

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Fakulta rybářství a ochrany vod**

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

**STANOVENÍ VELIKOSTI GENOMU JESETERŮ 2-D a 3-D  
OBRAZOVOU CYTOMETRIÍ**

**Autor:** Bc. Jiří Srp

**Vedoucí diplomové práce:** doc. Ing. Martin Flajšhans, Dr. rer. agr.

**Konzultant diplomové práce:** MSc. Dmytro Bytyutskyy

**Studijní program a obor:** Rybářství

**Forma studia:** Prezenční

**Ročník:** RYBA 2-N

České Budějovice, 2012

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím prameny a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum:

Podpis studenta:

Chtěl bych touto cestou poděkovat vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Martinu Flajšhansovi Dr. rer. agr. za odborné vedení, andělskou trpělivost, pomoc a cenné rady, které mi poskytl v průběhu provádění pokusů a zpracování diplomové práce.

Dále bych chtěl poděkovat svému konzultantovi diplomové práce MSc. Dmytro Bytyutskyy a zaměstnancům FROV JU ve Vodňanech paní Marii Pečené, panu Martinu Kahancovi, DIS a panu Ing. Davidu Gelovi, Ph.D. za obětavou pomoc při vypracování mé diplomové práce či při práci s jeseterovitými rybami.

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**Fakulta rybnářství a ochrany vod**  
Akademický rok: 2010/2011

**ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jiří SRP**  
Osobní číslo: **V10N017P**  
Studijní program: **N4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Rybnářství**  
Název tématu: **Stanovení velikosti genomu jeseterů 2-D a 3-D obrazovou cytometrií**  
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický**

**Z á s a d y   p r o   v y p r a c o v á n í :**

Cílem práce je stanovit velikost genomu evolučně polyploidních a neopolyploidních jeseterů metodami počítačové analýzy 2-D a 3-D obrazu specificky barvených buněčných jader. Student získá přehled o metodách odběru a hodnocení vzorků populací pro účely cytogenetických analýz a metodách stanovení velikosti genomu. V experimentální části bude student pracovat se vzorky různých druhů jeseterů, jejich hybridů, stanoví velikost jejich genomů densitometrií a konfokální mikroskopií a pokusí se získat představu o změnách prostorové konformace buněčného jádra se zvětšující se ploidií a odvodit dopady na jejich fyziologii.

Rozsah grafických prací: **podle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **cca 30 stran**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Flajšhans, M. a kol., 2008. Genetika a šlechtění ryb. Monografie VÚRH HU Vodňany.**

**Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G., 2006. Fish Cytogenetics. Science Publishers, Enfield, New Jersey, USA.**

**Hochleithner, M., 1996. Störe. AV Ratgeber, Österreichischer Agrarverlag.**

**a další podle požadavků vedoucího**

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Martin Flajšhans, Dr. rer. Agr.**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Konzultant diplomové práce: **MSc. Dmytro Bytyutskyy**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání diplomové práce: **30. listopadu 2010**  
Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2012**

0.2.   
prof. Ing. Otomar Linhart, Dr.Sc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD  
250 02 Vodňany (2)

  
doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.  
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. ledna 2011

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	7
<b>2. Literární přehled</b> .....	9
2.1 Systematika a výskyt jeseterovitých druhů ryb ( <i>Acipenseridae</i> ).....	9
2.2 Biologie a fyziologie jeseterů .....	13
2.3 Rozmnožování jeseterů.....	16
2.4 Genetika jeseterů.....	23
2.4.1 Identifikace mezirodových a mezidruhových hybridů .....	29
2.5 Metody stanovující úroveň ploidie a velikost genomu u jeseterů .....	32
2.6 Fyziologické změny závislé na velikosti genomu .....	35
2.6.1 Genofond jeseterovitých ryb a jeho ochrana .....	37
<b>3. Materiál a metodika</b> .....	38
3.1 Studované čisté druhy jeseterů .....	38
3.2 Studování hybridů.....	43
3.3 Získávání vzorků.....	45
3.4 Příprava vzorků pro počítačové analýzy 2-D a 3-D obrazu.....	47
3.5 Použité metody stanovující úroveň ploidie a velikost genomu .....	51
3.6 Potřebné vybavení pro počítačové analýzy a jejich použití.....	53
<b>4. Výsledky</b> .....	57
4.1 Výsledky měření velikosti genomu .....	57
4.2 Porovnání standardní a nestandardní velikosti genomu .....	67
4.3 Změny prostorové konformace jádra v závislosti na velikosti genomu .....	73
<b>5. Diskuse</b> .....	80
<b>6. Závěr</b> .....	86
<b>7. Seznam literatury</b> .....	87
<b>8. Seznam tabulek, obrázků, grafů a příloh</b> .....	95
<b>9. Přílohy</b> .....	99
<b>10. Abstrakt</b> .....	103
<b>11. Abstract</b> .....	104

# 1. Úvod

Zástupci řádu jeseterů (*Acipenseriformes*) patří mezi nejpozoruhodnější ryby, které se na naší planetě stále dochovaly. Příslušejí do nadřádu chrupavčitých (*Chondrostei*) a vyznačují se mnoha odlišnostmi od ryb kostnatých (*Teleostei*).

Počátky výskytu jeseterů na planetě Zemi jsou podle paleontologických nálezů datovány do období spodního triasu, recentní čeledi *Acipenseridae* a *Polyodontidae* jsou známy od svrchní křídy. To odpovídá časovému úseku 66 až 97 milionů lety (Berg, 1940). Hovoříme tedy o rybách, které obývaly sladké i slané vody již za éry dinosaurů.

V průběhu 20. století se však jeseterovité ryby dostaly na seznamy ohrožených i kriticky ohrožených druhů a některé populace jeseterů stály na pokraji vyhynutí, převážně vlivem nadměrného rybolovu a pytláctví, znečištěním a antropogenními změnami životního prostředí.

Tato nepříznivá situace však vedla ke zvýšenému zájmu o tyto druhy. Pro jejich záchranu bylo nutné začít jesetery blíže studovat a poznávat. Dále díky rostoucí oblíbenosti produktů z jeseterů (zejména kaviáru) a vlivem jejich úbytku ve volných vodách, se začalo s chovem v řízených podmínkách (tzv. jeseteří farmy).

Oba tyto směry, záchrana i komerční chov, však potřebovaly mnohem detailnější poznatky o jeseterech jako takových. O jejich biotopech, potravě, výskytu, migraci, rozmnožování, biologii a fyziologii.

V řízených chovech byly tyto informace podstatné pro dobrý ekonomický chod farem. Oproti tomu v chovech záchranných, které se koncem 20. století začaly zakládat, byla otázka ekonomického výsledku odsunuta a na její místo nastoupily otázky o přežití druhu v jeho čisté podobě. Jednalo se především o otázky genetických výzkumů.

Jeseteří jsou totiž druhy blízce příbuzné a jsou schopni se mezi sebou vzájemně křížit. Tato druhová příbuznost je tak blízká, že dávají možnost vzniku plodného potomstva. Dále jsou jeseterovité ryby přirozeně polyploidní. Pokud si tyto genetické vlastnosti jeseterů spojíme s jejich evolučním stářím, zásahy člověka do jejich výtěrových cyklů, umělou reprodukci a mnohdy až náhodným zakládáním záchranných chovů generačními rybami z volných vod, tak je naprosto logické, že genetické studie u jeseterovitých ryb jsou nevyhnutelné a musejí být prováděny s patřičnou podrobností.

Z výše uvedených faktů by však bylo nesprávné se domnívat, že jsou žádány pouze čisté druhy jeseterů. Postupem let začali být i velmi intenzivně studováni mezidruhová hybridy jeseterů, a to jak hybridy spontánní, tak i cíleně produkované  $F_1$  hybridy. Důvodem tohoto zájmu je odlišnost jejich vlastností, zejména užitkových, oproti vlastnostem rodičovských druhů (viz kapitola 2.4.1).

