polyploidie.

• **Expoziční doba** (trvání šoku) je nepřímo úměrná intenzitě šoku, jinak je spojena s nadměrnou mortalitou.

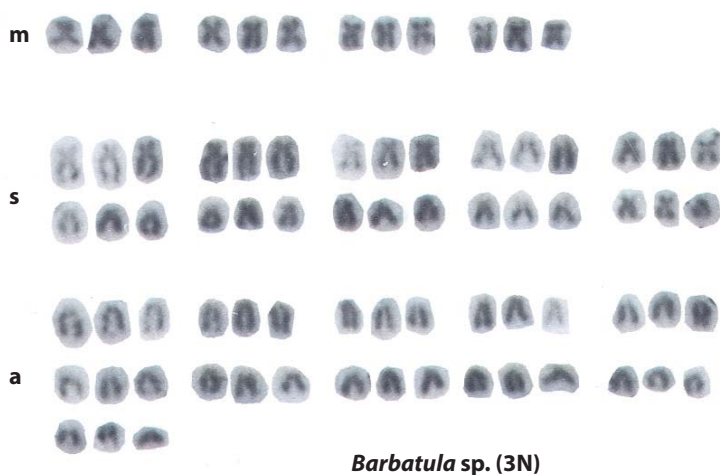
Tab. 6.2. Rozmezí hodnot hlavních proměnných k indukci triploidie u ryb. Podle Piferrer a kol. (2009).

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

Metody stanovení ploidie

Přímé metody zahrnují stanovení karyotypu, kvantifikaci obarvených jadérek v buňkách, kvantifikaci obsahu DNA ve specificky barvených buněčných jádrech pomocí průtokové cytometrie, spektrofluorimetrie a mikrodenzitometrie. Nepřímé metody jsou založeny na stanovení velikosti buněk a buněčných jader klasickými hematologickými postupy, Coulterovou metodou stanovení velikosti buněk na základě impedance, měřením buněčných a jaderných geometrických charakteristik, případně na základě morfologických rozdílů mezi diploidy a polyploidy.

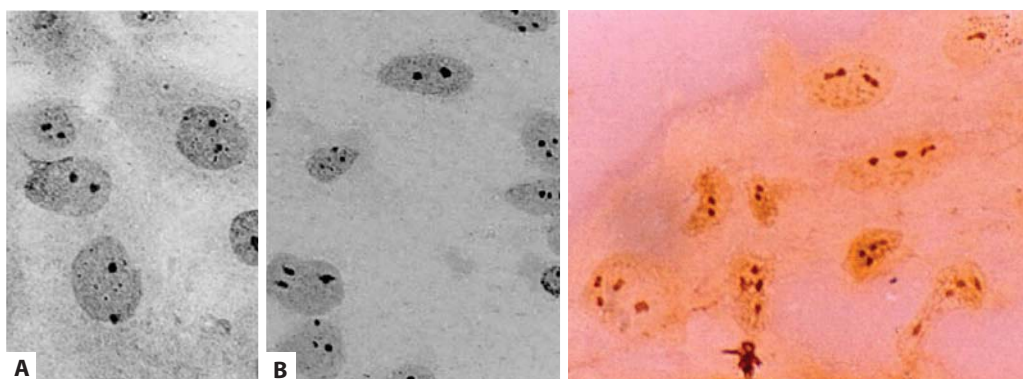
• **Stanovení karyotypu** (blíže v kapitole 3.) se provádí buď přímou preparací chromozomů z kraniální části ledvin, ze sleziny, z gonád nebo z epiteliálních buněk žaber po zabití ryby nebo z kultur fibroblastů nebo leukocytů po odběru části ploutevního lemu nebo krve ze živých ryb. Z hlediska rychlosti vyšetření je tato metoda relativně pracná a pomalá a nelze ji použít v poloprovozním/provozním měřítku, je však nejpřesnější a může ukázat abnormality jako je aneuploidie nebo heteromorfismy v některých trojitých sadách, nezjistitelné jinými metodami. Jedná se o základní referenční metodu (obr. 6.7.).



Barbatula sp. (3N)

Obr. 6.7. Karyotyp triploidní mřenky mramorované. Podle Collares-Pereira a kol. (1995); $3n = 75$ chromozomů; **m** metacentrické, **s** submetacentrické a **a** akrocentrické chromozomy.

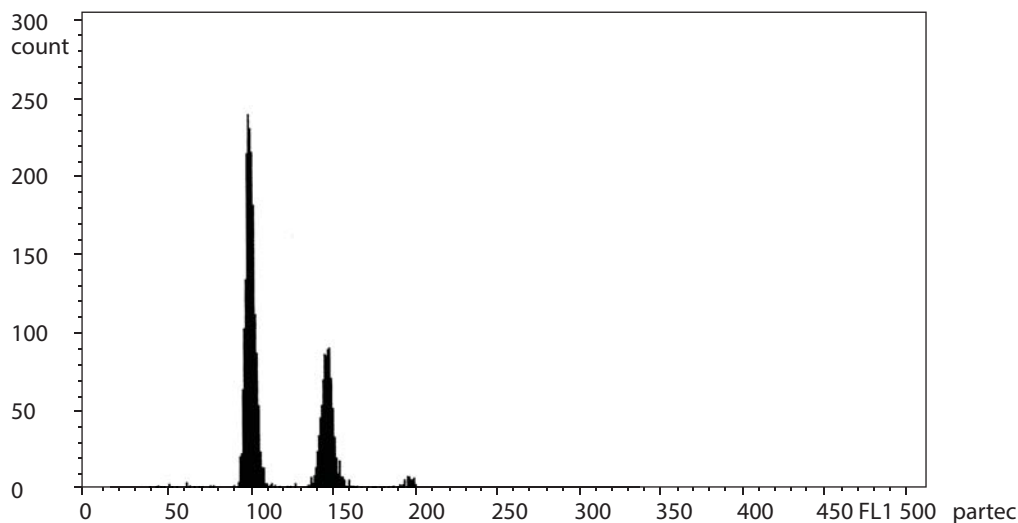
- **Kvantifikace obarvených oblastí organizátoru jadérka (Nucleolar Organizer Region, NOR)** či celých jadérek v metafázních nebo interfázních buňkách je rychlou a levnou metodou, ale její použití je omezeno na druhy ryb, které mají v haploidní sadě chromozomů jen jeden chromozom s NOR (Phillips a kol., 1986; Flajšhans a kol., 1992). Řada druhů ryb totiž díky přestavbám chromozomů během své evoluce má vyšší nebo nižší počet chromozomů s NOR v haploidní sadě než odpovídá jejich ploidii. Barvení stříbrem vizualizuje zbytky Ag-barvitelného rRNA-proteinového komplexu syntetizovaného oblastí organizátoru jadérka v předešlé interfázi, a proto identifikuje jen aktivní NOR. V metafázních buňkách diploidních ryb můžeme pozorovat 1 nebo 2 aktivní NOR a v buňkách triploidů 1, 2 nebo 3 aktivní NOR; v interfázních buňkách pak můžeme pozorovat příslušný počet Ag-barvených celých jadérek. U triploidního lína se počet buněk se 3 aktivními NOR pohybuje kolem 40 % (obr. 6.8.).



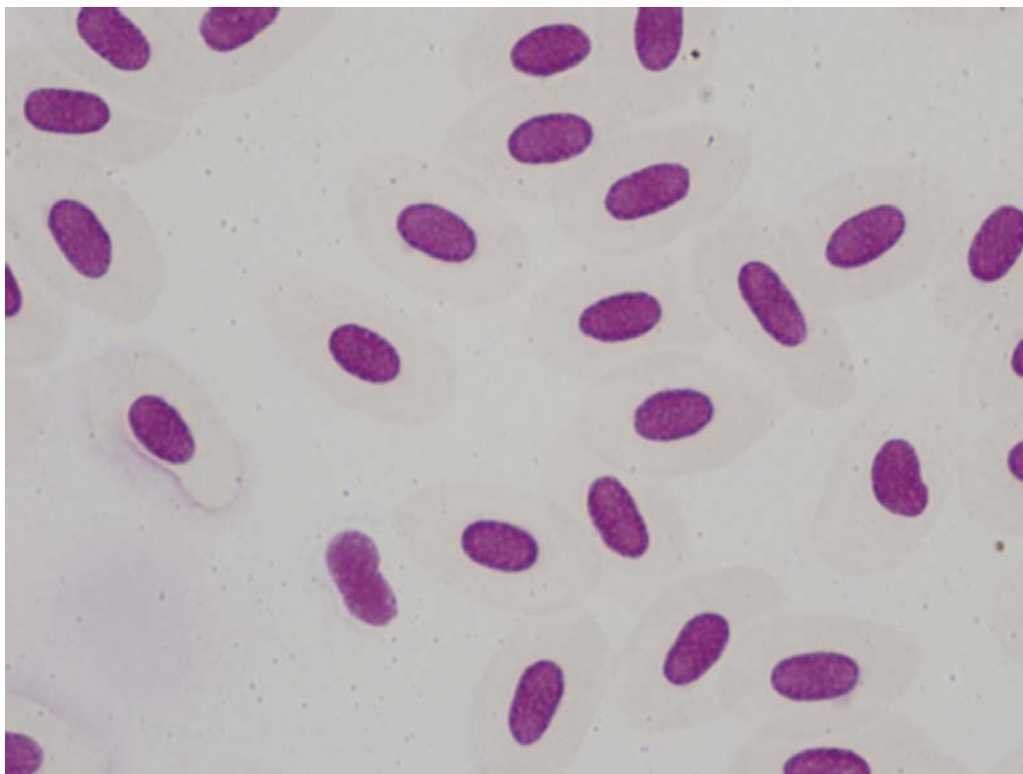
Obr. 6.8. Roztěry tkáně vykuleného plůdku nabarvené roztokem AgNO_3 s viditelnými jadérky obarvenými stříbrem. Vlevo a uprostřed diploidní (A) a indukovaně triploidní (B) lín obecný (podle Flajšhans a Linhart (2000), vpravo indukovaně tetraploidní kapr obecný (z archivu M. Flajšhans).

- **Kvantifikace obsahu DNA instrumentálními metodami** je založena na permeabilizaci buněčné membrány, obarvení jaderné DNA některým DNA-specifickým barvivem (např. 4',6-diamidino-2-fenylindolem, DAPI nebo propidiumjodidem, PI) a na měření fluorescence emitované komplexem obarvené DNA (**průtoková cytometrie a spektrofluorometrie**). Výsledky jsou zpravidla zobrazeny formou histogramu intenzity fluorescence v jádrech analyzované suspenze. Potom platí, že například u triploida, který má tři sady chromozomů a tedy 1,5× více DNA než diploid, se vrchol histogramu zobrazuje zhruba 1,5× dále na ose **x** než u diploida (obr. 6.9.). **Průtoková cytometrie** je rychlou a přesnou metodou stanovení ploidie ryb a této metody je od 80. let 20. stol. celosvětově používáno k hodnocení úspěšnosti chromozomových manipulací u ryb, stejně jako ke studiím diploidně-polyploidních komplexů u ryb (Ráb a kol., 2007). Umožňuje stanovení ploidie embryí (Lecommandeur a kol., 1994), larev (Ewing a kol., 1991) a starších jedinců z buněk krve a tkání (Thorgaard a kol., 1982; Allen, 1983 a další). Při použití vhodného fluorescenčního barviva (například propidiumjodidu jako interkalčního činidla) umožní průtoková cytometrie stanovit velikost genomu (haploidní obsah jaderné DNA) v buněčném jádře studovaného organismu vůči standardu. Tím je obvykle druh o známém haploidním obsahu jaderné DNA, např. lín obecný ($1C = 1,02 \text{ pgDNA}$) nebo pstruh duhový ($1C = 2,60 \text{ pgDNA}$). Třetí z instrumentálních metod, **mikrodenzitometrie** (Gold a Price, 1985; Gold a Amemiya, 1987; Gold a kol., 1990), je založena na měření absorbance barviva v buňkách nátěru obarveného Feulgenovou reakcí a je často používána i ke stanovení velikosti genomu ryb (obr. 6.10.).

File: 376
14.12.99 12:59:44
Total Count 2883



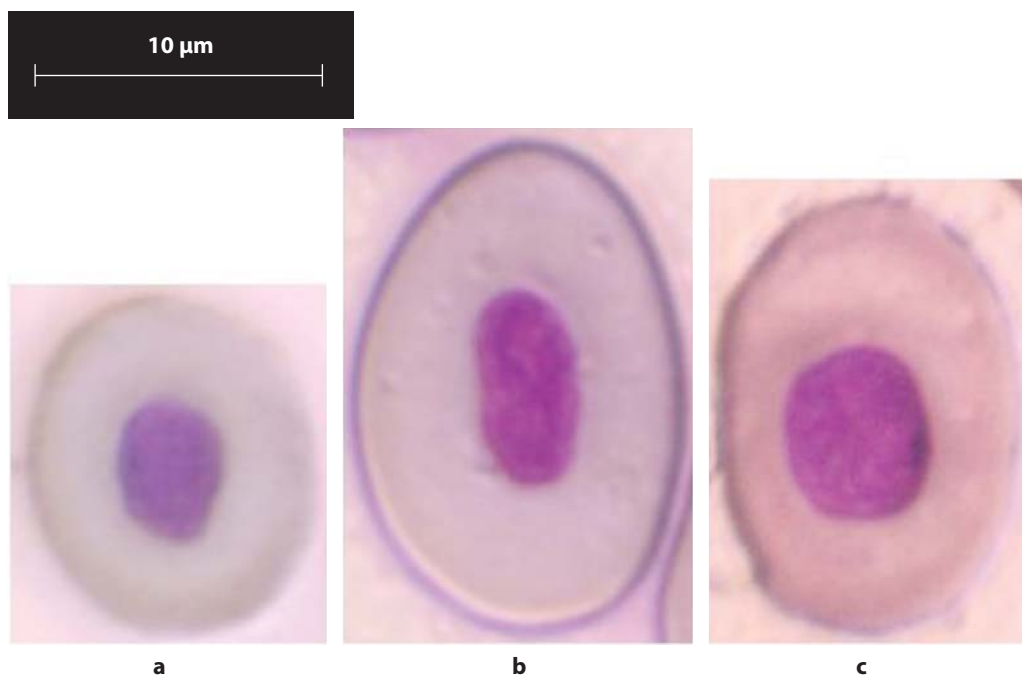
Obr. 6.9. Histogram relativního obsahu DNA diploidů (na kanále 100) a triploidů (na kanále 150) lína obecného. Podle Flajšhanse a Linhart (2000).



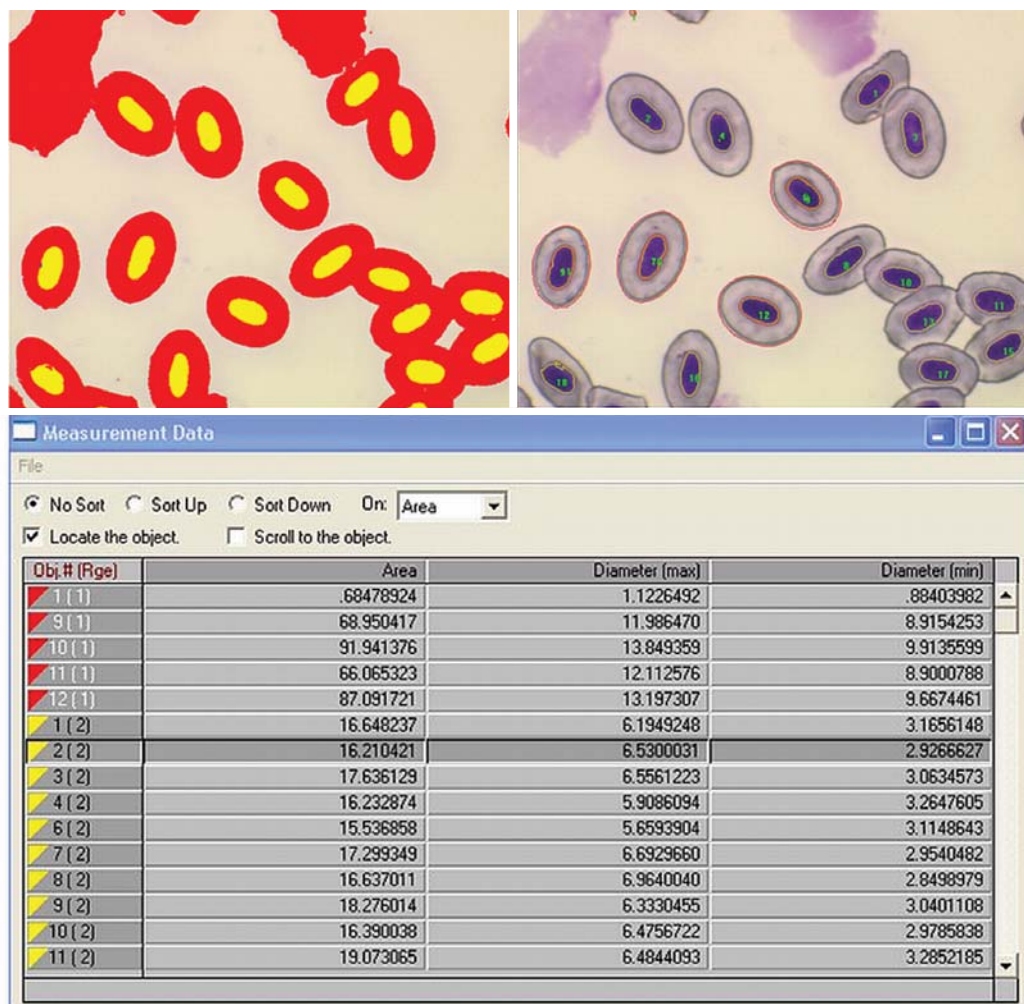
Obr. 6.10. Krevní nátěr karase stříbřitého, *Carassius gibelio* s jádry krevních buněk (převážně erytrocytů) barvenými Feulgenovou reakcí. Z archivu M. Flajšhanse.

- Elektronické **měření objemu jádra Coulterovou metodou** (využívá se v různých analyzátorech a počítačích částic) je založeno na změně impedance při průchodu částice mezi elektrodami, která odpovídá množství elektrolytu nahrazeného buňkou, a tudíž jejímu objemu. K analýze ploidie u ryb metodu poprvé využil Wattendorf (1986) k ověření triploidie (a tedy i předpokladu sterility) u amura bílého, než mohl být jako nepůvodní druh bez možnosti reprodukce vysazen do volných vod k likvidaci přemnožených porostů vodních rostlin. Princip Coulterovy metody je rovněž využíván v řadě humánních a veterinárních hemoanalyzátorů, které dokáží počítat jaderné erytrocyty ryb, obojživelníků, plazů a ptáků (např. francouzský MS 9.5 fy Melet-Schloesing). Stanovení ploidie zde vychází ze středního objemu erytrocytu (*Mean Corpuscular Volume*, MCV), který se u diploidů a triploidů průkazně liší (Svobodová a kol., 1998).

- **Měření geometrických charakteristik buněk a jader** vychází z jejich rozdílné velikosti u ryb diploidních, triploidních a tetraploidních, případně i u vyšších ploidních úrovní. Rozměry erytrocytů byly většinou zjišťovány z barvených krevních nátěrů pod mikroskopem s mikrometrem nebo z mikrofotografií (obr. 6.11.). Tuto metodu poprvé použil Swarup (1959) k rozlišení diploidů a triploidů u koljušky tříostné, *Gasterosteus aculeatus*. Délka celého erytrocytu nebo jádra erytrocytu (podélná osa) jsou obecně považovány za nejlepší indikátor ploidní úrovně u diploidních a triploidních ryb (Wolters a kol., 1982; Benfey a kol., 1984; Boroń, 1994 a další), zatímco šířka celého erytrocytu a šířka jádra erytrocytu (příčná osa) se s úrovní ploidie mění jen nevýznamně. Použití techniky digitalizace mikroskopického obrazu a počítačové analýzy obrazu (obr. 6.12.) přispělo k významnému zrychlení a zpřesnění této metody jako alternativy k průtokové cytometrii (Cormier a kol., 1993; Flajšhans, 1997). Kromě délky celého erytrocytu a délky jádra erytrocytu lze jako indikátor ploidie použít i další přímo měřené charakteristiky, jako je plocha erytrocytu, plocha jádra erytrocytu a jejich obvody (Svobodová a kol., 1998; Flajšhans a Vajcová, 2000; Linhart a kol., 2001; Ráb a kol., 2007 a další), a to i u tetra-, penta- a hexaploidů. Plocha jádra diploidního, triploidního, tetraploidního, pentaploidního a hexaploidního erytrocytu se v průměru pohybuje kolem 10, 15, 20, 25 a 30 μm^2 v případě kapra obecného, karase stříbřitého, lína obecného, sumce velkého a některých jeseterovitých ryb a jejich hybridů. Při měření erytrocytů jedince o neznámé ploidii je vždy nutné vycházet z referenčních hodnot diploidních jedinců téhož druhu.



Obr. 6.11. Digitální mikrofotografie diploidního (a), triploidního (b) a tetraploidního (c) erytrocytu lína obecného (a, b) a karase stříbřitého (c). Podle publikace Doubek (2003), upraveno.



Obr. 6.12. Ukázka měření geometrických charakteristik erytrocytů a jejich jader programem analýzy 2-D obrazu Olympus MicroImage 4.0 s použitím dvojího prahování. Červeně je prahována cytoplazma, žlutě je prahováno buněčné jádro (vlevo nahoře) a po odfiltrování artefaktů, neúplných objektů apod. úpravami intervalů hodnot měřitelných objektů jsou měřené buňky označeny obrysy (vpravo nahoře). Vizualizace měřených objektů slouží operátorovi ke kontrole – v tomto případě naprahování erytrocytu uprostřed snímku přesáhlo skutečný obrys buňky. Spodní výsledná tabulka ukazuje výsledky měřených hodnot (plocha = Area; délka objektu = Diameter max a šířka objektu = Diameter min) pro oba typy objektů. Automaticky jsou měřeny pouze objekty, které se nedotýkají či nepřekrývají.

- Molekulárně genetické techniky jsou méně využívány k rutinní diagnostice ploidní úrovně. **Elektroforéza enzymů** je založená na separaci proteinů z tkání, jejich elektroforetické separaci a barvení jednoho či více alozymů/izozymů. Využívá stupně polymorfizmu odlišných alel v různých lokusech účastnících se translace specifických enzymů. Diploida (AB) a triploida (AAB) pak můžeme odlišit podle silnějšího barvení pruhu produkovaného dvojitou alelou triploida. Používá se i k odlišení autotriploidů od allotriploidních mezidruhových hybridů (Arai, 1988). Využití mikrosatelitních

lokusů znamenalo významné zlepšení alozymové techniky vzhledem k vyššímu rozlišení heterozygotnosti. K identifikaci ploidie lze použít i **DNA fingerprinting** (Han a kol., 1992) a zejména **sekvenaci DNA** a relativní velikost dvojitého vrcholů v chromatogramech. Lze tak stanovit i relativní podíl rodičovských genomů u hybrida (Sousa-Santos a kol., 2005).

- **Morfologické rozdíly mezi diploidy a triploidy.** Allotriploidní mezidruhové hybridy lze v řadě případech morfologicky odlišit od rodičovských druhů na základě fenotypového projevu jejich genomu, obsahujícího chromozomové sady obou druhů (např. hybridy platýze velkého, *Pleuronectes platessa*, x platýze bradavičnatého, *Platichthys flesus*; Purdom, 1972; amura bílého, *Ctenopharyngodon idella*, x tolstolobika pestrého, *Aristichthys nobilis*, Beck a Biggers, 1982; Allen a Stanley, 1983 a Cassani a kol., 1984; nebo pstruha obecného f. potoční, *Salmo trutta* m. *fario*, x sivena amerického, *Salvelinus fontinalis*, Scheerer a kol., 1987). U autotriploidů, kteří mají tři sady chromozomů stejného druhu, byly morfologické odlišnosti proti diploidům popsány pouze sporadicky, u triploidní koljušky tříostné (kratší trup, delší ocasní ploutev; Swarup, 1959), kapra obecného (změny v počtu ploutevních paprsků a šupin; Gervai a kol., 1980 a Gomelsky a kol., 1992), sumečka skvrnitého (menší hlava; Wolters a kol., 1982), amura bílého (změny v tělesných proporcích, v počtu ploutevních paprsků a počtu šupin; Bonar a kol., 1988;), tolstolobika pestrého (deformace hlavy; Tave, 1993), lína obecného (délka a tvar břišních ploutví; obr. 6.13.; Flajšhans a kol., 1993) a indického sumečka *Heteropneustes fossilis* (změny v tělesných proporcích; Tiwary a kol., 1999). Tyto fenotypové odlišnosti se však u různých jedinců projevují do různé míry, nejsou tedy příliš přesné, nelze je brát jako jediné kritérium stanovení ploidie a mohou být použity pouze k orientačnímu rozlišení.



Obr. 6.13. Tvar a délka břišních ploutví u lína obecného: nahoře dlouhé a měkké ploutve triploida, vpravo dlouhé ploutve diploidního samce s masivními prvními tvrdými paprsky a vlevo krátké a měkké ploutve diploidní samice. Fotografie M. Korwina-Kossakowského (nahore) a M. Flajšhanse.

6.3. Využití polyploidních ryb v akvakultuře

Piferrer a kol. (2009) ve své přehledové práci shrnují hlavní důvody současného výzkumu triploidů pro akvakulturu, s následujícími potenciálními projevy užitečných vlastností:

- Zvýšený růst za předpokladu, že jejich sterilita zabrání růstové depresi spojené s pohlavním dozráním diploidů.
- Snížení sexuálního a teritoriálního chování ryb v akvakultuře, vedoucí k nižšímu stresu a menšímu plýtvání energií.
- Zvýšené přežití, pokud je reprodukce spojena s vyšší mortalitou diploidů.
- Lepší organoleptická kvalita masa (vybarvení svaloviny, % tuku, % vody v mase aj.), pokud je produkt prodáván během nebo po dosažení pohlavní zralosti diploidů.
- Sterilita při vysazování nepůvodních druhů nebo nepůvodních populací do volných vod.

Ihssen a kol. (1990) shrnuli, že první hypotézy předpokládaly rychlejší růst triploidních obratlovců a jejich větší konečnou velikost, protože jejich somatické buňky jsou větší. Tyto hypotézy byly vyvráceny již ve 40. letech 20. století studiemi polyploidních obojživelníků a posléze přehledovými studiemi vlastností polyploidních ryb (Pandian a Koteeswaran, 1998; Benfey, 1999), které shrnuly důkazy, že vzrůst velikosti buněk je kompenzován poklesem jejich počtu, a že triploidi nerostou rychleji ani nerostou do větších rozměrů díky tomuto jevu.

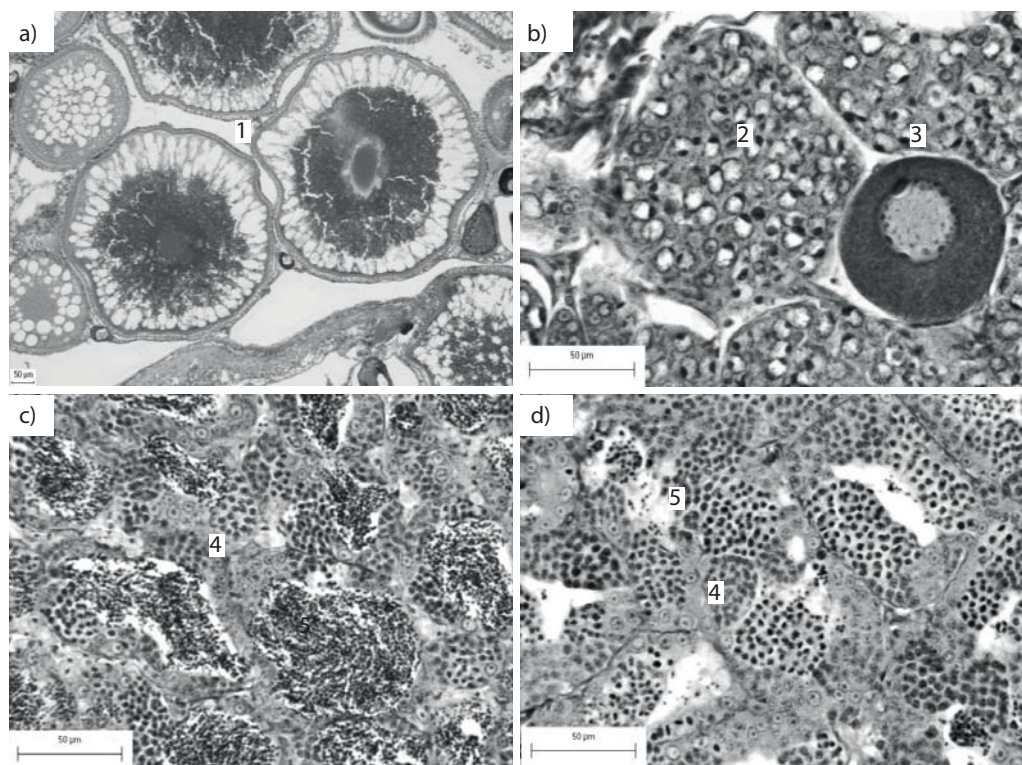
Obecně jsou triploidi považováni za sterilní, vzhledem k tomu, že párování chromozomů v meióze je narušeno přítomností tří sad homologních chromozomů, triploidi nemají normální průběh vývoje gonád (obr. 6.14.), ani gonadosomatický index a jestliže produkují gamety, pak jsou obvykle aneuploidní (Ihssen a kol., 1990). Z tohoto pravidla však existuje řada výjimek (například reprodukce allopolyploidů v hybridních komplexech (r. *Cobitis*, *Carassius*, *Squalius* aj.).

Obecně platí, že vývoj varlat triploidů u většiny druhů nebývá tolik postižen jako vývoj ovárií (Pandian a Koteeswaran, 1998). Piferrer a kol. (2009) k tomu konstatovali, že u samců nastupuje meióza s vypuknutím dospívání poté, co spermatogonie prošly mnoha cykly buněčného dělení mitózou. Ačkoli je tedy mechanismus meiózy rovněž poškozen, testes triploidních samců se mohou vyvinout do velikosti podobné té u diploidů, včetně plně funkčních steroidogenních buněk. Z obecné hypotézy sterility triploidů vychází vysvětlení jejich lepšího růstu: diploidi v době pohlavního dospívání spotřebují část energie z přijaté potravy na vývoj gamet, zatímco triploidi většinu této energie stále spotřebovávají na tělesný růst (Beaumont a Hoare, 2003). Ale Benfey (1999) podotýká, že steroidy gonád mají anabolický efekt, díky čemuž diploidi, kteří dospějí a přejí reprodukci, mohou poté často vykazat kompenzační růst, což může růstovou výhodu triploidů snížit.

Sterility triploidních ryb, pokud je prokázána, se 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 bílý (*Ctenopharyngodon idella*) je takto používán k eliminaci přemnožených vodních porostů v USA a na Novém Zélandě, triploidní siven americký (*Salvelinus fontinalis*), který je autochtonní pouze na východě Severní Ameriky, je takto pro vyšší odolnost proti chladu vysazován do rybářských revírů na pacifickém pobřeží aj. V Izraeli se do vodárenských nádrží vysazuje násada triploidního, a tedy sterilního amura černého, *Mylopharyngodon piceus*, k eliminaci populací měkkýšů z těchto nádrží (S. Rothbard, os. sdělení, 2010).

Dnes je také velmi diskutována možnost využít sterility triploidů při produkci transgenních ryb (tzv. *GMO biocontainment*, biologická kontrola geneticky modifikovaných organismů), aby se zamezilo

potenciálnímu nebezpečí jejich reprodukce při úniku z chovu. Úplná funkční sterilita, tj. nulová produkce spermií, byla zaznamenána u autotriploidních samců některých druhů ryb významných pro akvakulturu, např. u mořčáka evropského, kambaly velké, platýze Moserova, *Verasper moseri*, pražmana zlatého a u sivena alpského (Piferrer a kol., 2009). Naproti tomu poznatky o potenciální plodnosti triploidních samců amura bílého (Goudie, 1988; van Eenennaam a kol. 1990), lososa obecného (Benfey a Sutterlin, 1984), pstruha duhového (Benfey a kol., 1986), lososa, *Oncorhynchus kisutch* (Piferrer a kol., 1994), parmy jávské, *Puntius gonionotus* (Koedprang a Na-Nakorn, 2000), lína obecného (Linhart a kol., 2006) vedou k závěrům, že triploidie neznamená 100% sterilitu a na její možné použití k tomuto účelu je nutné pohlížet případ od případu a vyšetřit na sterilitu všechny jedince.



Obr. 6.14. Snímky hematoxylinem-eozinem obarvených histologických řezů gonádou diploidní a) a triploidní b) samice a diploidního c) a triploidního d) samce lína obecného stejného stáří, odebraných před reprodukční sezónou. U diploidní samice převažují oocyty na počátku vitelogeneze (1), u triploidní samice je vidět převážně jen zárodečné buňky (2) a ojediněle i méně vyvinuté oocyty (do stadia trofoplazmatického růstu, 3). Vzorky diploidního a triploidního samce se liší četností zárodečných buněk (4) a spermií (5). Podle Flajšhanse (1997).

Možnosti indukce triploidů v laboratorním, poloprovozním a provozním měřítku a jejich užitkové vlastnosti (zejména růst, přežití, jatečná výtěžnost, zbarvení svaloviny, % vody a tuku v masě, složení aminokyselin, mastných kyselin aj.) byly studovány téměř u všech hospodářsky významných druhů sladkovodních ryb od lososovitých, kaprovitých, sumců a sumecků až po ostnoploutvé (viz hlavní

přehledové práce: Thorgaard, 1983; Chourrout, 1987; Donaldson a Benfey, 1987; Ihssen a kol., 1990; Horváth a Orbán, 1995; Pandian a Koteeswaran, 1998; Benfey, 1999; Gomelsky, 2003, Piferrer a kol., 2009 aj.). Výsledky jsou však velmi různorodé a ukazují na nižší, stejnou nebo vyšší růstovou schopnost triploidů vůči diploidům stejného původu. Růstová schopnost triploidů je druhově specifická (Beaumont a Hoare, 2003) a v rámci druhu se může lišit i případ od případu (např. vlivem kvality jiker použitých k oplození a indukci triploidie, výsledky chovu v monokultuře vs. testování ve společné obsádce apod.).

Pandian a Koteeswaran (1998) kriticky porovnali růst triploidů řady zástupců ryb lososovitých, kaprovitých, sumcovitých a cichlid ve vztahu k období před a po dosažení pohlavní dospělosti. Podle jejich výsledků tito triploidi do období pohlavní dospělosti trpí 10–15% růstovou depresí a vysokou juvenilní mortalitou. V období po dosažení pohlavní dospělosti podle přehledu těchto autorů triploidi téměř všech hodnocených druhů rostou o 10–30 % rychleji než jejich diploidní protějšky. Z toho lze vyvodit obecný závěr: ***chceme-li dosáhnout rychlejšího růstu za stejnou dobu, má smysl zabývat se indukci triploidie u druhů, které dosahují tržní hmotnosti až po dosažení pohlavní dospělosti.***

Dalšími faktory ovlivňujícími růst a další užitkové vlastnosti triploidů mohou podle Piferrera a kol. (2009) být např. mezi- a vnitrodruhová kompetice během růstového testu, vliv typu šoku použitého k indukci triploidie, a vzhledem k vyšší vnímavosti triploidů vůči chronickému stresu také suboptimální podmínky prostředí (teplota vody, nasycení kyslíkem, hustota obsádky apod.).

Následující tab. 6.3. ukazuje hlavní druhy ryb v akvakultuře, u nichž se běžně produkují indukovaní autotriploidi v užitkovém chovu:

Tab. 6.3. Přehled druhů významných pro akvakulturu, u nichž jsou běžně produkováni autotriploidi (podle Piferrera a kol., 2009).

Druh	Země
Amur bílý	USA
Pstruh duhový	USA, Kanada, Francie, Velká Británie, Itálie, Španělsko, Japonsko, Korea, Irán, Chile, Turecko
Pstruh obecný	Francie, Velká Británie
Siven americký	Kanada, Francie
Siven alpský	Francie, Kanada, Island, Německo, Rakousko
Losos obecný	Kanada, Velká Británie, Irsko
Losos <i>Oncorhynchus rhodurus</i>	Japonsko
Losos <i>O. masou</i>	Japonsko
Losos <i>O. kisutch</i>	Japonsko, Kanada
Ayu <i>Plecoglossus altivelis</i>	Japonsko
Platýz <i>Paralichthys olivaceus</i>	Japonsko
Piskoř východoasijský	Japonsko

Na tomto místě nelze nezmínit také tržní produkci allotriploidů, tedy triploidních mezidruhových F_1 hybridů pro akvakulturu, a to buď pro jejich vzhled nebo pro vyšší přežití, lepší růst a nižší výskyt deformit proti diploidním tržním F_1 hybridům. K tomuto účelu jsou produkováni např. hybridi pstruha duhového s lososy *O. rhodurus* nebo *O. masou ishikawa*; hybridi sumecků keříčkovce žabiho (*Clarias batrachus*) a keříčkovce červenolemého (*C. gariepinus*); lososa kety (*O. keta*) a sivena světloskvrnného (*Salvelinus leucomaenis*) nebo pstruha duhového se sivenem světloskvrnným (Piferrer a kol., 2009).

Produkce triploidů křížením tetraploidních a diploidních rodičů

Vzhledem k vyšší mortalitě triploidů v embryonálním stádiu, způsobené různými typy fyzikálních šoků používaných k retenci 2. pólového tělíska, byla různými autory ověřena hypotéza produkce 100% triploidního potomstva křížením tetraploidních a diploidních rodičů. U pstruha duhového tak Chourrout a Nakayama (1987) získali triploidní potomstvo s lepší růstovou schopností a procentem přežití, než měli triploidi indukovaní fyzikálními šoky. Hörstgen-Schwark a kol. (1997), kteří testovali užitekčnost takto získaných triploidů u stejného druhu, konstatovali podobnou výtěžnost jako u diploidních ryb. Problémem je však i odchov tetraploidních rodičů pro jejich vysokou homozygotnost a citlivost vůči vnějším podmínkám. U ryb se tento způsob produkce proto neužívá. Používá se zejména u měkkýšů (produkce triploidních ústřic, *Crassostrea gigas* křížením tetraploidních mateřských a diploidních otcovských populací).

Produkce triploidů v zemích EU

Především je třeba zdůraznit, že podle evropské legislativy (Directive 90/220/CEE z 23. dubna 1990), polyploidi stejně jako hybridy nejsou považováni za geneticky modifikované organizmy. Polyploidi jsou proto vyňati z přísných pravidel o využívání a biologické ochraně GMO v zemědělství (Piferrer a kol., 2009).

V současné době akvakultura zemí EU využívá triploidů k produkci tržních ryb o vyšší hmotnosti zejména u pstruha duhového. Poptávku po tabulových (porcových, tedy celých) pstruzích o hmotnosti 250–350 g kryje produkce celosamičích populací, a to tak úspěšně, že dnes tvoří téměř 80 % veškeré sladkovodní produkce pstruha duhového v Evropě (Piferrer a kol., 2009). Podle přehledu těchto autorů je triploidů využíváno jak k produkci čerstvých filetů z tržních ryb o hmotnosti kolem 1,2 kg, tak i k produkci uzených filetů z tržních ryb o hmotnosti kolem 2,5–3 kg. Produkci triploidů dalších druhů shrnuje tab. 6.4.

Další významnou možností využití sterilních triploidů je produkce násad a vyšších hmotnostních kategorií pstruha duhového, pstruha obecného, sivena alpského a sivena amerického k vysazování do volných vod (sportovních rybářských revírů). Tato praxe je zavedena např. ve Velké Británii, Francii, Německu a Rakousku (Piferrer a kol., 2009). Zejména tam, kde se vyskytují i fragmenty původních populací autochtonních druhů, je vysazování sterilních triploidů z chovných populací považováno za ochranu proti genetickému impaktu na tyto populace.

Tab. 6.4. Přehled tržní produkce triploidních ryb a měkkýšů v zemích EU (P. Haffray, úst. sděl., 2009).

Druh	Země	Celková roční evropská produkce triploidů (t)	Způsob produkce triploidů
Pstruh duhový	Francie, Velká Británie, Itálie, Španělsko	15 000	indukce 3n
Pstruh obecný	Francie, Velká Británie	600	indukce 3n
Siven americký	Francie, Německo, Rakousko		indukce 3n
Siven alpský	Francie, Německo, Rakousko		indukce 3n
Losos obecný	Velká Británie, Irsko		indukce 3n
Pstruh obecný × siven americký	Francie, Německo, Rakousko, ČR		mezidruhová hybridizace
Ústřice jedlá	Francie	30 000	křížení 4n × 2n

6.4. Uniparentální dědičnost a klonální reprodukce parentálních genomů

Uniparentální dědičnost nazýváme procesy, při kterých se potomstvu předává genetická informace (jaderná DNA) pouze jednoho z rodičů. K těmto procesům může v přírodě docházet spontánně (a potom se hovoří o způsobech asexuálního, výstižněji unisexuálního rozmnožování, o němž bylo pojednáno v předchozí části) nebo je lze v chované populaci vyvolat cílenými zásahy (indukovaná gynogeneze, androgenese). První pokusy o indukovanou gynogenezi u ryb provedli již Makino a Ozima (1943) a jejich evropští následovníci v 60. a 70. letech 20. století (Purdom, 1969; Cherfas, 1975; Nagy a kol., 1978). Komen a Thorgaard (2007), kteří kriticky shrnuli pokrok dosažený za dobu studia uniparentální dědičnosti u ryb však konstatovali, že klíčovou laboratorní práci, která v podstatě odstartovala rozsáhlý výzkum gynogeneze a později i androgenese u ryb, publikoval až George Streisinger se svými spolupracovníky (Streisinger a kol., 1981). Detailně v ní popsali postup produkce meiotických i mitotických gynogenů, homozygotní a heterozygotní klonální linie modelového druhu zebříčky pruhované, *Danio rerio*.

Gynogeneze

Při gynogenezi je potomstvu předávána jaderná genetická informace (jaderná DNA) matky, pohlaví potomstva se (neuvažujeme-li případy autozomálního spoluurčení pohlaví) řídí určením pohlaví matky. Například u ryb s chromozomovým určením pohlaví typu *Drosophila* (XX/XY) nese všechno potomstvo pouze pohlavní chromozomy X a označuje se jako monosexní (celosamičí) potomstvo.

Přirozená (spontánní) gynogeneze

Přirozená gynogeneze je jedním z mechanismů unisexuální reprodukce, charakteristické pro rozmnožování celosamičích populací ryb a některých populací hybridních diploidně – polyploidních druhových komplexů. Jejich současný přehled, s důrazem na komplexy v rodech *Cobitis*, *Squalius*, *Carassius* a na některé další podezřelé druhy podávají např. Ráb a kol. (2007). Další rody a druhy tvořící celosamičí populace jsou např. *Misgurnus* sp., *Poecilia formosa*, *Menidia clarkhubbsi* (Pandian a Koteeswaran, 1998).

Stručně řečeno, na základě reprodukčního kontaktu dvou a více druhů, které mají specifickou evoluční vzdálenost, se u hybridních jedinců změní jinak konzervativní způsob gametogeneze, a tito jedinci se pak reprodukují partenogeneticky, gynogeneticky nebo hybridogeneticky, jak bylo vysvětleno v kapitole 6.1. a na obrázku 6.3. V případě gynogeneze je gynogenetický vývoj vajíčka aktivován přítomností spermií jiného druhu ryby, ale DNA spermií (samčího prvojádra) se neúčastní tvorby genomu embrya.

Například u celosamičí populace karasa stříbřitého, *Carassius gibelio*, je při oogenezi vynechána první fáze meiotického dělení a chromozomová sada zůstává zduplikovaná (Horváth a Orbán, 1995). Samice se účastní přirozené reprodukce jiných kaprovitých ryb a sexuálně na ní parazitují, jejich vajíčka jsou aktivována spermiemi těchto druhů, po aktivaci proběhne druhá fáze meiotického dělení, dojde k oddělení druhého pólového tělíska a zůstanou triploidní zygoty, z nichž se opět vyvinou triploidní samice.

V určitých případech, při oplození jiker samcem karase stříbřitého, se však může vyvinout 5–25 % samčího potomstva.

Umělá (indukovaná) gynogeneze

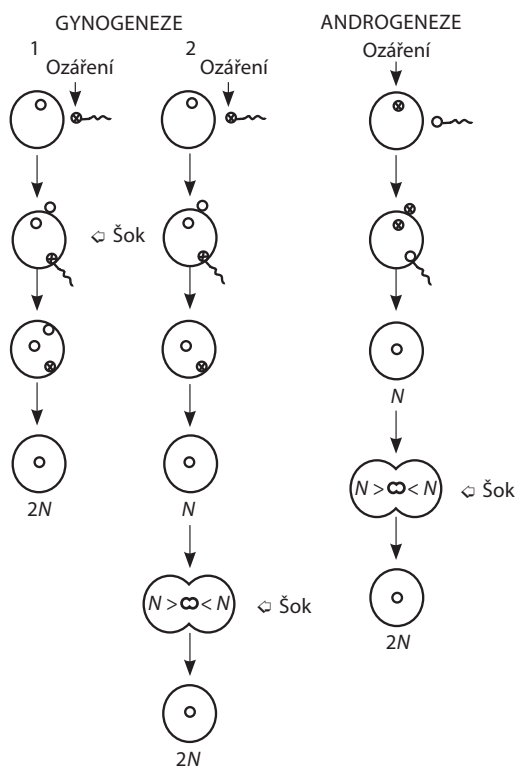
Indukovaná gynogeneze u druhů ryb s normální sexuální reprodukcí je založena na následujícím postupu (obr. 6.15.):

1) inaktivace samčí (otcovské) DNA ozářením spermie (např. u kapra obecného 1200 Gy gama zářením nebo 800 mJ.cm⁻² UV zářením),

2) osemenění a aktivace gamet a

3) obnovení diploidního stavu.

Použité sperma může být homologní (téhož druhu) nebo heterologní (jiného, i nepříbuzného druhu) a inaktivace jeho DNA se zpravidla provádí ionizujícím zářením (gama nebo rentgenovým zářením) nebo UV zářením. Ionizující záření proniká hluboko do buněčné tkáně a účinně fragmentuje DNA (Komen a Thorgaard, 2007). Proto je považováno za vhodné pro ozařování většího objemu spermatu a také pro ozařování oocytů většího průměru pro androgenezi. Využitelnost tohoto postupu však má svá omezení v dostupnosti zdroje ionizujícího záření, v nutnosti přepravy gamet k tomuto zdroji, délce přepravy, podmínkách uchování a době použitelnosti gamet po ovulaci/spermiaci k oplození apod. Obecně platí, že ovulované oocyty většiny druhů kostnatých ryb lze pro oplození v závislosti na podmínkách uchování udržet po řádově kratší dobu než spermie.



Obr. 6.15. Schéma indukce meiotické (1) a mitotické (2) gynogeneze a androgeneze u ryb. Z archivu O. Linhart.

Naproti tomu UV záření o vlnové délce ~254 nm má sice nízkou penetrační schopnost a lze jej použít k inaktivaci DNA gamet pouze ve velmi nízké vrstvě a tyto gamety musí být během ozáření míchány a chlazeny (Komen a Thorgaard, 2007), ale lze k němu využít různých germicidních lamp a je to snadno proveditelné, laciné a bezpečné opatření. Většinou je k inaktivaci DNA gamet používáno právě UV záření (obr. 6.16.). Pandian a Koteeswaran (1998) kritickou analýzou náhodně vybraných publikací zjistili, že 90 % autorů během posledních deseti let použilo právě UV záření k inaktivaci DNA spermií. Konečný účinek UV záření spočívá ve fragmentaci chromozomů a je podobný účinkům gama záření. Komen a Thorgaard (2007) shrnuli, že výnosy gynogenetického plůdku po inaktivaci DNA UV zářením jsou vyšší než po použití gama záření.



Obr. 6.16. Inaktivace DNA gamet UV zářením: celý přístroj (v tomto případě UV Crosslinker) je položen na třepačce, aby byla tenká vrstva gamet na Petriho miskách uvnitř přístroje promíchávána a ozářena homogenně. Z archivu M. Rodiny.

Obnovení diploidního stavu gynogenetických zygot může být provedeno:

1) Potlačením druhé fáze meiotického dělení ve vajíčku. Proto se metoda nazývá **meiotická gynogeneze** (obr. 6.15.). Využívá se šok obdobných parametrů a se stejným mechanismem působení jako při indukci triploidie. V závislosti na použití homologního nebo heterologního spermatu a na typu použitého šoku získali různí autoři touto metodou u pstruha duhového 48–63 %, u kapra obecného 29–38 % a u tilápie nilské 19–27 % živého diploidního gynogenetického potomstva, přičemž s použitím heterologního spermatu a/nebo tlakového šoku bylo většinou získáno vyšší procento potomstva.

2) Potlačením prvního mitotického dělení haploidních embryí. Metoda se nazývá **mitotická gynogeneze** (obr. 6.15.). Využívá se šok obdobných parametrů a se stejným mechanismem působení jako při indukci tetraploidie. V závislosti na použití homologního nebo heterologního spermatu a na typu použitého šoku získali různí autoři touto metodou u pstruha duhového 1–5 %, u kapra obecného 1–15 % a u tilápie nilské 1–25 % živého diploidního gynogenetického potomstva, přičemž s použitím heterologního spermatu a/nebo tlakového šoku bylo většinou získáno vyšší procento potomstva.

3) Použitím diploidních oocytů tetraploidní samice odpadne nutnost obnovovat diploidní stav a zabrání se vysoké embryonální mortalitě následkem šoku.

Indukovaná meiotická gynogeneze

Ačkoliv veškeré potomstvo nese pouze jadernou genetickou informaci matky, nejedná se o klonální reprodukci. Při potlačení druhé fáze meiotického dělení se neoddělí haploidní druhé pólóvé tělísko, a to pak fúzuje s haploidním samičím prvojádre. Během meiotického dělení dochází k volné kombinovatelnosti alel a crossing-overům, z čehož vyplývá určitá úroveň heterozygotnosti potomstva. Proto gynogenetické potomstvo vzniklé meiotickou gynogenezí také nazýváme gynogenetickými heterozygoty.

Touto metodou lze rychle vytvářet inbrední linie s mírou inbredizace za generaci rovnou 3–4 generacím plemenitby sourozenců nebo 6–7 generacím plemenitby polosourozenců (Falconer, 1989 in Tave, 1986).

Meiotickou gynogenezí můžeme za několik generací vytvořit isogenní linie ryb, ale nebude se jednat o homozygotní klonální linie (Nagy a Csanyi, 1984).

Indukovaná mitotická gynogeneze

Mitotické gynogenetické potomstvo nese pouze jadernou genetickou informaci matky a všichni jedinci jsou plně homozygotní, nejsou však klony, neboť při meiotickém cyklu vajíček došlo k volné kombinovatelnosti alel a crossing-overům. Touto metodou lze vytvořit klonální linie za dvě následující generace (Naruse a kol., 1985; Komen a kol., 1988).

Androgeneze

Při androgenezi se potomstvu předává pouze jaderná genetická informace (jaderná DNA) otce. Pohlaví potomstva se (neuvažujeme-li případy autozomálního spoluurčení pohlaví) řídí určením pohlaví otce. Například u ryb s chromozomovým určením pohlaví typu *Drosophila* (XX/XY) nese potomstvo pohlavní chromozomy X nebo Y a vyštěpuje se jako 50 % jedinců XX a 50 % jedinců YY.

Indukovaná androgeneze u druhů ryb s normální sexuální reprodukcí je založena na následujícím postupu (obr. 6.15.):

1) inaktivace samičí (mateřské) DNA ozářením vajíčka (např. pstruha duhového 400 Gy gama zářením nebo kapra obecného 250–300 Gy rentgenovým zářením),

2) osemenění a aktivace gamet a

3) obnovení diploidního stavu.

Inaktivace mateřské DNA se stejně jako u gynogeneze provádí pomocí ionizujícího nebo UV záření. Jak jsme již popsali v kapitole o gynogenezí, ionizující záření s vysokou schopností penetrovat do buňčné tkáně se hodí pro ozařování oocytů o velkém průměru (např. u lososovitých ryb), zatímco pro ozařování oocytů menšího průměru (< 2 mm) stačí UV záření (Komen a Thorgaard, 2007). Diploidní stav se obnovuje potlačením prvního mitotického dělení haploidních embryí a využívá se k tomu šok obdobných parametrů a se stejným mechanismem působení jako při indukci tetraploidie nebo mitotické gynogeneze. V závislosti na typu použitého šoku získali různí autoři touto metodou u pstruha duhového, kapra obecného a tilápie nilské 3–15 % živého diploidního androgenetického potomstva.

Použitím dispermičného oplození (oplození dvěma spermii; Grunina a kol., 1995a; Rekubratsky a kol., 1998; Kirankumar a Pandian, 2004) nebo oplozením diploidní spermií tetraploidního samce (Thorgaard a kol., 1990; Arai a kol., 1995) odpadne nutnost obnovovat diploidní stav.

Metody stanovení úspěšnosti indukce gynogeneze a androgeneze

Při ověřování úspěšnosti indukce uniparentální dědičnosti je nutné zaměřit se na všechny tři kroky, tj. zda byla dostatečně inaktivována DNA druhé rodičovské gamety, zda je potomstvo v odpovídající míře homozygotnosti, a zda byla obnovena diploidní úroveň embryí.

- **Míra inaktivace DNA druhé rodičovské gamety** se nejsnáze ověřuje kontrolním křížením, při němž se využívá nějakého kvalitativního znaku (např. recesivně dědičného zbarvení) jako markeru. Jestliže budeme inaktivovat DNA spermií divoce zbarveného (dominantního) lína a použijeme je ke gynogenezi u jiker zlatého (homozygotně recesivního) lína, pak získáme zlatě zbarvený váčkový plůdek, pokud bylo ošetření správné. Jestliže bude všechen plůdek pigmentovaný nebo získáme směs zlatého a pigmentovaného plůdku, pak nebyla DNA všech spermií korektně inaktivována. Další možností je použít molekulárně genetické metody k ověření nepřítomnosti otcovských genotypů v potomstvu.
- **Míra homozygotnosti** se zjišťuje molekulárně genetickými metodami, pomocí polymorfních proteinových systémů a mikrosatelitní DNA. Zejména u androgeneze vznesli někteří autoři (Carter a kol., 1991; Masaoka a kol., 1995) pochybnosti o úplné eliminaci mateřské genetické informace (mtDNA a mRNA) u ozářených jiker a Pandian a Koteeswaran (1998) ve svém přehledu také došli k závěru, že většina autorů, kteří produkovali živé diploidní androgeny, nepoužila více než jeden genetický marker k potvrzení úplné eliminace mateřského genomu.
- **Diploidní úroveň embryí**, resp. vykuleného plůdku orientačně zjistíme pohledem a spočítáním živého vykuleného plůdku normálního vzhledu (diploidního) a plůdku malformovaného (haploidního). Haploidi mají charakteristický rohlíčkovitě zakřivený tvar (obr. 6.17.), nemívají dostatečně vyvinuté vnitřní orgány a hynou nejpозději při přechodu na exogenní výživu. Ploidní úroveň plůdku přesně zjistíme například stanovením karyotypu, kvantifikací NOR nebo nejrychleji stanovením relativního obsahu DNA průtokovou cytometrií.