S rozvojem moderní techniky a zdokonalením poznatků genetiky je dnes možné studovat genom jeseterovitých druhů ryb z různých pohledů a různými metodami. S tímto zdokonalením moderní techniky však vyvstává problém, kterou metodu na danou problematiku použít? Výběr nesprávné metody často znesnadní nebo i znemožní dosažení správného výsledku nebo závěru.

Cílem této práce je tedy popsat studium velikosti genomu jeseterů metodami 2-D obrazu a 3-D obrazu. S přihlédnutím ke změnám prostorové konformace buněčného jádra popsat rozdíly ve velikosti genomu u vybraných čistých druhů paleopolyploidních jeseterovitých ryb a neopolyploidních jedinců, ať již spontánně autopolyploidních nebo allopolyploidních mezidruhových hybridů. V souvislosti se změnami velikosti genomu se pokusit odvodit možné dopady na fyziologii těchto ryb a pokusit se zohlednit výhody i nevýhody použitých metod pro studování genomu.



## 2. Literární přehled

### 2.1 Systematika a výskyt jeseterovitých druhů ryb (*Acipenseridae*)

Jeseterovité ryby patří do nadřádu chrupavčití (Chondrostei) a nejedná se o nejpočetnější druhy na naší planetě. Jsou to však nesmírně zajímavé druhy a to jak svým evolučním stářím, tak genetickým založením. Tyto zajímavosti však působí velké problémy v jejich systematickém zařazení. Vlivem nových genetických poznatků mohou být některé taxony jeseterů přehodnocovány, spojovány či mohou vznikat nové. Další neméně podstatnou otázkou je, zda byl daný taxon vlivem extrémního snížení počtu jeho jedinců pozorován ve své čisté podobě, jestli již nemohlo dojít k jeho ovlivnění a je tedy systematicky správně zařazen.

Chrupavčité ryby jsou systematicky řazeny (Rochard, et al., 1991; Hochleitner, 2004; [www.wscs.info](http://www.wscs.info)) takto:

Třída: *Osteichthyes* - Ryby

Podtřída: *Actinopterygii* - Paprskoploutví

Nadřád: *Chondrostei* - Chrupavčití

Čeleď: *Polyontidae* - Veslonosovití

*Polyodon spathula* veslonos americký

*Psephurus gladius* veslonos čínský

Čeleď: *Acipenseridae* - Jeseterovití

Rod: *Pseudoscaphirhynchus*

*Pseudoscaphirhynchus kaufmanni* lopatonos Kaufmannův

*Pseudoscaphirhynchus hermannii* lopatonos Hermannův

*Pseudoscaphirhynchus fedtschenkoi* lopatonos Fedčenkův

Rod: *Scaphirhynchus*

*Scaphirhynchus albus* lopatonos velký

*Scaphirhynchus platorhynchus* lopatonos americký

*Scaphirhynchus suttkusi* lopatonos alabamský

Rod: *Huso*

*Huso dauricus*\* kaluga, vyza malá

*Huso huso* vyza velká

Rod: *Acipenser* - Jeseter

*Acipenser brevirostrum* jeseter krátkorýpý

*Acipenser fulvescens* jeseter jezerní

*Acipenser medirostris* jeseter sachalinský

*Acipenser oxyrinchus*\* jeseter ostrorýpý

*Acipenser transmontanus* jeseter bílý

*Acipenser gueldenstaedtii* jeseter ruský

*Acipenser naccarii* jeseter jadranský

*Acipenser nudiventris* jeseter hladký

*Acipenser ruthenus* jeseter malý

*Acipenser stellatus* jeseter hvězdnatý

*Acipenser sturio*\* jeseter velký

*Acipenser baerii* jeseter sibiřský

*Acipenser dabryanus* jeseter jihočínský

*Acipenser colchicus* jeseter kolchický

*Acipenser mikadoi* jeseter severní

*Acipenser persicus* jeseter perský

*Acipenser schrenckii* jeseter amurský

*Acipenser sinensis* jeseter čínský

\* V dosud platné taxonomické klasifikaci jeseterů přetrvává řada rozporů, které jsou v současné době ve vědeckých kruzích často diskutovány. Patří k nim např. 1) existence r. *Huso* jako uměle vytvořeného, při příbuznosti *H. huso* k *A. ruthenus* a příbuznosti *H. dauricus* s *A. schrenckii*, 2) fylogenetické vnoření r. *Pseudoscaphirhynchus* do *A. stellatus*, a 3) rozpor u řazení druhů *A. sturio* a *A. oxyrinchus*. Výsledky provedených analýz vzorků DNA u těchto dvou druhů poskytují dvě možné hypotézy, že *A. sturio* a *A. oxyrinchus* jsou samostatnou z vývojových větví rodu *Acipenser*:

1. Předpokládá se, že před 90 miliony let byla na Zemi původní forma jesetera atlantského, která dala základ pro vznik dvou blízkých druhů a to *A. sturio* a *A. oxyrinchus*.

2. Je zastáván názor, že druhová podobnost je dána pomalou evolucí genomu jeseterovitých ryb a jedná se stále o jeden druh (Gela, 2008).

Molekulární analýzy muzeálních vzorků prokázaly přirozený výskyt hybridní populace *A. oxyrinchus* – *A. sturio* v Baltském moři a jeho přítocích. Tato hybridní populace pravděpodobně vznikla rozšířením americké populace ze Severovýchodního pobřeží Ameriky k Evropě v období poslední malé doby ledové (Fontana et al., 2008). Tiedemann et al. (2007) potvrdil přítomnost alel obou druhů a předpokládal imigraci *A. oxyrinchus*, adaptovaného na chlad a křížení hlavně samic *A. oxyrinchus* se samci baltické populace *A. sturio*. Na základě těchto výsledků probíhá vysazování *A. oxyrinchus* do polských řek (Kolman, 2008).

Velmi podstatným faktem je i to, že jeseterovité ryby nalezneme pouze na severní polokouli. Jeseteři totiž potřebují ke svému životu a následnému rozmnožování čisté, chladnější vody s následnou možností výtěrové migrace. Což jsou velká ústí řek převážně na severní polokouli. Mezi jeseterovitými rybami nalezneme druhy jak sladkovodní, tak i brakické. Prakticky všechny druhy mají určitou migrační aktivitu a to převážně v období výtěru (migrační výtěrová aktivita). Jedná se jak o druhy katadromní, anadromní, tak i o druhy s pouhou poproudovou či protiproudovou migrací.