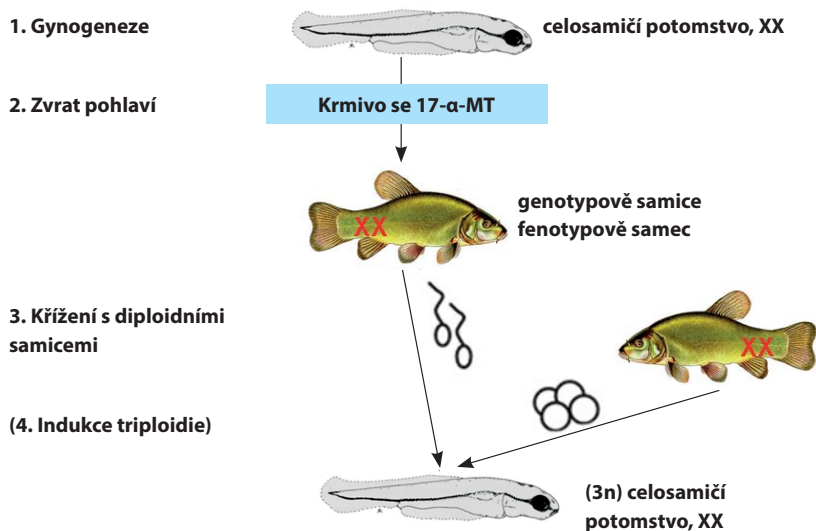
Obr. 6.17. Typický vzhled haploidního malformovaného váčkového plůdku lína obecného, okrasné zlaté formy. Z archivu M. Flajšhanse.

6.5. Využití gynogeneze a androgeneze v akvakultuře

- Nejfrekvencovanější způsob využití meiotické gynogeneze v kombinaci se zvratem pohlaví vede k získání 100% samičí populace k užitkovému chovu podle následujícího schématu (obr. 6.18.), ověřeného různými autory například u pstruha duhového (Lincoln a Scott, 1983), kapra obecného (Cherfas a kol., 1996; Kocour a kol., 2005), lína obecného (Linhart a kol., 1995).

Například v USA je asi 90 % produkce tržního pstruha duhového založeno na celosamičích populacích (Galbreath, 1999). Průměrná roční produkce pstruha duhového v akvakultuře ve Velké Británii činí přes 13 tis. t, z toho 89 % tvoří produkce celosamičí populace, 8 % triploidů a teprve zbytek (3 %) je tvořen produkcí obou pohlaví.

V celé Evropě tvoří celosamičí populace téměř 80 % veškeré produkce tržního pstruha duhového (Piferrer a kol., 2009).



Obr. 6.18. Schéma vytvoření celosamičí (rychleji rostoucí) populace ryb kombinací meiotické gynogeneze, zvratu pohlaví 17- α -metylstosteronem a křížením sex-invertovaných ryb s normálními samicemi. Ve 4. (fakultativním) kroku lze u zygot získaných krokem 3 indukovat triploidii.

U jeseterovitých ryb je výzkum monosexního samičího potomstva zaměřen na potenciál produkce kaviáru z akvakultury, zejména u veslonose amerického, *Polyodon spathula* (Mims a kol., 1997 a Mims a Shelton, 1998) s homogametním samičím pohlavím.

- Meiotickou gynogenezí lze relativně rychle vytvářet inbrední linie pro použití ve šlechtitelském programu nebo isogenní linie využitelné například v imunogenetickém výzkumu.
- Androgeneze lze použít k produkci YY nadsamců u druhů ryb s heterogametním samčím pohlavím. Nadsamce lze používat ke křížení k tvorbě 100% samčí populace pro šlechtitelské účely, stejně jako například ke studiu účinku polutantů (látek znečišťujících vodní prostředí) s xenoestrogenním působením na populace vodních živočichů.

- Mitotickou gynogenezi a androgenezi lze produkovat homozygotní potomstvo nesoucí genetickou informaci matky (G_1) nebo otce (A_1), a opakovaným ošetřením pak získat mateřské (G_2) nebo otcovské (A_2) klonální linie, u nichž jsou eliminovány subletální a letální geny. Klonální linie mají velký význam například ve výzkumu přenosu genů nebo v imunologii. Klonálních linií lze také použít ke vzájemnému křížení a vyhledávání specifické kombinační návaznosti, a tedy k produkci vysoce užitkových kříženců k chovu (např. Horváth a Orbán, 1995). Praktické použití těchto metod je limitováno zejména relativně nízkou oplozeností danou nutností inaktivovat DNA druhé rodičovské gamety různými typy záření a vysokou embryonální mortalitou díky zásahům v období 1. mitózy, nutným k reduplikaci rodičovského genomu na diploidní úroveň.
- U ohrožených druhů nebo mizejících čistých rybích plemen lze použít gynogeneze k získání potomstva, máme-li k dispozici pouze jikernačky. Použitím kryokonzervovaného spermatu a metody androgenese pak lze zcela rekonstruovat genom mizející linie nebo plemena, a dokonce i příbuzného druhu, v případě možnosti vzniku plodného mezidruhového hybridu (Grunina a kol., 1995b).
- Studium poruch meiotického dělení a mechanismů gynogeneze jako takové je významným krokem pomáhajícím objasnit příčiny spontánní polyploidie a evoluci hybridních diploidně-polyploidních komplexů u ryb.

6.6. Zvrat pohlaví

Gomelsky (2003) definuje zvrat pohlaví u ryb jako změnu normálního procesu diferenciaci pohlaví vlivem pohlavních steroidních hormonů tak, že u genotypových samic se vyvíjejí varlata nebo u genotypových samců se vyvíjejí vaječníky. Zvrat pohlaví mění pouze fenotyp ošetřených ryb, ale jejich genotyp zůstává stejný.

Přímé postupy zvratu pohlaví jsou:

- expozice inkubujících se jiker koupeli v roztoku hormonu, což bylo navrženo pro lososovité ryby (Bye a Lincoln, 1986; Donaldson a Benfey, 1987) nebo
- nejčastěji perorální aplikace hormonu v krmivu (dávkou kolem 0,1 mg hormonu na 1 kg krmiva, krmeného podle druhu ryby a teploty vody po dobu cca 40–70 dní) plůdku ryb v období diferenciaci pohlaví (Horváth a Orbán, 1995; Gomelsky, 2003; Kocour a kol., 2005) nebo
- intraperitoneální implantace částečně propustných kapslí (zhotovených například z umělé cévy) s pohlavním steroidním hormonem do odrostlejších ryb.

Mezi nepřímé postupy patří vystavení ryb vodnímu prostředí znečištěnému steroidním hormonem nebo jeho metabolity (Hulák a kol., 2006). Ke zvratu pohlaví ryb na podobném principu ostatně dochází i ve volných vodách působením polutantů (tzv. *endokrinní disruptory*) z různých průmyslových a komunálních odpadních vod. Většinou se jedná o látky s estrogenním účinkem, a tedy o zvrat samčího pohlaví na samičí, čili o **feminizaci**. To se však již dostáváme do tematiky vodní toxikologie.

K cílené feminizaci se používá například diethylstilbestrol nebo 17-beta-estradiol (Pandian a Koteeswaran, 1998). Ke zvratu samčího pohlaví na samčí, čili k **maskulinizaci**, se nejčastěji používá 17-alfa-metylt testosteron.

Úspěšnost zvratu pohlaví závisí na celé řadě faktorů, jako je teplota vody při odchovu, doba začátku a intenzita krmení, celková dávka hormonu, typ odchovného prostředí (recirkulace vs. průtočný systém), zdravotní stav ryb, typ diety, hustota obsádky a další.

LITERATURA

- Allen, S.K., Jr., 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture* 33: 317–328.
- Allen, S.K., Jr., Stanley, J.G., 1983. Ploidy of the hybrid grass carp x bighead carp determined by flow cytometry. *Transactions of the American Fisheries Society* 115: 841–848.
- Alves, M.J., Coelho, M.M., Collares-Pereira, M.J., 2001. Evolution in action through hybridisation and polyploidy in an Iberian freshwater fish: a genetic review. *Genetica* 111: 375–385.
- Arai, K., 1988. Viability of allotriploids in salmonidae. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 1695–1701.
- Arai, K., Ikeno, M., Suzuki, R., 1995. Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* using spermatozoa of natural tetraploids. *Aquaculture* 137: 131–138.
- Arai, R., 2011. *Fish Karyotypes: A Check List*. Springer, Tokyo Berlin Heidelberg New York, USA, 340 pp.
- Beaumont, A.R., Hoare, K., 2003. *Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture*. Blackwell Publishing, Oxford Malden Ames Victoria Berlin, 158 pp.
- Beck, M.C., Biggers, C.J., 1982. Chromosomal investigation of *Ctenopharyngodon idella* x *Aristichthys nobilis* hybrids. *Experientia (Basel)* 38: 319.
- Benfey, T.J., 1989. A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 1682, 33 pp.
- Benfey, T.J., 1999. The physiology and behaviour of triploid fishes. *Reviews in Fisheries Science* 7: 39–67.
- Benfey, T.J., Sutterlin A.M., Thompson, R.J., 1984. Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41: 980–984.
- Benfey, T.J., Solar, I.I., de Jong, G., Donaldson, E.M., 1986. Flow-cytometric confirmation of aneuploidy in sperm from triploid rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 115: 838–840.
- Bonar, S.A., Thomas, G.L., Pauley, G.B., 1988. Evaluation of the separation of triploid and diploid grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes), by external morphology. *Journal of Fish Biology* 33: 895–898.
- Boroń, A., 1994. Use of erythrocyte measurements to detect natural triploids of spined loach *Cobitis taenia* (L.). *Cytobios* 78: 197–202.
- Bye, V.J., Lincoln, R.F., 1986. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 57: 299–309.
- Carter, R.E., Mair, G.C., Skibinski, D.O.F., Parkin, D.T., Beardmore, J.A., 1991. The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia. *Aquaculture* 95: 41–52.
- Cassani, J.R., Caton, W.E., Clark, B., 1984. Morphological comparisons of diploid and triploid hybrid grass carp, *Ctenopharyngodon idella* female x *Hypophthalmichthys nobilis* male. *Journal of Fish Biology* 25: 269–278.
- Collares-Pereira, M.J., 1984a. The „*Rutilus alburnoides* (Steind., 1866) complex“ (Pisces, Cyprinidae). I. Biometrical analysis of some Portuguese populations. *Arquivos do Museu Bocage Sér. A* 2: 111–143.
- Collares-Pereira, M.J., 1984b. The „*Rutilus alburnoides* (Steind., 1866) complex“ (Pisces, Cyprinidae). II. First data on the karyology of a well-established diploid-triploid group. *Arquivos do Museu Bocage Sér. A* 3: 69–90.
- Collares-Pereira, M.J., Madeira, J., Ráb, P., 1995. Spontaneous triploidy in the stone loach *Noemacheilus barbatulus* (Balitoridae). *Copeia* 1995 (2): 483–484.
- Cormier, S.M., Neihsel, T.W., Williams, D.E., Tiersch, T.R., 1993. Natural occurrence of triploidy in a wild brown bullhead. *Transactions of the American Fisheries Society* 122: 390–392.

- Dawley, R.M., Bogart, J.P., 1989. Evolution and ecology of unisexual vertebrates. University of the State of New York, State Education Department, New York State Museum, Albany, New York, Museum Bulletin 466, 302 pp.
- Detlaff, T., Detlaff, A.A., 1961. On relative dimensionless characteristics of the development duration in embryology. Archives de Biologie (Liege) 72: 1–16.
- Donaldson, E.M., Benfey, T.J., 1987. Current status of induced sex manipulation. In: Idler, D.R., Crim, L.W., Walsh, J.M. (Eds), Proceedings of the Third International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Memorial University of Newfoundland, St. John, pp. 108–119.
- Donoghue, P.C.J., Purnell, M.A., 2005. Genome duplication, extinction and vertebrate evolution. Trends in Ecology and Evolution 20 (6): 312–319.
- Doubek, J. (Ed.), 2003. Veterinární hematologie. Noviko, Brno, 464 s.
- Drozd, B., Flajšhans, M., Ráb, P., 2010. Sympatric occurrence of triploid, intermediate aneuploid and tetraploid weatherfish *Misgurnus fossilis* (Cypriniformes, Cobitidae). Journal of Fish Biology 77: 2163–2170.
- Echelle, A.A., Echelle, A.F., Middaugh, D.P., 1989. Evolutionary biology of the *Menidia clarkhubbsi* complex of unisexual fishes (Atherinidae): origins, clonal diversity, and mode of reproduction. In: Dawley, R.M., Bogart, J.P. (Eds), Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates. New York State Museum, Bulletin 466, New York, USA, pp. 144–152.
- Ewing, R.R., Scalet, C.G., Evenson, D.P., 1991. Flow cytometric identification of larval triploid walleyes. The Progressive Fish-Culturist 53: 177–180.
- Flajšhans, M., 1997. A model approach to distinguish diploid and triploid fish by means of computer-assisted image analysis. Acta Veterinaria Brno 66: 101–110.
- Flajšhans, M., Ráb, P., 1987. Nález triploidního pstruha duhového formy kamloops (*Salmo gairdneri* kamloops). Živočišná Výroba 32 (3): 279–282.
- Flajšhans, M., Linhart, O., 2000. Produkce triploidních línů. Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 62, 14 s.
- Flajšhans, M., Vajcová, V., 2000. Odd ploidy levels in sturgeons suggest a backcross of interspecific hexaploid sturgeon hybrids to evolutionarily tetraploid and/or octaploid parental species. Folia Zoologica 49 (2): 133–138.
- Flajšhans, M., Ráb, P., Dobosz, S., 1992. Frequency analysis of active NORs in nuclei of artificially induced triploid fish. Theoretical and Applied Genetics 85: 68–72.
- Flajšhans, M., Kvasnička, P., Ráb, P., 1993. Genetic studies in tench (*Tinca tinca* L.) High incidence of spontaneous triploidy. Aquaculture 110: 243–248.
- Flajšhans, M., Gela, D., Kocour, M., Buchtová, H., Rodina, M., Pšenička, M., Kašpar, V., Piačková, V., Sudová, E., Linhart, O., 2010. A review on the potential of triploid tench for aquaculture. Reviews in Fish Biology and Fisheries 20: 317–329.
- Flajšhans, M., Havelka, M., Kříž, M., Toncar, J., Veselý, L., 2012. Tlaková jednotka pro indukci polyploidie u ryb. Užitný vzor č. 23378. Úřad průmyslového vlastnictví ČR.
- Froschauer, A., Braasch, I., Volff, J.-N., 2006. Fish genomes, comparative genomics and vertebrate evolution. Current Genomics 7: 43–57.
- Galbreath, P.F., 1999. Use of all-female and triploid salmonids in commercial culture. In: Aquaculture America '99 Book of Abstracts, Tampa, Florida, USA. U.S. Chapter World Aquaculture Society. p. 51.
- Gervai, L., Péter, A., Nagy, L., Horváth, L., Csányi, V., 1980. Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio* L. Journal of Fish Biology 17: 667–671.
- Gold, J.R., Price, H.J., 1985. Genome size variation among North American minnows (Cyprinidae). I. Distribution of the variation in five species. Heredity 54: 297–305.

- Gold, J.R., Amemiya, C.T., 1987. Genome size variation among North American minnows (Cyprinidae). II. Variation among 20 species. *Genome* 29: 481–489.
- Gold, J.R., Ragland, C.J., Schliesing, L.J., 1990. Genome size variation and evolution in North American cyprinid fishes. *Genetics Selection Evolution* 22: 11–29.
- Golovinskaja, K.A., Romašov, D.D., Čerfas, N.B., 1965. Odnopolovye i dvupolovye formy serebrjanogo karasja (*Carassius auratus gibelio* Bloch). *Voprosy Ihtologii* 5 (4): 614–629 (v ruštině).
- Gomelsky, B., 2003. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review. *Aquatic Living Resources* 16: 408–415.
- Gomelsky, B.I., Emelyanova, O.V., Recoubratsky, A.V., 1992. Application of the scale cover gene (N) to identification of type of gynogenesis and determination of ploidy in common carp. *Aquaculture* 106: 233–237.
- Goudie, C., 1988. Some triploid grass carp can be induced to spawn. U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Research Information Bulletin, 88–24, 2 s.
- Grunina, A.S., Neifakh, A.A., Gomelsky, B.I., 1995a. Investigations on diploid androgenesis in fish. *Aquaculture* 129: 218.
- Grunina, A.S., Recoubratsky, A.V., Emelyanova, O.V., Neyfakh, A.A., 1995b. Induced androgenesis in fish: production of viable androgenetic diploid hybrids. *Aquaculture* 137: 149.
- Han, H.S., Mannen, H., Tsujimora, A., Taniguchi, N., 1992. Application of DNA fingerprinting to confirmation of clone in ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 2027–2031.
- He, S., Mayden, R.L., Wang, X.Z., Wang, W., Tang, T.L., Chen, W.J., Che, J.J., 2008. Molecular phylogenetics of the family Cyprinidae (Actinopterygii: Cypriniformes) as evidenced by sequence variation in the first intron of 57 ribosomal protein-coding gene: Further evidence from a nuclear gene of the systematic chaos in the family. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46 (3): 818–829.
- Hörstgen-Schwark, G., Meyer, J.-N., Wedeking, H., Langholz, H.-J., 1997. Carcass and meat quality of heat-shocked and tetraploid-derived triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Proc. VI. Int. Symposium on Genetics in Aquaculture*, Stirling, Scotland, June 23–27, 1997, p. 1.
- Horváth, L., Orbán, L., 1995. Genome and gene manipulation in the common carp. *Aquaculture* 129: 157–181.
- Hulák, M., Kocour, M., Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2006. Water polluted by 17 α -MT provides successful male sex revers of common carp (*Cyprinus carpio* L.) from gynogenetic offsprings. In: *Book of abstracts from International symposium – Genetics in Aquaculture IX*, 26–30 June 2006, Montpellier, France, p. 45.
- Chen, W.J., Mayden, R.L., 2009. Molecular systematics of the Cyprinoidea (Teleostei: Cypriniformes), the world's largest clade of freshwater fishes: Further evidence from six nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52 (2): 544–549.
- Cherfas, N.B., 1966. The natural triploidy in females of unisexual form of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch). *Genetika* 5: 16–24.
- Cherfas, N.B., 1975. Study of radiation induced diploid gynogenesis in the carp 1: experiments on the mass production of diploid gynogenetic progeny. *Genetika* 11: 78–86.
- Cherfas, N.B., Gomelsky, B., Ben-Dom, N., Joseph, D., Cohen, S., Izrael, I., Kabessa, M., Zohar, G., Peretz, Y., Mires, D., Hulata, G., 1996. Assessment of all – female common carp progenies for fish culture. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgah* 48: 149–157.
- Choleva, L., Apostolou, A., Ráb, P., Janko, K., 2008. Making it on their own: sperm-dependent hybrid fishes (*Cobitis*) switch the sexual hosts and expand beyond the ranges of their original sperm donors. *Philosophical Transactions of the Royal Society London, B – Biological Sciences* 363 (1505): 2911–2919.

- Choleva, L., Janko, K., De Gelas, K., Bohlen, J., Šlechtová, V., Rábová, M., Ráb, P., 2012. Synthesis of clonality and polyploidy in vertebrate animals by hybridization between two sexual species. *Evolution* 66: 2191–2203.
- Chourrout, D., 1987. Genetic manipulations in fish: review of methods. In: Tiews, K. (Ed.), *Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*, vol. 2. Heenemann Verlagsgesellschaft mbH, Berlin, Germany, pp. 111–126.
- Chourrout, D., Nakayama, I., 1987. Chromosome studies of progenies issued from tetraploid females of rainbow trout. *Theoretical and Applied Genetics* 74: 687–692.
- Ihssen, P.E., McKay, L.R., McMillan, I., Phillips, R.B., 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: Cytogenetic and fisheries applications. *Transactions of the American Fisheries Society* 119: 698–717.
- Kendall, C., Valentino, S., Bodine, A.B., Luer, C.A., 1994. Triploidy in a nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Copeia* 1994: 825–827.
- Kirankumar, S., Pandian, T.J., 2004. Use of heterologous sperm for the dispermic induction of androgenesis in barbs. *Journal of Fish Biology* 64: 1485–1497.
- Kobayashi, H., Kawashima, Y., Takauchi, N., 1970. Comparative chromosome studies in the genus *Carassius*, especially with a finding of polyploidy in the Ginbuna (*C. auratus langsdorfi*). *Japanese Journal of Ichthyology* 17 (4): 153–160.
- Kobayashi, H., Ochi, H., Takeuchi, N., 1973. Chromosome studies in the genus *Carassius*: Comparison of *C. auratus grandoculis*, *C. auratus buergeri* and *C. auratus langsdorfi*. *Japanese Journal of Ichthyology* 20 (1): 7–12.
- Kocour, M., Linhart, O., Gela, D., Rodina, M., 2005. Growth performance of all-female and mixed-sex common carp *Cyprinus carpio* L. populations in the Central Europe climatic conditions. *Journal of the World Aquaculture Society* 36: 103–113.
- Koedprang, W., Na-Nakorn, U., 2000. Preliminary study on performance of triploid Thai silver barb, *Puntius gonionotus*. *Aquaculture* 190: 211–221.
- Kohn, M., Hgell, J., Vogel, W., Minich, P., Kehrer-Sawatzki, H., Graveas, J.A.M., Harneister, H., 2006. Reconstruction of a 450-My-old ancestral vertebrate protokaryotype. *Trends in Genetics* 22 (4): 203–210.
- Komen, H., Thorgaard, G.H., 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. *Aquaculture* 269: 150–173.
- Komen, J., Duynhouwere, J., Richter, C.J.J., Huismann, E.A., 1988. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). I. effects of genetic manipulation of sexual products and incubation condition of eggs. *Aquaculture* 69: 227–239.
- Krahulec, F., Krahulcová, A., Rosenbaumová, R., Plačková, I., 2011. Production of polyhaploids by facultatively apomictic *Pilosella* can result in the formation of new genotypes via genome doubling. *Preslia* 83 (3): 471–490.
- Lampert, K.P., Scharl, M., 2008. The origin and evolution of a unisexual hybrid: *Poecilia formosa*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B – Biological Sciences* 1505: 2901–2909.
- Lang, N.J., Roe, K.J., Renaud, C.B., Gill, H.S., Potter, I.C., Freyhof, J., Naseka, A.M., Cochran, P., Perez, H.E., Habit, E.M., Neely, D.A., Rhestenikov, J.S., Salnikov, V.B., Stamboudi, M., Mayden, R.L., 2009. Novel Relationships among Lampreys (Petromyzontiformes) Revealed by a Taxonomically Comprehensive Molecular Data Set. *American Fisheries Society Symposium* 72: 41–55.
- Larhammar, D., Risinger, C., 1994. Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp *Cyprinus carpio*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3 (1): 59–68.
- Le Comber, S.C., Smith, C., 2004. Polyploidy in fishes: patterns and processes. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 431–442.

- Lecommandeur, D., Haffray, P., Philippe, L., 1994. Rapid flow cytometry method for ploidy determination in salmonid eggs. *Aquaculture and Fisheries Management* 25: 345–350.
- Leggatt, R.A., Iwama, G.K., 2003. Occurrence of polyploidy in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13: 237–246.
- Levin, B.A., Freyhof, J., Lajbner, Z., Perea, S., Abdoli, A., Gaffaroğlu, M., Özuluğ, M., Rubenyan, H.R., Salnikov, V.B., Doadrio, I., 2012. Phylogenetic relationships of the algae scraping cyprinid genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 542–549.
- Li, Y.-J., Yu, Z., Zhang, M.Z., Qian, C., Abe, S., Arai, K., 2011. The origin of natural tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from meiotic chromosome configurations. *Genetica* 139: 805–811.
- Lieder, U., 1955. Mannchenmagel und natürliche parthenogenese bei der silberkarausche *Carassius auratus gibelio*. *Naturwissenschaften* 42 (1): 590.
- Lieder, U., 1959. Über die Entwicklung bei männchenlosen Stämmen der Silberkarausche *Carassius auratus gibelio* (Bloch) (Vertebrata, Pisces). *Biologisches zentralblatt* 78 (2): 284.
- Lincoln, R.F., Bye, V., 1984. Triploid rainbows show commercial potential. *Fish Farmer* 7 (5): 30–32.
- Lincoln, R.F., Scott, A.P., 1983. Production of all-female triploid rainbow trout. *Aquaculture* 30: 375–380.
- Linhart, O., Flajšhans, M., Kvasnička, P., 1991. Induced triploidy in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): A comparison of two methods. *Aquatic Living Resources* 4: 139–145.
- Linhart, O., Kvasnička, P., Flajšhans, M., Kasal, A., Ráb, P., Paleček, J., Šlechta, V., Hamáčková, J., Prokeš, M., 1995. Genetic studies with tench, *Tinca tinca* L.: induced meiotic gynogenesis and sex reversal. *Aquaculture* 132: 239–251.
- Linhart, O., Haffray, P., Ozouf-Costaz, C., Flajšhans, M., Vandeputte, M., 2001. Triploidization of European catfish (*Silurus glanis* L.) with heat-, cold-, hydrostatic pressure shocks and growth experiment. *Journal of Applied Ichthyology* 17: 247–255.
- Linhart, O., Rodina, M., Flajšhans, M., Mavrodiev, N., Nebesářová, J., Gela, D., Kocour, M., 2006. Studies on sperm of diploid and triploid tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture International* 14: 9–25.
- Makino, S., 1934. Notes on the chromosomes of some freshwater teleosts. *Japanese Journal of Genetics* 1: 100–103.
- Makino, S., 1939. The chromosomes of the carp, *Cyprinus carpio*, including those of some related species of Cyprinidae for comparison. *Cytologia* 9: 430–440.
- Makino, S., Ozima, Y., 1943. Formation of the diploid egg nucleus due to suppression of the second maturation division, induced by refrigeration of fertilized eggs of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Cytologia* 13: 55–60.
- Masaoka, T., Arai, K., Suzuki, R., 1995. Production of androgenetic diploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus* from UV irradiated eggs by suppression of the first cleavage. *Fisheries Science* 61: 716–717.
- Mims, S.D., Shelton, W.L., Linhart, O., Wang, C.Z., 1997. Induced meiotic gynogenesis of paddlefish *Polyodon spathula*. *Journal of the World Aquaculture Society* 28 (4): 334–343.
- Mims, S.D., Shelton, W.L., 1998. Induced meiotic gynogenesis in shovelnose sturgeon. *Aquaculture International* 6: 323–329.
- Morishima, K., Yoshikawa, H., Arai, K., 2008. Meiotic hybridogenesis in triploid *Misgurnus* loach derived from a clonal lineage. *Heredity* 100: 581–586.
- Nagy, A., Csanyi, V., 1984. A new breeding system using gynogenesis and sex reversal for fast inbreeding in carp. *Theoretical and Applied Genetics* 67: 485–490.
- Nagy, A., Rajki, K., Horvath, L., Csanyi, V., 1978. Investigation on carp *Cyprinus carpio* gynogenesis. *Journal of Fish Biology* 13: 215–224.

- Naruse, K., Ijiry, K., Shima, A., Egami, N., 1985. The production of cloned fish in the medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Experimental Zoology* 236: 335–341.
- Ohno, S., 1970. *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag, New York, USA, 160 pp.
- Pandian, T.J., Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384: 167–243.
- Pandian, T.J., Koteeswaran, R., 1999. Natural occurrence of monoplids and polyploids in the Indian catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Current Science* 76 (8): 1134–1137.
- Phillips, R.B., Ráb, P., 2001. Chromosome evolution in the Salmonidae (Pisces): an update. *Biological Reviews (Cambridge)* 76 (1): 1–25.
- Phillips, R.B., Zajicek, K.D., Ihssen, P.D., Johnson, O., 1986. Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. *Aquaculture* 54: 313–319.
- Piferrer, F., Benfey, T.J., Donaldson, E.M., 1994. Gonadal morphology of normal and sex-reversed triploid and gynogenetic diploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of Fish Biology* 45: 541–553.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.-C., Flajšhans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid Fish and Shellfish: Production, Biology and Applications to Aquaculture for Performance Improvement and Genetic Containment. *Aquaculture* 293 (3–4): 125–156.
- Prokofieva, A.A., 1934. Chromosome morphology in some fish and amphibians. *Doklady Akademii Nauk SSSR* 1 (2): 79–84.
- Purdom, C.E., 1969. Radiation induced gynogenesis and androgenesis in fish. *Heredity* 24: 431–444.
- Purdom, C.E., 1972. Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*). *Heredity* 29: 11–24.
- Purdom, C.E., 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture* 33: 287–300.
- Purdom, C.E., Lincoln, R.F., 1973. Chromosome manipulation in fish. In: Schroder, J. (Ed.), *Genetics and mutagenesis of fish*, Springer, Berlin, Germany, pp. 38–39.
- Ráb, P., 2004. Karyotypová evoluce ryb řádu Esociformes [Karyotype evolution in Esociformes]. Habilitační práce [Habilitation Thesis] PŘF UK, Praha.
- Ráb, P., Bohlen, J., Rábová, M., Flajšhans, M., Kalous, L., 2007. Cytogenetics as a tool in fish conservation: the present situation in Europe. In: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G. (Eds), *Fish Cytogenetics*. Science Publisher, Inc., Enfield, USA, pp. 215–241.
- Ramsden, S.D., Brinkmann, H., Hawryshyn, C.W., Taylor, J.S., 2003. Mitogenomics and the sister of Salmonidae. *Trends in Ecology and Evolution* 18 (12): 607–610.
- Rees, H., 1964. Question of polyploidy in Salmonidae. *Chromozoma* 15 (3): 275–279.
- Rekubratsky, A.V., Grunina, A.S., Muge, N.S., Neyfakh, A.A., 1998. Production of androgenetic nucleocytoplasmic hybrids in sturgeon fish. *Russian Journal of Developmental Biology* 29: 224–229.
- Saitoh, K., Wei-Jen, Ch., Mayden, R.L., 2010. Extensive hybridization and tetrapolyploidy in spined loach fish. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 1001–1010.
- Scheerer, P.D., Thorgaard, G.H., Seeb, J.E., 1987. Performance and developmental stability of triploid tiger trout (brown trout female x brook trout male). *Transactions of the American Fisheries Society* 116: 92–97.
- Schmidt, D.J., Bond, N.R., Adams, M., Hughes, J.M., 2011. Cytonuclear evidence for hybridogenetic reproduction in natural populations of the Australian carp gudgeon (*Hypseleotris*: Eleotridae). *Molecular Ecology* 20 (16): 3367–3380.
- Schultz, R.J. 1969. Hybridization, unisexuality and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *The American Naturalist* 103: 605–619.

- Schultz, R.J., 1980. The role of polyploidy in the evolution of fishes. In: Lewis, W.H. (Ed.), *Polyploidy: Biological Relevance*. Plenum Press, New York, USA, pp. 313–339.
- Schwartz, F.J., Maddock, M.B., 2002. Cytogenetics of the elasmobranchs: genome evolution and phylogenetic implications. *Marine and Freshwater Research* 53: 491–502.
- Sousa-Santos, C., Robalo, J.I., Collares-Pereira, M.J., Almada, V.C., 2005. Heterozygous indels as useful tools in the reconstruction of DNA sequences and in the assessment of ploidy level and genomic constitution on hybrid organisms. *DNA Sequence* 16: 462–467.
- Stingo, V., Rocco, L., 2001. Selachian cytogenetics: a review. *Genetica* 111: 329–347.
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., Singer, F., 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291: 293–296.
- Svärdson, G., 1945. Chromosome studies on Salmonidae. Reports from the Swedish State Institute of Fresh-Water Fishery Research, Drottningholm 23: 1–151.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Flajšhans, M., 1998. The first findings of the differences in complete blood count between diploid and triploid tench, *Tinca tinca* L. *Acta Veterinaria Brno* 67: 243–248.
- Swarup, H., 1959. Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L.). *Journal of Genetics* 56: 143–155.
- Symonová, R., Flajšhans, M., Gela, D., Rodina, M., Pelikánová, Š., Rábová, M., Ráb, P., 2010a. Sturgeons are pretty polyploid: hybrid and ploidy diversity in sturgeons. The International Meeting on the Genetics of Polyploids, Lisbon, Portugal, 11–12 November 2010, Book of Abstracts KN1, p. 13.
- Symonová, R., Flajšhans, M., Gela, D., Pelikánová, Š., Rábová, M., Ráb, P., 2010b. Tetraploidy in paddlefish, *Polyodon spathula*: – 34 years later. 19th ICACGM, Balice-Kraków, Poland, June 6–9, 2010, Book of Abstracts: 147, *Chromosome Research* 20 (10): 753–754.
- Šlechtová, V., Bohlen, J., Freyhof, J., Ráb, P., 2006. Molecular phylogeny of the Southeast Asian freshwater fish family Botiidae (Teleostei: Cobitoidea) and the origin of polyploidy in their evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39 (2): 529–541.
- Šlechtová, V., Bohlen, J., Hui, T.H., 2007. Families of Cobitoidea (Teleostei; Cypriniformes) as revealed from nuclear genetic data and the position of the mysterious genera *Barbucca*, *Psilorhynchus*, *Serpenticobitis* and *Vaillantella*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44 (3): 1358–1365.
- Tave, D., 1986. *Genetics for fish hatchery managers*. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, USA, 299 pp.
- Tave, D., 1993. Growth of triploid and diploid bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis*. *Journal of Applied Aquaculture* 2: 13–25.
- Taylor, M.I., Alexandrou, M.A., 2012. Whole Genome Duplication Accelerates Speciation in Corydoradinae Catfishes. ICPHB 2012 – International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity, 7–10 May 2012, Průhonice, Czech Republic.
- Thorgaard, G.H., 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds), *Fish Physiology*, vol. 9B. Academic Press, New York, USA, pp. 405–434.
- Thorgaard, G.H., 1986. Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture* 57: 57–64.
- Thorgaard, G.H., Rabinovitch, P.S., Shen, M.W., Gall, G.A.E., Propp, J., Utter, F.M., 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquaculture* 29: 305–309.
- Thorgaard, G.H., Scheerer, P.D., Hershberger, W.K., Myers, J.M., 1990. Androgenetic rainbow trout produced using sperm from tetraploid males show improved survival. *Aquaculture* 85: 215–221.

- Tiwary, B.K., Kirubakaran, R., Ray, A.K., 1999. Altered body shape as a morphometric indicator of triploidy in Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquaculture Research* 30: 907–910.
- Tsigenopoulos, C.S., Ráb, P., Naran, D., Berrebi, P., 2002. Multiple origins of polyploidy in the phylogeny of southern African barbs (Cyprinidae) as inferred from mtDNA markers. *Heredity* 88: 466–473.
- Turner, B.J., Diffoot, N., Rasch, E.M., 1992. The callichthyid catfish *Corydoras aeneus* is unresolved diploid-tetraploid sibling species complex. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 3: 17–24.
- van Eenennaam, J.P., Stocker, R.K., Thiery, R.G., Hagstrom, N.T., Doroshov, S.I., 1990. Egg fertility, early development and survival from crosses of diploid female x triploid male grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture* 86: 111–125.
- Vasil'ev, V.P., 1999. Polyploidization by reticular speciation in Acipenseriformes evolution: a working hypothesis. *Journal of Applied Ichthyology* 15: 29–31.
- Vasil'ev, V.P., Vasil'eva, E.D., 1982. Novyj diploidno-polyploidnoj kompleks u ryb. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 266 (1): 250–252.
- Volff, J.-N., 2005. Genome evolution and biodiversity of teleost fish. *Heredity* 94: 280–294.
- Wattendorf, R.J., 1986. Rapid identification of triploid grass carp with a Coulter Counter and Channelyzer. *Progressive Fish-Culturist* 48: 125–132.
- Wolters, W.R., Chrisman, C.L., Libey, G.S., 1982. Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Biology* 20: 253–258.
- Yamazaki, F., 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture* 33: 329–354.

GENETICKÉ MODIFIKACE RYB

J. Petr, V. Kašpar, M. Hulák

GENETICKÉ MODIFIKACE RYB

J. Petr, V. Kašpar, M. Huťák

7.1. Co je genetická modifikace?

Genetické modifikace představují fenomén, který začal hýbat vědeckými kruhy a veřejným míněním ve druhé polovině dvacátého století. Rozmach genetických modifikací byl samozřejmě umožněn rychlým rozvojem technik a nástrojů molekulární genetiky a genetického inženýrství, díky čemuž můžeme uvažovat o postupech dovolujících přímé pozměňování genetické informace. Výsledkem těchto snah jsou různé geneticky modifikované organizmy (GMO).

Tvorbu GMO lze chápat jako logické pokračování snah člověka o zefektivnění chovu hospodářských zvířat, které započaly před desítkami tisíc let. Z hlediska hospodářského jsou genetické úpravy zemědělských plodin nebo hospodářských zvířat vítané, neboť umožňují např. vyšší výnosy. Pomocí různých metod jsou do rostlin a zvířat vnášeny geny jiných organismů, za účelem vyšší odolnosti vůči nemocem nebo docílení vyššího podílu svalové hmoty. Stejně jako u rostlin nebo jiných živočichů je cílem genových manipulací u ryb získat takové vlastnosti, kterých by se při běžném křížení a šlechtění nepodařilo dosáhnout vůbec nebo jen s velkými obtížemi. Na rozdíl od rostlin jsou tyto modifikace u živočichů více eticky problematické. Vedle tohoto čistě praktického záměru ve zvýšení efektivity produkce může být pohnutkou pro vytváření GMO i samotné studium projevu jednotlivých genů, kromě praktického významu tak připadá v úvahu i experimentální studium intenzity projevu různých genů v GMO k pochopení funkce těchto genů.

Z celkového pohledu jsou ryby velmi vhodnou skupinou organismů pro genový transfer z několika následujících důvodů: vysoká plodnost, externí oplození a inkubace jiker, relativně jednoduché obstarání embryí, snadná manipulace s rybími embryi a jejich inkubace. Z tohoto hlediska jsou ryby pro studium genového transferu a genových manipulací mnohem vhodnější ve srovnání s komplikovanějším savčím systémem.

Počáteční pokusy s genetickými modifikacemi ryb nedopadaly příliš povzbudivě. Použití snáze dostupnějších savčích regulačních sekvencí nebo savčích strukturních genů nevedlo k žádanému výsledku. Obrat nastal ve chvíli, kdy byly k dispozici genové konstrukty složené kompletně z rybí DNA, tj. z rybích regulačních sekvencí a rybích strukturních genů. První publikované záznamy o úspěšném genovém transferu pocházejí z 80. let 20. století, kdy čínští vědci (Zhu a kol., 1985) aplikovali transferovou technologii (mikroinjekce) u závojnatek (*Carasius auratus*) k přenosu genu kódujícího produkci růstového hormonu (GH). Následně byl genový transfer aplikován u mnohých další hospodářsky významných druhů ryb, jako příklad může sloužit pstruh duhový (Chourrout a kol., 1986), sumeček skvrnitý (Dunham a kol., 1987) a tilápie nilská (Brem a kol., 1988).

Populárním a notoricky známým příkladem genového transferu u ryb jsou lososi, kterým byl vpraven gen pro růstový hormon (GH), přičemž u některých jedinců byl zaznamenán dramaticky zintenzivněný růst. Někteří jedinci byli až 43× těžší než jejich vrstevníci (Devlin a kol., 1994).

Jak již bylo řečeno, při genetických modifikacích se využívá mnoho různých metod a biotechnologických aplikací, jejichž jednotícím hlediskem je pozměňování genetické informace a změna v expresi jednotlivých genů. Pokud jde o přenos genů, mohou být použity geny, jež jsou příjemci jako druhu cizí (např. přenos genu *gfp* pro zeleně fluoreskující protein medúzy *Aequorea victoria* do genomu ryby dania pruhozaného). Pak se jedná o tzv. transgenozí. Mezi různými jedinci téhož druhu mohou být přenášeny varianty genů z jejich vlastního genomu (například přenos varianty genu, jež zajišťuje odolnost k chorobě, od rezistentní linie živočicha na linii vnímavou) a pak se hovoří o tzv. cisgenozí. Významné změny ve vlastnostech organismu lze dosáhnout i vyřazením genu z činnosti. Ztráta činnosti genu nemusí být nutně provázána sníženou životností. Naopak, vyblokování některých genů vede ke zvýšení růstových schopností, prodloužení života nebo zvýšení odolnosti k infekčním chorobám.

Při přenosu genů jsou jednotlivé geny individuálně izolovány resp. vybrány z genových knihoven, následně spojeny s **promotorem** (regulační úsek DNA) a namnoženy (klonovány) ve vhodném plazmidu. Takhle připravený gen, který je také označován jako **genový konstrukt** (tj. gen + promotor), je následně importován vhodným vektorem, resp. mikromanipulací do cílového organismu. Pozměněná genetická informace transgenního jedince je za optimálních podmínek dále dědičně přenášena i do následující generace.

Genový transfer – rizika, obavy a iluze o genetické čistotě

Výsledky genetických modifikací jsou častokrát odmítány jako „nepřirozené kombinace“. Genový transfer už v současnosti nepředstavuje jen problém vědecký, to znamená, jak GMO udělat, ale pole působnosti GMO se také rozšířilo v podstatě do všech oblastí lidské činnosti. Především však do politiky a ekonomiky, kde se otázka GMO stala předmětem rozsáhlých diskusí, které mají obecně dvě hlavní témata a to (1) oprávněnost zásahu do genetické informace rostlin a živočichů a (2) bezpečnost GMO ve vztahu k člověku i přírodnímu prostředí.

Odpůrci genetických modifikací se často ptají: „Máme vůbec právo zasahovat do dědičné informace mikrobů, rostlin a živočichů?“. Tato otázka z odborného pohledu přichází se zpožděním nejméně 12 000 let. Tak dlouho už člověk do dědičné informace rostlin a zvířat zasahuje. A to například tím, že při domestikaci různých druhů vybíral jedince, kteří nesli dědičné vlastnosti výhodné pro člověka a které by přírodní výběr pravděpodobně nikdy neupřednostnil. Za mnohem důležitější ale můžeme považovat argument, že přenos genů není vynálezem člověka. Přenos genů provázal už vznik pozemského života a neustal dodnes. Pro nás má často velmi hmatatelné následky. To znamená, že tzv. výpůjčkám genů se nevyhnul ani člověk. Úseky DNA v lidském genomu, které pocházejí např. z virů nám v dědičné informaci zabírají pětikrát více místa než naše vlastní geny. Virového původu je například gen pro syncytin, který sehrává klíčovou roli při tvorbě lidské placenty (Mi a kol., 2000). Porucha ve funkcích tohoto genu má za následek vážné komplikace během těhotenství, jež mohou skončit potratem (Knerr a kol., 2002). Jde o názorný příklad tzv. horizontálního přenosu genu, na jehož funkci jsme nyní existenčně závislí. Naše představy o kritériích „genetické čistoty a neposkvrněnosti“ tedy zjevně vyžadují korekci.

Diskuse o obavách z potravinových surovin a jejich kontrole má smysl v souvislosti se všemi novými plemeny, odrudami a potravinami, ať je jejich původ jakýkoli, nevyjímaje geneticky modifikované organismy. Vytrhovat z této skupiny pouze geneticky modifikované komodity nemá racionální důvod, a pokud se tak činí, jde častokrát o akci výhradně politickou se silně ekonomickým podtextem. Celkově ale můžeme konstatovat, že názory ohledně bezpečnosti konzumace GMO potravin jsou velmi různorodé. V mnoha evropských zemích existují skupiny šířící silný odpor proti GMO (např. *Greenpeace*). Jejich cílem je zabránit dalšímu rozšiřování GMO evropským moratorium, zaměřeným na ochranu místního zemědělství. V jiných částech světa je situace odlišná. Po celém světě více a více zemědělců přechází na produkci GMO a konzumenti GMO potraviny kupují. Mezi jinými, úřady v USA, Kanadě a Velké Británii považují tyto produkty za stejně bezpečné, jako jsou jejich konvenční protějšky. Jako příklad můžeme uvést průzkum *Soil Association* ve Velké Británii. Studie uvádí, že většina mléka, mléčných výrobků a vepřového masa v britských supermarketech je vyrobena ze zvířat živěných krmivem obsahujícími také GMO plodiny. Výsledky svého průzkumu SA vydala ve zprávě nazvané „*Silent invasion – The hidden use of GM crops in animal feed*“. Testy krmiv a průzkum pravidel supermarketů zjistily, že všechny řetězce supermarketů ve Velké Británii běžně povolují používání GMO krmiv (zdroj: www.soilassociation.org).

Z hlediska tvorby geneticky modifikovaných ryb sehrávají klíčovou roli následující faktory:

a) výběr vhodného genu;

b) genový konstrukt;

- c) klonování genu;
- d) vhodně zvolený objekt pro přenos genu;
- e) účinný prostředek pro přenos genu;
- f) detekce inkorporace a exprese genu (genového konstrukt).

7.2. Výběr vhodného genu

K základním způsobům získávání genů patří přímá izolace genů z DNA a využití tzv. genových knihoven. Přímá izolace genů byla používána v období prvních experimentů s genovým transferem. V současnosti o mnoho rozšířenější způsob získávání genů pro genový transfer představují tzv. **genové knihovny**, které umožňují jednoduchý výběr genů, resp. regulačních úseků (promotorů) vhodných pro genový transfer. Genové knihovny představují soubory různých úseků DNA (genů) vzniklé jejich naklonováním v hostitelských buňkách, které byly transformovány nebo infikovány specifickými vektory, z nichž každý obsahoval více či méně definovaný inzert. Konstruují se dva základní typy genových knihoven:

1) genomové knihovny, odvozené od genomové (jaderné) DNA. V optimálním případě obsahují všechny geny daného organismu. Obecný postup konstrukce genomové knihovny spočívá v izolaci genomové DNA, naštěpení této DNA na kratší úseky pomocí vhodné restriktazy, začlenění fragmentů DNA do vektorů a vpravení takto připravených vektorů do hostitelských buněk.

2) cDNA knihovny (*complementary DNA*), v nichž obsažené klonované úseky DNA jsou komplementární k mRNA, ze které byly reverzně transkribovány. Obecný postup konstrukce cDNA knihovny spočívá v izolaci mRNA, její reverzní transkripci, syntéze řetězce komplementárního k získané jednořetězcové cDNA (ss-cDNA), včlenění získaného produktu (dvouřetězcové DNA, ds-cDNA) do vektoru a jeho vpravení do hostitelské buňky. Genové knihovny lze v dnešní době nalézt na veřejně přístupných internetových portálech, jako jsou např. NCBI (www.ncbi.com), ZFIN (www.zfin.com) a jiné.

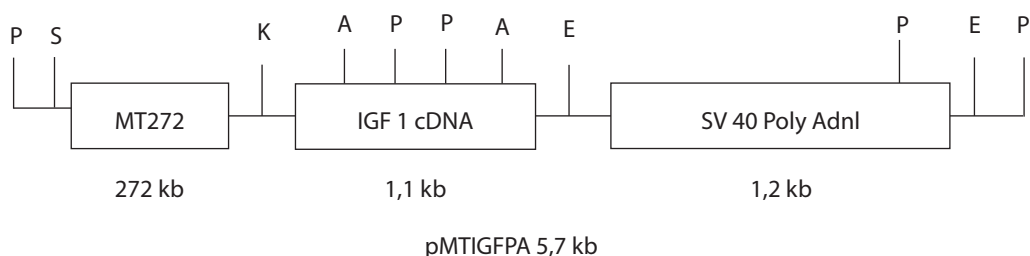
7.3. Genový konstrukt

Cílem genového transferu je ovlivnění hospodářsky významných vlastností (růst, rezistence vůči nemocem atd.) Ovlivnění těchto vlastností je podmíněno změnou exprese vybraného genu. Pokud chceme genem kódovanou bílkovinu produkovat ve velkém nebo ji „jen“ zkoumat, máme zpravidla zájem na tom, aby byl její výtěžek co nejvyšší. To lze uskutečnit několika způsoby. Nejběžnějším způsobem je kombinace strukturního genu a regulačního úseku (promotoru) tzn. tvorba **genového konstrukt**. Z praktického hlediska to znamená, že před gen umístíme silný promotor, který zabezpečí intenzivní expresi genu – produkci proteinu.

Genový konstrukt můžeme následně definovat jako laboratorně připravený úsek dědičné informace ve formě deoxyribonukleové kyseliny („**cizí gen**“). Genový konstrukt se skládá ze sekvence strukturního genu majícího za následek vytvoření bílkoviny a pozměnění určité vlastnosti v transgenním organismu a regulační sekvence zaručující, že tato bílkovina vůbec vznikne. Strukturní gen je tedy to, co se bude podle genového konstrukt v těle transgenního zvířete „**vyrábět**“. Volba strukturního genu proto závisí bezprostředně na požadavku na nově získanou vlastnost transgenního organismu a na dostupném množství informací o tomto genu a na tomto požadavku na nově získanou vlastnost transgenního

organismu závisí i volba regulační sekvence. V minulosti byly například často využívány regulační sekvence virového původu, jejich využití však nepřipadá v úvahu v případě, že by takto získaný transgenní organismus měl mít nějaké komerční využití.

Volba regulační sekvence je velmi důležitá, protože určuje **kde, kdy a za jakých podmínek** se přenášený gen uplatní. Příklad genového konstrukt (pMTIGFPA) uvádí Devlin a kol. (1994), kde strukturní gen je tvořen cDNA lososího růstového faktoru (IGF-1), spojen metallothioneinovým promotorem (MT 272) a ukončen terminální (terminátor) signální sekvencí (*simian virus 40 polyadenylation site*, SV 40 Poly Adni) (viz obr. 7.1.).



Obr. 7.1. Příklad genového konstrukt (pMTIGFPA) převzato a upraveno (Devlin a kol., 1994).

Pro cílené vyblokování genu z činnosti lze použít několik různých strategií. Gen může být v buňkách nahrazen nefunkční kopií, která se zabuduje na specifické místo genomu tzv. homologní rekombinací. Běžně se pro tyto účely používá varianta cílového genu, do které je vložena cizí sekvence, jež následně brání transkripci takto modifikovaného genu. Často jsou do genu vnášeny sekvence genů zajišťujících buňkám rezistenci k antibiotikům. Buňky, do kterých se takový genový konstrukt zabudoval, lze selektovat z populace buněk, u nichž se přenos genového konstrukt nezdařil, kultivací buněk v prostředí obsahujícím vybrané antibiotikum. Buňky se zabudovaným konstruktem jsou k antibiotiku rezistentní a přežívají. Ostatní buňky v antibiotiku hynou. Účinnost homologní rekombinace je obecně velmi nízká.

Jako efektivnější systém pro cílené narušení funkce genů se proto začal používat systém na bázi zinkových prstů spojených s endonukleázami (*zinc finger nuklease* – ZFN) nebo systém označovaný jako TALEN (Clark a kol., 2011).

Zinkové prsty jsou součástí bílkovinných molekul transkripčních faktorů a jsou tvořeny sekvencí zhruba 30 aminokyselin. Jejich trojrozměrnou konformaci zajišťuje iont zinku. Zinkový prst se váže specificky na konkrétní trojici bazí v DNA. Vytvořením řetězce z několika vybraných zinkových prstů lze dosáhnout toho, že se tento řetězec váže na specifické místo genomu tvořené sekvencí např. 9 bazí (řetězec tvořený 3 zinkovými prsty) nebo 12 bazí (řetězec ze 4 zinkových prstů). K řetězci zinkových prstů je připojena molekula nukleázy schopné štípat řetězec DNA. Místo, kde bude nukleáza působit, je specificky určeno typem a pořadím zinkových prstů. V buňce štěpí konjugát zinkových prstů s nukleázou DNA na specifickém místě, kde vznikne zlom. Ten je sice zacelován reparačními mechanismy buňky, ale v poměrně vysokém procentu případů neproběhne reparace zlomu kompletně a původní sekvence je narušena; obvykle různě rozsáhlou delecí. Tato delece vyřadí vybraný gen z činnosti (Remy a kol., 2010).

Systém označovaný jako TALEN působí podobně jako zinkové prsty (Clark a kol., 2011). Pro určení místa, kde bude nukleáza štípat řetězec DNA, jsou určeny proteiny konstruované podle proteinů, jež využívá k ovlivnění transkripce hostitelských rostlinných buněk patogenní bakterie *Xanthomonas*. Tyto tzv. transkripčním aktivátorům podobné (*Transcription Activator* – Like zkráceně TAL) proteiny bakterie jsou vysoce specifické a účinné. Uměle připravené TAL efektorové proteiny (*TAL effector protein* čili TALE) z těchto vlast-

ní TAL proteinů těží. Konjugují se s nukleázou a vzniklé TALEN (TAL *effector nuklease*) mohou po vpravení do zygoty zajistit v genomu zárodku delecí vybraného genu s účinností pohybující se kolem 70 %.

Na rozdíl od vyblokování genu homologní rekombinací nefunkčního genového konstruktů jsou delece vyvolané systémy ZFN a TALEN považovány za netransgenní techniky. Nedochází při nich k vnášení cizí genové sekvence do genomu a nepodléhají proto poměrně přísné a komplikované legislativě, jež reguluje transgenní a cisgenní techniky.

Oba systémy – TALEN a ZFN – lze využít i pro přenos genů k transgenozí či cisgenozí. V těchto případech se nevnaší do buňky pouze komponenta určená k vytvoření zlomu DNA v přesně určeném místě, ale také sekvence DNA, kterou je třeba vnést do genomu buňky. Při reparaci zlomu DNA je pak tato sekvence v mnoha případech vnesena na místo zlomu a tím zabudována do genomu. Obrovskou předností obou systémů je, že dovolují vnést genový konstrukt na přesně určenou pozici v genomu. Ve většině jiných metod přenosu genů je místo zabudování genového konstruktů zcela náhodné. Může tak dojít k zabudování genového konstruktů do nefunkční části genomu, kde neprobíhá transkripce. Další riziko spojené s nekontrolovanou inkorporací genového konstruktů do genomu představují inserční mutace, kdy se vnášený genový konstrukt zabuduje na místo uvnitř funkčního genu, který je tak vyřazen z činnosti.

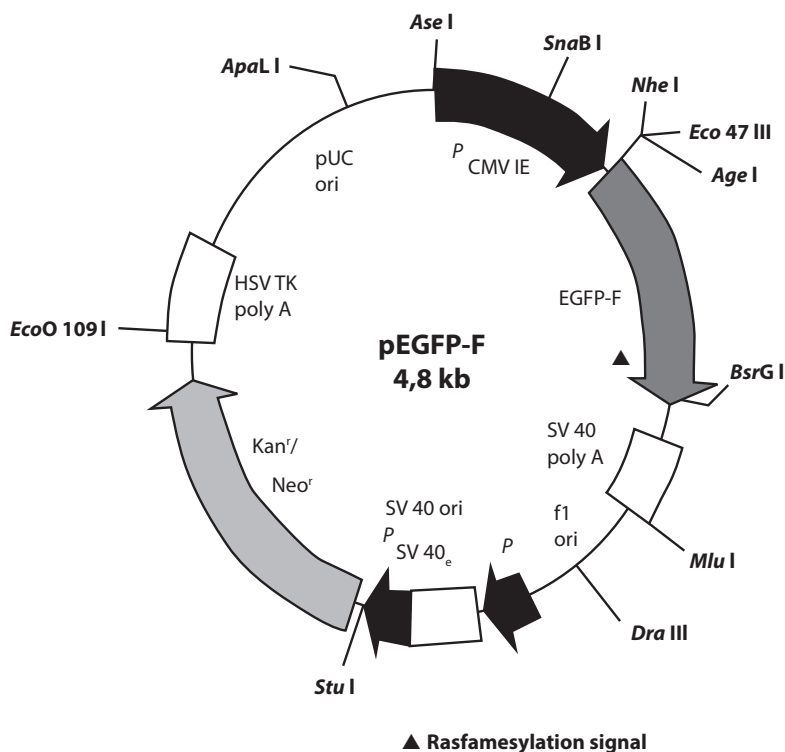
Vyřazení genů z funkce lze využít pro studium funkce vybraných genů (Foley a kol., 2009). Zároveň se však nabízí i ke zvýšení užitkových vlastností organismů. U obratlovců je například růst kosterní svaloviny regulován proteinem myostatinem, který potlačuje růst svalů. Mutace genu pro myostatin mají za následek intenzivnější růst svaloviny. Taková mutace nastala spontánně u skotu plemene belgické modré a vedla k fenotypu označovanému jako „*double muscle*“. U jiných druhů hospodářských zvířat nejsou linie s takovou mutací k dispozici. Nabízí se jejich produkce pomocí vyblokování genu pro myostatin. U ryb bylo fenotypu s extrémním osvalením typu „*double muscle*“ dosaženo vyblokováním genu pro myostatin u pstruha duhového (Phelps a Bradley, 2012).

Velmi efektivní potlačení exprese vybraného genu lze dosáhnout pomocí RNA interference. Pro tyto účely jsou do organismu vnášeny sekvence kódující dvoulátkovou RNA, jež spouští destrukci specifické jednovláčkové RNA obsahující komplementární sekvenci. Zásah nemění strukturu cílového genu, ale ovlivňuje jeho funkce na posttranskripční úrovni. Syntetizovaná mRNA vybraného genu je pod vlivem komplementární dvouláčkové RNA rychle destruována a výsledný efekt se často blíží efektu přímého vyblokování genu. Tímto způsobem lze na jedné straně blokovat funkce genů živočicha (Gruber a kol., 2005), ale na druhé straně se specifické dvouláčkové RNA využívají i k destrukci RNA patogenních mikroorganismů. Toho lze využít pro navození rezistence živočichů k infekci specifickým patogenem. Vnesením genových konstruktů pro produkci specifických dvouláčkových RNA cílených na molekuly RNA pro RNA polymerázu a RNA pro protein vnější kapsidy viru GCRV (grass carp reovirus) bylo dosaženo eliminace tohoto viru z infikovaných buněk (Ma a kol., 2011).

7.4. Klonování genů

Po samotném výběru, resp. izolaci cíleného genu a vytvoření konstruktů, je nevyhnutelné jeho namnožení – klonování. Pod termínem klonování genů (resp. úseku DNA) lze v podstatě rozumět namnožení požadovaných fragmentů DNA prostřednictvím vektorů (plazmidy, bakteriofágy, viry, kosmidy) ve vhodném hostiteli (obvykle bakteriální buňky). Vektory můžeme definovat jako elementy autonomně se replikující v hostitelských buňkách. Mezi nejčastěji používané vektory ke klonování genů ryb se řadí plazmidy, fágy a kosmidy.

Plazmidy jsou malé kružnicovité molekuly ds-DNA autonomně se replikující v bakteriálních buňkách. Pro účely klonování jsou vhodné plazmidy ne příliš velké (obvykle < 10 kb), dobře pronikající do hostitele a úspěšně se v něm množící, nesoucí alespoň jeden selektabilní marker a obsahující vhodná restriční místa pro inzerci cizí DNA. Mezi frekventovaně používané plazmidy patří např. plazmidy pCMVSV, pBPMG-p, pBR322, pEGFP-F (obr. 7.2.) a jiné.



Obr. 7.2. Příklad vektoru pEGFP-F; převzato z www.ncbi.com.

Fágy (bakteriofágy) jsou bakteriální viry, které jsou schopné infikovat hostitelskou bakteriální buňku, replikovat se v ní a reprodukovat nové fágové částice. DNA bakteriofágů může být kružnicová, jednořetězcová (např. fág M13, ΦX174) nebo lineární dvouřetězcová (např. fág λ).

Kosmidy jsou hybridní vektory nesoucí některé sekvence DNA plazmidu (místo *ori*-oblast se selekta-bilními markery) a místo *cos* fágaλ.

Po naklonování genu následuje vyštěpení namnoženého genového konstrukt z vektoru. K samotnému vyštěpení konstruktů z plazmidu nebo fágu se používají tzv. restriktazy (restrikční enzymy), které rozpoznávají specifické sekvence oligonukleotidů a v nich štěpí molekulu DNA za vzniku fragmentů s kohezními nebo tupými konci. Po samotném vyštěpení genového konstrukt z plazmidu je konstrukt připraven na přenos do hostitelského organismu.

7.5. Objekt přenosu genu

V případě genového transferu bývají geny nejčastěji přenášeny:

1) **do těla dospělého jedince** V tomto případě vznikají obvykle tzv. **transkaryontní organizmy** – cizí gen je cíleně vnášen jen do některých buněk jejich těla; tento postup je využíván pro tzv. DNA vakcinaci, při níž je zdravotní porucha vyvolaná produktem defektního genu nebo absencí genu napra-vována produktem genového konstrukt zabudovaného do buněk, které jsou vpraveny do těla ryby

a dlouhodobě v něm přežívají. V případě transkaryontních organismů nedochází obvykle k zabudování genu do pohlavních buněk a přenesený gen není děděn potomstvem;

2) **do raného zárodku;**

3) **do buněčných linií.**

V obou případech se gen objeví buď ve všech buňkách těla transgenního živočicha a pak je gen většinou děděn potomstvem. Gen se ale může vyskytovat jen v některých buňkách jeho těla (živočich je označován jako **mozaika** – protože jeho tělo je „složeno“ z buněk nesoucích cizí gen a z buněk, do kterých se gen nezabudoval). Dědění cizího genu pak závisí na tom, nakolik jsou **mozaicismem** postiženy pohlavní buňky. Podle podílu pohlavních buněk s cizím genem může být gen děděn 0 až 100 % potomstva.

V případě použití buněčných linií je následně v závislosti na použitých buňkách volena metoda pro vytvoření geneticky modifikovaného živočicha. Výhodné je použít například tzv. primordiální zárodečné buňky (*primordial germ cells* čili PGC), které lze odebrat a kultivovat. Tyto buňky jsou předurčeny k migraci do míst, kde se zakládá budoucí gonáda a v dalším vývoji položí základ populace pohlavních buněk. Pokud jsou transfekované PGC vneseny do krevního oběhu embrya vhodného vývojového stádia, dokončí v něm svou migraci do gonád a v dospělosti pak takto vzniklý jedinec produkuje gamety nesoucí genetickou modifikaci (Ciruna a kol., 2002).

Další možností je vytvoření transfekované linie somatických buněk a vytvoření zárodku přenosem jádra buňky z takové linie do vajíčka (jikry), jež byla předtím zbavena vlastní jaderné dědičné informace. Záměnou jaderného genomu vajíčka za genom somatické buňky vzniká embryo, které může dokončit vývoj v normálního jedince. Takový živočich pak nese v každé buňce svého těla genetickou modifikaci. Tento postup označovaný rovněž jako klonování získal velkou popularitu poté, co byla s jeho pomocí přivedena na svět ovce známá jako Dolly. Stejný postup byl technicky zvládnut a následně zdokonalen u ryb (Lee a kol., 2002).

7.6. Prostředky přenosu genů

S rychlým a intenzivním rozvojem biotechnologií a genových manipulací docházelo k rozvoji metod a nástrojů používaných pro úspěšný přenos genů. V současnosti je používána široká řada technik sloužících ke genovému transferu u ryb, přičemž k nejznámějším a nejpoužívanějším patří níže uvedené techniky. Fyzikální postupy zahrnují mikroinjekci, elektroporaci a biolistické metody, zatímco metody a přístupy biologické pak počítají s využitím spermie jako vektoru, retrovirovými vektory nebo lipofekcí.

(1) Mikroinjekce

(2) Elektroporace

(3) Biolistické metody („*Particle-bombardment*“)

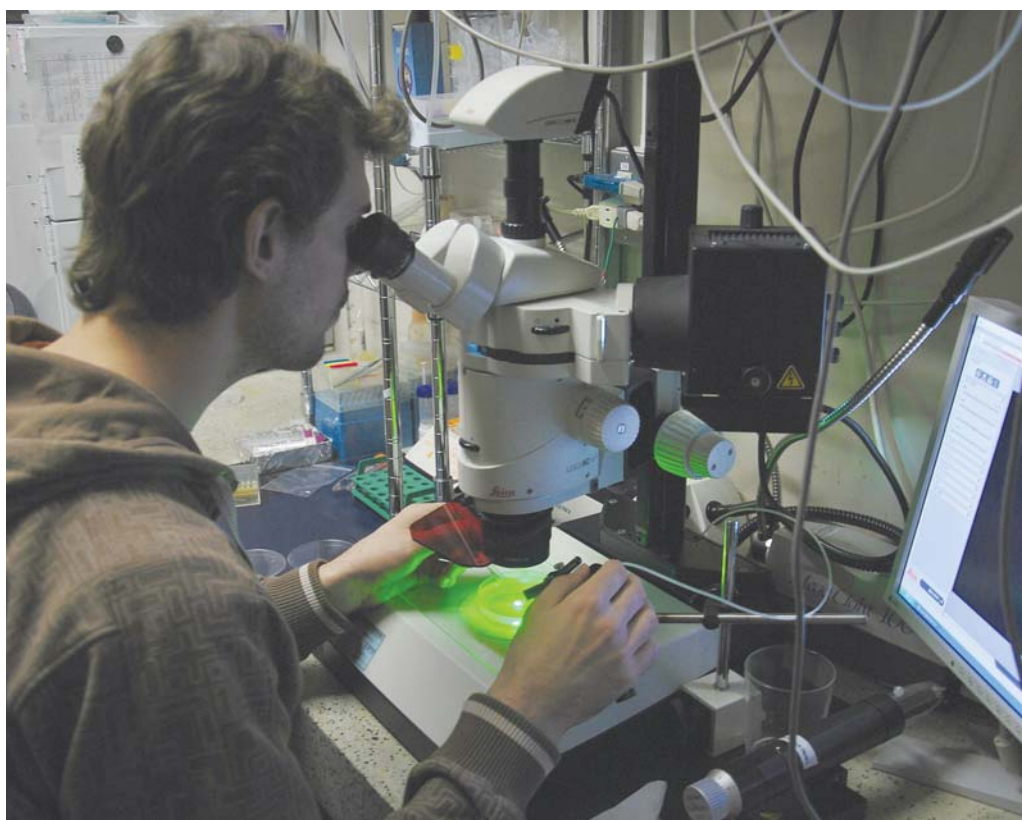
(4) Retrovirové vektory

(5) Lipofekce

(6) Spermie jako vektor

7.6.1. Mikroinjekce

Mikroinjekce genů, resp. genových konstruktů, byla cíleně vyvinuta pro transfer genů u myší. U ryb byla poprvé použita u závojnatek k přenosu genu kódujícího produkci růstového hormonu (GH) (Zhu a kol., 1985). K samotné mikroinjekci se využívají speciální aplikátory – mikromanipulátory – zařízení umožňující velmi jemnou manipulaci s buňkou, včetně penetrace buněčného obalu (obr. 7.3.). Samotný přenos spočívá v penetraci jikerných obalů tenkou skleněnou kapilárou upnutou v mikromanipulátoru, který dovoluje jemný posun ve třech osách pohybu a zároveň umožňuje vpravení tekutiny obsahující genový konstrukt dovnitř embrya v počátku rýhování díky velice jemnému hydraulickému zařízení k ovládání mikropipety ze skleněnou kapilárou.



Obr. 7.3. Příklad aplikátoru pro mikroinjekci. Z archivu V. Kašpara.

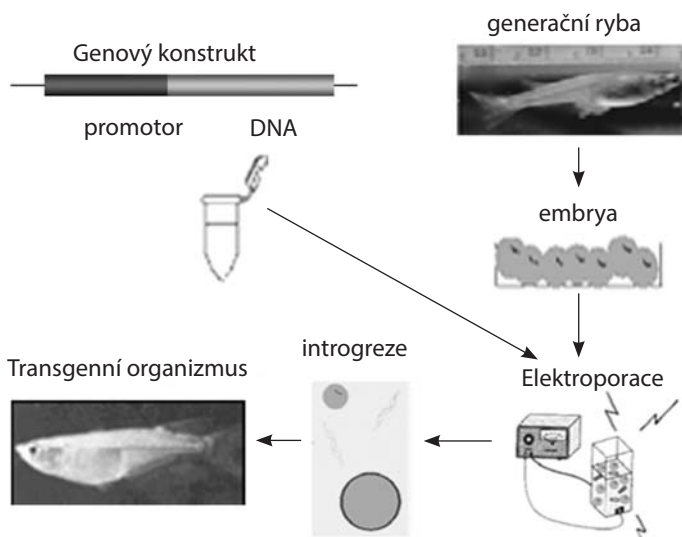
Genový konstrukt je tedy nejčastěji vpravován formou roztoku, který obsahuje (106–107 kopií) cíleného genu. Mikroinjekci není zapotřebí provádět do jádra buňky, ale stačí vpravit genový konstrukt do cytoplazmy. U některých druhů ryb je ale obal jikry (chorion) silný a mechanicky odolný, proto je nejdříve prováděna dechorionizace pomocí enzymu a pak teprve se provádí vlastní mikroinjekce. V případě jiker některých rybích druhů s velkými a relativně pevnými jikrami s pevným chorionem pak může být tato procedura dokonce nahrazena pouhým mechanickým odstraněním tohoto obalu. Velmi silný

chorion mají obvykle jikry mořských druhů ryb, proto není využití mikroinjekce pro vpravování genového konstruktů do jiker některých mořských druhů optimální metodou.

Účinnost zabudování genů po mikroinjekci je poměrně malá (u lososovitých se úspěšnost pohybuje mezi 1–5 %) a značně závislá na šikovnosti obsluhy mikromanipulátoru, každopádně je tak nutné použít velké množství embryí (řádově stovky), do nichž je však možno genový konstrukt vpravovat pouze v určité a časově omezenou dobu embryonálního vývoje. Tato metoda tedy dovoluje práci s velmi omezeným množstvím embryí v přesně určeném období embryonálního vývoje – tj. po velmi omezenou dobu vývoje oplozené jikry. Úspěšná mikroinjekce genů, resp. genových konstruktů, byla popsána u řady druhů, např. u pstruha duhového a lososa obecného (Rokkones a kol., 1989), piskoře východoasijského, *Misgurnus anguillicaudatus* (McLean a kol., 1987) a zebřičky pruhované, *Danio rerio* (Stuart a kol., 1988).

7.6.2. Elektroporace

Elektroporace je metoda, která byla vyvinuta pro přenos genu v pletivových resp. kalusových kulturách rostlin. Princip elektroporace je znám od 60. let a spočívá v aplikaci elektrického impulsu na vybrané buňky, což má za následek zvýšení poréznosti buněčných membrán. V genovém inženýrství se tento princip začal uplatňovat přibližně v polovině 80. let. V případě využití elektroporace pro vpravení genového konstruktů do embryí jsou tedy jikry vloženy do speciálního kontejneru (obr. 7.4.) s elektrolytem, přičemž je genový konstrukt vpraven pod zónu pellucidu tak, že působením elektrických pulsů dojde k depolarizaci náboje na cytoplazmatické membráně, k otevření pórů a průniku genového konstruktů do nitra jikry. Zařízení pro elektroporaci si pak lze představit stejně jako vanu pro elektroforézu se zdrojem dovolujícím přesné pulsní působení elektrického proudu (250–350 V, 2 000 μ F, 1 000 Ω). Samotná účinnost elektroporace pro přenos genu je závislá na řadě faktorů, jedním z nich je intenzita elektrického pole, jeho frekvence a také sekvence pulzního působení. Výhodou elektroporace oproti mikroinjekci je možnost práce s velkým počtem jiker najednou v porovnání s manipulací s jednotlivými jikrami v případě mikroinjekce.



Obr. 7.4. Příklad elektroporace genového konstruktů u ryb.

7.6.3. Biolistické metody

Tyto metody byly původně vyvinuty a používány u rostlin pro vpravování genových konstruktů k vytvoření transgenního organismu nebo k DNA vakcinaci. V případě jejího využití u rostlin má velmi široké uplatnění u různých typů buněk a různých druhů. Tato metoda označovaná jako "particle bombardment" například stála za vytvořením celé řady linií transgenních plodin odolných vůči herbicidům. V poslední době je ale velmi často využívána i v živočišných biotechnologiích. Princip této metody je založen na navázání genového konstruktů na mikroskopické wolframové částičky nebo částičky zlata o průměru 0,1–3,5 µm. Biologicky aktivní DNA je tedy navázána na částičky s vysokou relativní hmotností, ty jsou pak pomocí stlačeného vzduchu nebo plynu "vystřeleny" proti tkáňové kultuře nebo buňkám tlakem kolem 250 psi (liber na čtvereční palec, tj. 1,72 MPa) a měly by zajistit penetraci buněčných obalů a průnik do cytoplazmy buněk. Výhodou této metody je samozřejmě možnost práce s větším množstvím materiálu, tedy s větším množstvím jiker v případě ryb. Za nevýhodu lze považovat náročnost optimalizace této metody a samozřejmě také to, že genový konstrukt není vpravován spolehlivě do všech buněk podrobených "particle bombardment". V případě ryb byl tento postup úspěšně použit pro vpravení genových konstruktů do oplozených jiker piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*), pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a zebřičky pruhované (*Danio rerio*) (Dunham, 2004).

7.6.4. Retrovirové vektory

Metoda využívá vrozených vlastností a schopností virů ze skupiny tzv. retrovirů. Dědičná informace retrovirů se skládá z jednoho řetězce ribonukleové kyseliny (RNA). Při infekci buňky se virus zachytí na povrchu buňky prostřednictvím svých obalových proteinů. Jako „kotevní místo“ využije určité bílkoviny na povrchu buněk. Virová RNA pronikne do nitra buňky a podle této RNA je "vyrobena" deoxyribonukleová kyselina (DNA), která je zabudována do dědičné informace buňky. Podle této tzv. provirové DNA jsou pak buněčným cyklem vyráběny nové viry.

Retrovir tedy dokáže zabudovat své geny do buňky hostitelské buňky a tuto jeho vlastnost lze využít k tvorbě transgenních zvířat. Retroviry lze zbavit jejich vlastních genů a místo původních genů lze do viru vložit genový konstrukt. Je zapotřebí zajistit, aby se tento virový „trojský kůň“ i nadále choval jako virus a i po odstranění vlastních genů vnášel „podvrženou“ genetickou informaci do buňky. Zároveň je nutné zajistit, aby virus nezačal produkovat nové, plně životaschopné virové částice schopné zničit buňku, kterou virus infikoval. Při použití této metody bývá účinnost přenosu genového konstruktů srovnatelná s mikroinjekcí. Velkou nevýhodou je omezená délka genového konstruktů, který lze pomocí retrovirových vektorů vnášet do dědičné informace. Kapacita běžných retrovirových vektorů se pohybuje kolem 10 kbp. Některé strategie dovolují přenášet pomocí retrovirových vektorů i delší sekvence, ale postup je komplikovaný a jeho účinnost je nízká.

7.6.5. Lipofekce

Fosfolipidy v suspenzi s vodou vytvářejí zvláštní váčky – lipozomy, které ve svém nitru uzavřou vodní roztok. Pokud je ve vodné fázi přítomen genový konstrukt, dostane se do nitra lipozomu. Stěna lipozomu dokáže splynout s cytoplazmatickou membránou a obsah lipozomu se tak uvolní do nitra buňky. Úspěšnost této metody je ale velmi nízká (1–5 %). Předpokládá se, že lipozomy jsou nějakým mechanismem narušovány v hostitelských embryích, což má za následek destrukci genového konstruktů.

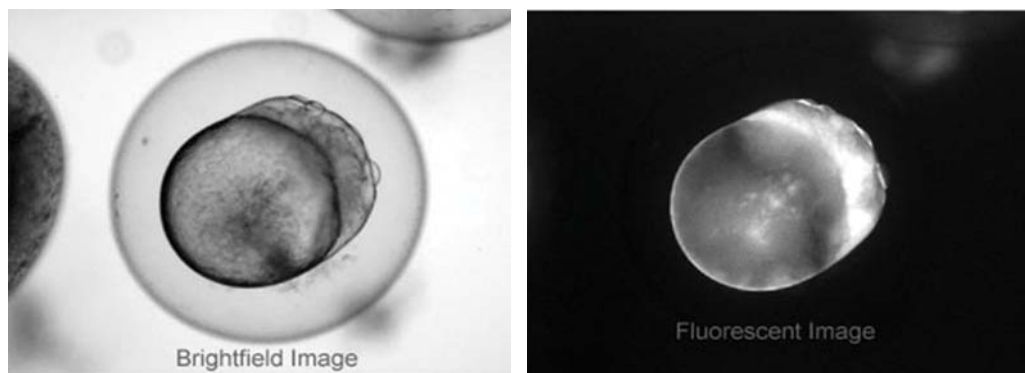
7.6.6. Spermie jako vektor

Začátkem 70. let (Brackett a kol., 1971) byl tento postup popsán jako vysoce účinná a jednoduchá metoda přenosu cizích genů u experimentálních králíků, ale dodatečně byly v literatuře nalezeny dřívější údaje o podobných úspěšných experimentech na ježovkách. Princip metody spočívá v přimíchání genového konstrukt do kultivačního média, v němž jsou uchovávány spermie. Následně dojde k zabudování genového konstrukt do spermií. K zabudování genového konstrukt do spermií je často používána elektroporace, resp. lipofekce (Andreeva a kol., 2003). Při oplození jiker *in vitro* takto upravenými spermii je genový konstrukt vnesen do dědičné informace jedince vzniklého oplozením jikry. Využití spermií jako vektoru na přenos genových konstruktů u zebřičky pruhované (*Danio rerio*) uvádějí ve svých pracích např. Khoo a kol. (1992), Spadafora (1998), Perry a kol. (1999). Experimenty se dlouho nedařilo zopakovat, metoda byla většinou autorů odmítána jako neúčinná a výsledky mnohých studií ukazují, že technika je velice nespolehlivá. Úspěšnost genového transferu může v jednotlivých případech dosahovat podle literatury až 85 %, ale ve většině případů je její účinnost nulová.

7.7. Detekce inkorporace a exprese genu

Úspěšnost genového transferu může být detekována několika způsoby. Jedním ze způsobů detekce transgenů je např. aplikace tzv. polymerázové řetězové reakce (PCR), kde k amplifikaci hledaného genu se použijí specifické primery, které umožní amplifikaci (namnožení) hledaného genu, jehož přítomnost se následně detekuje elektroforetickou separací PCR produktu na agarózovém gelu. V některých případech se do genového konstrukt přidává i tzv. „markerový“ gen. Ten slouží jako identifikační „značka“, která umožní snazší nalezení genového konstrukt v těle živočicha např. použitím PCR nebo Southern blottingem. Používají se také „značky“, které umožní obarvení buněk.

Například *green fluorescent protein* (GFP – „zeleně fluoreskující protein“), izolovaný z mořských medúz, vyvolává po osvětlení buněk pod fluorescenčním mikroskopem typickou zelenou fluorescenci, na jejímž základě lze jednoduše identifikovat buňky a zvířata, které genový konstrukt přijaly (obr. 7.5.). Velmi známým příkladem použití GFP jsou transgenní zebřičky, kterým byl do tzv. PGC (primordiálních buněk) vpraven genový konstrukt značený GFP. Následně byla sledována migrace primordiálních gonocytů do zárodečné lišty.



Obr. 7.5. Příklad detekce inkorporace genového konstrukt z využitím GFP („zeleně fluoreskujícího proteinu“) u embrya zebřičky pruhované ve stadiu 32 buněk. Převzato z www.zfin.com.

Jednou z dalších metod je analýza tzv. genové exprese inkorporovaného genu, při které se z cílené tkáně, resp. orgánu, extrahuje mRNA (mediátorová RNA), z níž se zpětně přepíše genetická informace do cDNA a následně se potenciální transgenní organizmus analyzuje na přítomnost transgenu (cizího genu) použitím kvantitativní PCR (qPCR), resp. za použití fluorescenčně značených sond se analyzuje exprese daného genu tzv. RT-PCR (kapitola 3.5.3.).

7.8. Využití geneticky modifikovaných ryb v akvakultuře

Prvním geneticky modifikovaným organismem schváleným pro komerční využití (schváleno *U. S. Food and Drug Administration*) byla bakterie *E. coli*, do jejíž dědičné informace byl vnesen lidský gen pro produkci inzulinu. K jejímu schválení došlo již v roce 1982. Zemědělství v současné době využívá celou řadu geneticky modifikovaných plodin, u kterých vložení určitých genů má za následek zvýšení odolnosti vůči herbicidním přípravkům nebo zvýšení odolnosti proti hmyzím škůdcům či plísním. V případě tvorby geneticky modifikovaných živočichů stále ještě stojí v cestě nízká účinnost jednotlivých metod, přesto jsou však geneticky modifikovaní živočišové využíváni například jako laboratorní organizmy, a to například pro studium dědičných chorob člověka. V případě využití geneticky modifikovaných živočichů pro produkci bílkovin pro lidskou spotřebu stále vyvstávají otázky ohledně bezpečnosti využívání takových organismů a také etické otázky. Komerencializace geneticky modifikovaných vodních živočichů a rozsáhlé využívání takových živočichů by mohly mít různé ekologické důsledky (Hallerman a Kapuscinski, 1999). Nicméně, do současnosti byl přenos genu zrealizován u asi 35 rybích druhů, přičemž přibližná polovina těchto druhů má nějaký hospodářský význam, druhá polovina druhů jsou laboratorní organizmy.

Ačkoliv první předpoklady uvažovaly s využíváním geneticky modifikovaných organismů v relativně krátkém časovém horizontu, využití geneticky modifikovaných organismů v akvakultuře doposud nenašlo tak široké praktické uplatnění v porovnání s geneticky modifikovanými bakteriemi nebo rostlinami. Potenciál pro jejich uplatnění je ale obrovský. Tendence vedoucí ke změnám některých vlastností hospodářsky významných ryb prostřednictvím metod genového inženýrství je diktována dvěma celosvětovými trendy, které otevírají rozsáhlou diskusi mezi vědeckými institucemi, komerčními společnostmi majícími zájem na produkci takových ryb, samotnými chovateli, ale hlavně úřady schvalujícími využití transgenních organismů a spotřebitelskou veřejností.

Na jedné straně je to vysoká produkce živočišných potravin ve vyspělých zemích, která vytváří enormní ekonomický tlak na inovaci a zvyšování efektivity produkce ryb. Samotné zvyšování efektivity produkce jde i cestou hledání a využívání nových druhů s potenciálem pro akvakulturní produkci, vedle toho se ale začíná uvažovat o geneticky modifikovaných organizmech v akvakultuře. Tyto snahy tak mohou vést k zavedení zcela nových komodit na světový trh a významný podíl na těchto nových komoditách mohou mít produkty pocházející z geneticky modifikovaných zvířat.

Na druhé straně stoupá spotřeba potravin živočišného původu v rozvojových zemích, které tradičně zajišťovaly výživu obyvatelstva rostlinnými produkty. Tato situace opět vyvolává tlak na zefektivnění chovu hospodářských zvířat, ryby nevyjímaje. Právě spotřeba produktů akvakultury má po několik posledních dekád rostoucí tendenci a společně se stagnujícím rybolovem dává prostor pro úvahy o možnostech zefektivnění akvakulturní produkce, třeba i díky využívání geneticky modifikovaných linií akvakulturně využívaných druhů ryb.

První vyhlídky OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj*) ohledně horizontu uplatnění geneticky modifikovaných vodních organismů, publikované v roce 1995, počítaly se začátkem chovu a s využitím geneticky modifikovaného lososa v horizontu 15 let a s geneticky modifikovanou tilapií bylo počítáno v horizontu pouhých pěti let. Tak jaká je tedy skutečnost?

Kritickým bodem pro získání a eventuálně další využívání geneticky modifikovaných organismů je efektivita přenosu genů a jejich integrace. V případě ryb a měkkýšů byly k přenosu genů často využívány retroviry (Chen a kol., 1993; Lu a kol., 1996), využití tohoto způsobu přenosu genu je však pro úvahy o eventuelním praktickém využití takto získaných geneticky modifikovaných organismů nepřijatelné z důvodu nedostatečných znalostí o vlivu sekvence virové DNA. V úvahu tak přicházejí jiné způsoby přenosu genu, např. mikroinjekce nebo systémy ZNF či TALEN.

V případě rybích druhů, které jsou využívány jako laboratorní organismy, je přenos genu realizován například pro studium samotné genové exprese různých genů. Pro akvakulturu se pak uvažuje o celé řadě důvodů pro přenos genů. Samozřejmě jako první se nabízejí snahy o pozměnění fyziologie organismu – zintenzivnění růstu, změnu a zefektivnění metabolismu, zvýšení odolnosti vůči různým patogenům, zvýšení fyziologické tolerance organismu nebo zvýšení odolnosti vůči stresu.

V následující části textu se pokusíme částečně přiblížit určité směry rozvoje produkce transgenních ryb, které by teoreticky mohly být užitečné pro zefektivnění akvakultury různých druhů, a proto jsou předmětem vědeckých studií. V současné době se snahy o přenos genů provádějí s cílem ovlivnit některé důležité vlastnosti, eventuálně k dalšímu využití:

1. Intenzita růstu
2. Odolnost vůči nemocem
3. Odolnost vůči chladu
4. Změna metabolismu
5. Sterilita
6. Využití transgenních ryb jako bioreaktoru

7.8.1. Intenzita růstu

Úspěch s indukcí růstu laboratorních zvířat (myši, králíků) nesoucích genový konstrukt složený z regulační sekvence metalothioninového genu a strukturní sekvence genu pro růstový hormon potkana vzbudil obrovskou pozornost a nastartoval dlouhou sérii experimentů s přenosem obdobných genových konstruktů u hospodářsky významných zvířat (skot, prasata, ryby). I u ryb je samozřejmě cílené ovlivnění růstu jedním z nejvýraznějších směrů rozvoje přenosu genů.

Z počátku využívala většina prací týkajících se přenosu genu růstového hormonu (GH) konstrukt savčí nebo drůbeží, a to především z důvodu nedostatečné znalosti odpovídajících sekvencí ryb. Požadovaný efekt tak nebyl dosahován vždy spolehlivě. Přenos savčího genu GH neměl zprvu požadovaný efekt u salmonidů (Guyomard a kol., 1989; Penman a kol., 1991), zatímco u jiných druhů s vneseným genem GH – piskoře, kapra, karase, atlantského lososa, sumečka a tilapie byl zaznamenán o 10–80% rychlejší růst než u kontrol.

Vyšší efektivitu genového transferu přinesly genové konstrukty obsahující strukturní gen i regulační sekvence pocházející z ryb. Z rybích promotorů se nejčastěji využívá promotor AFP (anti-freeze protein) pocházející ze slimule americké (*Zoarces americanus*) a nebo metalothionin různých druhů lososa. Přenosem genu pro růstový hormon pstruha se podařilo u atlantského lososa (*Salmo salar*) dosáhnout až čtyřicetkrát vyšší hmotnosti ryb ve srovnání s kontrolou s tím, že u ryb bylo urychleno i fyziologické stárnutí organismu (Devlin a kol., 1994). Lososovité ryby patří ke skupině ryb, u kterých je transfer

7

genu pro růstový hormon předmětem intenzivního výzkumu. Výsledky úspěšných pokusů s transferem genu pro růstový hormon lze nalézt např. v pracích Guyomard a kol. (1989), Penman a kol. (1991), Du a kol. (1992), McLean a Donaldson (1993), Devlin a kol. (1995) a dalších. Cílem těchto experimentů byly pokusy zaměřené na testování různých genových konstruktů obsahujících např. promotorové oblasti GH genu pro skot, resp. savčí promotor v kombinaci se strukturním genem GH lososů. Po celkové sumarizaci publikovaných dat lze konstatovat, že transfer genu pro růstový hormon u salmonidů obecně vedl k akceleraci růstu u transgenních ryb v rozmezí od 10 do 70 % v porovnání s kontrolními skupinami. Obdobné výsledky byly zaznamenány u několika dalších druhů ryb – piskoře (Nam a kol., 2001), kapra obecného (Chatakondi a kol., 1995), halančíka rýžovištního – tj. medaky, tilápie nilské (např. Martinez a kol., 1996, Rahman a kol., 1998), nebo dokonce štiky obecné (Gross a kol., 1992).

V současné době se např. v USA jedná o uvedení na trh masa z transgenních lososů s genem pro růstový hormon. Využívání transgenních ryb v komerční akvakultuře a hodnocení vlivu transgenních ryb na životní prostředí, stejně tak otázka hodnocení bezpečnosti potravin pocházejících z takových ryb je prozatím chápáno jako velmi problematické. Předpokládá se, že samotná produkce transgenních linií ryb může být velmi profitabilní, stejně tak jejich chov. V USA vznikl ambiciózní projekt založený na produkci geneticky modifikovaného lososa *Salmo salar* s vloženým genem GH lososa čavýča (*Oncorhynchus tshawytscha*) s regulační sekvencí pocházející ze slimule americké (*Macrozoarces americanus*). Linie transgenního atlantského lososa *S. salar* byla založena mikroinjekcí genového konstruktů do oplozených jiker, následně pak bylo odchováno šest generací transgenního lososa. Technologie chovu využívá hormonálního zvratu pohlaví u transgenních samic, sperma takto získaných „neomales“ (neosamců) je pak využíváno k oplození jiker netransgenních jikernaček a následně je tlakovým šokem prováděna triploidizace k získání sterility produkované celosamíčí populace označované jako *AquaBounty AquAdvantage®* Salmon. Americký Úřad pro potraviny a léčiva posoudil bezpečnost masa lososa *AquAdvantage* pro lidskou spotřebu v roce 2010 a neshledal žádná rizika spojená s jeho konzumací. Přesto nevydal souhlasné stanovisko k chovu geneticky modifikovaného lososa. Podobně nebyl schválen chov geneticky modifikovaného prasete *Enviropig* pro produkci vepřového masa, i když z biologického hlediska nenese konzumace masa těchto zvířat pro člověka žádné riziko. Pro biotechnologické společnosti, které se zaměřily na tvorbu linií geneticky modifikovaných živočichů pro komerční produkci potravin živočišného původu, je tato situace krajně nepříznivá. Nemohou zajistit ekonomickou návratnost vysokých investic do vývoje a ohrožuje to jejich existenci. Chov geneticky modifikovaného prasete už byl v Kanadě ukončen a také společnost *AquaBounty* se začala potýkat s existenčními problémy.

Jak bylo zmíněno výše, lososovité ryby jsou velmi častým objektem pro přenos genu. Vedle lososovitých ryb jsou další zajímavou skupinou ryb tilapie. Přenos genů GH je i u tilapií velmi zajímavým objektem výzkumu (Martinez a kol., 1996). U tilapie nilské (*Oreochromis niloticus*) byl dosažen dvojnásobně vyšší růst v případě použití genu GH s promotorem virového původu (Martinez a kol., 1996). Uvádí se, že některé z linií trasgenních ryb byly dokonce využity pro uvedení na trh (de la Fuente a kol., 1999). Transfer genového konstruktů složeného z jedné kopie promotoru *anti-freeze* proteinu slimule (*Zoarces americanus*) AFP a lososiho GH vedl ke 2,5krát vyšší intenzitě růstu a o 20 % vyšší konverzi krmiva v porovnání s kontrolními skupinami (Rahman a kol., 2001). Tilapie nilská představuje v mnoha rozvojových zemích významný zdroj živočišných proteinů. Jedním z příkladů je také Kuba, kde jsou transgenní tilapie využívány komerčně a jejich maso bylo údajně schváleno k uvádění na trh (Carr, 1999).

V případě kapra obecného úspěšný přenos genu pro růstový hormon uvádí ve svých pracích např. Zhang a kol. (1990), s urychlením růstu transgenních kaprů v rozmezí od 20 do 40 % v porovnání s kontrolou. Na straně druhé ale v případě testování jiných plemen kapra, resp. jedinců s odlišnými genotypy, nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v intenzitě růstu transgenních kaprů a kontrol. Úspěšný přenos genů pro růstový hormon provedli také Hinits a Moav (1999), kteří uvádějí až 3,6násobně vyšší intenzitu

v průběhu počáteční fáze růstu transgenního kapra. V rámci této studie však nebyl objektem přenosu gen GH ve své genomové formě, ale reverzní transkript GH transkriptu. V další studii testovali stejní autoři úspěšnost přenosu genu GH a růstové schopnosti transgenních ryb až po dobu šesti měsíců, kdy transgenní ryby dosahovaly až 14násobně vyšší hmotnosti oproti jejich sourozencům, do nichž nebyl vpraven gen GH. Čtyři transgenní mlíčáci kapra pak byli použiti k umělé reprodukci a osud genu GH byl sledován genotypováním potomstva, kdy přenos genu do další generace byl zaznamenán u 19–36 % potomstva. V případě kapra obecného je častěji než u jiných druhů ryb uváděna nutnost testování růstu v realističtějších podmínkách než v omezeném laboratorním prostředí akvarijních chovů pro reálnější hodnocení potenciálu geneticky modifikovaných ryb.

Markantní rozdíly v akceleraci růstu transgenních ryb mohou být obecně vysvětleny odlišným genetickým základem testovaných jedinců, množstvím vložených kopií cizího genu, složením genového konstruktů, resp. úrovní genové exprese. Otevírá se zde prostor pro selekční programy hospodářsky významných druhů ryb, které by mohly v kombinaci s genovým transferem vést k nalezení vhodného genotypu pro transfer genu pro růstový hormon, a v konečném důsledku vést k vyrovnaným výsledkům a praktické aplikaci v akvakultuře.

7.8.2. Odolnost vůči nemocem

Vedle vyšší intenzity růstu je dalším vlastností zajímavou pro přenos genů vyšší odolnost vůči různým onemocněním vyskytujícím se v intenzivních chovech. Odolnost vůči nemocem může významně ovlivnit efektivitu produkce ryb v akvakultuře. Výzkum transferu genů způsobujících vyšší specifickou či nesespecifickou odolnost organismu vůči různým agens však není zdaleka tak daleko. Jednou z možností využití genového transferu je např. tvorba transgenních ryb nesoucích gen pro virovou bílkovinu vyráběnou buňkami hostitelského organismu, která obsadí receptory na buňce a neumožní viru zakotvit se na povrchu buňky a infikovat ji. Tímto způsobem mohou být získány linie ryb odolné vůči různým typům virů.

Další možností je produkce transgenních ryb nesoucích geny pro antibakteriální peptidy, které umožní tvorbu např. litických enzymů chránících organismus vůči bakteriální infekci. Nejznámějším genem využívaným ke tvorbě transgenních ryb rezistentních vůči bakteriálním infekcím je cecropin. Využití cecropinu a jeho analogů (cecropin-B) k tvorbě transgenních ryb uvádějí ve svých pracích např. Kelly a kol. (1990) a Kjuul a kol. (1999). Inzerce genu pro cecropin a jeho následná genová exprese vedla k zvýšené rezistenci vůči gram-negativním baktériím a nižší mortalitě transgenních ryb (lososovitých, tilapií a sumecků). Geneticky modifikované linie sumečka (*Ictalurus punctatus*) produkující cecropin vytvořil a popsal Dunham a kol. (2002). Dalšími z antibakteriálních peptidů jsou magaininy, mající aktibakteriální a antiparazitickou funkci, které se nacházejí v pokožce obojživelníků. Předpokládá se potenciál genů zodpovědných za funkci takových aktibakteriálních peptidů pro získání transgenních ryb odolných vůči různým agens.

DNA vakcinace není naprosto typickým příkladem přenosu genů. Jejím principem je zajištění exprese antigenu, jenž je vlastní původci určitého onemocnění. Živočich reaguje na přítomnost tohoto antigenu typickou imunitní reakcí a to zvyšuje jeho odolnost k chorobě. Zpravidla je gen pro bílkovinu s antigenními vlastnostmi vpravován do těla juvenilních jedinců. Je vnášen jen do omezené populace somatických buněk, kde se v drtivé většině nezabuduje do genomu. Jeho exprese je přechodná a episomální. Imunitní reakce na DNA vakcíny bývá posílena kombinací genového konstruktů s vhodným adjuvans. Stále jsou vedeny diskuse o tom, zda DNA vakcinované ryby jsou geneticky modifikovanými organismy v pravém slova smyslu. To závisí na samotné definici geneticky modifikovaného organismu (a jejím výkladu). Například v Norsku je živočich podrobený DNA-vakcinaci považován za geneticky modifikovaného,

ale ve Velké Británii nikoli. U nás podléhají legislativě regulující nakládání s GMO experimentální DNA-vakcíny. Pokud by byla DNA-vakcína schválena pro komerční využití, byla by z působnosti legislativy týkající se GMO vyjmuta.

Principem DNA vakcinace, jak už bylo zmíněno výše, není nic jiného než zajištění exprese antigenu v určité tkáni za účelem eliminace onemocnění. Koncept DNA vakcinace se začal rozvíjet už v sedmdesátých letech 20. století, experimentálně se však tato metoda začala uplatňovat až v devadesátých letech. Do této doby jsou zřejmě nejrozsáhlejší zkušenosti s DNA vakcinací lososovitých druhů proti furunkulóze (Lorenzen a kol., 2000), infekční haematopoetické nekróze (Anderson a kol., 1996), infekční nekróze pankreatu a virové haemoragické septikemii nebo jarní viremii kaprovitých. V současné době je vyvinuto několik typů DNA vakcín pro použití v akvakultuře, nicméně do dnešní doby zřejmě žádná z veterinárních ani humánních DNA vakcín nebyla schválena pro široké praktické využití.

7.8.3. Odolnost vůči chladu

Jedním z velmi populárních genů je také gen pro anti-freeze protein (AFP) čili protimrazový protein. Tento protein se objevuje sezónně v krvi některých mořských ryb. Cílem přenosu jsou nejčastěji sekvence pocházející z platýse, *Pseudopleuronectes americanus*, a slimule americké (*Macrozoarches americanus*). Primárním účelem přenosu genu pro AFP je zvýšit toleranci vůči chladu a zvýšit odolnost vůči mrazu. V případě úspěšné aplikace by pak díky zvýšené odolnosti transgenních linií bylo možné produkovat ryby v podmínkách, které byly dosud považovány za suboptimální pro daný druh.

Přítomnost AFP v krvi potlačuje růst ledových krystalů. Chrání tak rybu před zmraznutím v mořské vodě. Bod mrznutí mořské vody je nižší než bod mrznutí tělních tekutin ryb. V značně vychlazené mořské vodě tedy může poklesnout tělní teplota ryb na hodnoty, kdy jsou jejich tkáně ohroženy tvorbou velkých ledových krystalů, které trhají tkáň. AFP způsobuje vyšší odolnost buněčných membrán proti vlivům chladu a také tvorbu krystalů při mražení buněk – předpokládá se tak i jistý účinek při mražení spermií a embryí ryb.

Gen pro AFP z mořských ryb byl proto pokusně vpraven do dědičné informace lososů. Jeho exprese ale v těle lososů byla natolik nízká, že rybu nechránila před poškozením mrazem, což omezilo jeho širší praktické využití (Fletcher a Davies, 1991; Hew a kol., 1999). Obecně na základě zhodnocení publikovaných dat můžeme konstatovat, že úspěšnost přenosu genu pro anti-freeze protein má prozatím nulové uplatnění v akvakultuře. V případě úspěšného vytvoření transgenních linií a dostatečné exprese tohoto genu by však připadal v úvahu obrovský potenciál pro akvakulturní produkci.

7.8.4. Změna metabolismu

Změna metabolismu je dalším z příkladů aplikace genetických modifikací u ryb. Pohnutkou, proč se pokoušet o přenos genů s cílem pozměnit metabolismus, může být snaha o vyšší využitelnost krmiva, či třeba menší závislost na esenciálních aminokyselinách v potravě. Toho by mělo být dosaženo tím, že přenos genů zajistí vznik odpovídajících metabolických drah, které nejsou vyvinuty u organismu původního, nebo zajistí jejich vyšší efektivitu. Tyto úvahy samotné, stejně tak pokusy o jejich realizaci, jsou pak vždy závislé na znalosti metabolických drah a jejich regulace v organismu.

V této oblasti byly realizovány pokusy o přenos původně krysího genu L-gulonon- γ -oxidázy s cílem vyvolat vznik biochemické dráhy, která by zajistila produkci L-askorbové kyseliny (vitamín C) v těle pstruha (zvířata i rostliny jsou zpravidla schopni syntetizovat si L-askorbovou kyselinu, člověk, opice, morčata a právě i několik druhů pstruha není schopno tuto látku produkovat a jsou závislí na příjmu této látky v potravě).

Další práce směřovaly ke zvýšení využitelnosti glukózy z potravy pstruha díky přenosu genů, které by měly zajistit vyšší aktivitu enzymů zajišťujících odpovídající biochemické dráhy – glukózový transporter nebo hexokinázu. Původně lidský glukózový transporter a krysí hexokináza byly přenášeny do genomu pstruha, výsledky studie však byly nejednoznačné a jejich interpretaci komplikoval mosaicismus geneticky modifikovaných ryb.

Pozitivní výsledky byly dosaženy přenosem genu *fat-1* z genomu hlístice, *Caenorhabditis elegans*, nejprve do modelového organismu myši (Kang a kol., 2004) a následně i do genomu prasete (Lai a kol., 2006). Expresí genu *fat-1* posouvá rovnováhu mezi syntézou omega-6 polynenasycených mastných kyselin a omega-3 polynenasycených mastných kyselin ve prospěch dieteticky příznivě hodnocených „omega-3“. Stejnou genetickou modifikací se podařilo týmu J.X. Kanga z Harvard Medical School výrazně zvýšit podíl „omega-3“ i ve svalovině ryb. Maso zvířat s expresí genu *fat-1* by tak mohlo přispět ke zdravější výživě konzumentů.

7.8.5. Sterilita

V souvislosti s rozsáhlým chovem ryb v klecových systémech, možností úniku chovaných jedinců a s tím, že se tito uniknuvší jedinci mohou v přírodě rozmnožovat s jedinci z divokých populací a tyto populace ovlivňovat, přichází úvahy o možnostech sterilizace. Začínají se tak rozvíjet úvahy, zda by této sterilizace nemohlo být dosaženo i zásahem do genetické informace – například s využitím tzv. „antisense RNA“ a zabránit tak translaci GnRH (*gonadotropin releasing hormone*), tak jak tomu bylo dosaženo například u myši (Mason a kol., 1986). Výsledkem první z prací s cílem sterilizovat takto ošetřené jedince byla úspěšná inserce antisense-GnRH faktoru, ale nikoliv úspěšná sterilizace (Uzbekova a kol., 2000).

Pro experimentální účely se v současné době využívá knock-downu dead end genu pomocí RNA, a to k cílené sterilizaci jedinců vzešlých z embryí ošetřených morpholino antisense oligonukleotidem. Morpholino antisense oligonukleotid je uměle syntetizovaná molekula RNA, která se používá ke změně genové exprese. Pomocí morpholino oligonukleotidu lze blokovat translaci mRNA na proteiny v závislosti na jeho základní sekvenci a pozměnit či přerušit tak expresi určitých genů. Těto techniky se využívá i pro experimentální studium genové exprese a funkce proteinů. Knock-down dead end genu pomocí morpholino oligonukleotidu se využívá například k získání sterilních jedinců pro transplantace primordiálních gonocytů (Saito a kol., 2008).

7.8.6. Využití geneticky modifikovaných ryb ve farmacii a biomedicině

V této kapitole již bylo zmíněno využití přenosu genů k zajištění produkce lidského insulinu v bakterii *E. coli* jakožto první legalizované použití geneticky modifikovaného organismu ke komerčním účelům. Podobně je dnes pro farmaceutické účely produkováána celá řada lidských rekombinantních proteinů (např. lidský růstový hormon pro léčbu poruch růstu dětí) nebo zvířecích rekombinantních proteinů (např. růstový hormon skotu pro stimulaci užitkovosti dojníc). Taková produkce je velmi drahá, protože stavba a provoz bioreaktorů jsou velmi náročné. Řadu lidských proteinů nelze produkovat transgenními geneticky modifikovanými prokaryotními organismy v potřebné kvalitě, protože prokaryota nezajistí jejich patřičnou posttranslační modifikaci (např. glykosylaci, acetylaci či fosforylaci proteinu). Proto je s výhodou využívána koncepce tzv. živých bioreaktorů. Jde většinou o transgenní obratlovce, kteří syntetizují ve svém organismu lidský protein podle vneseného lidského genu. Syntézu lze směřovat volbou promotoru v genovém

konstruktu specificky do vybraných tkání či orgánů. U savců se zhusta využívá promotorů genů kódujících mléčné bílkoviny, což zajistí expresi lidského proteinu v mléčné žláze samic a jeho vylučování mlékem. Prvním povoleným lékem produkovaným živým bioreaktorem je lidský anti-trombin produkovaný v mléce geneticky modifikovaných koz. Využívá se k léčbě pacientů trpících zvýšenou srážlivostí krve a ohrožených trombózou.

Ukazuje se, že posttranslační modifikace jsou i u obratlovců do určité míry druhově specifické a pro určitou bílkovinu je často nezbytné volit do role živého bioreaktoru organismus, který lidský protein posttranslačně upraví tak, aby si uchoval v lidském organismu plné biologické účinky a nevyvolával nežádoucí imunitní reakci. V řadě případů se ukazují jako velmi slibné živé bioreaktory ryby.

V případě ryb se uvažovalo o produkci lidského koagulačního faktoru pro farmaceutické využití díky vložení genu koagulačního faktoru VII do tilapie, toto téma bylo objektem společného výzkumu týmů z Velké Británie a USA. V současnosti jsou lidské koagulační faktory pro léčbu hemofilie produkovány geneticky modifikovanými kozami a ovci.

Skutečnost, že tilapie nilská nemá ve svých tkáních expresi alfa-galaktosylázy, otevřela zajímavou možnost využít geneticky modifikované tilapie pro xenotransplantace, tedy pro transplantace zvířecích buněk, tkání a orgánů nemocným lidem náhradou za jejich poškozené buňky, tkáně či orgány (Leventhal a kol., 2004). Člověk a vyšší primáti evolučně přišli o gen pro alfa-galaktosylázu a jejich buňky proto neobsahují alfa-(1,3) galaktosylový epitop. Většina savců včetně prasete, o němž se uvažuje přednostně jako zdroji buněk, tkání a orgánů pro xenotransplantace, však má expresi alfa-galaktosylázy plně zachovanou a jejich buňky proto nesou na povrchu četné alfa-(1,3) galaktosylové epitopy. Lidský imunitní systém reaguje na přítomnost těchto epitopů velmi silnou imunitní reakcí označovanou jako hyperakutní rejekce. Ta představuje jednu z významných limit pro xenotransplantace.

Pro léčbu diabetu by bylo možné využít transgenní tilapie (Hrytsenko a kol., 2011), které mají v Brockmanových tělískách pankreatu zajištěnou expresi lidského inzulinu. Při laboratorních testech už se prokázalo, že transplantace těchto buněk je s to zajistit normoglykemii myši s uměle navozeným diabetem a přitom nevyvolá u myši hyperakutní rejekci.

LITERATURA

- Anderson, E.D., Mourich, D.V., Fahrenrug, S.C., La Patra, S., Shepherd, J., Leong, J.A.C., 1996. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5: 114–122.
- Andreeva, L.E., Sleptsova, L.A., Grigorenko, A.P., Gavriushkin, A.V., Kuznetsov, A.V., 2003. Loach spermatozoa transfer foreign DNA, which expression is discovered in the early development stages. *Russian Journal of Genetics* 6: 758–761.
- Brackett, B.G., Baranska, W., Sawicki, W., Koprowski, H., 1971. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 68: 353–357.
- Brem, G., Brenig, B., Horstgen-Schwark, G., Winnacker, E.L., 1988. Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 68: 209–219.
- Carr, K., 1999. Cuban biotechnology trades a lonely path. *Nature* 398 (Suppl. 1): A22–A23.
- Ciruna, B., Weidinger, G., Knaut, H., Thisse, B., Thisse, C., Raz, E., Schier, A.F., 2002. Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 14919–14924.
- Clark, K.J., Voytas, D.F., Ekker, S.C., 2011. A TAKLE of two nucleases: Gene targeting for the masses? *Zebrafish* 8: 147–149.
- de la Fuente, J., Guillen, I., Martinez, R., Estrada, M.P., 1999. Growth regulation and enhancement in tilapia: basic research findings and their applications. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 15: 85–90.
- Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Donaldson, E.M., Swanson, P., Chen, W.K., 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature* 371: 209–210.
- Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Donaldson, E.M., Du, S.J., Hew, C.-L., 1995. Production of germline transgenic pacific salmonids with dramatically increased growth performance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52: 1376–1384.
- Du, S.J., Gong, Z., Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J., Idler, D.R., Hew, C.L., 1992. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an “all-fish” chimeric growth hormone gene construct. *Bio-Technology* 10: 179–187.
- Dunham, R.A., 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: genetic approaches*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 1–367.
- Dunham, R.A., Eash, J., Askins, J., Townes, T.M., 1987. Transfer of the metallothionein-human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society* 116: 87–91.
- Dunham, R.A., Warr, G., Nichols, A., Duncan, P.L., Angue, B., Middleton, D., Liu, Z., 2002. Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish, *Ictalurus punctatus*, possessing cecropin genes. *Marine Biotechnology* 4: 338–344.
- Fletcher, G., Davies, P.L., 1991. Transgenic fish for aquaculture. *Genetic Engineering* 13: 331–369.
- Foley, J.E., Yeh, J.-R.J., Maeder, M.L., Reyon, D., Sander, J.D., Pettersson, R.T., Joung, J.K., 2009. Rapid mutation of endogenous zebrafish genes using zinc finger nucleases made by Oligomerized Pool ENgineering (OPEN). *PLoS ONE* 4: e4348.
- Gross, M.L., Schneider, J.F., Moav, N., Moav, B., Alvarez, M.C., Myser, S.H., Liu, Z., Hallerlan, E.M., Hackett, P.B., Giuse, K.S., Faras, A.J., Kapuscinski, A.R., 1992. Molecular analysis and growth evaluation of Northern pike (*Esox lucius*) microinjected with growth hormone genes. *Aquaculture* 103: 253–273.