V dnešní době samozřejmě nalezneme jeseterovité ryby i na jižní polokouli. To je však způsobeno vlivem člověka, většinou za účelem konkrétního komerčního využití. Výskyt chrupavčitých ryb uvádí Birstein (1998) takto:

**Čeleď: *Polyontidae***

Druh	Výskyt
<i>Polyodon spathula</i>	Mississippi, Missouri, Ohio
<i>Psephurus gladius</i>	Yangtze

**Čeleď: *Acipenseridae* - Jeseterovítí; Rod: *Pseudoscaphirhynchus***

Druh	Výskyt
<i>Pseudoscaphirhynchus kaufmanni</i>	Povodí řek Amudarji a Syrdarji
<i>Pseudoscaphirhynchus hermannii</i>	Povodí řek Amudarji a Syrdarji
<i>Pseudoscaphirhynchus fedtschenkoi</i>	Povodí řek Amudarji a Syrdarji

**Čeleď *Acipenseridae*; Rod: *Scaphirhynchus***

Druh	Výskyt
<i>Scaphirhynchus albus</i>	Mississippi
<i>Scaphirhynchus platorhynchus</i>	Mississippi
<i>Scaphirhynchus suttkusi</i>	Mississippi, Mexický záliv

**Čeleď *Acipenseridae*; Rod: *Huso***

Druh	Výskyt
<i>Huso dauricus</i>	Amur
<i>Huso huso</i>	Eurasie

**Čeleď *Acipenseridae*; Rod: *Acipenser***

Druh	Výskyt
<i>Acipenser brevirostrum</i>	Amerika, Nebraska
<i>Acipenser fulvescens</i>	Amerika
<i>Acipenser medirostris</i>	Amerika
<i>Acipenser oxyrinchus</i>	Pobřeží Atlantského oceánu
<i>Acipenser transmontanus</i>	Amerika
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	Eurasie
<i>Acipenser naccarii</i>	Jadran
<i>Acipenser nudiventris</i>	Eurasie
<i>Acipenser ruthenus</i>	Eurasie
<i>Acipenser stellatus</i>	Eurasie
<i>Acipenser sturio</i>	Evropa a Amerika
<i>Acipenser baerii</i>	Eurasie
<i>Acipenser dabryanus</i>	Jižní Čína
<i>Acipenser colchicus</i>	Černé moře
<i>Acipenser persicus</i>	Eurasie
<i>Acipenser schrenckii</i>	Amur
<i>Acipenser sinensis</i>	Yangtze

## 2.2 Biologie a fyziologie jeseterů

Jeseteři patří do řádu *Acipenseriformes*, což je evolučně velmi starý řád chrupavčitých ryb (Chondrostei). První zástupci tohoto řádu na Zemi žili již v období svrchní křídy. Vlivem tohoto významného evolučního stáří a velmi pomalého evolučního vývoje se řád jeseterů od evolučně mladších ryb kostnatých (Teleostei) výrazně odlišuje.

Dle Berga (1911, 1940) a Hochleitnera (2004) je řád jeseterů popsán takto:

Jeseteři mají protáhlé tělo vřetenovitého tvaru, v kaudální části se laterálně zplošťuje. Tělo je pokryto kůží s kostěnými štítky, které se nacházejí v pěti řadách a nazývají se ganoidní šupiny. Kůže však může být i zcela holá s výjimkou lemu některých ploutví. Jedná se především o horní lalok ocasní ploutve. Ten může být pokryt zvláštním typem ganoidních šupin (*fulcræ*). Tyto šupiny jsou ve tvaru  $\Lambda$ . Pod nimi po stranách vzhůru ohnuté distální části ocasního násadce jsou ganoidní kosočtverečné šupiny. *Fulcræ* se také mohou vyskytnout na přední hraně nepárových ploutví, které tak v podstatě nahrazují první tvrdý ploutevní paprsek. Ostatní paprsky jsou již velmi podobné jako u kostnatých ryb.

Řady kostěných štítků vedou podél hřbetu, dále podél postraní čáry a po obou okrajích břicha. Tělo jesetera se tak na průřezu jeví jako pětiúhelníkovité. U juvenilních ryb jsou tyto kostěné štítky zakončeny většinou ostře (špičatě), s přibývajícím věkem se však stávají ploché. U adultních jedinců mohou kostěné štítky na břiše postupně vymizet.

Velmi nápadné je posunutí hřbetní ploutve k ploutvi ocasní (nachází se v poslední třetině těla) a nesouměrnost ocasní ploutve. Jedná se o tzv. heterocerní ploutev, kdy je horní část mnohem delší než část spodní. Důvodem této nesouměrnosti je vyústění páteře (chordy) do horní části ocasní ploutve. U některých druhů jeseterů je horní část protažena do tenkého vlákna (*Scaphirhynchus*).

Na spodní straně rypce se nacházejí výsuvná šterbinovitá ústa s mohutnými pysky. Pysky mohou zasahovat až na boky hlavy (*Huso huso*). Postavení úst je tedy spodní. Ústa jsou opatřena čtyřmi výraznými hmatovými vousky, v jedné příčné řadě, na nichž se nacházejí hmatové a chuťové buňky. Adultní jedinci jsou bezzubí. U výjimek je možné nalézt drobné zuby nacházející se na patře.

Lebka je velmi masivní a vzadu přechází do bazidorzální, resp. baziventrální chrupavky chordy. Spojení čelistí je hyostylní (volné). Rypec je protáhlý, u některých druhů značně dlouhý. Odborně se nazývá rostrum. Vytváří ho prodloužená střední čichová chrupavka (*cartilago ethmoidalis medialis*). U mladých ryb je rypec v poměru k celkové délce těla obvykle delší než u starších jedinců. Na rypci se dále nacházejí receptory (čidla), která dokážou vnímat elektrické podněty z okolí a tím rozlišit možnou kořist. V kraniálním směru od očí jsou umístěny mírně oválné čichové otvory s 20-30 čichovými lamelami. Chrupavčitá je i kost klíční (*clavicula*). Nadočnicový kanál prochází mezi přední a zadní nozdrou a spojuje se s podočnicovým kanálem.

Za dutinou hltanu, se nachází dutina žaberní, kterou mají jeseteři prakticky stejnou jako ryby kostnaté. Dutina obsahuje čtyři žaberní oblouky, každý se dvěma řadami lamel, které jsou opatřeny žebními tyčinkami. Zatímco pátý žební oblouk má funkci nosnou a je částečně propojen s ploutevním pletencem prsních ploutví. Víčková kost (*operculum*) a paprsky žaberní blány zcela chybí. Žaberní tyčinky se vyskytují v malém počtu (problematické dýchání).

Jeseteři mají osifikovanou částečně pouze lebku. Je u nich zachována chorda (*chorda dorsalis*), která není zaškrcena. Chorda je velmi pevná, ale elastická jako jeden dlouhý podélný vaz. Těla obratlů u jeseterovitých ryb zcela chybí. Žebra jsou spodní. Podpurná kostra hřbetní a řitní ploutve je taktéž chrupavčitá. Na každé z radiálií těchto ploutví je několik těsně spojených paprsků.

Trávicí trakt u jeseterů je poměrně krátký (cca 70 – 100% délky těla). Žaludek je jednoduchý a trávicí trakt obsahuje i pylorické přívěšky, které se spojily do vyrovnaného trojúhelníkovitého tvaru. Konec střeva je spirálovitě zatočen se 4-8 otočeními což zvyšuje délku a objem střeva až trojnásobně. Játra tvoří tři laloky.

Jeseteři mají jednoduchý plynový měchýř. Přesto se jedná o poměrně dobré a rychlé plavce, což je umožněno díky tzv. bílé svalovině, která se u nich vyskytuje ze 70% celkové svalové hmoty.

Velmi neobvyklé je překrytí poslední části vejcovodu, který se ve své konečné části stáčí a napojuje se na močové cesty. Pohlavní produkty jsou uvolňovány přímo do dutiny břišní. To způsobuje velmi problematický umělý výtěr (viz kapitola č. 2.3).

Tělo je většinou na hřbetu jednotně tmavé (tmavé hnědé až šedo-černé), světlejší na bocích a břicho je žluté až čisté bílé. Kostěné štítky jsou obecně jasnější než jejich pozadí. I u jeseterů se vyskytují barevné variace. Jsou však méně časté a většinou se jedná o albinismus.

Biologické a fyziologické odlišnosti u jeseterů:

- Jedná se o jedny z největších ryb vůbec. Příkladem je druh *Huso huso* (Linnaeus, 1758). Jedinci toho druhu mohou dosahovat až 10m a 3 200kg (Baruš, 1995).
- Jeseteři jsou migrující druhy. Mají převážně výtěrovou migraci, při které proplouvají sladkými i slanými vodami. Jde tedy o sladkovodní i diadromní druhy ryb.
- Diadromní druhy vytvářejí sezónní „rasy“. Jarní „rasa“ je obvykle menší a tře se na jaře a v létě stejného roku. Podzimní „rasa“ bývá zastoupena většími jedinci a přezimuje v řekách (Baruš, 1995).
- Z hlediska výtěru patří jeseterovití do skupiny jikry neochraňující a litofilní.
- Vlivem velké genetické podobnosti mohou u jeseterů vznikat nejrůznější mezidruhová hybridy, kteří jsou schopni se nadále množit.
- Pohlavně zralé samice nejsou schopny výtěru každoročně (Hochleitner, 2004).
- Jeseterovité ryby postrádají některé reflexy, převážně reflex únikový.
- Vlivem jednoduchého žaludku nejsou schopni štěpit dlouhé proteinové řetězce.
- U jeseterů je počet mikropylí nejen vyšší, ale také velmi variabilní v rámci jedince i druhu: *Acipenser ruthenus* 5-13, *Acipenser baerii* 2-10, *Acipenser stellatus* 1-13 mikropylí, *Acipenser gueldenstaedtii* až 52 (Dettlaff a kol., 1993)
- Spermie zůstávají po 2 minutách stále aktivní až ze 70% (Pšenička a kol., 2010).
- Jeseteři spermie má aktivní akrozómovou čepičku (Pšenička a kol., 2010).

Obr. č. 1: Uložení a stavba orgánů u jeseterů.



\* Viditelný žaberní oblouk, jednoduchý žaludek a pylorické přívěsky, játra, střevo a jednoduchý plynový měchýř. Hochleitner (2004)

## 2.3 Rozmnožování jeseterů

Tato oblast chovu patří mezi nejnáročnější části vůbec a není podstatné, zda se jedná o komerční nebo záchranné chovy. Rozmnožování jeseterovitých ryb je díky znečištění a složité migraci obtížné i pro jedince ve volné přírodě. Jeseteři patří mezi litofilní ryby a o nakladené jikry ani o potomstvo nijak nepečují. Výtěr probíhá vždy na stejných místech (tzv. trdlišťích). Na tato výtěrová místa jeseteři často putují nemalé vzdálenosti (tzv. výtěrová migrace). Bohužel v minulém století došlo díky antropogenním vlivům k úbytku generačních ryb, zničení trdlišť a zamezení prostupnosti migračních cest.

Z těchto důvodů úbytku jeseterovitých ryb ve volných vodách, ale i se stoupající oblíbenosti jejich produktů (maso, kaviár), bylo nutné začít s umělou reprodukcí tohoto druhu. Přirozený výtěr jeseterů byl na mnoha místech naší planety antropogenními změnami omezen až znemožněn. Stále však v některých oblastech přirozený výtěr probíhá (např. Kaspické moře, Dunaj, velké řeky Asie). Ovšem ani na místech kde stále tento proces probíhá, není přirozený výtěr dostatečně veliký, aby zajistil potřebné množství potomstva a vznik další generace v její požadované velikosti. Populace z přirozených výtěrů jsou dnes také podporovány vysazováním jedinců z umělých chovů, získaných umělým výtěrem.

První zemí, která se začala touto problematikou zabývat a byla schopna umělý výtěr provést, byl bývalý Sovětský svaz v roce 1930 (Doroshov, 1985). Výtěr ryb byl založen na odchytu generačních jedinců při migraci na trdlišťe nebo přímo na místech přirozeného výtěru. Pro následné odebrání ovulovaných ovocytů bylo nutné samice usmrtit. Teprve poté následovalo umělé osemnění, aktivace a inkubace jiker.

Klasická metoda umělého výtěru, kdy je používána masáž břišní dutiny, je u jeseterovitých ryb velmi komplikována díky anatomii gonád a vejcovodů. Nálevka vejcovodu se nachází v dorzální části tělní dutiny přibližně v polovině délky těla. Ovulované jikry vypadávají přímo do dutiny tělní. Při výtěru „klasickou metodou“ dojde k vytření pouze části ovulovaných jiker, jelikož tlakem na břišní partie dochází k přimáčknutí gonád na klenbu tělní dutiny a tím dochází k uzavření vejcovodu. Proto je tato metoda zdoluhavá a náročná jak pro rybu tak personál. Výtěr může trvat s přestávkami až 8 hodin (Linhart et al., 2000).



Výrazné usnadnění a pokrok při výtěru přinesla metoda tzv. „císařského řezu“, která splňovala požadavky přežití a možnosti opakované reprodukce ryby v následujících letech. Je známo až pět úspěšných operací u jedné ryby (Conte et al., 1988, Speer et al., 2000). Operace byla prováděna otevřením břišní dutiny ventrálním řezem v délce 100 – 200mm (dle velikosti samice). Následný odběr ovulovaných jiker probíhal pomocí lžice. Po odebrání všech ovulovaných jiker bylo nutné řez dezinfikovat a. V současné době se od této metody také ustupuje a již je využívána jen okrajově. Je to z důvodu náročnosti a velkého zásahu do organismu jedince (celá operace trvá cca 30 minut). Nejlepší výsledky s přežitím a rekonvalescencí ryb dává miniinvazivní chirurgické proříznutí vejcovodu a výtěr jiker (Štěch et al., 1999).

Původní způsob získávání generačních ryb odlovem z přirozeného prostředí se v současnosti využívá jen okrajově a to pro zachování druhu (odlovy v Číně *Acipenser sinensis* na Yangtze River – Williot et al., 2001; Wei et al., 2006).

Dnes je proto nejobvyklejší držení vlastních generačních hejn, která jsme si od juvenilních jedinců sami vybrali. Značnou prostorovou i ekonomickou zátěží chovu generačních hejn je velmi pozdní pohlavní dospělost jeseterů.

Tab. č. 1: Věk při dosažení pohlavní dospělosti (Hochleitner, 2004).

Druh	Samci (roky)	Samice (roky)
<i>A. ruthenus</i>	3 – 7	5 – 9
<i>A. gueldenstaedtii</i>	8 – 14	10 – 20
<i>A. stellatus</i>	9 – 14	11 – 15
<i>H. huso</i> *	10 - 16	14 – 20

\* Podle zkušenosti firmy Gross (Fischzucht Peter und Udo Gross GmbH & Co. KG, Německo) nastává pohlavní dospělost u *Huso huso* v chovu na oteplené vodě u samců v 7 – 9 letech a u samic v 11 – 13 letech (Gela, 2008)

Pokud chovatel jeseterů hospodaří s tzv. uzavřeným obratem, tj. odchovává z juvenilních jedinců vlastní generační hejno, je bezpodmínečně nutné, aby o těchto jedincích měl dokonalý přehled. To umožní podrobná dokumentace o každém jedinci, který musí být určitým způsobem od ostatních jedinců odlišen. Každý jedinec v budoucím generačním chovném hejnu musí být určitým způsobem označen pro snadnou identifikaci.

V České republice jsou pro jeseterovité ryby využívány tyto tři typy značení:

1. Barevné ploutevní značky: Jedná se o velmi jednoduchou, ale praktickou metodu. Jedincům je po určení pohlaví připevněna do levé prsní ploutve barevná značka s identifikačním číslem. V rámci dodržení zavedeného zootechnického systému je samicím přidělena značka žluté barvy a samcům značka červené barvy. Nezbytnou součástí je zavedení dat individuálně značených ryb do databáze (nejlépe počítačové např. „Evidence 2003“, Gela et. al., 2006). Značka je levná a neporuchová.



Obr. č. 2: Ploutevní značky.