- Gruber, J., Manninga, H., Tuschl, T., Osborn, M., Weber, K., 2005. Specific RNAi mediated gene knockdown in zebrafish cell lines. *RNA Biology* 2: 101–105.
- Guyomard, R., Chourrout, D., Houdebine, L., 1989. Production of stable transgenic fish by cytoplasmic injection of purified genes. In: Beaudet, A.L., Mulligan, R., Verma, I.M. (Eds), *Gene Transfer and Gene Therapy*. Alan R. Liss, New York, USA, pp. 9–18.
- Hallerman, E.M., Kapuscinski, A.R., 1999. Incorporating risk assesment and risk management into public policies on genetically modified finfish and shellfish. *Aquaculture* 137: 9–17.
- Hew, C., Poon, R., Xiong, F., Gauthier, S., Shears, M., King, M., Davies, P., Fletcher, G., 1999. Liver-specific and seasonal expression of transgenic Atlantic salmon harboring the winter flounder antifreeze protein gene. *Transgenic Research* 8: 405–419.
- Hinitz, Y., Moav, B., 1999. Growth performance studies in transgenic *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 173: 285–296.
- Hrytsenko, O., Rayat, G.R., Xu, B.-Y., Krause, R., Pohajdak, B., Rajotte, R.V., Wright, J.R., 2011. Lifelong stable human insulin expression in transgenic tilapia expressing a humanized tilapia insulin gene. *Transgenic Research* 20: 1397–1398.
- Chatakondi, N., Lovell, R.T., Duncan, P.L., Aayat, M., Chen, T.T., Powers, D.A., Weete, J.D., Cummins, K., Dunham, R.A., 1995. Body composition of transgenic common carp, *Cyprinus carpio*, containing rainbow trout growth hormone gene. *Aquaculture* 138: 99–109.
- Chen, T.T., Kight, K., Lin, C.M., Powers, D.A., Hayat, M., Chatakondi, N., Ramboux, A.C., Duncan, P.L., Dunham, R.A., 1993. Expression and inheritance of RSVLTR-reGH1 complementary DNA in the transgenic common carp, *Cyprinus carpio*. *Molecular marine biology and biotechnology* 2: 88–95.
- Chourrout, D., Guyomard, R., Houdebine, L., 1986. High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture* 51: 143–150.
- Kang, J.X., Wang, J., Wu, L., Kang, Z.B., 2004. Transgenic mice: Fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature* 427: 504.
- Kelly, D., Wolters, W.R., Jaynes, J.M., 1990. Effect of lityc enzymes on selected fish bacterial pathogens. *Journal of Fish Diseases* 13: 317–321.
- Kjuul, A.K., Bullesbach, E.E., Espelid, S., Dunham, R.A., Jorgensen, T.O., Warr, G.W., Styrvold, O.B., 1999. Effects of cecropin peptides on bacteria pathogenic to fish. *Journal of Fish Diseases* 22: 387–394.
- Khoo, H.W., Ang, L.H., Lim, H.B., Wong, K.Y., 1992. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. *Aquaculture* 1: 1–19.
- Knerr, I., Beidner, E., Rascher, W., 2002. Syncytin, a novel human endogenous retroviral gene in human placenta: Evidence for its dysregulation in preeclampsia and HELLP syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 186: 210–213.
- Lai, L., Kang, J.X., Li, R., Wang, J., Witt, W.T., Yong, H.Y., Hao, Y., Wax, D.M., Murphy, C.N., Rieke, A., Samuel, M., Linville, M.L., Korte, S.W., Evans, R.W., Starzl, T.E., Prather, R.S., Dai, Y., 2006. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nature Biotechnology* 24: 435–436.
- Lee, K.-Y., Huang, H., Ju, B., Yang, Z., Lin, S., 2002. Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells. *Nature Biotechnology* 20: 795–799.
- Leventhal, J.R., Sun, J., Zhang, J., Galili, U., Chong, A., Baker, M., Kaufman, D.B., Wright, J.R., 2004. Evidence that tilapia islets do not express $\alpha(1,3)\text{gal}$: implications for islet xenotransplantation. *Xenotransplantation* 11: 276–283.
- Lorenzen, N., Cupit, P.M., Elner-Jensen, K., Ahrens, P., Secombes, C.J., Cunningham, C., 2000. Immunoprophylaxis in fish by infection of mouse antibody genes. *Nature Biotechnology* 18: 1177–1180.

- Lu, J.K., Chen, T.T., Allen, S.K., Matsubara, T., Nurns, J.C., 1996. Production of transgenic dwarf surfclams, *Mulinia lateralis*, with pantropic retroviral vectors. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 93: 3482–3486.
- Ma, J., Wang, W., Zeng, L., Fan, Y., Xu, J., Zhou, Y., 2011. Inhibition of the replication of grass carp reovirus in CIK cells with plasmid transcribed shRNAs. Journal of Virological Methods 175: 182–187.
- Martinez, R., Estrada, M.P., Berlanga, J., Guillen, I., Hernandez, O., 1996. Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. Molecular Marine Biology and Biotechnology 5: 62–70.
- Mason, A.J., Hayflick, J.S., Zoeller, R.T., Young, W.S., Phillips, H.S., Nikolics, K., Seeburg, P.H., 1986. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. Science 234: 1366–1371.
- McLean, E., Donaldson, E.M., 1993. The role of somatotropin in growth in poikilotherms. In: Schreibman, M.P., Scanes, C.G., Pang, P.K.T. (Eds), The Endocrinology of Growth, Development and Metabolism in Vertebrates. Academic Press, New York, USA, pp. 43–71.
- McLean, N., Penman, D., Talwar, S., 1987. Introduction of novel genes into fish. Biotechnology 5: 257–261.
- Mi, S., Lee, X., Li, X.-P., Veldman, G.M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X.-Y., Edouard, P., Howes, S., Keith, J., McCoy, J.M., 2000. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. Nature 403: 785–789.
- Nam, Y.K., Noh, J.K., Cho, Y.S., Cho, H.J., Cho, K.N., Kim, C.G., Kim, D.S., 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. Transgenic Research 10: 353–362.
- Penman, D.J., Beeching, A.J., Penn, S., Rhaman, A., Sulaiman, S., McLean, N., 1991. Patterns of transgene inheritance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular Reproduction and Development 30: 201–206.
- Perry, A.C., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y., Yanagimachi, R., 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. Science 284: 1180–1183.
- Phelps, M.P., Bradley, T.M., 2012. The Potential of Enhancing Muscle Growth in Cultured Fish through the Inhibition of Members of the Transforming Growth Factor- β Superfamily. In: Fletcher, G.L., Rise, M.L. (Eds), Aquaculture Biotechnology, Wiley-Blackwell, Chapter 19, pp. 291–302.
- Rahman, M.A., Mak, R., Ayad, H., Smith, A., Maclean, N., 1998. Expression of a novel growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia. Transgenic Research 7: 357–369.
- Rahman, M.A., Ronyai, A., Engidaw, B.Z., Jauncey, K., Hwang, G., Smith, A., Roderick, E., Penman, D., Varadi, L., Mclean, M., 2001. Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene. Journal of Fish Biology 59: 62–78.
- Remy, S., Tesson, L., Menoret, S., Usal, C., Scharenberg, A.M., Anetin, I., 2010. Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. Transgenic Research 19: 363–371.
- Rokkones, E., Alestrom, P., Skjervold, H., Gautvik, K.M., 1989. Micro-injection and expression of a mouse metallotionein human growth hormone fusion in fertilized salmonid eggs. Journal of Comparative Physiology B 158: 751–758.
- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., Yamaha, E., 2008. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. Biology Reproduction 78: 159–66.
- Spadafora, C., 1998. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. BioEssays 11: 955–964.

- 
- Stuart, G.W., McMurray, J.V., Westerfield, M., 1988. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development* 103: 403–412.
- Uzbekova, S., Chyb, J., Ferrie, R., Bailhache, T., Prunet, P., 2000. Transgenic rainbow trout expressed sGnRH-antinsense RNA under the control of sGnRH promoter of Atlantic salmon. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 337–350.
- Zhang, P.J., Hayat, M., Joyce, C., Gonzales, V.L., Lin, C.M., Dunhanm, R.A., Chen, T.T., Powers, D.A., 1990. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Molecular Reproduction and Development* 25: 3–13.
- Zhu, Z., Li, G., He, L., Chen, S., 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carasius auratus* 1758). *Journal of Applied Ichthyology* 1: 31–33.

DOMESTIKACE A PLEMENITBA VÝZNAMNÝCH HOSPODÁŘSKÝCH DRUHŮ RYB

M. Flajšhans



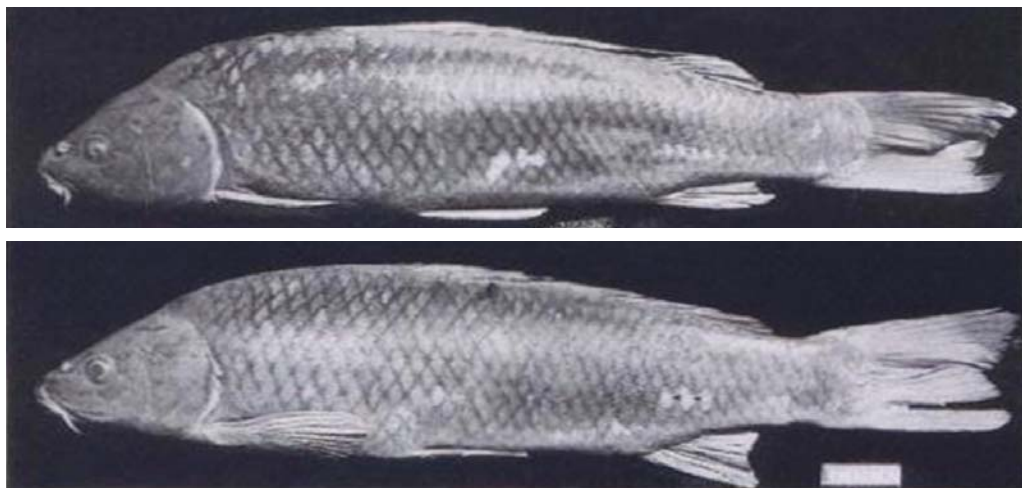
DOMESTIKACE A PLEMENITBA VÝZNAMNÝCH HOSPODÁŘSKÝCH DRUHŮ RYB

M. Flajšhans

Domestikace v původním slova smyslu znamená proces postupné adaptace organismu k životním podmínkám, které jsou nastavovány nějakým lidským zásahem (Bilio, 2007, 2008). V historii domestikace mnoha dnešních hospodářských zvířat včetně kapra obecného na počátku pravděpodobně stála tzv. „**bezděčná domestikace**“ podle Dunhama a kol. (2001) čili držení živočichů v zajetí a jejich uvyknutí podmínkám zajetí do té míry, že mohlo dojít k první reprodukci. V čase první reprodukce a individuálního vývoje pak docházelo k dalšímu přizpůsobování podmínkám prostředí a k postupnému bezděčnému výběru vlastností umožňujících lepší přežití v daném prostředí. Tato fáze je považována za tím účinnější, čím víc potomků může za těchto podmínek jeden rodičovský pár mít, tak jako má mnoho akvakulturních organismů, resp. ryb. Bezděčná domestikace je však přinejlepším jen prvním krokem ke skutečné domestikaci a v podstatě se jedná jen o přirozenou adaptaci na nové prostředí (Bilio, 2007, 2008).

O „**skutečné domestikaci**“ ve formě záměrné adaptace obvykle hovoříme až v souvislosti se šlechtitelským procesem. Hlavními rysy domestikace jsou:

- **kontinuální řízená reprodukce** v pořadí generací $P \rightarrow F_1 \rightarrow F_2 \rightarrow F_3$ atd. bez dalších vstupů divokých organismů do těchto generací, tak aby mohly být vybrané vlastnosti předávány z generace na generaci a proces domestikace mohl pokračovat postupným šlechtěním (selekcí). Jestliže byly uspokojivě stabilizovány žádoucí znaky a vlastnosti, které nesou jen minimální odchylku, proces může pokročit až k produkci čistých plemen se známými předky stejného typu. Významné omezení kontinuální reprodukce zde může představovat extrémní inbreeding v podobě negativního dopadu na fitness (reprodukční zdatnost) populace.
- Druhým rysem je tedy **vznik plemen s definovanými užitkovými vlastnostmi**, které se liší od původního divokého předka.
- Třetím rysem je **posun některých biologických charakteristik** domestikovaných forem vůči původnímu divokému předkovi. Například domestikovaný kapr obecný ve smyslu charakteristiky současných plemen (která tráví více rostlinné potravy, obývají jiný habitat a v rybníční polykultuře nepotřebují tak pohotově mobilizovat energetické rezervy a reagovat na vnější ohrožení), má o 15–25 % delší střevo, menší kraniální komoru vzduchového měchýře, téměř o 20 % méně červených krvinek, svalovinu méně protkanou cévami a rovněž má méně glykogenu v játrech (Balon, 2010), než má jeho divoký předek, tzv. „sazan“ (obr. 8.1.). U domestikovaného kapra došlo rovněž k posunu teplotního optima pro reprodukci z 15–18 °C v původním říčním prostředí na 19–21 °C u chovaných populací (Balon, 1990; Flajšhans a Hulata, 2006; Gela a kol., 2009).
- Za čtvrtý rys domestikace můžeme považovat **vyštěpení recesivních genotypů ošupení, tvaru ploutví a zejména zbarvení**, které by se v přírodě pro svou nápadnost okamžitě staly terčem predátorů, či by zastávaly podřízené postavení v etologické hierarchii hejna a měly nízkou šanci na přežití. Barevné fenotypy (např. zlatý, modrý, albinotický) byly zaznamenány v průběhu domestikace většiny hospodářsky významných druhů ryb (lososovitých, kaprovitých, sumcovitých, sumeckovitých, ostnoploutvých a dalších) a chov barevných mutací a jejich další šlechtění se stalo základem chovu okrasných ryb, např. závojnatek, japonského kapra koi, barevných línů, jesenů aj. Ještě dále v tomto směru pokročila domestikace akvarijních druhů ryb, o jejichž formách a okrasných mutacích jsme se zmínili v části pojednávající o genetice kvalitativních znaků.



Obr. 8.1. Divoká říční forma kapra obecného (tzv. „sazan“) má proudnicovitý tvar těla, typický pro reofilní ryby. Fotografie ryb ze slovenského úseku Dunaje (Balon, 1957).

8.1. Kapr obecný, *Cyprinus carpio* L.

Původ kapra

Předek kapra pravděpodobně pochází z oblasti Kaspického moře na konci pliocénu (poslední období třetihor). Během pleistocénu (dob ledových v období čtvrtohor) se z tohoto předka vyvinul moderní druh *Cyprinus carpio* a rozšířil se do bazénu Černého moře a Aralského jezera (Berg, 1948). V podmínkách postglaciálního termálního optima se druh rozšířil na západ až do povodí Dunaje a na východ do kontinentální Asie. Moderní druh *Cyprinus carpio* se v povodí Dunaje objevil před cca 8 000–10 000 lety (Balon, 1995). Současný areál přirozeného rozšíření kapra obecného je rozštěpen na západní oblast (úmoří Kaspického a Černého moře a Aralského jezera) a východní oblast (východní a jihovýchodní Asie).

Starší literatura (Berg, 1948) uvádí tyto poddruhy kapra obecného:

- *Cyprinus carpio carpio* (evropsko-transkavkazský)
- *Cyprinus carpio aralensis* (Střední Východ)
- *Cyprinus carpio haematopterus* (východní Asie)
- *Cyprinus carpio viridiviolaceus* (jižní Čína a Vietnam)

Podle práce Balona (1995) lze hovořit o skupině evropského kapra obecného (Bergův *C.c. carpio*) a o skupině asijského kapra obecného (Bergův *C.c. haematopterus*). V každé populaci a geografické oblasti mohou následkem adaptací vzniknout různé formy. Jako druh je kapr obecný rozšířen v kontinentální Eurasii.

Podle nedávných srovnávacích studií evropských a asijských populací kapra (Kohlmann a Kersten, 1999; Kohlmann a kol., 2003, 2005) pomocí mitochondriální a mikrosatelitní DNA lze potvrdit existenci odlišitelných evropských a asijských populací, v těchto studiích označovaných jako

- *Cyprinus carpio carpio*, z něj vychází většina evropských plemen a kam patří i populace kapra z tureckých jezer a ze střední Asie (Uzbekistán), a
- *Cyprinus carpio haematopterus*, kam patří asijské populace a plemena. Asijské populace lze dále členit na středoasijské a východo-/jihoasijské.

Současná taxonomie (Kottelat, 2001; blíže viz např. www.fishbase.org) uznává

- *Cyprinus carpio* L. pod názvem Evropský kapr a)
- pro Bergova *Cyprinus carpio viridiviolaceus* uznává název ***Cyprinus rubrofuscus* Lacepède, 1803**, pod názvem Asijský kapr s tím, že *viridiviolaceus* je mladším synonymem. Podle Eschmeyera (Catalog of Fishes, 2005, na webu California Academy of Sciences), je i *haematopterus* synonymem pro *C. rubrofuscus*.

Domestikace kapra v Číně

Řada literárních zdrojů stále uvádí, že kapr obecný byl domestikován v Číně před více než 2 000 lety. Plůdek odlovený v řekách byl chován do tržní velikosti v umělých lagunách, nádržích, na rýžovištích. Menší ryby po zátahu sítí byly ponechány k rozmnožení a obsádka byla doplňována odlovenými divokými rybami. Pravděpodobně šlo i o jiné druhy kaprovitých ryb (karasy, amury, tolstolobiky aj.). Podle prací Wohlfarth (1984) a Balon (1995, 2006) nebyl kapr v Číně domestikován v pravém slova smyslu, ale odlovené divoké ryby byly vysazovány do „semidomestikačních podmínek“, resp. podrobeny bezděčné domestikaci, o níž jsme hovořili v úvodu této kapitoly. Když si uvědomíme podmínky a dobu přepravy zboží z Asie do Evropy ve starověku a středověku, pak tvrzení, že kapr domestikovaný v Číně byl dovezen do Evropy, a že z něj vznikla evropská plemena, je vysoce nepravděpodobné.

Domestikace kapra v Evropě

Historií domestikačního procesu u kapra se zabýval zejména Balon (1995, 2006). Shrnuje, že kapr obecný se vytíral v zátopových oblastech na středním toku Dunaje, kde byl loven místními kmeny. Při vojenské expanzi do Podunají (pozdější Panonská provincie římské říše) počátkem našeho letopočtu jej zde poznali Římané a využili kapra jako jeden ze sezónních druhů potravy pro armádu a správu (4 legie mezi dnešní Vídni a Budapeští nutné k udržení severní hranice tvořily asi stotisícovou lidskou populaci). Hypotéza byla potvrzena mj. i nálezy četných kostí kapra ve vykopávkách římských pevností na slovensko-maďarském pomezí (Balon, 1995). V této oblasti navíc křižovala Dunaj důležitá severojižní obchodní cesta, Jantarová stezka. Římané znali chov ryb v umělých nádržích, dokázali domestikovat řadu živočišných druhů, poznali kapra jako potravu a mohli ho po vybudované síti vojenských silnic transportovat. Kapr byl také dostatečně odolným druhem, aby podmínky transportu přežil. Římská aristokracie dávala přednost rybám mořským, ale sladkovodní ryby Římané chovali rovněž, jak na Apeninském poloostrově, tak i v provinciích. Rybník z římských dob (Hoffmann, 1995) byl objeven i v německém Trevíru r. 1892. Papežský lékař Paolo Giovio, který v r. 1524 psal studii o rybách na trhu císařského Říma, se zmínil o vysazování kapra do římských jezer.

Rozšíření kapra v Evropě

Římská a klášterní domestikace (5.–12. století)

První psaný záznam pochází od sekretáře krále Theodorika, Cassiodora (490–585 n. l.), jemuž bylo nařízeno obstarat pro královskou tabuli mj. kapra z Dunaje a lososa z Rýna.

S pádem Římské říše a rozvojem křesťanství chov ryb pokračoval v klášterních rybnících. Kláštery vznikaly již od raného středověku (klášter v Monte Cassino byl založen již r. 529 n. l.). Křesťanství zavedlo více než 140 postních dní v roce. Během nich bylo z masa dovoleno jíst jen korýše, měkkýše, ryby, místně i jiné vodní živočichy (například bobra). Mniši potřebovali mít ryby v zásobě (ne vždy bylo možné je ulovit), a proto budovali rybníky po římském vzoru. Do rybníků byl vysazován především kapr, čímž docházelo k jeho postupné adaptaci a částečné domestikaci. Za příznivých podmínek se zde kapr také mohl spontánně podetřít.

V Čechách zakládání klášterních rybníků zmiňuje Kladrubská listina (1115) a Kosmova kronika (po r. 1119). Hildegarde von Bingen (představená německého benediktýnského kláštera, 1098–1179) vydala knihu receptů a zmiňovala přípravu kapra, což dokumentuje jeho gastronomický význam v té době.

Francko-Burgundské světské rybníky (12.–13. století)

Souběžně s klášterními rybníky začaly v západní Evropě (ve Francké říši) vznikat rybníky na šlechtických panstvích. Zakládání rybníků se stalo natolik důležitým fenoménem, že Karel Veliký (Charlemagne, 768–814) vydal instrukce o údržbě rybníků. Chov kapra v rybnících poprvé ve stejné době popsali hrabě ze Champagne v r. 1258 a Albert Veliký (Albertus Magnus, 1193–1280) v r. 1260.

Další rozšíření kapra v Evropě do 16. století

- první písemný důkaz o kapru v Polsku je z r. 1466, v Anglii z r. 1468

- první rybníkářské manuály:

1547: Jan Skála z Doubravky (J. Dubravius): „O rybnících“ (De Piscinis)

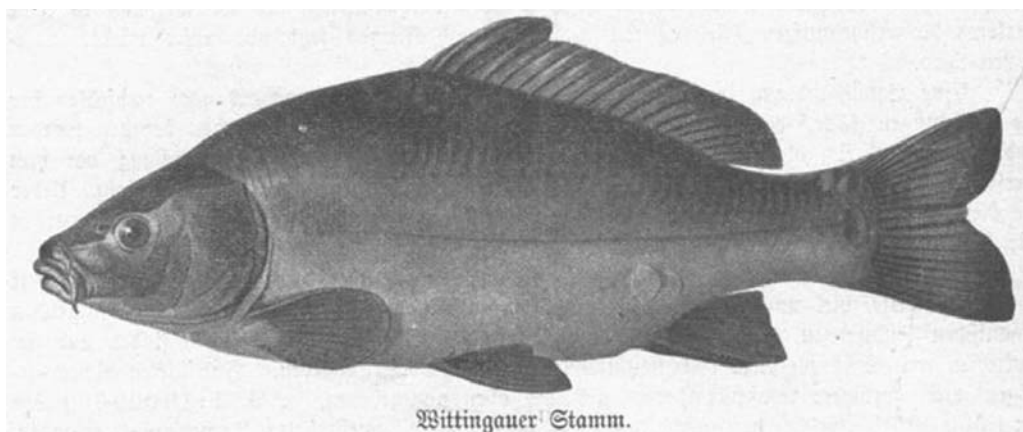
1573: O. Strumieński: „O Sprawie, sypaniu, wymierzaniu i rybieniu“ (Polsko)

1600: J. Taverner: „Certain experiments concerning fish and fruit“ (Anglie)

- 1560 introdukce kapra do Holandska a Dánska.

Stručný přehled historie plemenářské práce u kapra na území Čech, Moravy a Slezska

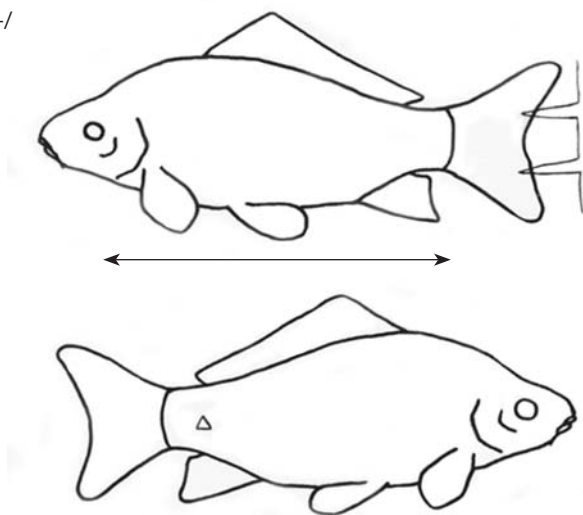
- Jan Dubravius (1547) ve svém díle „O rybnících“ definoval chovný cíl kapra obecného a fenotypově charakterizoval tělesný rámec. Definice je dodnes aktuální.
- Josef Šusta na přelomu 80. a 90. let 19. stol. prováděl selekci šupinatých kaprů na rychlost růstu (Šusta, 1898). Rovněž jako první vyslovil správnou teorii o původu lysého fenotypu kapra. Jeho přístup k dané problematice dokumentuje vysoce moderní pohled na šlechtitelskou práci v českých zemích té doby. Založil z místní populace chov šupinatého třeboňského kapra a r. 1882 i chov Třeboňského lysce na základě dovozu generačních ryb z panství ve Štětkni a Blatné (obr. 8.2.). Důvodem byla (již tehdy) vyšší cena za lysce na německém trhu. Šustova práce byla vysoce uznávána i v konkurenčním německém chovatelském prostředí.
- Selektce Inářského modráka dr. Theodorem Mokřým a telčského šupinatého modráka E. Srbem ve 20. letech 20. století.



Obr. 8.2. Třeboňský lysec J. Šustý (Wittingauer Stamm, třeboňský kmen) v prvním přehledu a kategorizaci plemen kapra B. Hofera (1898a–g).

- Ve 30. letech 20. století byla věnována pozornost plemenné (= genetické) struktuře kapra. Dr. Černajev, prof. Kříženecký s prof. Kostomarovem a dr. Nowakem popsali řadu kmenů kapra chovaných na českém území a údaje publikovali ve více než 30 odborných pracích. Vytvořili ucelenou metodiku měření a posuzování exteriéru a užitkové hodnoty, stanovili vývoj užitkové hodnoty, stanovili váhový růst pohlavních žláz, vytvořili novou metodu posuzování kvality kaprů podle tzv. objemové metody. **Monitoring na základě morfometrických znaků** ukázal rozdílnosti jednotlivých kmenů chovaných v různých oblastech Čech a Moravy, které vznikly dlouhodobým výběrem a adaptací na místní podmínky.
- Osvětovou činnost k metodám zušlechťování kapra, jeho evidence, výběru generačních ryb, později s přenosem nových poznatků z výzkumu prof. Kříženeckého a jeho žáků do rybářské praxe prováděli především Štěpán v letech 1906–1929, Dvořák v letech 1932–1944, Dyk v letech 1941–1946 a Rusov v letech 1944–1945.
- Za 2. světové války byl nucenou německou správou dovážěn plůdek kapra z Jugoslávie, který ovlivnil řadu krajových populací.
- V roce 1954 proběhla **první inventarizace generačních kaprů** v národním podniku (n.p.) Státní rybářství. V té době existovalo i Státní plemenářské rybářství v Chlumu u Třeboně a v Telči.
- V 50. a 60. letech byla ověřována **segregace ošupení a barev** (Krupauer a Chytra, 1962; Smíšek a Pícha, 1970; Zeman, 1981).
- Byl studován **vliv ošupení na užitkové vlastnosti**. Potvrzena vyšší růstová rychlost a přežití u šupinatých kaprů (Kostomarov, 1947; Krupauer a Chytra, 1962; Smíšek, 1968, 1972; Hochman a Jirásek, 1969, 1979).
- Významným krokem ve šlechtění kapra bylo **zavedení umělého výtěru** do plemenářských metod ve VÚRH Vodňany (Smíšek, 1970, 1971).

K_3 / H/T+/H-/Z-/K+ /



Obr. 8.3. Příklad použití značkovacího klíče a popisných značek, používaných v 50.–60. letech 20. století k popisu exteriéru kapra (K_3 bez určení pohlaví, H hladký, T+ typický fenotyp ošupení, H- neharmonický tvar těla, Z- špatný zdravotní stav, K+ dobře vyživený, protažený trup, rozštěpená ocasní ploutev, zahojené poranění na ocasním násadci).

- Hlavní metodou šlechtitelské práce ve směru zušlechťování chovu kapra s přenosem výsledků do praxe byl v 50. a 60. letech **hromadný výběr generačních ryb** (Kostomarov 1955; Chytra 1956) s důsledným popisem, evidencí a stanovením výtěžnosti (Krupauer, 1964, 1967, 1971; obr. 8.3.).
- **Vyřazování generačních kaprů** s různými defekty i za pomoci využití rentgenových snímků (Havelka a Volf, 1971; Havelka a kol., 1971).
- Počátkem 50. let se začal vytvářet současný **genofond plemen a linií kapra** ve VÚRH Vodňany, včetně dunajského sazana (Chytra a kol., 1961), za účelem zavádění selekce a hybridizace do šlechtění (Chytra 1953, 1956).
- V trendu doplnění kolekce o nové populace, krajové rázy, plemena a linie kapra z území Čech i z jiných evropských zemí pokračoval Smíšek (1974, 1979a,b,c) a Pokorný (1986, 1987, 1988).
- V 60. letech byla dovážena a vyhledávána nová plemena za účelem **užitkového křížení** jako nejrychlejší cesty k dosažení zlepšení užitkovosti, tj. růstové rychlosti a přežití (Smíšek 1974, 1978, 1979a,c, 1981).
- 1977 založena **Šlechtitelská rada** na Státním rybářství, oborovém podniku (o.p.) v Českých Budějovicích.
- 1978–1980 vypracován **šlechtitelský program** v chovu kapra.
- 1982 založena **Šlechtitelská stanice** ve VÚRH ve Vodňanech.
- 1982 založena **testovací stanice** v Milevsku [Státní rybářství Tábor, odštěpný závod (o.z.)].

- Šlechtitelský program byl doplněn o systém **testování užítkovosti rodičů podle potomstva**. V počátcích byly testy prováděny s opakováním, ovšem bez respektování rozdílných podmínek mezi rybníky (Smíšek, 1979b), později testy prováděny ve stejném prostředí (Smíšek, 1980; Smíšek a Pokorný, 1982) s využitím standardní linie (Pokorný a kol., 1983).
- Užitékové křížení přineslo momentální vklad ve zlepšení růstové rychlosti a přežití především u F_1 -šupinatých dihybridů mezi kaprem ropšinským a kaprem maďarského původu šupinatého i lysého fenotypu (Pokorný, 1990) a u F_1 lysých tetrahybridů s podílem krve kapra mariánskolázeňského, ropšinského a 2 maďarských lysých linií.
- Nalezení vhodných kříženců umožnilo u šupináče i u lysce **zlepšení chovatelských výsledků** v praxi.
- Negativní dopad zaváděného velkého počtu linií a různých kříženců v nekontrolovaných provozních podmínkách měl za následek postupnou "bastardizaci" některých chovných hejn. Některé linie a kmeny dosud byly udržovány jako velmi cenné, přičemž jejich původ je někdy velmi diskutabilní. Docházelo k **ztrátě charakteristických znaků u čistých plemen** a velmi často ke zmenšení nebo i zániku jejich výjimečnosti (Jakubec, 1986, 1990). (Např. kapr Aischgrundský, který byl u nás chován v čistém stavu ještě před 15 lety, se svými morfometrickými parametry naprosto odlišoval od Aischgrundského kapra, jehož popis publikoval Hofmann, 1927).
- Šlechtitelský výzkum byl doplňován výzkumem genetickým se sledováním **korelace mezi dědičností exteriéru a biochemickými ukazateli** se stanovením koeficientů některých užítkových vlastností (Smíšek, 1973, 1977, 1979b; Smíšek a Vavruška, 1973, 1975).
- V rámci testování užítkovosti linií a díky problémům s jejich značením především v prvním roce života, byla snaha jít cestou **využití biochemicko-genetických márků**, především transferinů (Valenta a Kálal, 1968; Smíšek, 1973; Kálal a Smíšek, 1975). Vzhledem k velké pracnosti a neadekvátní ceně s nutností využívání jen rodičů o precizně známém fenotypu bylo od zavádění těchto metod upuštěno, a to nejen ve šlechtitelském chovu kapra v Čechách, ale i v ostatních zemích.
- V 80. letech začalo studium **gynogeneze** a uplatnění gynogenetických ryb a **monosexních obsádek** ve šlechtitelském programu kapra (Linhart, 1989a,b; Linhart a kol., 1989).
- V 90. letech 20. stol. byl do testů užítkovosti a dědičnosti vnesen **systém matematických modelů** na úrovni dialelního křížení (Gela, 1994) a **vrcholového křížení** s kontrolou dědičnosti otců podle užítkovosti potomstva.
- Od r. 1993 byl zahájen **monitoring genetické struktury populací a plemen kapra** v genofondu VÚRH (od r. 1993–4) a v hlavních produkčních chovech v ČR (1994–2001).
- Od roku 1994 bylo přistoupeno k **individuálnímu značkování generačních kaprů mikročipovými značkami** (tzv. „P.I.T. tags“) a počítačové evidenci (databázi).
- V letech 1995–6 vznikl **Národní program uchování a využití genetických zdrojů hospodářských a užítkových zvířat**. To umožnilo poskytovat chovatelům dotace na živé genové banky autochtonních plemen kapra.

- Od r. 1997–8 je vytvářena **banka zamraženého spermatu** kapra ve VÚRH, nyní FROV JU ve Vodňanech.
- V r. 2001 byl přijat **zákon č. 154/2000 Sb.** o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon).

8.2. Evropská historická plemena kapra

První plemena vznikala z místních populací (krajových rázů) adaptovaných na místní podmínky. Většinou vznikla z méně než 10 generačních ryb a byla tedy vysoce inbrední. Rychle se u nich fixovaly dědičné vady (např. chondrodystrofie). Na přelomu 19. a 20. století byla hlavní plemena standardizována podle tvaru těla a ošupení (Hofer-Walterovo třídění, 90. léta 19. století). Kritériem tvaru těla byl „tělový poměr (*Körperverhältnis*)“ jako poměr výšky těla k délce těla (Hofer, 1898a–g). Rozlišována byla plemena vysokohřbetá (1 : 2 až 1 : 2,5) a širokohřbetá (1 : 2,6 a více).

Aischgrundský lysec (*Aischgrunder Karpfen*)

Byl vyšlechtěn v Bavorsku před více než 300 lety (obr. 8.4.C.). Vysokohřbetý (1 : 2). Dědičná chondrodystrofie (porucha páteře). Podílel se jako kříženec s Franckým kaprem nebo Haličským kaprem na vzniku některých německých a jugoslávských plemen. Geny Aischgrundského kapra obsahují syntetické linie C 434 a C 435, dále též izraelský lysec Dor 70. Aischgrundský lysec byl ve 20. letech 20. století dovezen do Japonska a podílel se na vzniku lysých fenotypů kapra koi (označovaných dodnes *Doitsu* japonským výrazem pro adjektivum „německý“, které se zde stalo synonymem pro lysce). Jako čisté plemeno vymizel okolo roku 1956 (Steffens, 1980). Bavorský zemský ústav pro rybářství se zasloužil o obnovu chovu pod tímž názvem v rybníkářské oblasti kolem řeky Aisch (M. Oberle, os. sděl.). Nejedná se však o plemeno, nýbrž o chráněné zeměpisné označení (CHZO) „Aischgrundský kapr“ podle evropské legislativy.

Haličský kapr (*Galizier Karpfen*)

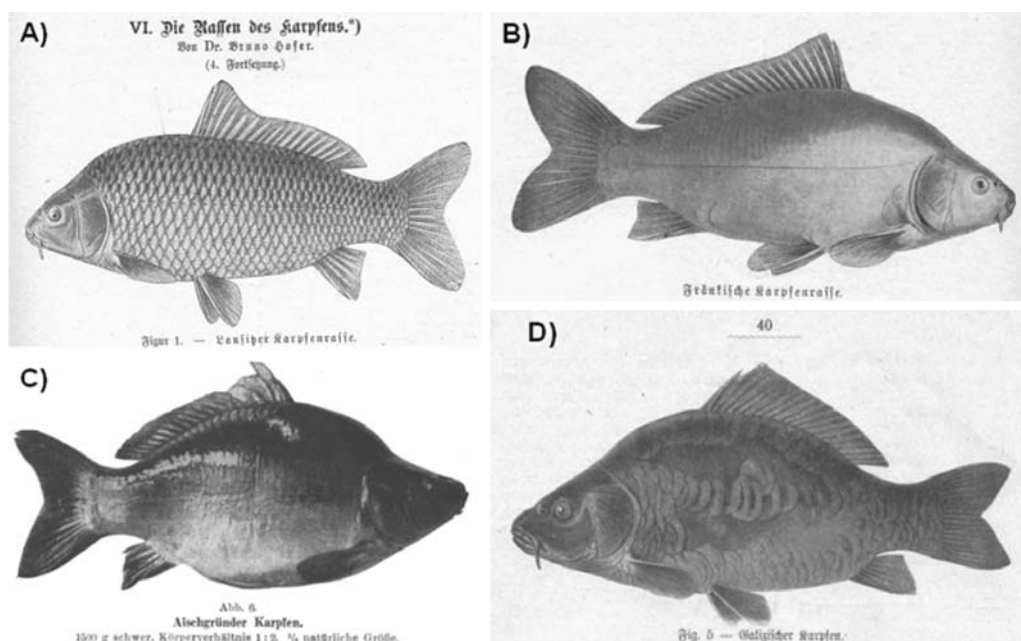
Byl vyšlechtěn před r. 1880 chovatelem A. Gaschem v historické oblasti Haliče (dnes jihovýchodní Polsko a západní Ukrajina), v r. 1880 byl jako plemeno představen na zemědělské výstavě v Berlíně, kde vyhrál zlatou medaili. Vyznačoval se vysokou růstovou schopností a tělovým poměrem 1 : 2,5 (obr. 8.4.D.). Byl křížen s mnoha krajovými rázy, jako čisté plemeno vymizel během obou světových válek, zbylé populace byly překříženy. Ve 30. letech 20. století jej prof. Kirpičnikov použil ke křížení s Amurským sazanem jako základu k vytvoření Ropšinského kapra. Geny Haličského kapra též obsahuje Ukrajinský kapr (Nivka). Adolf (podle některých pramenů Adam) Gasch a jeho Haličský kapr mají v polském Kaniowě pomník.

Lužický kapr (*Lausitzer Karpfen*)

Byl chován v oblasti pruské a saské Lužice v Německu. Byl šedé barvy, protáhlého tvaru těla (tělový poměr 1 : 2,5–1 : 2,7). Měl dobrou růstovou schopnost, jako čisté plemeno vymizel (obr. 8.4.A.).

Francký kapr (*Fränkisch nebo Schwarzenfelder Karpfen*)

Hladký kapr s malou hlavou, s tělovým poměrem 1 : 2,65 (obr. 8.4.B.). Byl chován v oblasti Frank a Durynska v Německu. Jako čisté plemeno vymizel.



Obr. 8.4. Historická plemena kapra: Lužický (A), Francký (B), Aischgrundský (C) a Haličský (D). Podle Hofera (1898a–g) a Hofmanna (1927).

Česká a moravská historická plemena kapra

Ve 30. letech 20. století popsala škola prof. Kříženeckého v chovech na území dnešní ČR celkem 9 šupinatých a 12 lysých a hladkých populací kapra.

V 50. letech 20. století zpráva o první inventarizaci kapra na závodech Státního rybářství zmínila celkem 17 šupinatých, 11 lysých a 7 hladkých populací v chovech.

Další inventarizace v chovech členů Rybářského sdružení ČR, která proběhla v letech 1997–2000 pro podchycení čistých plemen pro program genetických zdrojů, konstatovala 3 šupinatá a 7 lysých plemen lokálního původu. Řada místních plemen vymizela, byla překřížena nebo vyřazena z chovu během 50.–60. let 20. století, plemena kapra hladkého fenotypu byla záměrně vyřazena kvůli letálním účinkům alely N (viz kap. 4.2.2.).

Většinu významných historických plemen detailně popsali Pokorný a kol. (1995), zde proto jen stručně shrneme jejich výčet:

- **Třeboňský kapr šupinatý** – původní třeboňský kapr vyšlechtěný J. Šustou koncem 19. století. Za 2. světové války pomíchán s dováženým plůdkem, později přesuny násad na Státním rybářství, o.p., a od poloviny 80. let 20. století hybridizace s Ropšínským kaprem.
- **Třeboňský lysec** – plemenný chov založen 1882, vymizel.
- **Telčský modrák šupinatý** zanikl ve 40. letech 20. století.
- **Milevský šupinatý kapr**

- **Chlumský šupinatý kapr**
- **Lnářský modrák**, lysec vznikl již koncem 19. století, jako plemeno veřejně představen na zemědělské výstavě v Praze 1921.
- **Hlubocký lysec**
- **Žďárský lysec**
- **Valtický lysec**
- **Pohořelický šedák, lysec**
- **Náměšťský lysec**
- **Borský hladký kapr**
- **Mšecký hladký kapr**

8.3. Současná plemena kapra chovaná v ČR

Přehled plemen kapra s jejich biologickými a užitkovými charakteristikami recentně zpracovali Kocour a kol. (2008) a jejich využití v podmínkách českého, moravského a slezského rybářství ve šlechtitelském programu k produkci tržních ryb čistokrevnou plemenitbou, selekcí a hybridizací popsali v jednotlivých metodikách FROV JU Gela a kol. (2009) a Kocour a kol. (2010, 2011).

Současná plemena kapra v českých a moravských chovech můžeme rozdělit na:

- genetické zdroje (původní plemena) a
- šlechtitelské rezervy (plemena importovaná a novošlechtěná).

Mezi **genetické zdroje kapra** patří:

Žďárský lysec (Žď-L)

Jeho morfologickou a užitkovou charakteristiku uvádí Pokorný a kol. (1995). Jde o plemeno konstitučně tvrdší, dosahuje dobrých produkčních výsledků ve vyšší nadmořské výšce, vyšší přežití plůdku při zachování požadované intenzity růstu a žádoucího exteriéru. Jako genetický zdroj se udržuje čistokrevnou plemenitbou, pro užitkový chov F_1 hybridů se kříží se Severským lyscem M72.

Žďárský šupináč (Žď-Š)

Jeho morfologickou a užitkovou charakteristiku uvádí Pokorný a kol. (1995). Pochází z místního žďárského šupináče, kde byla prováděna mnoholetá pozitivní selekce na přírůstek hmotnosti, přežití a exteriér, evidence o selekci generačních kaprů (Kg) je vedena od roku 1975. Cílem bylo zvýšit přirozenou odolnost žďárského šupinatého kapra chovaného ve vyšších nadmořských výškách a zlepšit růstové vlastnosti. Jako genetický zdroj se udržuje čistokrevnou plemenitbou, pro užitkový chov F_1 hybridů se kříží s Ropšinským kaprem. Hybrid se podílí 70 % na produkci kapra v oblasti Vysočiny kolem Žďáru nad Sázavou.

***Jihočeský kapr šupinatý* (C 73)**

Selekce a prověření genotypu ošupení bylo provedeno ve VÚRH Vodňany koncem 60. let. Podkladem ke vzniku plemene byl šupinatý kapr chovaný v oblasti jižních Čech. Jeho morfologickou a užitkovou charakteristiku uvádí Pokorný a kol. (1995). Vhodný do standardních chovatelských podmínek. Jako genetický zdroj se udržuje čistokrevnou plemenitbou. Používá se k hybridizaci v testech užitkovosti.

***Mariánskolázeňský kapr šupinatý* (ML)**

Vznikl selekcí s cílem upevnit dobré užitkové a exteriérové vlastnosti samostatného plemene a současně je využít k hybridizaci. Jeho morfologickou a užitkovou charakteristiku uvádí Pokorný a kol. (1995). Testy v genotypu ošupení prošel na rybářství v Mariánských Lázních. Výchozí základnou byl šupinatý kapr rozšířený v západních Čechách. Prováděn dlouholetý pozitivní plemenný výběr. Plemeno dosahuje v běžných provozních podmínkách velmi vyrovnaných produkčních výsledků. I ve zhuštěných nasadách velmi dobrý zdravotní stav, ekonomická spotřeba krmiv, dobrá kondice a exteriér. Jako genetický zdroj se udržuje čistokrevnou plemenitbou, pro užitkový chov F_1 hybridů se kříží s Ropsinským kaprem.

***Milevský lysec* (MV)**

Jeho morfologickou a užitkovou charakteristiku uvádí Pokorný a kol. (1995). Významně odolný proti běžným onemocněním. Vyrovnaná, mírně nadprůměrná užitkovost, v současné době se uchovává pouze jako genetický zdroj čistokrevnou plemenitbou.

***Jihočeský lysec* (BV)**

Vznikl z populací vodňanského a blatenského lysce, křížením a po dlouholeté řízené selekci v 60.–70. letech 20. století. Cílem bylo získat kapra o vyrovnaných užitkových vlastnostech, středním až vyšším tělesném rámci a s přiměřenou odolností, vhodného pro střední až vyšší intenzitu hospodaření. Předpokládala se i vhodnost k hybridizaci s dovezenými populacemi kapra lysce. Jeho morfologickou a užitkovou charakteristiku uvádí Pokorný a kol. (1995). Jde o osvědčeného lysce v normálních i silně zhuštěných obsadkách s velmi vyrovnaným přežitím i přírůstkem ve standardních podmínkách a se spolehlivou řízenou reprodukcí. V současné době se uchovává pouze jako genetický zdroj čistokrevnou plemenitbou.

***Telčský lysec* (TE)**

Pochází z oblasti bývalého Státního rybářství v Telči. Zde byl prováděn dlouholetý výběr kapra lysce podle provozních plemenářských směrnic Státního rybářství, o.p., již od 60. let 20. století. Cílem bylo ověřit užitkové vlastnosti a vhodnost do různorodých podmínek středních až vyšších geografických poloh. Jeho morfologickou a užitkovou charakteristiku uvádí Pokorný a kol. (1995). Jako genetický zdroj se udržuje čistokrevnou plemenitbou, používá se i pro užitkový chov.

***Syntetické linie* C434, C435**

Vyšlechtěny uplatněním direkcionální (řízené) selekce na šlechtitelské stanici VÚRH ve Vodňanech v období let 1982–1986. Výchozími populacemi byly místní lysec, importované linie z Maďarska a Aischgrundský lysec. Tento lysec již byl v evropských chovech překřížen a jako čisté plemeno je ho možno považovat za zmizelé (Flajšhans a Gall, 1995). Morfologickou a užitkovou charakteristiku obou linií uvádí Pokorný a kol. (1995). C434 a C435 vykázaly v kontrolách užitkovosti nadprůměrných výsledků. Předností je velmi dobrá vyrovnanost a exteriér včetně ošupení. V současné době se k produkci nepoužívají. Uchovávají se pouze jako genetický zdroj čistokrevnou plemenitbou především proto, že obsahují geny vymizelého Aischgrundského lysce.

Pohořelický lysce (PoL)

Plemeno vzniklo z místního lysce chovaného na jižní Moravě. Vyznačuje se výbornými růstovými schopnostmi, vitalitou, odolností, velmi dobrým osvalením (zmasilostí), vysokohřbetostí a malou hlavou. Jako genetický zdroj se udržuje čistokrevnou plemenitbou, používá se pro užitkový chov i k hybridizaci. Naproti tomu „Pohořelický kapr“ není plemeno, ale chráněné označení původu (CHOP) podle evropské legislativy od roku 2004.

Třeboňský šupináč (TŠ)

Od roku 1998 bylo snahou Rybářství Třeboň, Rybářství Nové Hradky a VÚRH JU ve Vodňanech ve spolupráci s Ústavem živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Liběchově restaurovat a stabilizovat populaci Třeboňského šupináče. Současná populace byla založena na výběru generačních ryb před érou hybridizace s Ropšinským kaprem, analýze genetické struktury populace, vyřazení hybridů a rozmnožení čistokrevných jedinců. Jako genetický zdroj se udržuje čistokrevnou plemenitbou, používá se i pro užitkový chov. Označení „Třeboňský kapr“ rovněž není název plemene, ale chráněné zeměpisné označení (CHZO) podle evropské legislativy od roku 2006.

Mezi **šlechtitelské rezervy kapra** patří tato importovaná plemena:

Amurský sazan (AS)

Plemeno bylo založeno z původní populace divokého říčního kapra z amurské oblasti na Dálném východě (původně označovaného jako *Cyprinus carpio haematopterus*, nyní *C. rubrofascus*). Amurský sazan byl do ČSSR importován z Ukrajiny v roce 1983 pro výzkumné účely a porovnání užitkových vlastností s jinými populacemi kaprů. Jeho morfologickou a užitkovou charakteristiku uvádí Pokorný a kol. (1995): růstová schopnost v plůdku a násadě je podobná českým plemenům, od 3. roku zaostává v růstu. Vyznačuje se vysokou nespecifickou odolností. Dobré přežití plůdku. Odolný vůči jarní virémii kapra (SVC) a vůči koi herpesviróze (KHV).

Amurský sazan je geneticky nejvzdálenější od evropských kaprů a používá se jako referenční standard pro stanovení genetické vzdálenosti plemen a populací. Od jeho genetické vzdálenosti vůči evropským kaprům je odvozen heterozní efekt kříženců.

Ve 30. letech 20. století byl AS použit prof. Kirpičnikovem ke křížení s Haličským kaprem jako podklad vzniku plemene Ropšinského kapra (Kirpichnikov, 1981; Pokorný a kol., 1995).

V 90. letech 20. století byly dávky zamraženého spermatu AS (a později též plůdek) z VÚRH JU ve Vodňanech použity v Izraeli s úspěchem pro výzkum odolnosti hybridů plemen Dor 70 × AS a Našice × AS vůči KHV.

V letech 1999–2004 byla ve VÚRH JU ve Vodňanech s použitím AS vyšlechtěna nová linie Amurského lysce (AL). V současné době se jedná o uznání AL jako samostatného plemene v uznávacím řízení.

Ropšinský kapr šupinatý (ROP)

Plemeno ROP bylo vyšlechtěno ve 30. letech 20. století v tehdejší SSSR prof. Kirpičnikovem. Základem pro tvorbu kapra ROP byl amurský sazan a kapr haličský. Ve své domovině je ROP chován v severských oblastech (např. okolí Petrohradu) v liniovém chovu. K nám byl importován především k účelům hybridizace. Jeho morfologickou a užitkovou charakteristiku uvádí Pokorný a kol. (1995): nejnápadnější užitkovou vlastností je vysoká vitalita. Přežití v I. roce života představuje tři až pětinašobek v porovnání s domácími šupinatými liniemi. Ryby jsou odolné vůči nepříznivým podmínkám přezimování. Růst je podle testů užitkovosti v 1. a 2. roce vyhovující, od 3. roku však výrazně zaostává (o 25–35 %). Dobře snáší nepříznivé podmínky přezimování a je méně vnímavý stresům při manipulaci. Byla u něj také potvrzena vyšší nespecifická odolnost vůči bakteriálním a virovým onemocněním.

Plemeno ROP je jedním z nejdůležitějších plemen kapra v současném hybridizačním programu. Používá se k tvorbě F_1 užitkových hybridů např. s plemeny Žd-Š, ML, TAT a C73.

Odolnost Ropšínského kapra byla důvodem vzniku polyhybridního Severského lysce M72, s cílem zvýšit odolnost a přežití plůdku u lysce vnesením genů ROP do genomu lysce.

Využití ROP k hybridizaci jednoznačně přispělo ke zvýšení produkce akvakultury kapra, na druhé straně s sebou přineslo i určitá negativa: křížení s ROP bylo často prováděno empiricky a F_1 užitkoví kříženci byli místo výlučně tržní produkce často používáni k dalšímu chovu. Tím docházelo ke kontaminaci čistých plemenných chovů (např. TŠ, ML) geny ROP. Od roku 1992 se provádí vyřazování hybridů z chovů po genetických analýzách, což je časově i finančně náročné.

Maďarský lysec (M2)

Byl importován do ČSSR v roce 1972 z Maďarska, z rybářského výzkumného ústavu HAKI v Szarvasi do VÚRH Vodňany v rámci výměny genofundu kapra s cílem ověření a vzájemného porovnání užitkovosti lysců v obou ústavech. Již koncem 70. let 20. století bylo plemeno M2 rozšířeno na naše rybníkářství. Jeho morfologickou a užitkovou charakteristiku uvádí Pokorný a kol. (1995): M2 poskytuje standardní produkční výsledky v nižších polohách a ve všech typech obsádek (normálních až silně zhuštěných). Řízená reprodukce je spolehlivá. Dobře využívá předkládaná krmiva. V současné době se jedná o nejrozsířenější plemeno lysce s plemenářskou evidencí více než 5 000 generačních a remontních ryb v ČR. V užitkovém chovu jsou používáni čistokrevní jedinci, M2 je též používáno k hybridizaci a produkci užitkových F_1 hybridů především s plemeny Dor 70, M72. Hybrid $M2 \times M72$ je používán jako kontrolní linie v testech užitkovosti šupinatých kaprů.

Tatajský kapr šupinatý (TAT)

Plemeno TAT na podkladě kapra z oblasti Tata v západním Maďarsku je jedním z nejstarších maďarských šupinatých plemen kapra. Bylo importováno do ČSSR z Maďarska v roce 1982 a 1983 jako K_0 k hybridizaci s jinými domácími a importovanými plemeny. Při odchovu plůdku vykazuje nižší procento přežití, dále až 6% výskyt tělesných abnormalit a náchylnost k zánětům plynového měchýře. Jeho morfologickou a užitkovou charakteristiku uvádí Pokorný a kol. (1995). Plemeno se v současné době používá především k hybridizaci, přenáší na F_1 hybridy vyšší rámec těla. Hybrid $ROP \times TAT$ je používán jako kontrolní linie v testech užitkovosti lysců.

Izraelský lysec Dor 70 (Dor 70)

Vznikl v Izraeli na výzkumné stanici pro akvakulturu v Doru (Wohlfarth a kol., 1980) jako výsledek dvoucestného selekčního pokusu v letech 1965–1970. Výchozí populace vznikla z 5 rodinných linií. Inbrední depresi bylo zamezeno velkým počtem ryb a křížením mezi skupinami uvnitř selektovaných linií. Nejlepší linie byla nazvána Dor 70. Inbreeding uvnitř Dor 70 redukuje růstovou schopnost, vznikají kosterní malformace.

Linie Dor 70 prokázala vynikající heterózní efekt při křížení s plemenem Našice a jihovýchodoasijskými kapry. Byla exportována do Hongkongu, Brazílie, Panamy, Jihoafrické republiky. Do ČR byla importována jako rychlený plůdek (K_1) v roce 1995. Používá se v hybridizačním programu k produkci užitkových F_1 hybridů.

Další plemena kapra, která byla do ČR dovezena a která zmiňuje Pokorný a kol. (1995), mají dnes již jen okrajový nebo místní význam. Patří mezi ně:

- ***Maďarský kapr šupinatý (M4)***
- ***Szarvašský šupinač (P3)***, mateřská linie k produkci šupinatého heterozygota P31

- **Maďarský lysec** (15), otcovská linie k produkci šupinatého heterozygota P31 a lysého hybridu 215
- **Maďarský lysec** (2), mateřská linie k produkci hybridu 215
- **Ukrajinský kapr šupinatý** (Nivka)
- **Ukrajinský lysec**

Mezi **novošlechtěná plemena kapra** patří:

Severský lysec (M 72)

Vznikl ve VÚRH Vodňany na šlechtitelské stanici v letech 1987–1992 (Pokorný a kol., 1995) křížením parentální generace ML × ROP, křížením F_1 šupinatých hybridů s M2 za vzniku F_2 šupinatých heterozygotů, křížením F_2 šupinatých heterozygotů mezi sebou a selekcí vyštěpeného lysého potomstva. Cílem bylo vnést geny ROP do genomu lysce a vyšlechtit lysce s vysokou vitalitou plůdku a nespécifickou odolností. V současné době je pro tyto své vlastnosti M 72 druhým nejrozšířenějším plemenem lysce, plemenářská evidence zaznamenává více než 4 500 generačních a remontních ryb v ČR. Severský lysec M 72 je používán k hybridizaci a produkci užitkových F_1 hybridů především s plemenem Dor 70, M2, PoL.

Syntetická linie maďarských lysců (HSM)

Vznikla ve VÚRH JU Vodňany na šlechtitelské stanici v letech 1997–2001 křížením populací maďarských lysců s nízkou vzájemnou genetickou vzdáleností na základě vyšetření polymorfních proteinových systémů. Používá se k produkci užitkových F_1 hybridů s plemenem M 72.

Amurský lysec (AL)

Vznikl ve VÚRH JU Vodňany na šlechtitelské stanici v letech 1996–2003 na základě křížení Amurského sazana s matkami syntetické linie maďarských lysců (HSM), křížením F_1 šupinatých heterozygotů (HSM × AS) mezi sebou a vyštěpením lysců v F_2 (viz kapitola 9). Novošlechtěné plemeno vykazuje až 73% přežití v testu odolnosti vůči koi herpesviróze a v současné době je pro něj vedeno uznávací řízení nového plemene a zavedení plemenářské evidence.

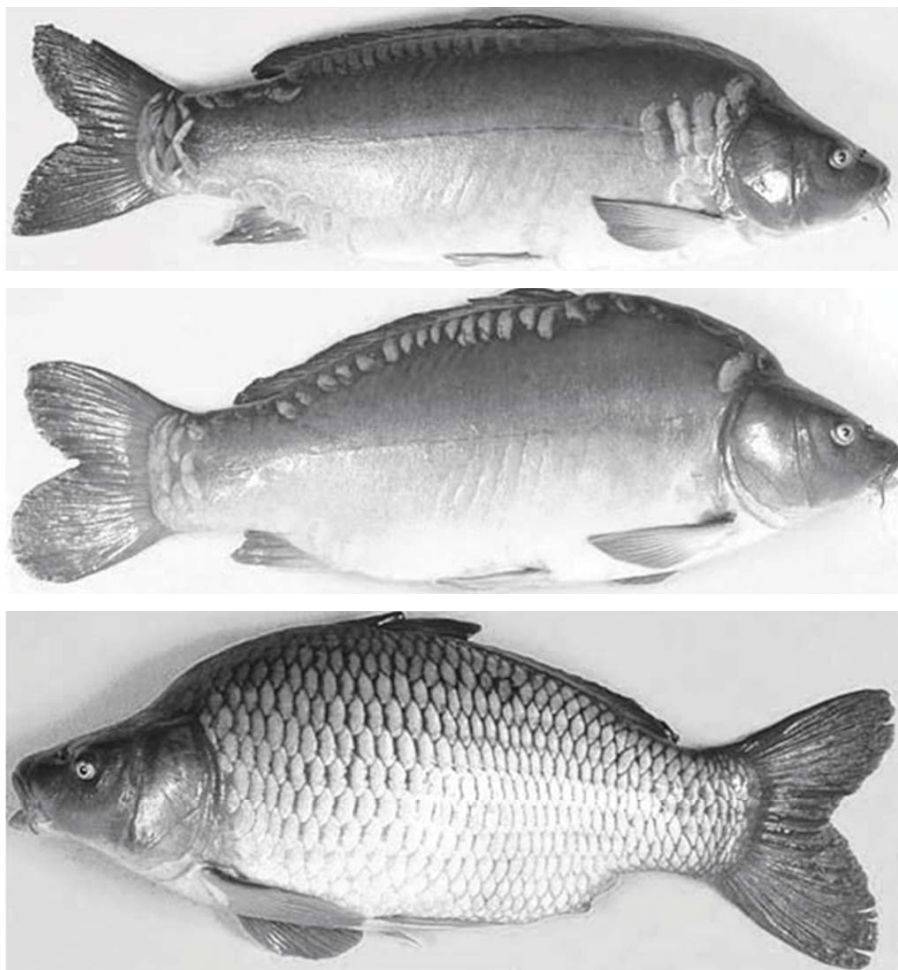
8.4. Další evropská a světová plemena kapra

Kromě již zmíněné snahy o obnovení Aischgrundského lysce jsou současné chovy kapra v **Německu** většinou založeny na místních, lokálně využívaných a reprodukováných populacích (K. Kohlmann, W. Steffens, úst. sděl.). Kohlmann a kol. (2003) uvádějí celkem 11 chovů kapra, rozlišovaných místními názvy.

V **Maďarsku** je známo 17 plemen a hybridních linií kapra, udržovaných živou genovou bankou Výzkumného ústavu pro rybářství a zavlažování HAKI v Szarvasi, nejznámější z nich jsou patrně lysá plemena Bikal, Palkonya, Dinnyés (na základě křížení s chorvatským plemenem Našice), Sumony (odvozené od Aischgrundského lysce), Szarvašský lysec a šupinaté plemeno Tata (Tatajský kapr).

Chorvatské plemeno lysce Našice (Nasić; obr. 8.5.) bylo vyšlechtěno na stejnojmenné farmě, experimentálním zařízení zářebské univerzity. Plemeno Našice bylo využito v hybridizačních programech v Maďarsku a v Izraeli.

Ze **Srbska** pocházejí šupinaté a lysé plemeno kapra Poljana (obr. 8.5.), která vznikla na stejnojmenné rybí farmě.



Obr. 8.5. Shora dolů: srbský lysec Poljana, chorvatský lysec Našice a rumunský šupináč Fresinet. Upraveno, podle FAO, www.fao.org

V **Polsku** je chován Polský řádkový lysec a šupinatý kapr Starzawski na pokusné rybářské stanici v Zatoru patřící Ústavu vnitrozemského rybářství v Olsztyně, Polský lysec a dalších 17 plemen a linií v živé genové bance Ústavu ichtyobiologie a akvakultury Polské akademie věd v Golyszi. Naproti tomu kapr lysého fenotypu „Zatorski“ chovaný na jihu Polska není plemeno, ale chráněné označení původu (CHOP) podle evropské legislativy.

Z **Rumunska** je známé šupinaté plemeno Fresinet (obr. 8.5.), vyšlechtěné na Výzkumné stanici chovu ryb v Nucetu.

V **Rusku** jsou chována šupinatá plemena Ropšinského, Parského, Čuvašského, Angelinského, Stavropolského a Čerepetského kapra a lysá plemena Altajského, Angelinského a Čerepetského kapra (Bogeruk, 2004).

Ve **Francii** jsou chována plemena Brenne, Dombes a Forez (Vandeputte os. sděl., 2002).

V **Izraeli** jsou chována plemena lysého fenotypu Našice a Dor 70 k produkci F_1 tržního hybrida Našice $\times$ Dor 70.

V asijských plemenech kapra je poměrně obtížné se vyznat. Různí autoři je udávají podle původu nebo podle barevného fenotypu, přičemž není jisté, zda spolu oba typy pojmenování souvisejí nebo se dokonce nepřekrývají jako je tomu např. v případě čínského kapra červeného zbarvení a šupinatého fenotypu, který bývá označován jako „Skleněný červený kapr“ (*Glass red common carp*), „Červený kapr Hebao“ (*Hebao red carp*) nebo také jako „kapr obecný var. Wuyuanensis“.

Ve **Vietnamu** bylo popsáno osm místních plemen lišících se svou morfologií, barvou, rozšířením a biologickými charakteristikami (Tran, 1983): pro akvakulturu nejvýznamnější bílý kapr, dále kapr Bac Kan fenotypu divokého kapra, vysokohřbetý kapr, kapr Ho Tay, kapr jižní Hai Van, červený kapr, fialový kapr a kapr s redukováným šupinovým pokryvem. Dále byla importována některá indonéská plemena a rovněž některá maďarská plemena k hybridizaci, ke zlepšení růstu místních plemen.

V **Číně** je chována řada plemen zmiňovaných různými autory podle místa původu (Xingguonensis, Wananensis, Wuyuanensis; Thai a kol., 2006) nebo podle barevného fenotypu (červený kapr, bílý kapr (podle www.fao.org); barevný kapr (Thai a kol., 2006)). Rovněž je zde chováno plemeno šupinatého fenotypu označované jako „Velké břicho“ („*Big Belly*“ podle nápadně zvětšené ventrální partie) nebo také jako plemeno hongkongské (Wohlfarth a kol., 1983).

V **Indonézii**, na západní Jávě jsou chována plemena šupinatého fenotypu vyššího a středního tělesného rámce Majalaya, Sinyonya, Wildan, plemeno Rajadanu fenotypově blízké divokému kapru a dvě plemena zlatého zbarvení, Cangkringan a Sutisna (Jhingran a Pullin, 1988; Thai a kol., 2004).

8.5. Lín obecný, *Tinca tinca* L.

Původ a domestikace lína

Lín obecný je původním eurosibiřským druhem. Od středověku je lín využíván jako doplňkový druh v rybníkářství. Byl introdukován do Austrálie, na Nový Zéland, do Afriky, Severní Ameriky a jihovýchodní Asie (Steffens, 1995). V roce 1995 byl dovezen z ČR do Izraele a v letech 2000–2002 do Číny. Zejména v Číně je výzkumu a chovu lína v současné době věnována velká pozornost.

Domestikace druhu je zcela recentní proces. Evropské země nebo jejich kraje a oblasti, kde byla chovu a plemenitbě lína věnována zvýšená pozornost, můžeme označit jako domestikáčnická centra:

- Čechy a Morava
- Německo (Bavorsko, Sasko)
- Polsko
- Španělsko (Extremadura – oblast při hranici s Portugalskem)
- Itálie (Piemont – oblast kolem Turína)
- Francie (Dombes – oblast u Lyonu, Alsasko)

Ačkoli jsou geograficky oddělené, tradiční chovy ve Španělsku a Itálii byly založeny v podobných podmínkách a vykazují řadu společných rysů: chovány jsou původní populace lína (s dotací EU na podporu typických regionálních produktů), plůdek je odlovován



Obr. 8.6. Tradiční oslava ukončení výlovu lína v Cáceres (Španělsko), 1994.

z nádrží po přirozeném nebo poloumělém výtěru, ryby jsou chovány do tržní hmotnosti 100–120 g v nádržích na zemědělské půdě, které současně slouží jako napajedla pro dobytek a pro zavlažování plodin. Koncem léta nebo začátkem podzimu klesne vlivem spotřeby hladina vody v nádržích, ryby zde nelze dále chovat, v regionu proběhnou v krátké době výlovy spojené s oslavou a přípravou tradičních pokrmů z lína (obr. 8.6.). Piemontský vysokohřbetý lín zlatavého zbarvení z oblasti Poirino „*Tinca gobba dorata del Pianalto di Poirino*“ nese chráněné označení původu (CHOP) podle evropské legislativy.

Postup plemenářské práce u lína v ČR

Jednotlivé populace lína obecného (české a moravské místní populace a populace importované z Maďarska a Rumunska) byly shromážděny ve VÚRH Vodňany, počínaje rokem 1979 (Kvasnička a kol., 1993).

Výběrem byly založeny liniové chovy. Ke zvýšení homozygotnosti výchozích linií bylo použito blízké příbuzenské plemenitby a meiotické gynogeneze. K testaci užitkovosti bylo použito dialelního křížení a metody společného odchovu "*multiple nursing*". Recesivního založení zlaté a modré populace se využívá jako márkru i jako kontrolních linií v testech užitkovosti.

Ve výrobních rybářských podnicích se však dosud často chová lín z přirozeného výtěru v rybnících nebo z umělého výtěru vlastních, většinou blíže geneticky nespecifikovaných obsádek.

V ČR jsou chována tato plemena lína (Linhart a Flajšhans, 1996; Gela a kol., 2006):

Genetické zdroje:

- Vodňanský – V
- Hlubocký – H
- Tábořský – T
- Mariánskolázeňský – ML
- Velkomeziříčský – VM
- Kož. 92
- Modrý – MO

Šlechtitelské rezervy:

- Zlatý – ZL
- Maďarský – M
- Rumunský – R
- Koenigswartha – K (Německo)

Okrasné zbarvení modrého a zlatého lína je podmíněno recesivními alelami genů *B* (Blue, modrý) a *G* (Golden, zlatý), které nejsou vázány na pohlaví (Kvasnička a kol., 1998).

Genetická struktura plemen a populací lína byla prověřena analýzou polymorfních proteinových systémů (alozymů; Šlechtová a kol., 1995) a mikrosatelitními markery (Kohlmann a kol., 2007).

První srovnávací testy užitkovosti plemen a hybridů lína v rybnících prováděné v České republice ukazují, že i mezi hybridy a plemeny mohou existovat významné rozdíly v jejich růstu, přežití i výtěžnosti. Testy užitkovosti lína obecného s využitím kontrolní skupiny začaly teprve v roce 2000 a díky problémům v jednotlivých testech s odchovem kontrolní zlaté skupiny, skupinovým značením ryb či nepříznivými klimatickými vlivy (povodně), je ještě předčasné hovořit o nějakých závěrech. Prvotní výsledky překvapivě ukázaly, že místní Vodňanské plemeno vykazovalo v tržní velikosti až o 45 % nižší růst oproti plemeni německému (Koenigswartha) a mezi plemeny byly zjištěny větší rozdíly v užitkovosti než mezi hybridy z vrcholového křížení.

Srovnávací test užitkovosti českých a německých populací lína v podmínkách intenzivního halového odchovu ukázal opačné výsledky – vyšší rychlost růstu a příznivější konverzi krmiv českých plemen (Rennert a kol., 2003), i vyšší kvalitu jejich masa (vyšší výtěžnost a sušinu filetu, vaznost masa; Wedekind a kol., 2003).

U lína obecného byly rovněž testovány možnosti zvýšení užitkovosti **mezidruhovou hybridizací** se samci tolstolobce pestrého, tolstolobika bílého a karase obecného. Výsledkem však byla většinou nízká

oplozenost jiker, vysoká embryonální mortalita a velké množství malformovaného plůdku. Křížení samice lína se samcem kapra obecného vedlo k 100% mortalitě embryí. Reciproké křížení (**samice kapra a samec lína**) sice rovněž vedlo k nižší oplozenosti jiker a líhnivosti, ale bylo získáno životaschopné potomstvo kaprolína (obr. 8.7.). Jeho růstová schopnost však nebyla vysoká.



Obr. 8.7. Kaprolín: mezidruhový F_1 hybrid kapra obecného (♀) a lína obecného (♂). Z archivu P. Kvasničky.

8.6. Pstruh duhový, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (1792)

Původ a domestikace pstruha duhového

Pstruh duhový je původním druhem vod pobřeží Tichého oceánu a povodí řek na západním pobřeží Severní Ameriky od Aljašky po Mexiko a v Asii v povodí řek Kamčatky a v Ochotském moři. Tvoří tažnou (*steelhead*), netažnou a jezerní formu.

V Severní Americe byl pod názvem *Salmo gairdnerii* (*irideus*) Richardson 1836 řazen do rodu *Salmo* spolu se skupinou blíže příbuzných endemických pstruhů (skupinou poddruhů *S. clarki*, druhy *S. aguabonita*, *S. gilae*, *S. apache*, *S. sp.* „redband“ aj.). Na opačné straně Tichého oceánu byly původně rozlišovány druhy *Salmo mykiss* a *S. penshinensis*, později zjištěné jako tažná a netažná forma 1 druhu, který byl podle názvoslovné priority označen jako *Salmo mykiss* Walbaum (1792). Američtí autoři Smith a Stearley v osmdesátých letech popsali příbuznost mezi tichomořskými lososy r. *Oncorhynchus* a pstruhem duhovým, proto došlo k názvoslovné reklasifikaci na *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (1792).

Pstruh duhový je od roku 1874 uměle reprodukován (Behnke, 1990) a byl introdukován na všechny kontinenty s výjimkou Antarktidy.

Introdukce na území dnešní ČR

V roce 1880 byl pstruh duhový dovezen do Německa, roku 1888 do Čech. Ryby z prvního dovozu byly překříženy dalšími dovozy z USA, později i z Dánska. Stavby v chovech byly za 2. světové války značně redukovány a novým základem chovu se staly dovozy z Dánska v letech 1946–48 (Baruš a kol., 1995). Pozdější populace byly dováženy opět z USA, Dánska, Polska, Francie, Bulharska. Byly k nám dováženy tažné i netažné formy.

Z celkem 15 populací pstruha duhového byla šlechtitelská práce v ČR intenzivně prováděna u čtyř, z nichž byly založeny liniové chovy. Označení „linie“ bylo do roku 2000 užíváno záměrně, protože legislativa předcházející plemenářskému zákonu č. 154/2000 Sb. neumožňovala používat u ryb pojmu „plemena“. Tyto chovy tvoří majoritu české produkce pstruha duhového:

Pstruh duhový místní forma (Pd M)

Populace pochází z prvních poválečných dovozů z let 1946–7 (Flajšhans a kol., 1993), v dnešní době se jedná o plemeno po 25 letech selekce na užitkové a reprodukční vlastnosti plně adaptované na místní podmínky. Vyznačuje se jarním výtěrem a vyšší odolností proti stresovým faktorům.

Pstruh duhový dánský z roku 1966 (PdD 66; Kamloops)

Původně jezerní forma z jezera Kamloops na rozhraní Britské Kolumbie (Kanada) a státu Washington (USA). Podle označení populace stálá (nemigrující) forma pstruha duhového (Flajšhans a Ráb, 1990; Flajšhans a kol., 1993), která je v ČR dlouhodobě adaptovaná a vyšlechtěná na místní podmínky. Jedná se o pstruha s podzimním výtěrem, s vysokými užitkovými vlastnostmi, vysokým stupněm prošlechtění, velmi dobrou konverzí krmiva, méně odolného proti stresu (obr. 8.8.).

Pstruh duhový dánský z roku 1975 (PdD 75)

Jde o rychle rostoucí formu s raným jarním výtěrem, která je chována po celou dobu odděleně v čistokrevném chovu. Vytírá se již od 10. ledna, selekcí generačních ryb však byla posunuta doba výtěru na březen, což je vhodnější vzhledem k teplotním a klimatickým podmínkám českého pstruhařství. Inkubující se jikry vykazují zvýšenou odolnost vůči nižší teplotě vody. Provádí se pozitivní výběr již od stadia Pd1. Elektroforetickou analýzou polymorfních proteinů byla zjištěna čistota této populace v žichovickém chovu a také značná genetická odlišnost proti populacím Pd M, PdD 66. Bylo proto doporučeno chovat tuto populaci v čisté formě.

Všechna tato plemena jsou používána k produkci a u každého plemene je jeho chovný nukleus současně udržován též jako genetický zdroj pstruha duhového.



Obr. 8.8. Generační PdD 66 z chovu v Liběchově. Z archivu M. Flajšhanse, 1983.

Pstruh duhový Maroko (dovezený z Bulharska v roce 1988, PdB 88)

Jde o formu s jarním výtěrem.

Celosvětově je chována řada plemen, linií a populací pstruha duhového v 64 zemích (www.fao.org). Většinou jsou pojmenovány podle zakladatele (např. Donaldsonova linie), lokality původu (např. linie Shasta), země dovozu (např. Americká, Finská populace), specifika populace (např. „Redband“, „Palomino“, modrý pstruh, zlatý pstruh aj.) nebo lokálním kódem (linie A1, A3). Jejich úplný výčet je mimo možnosti této monografie.

8.7. Sumec velký, *Silurus glanis* L.

Původ a domestikace sumce velkého

Sumec velký je původním evropským druhem, původně byl rozšířen v horních částech povodí Labe a Rýna a ve vodách východní Evropy, patřících k úmoří Baltského, Černého a Kaspického moře.

Šlechtitelská práce u sumce velkého byla zahájena ve VÚRH Vodňany v roce 1993 u dvou populací: Vodňany (V) a Hodonín (H). Jedná se o populace z umělých chovů, původně založených z autochtonních ryb povodí Labe a povodí Moravy, resp. Dunaje. Obě populace jsou geneticky odlišné a jsou zahrnuty mezi genetické zdroje ryb. V ČR je rovněž chován albinotický sumec (obr. 8.9.) a zlatá (xantorická) forma.



Obr. 8.9. Albinotický sumec Su₁ z lihně Mydlovary, Rybníkářství Hluboká a.s. Z archivu M. Flajšhanse, 1996.

8.8. Plemenitba ostatních druhů ryb

Síh severní maréna (*Coregonus lavaretus maraena*)

Pochází z jezer v Pomořansku a Meklenbursku, odtud byl vysazen do dalších německých jezer, do Polska, Pobaltí, Josefem Šustou byl introdukovan v 80. letech 19. století z jezera Miedwie (Madüsee) na Třeboňsko.

Síh peled' (*Coregonus peled*)

Pochází z jezer a velkých řek Ruska mezi řekami Kolymou a Mezeň. Byl rozšířen do Švédska, Finska, Polska, Německa; od r. 1970 je též v Čechách.

Mezi oběma druhy byla na podnicích Státního rybářství, o.p., od roku 1971 prováděna mezidruhov^á hybridizace pro zvýšenou růstovou schopnost a kvalitu masa F₁ kříženců. Stav popsali např. Hochman a Peňáz (1986). Docházelo k neevidovanému náhodnému i záměrnému křížení dalších filiálních generací, tím ke ztrátě heterozního efektu, postupně ke ztrátě užitkovosti. U převážné většiny dnes chovaných populací v ČR se jedná o mezidruhov^ý hybrida síha marény a síha peledě n-té filiální generace. Tito mnohonásobní hybridy vykazují značnou morfologickou plasticitu.

V 80. a 90. letech byl prováděn genetický monitoring druhové čistoty síhů v českých a moravských chovech, populace čistého druhu síha marény a síha peledě byla nalezena pouze v jednom hospodářském chovu. V současné době je České rybářství v Mariánských Lázních jediným chovatelem obou čistých druhů v ČR a udržuje je v živé genové bance; oba čisté druhy síhů jsou zahrnuty do genetických zdrojů ryb.

Ještě ve druhé polovině 90. let 20. století se oba čisté druhy síhů volně vyskytovaly v několika vodárenských nádržích (Flajšhans a kol., 1996). Vlivem povodní v roce 1997 a dlouhodobým vlivem biomelioračních zásahů (vysazování dravců) však došlo ke značnému snížení jejich stavů.

Jeseteři

Historicky jsou na území ČR původní celkem tři druhy jeseterů: jeseter velký, *Acipenser sturio*, v povodí Labe; jeseter malý, *A. ruthenus*, a vyza velká, *Huso huso*, v povodí Dunaje.

Jeseter velký se celosvětově blíží k vyhynutí. Malé populace tohoto druhu jsou v Evropě chovány ve dvou institucích (v německém Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei v Berlíně a ve francouzském CEMAGREF v Toulouse). Současná reintrodukce do německých a polských řek v úmoří Baltického moře (Gessner a kol., 2007) je tak založena na jeseteru ostrorypém, *A. oxyrinchus*, na základě důkazů o jeho přirozené introgresi do baltických populací jesetera velkého ve středověku, během tzv. malé doby ledové (Tiedemann a kol., 2007).

Populace čistých druhů **jesetera malého** a **vyzy velké** jsou v ČR chovány v akvakultuře, individuálně označované, chráněné jako genetické zdroje a v případě jesetera malého pravidelně rozmnožované umělou reprodukcí. České populace vyzy velké v současné době ještě sestávají z pohlavně nedospělých a čerstvě dospívajících jedinců. Umělý chov v zajetí sice znamená domestikaci se všemi průvodními znaky, je to však v současné době nejlepší známý způsob, jak tyto druhy zachovat.

Na základě molekulárně genetických analýz probíhá i testování na forenzní molekulární markery používané pro potírání ilegálního obchodu s kaviárem (viz např. Wuertz a kol., 2007). Často byl také lacinější kaviár dostupnějších druhů uměle upravován a vydáván za dražší kaviár vyzy.

LITERATURA

- Balon, E.K., 1957. Vek a rásť neresového stáda dunajského kapra-sazana (*Cyprinus carpio* morpha *hungaricus* Heck.) z Malého Dunaja nad Kolárovom. Poľnohospodárstvo 4: 961–986.
- Balon, E.K., 1990. Epigenesis of an epigeneticist: the development of some alternative concepts on the early ontogeny and evolution of fishes. Guelph Ichthyology Reviews 1: 1–48.
- Balon, E.K., 1995. The common carp, *Cyprinus carpio*: its wild origin, domestication in aquaculture, and selection as colored nishikigoi. Guelph Ichthyology Reviews 3: 2–56.
- Balon, E.K., 2006. The oldest domesticated fishes, and the consequences of an epigenetic dichotomy in fish culture. Journal of Ichthyology And Aquatic Biology 11: 47–86.
- Balon, E.K., 2010. The life history and quality of wild common carp, *Cyprinus carpio*, in the Danube Delta, the main ancestor of its domesticated or feral forms now introduced through most of the world. In: Vykusová, B., Dvořáková, Z. (Eds), Sborník abstraktů, XII. Česká ichtyologická konference, 19.–20. 5. 2010, Vodňany, p. 9.
- Baruš, V., Oliva, O., 1995. Mihulovci – *Petromyzontes* a ryby – *Osteichthyes* (2). Academia, Praha, 698 s.
- Behnke, R., 1990. Livingston Stone, J.B. Campbell and the origins of hatchery rainbow trout. The American Fly Fisher 16: 3.
- Berg, L.S., 1948. Ryby presnych vod SSSR i dopredelnykh stran. Izdatelstvo Akademii nauk SSSR, Moskva, Russia, 466 pp.
- Bilio, M., 2007. Controlled reproduction and domestication in aquaculture – the current state of the art, Part I. Aquaculture Europe 32 (1): 5–14.
- Bilio, M., 2007. Controlled reproduction and domestication in aquaculture – the current state of the art, Part II. Aquaculture Europe 32 (3): 5–23.
- Bilio, M., 2008. Controlled reproduction and domestication in aquaculture – the current state of the art, Part III. Aquaculture Europe 33 (1): 5–19.
- Bilio, M., 2008. Controlled reproduction and domestication in aquaculture – the current state of the art, Part IV. Aquaculture Europe 33 (2): 12–24.
- Bogeruk, A.K., 2004. Plemena kapra (*Cyprinus carpio* L.). Ministerstvo zemědělství Ruské federace, Rosinformagrotech, Moskva, Russia, 400 s.
- Dubravius, J., 1547. De piscinis. Reedice 1953, Sborník filosofický, Československá akademie věd, 1: 11–75.
- Dunham, R.A., Majumdar, K., Hallerman, E., Bartley, D., Mair, G., Hulata, G., Liu, Zh., Pongthana, N., Bakos, J., Penman, D., Gupta, M., Rothlisberg, P., Hoerstgen-Schwark, G., 2001. Review of the status of aquaculture genetics. In: NACA (Bangkok)/FAO (Rome) – Technical Proceedings of the Conference “Aquaculture in the Third Millennium” in Bangkok, Thailand, 20–25 February 2000, 141–173.
- Flajšhans, M., Ráb, P., 1990. Chromosome study of *Oncorhynchus mykiss kamloops*. Aquaculture 89: 1–8.
- Flajšhans, M., Ráb, P., Kálal, L., 1993. Genetics of salmonids in Czechoslovakia: Current status of knowledge. In: Cloud, J., Thorgaard, G.H. (Eds), NATO-ASI Genetic Conservation of Salmonid Fishes, Moscow (Idaho) and Pullmann (Washington), USA, June 24–July 5, 1991, Plenum Publishing Corporation, New York, USA, pp. 231–242.
- Flajšhans, M., Gall, G.A.E., 1995. Genetics: Chairmen's Summary. In: Billard, R., Gall, G.A.E. (Eds), The Carp Symposium, Budapest, Hungary, September 6–8, 1993, Aquaculture 129: 136.
- Flajšhans, M., Křížek, J., Šlechtová, V., Šlechta, V., 1996. První pokusy o založení živé genové banky čistých druhů síhovitých ryb. In: Kozák, P., Hamáčková, J., (Eds), Sbor. ref. z II. české ichtyologické konference, VÚRH JU, Vodňany, 74–80.

- Flajšhans, M., Hulata, G., 2006. Common carp – *Cyprinus carpio*. In: Crosetti, D., Lapègue, S., Olesen, I., Svaasand, T. (Eds), Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations. GENIMPACT project: Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. A European network. WP1 workshop "Genetics of domestication, breeding and enhancement of performance of fish and shellfish", Viterbo, Italy, 12–17th June, 2006, p. 7. <http://genimpact.imr.no/>
- Gela, D., 1994. Dialelní křížení u kapra obecného. Diplomová práce, VŠZ Brno, 105 s.
- Gela, D., Flajšhans, M., Kocour, M., Rodina, M., Linhart, O., 2006. Tench (*Tinca tinca*) broodstock management in breeding station under conditions of pond culture: a review. *Aquaculture International* 14: 195–203.
- Gela, D., Kocour, M., Flajšhans, M., Rodina, M., Beránková, P., Linhart, O., 2009. Technologie řízení reprodukce kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 99, 43 s.
- Gessner, J., Arndt, G.-M., Ludwig, A., Kirschbaum, F., 2007. Remediation of Atlantic sturgeon in the Baltic Sea: Background, status, and perspectives. In: Munro, J. (Ed.), *Anadromous sturgeons: Habitats, threats and management*. American Fisheries Society Symposium 56: 301–317.
- Havelka, J., Volf, F., 1971. Záznam o změnách na plynovém měchýři kaprů v československém rybářství. *Bulletin VÚRH Vodňany* 7 (1): 3–8.
- Havelka, J., Reyerl, K., Volf, F., 1971. Rentgenové obrazy některých změn na skeletu ryb se zvláštním zřetelem k páteři. *Bulletin VÚRH Vodňany* 7 (2): 23–36.
- Hochman, L., Jirásek, J., 1969. Vztah užitkové hodnoty kapra k typu ošupení. In: Publikace zootechnického oboru AF VŠZ v Brně (rybářská specializace), s. 69–78.
- Hochman, L., Jirásek, J., 1979. Užitkové vlastnosti kapra šupinatého a lysého typu ošupení z podmínek Státního rybářství Telč. *Živočišná výroba* 24: 803–812.
- Hochman, L., Peňáz, M., 1986. O problémech hybridizace ryb na příkladu síhů. In: Kouřil, J., Berka, R. (Eds), *Reprodukce a genetika ryb*, Vodňany, Slovenská zoologická spoločnosť – Ichtyologická sekce, s. 36–40.
- Hofer, B., 1898a. Die Rassen der Karpfen. *Allgemeine Fischerei-Zeitung* 23 (3): 37–40.
- Hofer, B., 1898b. Die Rassen der Karpfen. *Allgemeine Fischerei-Zeitung* 23 (9): 153–156.
- Hofer, B., 1898c. Die Rassen der Karpfen. *Allgemeine Fischerei-Zeitung* 23 (10): 175–176.
- Hofer, B., 1898d. Die Rassen der Karpfen. *Allgemeine Fischerei-Zeitung* 23 (11): 187–188.
- Hofer, B., 1898e. Die Rassen der Karpfen. *Allgemeine Fischerei-Zeitung* 23 (12): 205–206.
- Hofer, B., 1898f. Die Rassen der Karpfen. *Allgemeine Fischerei-Zeitung* 23 (15): 257–259.
- Hofer, B., 1898g. Die Rassen der Karpfen. *Allgemeine Fischerei-Zeitung* 23 (16): 274–275.
- Hofmann, J., 1927. Die Aischgründer Karpfenrasse. *Zeitschrift für Fischerei u. deren Hilfswissenschaften* 25: 291–365.
- Hoffmann, R., 1995. Environmental change and the culture of common carp in medieval Europe. *Guelph Ichthyology Reviews* 3: 57–85.
- Chytra, F., 1953. Nové směry v plemenitbě ryb. *Za socialistické zemědělství* 3 (10): 1115–1118.
- Chytra, F., 1956. Základy plemenitby. In: *Kurs lid. ryb. patologů*, Jednota rybářů, Praha, s. 290–298.
- Chytra, F., Krupauer, V., Pícha, O., 1961. Růst dunajských kaprů v rybnících v prvních 3 letech života. In: *Práce ČSAZV, VÚR Vodňany*, 1: 73–91.
- Jakubec, V., 1986. Využití genetiky populací ve šlechtění u ryb. In: Kouřil, J., Berka, R. (Eds), *Reprodukce a genetika ryb*, Vodňany, Slovenská zoologická spoločnosť – Ichtyologická sekce, s. 9–15.
- Jakubec, V., 1990. Plans and methods of testing pure and hybrid fish populations. In: *Práce VÚRH Vodňany* 19: 3–13.

- Jhingran, V.G., Pullin, R.S.V., 1988. A hatchery manual for the common, Chinese and Indian major carps. ICLARM Study Reviews 11, 191 pp.
- Kálal, L., Smíšek, J., 1975. Využití sérových transferinů při šlechtění kapra. Živočišná výroba 20: 789–798.
- Kirpichnikov, V.S., 1981. Genetic bases of fish selection. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 410 pp.
- Kocour, M., Gela, D., Šlechtová, V., Kopecká, J., Šlechta, V., Rodina, M., Flajšhans, M., 2008. Carp breeds of the Czech Republic. In: Bogeruk, A.K. (Ed.), Catalogue of carp breeds (*Cyprinus carpio* L.) of the countries of the Central and Eastern Europe, Ministry of Agriculture of the Russian Federation, Moscow, Russia, pp. 13–46.
- Kocour, M., Flajšhans, M., Gela, D., Rodina, M., Hulák, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2010. Metodické postupy při aplikaci selekčního programu zaměřeného na zvyšování užitkovosti ryb v podmínkách českého rybářství. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 103, 86 s.
- Kocour, M., Flajšhans, M., Kašpar, V., Gela, D., Hulák, M., Rodina, M., Linhart, O., 2011. Metodické postupy při aplikaci hybridizačních programů u ryb v podmínkách českého rybářství. Edice Metodik FROV JU, Vodňany, č. 119, 53 s.
- Kohlmann, K., Kersten, P., 1999. Genetic variability of German and foreign common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. Aquaculture 173: 435–445.
- Kohlmann, K., Gross, R., Murakaeva, A., Kersten, P., 2003. Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers. Aquatic Living Resources 16: 421–431.
- Kohlmann, K., Kersten, P., Flajšhans, M., 2005. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. Aquaculture 247: 253–266.
- Kohlmann, K., Kersten, P., Flajšhans, M., 2007. Comparison of microsatellite variability in wild and cultured tench (*Tinca tinca*). Aquaculture 272 (S1): S147–S151.
- Kostomarov, B., 1947. Druh ošupení a jeho význam pro důležité hospodářské vlastnosti kaprů. Sborník Československé akademie zemědělské, 20 s.
- Kostomarov, B., 1955. Rozmnožování a plemenitba ryb. Práce Československé akademie věd, Praha, 158 s.
- Kottelat, M., 2001. Fishes of Laos. WHT Publications Ltd., Colombo 5, Sri Lanka, 198 pp.
- Krupauer, V., 1964. Popis – důležitý doplněk při výběru generačních kaprů. In: Práce VÚR Vodňany 4: 128–142.
- Krupauer, V., 1967. Péče o generační kapry. Inf. zprávy Státního rybářství. 3: 18–24.
- Krupauer, V., 1971. Význam stanovení výtěžnosti u ryb. Československý rybníkář. 3: 8–11.
- Krupauer, V., Chytrá, F., 1962. Rozdíly v růstu lisců řádkových a šupinatých kaprů. In: Práce VÚR Vodňany 2: 9–26.
- Kvasnička, P., Linhart, O., Flajšhans, M., 1993. Breeding programme for the tench (*Tinca tinca* L.). In: Gall, G.A.E., Chen, H. (Eds), Proc. IVth Int. Symp. in Aquaculture, Wuhan, China, April 29–May 3, 1991, Aquaculture 111: 303.
- Kvasnička, P., Flajšhans, M., Ráb, P., Linhart, O., 1998. Inheritance studies of blue and golden varieties of tench (Pisces: *Tinca tinca* L.). Journal of Heredity 89: 553–556.
- Linhart, O., 1989a. Using meiotic gynogenesis in carp, *Cyprinus carpio* L. to selection the negatively presenting genotypes and verifying the phenotype manifestation in locus S. Bulletin VÚRH Vodňany 25 (4): 3–7.
- Linhart, O., 1989b. Growth and survival of the gynogenetic fry of carp. Bulletin VÚRH Vodňany 25 (2): 3–9.

- Linhart, O., Flajšhans, M., 1996. Genetický výzkum kapra obecného, lína obecného, sumce velkého, ochrana genových zdrojů ryb a šlechtitelských rezerv v ČR. In: Flajšhans, M. (Ed.), Sborník vědeckých prací k 75. výročí založení VÚRH, VÚRH Vodňany, 22–33.
- Linhart, O., Šlechtová, V., Kvasnička, P., Ráb, P., Příkryl, I., 1989. Chromosome manipulations in tench (*Tinca tinca* L.) and carp (*Cyprinus carpio* L.) in Czechoslovakia. *Práce VÚRH Vodňany* 18: 53–60.
- Pokorný, J., 1986. Evaluation of the parental generations of carp according to the survival of advanced fry. *Práce VÚRH Vodňany*, 15: 21–27.
- Pokorný, J., 1987. Importy kapra a doplňkových ryb v letech 1982–1986. In: Perspektivní druhy ryb pro ČSSR; Vodňany, ČSVTS, s. 83–87.
- Pokorný, J., 1988. Výtěžnost a podíl hlavních částí těla u některých aborigenních a importovaných populací kapra. *Bulletin VÚRH Vodňany* 24 (3): 10–17.
- Pokorný, J., 1990. Výsledky odchovu a kontroly užitkovosti importovaných genotypů kapra. *Práce VÚRH Vodňany* 19: 34–46.
- Pokorný, J., Hartvich, P., Ryšavý, J., Klézl, L., 1983. Hodnocení hmotnosti kapřího plůdku K1 s použitím standardní linie. *Živočišná výroba* 28: 843–849.
- Pokorný, J., Flajšhans, M., Hartvich, P., Kvasnička, P., Pružina I., 1995. Atlas kaprů chovaných v České republice. Victoria Publishing, Praha, 69 s.
- Rennert, B., Kohlmann, K., Hack, H., 2003. Performance test with five different strains of tench (*Tinca tinca* L.) under controlled warm water conditions. *Journal of Applied Ichthyology* 19: 161–164.
- Smíšek, J., 1968. Vliv typu ošupení na růst kaprů (K1–3). *Živočišná výroba* 61: 475–484.
- Smíšek, J., 1970. Identifikace genotypů v ošupení kapra pomocí umělého výtěru. *Bulletin VÚRH Vodňany* 6: 20–27.
- Smíšek, J., 1971. Plemenitba a umělý výtěr kapra. *Metodika ÚVTI*, Praha, ÚVTI, 23 s.
- Smíšek, J., 1972. Užitkové vlastnosti kapra různého fenotypu v ošupení. *Bulletin VÚRH Vodňany* 8 (3): 3–10.
- Smíšek, J., 1973. Využití transferinů v plemenitbě kapra. *Bulletin VÚRH Vodňany* 9 (1): 19–24.
- Smíšek, J., 1974. Plemenářská a šlechtitelská problematika v chovu kapra v ČSSR. *Bulletin VÚRH Vodňany* 10 (1): 3–8.
- Smíšek, J., 1977. Korelace, dědičnost exteriéru a biochemických ukazatelů u kapra ve stáří jeden až dva roky. *Bulletin VÚRH Vodňany* 13 (2): 3–9.
- Smíšek, J., 1978. Vliv inbredizace a neinbrední hybridizace na produkční vlastnosti kapřího plůdku. *Bulletin VÚRH Vodňany* 14: 24–10.
- Smíšek, J., 1979a. Hybridizace kaprů vodňanské a maďarské linie. *Bulletin VÚRH Vodňany* 15 (1): 3–12.
- Smíšek, J., 1979b. Výzkum exteriéru, heritability a biochemických hodnot v genetice kapra v ČSSR. *Bulletin VÚRH Vodňany* 15 (2): 3–6.
- Smíšek, J., 1979c. Výsledky testování domácích linií kapra s importovanými a jejich hybridizace. In: Intenzivní chov ryb a zpracování ryb, České Budějovice, ČSVTS, s. 75–84.
- Smíšek, J., 1980. Kontrola užitkovosti a dědičnosti v chovu kapra. *Bulletin VÚRH Vodňany* 16 (2): 3–7.
- Smíšek, J., 1981. Vliv genofondu na užitkové a exteriérové vlastnosti filiálních generací kapřího plůdku z meziliniového křížení. *Bulletin VÚRH Vodňany* 17 (2): 1–9.
- Smíšek, J., Pícha, O., 1970. Růstové vlastnosti homozygotních lisců kapra. *Živočišná výroba* 15: 461–470.
- Smíšek, J., Pokorný, J., 1982. Odchov a selekce kaprů. *Edice Metodik, VÚRH, Vodňany*, č. 1, 16 s.

- Smíšek, J., Vavruška, A., 1973. Průzkum korelací a dědičnosti exteriéru a biochemických ukazatelů u kapřího plůdku. Bulletin VÚRH Vodňany 9 (2): 12–18.
- Smíšek, J., Vavruška, A., 1975. Výsledky korelací transferinových fenotypů k exteriéru a k biochemickým hodnotám u kapra lysého (*ssnn*). Bulletin VÚRH Vodňany 11 (2): 3–10.
- Steffens, W., 1980. Der Karpfen. A. Ziemsen Verlag Wittenberg Lutherstadt, 5. Auflage.
- Steffens, W., 1995. The tench (*Tinca tinca* L.), a neglected pond fish species. Polskie Archiwum Hydrobiologii 42: 161–180.
- Šlechtová, V., Šlechta, V., Valenta, M., 1995. Genetic protein variability in tench (*Tinca tinca* L.) stocks in Czech Republic. Polskie Archiwum Hydrobiologii 42: 133–140.
- Šusta, J., 1898. Fünf Jahrhunderte der Teichwirtschaft zu Wittingau. Stettin. S. 4 u.f.
- Thai, B.T., Burrridge, C. P., Pham, T. A., Austin, C. M., 2004. Using mitochondrial nucleotide sequences to investigate diversity and genealogical relationships within common carp (*Cyprinus carpio* L.). Animal Genetics 36: 23–28.
- Thai, B.T., Pham, T.A., Thai, U.D., Austin, C.M., 2006. Progress toward a global genealogy of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains using mitochondrial nucleotide sequences data. NAGA, WorldFish Center Quarterly 29 (3–4): 55–61.
- Tiedemann, R., Moll, K., Paulus, K.B., Scheer, M., Williot, P., Bartel, R., Gessner, J., Kirschbaum, F., 2007. Atlantic sturgeons (*Acipenser sturio*, *Acipenser oxyrinchus*): American females successful in Europe. Naturwissenschaften 94:213–217.
- Tran, D.T., 1983. A contribution to morphological mutation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Vietnam. Pedagogical University Hanoi (in Vietnamese).
- Valenta, M., Kálal, L., 1968. Polymorfismus sérových transferinů u kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a lína obecného (*Tinca tinca*). In: Sborník VŠZ Praha, B: 93–103.
- Wedekind, H., Rennert, B., Kohlmann, K., 2003. Product quality in different strains of tench (*Tinca tinca*) tested under controlled environmental conditions. Journal of Applied Ichthyology 19: 174–176.
- Wohlfarth, G.W., 1984. Common carp. In: Mason, I.L. (Ed.), Evolution of domesticated animals, Longman, London, UK, pp. 375–380.
- Wohlfarth, G.W., Lahman, M., Hulata, G., Moav, R., 1980. The story of 'Dor-70', a selected strain of the Israeli common carp. Bamidgeh 32: 3–5.
- Wohlfarth, G.W., Moav, R., Hulata, G., 1983. A genotype-environment interaction for growth rate in the common carp, growing in intensively manured ponds. Aquaculture 33:187–195.
- Wuertz, S., Mesfin, B., Kirschbaum, F., 2007. On the risk of criminal manipulation in caviar trade by intended contamination of caviar with PCR products. Aquaculture 269: 130–134.
- Zeman, A., 1981. Dědičnost zbarvení u kapra (*Cyprinus carpio* L.). In: Kouřil, J. (Ed.), Reprodukce, genetika a hybridizace ryb; Vodňany, Slovenská zoologická spoločnosť – Ichtyologická sekce, s. 154–156.

ŠLECHTITELSKÉ PROGRAMY V AKVAKULTUŘE

M. Kocour

9

ŠLECHTITELSKÉ PROGRAMY V AKVAKULTUŘE

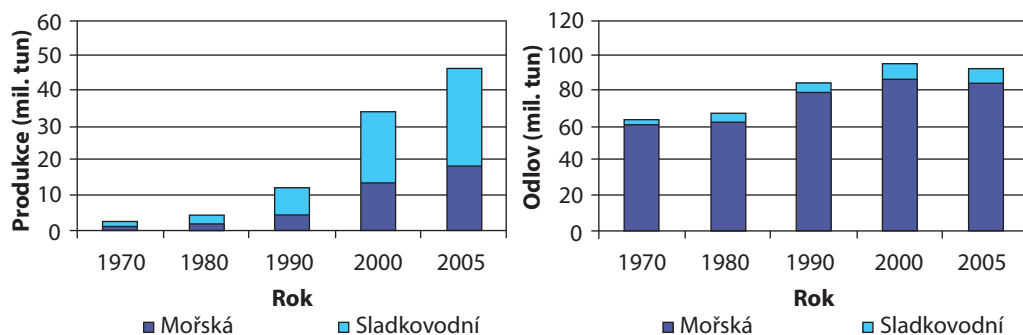
M. Kocour

9.1. Úvod do problematiky

Cílem šlechtitelských programů v rybářství je, stejně jako v chovu jiných hospodářských zvířat, zlepšovat požadované užitkové vlastnosti chovaných organismů s využitím zákonitostí genetiky. Šlechtění můžeme označit za „genetické zlepšování“, protože se zaměřuje na genetickou složku fenotypu. Přesto je však nutno chápat šlechtění jako komplexní strategii sledující ekonomický zájem chovatelů, a proto nemůžeme opomíjet podmínky prostředí, které jsou v akvakultuře mnohdy limitujícím faktorem (**příklad 9.1.**). Aplikací šlechtitelských programů chceme posunout průměrnou hodnotu požadovaných vlastností s kontinuální proměnlivostí (např. růst, výtěžnost) požadovaným směrem. U vlastností s definovanými třídami (např. přežití, barva masa apod.) chceme zvýšit četnost požadovaných tříd v populaci.

Příklad 9.1. *Růstový potenciál běžného kulturního kapra obecného je tak velký, že při dobrých podmínkách prostředí (optimální teplota, dostatek potravy a prostoru) může během jediného roku dosáhnout hmotnosti 1–1,5 kg. Přitom úplně stejný kapr v běžných podmínkách rybníčního hospodaření v České republice dosáhne této hmotnosti až za 2–3 roky. Podobně je to se všemi akvakulturními organizmy, čímž se akvakultura od ostatních chovů hospodářských zvířat podstatně liší. V akvakulturních chovech nejsme velmi často schopni poskytnout ty nejvhodnější podmínky prostředí pro růst a musíme se spokojit s těmi, které máme. Znamená to tedy, že bychom se neměli genetickou složkou fenotypu vůbec zabývat a zaměřit se pouze na optimalizaci podmínek prostředí? To určitě ne. Optimalizace podmínek chovů ve venkovním prostředí je totiž limitována teplotou a kvalitou vody. V intenzivních a uzavřených chovech většinou kvalitou vody, prostorem a ekonomičností provozu. V akvakultuře je proto nezbytné v daných podmínkách zajistit ekonomicky přijatelné neoptimálnější prostředí a v něm aplikovat šlechtitelské programy pro maximální využití genetické složky.*

Uplatňování šlechtitelských programů v akvakultuře začalo prakticky až počátkem 20. století, tedy společně s rozvojem oboru genetiky a teprve v posledních několika desetiletích má šlechtění v akvakultuře velmi významnou úlohu. I chovatelé v minulosti se však bez znalostí genetiky zasloužili o zlepšování užitkovosti populací ve srovnání s divokými populacemi. Šlechtění v akvakultuře je ve srovnání s ostatními oblastmi chovu hospodářských zvířat pozadu, o to více se však v současnosti rozvíjí. Důvodem zpoždění je skutečnost, že větší podíl mořských ryb, koryšů a měkkýšů pro konzumaci je získáván odlovem z přírodních zdrojů moří a oceánů. Ve sladkovodním rybářství se chov na celkové produkci podílí více než odlovy z volných vod, způsob chovu byl však v velké části extenzivní. Situace se ale s ubýváním přírodních zdrojů ryb v mořích a zvyšováním poptávky po rybích produktech dramaticky změnila a produkce akvakulturních druhů z chovů tvoří dnes polovinu z celkové roční potřeby (obr. 9.1.).



Obr. 9.1. Vývoj produkce (nalevo) a odlovů (napravo) živočišných druhů v mořské a sladkovodní akvakultuře (podle FAO, www.fao.org)

Používané šlechtitelské postupy se liší podle druhu organismu, způsobu hospodaření, kvantitativních vlastností, které chceme měnit apod. Důležité je rovněž stanovit si jasný cíl šlechtitelského programu, pamatovat přitom na všechny zákonitosti (např. že zlepšení užitkovosti jednoho znaku se může projevit snížením užitkovosti znaku jiného, neboť mezi některými znaky existuje negativní korelace) a hlavně kvalifikovaně a co nejobjektivněji otestovat výsledný produkt šlechtitelské práce (podrobnosti v kapitole o testování užitkovosti ryb). Nejčastějším cílem šlechtitelské práce je jednoznačně zlepšení růstových schopností, zvýšení procenta přežití (u nižších věkových kategorií je přežití mnohdy limitujícím faktorem), zvýšení podílů jedlých částí těla, zlepšení reprodukční schopnosti, zvýšení konverze krmiva, dosažení požadované barvy a kvality masa, tělesného rámce atd. U ornamentálních ryb, např. Koi kaprů, je snaha šlechtit ryby na kvalitu a vzhled požadovaných barevných variant.

9.2. Specifika šlechtitelské práce v akvakultuře

Před popisem jednotlivých šlechtitelských metod je vhodné shrnout nejdůležitější specifika chovu ryb (popř. koryšů a měkkýšů) v akvakulturách, protože tato specifika odlišují šlechtitelskou práci v tomto oboru od šlechtění u jiných hospodářských zvířat.

1) **Rozmnožovací schopnost** u ryb je ve srovnání se skotem, prasaty či drůbeží výrazně vyšší a pohybuje se řádově v tisících až milionech potomků od jediného rodičovského páru z jediného výtěru. Tato zdánlivá výhoda ale v minulosti vedla k tomu, že chovná hejna byla zakládána jen z několika rodičů a procento inbreedingu ve většině současných chovů je pravděpodobně velmi vysoké. Situace je tím horší, čím delší je historie chovu a domestikace daného druhu. Příkladem může být např. kapr obecný jako nejdéle chovaný druh ryby. Nejnovější populační studie naznačují, že genetická variabilita u kulturních plemen či linií kapra je mnohem nižší než u divokých populací. Podobně je tomu i u jiných druhů ryb. V poslední době je také znát úbytek reprodukční schopnosti, což může být způsobeno inbrední depresí. Situace u lososovitých ryb je příznivější díky jejich až 20krát nižší plodnosti.

2) **Přežití ryb** ze stádia plůdku do tržní či reprodukční velikosti je ve srovnání s jinými hospodářskými zvířaty velmi nízké. V rybníčních chovech nedosahuje kumulativní přežití ryb zpravidla více než 20%, v intenzivních chovech lososovitých ryb činí přežití 50–80%. Tato situace komplikuje testování

vyšlechtěných skupin, neboť je nezbytné začínat s větším počtem ryb. Při selekčních programech ztrácíme mnoho selektovaných ryb a tím i žádoucích fenotypů a je nezbytné selektovat větší množství ryb, abychom v reprodukčním věku měli požadovanou efektivní velikost populace. Rovněž přežití ryb používaných k umělé reprodukci je velmi variabilní a některé druhy po reprodukci hynou přirozeně. V rybníčních chovech nemáme o generačních rybách žádné informace až do doby jejich dalšího přelovení. Proto v rybníčních chovech nevyhledáváme výkonné jedince, ale zaměřujeme se na celé populace (generační hejna).

3) **Podmínky prostředí** mohou výrazně vylepšit i zhoršit užitkové vlastnosti zejména růst, přežití, plodnost apod. Několik případů bylo zmíněno v předchozím textu. Vliv prostředí u savců a ptáků není díky jejich teplokrevnosti tak vysoký, navíc se tato zvířata chovají za jasně definovaných podmínek (výživa, teplota apod.). Situace ve venkovních chovech a tam, kde ryby vyrůstají z části na přirozené potravě dané produktivitou vodních ekosystémů, je o to horší. Rybníky, i když leží vedle sebe, jsou každý sám o sobě specifickým ekosystémem s mnoha proměnnými, a proto se podmínky prostředí v každém z nich mohou velmi lišit. Chováme-li geneticky odlišné skupiny ryb v oddělených rybnících, nejsme schopni kvantifikovat, jak se konkrétní podmínky prostředí v jednotlivých rybnících promítly do výsledné fenotypové variance. Jediným východiskem je provádět korekci fenotypových hodnot.

4) **Velikost počátečních vývojových stádií** ryb při zahájení testování je tak malá (několik mm až cm), že není možno efektivně jedince individuálně ani skupinově označit. Při odděleném chovu, zvláště v rybnících, se potýkáme s odlišnými podmínkami prostředí, jak bylo vysvětleno v bodě 3 a mnohdy nejsme schopni zajistit pro požadovaný počet skupin (sourozenců, polosourozenců) rybníční fond. Např. při plném faktoriálním křížení 10 otců s 10 matkami získáme 100 rodin, tzn. že bychom potřebovali 100 inkubačních lahví, kolíbek a rybníků do doby možného individuálního značení. Navíc individuální značky jsou velmi drahé (většinou nelze použít obdobné typy značek používané u skotu, prasat či drůbeže) a vezmeme-li v úvahu procento přežití ryb, je takovéto značení většinou ekonomicky neúnosné. Proto se většinou porovnávají jen skupiny, např. hybrid A s hybridem B, či potomci selektovaných rodičů vůči neselektovaným apod. To však znamená rozmnožovat velký počet rodičovských párů, aby potomstvo bylo odrazem celé vyšlechtěné populace a ne jen několika jedinců. U testovaných jedinců neznáme ale jejich rodiče, protože z výše popsaných důvodů se všichni sourozenci jedné skupiny chovají ve společné skupině. Pokud neprovádíme dialelní křížení, nejsme schopni pro každou skupinu vyčíslit jednotlivé složky fenotypové variance. Výsledky se tedy po korekci fenotypů na podmínky prostředí omezují na zjištění, zda je skupina A průkazně lepší v užitkovosti než skupina B.

5) **Vedení rodokmenů** je v chovech ryb zpravidla ekonomicky neúnosné. Naráží to na nemožnost označení potomstva v počátečním vývojovém stadiu a na nedostatek odchovných ploch pro oddělené držení potomstva po konkrétním rodičovském páru do doby možného individuálního označení. Při odděleném chovu, můžeme-li si jej dovolit, se zase potýkáme s odlišnými podmínkami prostředí. Nejužitečnější metodou je používání molekulárně genetických metod, které umožňují s využitím různých genetických markerů přiřadit jedince k příslušnému rodičovskému páru. Všechny jedince můžeme držet v jednotných podmínkách směsných obsádek a ke stanovení původu nám stačí z potomka a potenciálních rodičů odebrat 1 cm² ploutevní tkáň. Úspěšnost přiřazení jedinců k jedinému rodičovskému páru se dle použité metody pohybuje na úrovni 80–99%. Bohužel náklady na tato stanovení jsou pro běžné chovatele neúnosné.