2. PIT značky: Jde o přidělování identifikačních čipů typu P.I.T. (passive integrated transponder tags) pracujících např. na frekvenci 134,2 kHz (Rodina a Flajšhans, 2008). Čipy jsou nejčastěji zaváděny injekčními aplikátory do levé partie hřbetu. Pro jejich identifikaci je zapotřebí čtecí zařízení. Výhodou této metody je unikátní identifikační kód, který je čip schopen poskytnout. Naopak nevýhodou je velké množství doprovodné čtecí elektroniky a vysoké pořizovací náklady.



Obr. č. 3: Injekční aplikátor.

3. VIE systém: Je určen především pro skupinové značení ryb. Využívá vizuální elastomerové značky tzv. VIE (Visible Implant Elastomer tags). Jedná se o barevné značky, které jsou viditelné pouhým okem, popřípadě pomocí UV lampy. Tyto značky se aplikují pod průhlednou epidermis (bez pigmentu). U jeseterů se osvědčila ventrální strana rypce (rostrum). Jde o nejmodernější metodu. Ovšem ztrátovost značek činí až 50%. Elastomery se implantují pomocí speciálního aplikátoru.



Obr. č. 4: Značky VIE.

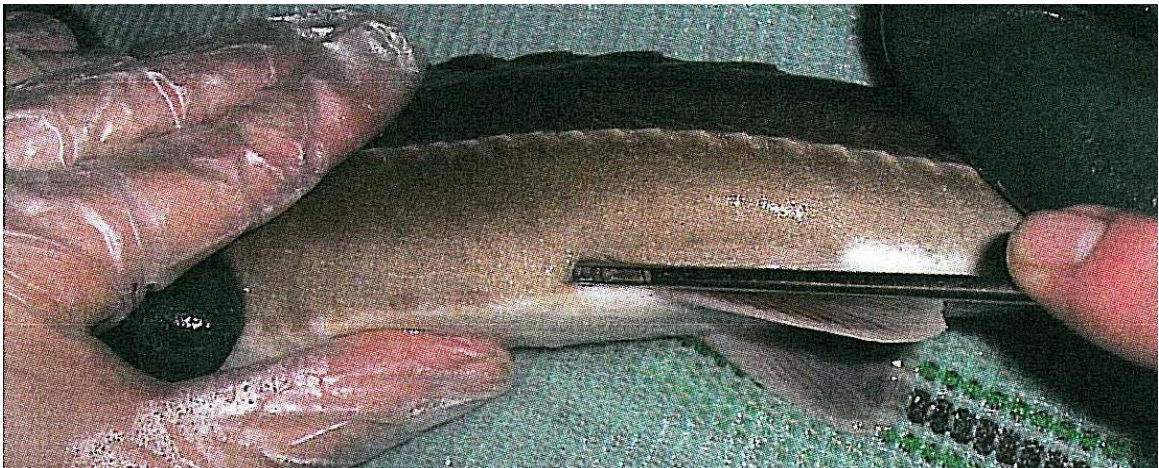
Pokud již máme generační hejno s jedinci ve věku a velikosti, kdy by již mohli mít patřičně vyvinuté gonády (viz tabulka č. 1), musíme určit pohlaví jedinců a řádně je označit (založení databáze). Pro dlouhodobý a úspěšný chov je z genetického hlediska doporučováno udržovat alespoň tři původem odlišné populace od každého chovaného druhu s odstupem stáří ryb nejméně dvou let a postupným označením po 300 kusech remontních ryb z každé populace. V průběhu budoucí reprodukce je totiž nezbytné vzájemně křížení jednotlivých jedinců z jednotlivých populací. Jde se o velmi náročný způsob chovu. Avšak takto je možné zamezit nebezpečí příbuzenské plemenitby a genetického driftu, jež může nastat v populacích s malým počtem křížených jedinců. Z genetického hlediska je pro vyvážený chov nutné držení alespoň 900 kusů juvenilních ryb a finálního hejna 300 kusů dospělých ryb (Gela, 2008). Při umělém výtěru je nezbytné správné určení pohlaví a zralost ovocytů.

Rozpoznání pohlaví je v principu možné více způsoby:

- Biopsií tkáně gonád
- Sonograficky
- Podle hormonálního profilu krve

K určení stádia zralosti ovocytů se na většině farem provádí tzv. biopsie tkáně (obrázek č. 5). Toto určení jde však provádět pouze u dospělých a zralých jedinců (viz tabulka č. 1). K biopsii se využívá speciální trokar (sonda) (Kazanskii et al., 1978), který musí být přizpůsoben velikosti ovocytů dle druhu ryby, aby nedošlo k poškození.

Obr. č. 5: Biopsie gonád sondou u jesetera malého.



Gela (2008)

Tab. č. 2: Průměrná velikost jiker a počet zralých vytřených jiker v 1g (Hochleitner, 2004).

Druh	Velikost jiker (mm)	Počet jiker v 1g
<i>A. ruthenus</i>	1,9 – 2,5	110 – 1120
<i>A. baerii</i>	2,4 – 2,9	50 – 55
<i>A. gueldenstaedtii</i>	2,8 – 3,8	45 – 70
<i>A. stellatus</i>	2,7 – 3,2	70 – 100
<i>H. huso</i>	3,3 – 4,5	27 – 45

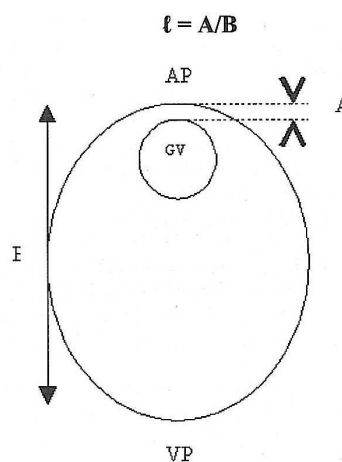
Před vlastním odběrem musí být sonda dezinfikována (například roztokem hypermanganu  $1\text{g.l}^{-1}$  teplé pitné vody). Trokarem poté penetrujeme břišní stěnu a zasuneme ho dostatečně hluboko. Při tomto úkonu je nutná velká opatrnost a šetrnost, aby nedošlo k poškození vnitřních orgánů (především střeva). Následně šroubovým otáčením odebereme část tkáně. Pokud byl dodržen směr a hloubku vpichu, tak se místo penetrace během několika týdnů zahojí. Po ukončení odběru je nutné místo odběru opět dezinfikovat.

Po odebrání vzorky fixujeme jikry v Serrově roztoku (složení na 100ml: 60ml ethanolu 96%, 30ml formaldehydu 38%, 10ml ledové kyseliny octové 99%; Rodina, 2006).

Tento roztok způsobuje konzervaci ovocytů, a proto je možné s jejich určováním začít nejdříve po 24 hodinách. Určování probíhá pod stereomikroskopem, kde se určí plocha jádra (Kazanski et al., 1978; Rodina, 2006). Optimální polohu udává klasifikační index ( $\ell$ ) na úrovni 0,06.

Obr. č. 6: Určení zralosti ovocytu dle Conte (1988).

AP – animální pól, VP – vegetační pól, GV – jádro  
 A – Vzdálenost mezi jádrem a membránou ovocytu  
 B – Průměr mezi animálním a vegetačním pólem  
 $\ell$  - klasifikační index



Před vlastním výtěrem je důležitá také teplotní stimulace remontních jedinců. Vybrané samce a samice přesuneme do připravených bazénů, kde zajistíme postupné navyšování teploty vody (s maximálním denním navýšením 3 °C). Konečná teplota by měla být 14 – 15 °C. Tato teplota je udržována minimálně 5 – 7 dní před plánovanou hormonální stimulací ryb (Gela, 2008). Jedince není nutné rozdělovat podle pohlaví. U jeseterovitých ryb ani po hormonální stimulaci nedojde ke spontánnímu výtěru jako např. u ryb kaprovitých.

K hormonální stimulaci samců se používá jednorázová nitrosvalová injekce suspenze kapří hypofýzy a fyziologického roztoku v dávce  $4\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti ryby (Gela, 2008). K optimální spermiaci dochází asi po 36 hodinách od aplikování suspenze při zmiňované teplotě 14–15°C.

Ke spermiaci se dá též použít jednorázová nitrosvalová dávka:

- Kobarelinu v množství  $50\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti
- Ovopelu v dávce 1 peletky. $\text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti ryby

Při použití těchto látek se spermiace dostaví již po 20 hodinách od hormonální stimulace (Rzemieniecki et al., 2004). Anestézie se u samců neprovádí, pokud se již nejedná o jedince větších rozměrů, se kterými je manipulace již složitá.

Pokud již nastala spermiace je samec položen hřbetem na výtěrový stůl. Velmi důležité je osušení pohlavního otvoru a jeho okolí. Sperma je poté odebíráno suchou kanylou, která je upravena do špičky. Velikost a průměr kanyly musíme přizpůsobit jedinci, kterému je sperma odebíráno. Kanyla je poté zasunuta upraveným koncem do chámovodu a její volný konec se vloží do předem připravené suché nádoby. Při dobré připravenosti samců není masáž břišní dutiny nutná. Odebrané sperma je možné uchovávat až na dobu 72 hodin. Nezbytné je však dodržení teploty 0 až 4°C. Sperma jeseterů je bělavé až mléčné a má vodnatou konzistenci. Koncentrace spermií je v rozmezí  $0,01 - 1 \times 10^9$  v 1ml.

Ke stimulaci samic je též používána nitrosvalová injekce suspenze kapří hypofýzy a fyziologického roztoku. Je již ovšem podávána ve dvou dávkách:

1. Dávka je  $0,5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti ryby (Gela, 2008).
2. Dávka po 12-ti hodinách, a to  $4,5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti ryby (Gela, 2008).

Časový rozdíl mezi první a druhou dávkou činí 12 hodin. Ovulace poté nastává do 42 hodin od první dávky suspenze hypofýzy. Neklamným signálem pro chovatele je objevení se prvních černých jiker na dně nádrže.

Ovulující samici je třeba před výtěrem anestetizovat ke zmírnění stresu, snazší manipulaci, a také k minimalizaci možného následného poranění při neočekávaném pohybu ryby v momentě provádění chirurgického řezu. K anestezii je možné použít např. roztok hřebíčkového oleje o koncentraci  $0,07 \text{ ml.l}^{-1}$  (Gela, 2008). Po anestézii samici vyzvedneme z lázně a přemístíme jí na výtěrový stůl opět hřbetem dolů. Velmi podstatné je pečlivé osušení pohlavního otvoru a jeho okolí. Vlastní chirurgický zákrok dle Štěcha a kol. (1999) spočívá v proříznutí vejcovodu v délce 20mm v místě před vyústěním do pohlavního otvoru. Poté následuje klasická masáž břišních partií. Celý zákrok by neměl překročit dobu 10 minut. Nejdůležitější je úplně zbavit rybu všech postupně ovulovaných jiker. Proto se ryby po několika hodinách nebo nejpozději druhý den tzv. „dotírají“. Jikry, které by zůstaly v břišní dutině, by začaly podléhat následnému rozpadu a způsobily by sepsi, jež by vedla až k úhynu samice.

Jikry vytíráme do připravených, jasně označených a suchých misek. Vytřené jikry mají dle druhu šedočernou až černou barvu a jsou v ovariální tekutině. Velmi dobře zřetelný je animální pól. Vytřené ovocyty je nutné pečlivě chránit před kontaktem s vodou a přímým slunečním svitem. Hmotnost vytřených jiker se pohybuje okolo 10 – 15% hmotnosti samice. Samice je schopna dalšího výtěru za 2 – 3 roky dle podmínek prostředí (Hochleitner, 2004).

K oplození a aktivaci 1000g jiker je vhodné použít 20 – 25ml heterospermatu, které je naředěno čtyřmi litry aktivační vody. Jikry je poté nutno několikrát důkladně propláchnout. Z důvodu lepivosti jiker je nutné ihned začít s jejich odlepkováním. Jako odlepkovací suspenze je nejčastěji využíván jíl a to z důvodů chladné vody (cca  $15^{\circ}\text{C}$ ), při které ostatní odlepkovací prostředky (např. mléko) nefungují nebo jsou nedostatečné. Vlastní odlepkování trvá 60 minut (Gela et al., 2003). Jikry je nutno po celou dobu procesu míchat (šetrné zacházení). Po odlepkování je nutno jikry propláchnout a čisté jikry umístit na inkubační aparáty. Jikry jsou extrémně citlivé na následné otřesy.

Líhnutí neprobíhá hromadně. Probíhá v dlouhém časovém intervalu po dobu 2 – 3 dnů (Gela, 2008). Vykulený plůdek velice ochotně plave s vodou a je umístěn na odchovné žlaby, kde se následně rozplavává a je rozkrmován.

## 2.4 Genetika jeseterů

Výzkum systematických vztahů v čeledi *Acipenseridae* je v současné době velmi komplikován přítomností mezidruhových či mezirodových hybridů a rozšířeným anatomickým a ontogenetickým polymorfismem (Berg, 1962). Nejběžnější taxonomická kritéria jsou založena na morfologických, etologických a ekologických znacích. Velmi podstatné je též biogeografické rozšíření druhů (Rochard, 1991).

Cytogenetická a molekulární data teprve nedávno poskytla lepší a hlubší pohled na možnosti druhového rozlišení uvnitř řádu. Díky tomu jsou objevovány nové taxonomické a fylogenetické vztahy mezi skupinami určitých druhů. Nejdůležitější poznatky se týkají i typických vlastností jeseterů, jež je například polyploidie.

### a) Cytogenetika:

Podle přehledu Fontana a Zane (2007), první data o množství nukleární DNA u jeseterů byla získána v 50. letech 20. stol. Mirsky a Riss (1951) si pomocí histofotometrických metod všimli, že *Acipenser sturio* má 3,2pg nukleární DNA v buněčném jádru. Toto množství nukleární DNA bylo prokazatelně vyšší než u modelových kostnatých ryb. Tento poznatek tak podpořil hypotézy, že primitivní ryby mohou mít vyšší množství DNA než mladší kostnaté ryby.

První data o počtu chromozómů u jeseterů byla získána kolem roku 1965 ruskou autorkou Serebryakovou (Serebryakova, 1972), která zaznamenala 60 chromozómů u *Huso huso* a *Acipenser ruthenus*. I přes velký úspěch byly dané výsledky velmi nedostatečné kvality.

Ve stejné době pozoroval Ohno (1969), že karyotyp jesetera *Scaphirhynchus platyrhynchus* byl tvořen 112 chromozómy, z nichž 48 byly mikrochromozómy. Také zjistil, že množství nukleární DNA bylo  $3,6\text{pg.jádro}^{-1}$ . Tento velký rozdíl v počtu chromozómů v porovnání s tím co bylo pozorováno ruskými výzkumníky, byl zřejmě zapříčiněn primitivním rozlišením předchozí techniky, jež nebyla schopna rozpoznat mikrochromozómy.

Další zlepšení metody stanovení zjištění karyotypu bylo předošetření mitotickými inhibitory a poté sušení chromozomových preparátů na vzduchu (Fontana a Colombo, 1974). Touto metodou bylo zjištěno, že karyotyp u *Huso huso* a *A. sturio* se skládá ze 116 chromozómů, ale u *A. naccarii* je již z 240 chromozómů.