6) **Vhodný rybníční fond** pro testování a chov plemenných ryb je omezený. Již bylo zmíněno, že pro testování velkého množství skupin není dostatek menších rybníčních ploch, připočteme-li nutnost opakování pro každou z testovaných skupin kvůli odlišnosti podmínek prostředí, dostáváme se na potřebu desítek rybníků pro jeden test. Také pro obnovu stavů plemenných ryb (linie, plemene apod.) potřebujeme zvláštní rybníční plochu, protože nejsme schopni označit váčkový plůdek ryb. Identifikace s využitím molekulárních metod je ekonomicky neúnosná. Plemenné ryby potřebují větší prostor a úrodný rybník, který mnohdy chybí, a proto se plemenné ryby chovají s tržní rybou. Máme-li velké množství plemen či linií, můžeme chovat více skupin pohromadě. Při omezeném rybníčním fondu jsou ale často generační ryby ve velmi zhuštěných obsádkách nebo držíme nižší počty ryb. Poměrně časný projev inbrední deprese u plemenných ryb je vysoce pravděpodobný.

7) **Délka generačního intervalu**, tedy průměrný věk rodičů při narození jejich prvního potomstva, je u některých ryb mnohonásobně delší než u ostatních hospodářských zvířat. Tento faktor vysoce závisí na podmínkách prostředí (zejména teplotě) a výživě. V našich klimatických podmínkách se např. samci kapra obecného používají poprvé zpravidla ve věku 4 let, ale je možno využít i ryby ve věku 2 let (ve třetí vegetační sezóně). Samice dospívají ve věku 4 až 5 let. U ostatních rybníčních druhů ryb je situace obdobná. Později dospívají amur a tolstolobici (7–8 let), jeseteři zpravidla až ve věku 8–15 let. Tyto skutečnosti velmi omezují šlechtitelskou práci.

Závěrem je nezbytné opět zdůraznit, že základem při provádění všech selekčních programů a následném testování nových (výkonnějších) populací je zvolit vhodný experimentální model, který umožní korekci zjištěných fenotypových hodnot vzhledem k neodhadnutelným proměnným a který bude zárukou objektivního výsledku. Neznalost těchto skutečností či nemožnost identifikace původu potomstva použitím molekulárních metod vedly v minulosti často ke špatným interpretacím výsledků (Vandeputte, 2003).

9.3. Čistokrevná plemenitba

Pokud provádíme rozmnožování jedinců pouze v rámci daného plemene, linie, populace apod., hovoříme o čistokrevné plemenitbě. Při čistokrevné plemenitbě spoléháme na aditivní složku genetické variance, a proto je tato plemenitba základem při provádění dlouhodobých selekčních programů, kdy můžeme výběrem po mnoho generací postupně vylepšovat genetický potenciál požadovaných kvantitativních znaků, a to jak u plemenných ryb, tak u ryb určených ke konzumaci. Čistokrevná plemenitba je základní šlechtitelská metoda, a protože v akvakultuře převládají šlechtitelské programy zaměřené na selekci, je i metodou nejpoužívanější.

Čistokrevná plemenitba se používá při obnově všech generačních hejn (plemenných ryb) v rámci daného plemene, linie, populace, i pro produkci užitkových obsádek bez návaznosti na jiné šlechtitelské metody. Při obnově stavů plemenných ryb používaných pro produkci užitkových populací či jako genetické zdroje rozšiřující genetickou rozmanitost v rámci druhu je potřeba zabránit příbuzenské plemenitbě vedoucí k inbreedingu. Z tohoto důvodu je potřeba v rámci každého generačního hejna zachovávat požadovanou minimální velikost populace, a pokud v dané populaci neaplikujeme selekční postupy, je vhodné doplňovat v určitých časových intervalech generační hejna plemenných ryb novými jedinci stejného plemene či linie z jiných chovů.

9.4. Křížení (hybridizace)

Křížení je dobře známá metoda genetického zlepšování. Křížením rozumíme vzájemné páření mezi druhy, plemeny, populacemi či liniemi. Hlavním důvodem používání křížení ve šlechtitelské práci je využití neaditivní složky genetické variance, která při křížení vzdálených genotypů může způsobit **heterózní efekt – heterózu** (viz kapitola 5.4.). Výsledná fenotypová hodnota kříženců (hybridů) je však i výsledkem působení aditivní genetické variance. Z chovatelského hlediska nás ale nejvíce zajímá, zda je užitkovost hybrida v porovnání s jeho rodiči lepší. Vliv podílu jednotlivých složek na fenotypové varianci je podružný.

U většiny druhů ryb není křížení běžně používanou metodou. Mezidruhovému křížení až na výjimky nenašlo v akvakultuře praktické uplatnění. Zpravidla se provádí křížení v rámci druhů na úrovni plemen, linií či populací. Výsledky křížení jsou tím účinnější, čím rozdílnější a geneticky vzdálenější jsou křížené skupiny ryb. Míru genetické vzdálenosti mezi skupinami ryb mohou indikovat morfologicko-biometrické ukazatele, neefektivnější je však využívání populačních studií s využitím metod molekulární biologie. Na základě polymorfismu alozymů, mikrosatelitních markerů, mtDNA, či jiných genů můžeme konstruovat stromy genetických vzdáleností jednotlivých plemen či populací a přednostně vybírat ke křížení nejvzdálenější skupiny. Největší uplatnění našlo křížení u kapra obecného, kde je u hybridů heterózní efekt běžný, ale ne univerzální fenomén (Wohlfarth, 1993). Heterózní efekt bývá bohužel omezen zpravidla jen na F_1 generaci, což omezuje používání této metody především k produkci užitkových hybridů. Křížení může sloužit také jako nástroj pro vznik nových linií.

9.4.1. Mezidruhová hybridizace

Mezidruhová hybridizace se provádí u příbuzných druhů ryb, protože čím jsou si druhy vzdálenější, tím menší je pravděpodobnost, že potomstvo bude životaschopné. Úspěch při mezidruhovém křížení závisí hodně na homologicitě chromozomových párů (shodě ve velikosti a tvaru chromozomů a komplementaritě příslušných alelických párů) po splynutí haploidních jader samčích a samičích gamety. Následkem neúplné homologicity chromozomových párů jsou mezidruhová hybridní jedinci neplodní nebo mají omezenou plodnost. Velmi často vznikají také spontánní polyploidní jedinci, a proto se mezidruhová hybridizace stala nástrojem k indukci a studiu polyploidie.

Při studiích mezidruhové hybridizace při křížení samic kapra obecného a samců amura bílého byli zaznamenáni triploidní jedinci. Triploidie byla pravděpodobně indukována spontánním zadržením sekundárního pólového tělíska. Rovněž polovina ryb vzniklých křížením samic F_1 generace hybrida mezi karasem stříbřitým a kaprem obecným se samci kapra obecného byla triploidní. Jikry hybrida karase stříbřitého a kapra obecného oplozené inaktivovanou spermií daly vznik normální diploidní populaci, a to i v případech bez umělé indukce gynogeneze. Při křížení tohoto hybrida s rodičovskými druhy se objevovali allotriploidní potomci, protože samice mezidruhového hybrida produkovaly jikry s diploidní sadou chromozomů (Emelyanova a Cherfas, 1980). Navíc Gomelsky a kol. (1985, 1988) demonstrovali u stejného mezidruhového hybrida, že maskulinizované jikernačky byly na rozdíl od normálních samic plodné a produkovaly diploidní pohlavní buňky (spermie). Křížením těchto maskulinizovaných samic s normálními hybridními samicemi autoři získali allotetraploidní populaci a tito tetraploidi produkovali diploidní pohlavní buňky. Liu a kol. (2001) vyprodukovali tetraploidní populaci hybrida mezi zlatou formou karasa stříbřitého a kapra obecného. V tomto případě vznikla tetraploidní populace křížením jedinců F_1 populace zmíněných hybridů, kteří produkovali pohlavní buňky s neredukovaným genomem.

Testování užitečnosti mezidruhových hybridů ukázalo, že užitečnost hybridů ve většině případů nepřesáhla užitečnost lepšího z rodičů. Snad jediné praktické uplatnění má v současné době hybridizace mezi tlamouny (tilápiemi). V Izraeli křížením druhů *Oreochromis niloticus* a *O. aureus* získali téměř celosamčí (*all-male*) populaci, která vykazuje lepší růstové vlastnosti. U tlamounů rostou totiž samci rychleji než samice (Gjedrem, 2005).

9.4.2. Dialelní křížení

Pod tímto názvem se rozumí založení všech možných hybridních kombinací testovaných skupin (linií, plemen) mezi rodičovskými a mateřskými jedinci. Tento způsob křížení je nejvýhodnější, protože zjistíme užitečnost všech skupin při jediném testu a při statistickém vyhodnocení jsme schopni zjistit podíl jednotlivých složek fenotypové proměnlivosti sledovaných znaků. Jelikož při této metodě vzniká velké množství testovaných skupin, je omezena kapacitou testovacího zařízení. Dialelní křížení se často používá i při zakládání výchozích (syntetických) populací před zahájením selekčního programu.

Příkladem dialelního křížení je projekt GIFT (*Genetic Improvement of Farmed Tilapia*) u tlamouna nilského (tilápie) zaměřený na genetické zlepšení chovaných tilápií. Pro tyto účely byly dialelně kříženy 4 asijské a 4 africké linie ($8 \times 8 = 64$ skupin) za účelem porovnání růstu a přežití. Výsledky pozorovaného heterózního efektu jsou znázorněny v tab. 9.1. (Bentsen a kol., 1998).

Tab. 9.1. Schéma dialelního křížení 8 linií tlamouna nilského (*Oreochromis niloticus*) s vyjádřením průměrného heterózního efektu (v %) u hmotnosti v tržní velikosti. Podle Bentsen a kol. (1998).

Otcovské	Mateřské linie							
linie	E2	Gh	Ke	Se	Is	Si	Th	Tw
E2	–	3,8	9,9	11,6	9,3	3,1	9,5	5,7
Gh	4,0	–	-1,5	10,4	2,6	3,9	14,0	3,7
Ke	10,6	-1,5	–	-0,8	4,8	1,9	5,6	1,6
Se	12,3	10,3	-0,8	–	6,3	0,3	2,8	0,0
Is	10,4	2,8	4,9	6,7	–	0,6	7,0	0,4
Si	2,8	3,5	1,7	0,2	0,4	–	5,8	2,5
Th	10,0	13,7	5,4	2,7	6,5	6,0	–	-5,2
Tw	6,0	3,8	1,7	0,1	0,3	2,8	5,8	–

V České republice bylo prováděno dialelní křížení především u plemen kapra obecného. U testu maďarské a vodňanské linie prokazovali hybridní populace statisticky významně vyšší růst a ve finálním produktu dosáhli tito jedinci o 10–15 % vyšší hmotnost oproti čistým liniím. U filetů byla zjištěna vyšší výtěžnost o 1–2,3 % a byl prokázán i rozdíl v profilové tvorbě filetu (Smišek, 1979). Při tomto testování nebyly bohužel v minulosti zohledněny odlišné podmínky prostředí.

Jiný test trvající 4 roky byl zaměřen na hodnocení užitkovosti následujících skupin: 1) kapr ropšínský (*Rop*), 2) syntetická linie (*C435*), 3) jihočeský lysý kapr (*BV*) a 4) Koi kapr. Výsledky prokázaly vliv kříženců na živou vyšší hmotnost ($P = 0,0005$) i na hmotnost opracovaného těla ($P = 0,0033$). Vliv hybridů na výtěžnost jedlých částí těla nebyl prokázán ($P = 0,1219$) (Gela a Linhart, 2000).

V Polsku byla testována užitkovost hybridů při dialelním křížení dvou maďarských linií s označením W a T a polské vyšlechtěné linie s označením (3). Chov ryb probíhal v malých zemních rybnících o výměře 120 m² s několikerým opakováním odděleně podle linie s kontrolní skupinou ryb v každém rybníce pro korekci skutečných dosažených hmotností. U kříženců byl pozorován heterózní efekt u přežití a konverze předkládaného krmiva, u růstu byla heteróza nízká nebo žádná (tab. 9.2.). Výsledky ukázaly, že heterózní efekt se projevil zejména za stavu horších životních podmínek, kdy se zlepšila produkce ryb z jednoho hektaru rybníční plochy, a to díky vyššímu přežití a konverzi krmiva (Bialowas, 1991).

Tab. 9.2. Heterózní efekt kříženců vyjádřený v procentech celkové průměrné hmotnosti rodičovských populací (Bialowas, 1991).

Kříženec	Růstový poměr		Přežití		Konverze krmiva		Produkce ryb z ha rybníční plochy	
	G	B	G	B	G	B	G	B
3 × T	95,5	120,7	162,7	210,9	143,7	193,4	134,7	174,2
3 × W	100,1	100,8	150,9	185,4	137,2	158,6	126,9	139,6
T × W	81,3	132,4	127,4	133,2	160,7	153,0	106,0	152,7
W × 3	107,7	137,9	117,5	233,5	122,9	252,5	114,9	222,2
W × T	101,9	132,4	140,6	154,8	132,7	174,7	131,3	174,0

G – rybníky v komplexu Golysz; **B** – rybníky v komplexu Byczki

Výraznější projev heterózního efektu za zhoršených životních podmínek byl pozorován také v Izraeli při 73 různých srovnáních hybridů kapra obecného. Ve 47 případech byla užitkovost kříženců v růstu vyšší než u lepšího z obou rodičů, u 15 byl rozdíl statisticky průkazný. Při srovnání užitkovosti kříženců ve vztahu k průměrné užitkovosti obou rodičovských plemen byli kříženci ve všech 28 případech výkonnější a ve 22 případech i statisticky (Wohlfarth, 1993).

9.4.3. Vrcholové křížení

Při tomto typu křížení použijeme jednu skupinu (linii, plemeno) jako výchozí a na ni křížíme jiné testované linie. Rozlišujeme **vrcholové křížení s mateřskou dědičností** (výchozí linie je na otcovské pozici) či **otcovskou dědičností** (výchozí linie je na mateřské pozici). Tento způsob křížení je hojně využíván při testování kapra obecného a lina obecného v České republice. Z praktických důvodů se téměř výhradně využívá vrcholové křížení s otcovskou dědičností, kdy na samice jedné skupiny (plemena, linie) křížíme několik různých skupin samců. Výhodou tohoto křížení je, že při menším počtu odchovných ploch

můžeme otestovat více otcovských skupin a tento typ křížení zapadá lépe do strategie rybářských podniků. Rybářské podniky, které se spoléhají na získávání váčkového plůdku z reprodukce vlastních ryb, využívají velmi často jen jednu skupinu (linii, plemeno) lysého kapra a jednu skupinu kapra šupinatého jako základní. Ke každé skupině (linii, plemeni) pak hledají další pro produkci užitkových hybridů s lepší výkonností. Použitím vrcholového křížení jsou schopni v jednom testu otestovat více potenciálních skupin, protože dostupných linií či plemen kapra je velký počet.

Při vrcholovém křížení je vhodné spoléhat se při výběru hybridů k testování na výsledky populačních studií s využitím metod molekulární biologie a přednostně vybírat ty populace, které jsou geneticky nejvzdálenější. Z tohoto ohledu se při tvorbě šupinatých kříženců velmi osvědčilo plemeno Ropšínského kapra (Rop) nebo Amurského sazana (AS). Při křížení těchto plemen, která jsou zpravidla na mateřské pozici s plemeny evropskými, získáme hybrida se stabilnějším přežitím, dobrým růstem a vyšší odolností vůči nemocem a nepříznivým zimním podmínkám. Tento hybridní efekt je přičítán větší genetické vzdálenosti, neboť plemeno AS je původní divoká forma z dálného východu a dle výsledků populačních analýz patří do skupiny *Cyprinus carpio haematopterus*, zatímco evropská plemena do skupiny *C. c. carpio*. Kapr Ropšínský je kulturní forma kapra vyšlechtěná v Rusku a patří mezi evropská plemena, ale nese v sobě geny Amurského sazana. AS a Rop se také od normálních evropských plemen odlišují stavbou těla, protože mají výrazně protáhlý tvar s vysokým indexem širokohřbetosti (IŠ).

Výsledky vrcholového křížení prováděné v ČR pravidelně od devadesátých let 20. století potvrzují, že heterózní efekt růstu není u hybridů pravidlem. Ve většině případů nejsou ale hybridi výrazně horší než čistá linie (plemeno) a v řadě případů je jejich růst i průkazně lepší. U přežití vykazují hybridi skoro vždy vyrovnanější hodnoty, tzn. že přežití hybridů nekolísá tak výrazně v závislosti na konkrétních podmínkách prostředí. Tento stabilizující prvek přežití je zejména v prvním roce života (vegetační sezóna i přezimování) velmi ceněný a je vyšší zárukou dostatečného počtu násad pro další období. Stejně jako v předešlých případech byl heterózní efekt tím výraznější, čím horší byly podmínky prostředí v daném období. Vzhledem k velké závislosti rybníčního hospodaření na podmínkách prostředí se využívání křížení k produkci finálních (tržních) obsádek doporučuje. Nemělo by se ale zapomínat na pravidelné a opakované testování používaných hybridů.

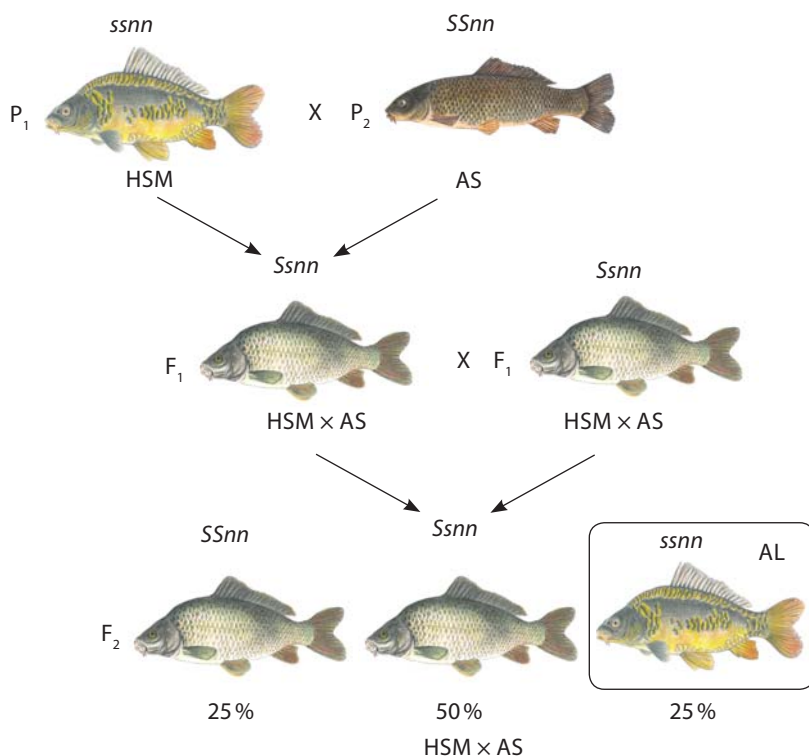
9.4.4. Reprodukční (kombinační) křížení

Reprodukční křížení je vícenásobné křížení, kdy postupně křížíme dvou až tří liniové hybridy s ostatními plemeny či liniemi a výsledkem jsou tří, čtyř i více linioví (plemenní) kříženci. Mnohdy se využívá i zpětného křížení, kdy je hybrid nakřížen zpět na jednu z rodičovských skupin (plemen, linií). Tímto křížením získáváme populace, které po aplikaci selekce, popř. inbredizace, mohou dát vzniknout novým plemenům, syntetickým liniím či účelovým hybridům. Dále je pak můžeme obnovovat čistokrevnou plemenitbou nebo použít v další plemenářské práci, např. v selekčních programech (Bakos, 1979). Reprodukční křížení je ve šlechtění hospodářských zvířat hojně využívanou metodou, v chovu ryb se používají zpravidla maximálně třílinioví hybridy. U většiny druhů akvakulturních organizmů se reprodukční křížení nepoužívá (Gjedrem, 2005), ale u kapra obecného našla tato metoda své uplatnění.

V Maďarsku byly v letech 1977 a 1978 touto metodou vyšlechtěny dva noví třílinioví hybridy s označením 215 a P31. Základem pro ně byly původní maďarské linie shromážděné z různých částí státu. Lysý hybrid (linie) s označením 215 vykazuje o 20 % vyšší produktivitu než tradiční maďarské linie. Heterozygotní šupinatý hybrid (linie) P31 dosahuje vyšší užitkovosti o 20–25 % a je velmi adaptabilní na extenzivní i intenzivní podmínky chovu. Ještě v nedávné době bylo 80 % chovů v Maďarsku zaměřeno na produkci těchto dvou hybridů (Bakos, 1990). V Rusku takto vznikl ve 30. letech kapr Ropšínský (Rop) a kapr ukrajinský šupinatý (UKR), v České republice lysé linie C434 a C435 či jihočeský lysec (BV) (Pokorný a kol., 1995).

Velmi účelné je použít kombinační křížení při dovozu plemen (linií, populací) z jiných zemí. Nově dovezené populace jsou zpravidla více geneticky vzdálené od místních plemen (linií), která jsou mnohdy v důsledku dlouhé izolace náchylná k inbrední depresi vedoucí ke snížení růstu a odolnosti (Wohlfarth a kol., 1986). Křížením dovezených populací na místní inbrední populace je možno získat hybrida s dobrými užitkovými vlastnostmi. Takto vznikl např. v roce 1989 dvou liniový šupinatý hybrid maďarské linie a amurského divokého kapra zvaný P34 (Bakos a Gorda, 1995).

Reprodukční křížení je využitelné k produkci lysých linií kapra obecného, které nesou geny divokých šupinatých populací kaprů. Účelem je dosažení vyšší odolnosti vůči nemocem a stresu, popřípadě vyššího růstu. Tyto linie dále rozmnožujeme čistokrevně nebo je křížíme s jinými liniemi (plemeny, populacemi) s očekáváním významného heterozního efektu. Zušlechťování lysých plemen geny divokých kaprů probíhá tak, že zkřížíme vybrané divoké šupinaté plemeno s vybraným lysým plemenem. Znak pro plné ošupení je dominantní, proto v F_1 generaci získáme šupinaté heterozygotní potomstvo. Vzájemným křížením jedinců F_1 generace získáme generaci F_2 s 25% podílem lysých ryb s geny šupinatých divokých kaprů. Tyto ryby selektujeme a dále udržujeme čistokrevnou plemenitbou. Tímto způsobem vznikl v letech 1987 až 1992 v ČR severský lysec (M72), který nese geny Ropšínského kapra (Pokorný a kol., 1995). Linie M72 je v současné době v ČR jednou z nejpoužívanějších linií. Na šlechtitelské stanici VÚRH JU byla podobným způsobem v letech 1999 až 2004 získána linie označovaná jako amurský lysec (AL). Vznik linie AL je graficky znázorněn na obr. 9.2. Obdobným způsobem ale s využitím plemene Pohořelického lysce vznikla další linie s geny amurského sazana v letech 2003 až 2006 na podniku Rybníkářství Pohořelice a.s.



Obr. 9.2. Schéma vzniku linie označované jako amurský lysec (AL). HSM – maďarská syntetická linie; AS – Amurský sazan, P_1 – mateřská linie, P_2 – otcovská linie, $ssnn$ – genotyp pro lysé ošupení, $SSnn$ a $Ssnn$ – genotyp pro šupinaté ošupení. Ilustrace ryb Pavla Hanusová (kapr obecný lysý, amurský sazan), Lucie Mrázová (kapr obecný šupinatý).

9.4.5. Souhrn a výsledky dosažené při křížení ve šlechtitelských programech

Představme si, že máme čtyři plemena jakéhokoliv druhu ryby s označením A, B, C a D. Jednotlivé příklady křížení popsané v předchozích kapitolách můžeme graficky vyjádřit na obr. 9.3.

Již bylo řečeno, že u kapra obecného má využití heterózního efektu u růstu, přežití, odolnosti vůči chorobám či chladné vodě velký význam. Výskyt heterózního efektu byl u různých hybridů domestikovaného i divokého kapra z Evropy, Ruska, Číny a Japonska opakovaně popisován (Hulata, 1995). Výsledky z Izraele za více než dvě desetiletí ukazují, že pozitivní heterózní efekt na růst u kapra je běžný, ale ne univerzální jev. To potvrzují i zjištění z České republiky, kdy byl při testování přes 100 různých hybridních kombinací zaznamenán významný heterózní efekt jen u 10 % hybridů (Pokorný, 1996). Bylo také zjištěno, že heterózní efekt je výraznější u mladších věkových kategorií, s věkem a růstem ryb se výše heterózního efektu snižuje. Experimenty prováděné v 80. letech 20. století na testovací stanici v Milevsku u místních a dovezených linií kapra obecného a jejich hybridů ukázaly, že v porovnání s původními populacemi ze 70. let dosahují šupinaté kombinace 3–6krát vyššího přežití (u K_0-1 30–65%, u K_2 95–99%), zvýšeného přírůstku hmotnosti o 7–15 % a příznivější výtěžnost masa o 4–8 %. V tomto případě je však potřeba zdůraznit možnost špatně interpretovaných výsledků z důvodu chybného modelu testování bez kontrolní skupiny ryb nebo dostatečného opakování.

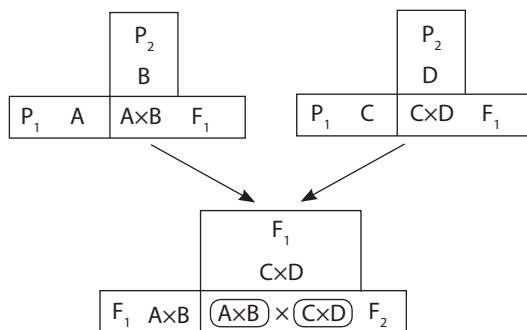
I. Dialelní křížení

		P ₂				
		A	B	C	D	
P ₁	A	A×A	A×B	A×C	A×D	F ₁
	B	B×A	B×B	B×C	B×D	
	C	C×A	C×B	C×C	C×D	
	D	D×A	D×B	D×C	D×D	

II. Vrcholové křížení

		P ₂				
		A	B	C	D	
P ₁	A	A×A	A×B	A×C	A×D	F ₁

III. Kombinační křížení



Obr. 9.3. Schématické znázornění různých typů křížení v rámci druhu u plemen A, B, C a D.

U lososovitých ryb bylo zjištěno, že ve většině případů hybridy vykazovali užitkovost na úrovni průměru užitkovosti rodičovských populací nebo srovnatelnou užitkovost s lepší rodičovskou populací (Chevassus, 1979). Ani mezidruhové kříženci čtyř lososovitých druhů – lososa obecného, pstruha obecného, sivena a mořské formy pstruha nevykázali lepší užitkovost než největší z rodičů (losos obecný). Srovnávání užitkovosti kříženců u pěti linií lososa obecného chovaných v Norsku také nevedlo k významnému heteróznímu efektu u růstu a přežití (Gjerde a Refstie, 1984). Naproti tomu u hybridů pstruha duhového byl v některých případech zaznamenán významný heterózní efekt u dosažené tělesné hmotnosti (Gall, 1975; Ayles a Baker, 1983).

U již zmíněného programu GIFT u tlamovce nilského vykázalo 22 kříženců významný heterózní efekt, ale jen u 7 z nich byla průměrná užitkovost v dosažené tělesné hmotnosti vyšší než u výkonnější rodičovské populace, a to maximálně o 11 %. Zároveň bylo zjištěno, že podíl neaditivní složky genetické variance byl nižší než aditivní složky (Bentsen a kol., 1998).

U pražmana zlatého (*Sparus aurata* L.) byl heterózní efekt při křížení zaznamenán jen v malém rozsahu (Knibb a kol., 1997) a při křížení krevet druhů *Penaeus monodon* a *P. esculentus* nebyl zjištěn žádný heterózní efekt (Benzie a kol., 1995). Při srovnávání výsledků z křížení napříč všemi živočišnými druhy chovanými v akvakultuře bylo zjištěno, že hybridi většinou vykazovali užitkovost rovnající se průměrné hodnotě užitkovosti obou rodičů a jen méně než 1 % hybridů našlo komerční využití.

9.5. Selektce

Selektce (výběr) je jednou z hlavních evolučních sil ve všech biologických systémech a zároveň i nástroj pro cíleného zlepšování požadovaných vlastností. Účinkem selektce dochází ke změnám četností genů i genotypů v populaci. Četnosti genů či genotypů s pozitivním vlivem na vlastnost, která je ovlivněna selekcí, se zvyšují a naopak četnosti genů a genotypů s nepříznivým účinkem na znak ovlivněný selekcí se snižují (Gjedrem, 2005). Pokud jsou selekci vystaveny kvalitativní znaky, můžeme v populaci pozorovat přímo změnu ve frekvencích alel a genotypů. U kvantitativních znaků se na výsledném projevu podílí velké množství genů neznámého počtu, a jak bylo řečeno v předchozím textu, mají kvantitativní znaky v populaci kontinuální proměnlivost. Proto při selekci na kvantitativní znaky pozorujeme v populaci posun průměrné hodnoty fenotypu daného znaku ve směru selektce. V akvakultuře provádíme selekci zpravidla jen u znaků kvantitativní povahy.

9.5.1. Přírodní selektce

Podíl potomků vyprodukovaných jedním genotypem ve srovnání s genotypem jiným se nazývá **fitness (adaptivní hodnota)** nebo též **relativní reprodukční zdatnost** a právě fitness je „znakem“, na který je prováděna přírodní selektce. Jedinci, kteří mají za daných okolností nejvyšší fitness, budou produkovat větší množství potomstva s vyšším přežitím než jedinci s nižším fitness. Výsledkem přírodní selektce po mnoho generací je vytvoření populace adaptované na dané přírodní podmínky. Pokud se změní podmínky prostředí, může se změnit i fitness příslušného genotypu; pokud jsou však změny prostředí rychlejší než účinek přírodní selektce na adaptabilitu k novým podmínkám, může příslušná populace zaniknout (Falconer a Mackay, 1996). Nedostatečný účinek přírodní selektce na populace lososovitých ryb je popsán na **příkladu 9.2**.

Příklad 9.2. V jižním Norsku se za posledních několik desetiletí snížilo účinkem kyselých dešťů pH vody v řekách a jezerech pod hladinu tolerance lososovitých ryb ($\text{pH} < 5$). Zjistilo se, že odolnost vůči pH vykazuje u ryb heritabilitu na úrovni 0,09–0,33, a že adaptace na nižší pH je možná. Bohužel okyselení vody proběhlo příliš rychle na to, aby tlak přírodní selektce stačil místní populace na nové podmínky adaptovat. Výsledkem nepříznivého účinku kyselých dešťů byl rozsáhlý úbytek populací lososovitých ryb ve stovkách norských jezer (Gjedrem, 2005).

9.5.2. Umělá selekce

Umělá selekce je prováděna lidskou silou při šlechtění ryb za účelem změny vybraného znaku (vybraných znaků) v požadovaném směru. Z populace vybíráme na základě zjištěných fenotypových hodnot (změření, zvážení, výpočet) jen ty jedince, kteří spadají do požadovaného intervalu. Vybrané jedince použijeme jako rodičovskou populaci pro další generaci. Nesmíme ale zapomínat, že při provádění umělé selekce působí na populaci i přírodní selekce, která může v některých případech působit v úplně opačném směru.

Při umělé selekci rozlišujeme tři základní typy selekce (obr. 9.4.):

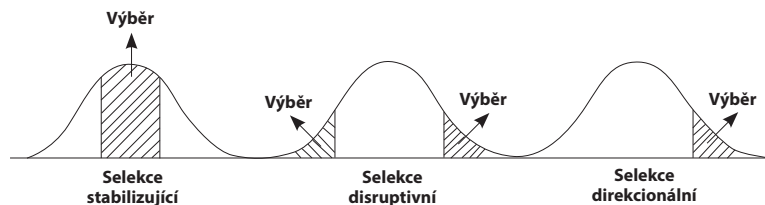
- 1) stabilizující (stabilizační, dostředivá, centripetální) selekce;
- 2) disruptivní (diverzifikační, dvousměrná) selekce;
- 3) direkcionální (řízená, směrovaná, jednosměrná) selekce.

Při **stabilizační selekci** vybíráme fenotypy s hodnotami blízkými průměru znaku v populaci za účelem snížení výskytu extrémních hodnot. Naší snahou je snížit rozptyl či směrodatnou odchylku znaku. Stabilizační selekci můžeme použít například při snaze zvýšit zastoupení ryb s optimálním obsahem tuku ve svalovině ryb a omezit výskyt extrémních hodnot (s nízkým i vysokým obsahem tuku).

Při **disruptivní selekci** vybíráme v populaci fenotypy s oběma extrémními hodnotami selektovaného znaku. Tato metoda se v akvakultuře využívá výjimečně, zpravidla jen v experimentálních selekčních programech pro ověření účinku selekce v obou směrech.

Nejběžněji využívanou metodou je **direkcionální selekce**, kdy vybíráme jen část populace s nejlepšími (nejvyššími nebo nejnižšími) hodnotami selektovaného znaku. Úkolem této selekce je vylepšit hodnotu ekonomicky důležitého znaku v dalších generacích. Vylepšení průměrné hodnoty znaku v další populaci po selekci rodičů je způsobeno změnou četnosti alel genů podílejících se na projevu znaku ve prospěch těch s vyšší šlechtitelskou hodnotou.

Všechny tři výše uvedené typy selekce se vyskytují i v přírodě, jsou tedy rovněž součástí přírodního (přirozeného) výběru (Fleg, 2005).



Obr. 9.4. Základní způsoby umělé selekce (upraveno podle Gjedrema, 2005).

9.5.3. Předpověď selekční odezvy – genetický zisk

Základem pro úspěšné zvýšení průměrné hodnoty selektovaného znaku v následující generaci je, aby se na výsledném projevu znaku dostatečnou měrou podílela aditivní genetická variance. Podíl aditivní genetické variance na celkové fenotypové varianci se nazývá heritabilita (viz kapitola 5.3.). Dalším důležitým hlediskem pro odhad úspěšnosti selekce je rozdíl mezi průměrnou hodnotou selektovaného znaku u rodičů a průměrem populace, z které rodiče pocházejí. Tento rozdíl nazýváme **selekční diferencíál (S)**. Rozdíl

mezi průměrnou hodnotou znaku v původní populaci a v populaci následné, vzniklé rozmnožením selektovaných rodičů nazýváme **genetický zisk** (ΔG). Výši genetického zisku je možno odhadnout z rovnice:

$$\Delta G = S \cdot h^2 \quad (17)$$

kde ΔG je genetický zisk, S je selekční diferencíál a h^2 je heritabilita příslušného znaku.

Celou situaci můžeme pro přehlednost vyjádřit i schematicky na obr. 9.5.

V praxi provádíme selekci na základě stanovení hodnoty **selekčního prahu** a průměrnou hodnotu znaku vybraných rodičů zpravidla neznáme. **Selekční práh** definujeme jako mezní fenotypovou hodnotu, která rozhoduje o zařazení či vyřazení jedince z budoucí rodičovské populace. Hodnota selekčního prahu v dané populaci je závislá na procentu selektovaných jedinců a za předpokladu normálního rozdělení hodnot v populaci nám procento vybraných rodičů z původní populace udává **intenzitu selekce** (i). Selekcční diferencíál pak můžeme vyjádřit jako:

$$S = i \cdot \sigma_p \quad (18)$$

kde i je intenzita selekce (**viz příloha 9.1.**) a σ_p je směrodatná odchylka znaku v populaci.

Očekávaný genetický zisk je pak možno vyjádřit jako:

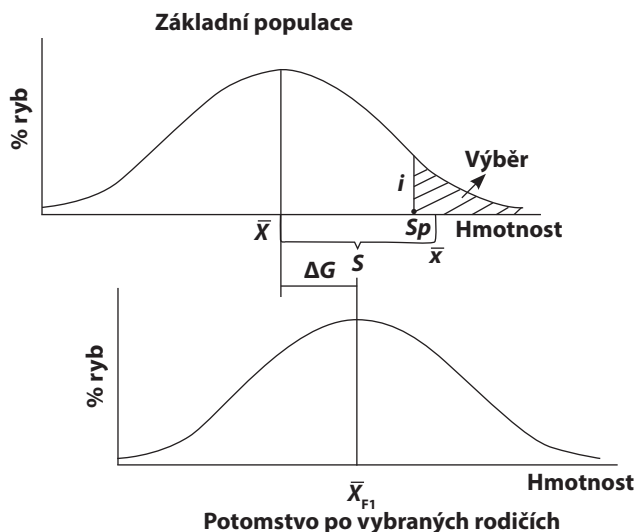
$$\Delta G = i \cdot \sigma_p \cdot h^2 \quad (19)$$

Pokud chceme vyjádřit genetický zisk za rok, vydělíme získanou hodnotu délkou generačního intervalu (L), který udává průměrný věk rodičů při narození jejich prvního potomstva:

$$\Delta G = i \cdot \sigma_p \cdot h^2 / L \quad (20)$$

Pokud chceme vyjádřit genetický zisk v procentech, vydělíme vypočtenou hodnotu ΔG průměrnou hodnotou znaku v původní populaci.

$$\Delta G (\%) = i \cdot \sigma_p \cdot h^2 / \bar{X} \cdot 100 \quad (21)$$



Obr. 9.5. Schématické znázornění selekčního diferencíálu (S), selekčního prahu (S_p) a genetického zisku (ΔG).

$\bar{X}$ – průměrná hodnota základní populace; $\bar{x}$ – průměrná hodnota vybraných rodičů, $\bar{X}_{F1}$ – průměrná hodnota potomstva, i – intenzita selekce (%)

Příloha 9.1. Vyjádření procenta selektovaných jedinců (selekčního tlaku) ze základní populace v počtu směrodatných odchylek (σ) od průměru a odpovídající hodnoty intenzity selekce (i) za předpokladu normálního rozdělení. Převzato od Gjedrem (2005).

% selektovaných jedinců	Počet σ od průměru	Intenzita selekce	% selektovaných jedinců	Počet σ od průměru	Intenzita selekce
0,01	3,719	3,960	9	1,341	1,804
0,05	3,291	3,554	10	1,282	1,755
0,10	3,090	3,367	11	1,227	1,709
0,20	2,878	3,170	12	1,175	1,667
0,30	2,748	3,050	13	1,126	1,627
0,40	2,652	2,962	14	1,080	1,590
0,50	2,576	2,892	15	1,036	1,554
0,60	2,512	2,834	16	0,994	1,521
0,70	2,457	2,784	17	0,954	1,489
0,80	2,409	2,740	18	0,915	1,458
0,90	2,366	2,701	19	0,878	1,428
1,00	2,326	2,665	20	0,842	1,400
2,00	2,054	2,421	25	0,674	1,271
3,00	1,881	2,268	30	0,524	1,159
4,00	1,751	2,154	35	0,385	1,058
5,00	1,645	2,063	40	0,253	0,966
6,00	1,555	1,985	45	0,126	0,880
7,00	1,476	1,918	50	0,000	0,798
8,00	1,405	1,858	60	-0,25	0,644

9.5.4. Realizovaná heritabilita

V kapitole 5.6. bylo naznačeno, že heritabilitu můžeme odhadnout z hodnot zjištěných při odhadu jednotlivých složek fenotypové variance, a to na základě:

- analýzy variance fenotypové proměnlivosti u příbuzných jedinců (rodiče – potomci, polosourozenci, sourozenci);
- regresní a korelační analýzy blízkce příbuzných jedinců (rodiče – potomci, polosourozenci, sourozenci).

Obě tyto metody mají svoje slabé stránky především v tom ohledu, že heritabilita je odhadována za konkrétních podmínek prostředí, které nastaly během prováděného experimentu. V akvakultuře a zejména v rybníčním hospodářství ale nejme schopni vnější podmínky panující v jednom roce přesně zopakovat v roce dalším. Vždy se najde odchylka, která způsobí změnu podmínek prostředí při chovu následné generace. Očekávaný genetický zisk při provádění selekce se může lišit od skutečné hodnoty, neboť odhadnutý koeficient heritability z předchozí generace nemusí odpovídat hodnotě u potomstva chovaného v jiných podmínkách. Proto můžeme skutečnou heritabilitu odhadnout až z výsledku zjištěného v selekčním programu, tedy na základě skutečně dosaženého genetického zisku. Takto zjištěná heritabilita je nazývána **realizovaná heritabilita** a vypočteme ji ze vzorce:

$$h^2 = \frac{\Delta G}{i \cdot \sigma_p} \quad (22)$$

9.5.5. Selekční metody

V kapitole o umělé selekci (9.5.2.) byly zmíněny tři typy selekce rozdělené podle cílové (selektované) skupiny ve fenotypovém rozdělení hodnot v populaci, a to selekce stabilizační, diverzifikační a direkcio-nální. Selekční metody můžeme rozdělovat podle mnoha dalších hledisek.

1. Podle počtu selektovaných znaků rozlišujeme:

- a) Selekcí na jeden znak
- b) Selekcí na více znaků

Selekce na jeden znak je často využívaná metoda, protože je velmi jednoduchá. Jedince vybíráme jen podle jednoho fenotypového ukazatele. Při použití této metody musíme pamatovat na skutečnost, že mezi některými znaky je záporná korelace. Selekcí na jeden znak pak můžeme nepřímo zhoršovat znak jiný. Z tohoto důvodu se selekce na jeden znak používá u komerčně nejdůležitějších znaků, které nám případně vyváží zhoršení znaku jiného ale méně významného. Nejdůležitějším kvantitativními zna-ky jsou ve většině případů růstové vlastnosti (dosažená hmotnost či délka těla).

Selekce na více znaků je komplexnější, ale také pracnější metoda, kdy se při selekci zabýváme několika ekonomicky důležitými znaky. Provádíme-li selekcí nejprve na jeden znak až do doby dosažení požadované genetické úrovně (tzn. po několik generací) a poté začneme selektovat na jiný znak atd., hovoříme o **tandemové selekci**. Selektujeme-li podle všech znaků najednou ale nezávisle, hovoříme o **selekci dle nezávis-lých výběrových úrovní**. Při této metodě je ryba vybrána jako rodič pro budoucí generaci za předpokladu, že splní selekční kritérium (selekční práh) alespoň u jednoho z vybraných znaků. Třetí možností je metoda zvaná **selekční index** či **celkové skóre**. Při této metodě selektujeme jedince podle všech vybraných znaků najednou, a to podle hodnot zjištěných na jedinci samotném či na jeho příbuzných (rodiče, sourozenci, potomstvo). Selekcí index se počítá statistickými metodami v programech založenými na metodách *BP* (*Best Predictor*), *BLP* (*Best Linear Predictor*), *BLUP* (*Best Linear Unbiased Predictor*) a vypočítanou hodnotu se-lekčního indexu označujeme jako **plemennou hodnotu**. Přestože je tato metoda nejpřesnější, má v akva-kultuře malé využití z důvodu problémů spojených s vedením rodokmenů u plemenných ryb či individuál-ních údajů o jejich užitkovosti, užitkovosti jejich potomstva atd. (viz kapitola 9.2.).

2. Podle způsobu selektovaných jedinců rozlišujeme:

- a) Individuální selekcí
- b) Rodinnou selekcí
- c) Selekcí podle rodokmenu
- d) Selekcí uvnitř rodin
- e) Selekcí podle potomstva
- f) Kombinovanou selekcí

Při individuální nebo také **hromadné selekci** vybíráme jedince na základě jeho vlastní užitkovosti. Tato metoda je nejjednodušší, nejrychlejší a u mnoha akvakulturních živočichů jediná dodnes využívaná metoda.

Při individuální selekci musíme provádět selekci v populacích jedinců stejného věku a ze stejných podmínek prostředí (rybníka, nádrže), jinak se můžeme dopustit chyby. Individuální selekci není možné, nebo je velmi složité, provádět u znaků spojených s kvalitou masa, jateční výtěžností, odolností vůči nemocem a nemůžeme při ní zabránit inbreedingu. Při **rodinné selekci** zjišťujeme průměrnou užitkovost rodin a k dalšímu šlechtění vybíráme celou rodinu s nejlepší užitkovostí. Při **selekci podle rodokmenu** vybíráme jedince na základě užitkovosti jeho rodičů a prarodičů. **Selekce uvnitř rodin** je opakem rodinné selekce. Výběrovým kritériem pro jedince je zde jejich odchylka v užitkovosti od průměru rodiny, ke které hodnocený jedinec patří. **Selekce podle potomstva** je prováděna na základě užitkovosti potomků. V akvakultuře se tato metoda příliš nepoužívá kvůli dlouhému generačnímu intervalu ryb a také skutečnosti, že u mnoha akvakulturních druhů je vysoká povýřetová mortalita. **Kombinovaná selekce** v sobě zahrnuje více z výše zmiňovaných metod a z tohoto ohledu je metodou nejefektivnější. Nejčastěji se užívá kombinace rodinné a individuální selekce.

3. Podle počtu prováděných selekcí rozlišujeme:

- a) jednostupňovou,
- b) vícestupňovou.

Při **jednostupňové selekci** vystavujeme jedince jen jedné selekční vlně (výzvě) a při splnění selekčního kritéria je jedinec vybrán pro účely další šlechtitelské práce. Při **vícestupňové selekci** jsou jedinci vystaveni několika selekčním vlnám (výzvám) a pouze jedinci, kteří úspěšně prošli všemi selekcemi, jsou dále používáni ve šlechtění. Tato metoda je výhodná u ryb s delším generačním intervalem, kdy selekcemi postupně snižujeme počet jedinců chovaných až do dospělosti, čímž ušetříme na chovatelských nákladech.

4. Podle procenta vybraných rodičů z původní populace rozlišujeme selekci:

- a) negativní,
- b) pozitivní.

Při **negativní selekci** vyřazujeme jen ryby, které se liší od běžného standardu v populaci tzv. mínus varianty. Nejedná se přitom zpravidla o hodnocení kvantitativních vlastností, ale o hodnocení jejich vzhledu, zdravotního stavu apod. Za normálních okolností je procento takto vyřazených ryb velmi nízké (0–5 %), protože vyřazujeme jen ryby nemocné, s tělesnými vadami, atypickým ošupením, atypickým tvarem těla, u plemenných ryb jedince s nízkou plodností z předchozích let či ryby, u kterých nejsme schopni určit pohlaví. Při **pozitivní selekci** vybíráme jen jedince, kteří splňují selekční kritérium (plus varianty) a v tomto případě hovoříme o selekci v pravém slova smyslu, protože vyřazujeme i ryby zdravé, v dobrém výživném stavu apod. Procento vybraných ryb z populace je nízké, protože čím nižší procento nejlepších ryb vybereme, tím vyšší můžeme očekávat selekční zisk u další generace. Nesmíme přitom ale zapomínat na zachování efektivní velikosti populace vybraných rodičů pro další generaci, abychom se vyvarovali inbreedingu. Základní populace by měla být proto dostatečně početná.

5. Podle charakteru selektovaného znaku rozlišujeme selekci:

- a) přímou,
- b) nepřímou.

Při **přímé selekci** vybíráme jedince podle znaku, který je skutečně předmětem selekce. Takže pokud provádíme selekci za účelem zvýšení hmotnosti, vybíráme jedince na základě fenotypových hodnot jejich hmotnosti. Pokud provádíme selekci na účelem snížení obsahu tuku ve svalovině, provádíme selekci na základě údajů přístroje měřícího v živých rybách relativní hodnotu obsahu tuku ve svalovině atd. Pokud provádíme **nepřímou selekci**, je selekčnímu kritériu vystaven jiný znak než ten, jehož užitečnost chceme šlechtěním pozměnit. Využíváme přitom poznatků, že mezi oběma znaky (dle kterého selektujeme i který nás zajímá) je velmi výrazná genetická korelace (negativní či pozitivní). Genetický zisk při nepřímé selekci můžeme odhadnout ze vztahu:

$$\Delta G = i \cdot h_{p_1} \cdot h_{p_2} \cdot r_g \cdot \sigma_{p_2} \quad (23)$$

kde i je intenzita selekce, h_{p_1} je odmocnina z heritability zjištěné u znaku podle kterého selektujeme, h_{p_2} je odmocnina z hodnoty heritability u znaku, který chceme změnit, r_g je hodnota genetického korelačního koeficientu mezi oběma znaky a σ_{p_2} je směrodatná odchylka fenotypové hodnoty znaku, jehož průměr chceme selekcí změnit.

Nepřímá selekce je vhodná v případech, kdy není možné vlastní hodnotu znaku, který chceme selekcí změnit, zjistit nebo je jeho zjištění technicky náročné. Příkladem může být selekce podle délky těla ryb, ale účelem je zvýšit jejich hmotnost. Mezi oběma znaky je vysoká genetická korelace a selektovat ryby podle délky těla je zpravidla mnohem rychlejší než selekce vážením. Další příklady jsou uvedeny v tab. 9.3.

Tab. 9.3. Příklady možného využití nepřímé selekce.

Znak, který chceme selekcí vylepšit	Znak, podle kterého selektujeme	Druh	Vypočtený r_g	Literatura
Odolnost vůči nemocem	imunologické a fyziologické ukazatele (hemolytická aktivita, IGM, titr protilátke, hladina kortisolu atd.)	losos obecný, pstruh duhový	$\pm 0,37$	Røed a kol., 1990, 1992 Refstie, 1982 Lund a kol., 1995
Konverze krmiva	růst	pstruh duhový	0,78	Gjøen a kol., 1993
Výtěžnost jedlých částí těla	relativní délka hlavy	kapr obecný	-0,7 až -0,9	Kocour a kol., 2007

9.5.6. Seleční strop

I když bylo prokázáno, že v některých případech reagují organizmy po mnoho generací na selekci bez známek jakékoliv selekčního stropu, ve většině případů existuje hranice, po jejímž dosažení není selekce již účinným nástrojem. U velkého množství případů bylo zjištěno, že účinek selekce zeslaboval či zmizel po 20–30 selektovaných generacích při jedné z těchto situací:

- úbytek či ztráta genetické variance znaku;
- genetická variance zůstala zachována, ale další generace na selekci již nereagovaly.

Příčinami tohoto jevu může být jedna nebo více z následujících skutečností:

- bylo dosaženo biologické nebo fyzikální hranice, za kterou není možno jít;
- ztráta fitness nebo vyrovnání hodnot protisměrně působících znaků či jevů (např. ztráta sexuální aktivity či plodnosti u jedinců s rychlým růstem, inbreeding);
- účinek umělé selekce byl zastaven účinkem přírodní selekce.

9.5.7. Výsledky selekčních experimentů v akvakultuře

Do roku 1970 nebylo o možnosti selekce u kvantitativních znaků ryb skoro nic známo. V posledních třech desetiletích zaznamenala však tato oblast velký rozkvět (Dunham, 1996). Selekční odezva na rychlejší růst je u akvakulturních druhů živočichů obecně vyšší než u suchozemských z důvodu jejich poměrně vysoké genetické variance u kvantitativních znaků. Gjedrem (1983) zaznamenal genetickou varianci u růstu ryb, koryšů a měkkýšů na úrovni 20–35 %, zatímco u suchozemských hospodářských zvířat pouze na úrovni 7–10 %. Vysoká plodnost ryb umožňuje také aplikaci vyššího selekčního tlaku. V současnosti je známo přes 200 odhadů heritability u některých kvantitativních znaků vodních organismů (Dunham a kol., 2001) a v mnoha zemích s významným podílem produkce vodních organismů na světovém trhu probíhají národní šlechtitelské programy zaměřené především na selekční šlechtění (Hulata, 2001).

Některé výsledky selekčních experimentů na rychlejší růst u různých vodních organismů jsou shrnuty v tab. 9.4. Genetický zisk za jednu generaci u růstu se pohybuje u ryb v průměru na úrovni 5–7 % (Gjedrem, 1979; Kincaid, 1983; Hersherberger a kol., 1990). U tilapie nilské se ale podařilo vylepšit růst až o 11 % a u sumečka skvrnitého dokonce o 13–14 % (Gjerde, 1986; Padi, 1995) za jednu generaci.

Tab. 9.4. Přehled úspěchu selekce na vyšší růst u některých druhů vodních organismů. Převzato od Dunhama a kol. (2001).

Druh (latinsky)	Genetický zisk (%) za jednu generaci	Počet generací	Literatura
Pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	10,1	4	Kincaid a kol. (1977)
	13,0	2	Gjerde (1986)
	5	6	Kincaid (1983)
Losos obecný (<i>Salmo salar</i>)	14,4	1	Gjerde (1986)
	14	6	Gjerde a Korsvoll (1999)
	7	1	Gjedrem (1979)
Losos stříbrný – Coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	5	10	Hersberger a kol. (1990)
Sumeček skvrnitý (<i>Ictalurus punctatus</i>)	14	4	Dunham (1987)
	7–10	3	Rezk (1993)
	20	1	Bondari (1983)
	13,8	4	Padi (1995)
Tlamevec nilský (<i>Oreochromis niloticus</i>)	15	5	Rye a Eknath (1999)
	11	1	Dunham a kol. (2001)
Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	17	2	Mahapatra a kol. (2000)
Kreveta (<i>Panesus vannamei</i>)	4,4	1	Fjalestad a kol. (1997)
Kreveta (<i>Panesus japonicus</i>)	10,7	1	Hetzel a kol. (2000)
Ústřice (<i>Ostrea chilensis</i>)	9–12	1	Toro a kol. (1996)

Výsledky selekčních programů na vyšší růst u kapra obecného jsou sporné (Vandeputte, 2003). Tran a Nguyen (1993) zaznamenali u kapra obecného po selekci na vyšší růst u šesti generací průměrný genetický zisk za jednu generaci na úrovni 5 %. První pokusy s individuální hromadnou selekcí na růst byly prováděny v Izraeli od roku 1965. Po pěti po sobě jdoucích generacích nebyla zaznamenána pozitivní odpověď (Moav a Wohlfarth, 1976). Růst u F_1 generace, která vznikla z rodičů s vyšším růstem, byl ve srovnání s kontrolní skupinou jen nepatrně lepší a v dalších generacích se již nezvětšoval nebo se dokonce zmenšoval. Selekce na pomalejší růst byla naopak úspěšná. Jako důvody neúspěchu selekce u kapra obecného byly uvedeny následující skutečnosti: 1) snížená genetická variance u aditivní

složky (Hulata, 2001) v důsledku způsobu předchozí domestikace kapra obecného, 2) použití plemene na hranici maximálního selekčního stropu (Moav a Wohlfarth, 1976) nebo 3) silná interakce mezi genotypem a prostředím (Moav a kol., 1975; Wohlfarth a kol., 1983). Vandeputte (2003) však tvrdí na základě dostupných údajů (populační studie, rozdíly mezi plemeny a odhady heritability), že u kapra s největší pravděpodobností uspokojivá aditivní genetická variance existuje. Nemusí to být však případ všech populací, neboť se u kapra obecného běžně k reprodukci používá nízký počet jedinců a mohlo snadno dojít k nežádoucí inbrední depresi. Pokud navíc docházelo k několikerému výtěru a oplození v průběhu dne, měli dříve vykulení jedinci velikostní výhodu již při vysazení do rybníků, a tudíž vykazovali vyšší růst, který neodpovídal genetické kvalitě ryb (Vandeputte, 2003).