Kolem roku 1980 se zvýšilo množství dat o karyotypech jeseterů zejména díky práci ruských vědeckých pracovníků.

Tab. č. 3: Stanovený karyotyp u vybraných druhů jeseterovitých ryb.

Druh	Karyotyp	Autor
<i>A. nudiventris</i>	4n = 118	Arefjev, 1983
<i>A. stellatus</i>	4n = 118	Birstein, 1987
<i>H. dauricus</i>	4n = 120	Burtzev et al., 1976
<i>A. schrenckii</i>	8n = 240	Vasil' ev et al., 1980
<i>A. baerii</i>	8n = 250	Vasil' ev et al., 1980
<i>A. gueldenstaedtii</i>	8n = 250	Birstein, 1987
<i>A. sinensis</i>	8n = 264	Yu et al., 1987

Všechna zmiňovaná data podpořila přítomnost dvou skupin jeseterů:

- **Skupina A** je charakterizována karyotypem se 116 – 120 chromozómy
- **Skupina B** je charakterizována karyotypem s 240 – 260 chromozómy

Autoři tak hájili názor, že vztah ploidie mezi těmito dvěma skupinami byl tetra-oktaploidní (4n – 8n). Avšak některá data nesouhlasila s výše uvedenou hypotézou, a v tomto případě zastánci tetra-oktaploidní hypotézy obhajovali naměřené výsledky nepříliš jasným diploidizačním procesem (Birstein, 1987).

Zavedení metody průtokové cytometrie do rybí genetiky učinilo kvantitativní stanovení obsahu nukleární DNA mnohem snadnějším a rychlejším. Tato metoda je též považována za jednu z nejspolehlivějších. Velikost genomu u sedmi druhů amerických jeseterů byla nalezena v rozmezí 4,6 – 13,1pgDNA.jádro<sup>-1</sup> (Blacklidge a Bidwell, 1993).

Autoři následně rozdělili zmiňovaných 7 druhů jeseterů do 3 skupin a to v poměru 1:2:3, kde byly považovány:

- Tetraploidní (4n) druhy za ty s nejnižší hodnotou.
- Oktaploidní (8n) druhy dosahovaly středních hodnot.
- Dodekaploidní (12n) druhy dosahovaly nejvyšších hodnot.



Poněkud odlišné výsledky stanovení byly získány u 10 druhů jeseterovitých ryb z amerického a euroasijského regionu (Birstein et al., 1993). Uvedených deset druhů bylo také rozděleno do 3 skupin. Ovšem do poněkud rozdílných:

- Tetraploidní
- Oktaploidní
- Hexadekaploidní (16n)

Podle výše uvedených dat došli vědci k závěrům, že druhy skupiny A byly tetraploidní a druhy skupiny B musely být oktaploidní.

Velký přínos pro porozumění vztahů ploidie mezi jeseteřími skupinami A a B byl poskytnut barvením chromozomů za tepla směsí roztoků želatiny a dusičnanu stříbrného, které pomáhá stanovit ribosomální genové aktivity a identifikuje oblasti nukleárního uspořádání (NOR = nucleolar organizing regions) (Goodpasture a Bloom, 1975). NOR počet chromozómů u druhů skupiny A dosahoval 4 – 6 chromozómů, zatímco u skupiny B dosahoval počet 8 – 13 chromozómů (Fontana et al., 2001). Z těchto výsledků vyplývá, že u druhů skupiny A mohou být NOR chromozómy shromážděny v párech. Ovšem u druhů skupiny B mohou být chromozomy shromážděny v sadách čtyř podobných chromozómů.

Další přehled o ploidní úrovni jeseterů může být vyvozen pomocí metody fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Satelitní DNA, která byla izolována z genomu *Acipenser naccarii* a byla ošetřena restričním enzymem (HindIII), je využívána jako tzv. FISH sonda na metafázních chromozómech. Hybridizační signály byly jasně rozpoznatelné v centrometrických oblastech všech zkoumaných druhů, kromě *A. sturio*. U všech zkoumaných druhů ve skupině A bylo signály detekováno 8 – 10 chromozómů a ve skupině B signály dosahovaly 40 – 80 chromozómů (Landfredi et al., 2001; Fontana et al., 2004).

Tab. č. 4: Počet chromozómů a obsah DNA u *Acipenseriformes* skupiny A (evolučně tetraploidní, 4n).

Druh	Počet chromozómů	Obsah DNA (pg)	Autor
<i>A. oxyrinchus</i>	4n = 99 – 112	4,55	Blacklidge, 1993
<i>S. platyrhynchus</i>	4n = 112	3,6	Ohno et al., 1969
<i>A. ruthenus</i>	4n = 116 ± 4	3,74	Birstein et al., 1993
<i>A. sturio</i>	4n = 116 ± 4	3,2	Mirsky, 1951
<i>H. huso</i>	4n = 116 ± 4	3,6	Fontana, 1976
<i>A. stellatus</i>	4n = 118 ± 2	3,74	Birstein et al., 1993
<i>A. nudiventris</i>	4n = 118 ± 3	3,9	Birstein et al., 1993
<i>H. dauricus</i>	4n = 120	3,78	Birstein et al., 1993
<i>P. spathula</i>	4n = 120	3,9	Tiersch et al., 1989

Tab. č. 5: Počet chromozómů a obsahu DNA u *Acipenseriformes* skupiny B (evolučně oktaploidní, 8n).

Druh	Počet chromozómů	Obsah DNA (pg)	Autor
<i>A. naccarii</i>	8n = 239 ± 7	6,26	Fontana, 1976
<i>A. schrenckii</i>	8n = 240	6,07	Zhang et al., 1999
<i>A. baerii</i>	8n = 249 ± 5	8,3	Birstein et al., 1993
<i>A. medirostris</i>	8n = 249 ± 8	8,82	Blacklidge, 1993
<i>A. gueldenstaedtii</i>	8n = 250 ± 8	7,87	Birstein et al., 1993
<i>A. fulvescens</i>	8n = 262 ± 6	8,9	Blacklidge, 1993
<i>A. sinensis</i>	8n = 264 ± 4	9,07	Zhang et al. 1999
<i>A. transmontanus</i>	8n = 271	9,55	Blacklidge, 1993

\* U diploidních organismů pojem velikosti genomu odpovídá množství DNA v jedné kopii genomu, čemuž rovněž odpovídá pojem C-hodnota jako obsah haploidní jaderné DNA. Ale jelikož polyploidní mohou obsahovat dva nebo více genomů v haploidním jádře, tak by použití termínu C-hodnota mohlo vést k nedorozumění. Proto v této práci je raději používán výraz obsah DNA, který odpovídá celkovému množství DNA v somatické buňce.

Všechny tyto cytogenetické poznatky silně podporují hypotézu, že jeseteři se 120 chromozómy patřící do skupiny A jsou tetraploidní. Zatímco jeseteři patřící do skupiny B s 240 – 260 chromozómy jsou oktaploidní.

V roce 2005 Kim et al. popsali karyotyp u *A. brevirostrum*, který obsahoval 372 chromozómů. Blacklidge (1993) si však již všiml, že tento druh má obsah nukleární DNA 13,08pg. To je 2,78 x vyšší hodnota než je průměr skupiny A a 1,44x vyšší hodnota než skupiny B. Dle těchto poznatků je *A. brevirostrum* odvozeným druhem, jehož původ může být v hybridizaci mezi druhy u skupin A a B.