Dosud nepublikované výsledky selekčního programu u kapra obecného prováděné na VÚRH JU od roku 2001 s využitím metod molekulární genetiky pro určení původu potomstva u syntetické linie HSM ukazují opačné výsledky v porovnání s těmi zjištěnými v Izraeli (Moav a Wohlfarth, 1976). Při selekci na vyšší růst bylo dosaženo genetického zisku na úrovni až 20 %, u selekce na nižší růst nebyl naopak zjištěn žádný genetický zisk. Díky těmto protichůdným výsledkům u selekce na nižší a vyšší růst je velmi obtížné jednoznačně říci, zda může být selekce u kapra obecného účinným nástrojem při zlepšování jeho růstových vlastností. V prvé řadě je potřeba lépe porozumět interakcím mezi genotypem a prostředím, které, jak se ukázalo, mohou pozměnit účinek selekce.

V bývalém SSSR probíhaly v minulosti selekční programy založené na křížení původních plemen kapra s vyšší genetickou vzdáleností za účelem zvýšení genetické variability. Poté následovala selekce na vyšší růst, požadovaný tvar, životaschopnost nebo adaptabilitu k nepříznivým životním podmínkám (Vandeputte, 2003). Bohužel u většiny z nich nejsou dostupné podrobnější údaje o výsledcích selekce na vyšší růst. Kirpichnikov a kol. (1974) vyšlechtili křížením Amurského divokého kapra s evropskými plemeny a následnou selekcí plemeno Ropsinského kapra, který je homozygotní pro plné ošupení (genotyp SSnn), má vyšší růstové vlastnosti a je odolný k nízkým teplotám. Přežití v nepříznivém zimním období se zvýšilo ze 30–40 % na 77 %. Při šlechtění se zdála nejvýhodnější kombinovaná selekce uplatňující prvky individuální i hromadné selekce.

I když je největší pozornost při selekci věnována právě zlepšení růstových vlastností, sleduje se i kvalita (barva) jedlých částí těla (Dunham, 1996), věk pohlavního dospívání (Longalong a kol., 1999) a efektivita konverze krmiva (Thodesen a kol., 1999). Rovněž selekce na odolnost vůči nemocem je v zájmu chovatelů. Ehlinger (1977) zvýšil rezistenci pstruha obecného a sivena amerického proti furunkulóze. Okamoto a kol. (1993) našli linii pstruha duhového, která je velmi rezistentní proti pankreatické nekróze (úmrtnost 4,3 % ve srovnání s 96,1 % u ostatních populací). U kapra obecného byl selekční program zaměřen na zvýšení růstu a odolnosti vůči jarní virémii, která mnohdy limitovala jeho produkci (Kirpichnikov a kol., 1993). Ryby byly selektovány s intenzitou 30–35 % po dobu devíti generací z jedinců, kteří přežili v obsádkách záměrně infikovaných jarní virémií. Obsádky byly infikovány přísazením nemocných ryb. Výsledkem selekčního programu byl Krasnodarský kapr s prokazatelně vyšší odolností a rovněž vyšším růstem. Bližší podrobnosti o výsledcích selekce na růstu nejsou však známy. Podobný program na zvýšení odolnosti vůči jarní virémii prováděl Schäperclaus (1962). Intenzita selekce nebyla uvedena, ale selektovaná linie vykazovala v 65 rybnících průměrnou úmrtnost jen 11,5 %, zatímco neselektované ryby měly průměrnou úmrtnost v 76 rybnících 5krát vyšší.

Ankorian a kol. (1992) zaznamenali u kapra obecného dobrou odezvu při selekci na poměr mezi výškou a délkou těla. Po jednogenerační selekci odhadli heritabilitu tohoto znaku na 0,47 při zvyšování poměru mezi výškou a délkou těla (protahování tvaru těla) a 0,33 při jeho snižování (čtvercový rámec). Korelace mezi tělesnou stavbou a rychlostí růstu nebyla potvrzena, i když skupina selektovaná na nízký poměr výšky a délky těla vykazovala lepší růst.

Selekce na snižování počtu vnitrosvalových kostí u kapra obecného nebyla úspěšná (Von Sengbusch a Meske, 1967; Kossmann, 1972). Experimentální práce byla v tomto případě ztížena velkou náročností

při určování počtu kostí ve svalovině ryb. Meske (1968) při rentgenovém vyšetření 704 ryb zaznamenal poměrně velkou variabilitu v počtu vnitrosvalových kůstek. Počty kostí se pohybovaly od 70 do 134 ks s průměrnou hodnotou 100 kůstek. Na druhé straně M. Vandeputte (osobní komentář) zaznamenal při analýze filetů z asi 60 ks ryb velmi malou variabilitu v celkovém počtu vnitrosvalových kostí. Vyšší variabilita byla zjištěna u tvaru kostí (jehlicové a vidlicové). Na základě údajů odhadl, že použitím selekce by se počet kostí snížil průměrně o jednu kost za generaci.

9.6. Využití metod molekulární genetiky při šlechtitelské práci v akvakultuře

V předchozích kapitolách zabývajících se kvantitativními znaky a šlechtitelskou prací bylo neustále opakováno, že kvantitativní znaky jsou založeny polygeny, tedy mnoha geny malého účinku. Počet genů je neznámý a ani není jasné, jak se který gen na projevu znaku podílí. Šlechtitelská práce proto byla založena jen na odhadování plemenné hodnoty jedinců (v akvakultuře spíše populací, plemen, linií apod.) podle pozorovaných fenotypových hodnot u příbuzných jedinců s využitím statistických metod. V předchozím textu, zvláště v kapitole 9.2., byla vysvětlena specifika šlechtitelské práce v akvakultuře a s tím spojené problémy s objektivním vyhodnocení výsledků v experimentálních šlechtitelských programech. Rozvoj metod v molekulární biologii a genetice společně s dostupností přístrojového vybavení umožnil úzké propojení molekulární genetiky se šlechtitelskou prací a zpřesnění odhadů jednotlivých složek fenotypové proměnlivosti či selekčních metod.

Postupným mapováním genomů byly specifikovány některé konkrétní úseky DNA v chromozomech s klasickou mendelistickou dědičností, které vykazovaly jistý stupeň polymorfizmu (různorodosti) v délce nebo složení svých fragmentů. Tyto úseky se nazývají **genetické markery** a mají v genetice velmi dobré praktické využití. Genetické markery mohou být kódující úseky genů, ale častěji jsou to úseky DNA s neznámou funkcí (nekódující úseky). Pro kvantitativní genetiku jsou genetické markery využitelné při:

- určování rodičovství,
- vyhledání QTL a selekci (MAS).

9.6.1. Určování rodičovství

Pro určování rodičovství se v akvakultuře hojně využívají mikrosatelitní markery. Mikrosatelity jsou krátké opakující se sekvence (zpravidla dinukleotidů) v nekódujících úsecích DNA. U hospodářsky významných druhů ryb (losos obecný, pstruh duhový, kapr obecný, treska obecná atd.) je známo několik desítek markerů lokalizovaných v různých místech genomu. Porovnáním vzorků DNA (respektive délek jednotlivých fragmentů mikrosatelitů) potomků se vzorky rodičů je možno s využitím počítačové techniky určit původ potomka, neboť se tyto úseky dědí mendelisticky (**příklad 9.3.**).

Příklad 9.3. U kapra obecného byl hledán přímý potomek rodičovského páru (matky A a otce B) ze souboru 4 ryb (označených 1 až 4). K detekci byly použity 4 mikrosatelitní markery s označením MFW1, MFW2, MFW3 a MFW4. Délky fragmentů (v počtu párů bází) jednotlivých mikrosatelitů u vyšetřovaných ryb byly následující:

	Matka A	Otec B	Ryba 1	Ryba 2	Ryba 3	Ryba 4
MFW1	120, 120	150, 150	120, 120	120, 150	120, 150	150, 150
MFW2	180, 154	180, 180	180, 180	154, 154	154, 180	154, 154
MFW3	211, 180	211, 180	211, 180	180, 211	211, 211	180, 180
MFW4	150, 150	125, 125	120, 125	150, 150	150, 125	150, 125

Který z jedinců může být potomkem rodičů A a B? Jelikož potomek dostane vždy jednu alelu od otce a druhou od matky, je na základě porovnání alel v jednotlivých lokusech jisté, že pouze **ryba 3** může být potomkem rodiče A a B (má příslušné alely od obou rodičů).

Výhodou používání genetického určování původu potomstva je možnost chovu všech testovaných jedinců (skupin) od začátku ve společných obsádkách, čímž eliminujeme vliv prostředí projevující se při odděleném chovu. Nevýhodou je stále relativně vysoká cena, proto je tento nástroj využíván především v experimentálních šlechtitelských programech. Přesnost určení původu potomstva závisí na počtu možných rodičovských párů a počtu a polymorfizmu vybraných mikrosatelitních markerů. Příklad úspěšnosti určení rodičů u kapra obecného je znázorněn v tab. 9.5., u ostatních druhů ryb je úspěšnost určení rodičů obdobná. Čím nižší je počet potenciálních rodičovských párů, tím vyšší je úspěšnost určení původu potomků. V některých případech se přesnost přiřazení potomků ke konkrétnímu rodičovskému páru s využitím 5 až 8 mikrosatelitních markerů pohybuje na hranici 99 %.

Tab. 9.5. Příklady úspěšnosti přiřazení potomků k jedinému rodičovskému páru u kapra obecného (linie HSM) s využitím 8 až 11 mikrosatelitních markerů.

	I.	II.	III.
Počet možných rodičovských párů	240	1176	768
Počet analyzovaných potomků	147	812	797
Počet ryb přiřazených k jedinému rodičovskému páru	126	615	647
Procento úspěšnosti	85,7	75,7	81,2

9.6.2. Vyhledávání QTL (Quantitative trait loci) a MAS (Marker assisted selection)

Při porovnávání variance fenotypových hodnot kvantitativních znaků a genetického polymorfizmu některých konkrétních genetických markerů v populacích bylo zjištěno, že mezi nimi existuje významná závislost. Mísita na chromozomu (lokusy) s genetickými markery, u kterých se předpokládá, že jsou spojeny s fenotypovým projevem kvantitativního znaku, se označují jako **QTL (Quantitative trait loci; lokusy kvantitativních znaků)**.

Znamená to tedy, že kvantitativní znaky jsou založeny také geny velkého účinku? Odpověď zní nikoliv. Zmíněný QTL může být sám o sobě genem nebo je ve vazbě s genem (genovou rodinou), které mají na projev kvantitativního znaku velký podíl. Stále však existuje mnoho dalších genů podílejících

se na projevu daného znaku. Vyplývá to z podstaty kvantitativních znaků, které jsou výsledkem mnoha fyziologických a metabolických procesů ve vazbě s vnějšími podmínkami. Na těchto procesech se podílí velké množství enzymů a dalších bílkovinných struktur, které jsou geneticky kódovány. Předpokládáme-li, že každý enzym má svůj gen, je množství genů zodpovědných za projev znaku veliké. Některé geny mají ale na projev znaku větší podíl než jiné.

Díky neustálému snižování finančních nákladů molekulárních metod se začalo uvažovat o využití QTL ve šlechtitelské práci jako možnosti zpřesnění či nahrazení klasických metod kvantitativní genetiky. Podle povahy genetického markeru ve vztahu ke QTL rozlišujeme:

- přímé markery,
- nepřímé markery.

Přímé markery jsou součástí genu zodpovědného za projev znaku a rozlišujeme *funkční markery*, které jsou výsledkem příčinné mutace, a nebo *vlastní přímé markery*, které jsou dány polymorfismem uvnitř vlastního genu. **Nepřímé markery** jsou takové, které nemají na projev znaku přímý vliv, ale jsou s QTL ve vazbě. Nepřímé markery můžeme rozdělit na *LD markery* (*Linkage Disequilibrium*), které jsou s QTL ve vazbové nerovnováze a *LE markery* (*Linkage Equilibrium*), které jsou s QTL ve vazbové rovnováze. Mezi nepřímé markery patří již zmiňované mikrosatelitní (tandemové) sekvence, jinak také STRs (*Short Tandem Repeats*) nebo jednoduché nukleotidové polymorfismy ve funkčních (exonech) i nefunkčních (intronech) částech genu vzniklé mutací (Gjedrem, 2005). Tyto markery označujeme jako SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). **Příklad 9.4.** znázorňuje princip vyhledávání QTL.

Lokusy kvantitativních znaků (QTL) můžeme využít jako jedno ze selekčních kritérií. Tzn. že budeme vybírat jen jedince s takovými QTL, u kterých byl prokázán významný vliv na fenotypovou hodnotu požadovaného kvantitativního znaku. Metoda využívající QTL pro selekci hospodářských zvířat se nazývá „**Marker assisted selection**“ (**MAS**) – **asistovaná selekce podle markerů**. Využití MAS ve šlechtitelských programech může mít tyto výhody:

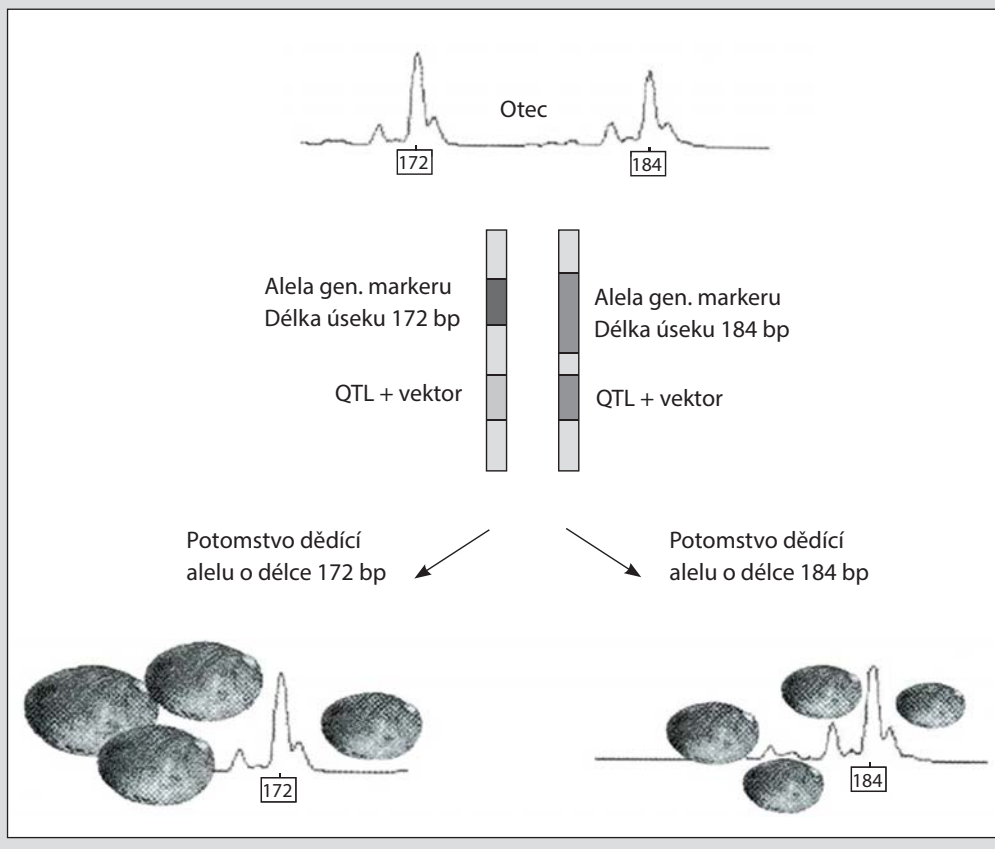
- Jsou zjistitelné již u raných stádií (jakmile můžeme odebrat vzorek DNA, aniž bychom ohrozili život jedince), či dokonce již v gametách.
- Markery pro znaky vyskytující se jen u jednoho pohlaví (ale obě pohlaví do genotypu těchto znaků vnášejí svoje geny) můžeme s využitím MAS zjistit u obou pohlaví.
- Znaky, které se dají hodnotit až u mrtvých jedinců (výťažnostní ukazatele, kvalita masa) se dají zjistit již za života zvířete.
- U znaků s dominantními vztahy můžeme na základě zjištěných genotypů eliminovat heterozygoty, kteří se jinak ve fenotypu neprojeví.

Přes všechny výhody je v současné době využití QTL pro účely MAS velmi omezené. Důvody jsou následující:

- Nedostatek informací o tom, které geny ovlivňují jaký znak, což nám nedovoluje spoléhat se jen na QTL. Proto je nezbytné při používání QTL pracovat i s informacemi o fenotypových hodnotách.
- Při využití nepřímých markerů nesledujeme příčinou mutaci, ale jen polymorfismus, který je s ní ve vazbě. Tato vazba nemusí být stálá. Může dojít k rekombinacím (*crossing-over*) nebo se v jiné populaci může vyskytovat jiná vazbová fáze.

- Při mapování vlivu QTL vycházíme z údajů o fenotypu. Zjištění fenotypových hodnot může být zatíženo chybou (chybné statistické zpracování, změření atd.).
- Stále velmi vysoká cenová náročnost neodpovídající zisku v případech zlepšení úrovně kvantitativního znaku.
- Kvůli velkému množství markerů je velká pravděpodobnost chybného určení vlivu markeru na daný znak.
- QTL může mít škodlivý účinek na jiné znaky (např. pleiotropie atd.). Při využití MAS může snadno dojít ke 100% fixaci jedné alely v populaci. Proto je nutné znát všechny účinky dané alely nebo neprovádět MAS až na úroveň 100%.

Příklad 9.4. Princip vyhledávání QTL u ušní rodu *Haliotis*. Otec je heterozygotní v délce genetického markeru (172 a 184 bp) ve vazbě s QTL. Potomstvo po tomto otci je rozděleno na dvě skupiny podle alely genetického markeru, kterou nesou (se 172 nebo 184 bp). Průkazný rozdíl v průměrné velikosti mezi skupinami naznačuje, že tento genetický marker je ve vazbě s QTL. V tomto případě je QTL pro lepší růst spojen s alelou o délce 172 bp a QTL pro nižší růst je spojen s alelou o délce 184 bp. (Převzato od Gjedrema, 2005).



V současné době je u akvakulturních druhů známo jen malé množství QTL a jejich využití při asistované selekci je ve fázi experimentálních programů. QTL byly popisovány u tlamouna nilského, lososa obecného, pstruha duhového či u kapra obecného. Zjištěné QTL se u kapra obecného či tlamouna nilského vztahují k odolnosti vůči nízkým teplotám vody (Cnaani a kol., 2003; Sun a Liang, 2004), vyšší salinitě (Lee, 2003) či červené barvě těla u tlamouna (Howe a Kocher, 2003). U pstruha duhového byl zaznamenán QTL pro odolnost vůči infekční pankreatické nekróze (IPN) (Ozaki a kol., 2000) a u lososa k infekční anémii (ISA) (Moen a kol., 2004). Objevením lokalizace a struktury genů pro růstové faktory (růstový hormon – GH, prolaktin – PRL, somatolaktin – SL, inzulinový růstový faktor 1 – IGF 1) či spouštěčů těchto genů (GHRH – growth hormone releasing hormone) se nabízí možnost jejich využití k asistované selekci (MAS) na základě polymorfizmu (v intronech i exonech). První pozitivní výsledky byly zjištěny u lososa obecného (Gross a Nilsson, 1999) nebo platýze *Paralichthys olivaceus* (Kang a kol., 2002).

9.7. Šlechtitelské programy v ČR a ve světě a jejich organizace

Šlechtitelské programy v akvakultuře závisí na místních podmínkách, druhu chované ryby (korýše, měkkýše) a způsobu nebo intenzitě hospodaření. Spíše než mezi jednotlivými státy existují rozdíly ve šlechtění mezi rybníčním hospodařením a intenzivním způsobem chovu, ať již ve venkovních podmínkách nebo uzavřených systémech. Rozdíl v intenzitě je dán zpravidla hustotou ryb na jednotku objemu vody v nádrži a na složení potravy (přirozená potrava + příkrmování vs. intenzivní krmení krmnými směsmi). Intenzita hospodaření je částečně ovlivněna druhem chovaných ryb. Některé druhy ryb se však chovají extenzivně, polointenzivně i intenzivně.

V **České republice** je hlavním chovaným druhem kapr obecný, který tvoří okolo 85 % celkové roční produkce ryb. Dalšími druhy, kde je možno hovořit o šlechtitelské práci jako o cílené aktivitě za účelem dosažení genetického vylepšení požadovaných užitkových vlastností, jsou lín obecný a pstruh duhový. U některých dalších druhů (sumec velký, síh severní, maréna a síh peled) se udržují systematickou prací plemena, linie nebo čisté druhy z důvodu ochrany původních genových zdrojů (viz kapitola 2). V rámci ČR existuje několik odlišných způsobů šlechtění, obnovy a výběru plemenných ryb a jejich chovu, a to zejména v návaznosti na místní tradice, podmínky a zaběhnuté principy (tab. 9.6.). Základní podmínky při šlechtění a plemenitbě ryb jsou upraveny novelou zákona č. 154/2000 Sb. o šlechtění a plemenitbě hospodářských zvířat a jeho vyhláškou. Mezi základní principy patří zejména:

- generační hejno plemenných ryb musí být složeno minimálně ze 120 jedinců;
- plemenné ryby zařazené do generačního hejna musí být individuálně označeny;
- při obnově hejna plemenných ryb je nutno zařadit do umělého výtěru minimálně 15 matek a 25 otců;
- jedince z neověřených populací nově zařazovaných do generačního hejna plemenných ryb je nutné geneticky otestovat kvůli genetické variabilitě a možnosti kontaminace jinými plemeny;
- jednotlivá plemena u kapra obecného, lína obecného a pstruha duhového je nutno pravidelně testovat na užitkovost (viz kapitola 10).

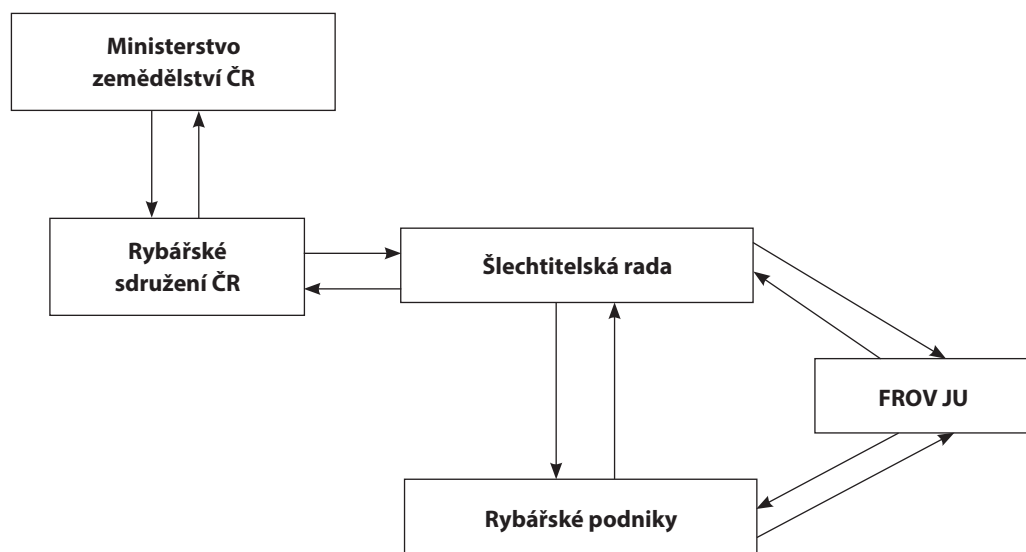
Při šlechtitelské práci je potřeba rozlišovat dvě základní roviny:

- šlechtění na úrovni plemenných ryb;
- šlechtění na úrovni konečných užitkových populací ryb (ryb určených ke konzumaci).

Tab. 9.6. Přehled šlechtitelských metod v ČR u jednotlivých druhů ryb.

Druh	Metoda	Cíle šlechtění	Frekvence
Kapr obecný	čistokrevná plemenitba	udržení stavu plemenných ryb produkce užitkových populací	standardně standardně
	křížení	produkce užitkových hybridů s vyšší výkonností tvorba nových linií a plemen tvorba syntetických populací	standardně příležitostně příležitostně
	systematická selekce	zlepšení užitkových vlastností plemenných ryb i užitkových populací	experimentálně
	genomové manipulace	produkce celosamičích populací	experimentálně
Lín obecný	čistokrevná plemenitba	udržování stavu plemenných ryb produkce užitkových populací	standardně standardně
	křížení	produkce užitkových hybridů s vyšší výkonností tvorba syntetických populací	příležitostně příležitostně
	genomové manipulace	produkce triploidních a gynogenetických populací	experimentálně
Pstruh duhový	čistokrevná plemenitba	udržování stavu plemenných ryb produkce užitkových populací	standardně standardně
	selekce	zlepšování užitkových vlastností plemenných ryb i užitkových populací	příležitostně
Ostatní druhy	čistokrevná plemenitba	udržování stavu plemenných ryb produkce užitkových populací	standardně standardně

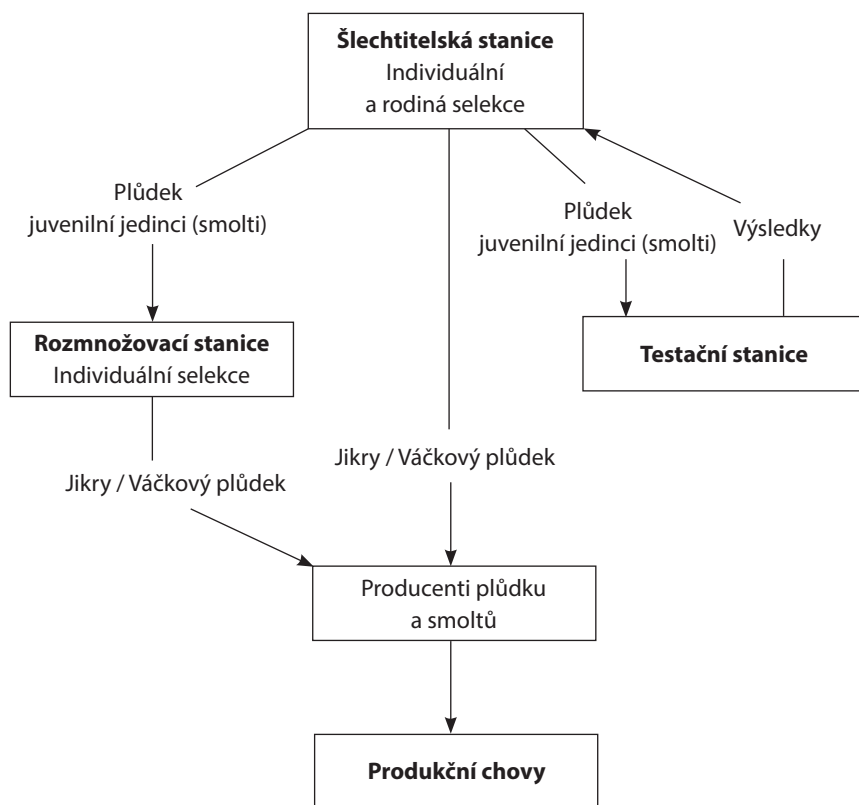
V České republice je šlechtění na rybářských podnicích za účelem cíleného zvyšování požadovaných užitkových vlastností zaměřeno především na cílový tržní produkt a ne na vlastní plemenné ryby. Generační hejna plemenných ryb jednotlivých plemen (linií) jsou udržována čistokrevnou plemenitbou podle výše uvedených principů se snahou zamezit inbreedingu a inbrední depresi. Díky individuálnímu značení mohou být u každé plemenné ryby v generačním hejnu zaznamenávány údaje o růstu, biometrických a reprodukčních ukazatelích, zdravotním stavu atd. Při výběru a zařazování ryb do generačních hejn se zpravidla provádí jen negativní selekce nebo selekce subjektivní založená na zkušenostech osoby provádějící výběr ryb. Protože je šlechtitelská činnost v úzké návaznosti na činnost výzkumnou, je šlechtění na úrovni plemenných ryb prováděno z převážné většiny na Fakultě rybářství a ochrany vod ve Vodňanech, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (FROV JU). Další chovatelské subjekty mají z hlediska plemenářské práce povahu rozmnožovacích a užitkových chovů (reprodukují plemenné ryby nebo produkují meziplemenné hybridy částečně na prodej, částečně pro vlastní tržní produkci) nebo výhradně povahu užitkových chovů. Šlechtitelská činnost ryb v ČR je koordinována Šlechtitelskou radou Rybářského sdružení České republiky za pomoci FROV JU (obr. 9.6.).



Obr. 9.6. Organizace řízení šlechtitelské práce u ryb v České republice.

Ve **světě** je nepoužívanější metodou pro zvyšování užitkovosti selekce vycházející z čistokrevné plemenitby. Vnitrodruhová hybridizace (křížení) se používá jen okrajově nebo jako nástroj pro zakládání **syntetických linií (populací)** před zahájením selekčního programu. Syntetická populace se zakládá použitím většího množství rodičovských populací stejného druhu (plemen, linií, oddělených populací) zpravidla systémem dialelního křížení. Účelem je vytvoření populace, která v sobě kombinuje výhody jednotlivých rodičovských populací a je více geneticky heterogenní. Vyšší heterogenita má za následek dosažení vyšší směrodatné odchylky a variačního koeficientu fenotypových hodnot kvantitativních znaků a v prvních generacích lze tak očekávat vyšší genetický zisk. Založením syntetické populace také oddálíme nežádoucí efekt inbreedingu.

Nejrozsáhlejší a intenzivní šlechtitelské programy probíhají zpravidla u hospodářsky nejdůležitějších akvakulturních organismů (např. losos obecný, *Salmo salar*, a další druhy lososů rodu *Oncorhynchus*; pstruh duhový, *Oncorhynchus mykiss*; tlamouni rodu *Oreochromis*; sumeček skvrnitý, *Ictalurus punctatus*; mořčák evropský, *Dicentrarchus labrax*; a dále rozličné druhy tresek, platýzů, z korýšů krevety a z měkkýšů ústřice, hřebenatky a ušně). Existují ale i výjimky, zvláště u druhů chovaných ve východní Asii (např. kapr obecný, amur bílý, tolstolobici), kde i přes obrovské celoroční produkce není cílená šlechtitelská práce prováděna nebo jen ve velmi omezené míře. Vysokých produkci je zde dosahováno především chovem ryb na mnoha malých farmách, které se systematickým vylepšováním genetického potenciálu ryb nezabývají.



Obr. 9.7. Struktura šíření genetického zisku ve šlechtitelském programu lososa obecného, *Salmo salar* v Norsku. Převzato od Gjødrema (2005).

V současné době probíhá nejvyšší intenzita šlechtitelských programů u lososa obecného. Struktura šlechtitelského programu u lososa obecného v Norsku, jako země s nejvyšší produkcí tohoto druhu na světě, je znázorněna na obr. 9.7. V mnoha případech se šlechtitelé a chovatelé států v rámci stejného hospodářského celku (např. EU, Severní a Jižní Amerika, východní Asie, Afrika) sdružují a vytvářejí mezinárodní šlechtitelské programy zaměřené na genetické zlepšování požadovaných kvantitativních znaků. S diverzifikací (rozšiřováním) produkce různých druhů organismů v akvakultuře se rozšiřují i šlechtitelské programy.

LITERATURA

- Ankorion, Y., Moav, R., Wohlfarth, G.W., 1992. Bidirectional mass selection for body shape in common carp. *Genetique, Selection, Evolution* 24: 43–52.
- Ayles, G.B., Baker, R.F., 1983. Genetic differences in growth and survival between strains and hybrids of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) stocked in aquaculture lakes in the Canadian prairies. *Aquaculture* 33: 269–280.
- Bakos, J., 1979. Crossbreeding Hungarian races of common carp to develop more productive hybrids. In: Pillay, T.V.R., Dill, W. (Eds), *Advances in Aquaculture*. Fishing News Books Ltd., Farnham, Surrey, UK, pp. 633–635.
- Bakos, J., 1990. Productivity improvement of common carp by hybridization of different landraces. Symposium on carp genetics, Szarvas, Hungary.
- Bakos, J., Gorda, S., 1995. Genetic improvement of common carp strains using intraspecific hybridization. *Aquaculture* 129: 183–186.
- Bentsen, H.B., Eknath, A.E., Palada-de Vera, M., Danting, J.C., Bolivar, H.L., Reyes, R.A., Dionisio, E.E., Longalong, F.M., Circa, A.V., Tayamen, M.M., Gjerde, B., 1998. Genetic improvement of farmed tilapias: Growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 160: 145–173.
- Benzie, J.A.H., Kenway, M., Ballment, E., Fresher, S., Trott, L., 1995. Interspecific hybridization of the tiger prawns *Penaeus monodon* and *Penaeus esculentus*. *Aquaculture* 133: 103–111.
- Bialowas, H., 1991. Possibilities of application of the heterosis effect in commercial production of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Hydrobiologica* 33: 319–334.
- Bondari, K., 1983. Response to bidirectional selection for body weight in channel catfish. *Aquaculture* 33: 73–81.
- Cnaani, A., Hallerman, E.M., Ron, M., Weller, J.I., Indelman, M., Kashi, Y., Gall, G.A.E., Hulata, G., 2003. Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F-2 tilapia hybrid. *Aquaculture* 223: 117–128.
- Dunham, R.A., 1987. American catfish breeding programs. Selection, hybridization and genetic engineering in aquaculture. European Inland Fisheries Advisory Commission (EIFAC) Symposium. Bordeaux, France, 1986.
- Dunham, R.A., 1996. Contribution of genetically improved aquatic organisms to global food security. International Conference on Sustainable Contribution of Fisheries to Food Security. Government of Japan and FAO, Rome, 150 pp.
- Dunham, R.A., Majumdar, K., Hallerman, E., Bartley, D., Mair, G., Hulata, G., Liu, Z., Pongthana, N., Bakos, J., Penman, D., Gupta, M., Rothlisberg, P., Hoerstgen-Schwark, G., 2001. Review of the status of aquaculture genetics. In: Subasinghe, R.P., Bueno, P., Phillips, M.J., Hough, C., McGladdery, S.E., Arthur, J.R. (Eds), *Aquaculture in the Third Millennium*. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20–25 February 2000, NACA, Bangkok and FAO, Rome, pp. 137–166.
- Ehlinger, N.F., 1977. Selective breeding of trout for resistance to furunculosis. *New York Fish Game Journal* 24: 25–36.
- Emelyanova, O.V., Cherfas, N.B., 1980. Results of cytological analysis of unfertilized eggs of F1 females obtained from crossing o crucian carp and o common carp. *Proceedings of All-Union Research Institute of Pond Fishery (Moscow)* 28: 106–115. [In Russian].
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th edition. Longman, Harlow, UK. 464 pp.

- FAO [online]. Fishery statistical collection. <http://www.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=topic&fid=16003>.
- Fjalestad, K.T., Gjedrem, T., Carr, W.H., Sweeney, J.N., 1997. Final report: the shrimp breeding program. Selective breeding of *Penaeus vannamei*. AKVAFORSK Rep. No. 17/97, 85 pp.
- Flegel, J., 2005. Evoluční biologie. Academia, Praha, 560 s.
- Gall, G.A.E., 1975. Genetic reproduction in domesticated rainbow trout. Journal of Animal Science 40: 19–28.
- Gela, D., Linhart, O., 2000. Evaluation of slaughtering value of common carp from diallel crossing (Hodnocení výtěžnosti kapra obecného z dialelního křížení). Czech Journal of Animal Science 45: 53–58.
- Gjedrem, T., 1979. Selection for growth rate and domestication in Atlantic salmon. Zeitschrift fur Tierzucht und Zuchtungsbiologie 96: 56–59.
- Gjedrem, T., 1983. Genetic variation in quantitative traits and selective breeding in fish and shellfish. Aquaculture 33: 51–72.
- Gjedrem, T., 2005. Selection and breeding programs in aquaculture. Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 364.
- Gjerde, B., 1986. Growth and reproduction in fish and shellfish. Aquaculture 57: 37–55.
- Gjerde, B., Korsvoll, A., 1999. Realised selection differentials for growth rate and early sexual maturity in Atlantic salmon (abstract). Aquaculture Europe 99, Trondheim, Norway, pp. 73–74.
- Gjerde, B., Refstie, T., 1984. Complete diallel cross between five strains of Atlantic salmon. Livestock Production Science 11: 207–226.
- Gjøen, H.M., Storebakken, T., Austreng, E., Refstie, T., 1993. Genotypes and nutrient utilization. Fish Nutrition in Practise, Blarritz (France), June 24–27, 1991. Ed. INRA, Paris (Les Colloques, n°61), pp. 19–26.
- Gomelsky, B., Cherfas, N.B., Emelyanova, O.V., 1985. On the ability of hybrids between crucian carp and common carp to produce diploid spermia. Doklady Akademii Nauk SSSR (DAN) 282: 1255–1258. [In Russian].
- Gomelsky, B.I., Emelyanova, O.V., Recoubatsky, A.V., 1988. Phenomen on gamete unredution in interspecific fish hybrids and its possible significance in origin of bisexual tetraploid species. In: Severtzov, A.S. (Ed.), Problemi Mikroevoljutzii, Moscow University, Moscow, Russia, pp. 93–94. [In Russian].
- Gross, R., Nilsson, J., 1999. Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and its association with weight among the offspring of a hatchery stock. Aquaculture 173: 73–80.
- Hershberger, W.K., Meyers, J.M., McAuley, W.C., Saxton, A.M., 1990. Genetic changes in growth of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in marine netpens, produced by ten years of selection. Aquaculture 85: 187–197.
- Hetzel, D.J.S., Crocos, P.J., Davis, G.P., Moore, S.S., Preston, N.C., 2000. Response to selection and heritability for growth in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture 181: 215–223.
- Howe, A., Kocher, T.D., 2003. Comparative mapping of a QTL for red body colour in Tilapia. Plant & Animal Genomes XI: Aquaculture workshop, January 11–15, San Diego, CA, USA. W26.
- Hulata, G., 1995. A review of genetic improvement of commom carp (*Cyprinus carpio* L.) and other cyprinidis by crossbreeding, hybridization and selection. In: Billard, R., Gall, G.A.E. (Eds), The Carp Symposium, Budapest, Hungary, September 6–8, 1993, Aquaculture 129: 143–155.
- Hulata, G., 2001. Genetic manipulation in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. Genetica 111: 155–173.
- Chevassus, B., 1979. Hybridization in salmonids: Results and perspectives. Aquaculture 17: 113–128.

- Kang, J.H., Lee, S.J., Park, S.R., Ryu, H.Y., 2002. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science 68: 494–498.
- Kincaid, H.L., 1983. Results from six generations of selection for accelerated growth rate in a rainbow trout population (abstract). In: The future of aquaculture in North America, Fish Culture Section of the American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, pp. 26–27.
- Kincaid, H.L., Bridges, W.R., Von Limbach, B., 1977. Three generations of selection for growth rate in fall spawning rainbow trout. Transactions of the American Fisheries Society 106: 621–629.
- Kirpichnikov, V.S., Ponomarenko, K.V., Tolmacheva, N.V., Tsoi, R.M., 1974. Methods and effectiveness of breeding in Ropshian carp. II. Methods of selection. Sovetskaja Genetika 10: 1108–1116.
- Kirpichnikov, V.S., Ilyassov, Y.I., Shart, L.A., Vikham, A.A., Ganchenko, M.V., Ostashevsky, L.A., Simonov, V.M., Tikhonov, G.F., Tjurin, V.V., 1993. Selection of Krasnodar common carp (*Cyprinus carpio* L.) for resistance to dropsy: principal results and prospects. Aquaculture 111: 7–20.
- Knibb, W.R., Gorshkova, G., Gorshkov, S., 1997. Growth of strains of gilthead seabream *Sparus aurata* L. Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh 49: 57–66.
- Kocour, M., Mauger, S., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., Vandeputte, M., 2007. Heritability estimates for processing and quality traits in common carp (*Cyprinus carpio*) using a molecular pedigree. Aquaculture 270: 43–50.
- Kossmann, H., 1972. Research on genetic variance of the intermuscular bones in common carp. Theoretical and Applied Genetics 42: 130–135.
- Lee, W., 2003. Detection of QTL for salinity tolerance of Tilapia. Plant & Animal Genomes XI: Aquaculture workshop, January 11–15, San Diego, CA, USA. W24.
- Liu, S., Liu, Y., Zhou, G., Zhang, X., Luo, C., Feng, H., He, X., Zhu, G., Yang, H., 2001. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp x common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. Aquaculture 192: 171–186.
- Longalong, F.M., Eknath, A.E., Bentsen, H.B., 1999. Response to bi-directional selection for frequency of early maturing females in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 178: 13–25.
- Lund, T., Gjerdem, T., Bentsen, H.B., Eide, D.M., Larsen, H.J.S., Roed, K.H., 1995. Genetic variation in immune parameters and associations to survival in Atlantic salmon. Journal of Fish Biology 46: 748–758.
- Mahapatra, K.D., Meher, P.K., Saha, J.N., Gjerde, B., Reddy, P.V.G.K., Jana, R.K., Sahoo, M., Rye, M., 2000. Selection response of rohu, *Labeo rohita*, for two generations of selective breeding. The Fifth Indian Fisheries Forum, 17–20 January, 2000, Abstracts.
- Meske, Ch., 1968. Breeding carp for reduced number of intermuscular bones and growth of carp in aquaria. Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh 20: 105–120.
- Moav, R., Wohlfarth, G., 1976. Two way selection for growth rate in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). Genetics 82: 83–101.
- Moav, R., Wohlfarth, G.W., Hulata, G., 1975. Genetic differences between the Chinese and European races of the common carp. I. Analysis of genotype-environment interactions for growth rate. Heridity 34: 323–340.
- Moen, T., Fjalestad, K.T., Munck, H., Gomez-Raya, L., 2004. A multistage testing strategy for detection of quantitative trait loci affecting disease resistance in Atlantic salmon. Genetics 167: 851–858.
- Okamoto, N., Tayaman, T., Kawanobe, M., Fujiki, N., Yasuda, Y., Sano, T., 1993. Resistance of a rainbow trout strain to infectious pancreatic necrosis. Aquaculture 117: 71–76.
- Ozaki, A., Sakamoto, T., Khoo, S., Nakamura, K., Coimbra, M.R.M., Akutsu, T., Okamoto, N., 2000. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance / susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPN) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular Genetics and Genomics 265: 23–31.

- Padi, J.N., 1995. Response and correlated responses to four generations of selection for increased body weight in the Kansas strain channel catfish, *Ictalurus punctatus*, grown in earthen ponds. M.Sc. Thesis. Auburn University, AL, USA.
- Pokorný, J., 1996. Fifteen years of activity of the breeding and testing station in fish culture. In: Flajšhans, M. (Ed.), Sborník vědeckých prací k 75. výročí založení VÚRH, VÚRH JU, Vodňany, s. 11–21.
- Pokorný, J., Flajšhans, M., Hartvich, P., Kvasnička, P., Pružina, I., 1995. Atlas kaprů chovaných v České republice. Victoria Publishing, Praha, 69 s.
- Refstie, T., 1982. Preliminary results: differences between rainbow trout families in resistance against vibriosis and stress. In: van Muiswinkel, W.B. (Ed.), Developmental and Comparative Immunology, suppl. 2. Pergamon Press, New York, USA, pp. 205–209.
- Rezk, M.S., 1993. Response and correlated responses to three generations of selection for increased body weight in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Ph.D. Dissertation. Auburn University, AL, USA.
- Røed, K.H., Brun, E., Larsen, H.J., Refstie, T., 1990. The genetic influence on serum hemolytic-activity in rainbow-trout. Aquaculture 85: 109–117.
- Røed, K.H., Fjalestad, K., Larsen, H.J., Midthjel, L., 1992. Genetic-variation in hemolytic-activity in atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Journal of Fish Biology 40: 739–750.
- Rye, M., Eknath, A.E., 1999. Genetic improvement of tilapia through selective breeding – experience from Asia, In: Towards Predictable Quality, Abstract of Contributions Presented at Aquaculture Europe 99. European Aquaculture Society Special Publication 27, Oostende, Belgium, pp. 207–208.
- Sbírka zákonů ČR, 2006, částka 106. Zákon č. 344/2006 Sb., Úplné znění zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon), jak vyplývá z pozdějších změn. Tiskárna MV, Praha.
- Schäperclaus, W., 1962. Traité de pisciculture en étang. Vigot Freres, Paris, 620 pp.
- Smíšek, J., 1979. Výzkum exteriéru, heritability a biochemických hodnot v genetice kapra v ČSSR. Bulletin VÚRH Vodňany 15 (1): 3–12.
- Sun, X.W., Liang, L.Q., 2004. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping of a loci associated with cold tolerance. Aquaculture 238: 165–172.
- Thodesen, J., Grisdale-Helland, B., Helland, S.J., Gjerde, B., 1999. Feed intake, growth and feed utilization of offspring from wild and selected Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 180: 237–246.
- Toro, J.E., Aguila, P., Vergara, A.M., 1996. Spatial variation in response to selection for live weight and shell length from data on individually tagged Chilean native oysters (*Ostrea chilensis* Philippi, 1845). Aquaculture 146: 27–36.
- Tran, M.T., Nguyen, C.T., 1993. Selection of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Vietnam. Aquaculture 111: 301–302.
- Vandeputte, M., 2003. Selective breeding of quantitative traits in the common carp (*Cyprinus carpio*): a review. Aquatic Living Resources 16: 399–407.
- Von Sengbusch, R., Meske, Ch., 1967. Auf dem Wege zum gratenlosen Karpfen. Zuechter 37: 271–274.
- Wohlfarth, G.W., 1993. Heterosis for growth rate in common carp. Aquaculture 113: 31–46.
- Wohlfarth, G.W., Moav, R., Hulata, G., 1983. A genotype-environment interaction for growth rate in the common carp, growing in intensively manured ponds. Aquaculture 33: 187–195.
- Wohlfarth, G.W., Moav, R., Hulata, G., 1986. Genetic differences between the Chinese and European races of the common carp. 5. Differential adaptation to manure and artificial feeds. Theoretical and Applied Genetics 72: 88–97.

TESTOVÁNÍ UŽITKOVOSTI U RYB A ODHAD PLEMENNÉ HODNOTY

M. Kocour

0

TESTOVÁNÍ UŽITKOVOSTI U RYB A ODHAD PLEMENNÉ HODNOTY

M. Kocour

Ověření genetického potenciálu výsledného produktu šlechtitelské práce nebo nově dovezených plemen, linií či skupin ryb (popř. koryšů a měkkýšů) se provádí testováním jejich užítkovosti. V akvakultuře je pozornost ve většině případů zaměřena na porovnávání užítkových znaků mezi kříženci, plemeny, liniemi, chovnými skupinami či rodinami. Hodnocení jednotlivců není díky specifickým šlechtitelské práce v akvakultuře (viz kapitola 9.) efektivní. Účelem testování je ověření užítkovosti organismů v podmínkách, které co nejvíce odpovídají běžnému způsobu chovu konkrétního druhu a hospodaření v dané zemi. Při provádění testování užítkovosti a odhadu plemenné hodnoty by měly být zajištěny dvě základní podmínky:

- **vhodný model testování**, který zajistí objektivní statistické vyhodnocení testu;
- **přijatelná technická, časová a finanční náročnost** provádění testování v provozních nebo polo-provozních podmínkách.

Bohužel výše zmíněné podmínky jsou ve vzájemném rozporu a vhodný model testování se z důvodu mnoha faktorů liší případ od případu. Z těchto důvodů se v akvakultuře používá několik různých způsobů testování. Cílem této kapitoly je podat podrobné informace o testování ryb především v podmínkách České republiky.

10.1. Testování užítkovosti ryb v České republice

Testování užítkovosti ryb v České republice je pravidelně prováděno od 70. let 20. století. První testy byly prováděny sice s opakováním, ale bez respektování rozdílných podmínek mezi rybníky. Od 80. let 20. století začala být používána interní kontrolní skupina, ale počty používaných rodičů k založení experimentálních populací byly velmi nízké. Navíc bylo používáno heterospermické oplození jiker, které rovněž značně snižovalo genetickou variabilitu testované populace s ohledem k populaci rodičovské. Od 90. let 20. století byla metodika testování doplněna s ohledem k zachování přijatelné genetické variability a v této podobě se dostala i do vyhlášky č. 471/2000 Sb. k zákonu č. 154/2000 Sb. o šlechtění a plemenitbě hospodářských zvířat (plemenářský zákon). Při novelizaci plemenářského zákona byla vlastní metodika testování z upravené prováděcí vyhlášky č. 448/2006 Sb. vyňata s tím, že metodika testování bude jednotně určována příslušným chovatelským sdružením, kterým je pro oblast chovu ryb Rybářské sdružení ČR. Metodika testování zůstala i po tomto zásahu prakticky nezměněna. Kontroly užítkovosti ryb jsou pravidelně prováděny u kapra obecného, lína obecného a pstruha duhového. Při kontrolách užítkovosti rozlišujeme testování užítkovosti a odhad plemenné hodnoty.

10.1.1. Metodika při provádění kontrol užítkovosti

A. Znaky a vlastnosti hodnocené při kontrole užítkovosti

V chovech plemenných ryb a v testovacích stanicích se při provádění kontroly užítkovosti sledují:

1. Reprodukční užítkovost u vytíraných ryb (rodičů), kde se hodnotí:

- Celkový počet jiker na 1 kg hmotnosti jikernačky.

- U lososovitých ryb velikost jiker v mm, u ostatních druhů hmotnost jiker na 1 kg hmotnosti jikernačky.
- Objem spermatu v ml na 1 kg hmotnosti mlíčáka.
- Počet spermií na 1 kg hmotnosti mlíčáka.
- Procento oplozenosti jiker v očních bodech.
- Celkové množství rozplavaného váčkového plůdku.

II. Procento přežití testovaných ryb

- Při testování ryb v rybnících se procento přežití zjišťuje optimálně v každém roce testování:

- a) za vegetační období – od jarního nasazení do podzimního výlovu;
- b) mimo vegetační období při komorování – od podzimního nasazení do jarního výlovu.

Minimálně je nutné stanovit přežití jednotlivých skupin po nebo před každou novou vegetační sezónou a na konci testu.

- Při testování ryb ve speciálních zařízeních při každém přelovení nebo ředění obsádky testovaných ryb, minimálně 4× za období testování.

III. Růst testovaných ryb

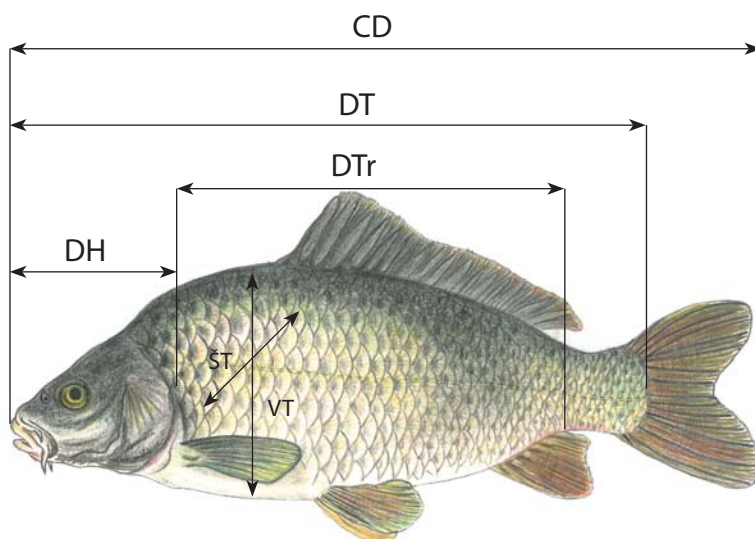
Růst ryb se sleduje v průběhu testování jako momentální živá hmotnost, která je zjišťována:

- při testování v rybnících nejméně jednou ročně až do tržní velikosti, optimálně po každém vegetačním období a po komorování;
- při testování ve speciálních rybochovných zařízeních v pravidelných intervalech nejméně 4× za období testu (vážení na počátku a na konci testu se započítávají).

IV. Plastické znaky z každé skupiny v tržní velikosti, kterými jsou:

- **Celková délka** (CD) v mm měřená od předního okraje rypce k nejzazšímu místu ocasní ploutve.
- **Délka těla** (DT) v mm měřená od předního okraje rypce ke konci ocasního násadce.
- **Délka trupu** (DT_r) v mm je charakterizována jako nejkratší vzdálenost od konce hlavy ke konci řitní ploutve.
- **Délka hlavy** (DH) v mm měřená od předního okraje rypce až po nejzazší konec skřelových víček.
- **Výška těla** (VT) v mm měřená jako kolmice k podélné ose těla v místě největší vzdálenosti mezi hřbetem a břichem.
- **Šířka těla** (ŠT) v mm měřená jako kolmice k podélné ose těla v místě největší vzdálenosti mezi levou a pravou stranou těla.

Grafické znázornění měření délkových plastických znaků je znázorněno na obr. 10.1.



Obr. 10.1. Schéma měření plastických znaků ryb. Ilustrace ryby Lucie Mrázová.

- **Celková hmotnost ryby** v g.
- **Hmotnost opracovaného trupu** v g. Opracovaným trupem se rozumí:
 - a) u kaprovitých ryb, candáta obecného, jeseterů, okouna říčního, okounka pstruhového, sumce velkého, štiky obecné a tilápie tělo bez hlavy, šupin, vnitřních orgánů a ploutví oddělených těsně při bázi těla;
 - b) u lína obecného, mníka jednovousého, pstruhů, sivenů, sumecků a úhoře říčního tělo s hlavou, bez žaber a vnitřních orgánů;
 - c) u lipana podhorního a síhů tělo s hlavou bez žaber, šupin a vnitřních orgánů.
- **Hmotnost hlavy** v g oddělené od těla obloukovitým řezem tak, aby pletenec prsních ploutví zůstal u těla.
- **Hmotnost obou filetů** s kůží (popř. i bez kůže) v g oddělených řezy od kostry trupu a pletenců ploutví.
- **Hmotnost gonád** v g s určením pohlaví.

V. Biometrické a výtěžnostní ukazatele

Biometrické a výtěžnostní ukazatele se vypočítávají na základě zjištěných plastických znaků s přihlédnutím k druhu testovaných ryb a patří sem zejména:

- **podíl trupu (POT) v %** =
$$\frac{\text{Hmotnost opracovaného trupu (g)}}{\text{Hmotnost ryby (g)}} \times 100 \quad (24)$$

- podíl hlavy (PH) v % =
$$\frac{\text{Hmotnost hlavy (g)}}{\text{Hmotnost ryby (g)}} \times 100 \quad (25)$$

- podíl filetů s kůží a popř. i bez kůže (PFSK, PFBK) v %

$$\text{PFSK} = \frac{\text{Hmotnost filetů s kůží (g)}}{\text{Hmotnost ryby (g)}} \times 100 \quad (26)$$

$$\text{PFBK} = \frac{\text{Hmotnost filetů bez kůže (g)}}{\text{Hmotnost ryby (g)}} \times 100 \quad (27)$$

- podíl gonád (Gonadosomatický index – GSI) =
$$\frac{\text{Hmotnost gonád (g)}}{\text{Hmotnost ryby (g)}} \times 100 \quad (28)$$

- index vysokohřbetosti (IV) =
$$\frac{\text{Délka těla (mm)}}{\text{Výška těla (mm)}} \quad (29)$$

- index širokohřbetosti (IŠ) =
$$\frac{\text{Šířka těla (mm)}}{\text{Délka těla (mm)}} \times 100 \quad (30)$$

- index délky hlavy (IDH) =
$$\frac{\text{Délka hlavy (mm)}}{\text{Délka těla (mm)}} \times 100 \quad (31)$$

- Fultonův kondiční koeficient (FK) =
$$\frac{\text{Hmotnost ryby (g)}}{\text{Délka těla (mm)}} \times 100\,000 \quad (32)$$

B. Testování užítkovosti

Testování užítkovosti se provádí za účelem srovnání užítkovosti finálních hybridů, plemen, linií a populací ryb či ke zjištění výkonnosti plemenných ryb na základě vlastní užítkovosti části populace nebo užítkovosti jejich potomstva při využití meziplemenného křížení nebo čistokrevné plemenitby. Testování probíhá v rybnících nebo speciálních rybochovných zařízeních. Při testování se hodnotí znaky uvedené v části A.

I. Reprodukční užítkovost rodičů

Reprodukční užítkovost vytíraných ryb se stanovuje u individuálně značených generačních ryb s minimálním počtem 25 otců a 15 matek pro každý typ křížení vybraných z generačního hejna plemenných ryb o minimálním počtu 120 ks. Subjektivním selekčním kritériem je pouze připravenost ryb k výtěru a jejich zdravotní stav.

Postup reprodukce:

- Reprodukce je prováděna umělým výtěrem u všech jedinců synchronně v jednom časovém období.
- Gamety jsou odebírány individuálně.
- Osemenění s aktivací gamet je prováděno nejlépe faktoriálním schématem páření. Z jiker odebraných od matek je vytvořen směsný vzorek s přibližně stejným podílem jiker od všech 15 matek. Stejnomořnost množství jiker je zajištěna odvážením stejné hmotnosti jiker od každé samice.

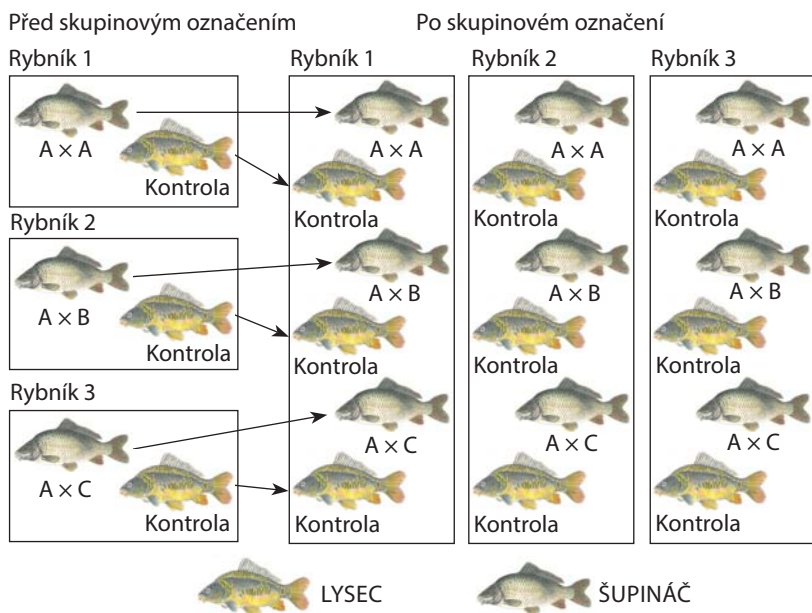
Tento směsný vzorek jiker je rozdělen na 25 dílů a každý díl je osemeněn jiným otcem a aktivován. Po aktivaci mohou být všechny jikry smíchány dohromady a inkubovány. Takto je postupováno pro všechny typy křížení.

- V průběhu inkubace jiker a plůdku se hodnotí:
 - procento oplozenosti jiker v očních bodech;
 - množství rozplavaného plůdku.
- Při sestavování obsádky v případě použití více inkubačních aparátů (kolíbek) pro jeden typ křížení je plůdek k testu odebrán proporcionálně ze všech aparátů.

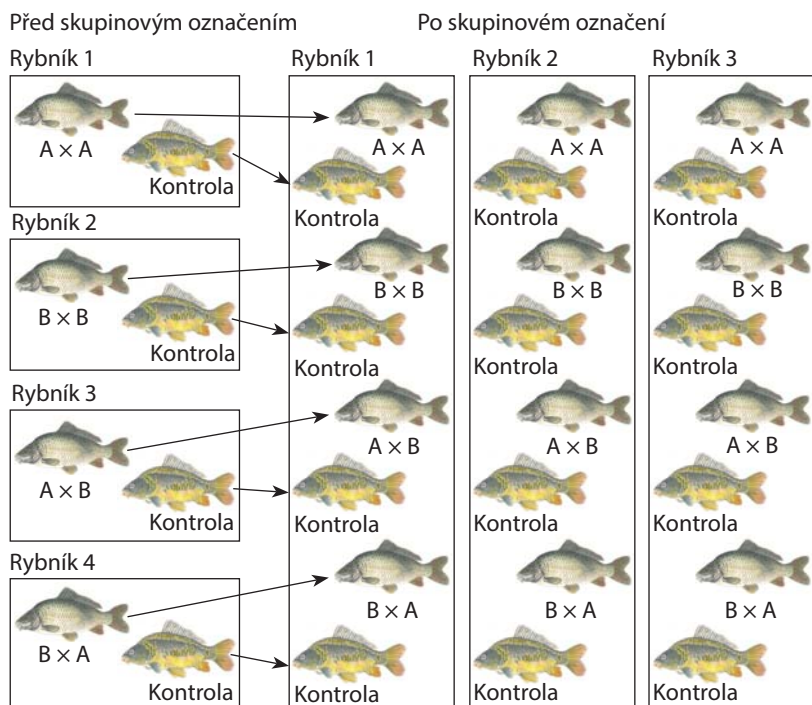
II. Testování kapra obecného a lína obecného

Testování kapra a lína se provádí v rybnících:

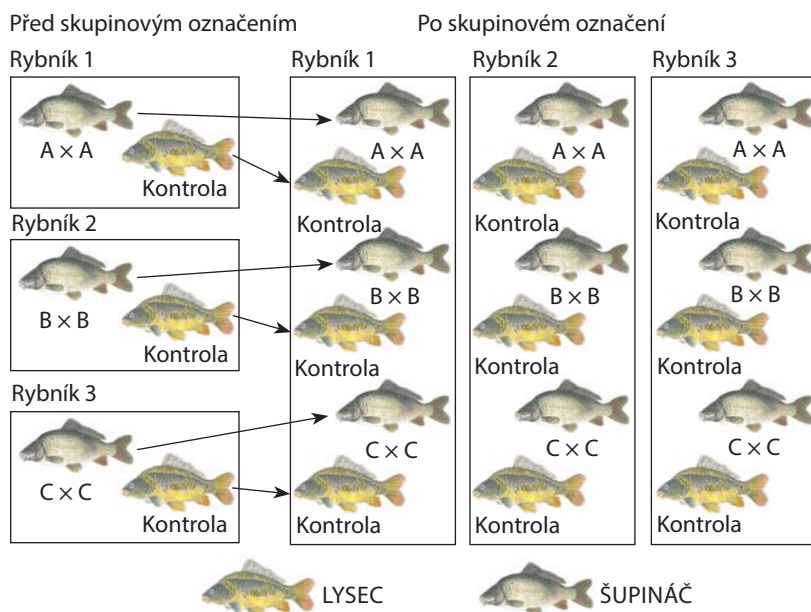
- Vysazením rozplavaného nerozkrmeného váčkového plůdku a jeho odchovem do tržní velikosti (zpravidla 3 vegetační sezóny) se stanovením výtěžnosti jedlých částí na závěr testu.
- Ke každé testované skupině je současně přisazována kontrolní skupina odlišitelného fenotypu ke korekci vlivů prostředí na dosaženou hodnotu hmotnosti.
- Kontrolní skupina musí být pro všechny testované skupiny stejného původu (ze stejného výtěru od stejných rodičů). U kapra obecného se při testu lysých kaprů používá jako kontrolní skupina šupinatá linie, při testu šupinatých skupin se jako kontrolní skupina používá lysá linie. Z důvodu centrální evidence výsledků testů užitkovosti a možného srovnávání jednotlivých testů stanovila Šlechtitelská rada Rybářského sdružení pro všechny testy jednotné kontrolní skupiny. Kontrolní šupinatou skupinou je hybrid Rop × TAT, kontrolní lysou skupinou je hybrid M2 × M72. U lína obecného se jako kontrolní skupina používá nejčastěji zlatá forma lína.
- Testování probíhá porovnáváním nejméně 3 odlišných skupin meziplemenných kříženců nebo čistých plemen s kontrolní linií podle schématu na obr. 10.2. (vrcholové křížení), obr. 10.3. (dialelní křížení) a obr. 10.4. (čistokrevná plemenitba).
- V prvním roce nebo do skupinového označení může testování probíhat bez opakování s jednou testovanou a jednou kontrolní skupinou v každém rybníce.
- Ve druhém roce nebo po skupinovém označení probíhá testování minimálně ve třech rybnících s minimem tří testovaných skupin a jejich příslušnými kontrolami v každém rybníce. U testů kapra obecného se nejčastěji jako metoda skupinového značení používá stříhání jedné z párových ploutví. Testovaná i kontrolní skupina z jednoho rybníka se vždy označí stejným střížením. Takto je možno testovat maximálně 4 odlišné skupiny ryb, neboť ryba má jen 2 páry párových ploutví. U testů lína obecného je z důvodu drobné velikosti plůdku po prvním roce testování vhodnější kryogenní metoda. Výhodou této metody je možnost testování více skupin.
- V průběhu testování se sledují níže uvedené znaky podle pokynů uvedených v části A:
 - procento přežití všech testovaných skupin včetně kontroly;
 - průměrné hmotnosti jednotlivých skupin;
 - individuální hmotnosti nejméně 33 kusů ryb v každé skupině.



Obr. 10.2. Schéma testování užitkovosti ryb v rybnících při použití vrcholového křížení (3 skupiny). Ilustrace ryb Pavla Hanusová (kapr obecný lysý), Lucie Mrázová (kapr obecný šupinatý).



Obr. 10.3. Schéma testování užitkovosti ryb v rybnících při použití dialelního křížení. Ilustrace ryb Pavla Hanusová a Lucie Mrázová.



Obr. 10.4. Schéma testování užítkovosti ryb v rybnících při čistokrevné plemenitbě (3 skupiny). Ilustrace ryb Pavla Hanusová a Lucie Mrázová.

- Získané údaje se každoročně statisticky vyhodnocují s ohledem na účel testování. Při podzimním lovení se hodnotí růstová schopnost (dosažená hmotnost) testovaných skupin a jejich přežití. U dosažené hmotnosti, popř. i u přežití se vypočítává heterozní efekt. Na konci testu (v tržní velikosti) se navíc hodnotí biometrické ukazatele a ukazatele výtežnosti (jateční hodnota), a to individuálně nejméně u 33 ks ryb z každé testované skupiny včetně kontroly. Při lovení po komorování ryb (tedy v časovém období od podzimního nasazení do jarního lovení) se hodnotí hmotnost ryb a přežití. Místo heterozního efektu růstu se hodnotí změna hmotnosti (vylehčení) v průběhu zimování.
- Kontrolní skupina slouží ke korekci hmotnosti (popř. i přežití) u testovaných skupin v případě, že došlo k výraznému rozdílu mezi podmínkami prostředí v rybnících zejména v prvním roce testování při odděleném chovu jednotlivých testovaných skupin. Korekce hmotnosti se u jednotlivých testů provádí, pokud se vzájemně liší hmotnost kontrolních skupin (vypočteno jednofaktorovou analýzou variance – ANOVA). Korekce skutečných hmotností ryb u testovaných skupin se provádí dle vzorce (Kirpichnikov, 1987):

$$h_{ki} = h_i \cdot k_1 / k_2 \quad (33)$$

- kde: h_{ki} = korigovaná hmotnost ryby i (případně průměrná hmotnost skupiny i);
 h_i = skutečná hmotnost ryby i (případně průměrná hmotnost skupiny i);
 k_1 = celková průměrná hmotnost kontrolní skupiny (ze všech rybníků před skupinovým označením či v rámci daného rybníka po skupinovém označení);
 k_2 = průměrná hmotnost kontrolní skupiny (chované s testovanou skupinou ryby i ve stejném rybníce před skupinovým označením nebo stejného značení v rámci daného rybníka po skupinovém označení).

Korekce přežití u testovaných skupin se provádí dle vzorce:

$$P_{ki} = P_i \cdot k_1 / k_2 \quad (34)$$

- kde: P_{ki} = korigované přežití testované skupiny i ;
 P_i = skutečné přežití testované skupiny i ;
 k_1 = průměrné přežití kontrolní skupiny ze všech rybníků (ze všech rybníků před skupinovým označením či v rámci daného rybníka po skupinovém označení);
 k_2 = přežití kontrolní skupiny (chované s testovanou skupinou ve stejném rybníce před skupinovým označením nebo stejného značení v rámci daného rybníka po skupinovém označení).

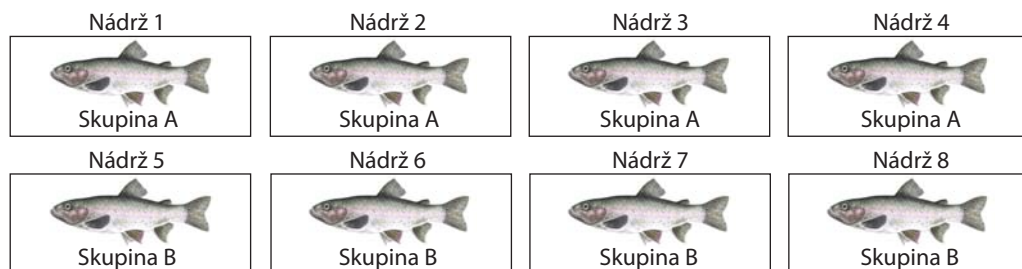
III. Testování pstruha duhového

Testování pstruha duhového se provádí ve speciálních rybochovných zařízeních:

- V individuálních nádržích s opakováním 4× pro každou testovanou skupinu při stejných parametrech prostředí (hustota obsádky, výživa, teplota, obsluha, fotoperioda, kvalita vody apod.). Za nádrže se považují chovatelské stavby a zařízení s dostatečnou chovnou kapacitou a odpovídajícím technickým vybavením, které zabezpečují opakovatelnost testu a identické podmínky.
- Testované skupiny ryb se chovají po celou dobu odděleně a v jednom probíhající testu jsou posuzovány minimálně 2 skupiny ryb (obr. 10.5.).
- V průběhu testování se v každé testované skupině a opakování hodnotí znaky uvedené v části A II–V. Růst je hodnocen zjišťováním průměrné hmotnosti testovaných skupin v každé nádrži a rovněž individuálním vážením nejméně 33 kusů ryb ve skupině minimálně 4× za období testování (na začátku a konci testu a dále dvakrát v pravidelných periodách v průběhu odchovu).
- Získané údaje se každoročně statisticky vyhodnocují s ohledem na účel testování.
- Plastické znaky jsou zjišťovány u tržních jedinců na závěr testu.

C. Odhad plemenné hodnoty

- Odhadem plemenné hodnoty se rozumí srovnávání užitekosti populací, skupin či rodin jednoho plemene chovaných v různých chovech nebo odděleně. Testované skupiny přitom mohou žít ve stejném nebo i v jiném časovém horizontu.
- Plemenná hodnota se odhaduje pro znaky popsané v části A, zejména pak pro reprodukční ukazatele, procento přežití, růst a výtěžnostní ukazatele na základě:



Obr. 10.5. Schéma testování užitekosti ryb ve speciálních rybochovných zařízeních (2 skupiny). Ilustrace ryb Lucie Mrázová.

1. vlastního testování jasně definovaných skupin jednoho plemene dle metodiky popsané v části B. Rozdíl je v tom, že se nesrovnávají skupiny různých plemen či křížení, ale v rámci jednoho plemene;
2. testování všech skupin jednoho plemene od stadia váčkového plůdku až do tržní velikosti ve společných podmínkách (stejném rybníce, nádrži apod.) bez opakování nebo s opakováním v případě, že původ testovaných ryb může být určen na základě využití molekulárních metod;
3. záznamů o výsledcích užítkovosti vedených v plemenářské evidenci;
4. podmínkou pro odhad plemenné hodnoty z výsledků popsaných v bodech 1 a 2 je předpoklad, že se výsledky dají věrohodně statisticky zpracovat (např. využitím výsledků z testů se stejnou kontrolní skupinou, stejnou technologií chovu, dostatečně obsáhlý rodokmen a vzorek určovaných ryb z populace apod.).

10.1.2. Základní statistické modely používané pro vyhodnocování výsledků při kontrolách užítkovosti

1. Testování užítkovosti

Při testování užítkovosti ryb v rybnících podle schémat na obr. 10.2.–10.4. nebo ve speciálních rybochovných zařízeních využíváme:

- Jedno-faktorovou analýzu variance (angl. *one-way* ANOVA) při:

1. porovnávání vlivu prostředí na dosaženou hmotnost při testování ryb v rybnících podle údajů zjištěných u kontrolní skupiny s využitím modelu:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + e_{ij} \quad (35)$$

kde Y_{ij} je hmotnost ryby j v rybníce i , μ je celkový průměr kontrolní skupiny ze všech rybníků, P_i je fixní efekt rybníka i (P od anglického slova „*pond*“ = rybník) a e_{ij} je náhodné reziduum.

Při výpočtu vycházíme z údajů individuálních hmotností minimálně 33 ks ryb v každé kontrolní skupině. Pokud je vliv rybníka (prostředí) průkazný na hladině významnosti $\alpha < 0,05$, provedeme korekci hmotností testovaných ryb dle vzorce 33.

2. zpracování výsledků dosažených hmotností (růstu) při testování v prvním roce nebo před skupinovým označením (nemáme-li opakování) nebo zpracování výsledků přežití po skupinovém označení při opakování v rybnících a při vyhodnocování testů prováděných ve speciálních rybochovných zařízeních při využití průměrných hodnot podle modelu:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij} \quad (36)$$

kde Y_{ij} je hmotnost ryby j ze skupiny i (nebo přežití dané skupiny), μ je celkový průměr znaku, G_i je fixní efekt testované skupiny (G od anglického slova „*group*“ = skupina) a e_{ij} je náhodné reziduum.

- Dvou-faktorovou analýzu variance (angl. *two-way* ANOVA) po skupinovém označení ryb při testování ryb v rybnících nebo při testování ryb ve speciálních rybochovných zařízeních používáme-li individuální data podle modelu:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + P_j + GP_{ij} + e_{ijk} \quad (37)$$

kde Y_{ijk} je hmotnost ryby k ze skupiny i a rybníka j , μ je celkový průměr znaku, G_j je fixní efekt testované skupiny i , P_j je fixní efekt rybníka j , GP_{ij} jsou interakce mezi skupinou a prostředím rybníka a e_{ijk} je náhodné reziduum.

- Analýzu kovariance (ANCOVA) při hodnocení rozdílů růstu (hmotnosti) za předpokladu, že máme dostatečný počet opakování (5 a více) či při hodnocení rozdílů přežití. Při této metodě nepočítáme s individuálními údaji, ale s průměrnými hodnotami znaku jednotlivých skupin z každého rybníka. Kovarietou jsou hodnoty testovaných znaků u příslušné kontrolní skupiny. Princip výpočtu této metody je podobný tomu při provádění korekce dle vzorce 33. V tomto případě je ale korekce prováděna vlastním statistickým programem. ANCOVA je v tomto ohledu objektivnější.

1. Základní statistický model při analýze kovariance je:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + a c_{ij} + e_{ij} \quad (38)$$

kde Y_{ij} je hmotnost nebo přežití skupiny i z rybníka j , μ je celkový průměr znaku, G_i je fixní efekt testované skupiny i , a je regresní koeficient znaku na příslušnou kontrolní skupinu, c_{ij} je hmotnost kontrolní skupiny patřící k testované skupině i z rybníka j a e_{ij} je náhodné reziduum.

2. Pokud probíhalo stejné testování na více místech (testovacích stanicích, podnicích), můžeme model rozšířit o testování na vliv lokality podle vzorce:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + P_k + GP_{ik} + a c_{ijk} + e_{ijk} \quad (39)$$

kde Y_{ijk} je hmotnost skupiny i z rybníka j a lokality k , μ je celkový průměr znaku; G_i je fixní efekt testované skupiny i , P_k je fixní efekt lokality k , GP_{ik} jsou interakce mezi skupinou i a lokalitou k , a je regresní koeficient znaku na příslušnou kontrolní skupinu, c_{ijk} je hmotnost kontrolní skupiny patřící k testované skupině i z rybníka j na lokalitě k a e_{ijk} je náhodné reziduum.

3. Při zpracování údajů o biometrických ukazatelích a výtěžnostních charakteristikách porovnáváme testované skupiny na základě individuálních údajů a kovarietou je vlastní hmotnost nebo délka těla ryby. Tyto parametry jsou totiž závislé na velikosti ryb, a proto je ANCOVA objektivnější než klasická ANOVA. Základním statistickým modelem je:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + S_j + GS_{ij} + a c_{ijk} + e_{ijk} \quad (40)$$

kde Y_{ijk} je hodnota znaku u ryby k ze skupiny i s pohlavím j , μ je celkový průměr znaku, G_i je fixní efekt testované skupiny i , S_j je fixní efekt pohlaví, GS_{ij} jsou interakce mezi skupinou a pohlavím, a je regresní koeficient znaku na hmotnost nebo délku těla ryby, c_{ijk} je hmotnost nebo délka těla ryby k ze skupiny i s pohlavím j a e_{ijk} je náhodné reziduum.

Podle charakteru získaných dat můžeme do modelu zařazovat i další faktory jako jsou např. rybník a lokalita.

II. Odhad plemenné hodnoty

U odhadu plemenné hodnoty je situace poněkud složitější. V prvé řadě záleží na tom, co chceme při odhadu plemenné hodnoty zjistit. Podle toho volíme také testovací model a příslušný model statistický. Základní statistická zpracování vychází rovněž z obecných lineárních modelů (GLM – *General linear models*), mezi něž patří i ANOVA. Pokud známe příslušný rodičovský pár testovaných potomků, testujeme vliv otců a matek na projev studovaného znaku. Podmínkou pro takovéto testování je individuální značení všech ryb. Příkladem takového testování může být model:

$$Y_{ijklm} = \mu + G_i + P_j + s_{k(j)} + d_l + e_{ijklm} \quad (41)$$

kde Y_{ijklm} je užitkovost ryby m od matky l a otce k , z genetické skupiny j a rybníka i ; μ je průměr znaku ve sledované populaci, P_i je fixní efekt rybníka i , G_j je fixní efekt genetické skupiny j , $s_{k(j)}$ je náhodný efekt otce k uvnitř genetické skupiny j , d_l je náhodný efekt matky l a e_{ijklm} je náhodné reziduum.

Kromě zjišťování významnosti fixních a náhodných efektů na projev znaku vypočítáváme heritabilitu či podíl jednotlivých složek fenotypové variance použitím metody „animal model“. Tato metoda vychází z podobných modelů zmíněných výše, podmínkou pro výpočet je opět znalost rodokmenu potomstva, tedy příslušnosti testovaných jedinců ke konkrétnímu rodičovskému páru. Problematikou výpočtu heritability a složek fenotypové variance se zabývá podrobně kapitola 5.6.

10.2. Testování užitkovosti ryb v dalších zemích

Testování užitkovosti ryb s interní kontrolou je metoda využívaná i v jiných zemích. Tato metoda může být použita ale jen u těch druhů ryb, kde máme k dispozici různé a snadno odlišitelné fenotypy (různé barevné varianty, různé formy ošupení). Bohužel takových druhů není příliš mnoho, navíc se často diskutuje otázka, zda při testování ryb s interní kontrolou a ve smíšených obsádkách nedochází vlivem soupeření (o potravu, prostor apod.) mezi odlišnými genetickými skupinami ke zkeslení výsledků testů.

Základní podmínkou u všech testů zejména tam, kde není možno použít vhodnou kontrolní skupinu, zůstává snaha o zajištění stejných podmínek prostředí pro všechny testované skupiny. Uniformní podmínky prostředí se mnohem snáze zajišťují při testování ryb ve speciálních rybochovných zařízeních, kde je možno snadno upravovat hustotu obsádky, zajistit stejnou kvalitu vody a regulovat a ovlivňovat množství předkládané potravy. Většina rybích druhů, u nichž se provádí cílené šlechtitelské programy, se chovají a testují právě v rybochovných zařízeních. Problémem je, že testování užitkovosti ryb často začíná až po překonání počátečního rozkrmovacího období, kdy nejsou podmínky odchovu pro jednotlivé testované skupiny ryb totožné (odlišné obsádky, krmení apod., jiný termín výtěru) a počáteční hmotnost testovaných skupin ryb na začátku testu se liší. Podobně se od starších vývojových stádií (rychlený plůdek, plůdek) provádí i testování ryb v rybnících. Z důvodu objektivity testování je nutné provádět korekci pozorovaných přírůstků testovaných skupin ryb na jejich počáteční hmotnost, neboť ryby s vyšší počáteční hmotností rostou rychleji než ryby s nižší počáteční hmotností (Moav a Wohlfarth, 1974). Korekce hmotnosti se provádí podle vzorce:

$$Y = Y_i' - b_i(X_i - X) \quad (42)$$

kde Y je korigovaný přírůstek, Y_i' je pozorovaný přírůstek genetické skupiny (jedince) i , X_i je počáteční průměrná hmotnost skupiny (jedince) i , X je celková průměrná počáteční hmotnost všech testovaných skupin (ryb) a b_i je koeficient lineární regrese přírůstku na počáteční hmotnost u skupiny (jedince) i .

V případě, že provádíme korekci hmotnosti u skupiny jednotlivců, je nezbytné označit ryby v testu individuálně. Podobně můžeme provádět standardizaci dat na věk ryb, pohlaví, rok testování apod. (Gjedrem, 2005).

LITERATURA

- Gjedrem, T., 2005. Selection and breeding programs in aquaculture. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 364 pp.
- Kirpichnikov, S.V., 1987. Genetics and selection of fish. Nauka, Leningrad, Russia, 519 pp.
- Moav, R., Wohlfarth, G.W., 1974. Magnification through competition of genetic differences in yield capacity in carp. *Heredity* 33: 181–202.
- Sbírka zákonů ČR, 2000, částka 135. Vyhláška MZe ČR č. 471/2000 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon). Tiskárna MV, Praha.
- Sbírka zákonů ČR, 2006, částka 106. Zákon č. 344/2006 Sb., Úplné znění zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon), jak vyplývá z pozdějších změn. Tiskárna MV, Praha.

PLEMENITBA RYB A LEGISLATIVA, DOTAČNÍ PROGRAMY

M. Flajšhans

PLEMENITBA RYB A LEGISLATIVA, DOTAČNÍ PROGRAMY

M. Flajšhans

11.1. Plemenářský zákon a prováděcí vyhlášky

Plemenářský zákon

Dne 1. ledna 2001 vstoupil v České republice v platnost zákon č. 154/2000 Sb. o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon). Od té doby byl plemenářský zákon i jeho prováděcí vyhlášky předmětem několika dílčích úprav formou novelizace. V současné době (tedy k 31. 12. 2011) je jeho úplné znění vydáno formou **zákona č. 344/2006 Sb. Úplné znění zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon), jak vyplývá z pozdějších změn a poslední platnou úpravou je zákon č. 32/2011 Sb. z 26. ledna 2011, kterým se mění zákon č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon), ve znění pozdějších předpisů.**

Legislativa v oblasti šlechtění a plemenitby ryb posiluje postavení Rybářského sdružení ČR jako uznávaného chovatelského sdružení k zabezpečování společných zájmů a postupů v oblasti šlechtění a plemenitby ryb jak navenek (vůči veřejnosti, státu a státním institucím i mezinárodním institucím a asociacím, jako je EU, FAO, FEAP aj.), tak i uvnitř (vůči členům, např. v otázce uznávání chovů, v otázce státních dotací a příspěvků, ve vedení plemenářské a ústřední evidence a vydávání potvrzení o původu).

Členění plemenářského zákona ve vztahu k rybářství

Zákon má 10 hlav, z nichž Hlava I definuje základní pojmy a vymezuje podmínky udělení souhlasu k výkonu odborných činností tzv. „oprávněným osobám“ (§ 1–3). Stanoví se, kdo a za jakých podmínek (po doložení technických podmínek, kvalifikačních předpokladů a stavů plemen) vůbec může testování a posuzování plemenných ryb a finálních hybridů provádět, vést chovy, obchodovat s plemenným materiálem, vyvážet jej a dovážet aj.

Hlava II definuje šlechtitelské činnosti a opatření, uznaná chovatelská sdružení a chovatelské podniky (§ 4–6), kontrolu užitekosti, výkonnostní zkoušky a testy a posuzování vyjmenovaných hospodářských zvířat včetně povinností oprávněných osob, odhad plemenné hodnoty, plemenné knihy, plemenářské evidence, potvrzení o původu a ověřování a osvědčování původu (§ 7–12). Stanovují se zde pravidla a podmínky, za nichž se za podpory ze státních prostředků šlechtění a plemenitba ryb provádí. Plemenářská evidence u plemenných ryb je analogií plemenných knih (plemen koní, skotu, prasat aj.). Plemenářská evidence je vedena prostřednictvím Rybářského sdružení ČR za každé chované plemeno. Samostatný § 14 se týká genetických zdrojů zvířat, včetně ryb.

Hlava III vymezuje podmínky plemenitby hospodářsky významných druhů savců (§ 15–19).

Hlava IV se týká plemenitby drůbeže, plemenných ryb a včel (§ 20). Stanoví podmínky vydávání osvědčení o původu hejna a umělé, resp. poloumělé reprodukci jako schválený způsob plemenitby.

Hlava V definuje podmínky uvádění plemenných zvířat, gamet, oplozených vajec a dalšího plemenného materiálu do oběhu, včetně potřebných doprovázejících dokumentů (§ 21).

Poměrně rozsáhlá Hlava VI se týká označování a evidence zvířat, a s tím souvisejících povinností osob na jednotlivých stupních procesu chovu, zpracování, asanace zvířat a obchodu s nimi, a systému ústřední evidence (§ 22–23). U ryb nemohlo být označování podmínkou ze zákona (kolize s veterinárním zákonem), nýbrž z řádu plemenářské evidence uznaného chovatelského sdružení.

Hlava VII vymezuje dozorčí činnost České plemenářské inspekce (§ 24–25) a navazující Hlava VIII specifikuje správní delikty a výši pokut za ně (§ 26–28).

Další části (Hlava IX, X) pak shrnují společná a obecná ustanovení, odbornou způsobilost, ohlašovací povinnost a přechodná a zrušovací ustanovení (§ 29–39).

Chovatelů živočichů pocházejících z akvakultury (neplemenných ryb podle předchozí právní úpravy) se také dotýkají některá ustanovení zákona č. 99/2004 Sb. o rybníkářství, výkonu rybářského práva, rybářské strážní, ochraně mořských rybolovných zdrojů a o změně některých zákonů (zákon o rybářství).

Prováděcí vyhlášky

K zákonu č. 154/2000 Sb. v současné legislativní úpravě platí následující prováděcí předpisy, které se týkají i ryb:

- Vyhláška č. 370/2006 Sb. o odborných kurzech k výkonu některých odborných činností v oblasti šlechtění a plemenitby hospodářských zvířat, stanoví odbornou způsobilost pro jednotlivé stupně šlechtitelské a plemenářské práce.
- Vyhláška MZe ČR č. 447/2006 Sb., o genetických zdrojích zvířat.
- Vyhláška MZe ČR č. 448/2006 Sb., prováděcí vyhláška k plemenářskému zákonu, týká se udělení oprávnění, šlechtění, testování, posuzování, vedení dokumentace.
- Vyhláška MZe ČR č. 57/2011 Sb., kterou se mění vyhláška č. 448/2006 Sb., o provedení některých ustanovení plemenářského zákona

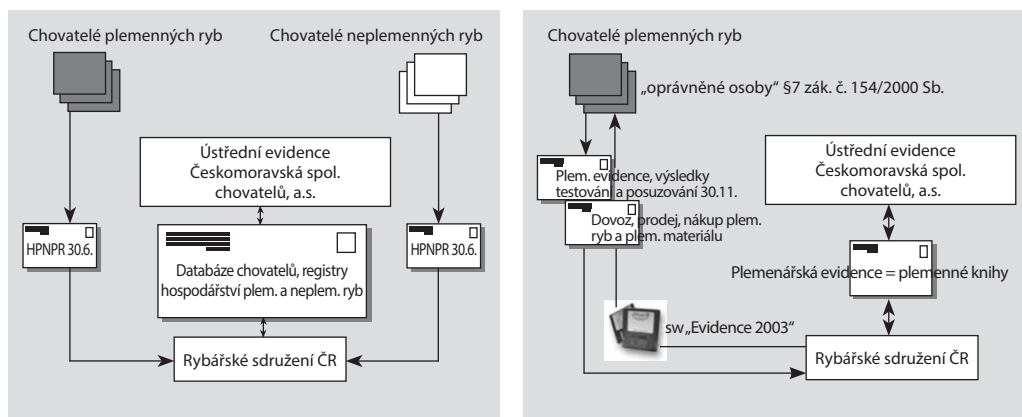
a série novelizací prováděcího právního předpisu, týkajícího se označování a značkování zvířat, vedení evidence zvířat a hospodářství a hlášení pro Ústřední evidenci:

- **Vyhláška MZe ČR č. 136/2004 Sb.,** která stanoví podrobnosti označování zvířat a jejich evidence a evidence hospodářství a osob stanovených plemenářským zákonem.
- **Vyhláška MZe ČR č. 199/2007 Sb.,** kterou se mění vyhláška 136/2004 Sb., která stanoví podrobnosti označování zvířat a jejich evidence a evidence hospodářství a osob stanovených plemenářským zákonem.
- **Vyhláška MZe ČR č. 213/2009 Sb.,** kterou se mění vyhláška č. 136/2004 Sb., ve znění vyhlášky č. 199/2007 Sb., kterou se stanoví podrobnosti označování zvířat a jejich evidence a evidence hospodářství a osob stanovených plemenářským zákonem.
- **Vyhláška MZe ČR č. 202/2010 Sb., kterou se mění vyhláška č. 136/2004 Sb.,** kterou se stanoví podrobnosti označování zvířat a jejich evidence a evidence hospodářství a osob stanovených plemenářským zákonem, ve znění pozdějších předpisů.

Plemenářská a ústřední evidence

Plemenářská evidence je v kompetenci uznaného chovatelského sdružení. Pro ryby je jím Rybářské sdružení ČR, které vede evidenci za každé chované plemeno, eviduje původ plemenných ryb a jejich užitkové vlastnosti. Plemenářská evidence je vedena elektronickou formou (v současnosti je používán software „Evidence 2003“). Uzané chovatelské sdružení rovněž komplexně zpracovává výsledky testování užitkovosti plemen a hybridů.

Ústřední evidenci vede státem pověřená organizace. V současné době je to Českomoravská společnost chovatelů, a.s., v Hradištku pod Medníkem. Tato organizace rovněž poskytuje údaje z ústřední evidence Ministerstvu zemědělství ČR ke zveřejnění na webu formou Integrovaného registru zvířat (IRZ). Ústřední evidence plemenných ryb zahrnuje registr chovatelů a jejich hospodářství s přidělenými registračními čísly, hlášení o počtech plemenných ryb (HPPR) podle plemene a pohlaví k 30. 6. každého roku a hlášení o počtech a hmotnosti neplemenných ryb (HPNPR; resp. podle novelizace předpisu č. 32/2011 Sb. nyní „živočichů pocházejících z akvakultury“) k 30. 6. každého roku (obr. 11.1.).



Obr. 11.1. Schéma poskytování povinných údajů chovateli přes Rybářské sdružení ČR do Ústřední evidence (vlevo) a poskytování povinných údajů chovateli Rybářskému sdružení ČR pro plemenářskou evidenci (vpravo).

Evidenční číslo

V plemenářské evidenci má každá generační ryba přiděleno tzv. **evidenční číslo** (např. ROP-VO-99/1- 7F7A10594B), což je kombinace označení **chovné skupiny** a **individuálního identifikátoru**.

Chovná skupina je skupina jedinců stejného původu (ze stejných rodičů) a stáří v rámci plemena (např: ROP-VO-99/1, kde ROP- zkratka plemena, v tomto případě Ropšinský kapr šupinatý, VO – zkratka chovatele, kde byla chovná skupina založena; zde FROV JU, VÚRH Vodňany; 99 – rok založení, tj. vykulení plůdku a /1- pořadí výtěru daného plemene ve výtěrové sezóně).

Individuální identifikátor (ID) je znak nebo sada znaků, podle kterého můžeme nezaměnitelně identifikovat jedince

- znakem (kryogenická značka, jiná vizuální značka), např. 15/55, kde se ID skládá ze skupinového značení chovné skupiny/pořadového čísla jedince;
- pomocí techniky (mikročipové značky PIT tags), např: 7F7A10594B nebo 276098101198403 (alfanumerický řetězec max. 15 znaků; Rodina a Flajšhans, 2008).

Evidenční povinnosti chovatele:

- **Registračním lístkem** se chovatel do ústřední evidence přihlašuje prostřednictvím uznaného chovatelského sdružení do 7 dnů od zahájení činnosti, ve stejné lhůtě po ukončení činnosti také toto oznamuje **odhlašovacím lístkem**. Na základě registračního lístku je chovateli přiděleno registrační číslo pro každé hospodářství. Registračním číslem se hospodářství označuje v každoročním hlášení o počtu plemenných/počtu a hmotnosti neplemenných ryb.
- **Prvotní evidence o chovu.** Chovatel zaznamenává stavy, individuální identifikaci plemenných ryb a údaje o výtěru. Využívá k tomu pomocnou technickou evidenci (výtěrový list, odlovní a komorovou knížku). Na 1 listu odlovní a komorové knihy vede údaje o plemenných rybách v 1 nádrži (= rybníku, bazénu). Funkci stájového registru u chovatelů neplemenných ryb plní hospodářská evidence o chovu ryb na rybníku s chovem ryb, popisný list rybářského revíru a evidence o dosažených hospodářských výsledcích na rybářském revíru. Prvotní evidenci chovatel nikam neposílá, ale předkládá ji při kontrole.

- **Hlášení o počtu plemenných ryb** posílá chovatel uznanému chovatelskému sdružení (osobě pověřené vedením ústřední evidence u ryb) do 30. 6. každého roku.
- **Hlášení o počtu a hmotnosti neplemenných ryb (živočichů pocházejících z akvakultury)** posílá chovatel uznanému chovatelskému sdružení (osobě pověřené vedením ústřední evidence u ryb) do 30. 6. každého roku.
- **Je-li chovatel zároveň oprávněnou osobou** k provádění kontroly užitkovosti, výkonnostních zkoušek, výkonnostních testů a posuzování plemenných ryb ve vlastních testačních zařízeních, **vede další záznamy o vlastnostech a znacích podle způsobu testování a posuzování.** Výsledky poskytuje chovatel s hlášením o individuální identifikaci plemenných ryb do plemenářské evidence vždy k 30. 11. kalendářního roku.
- **Identifikace a způsob označování plemenných ryb.** K identifikaci plemenných ryb se používá především mikročipových značek. U kaprů lisců a línů lze použít značení matricemi vymraženými v kapalném dusíku. Plemenné (remontní a generační) ryby se označují individuálně. Mikročipové značky se implantují podkožně, vnitrosvalově nebo intraperitoneálně. Při značení povrchu těla matricemi vymraženými v kapalném dusíku se používá individuálních alfanumerických kódů. Plemeným materiálem ryb se rozumí sperma, oocyty, jikry v očních bodech, plůdek a násada. Plemenému materiálu se nepřidělují individuální identifikační značky, ale v době, kdy to umožní velikost a stav ryb, provádí se u skupin testovaného plůdku značení skupinové.
- **Průvodní list dováženého plemenného materiálu ryb** musí obsahovat údaje stanovené prováděcí vyhláškou (jméno/název a adresy majitele a kupujícího, druh ryby, plemeno/linii/populaci, počet kusů, skupinové n. individuální označení ryb, datum odběru, datum a místo vystavení průvodního listu, národně osoby, která průvodní list vystavila). Kopii průvodního listu posílá chovatel uznanému chovatelskému sdružení s hlášením o stavech a individuální identifikaci ryb.
- **Záznam o prodeji plemenných ryb a plemenného materiálu ryb** musí obsahovat údaje stanovené prováděcí vyhláškou (jméno/název a adresy prodávajícího a kupujícího, druh ryby, plemeno/linii/populaci, věkovou kategorii, počet kusů, pohlaví, skupinové n. individuální označení ryb a datum odběru). Kopii záznamu posílá chovatel uznanému chovatelskému sdružení s hlášením o stavech a individuální identifikaci ryb.
- **Označení obalů plemenného materiálu ryb.** Obaly dávek gamet, jiker v očních bodech a rozplaveného plůdku musí obsahovat údaje stanovené prováděcí vyhláškou (datum odběru gamet, druh ryby, plemeno/linii/populaci, identifikaci mlíčka/jikernačky, objem dávky gamet, jméno/název a adresu chovatele; resp. datum výtěru, druh ryby, plemeno/linii/populaci, identifikační čísla rodičů, počet jiker v očních bodech nebo rozplaveného plůdku, jméno/název a adresu chovatele).

Vzory všech dokumentů jsou ke stažení z webových stránek uznaného chovatelského sdružení <http://rybsdr.fish-net.cz/plemenarstvi.htm> a <http://www.cz-ryby.cz/content/default/19>.

Potvrzení o původu plemenných ryb a plemenného materiálu. Tento dokument si chovatelé nemohou sami vystavovat, jen poskytují do plemenářské evidence nutné podklady. Potvrzení o původu plemenných ryb a plemenného materiálu vydává Rybářské sdružení ČR na základě žádosti chovatele a musí obsahovat tyto údaje: registrační (evidenční) číslo zvířete v plemenářské evidenci, způsob identifikace, identifikační číslo plemenného zvířete, datum výtěru, datum vykulení, plemeno/linii/populaci, pohlaví, jméno/název a adresu chovatele, z jehož chovu zvíře pochází, jméno/název a adresu majitele, diagnostické markery, oboustranný původ, datum vystavení potvrzení o původu, podpis zástupce uznaného chovatelského sdružení.

11.2. Dotační programy

Finanční podpora státu chovatelům v oblasti šlechtění a plemenitby ryb zdaleka není samozřejmostí ve všech státech EU. V západní Evropě jsou šlechtitelské programy nejčastěji realizovány národními korporacemi nebo chovatelskými asociacemi ve spojení s výzkumnými organizacemi (např. u lososa obecného v Norsku, Velké Británii, Irsku a na Islandu; pstruha duhového ve Francii a Finsku) buď za národní nebo regionální podpory nebo za podpory různých typů mezinárodních projektů EU buď na výzkum, nebo na implementaci výsledků výzkumu do malých a středních podniků.

Systém šlechtitelské práce u ryb v rámci uznaného chovatelského sdružení je zatížen větším množstvím zákonných evidenčních povinností, musí být vůči státním orgánům průhledný a tedy kontrolovatelný, ale na druhé straně umožňuje finanční podporu státu. Česká republika prostřednictvím Ministerstva zemědělství ČR v současné době může poskytovat chovatelům ryb dotace na dva typy činností:

- na ochranu a udržování genetických živočišných zdrojů v rámci „Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu, zemědělství a lesní hospodářství“ (**dotace na genetické živočišné zdroje:** Program 6, titul B. 1. 16 Ryby)
- na vybrané aspekty šlechtitelské práce v rámci „dotačního programu 2.A. Udržování a zlepšování genetického potenciálu vyjmenovaných hospodářských zvířat“ (**dotace na šlechtění:** titul 2. A.e.1.a) na kontrolu užitkovosti (KU), výkonnostní zkoušky, výkonnostní testy a posuzování a kontrolu dědičnosti užitkových vlastností a zdraví: KU u ryb.

Ministerstvo zemědělství ČR každoročně vypisuje „Zásady, kterými se stanovují podmínky pro poskytování dotací“ a v nich uvádí dotační tituly, na něž může chovatel žádat o podporu vybrané činnosti. Na podporu není právní nárok.

Aby se chovatel pro poskytnutí dotace kvalifikoval, musí splňovat tyto podmínky:

Pro **dotaci na genetické živočišné zdroje (GZ)** musí chovatel:

- mít kmenové hejno GZ 120 kusů ryb, které splňují náležitosti genetického zdroje, prověřené genetickou analýzou druhové/plemenné čistoty (nepřítomnost hybridů) a úroveň genetické variability,
- mít kmenové hejno GZ individuálně označené (s výjimkou pstruha obecného a síhů) a doložit individuální značení v elektronické podobě,
- mít chovatelské podmínky odpovídající zákonu č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů,
- být uveden mezi vyjmenovanými subjekty příslušného titulu „Zásad“ a mít přidělené evidenční číslo účastníka Národního programu,
- být registrován v ústřední evidenci (ÚE) podle prováděcích předpisů k plemenářskému zákonu,
- uchovávat kmenové hejno GZ podle schválené metodiky,
- splňovat odborné a technické předpoklady pro chov a vedení dokumentace o genetickém zdroji podle schválené metodiky příslušného genetického zdroje (Flajšhans a kol., 2009),

- mít hospodaření s dotací účetně oddělené od ostatních činností,
- podat úplně vyplněnou a doloženou žádost včetně stavů a individuální identifikace ryb, chovného cíle a technického zázemí podle „Zásad“ přes uznané chovatelské sdružení a mít ji schválenou garantem příslušného GZ a uznaným chovatelským sdružením,
- podat o vynaložení dotace za uplynulý rok zprávu uznanému chovatelskému sdružení.

Je-li chovateli přiznána **dotace na genetické živočišné zdroje**, dostane od uznaného chovatelského sdružení smlouvu a na jejím základě obdrží roční příspěvek, který se na 120 ks ryb 1 kmenového hejna pohybuje ve výši podle tab. 11.1.

Tab. 11.1. Počet genetických zdrojů uvnitř každého druhu a výše příspěvku na udržování kmenového hejna genetického zdroje ryb, stav podle skutečnosti roku 2011.

Druh	Podpora na kmenové hejno (tis. Kč)	Druh	Podpora na kmenové hejno (tis. Kč)
Kapr obecný (11 GZ)	do 120	Sih maréna (čistý druh)	do 150
Lin obecný (7 GZ)	do 100	Sih peleď (čistý druh)	do 150
Sumec velký (2 GZ)	do 150	Jeseter malý (čistý druh)	do 150
Pstruh duhový (3 GZ)	do 250	Vyza velká (čistý druh)	do 150
Pstruh obecný f. potoční (2 GZ)	do 200		

Celková roční podpora státu na genetické zdroje ryb se podle rozpočtových možností pohybuje ve výši 2,75–4 mil. Kč.

Pro **dotaci na šlechtění** musí chovatel:

- být „oprávněnou osobou“ podle prováděcích předpisů k plemenářskému zákonu,
- být registrován v ústřední evidenci (ÚE) podle prováděcích předpisů k plemenářskému zákonu,
- mít hospodaření s dotací účetně oddělené od ostatních činností,
- mít chovatelské podmínky odpovídající zákonu č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů,
- podat úplně vyplněnou a doloženou žádost včetně stavů ryb, chovného cíle a technického zázemí podle „Zásad“ přes Územní odbor MZe ČR a mít ji doporučenou uznaným chovatelským sdružením,
- podat o vynaložení dotace za uplynulý rok zprávu uznanému chovatelskému sdružení.

Je-li chovateli přiznána **dotace na šlechtění**, dostane od MZe ČR rozhodnutí, na jehož základě obdrží zpětně na daný rok podporu ve výši do 60 % prokázaných přímých nákladů na danou činnost.

Celková roční podpora státu v dotacích na šlechtění ryb se pohybuje ve výši 4,1–5,7 mil. Kč.

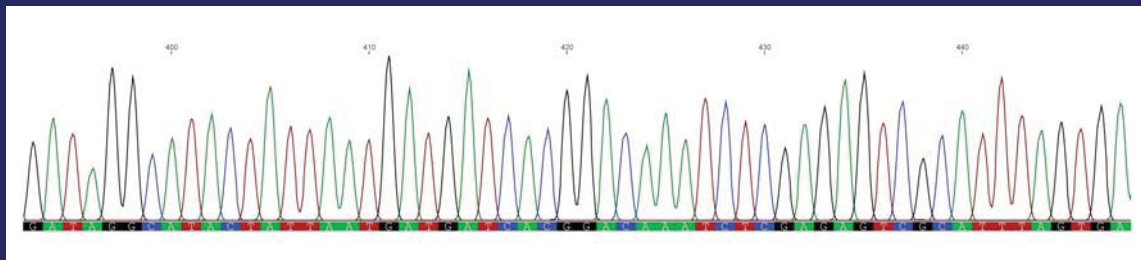
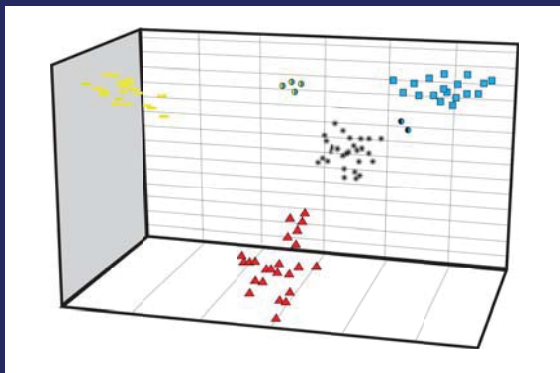
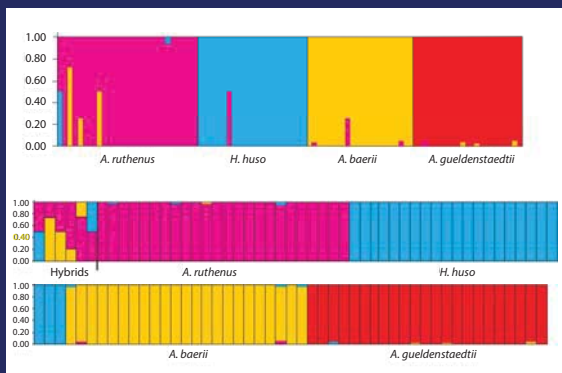
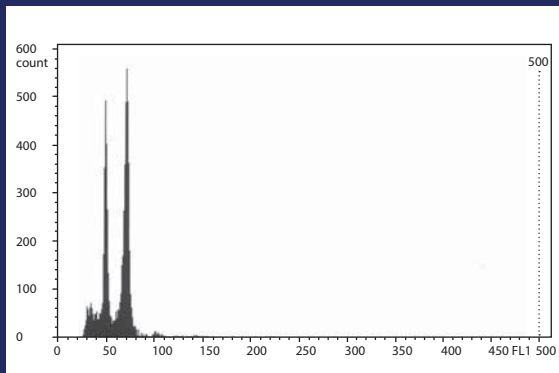
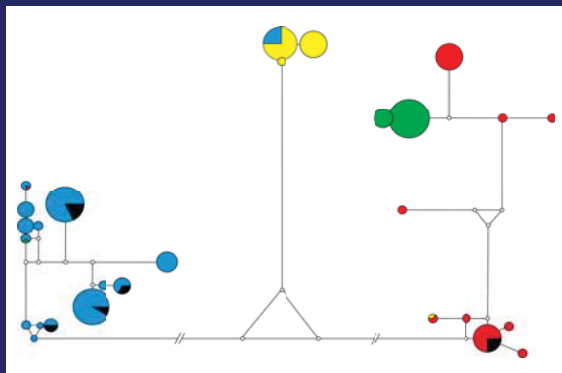
LITERATURA

- Flajšhans, M., Hulák, M., Kašpar, V., Rodina, M., Kocour, M., Gela, D., 2009. Metodika uchování genetických zdrojů ryb v živé genové bance. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 91, 35 s.
- Rodina, M., Flajšhans, M., 2008. Využití RFID technologie ke značení ryb v ČR. Bulletin VÚRH Vodňany 44 (4): 100–108.
- Sbírka zákonů ČR, 2004, částka 32. Zákon č. 99/2004 Sb., o rybníkářství, výkonu rybářského práva, rybářské stráží, ochraně mořských rybolovných zdrojů a o změně některých zákonů (zákon o rybářství). Tiskárna MV, Praha.
- Sbírka zákonů ČR, 2004, částka 44. Vyhláška MZe ČR č. 136/2004 Sb., kterou se stanoví podrobnosti označování zvířat a jejich evidence a evidence hospodářství a osob stanovených plemenářským zákonem. Tiskárna MV, Praha.
- Sbírka zákonů ČR, 2006, částka 106. Zákon č. 344/2006 Sb., Úplné znění zákona č. 154/2000 Sb. o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon), jak vyplývá z pozdějších změn. Tiskárna MV, Praha.
- Sbírka zákonů ČR, 2006, částka 116. Vyhláška MZe ČR č. 370/2006 Sb., o odborných kurzech k výkonu některých odborných činností v oblasti šlechtění a plemenitby hospodářských zvířat. Tiskárna MV, Praha.
- Sbírka zákonů ČR, 2006, částka 145. Vyhláška MZe ČR č. 447/2006 Sb., o genetických zdrojích zvířat. Tiskárna MV, Praha.
- Sbírka zákonů ČR, 2006, částka 145. Vyhláška MZe ČR č. 448/2006 Sb., o provedení některých ustanovení plemenářského zákona. Tiskárna MV, Praha.
- Sbírka zákonů ČR, 2007, částka 63. Vyhláška MZe ČR č. 199/2007 Sb., kterou se mění vyhláška č. 136/2004 Sb., kterou se stanoví podrobnosti označování zvířat a jejich evidence a evidence hospodářství a osob stanovených plemenářským zákonem. Tiskárna MV, Praha.
- Sbírka zákonů ČR, 2009, částka 64. Vyhláška MZe ČR č. 213/2009 Sb., kterou se mění vyhláška č. 136/2004 Sb., kterou se stanoví podrobnosti označování zvířat a jejich evidence a evidence hospodářství a osob stanovených plemenářským zákonem, ve znění vyhlášky č. 199/2007 Sb. Tiskárna MV, Praha.
- Sbírka zákonů ČR, 2010, částka 67. Vyhláška MZe ČR č. 202/2010 Sb., kterou se mění vyhláška č. 136/2004 Sb., kterou se stanoví podrobnosti označování zvířat a jejich evidence a evidence hospodářství a osob stanovených plemenářským zákonem, ve znění pozdějších předpisů. Tiskárna MV, Praha.
- Sbírka zákonů ČR, 2011, částka 11. Zákon č. 32/2011 Sb., kterým se mění zákon č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon), ve znění pozdějších předpisů. Tiskárna MV, Praha.
- Sbírka zákonů ČR, 2011, částka 21: Vyhláška MZe ČR č. 57/2011 Sb., kterou se mění vyhláška č. 448/2006 Sb., o provedení některých ustanovení plemenářského zákona. Tiskárna MV, Praha.
- webové stránky Rybářského sdružení ČR <http://rybsdr.fish-net.cz/plemenarstvi.htm>
a <http://www.cz-ryby.cz/content/default/19> se vzory tiskopisů



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH



Vydání publikace bylo uskutečněno za finanční podpory projektu OP Rybářství:
Příprava a vydání odborných publikací 2011, reg. č. CZ.1.25/3.1.00/11.00303



Evropský rybářský fond
„Investování do udržitelného rybolovu“