## b) Molekulární genetika:

Fontana a Zane (2007) shrnují kromě přímé vizualizace chromozómů i využití molekulárně biologických technik u jeseterovitých ryb. U jeseterovitých ryb je možné využít metodu fylogenetické rekonstrukce, jež je založena na molekulárních markerech (Birstein *et al.*, 1997, 1998; Zhang *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2001). Stejně tak je možné využít metodu mapování počtu chromozómů na fylogenetických stromech (Maddison a Maddison, 1992). Nyní je metoda fylogenetických stromů využívána pro 22 z 27 druhů *Acipenseriformes* (Ludwig *et al.* 2001).

Molekulární markery mohou být použity k přímému vyvození ploidní úrovně genomu analyzováním maximálního počtu alel, jež byly nalezeny v daném lokusu. Například maximum dvou alel je očekáváno v diploidním lokusu, zatímco tetraploidní lokus by měl obsahovat maximálně 4 alely. Tato metoda ovšem přinesla neslučitelné výsledky (Fontana a Zane, 2007).

Nejpoužívanějšími markery jsou mikrosatelitní DNA markery, které byly nalezeny ve všech prokaryotických a eukariotických genomech analyzovaných do dnešní doby. Jsou obsaženy hlavně v nekódujících oblastech. Jedná se o nesmírně cenný nástroj studia genetické variability (Zane *et al.*, 2002). Mikrosatelitní markery byly poprvé izolovány z *A. fulvescens* s 240 chromozómy (May *et al.* 1997).

Mikrosatelitní markery mohou být postiženy určitými problémy:

- Přítomnost ne více než dvou alel může indikovat diploidii na lokusu.
- Po genové duplikaci nemusí multilokusová analýza souhlasit
- Jediná duplikace lokusu může vést ve zdánlivou polyploidii.

Kromě studia počtu alel byly mikrosatelity použity i v segregáční analýze k identifikaci disomických, tetrasomických a oktasomických přenosových znaků u *A. fulvescens* (Pyatskowitz *et al.*, 2001; McQuown *et al.*, 2002). Disomický genetický odkaz je typický pro alotetraploidy, u nichž jsou homologické chromozomy ze dvou rodičovských druhů naprosto odlišné od ostatních (Olson, 1997). Zatímco tetrasomický genetický odkaz je typický pro autotetraploidy, u alotetraploidie se čtyři chromozómy nesoucí stejný tetraploidní lokus chovají jako nesoucí dva diploidní lokusy. Proto se pouze jeden chromozóm z každého páru odděluje do každé gamety (Fontana a Zane, 2007).

Tab. č. 6: Testování a izolování mikrosatelitních lokusů dle May et al. (1997) (M) a Ludwig et al. (2001) (L). **p** = Polymorfní; **m** = Monomorfní; **n** = Neaktivní.

Locus	LS19		LS22		LS23		LS34		LS39		LS54		LS57		LS58		LS62		LS68		LS69	
	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L
Druh																						
<i>A. baerii</i>	-	p	-	-	-	-	-	p	-	p	-	p	-	p	-	-	-	-	-	p	-	-
<i>A. brevirostrum</i>	p	p	n	-	m	-	p	p	p	p	p	p	p	n	m	-	p	-	p	p	p	-
<i>A. fulvescens</i>	p	p	p	-	m	-	m	n	p	p	m	p	p	p	m	-	p	-	p	p	p	-
<i>A. gueldenstaedtii</i>	-	p	-	-	-	-	-	p	-	p	-	p	-	n	-	-	-	-	-	p	-	-
<i>A. medirostris</i>	p	p	m	-	m	-	m	p	m	n	m	p	p	p	m	-	p	-	p	p	n	-
<i>A. mikadoi</i>	-	p	-	-	-	-	-	p	-	n	-	m	-	p	-	-	-	-	-	p	-	-
<i>A. naccarii</i>	-	p	-	-	-	-	-	p	-	p	-	p	-	n	-	-	-	-	-	p	-	-
<i>A. nudiventris</i>	-	p	-	-	-	-	-	m	-	m	-	p	-	n	-	-	-	-	-	p	-	-
<i>A. oxyrinchus</i>	p	p	n	-	m	-	m	p	m	p	p	p	m	n	m	-	-	p	p	p	m	-
<i>A. persicus</i>	-	p	-	-	-	-	-	p	-	p	-	p	p	-	-	-	-	-	-	p	-	-
<i>A. ruthenus</i>	-	p	-	-	-	-	-	p	-	p	-	n	-	n	-	-	-	-	-	p	-	-
<i>A. schrenckii</i>	-	p	-	-	-	-	-	p	-	m	-	p	-	n	-	-	-	-	-	p	-	-
<i>A. sinensis</i>	-	p	-	-	-	-	-	p	-	p	-	p	-	n	-	-	-	-	-	p	-	-
<i>A. stellatus</i>	-	p	-	-	-	-	-	p	-	m	-	p	-	n	-	-	-	-	-	p	-	-
<i>A. sturio</i>	-	p	-	-	-	-	-	p	-	p	-	p	-	n	-	-	-	-	-	p	-	-
<i>A. transmontanus</i>	m	n	n	-	n	-	m	p	m	m	m	m	p	p	m	-	p	-	p	p	m	-
<i>H. huso</i>	-	p	-	-	-	-	-	p	-	p	-	p	-	n	-	-	-	-	-	p	-	-
<i>H. dauricus</i>	-	p	-	-	-	-	-	p	-	p	-	p	-	n	-	-	-	-	-	p	-	-
<i>S. albus</i>	p	m	n	-	n	-	p	p	m	p	p	m	p	p	m	-	p	-	p	p	m	-
<i>S. platyrinchus</i>	p	p	n	-	n	-	p	p	m	p	p	p	p	p	m	-	p	-	p	p	m	-

### 2.4.1 Identifikace mezirodových a mezidruhových hybridů

Hybrid je jedinec, který vznikl procesem hybridizace (křížení). Hybridem rozumíme potomka (potomstvo) vzájemného páření mezi jedinci patřícími do různých rodů, druhů, k různým plemenům, populacím či liniím, a pak rozlišujeme hybridy mezirodové či mezidruhové, a hybridy vnitrodruhové (mezipopulační, meziplenné a meziliniové; Flajšhans a kol., 2008). Hybridizaci můžeme dále členit na spontánní (přirozenou, k níž dochází v přírodě bez zásahu člověka) a umělou.

U jeseterů je schopnost přirozené hybridizace (a rovněž poskytovat životaschopné potomstvo po umělé hybridizaci) oproti ostatním druhům ryb výrazně podpořena dalšími faktory:

- přirozená evoluční polyploidie
- blízká genetická příbuznost
- evoluční stáří
- velmi shodné nároky na rozmnožování

Tyto faktory navíc nepůsobí jednotlivě, ale vzájemně se doplňují. Dávají tak možnost vzniku nejrůznějších typů hybridů. Některé teorie dokonce uvádějí, že spojením těchto faktorů došlo k vytvořením nových druhů jeseterů.

Na základě počtu chromozómů jsou jeseteři rozděleni do dvou skupin, jež první obsahuje 116 – 120 chromozómů a druhá 240 – 260 chromozómů (viz kapitola 2.4). Pokud ke křížení jeseterů dochází uvnitř skupiny, tak vzniká plodné potomstvo. Pokud ovšem dochází k mezidruhovému křížení mezi skupinami, mělo by vznikat triploidní potomstvo, které by mělo být neplodné (Hochleitner, 2004).

Ovšem u jeseterů toto pravidlo neplatí vždy jednoznačně. Díky evoluční polyploidii může docházet k situacím, kdy mezidruhové hybridy jsou dokonale plodné. Je to možné díky sudému počtu chromozómů, které daný jedinec získá. Jelikož tento sudý počet chromozómů se pak velmi snadno rozdělí do pohlavních produktů v následném procesu spermatogeneze či ovogeneze.

Změny počtu chromozómů při rozmnožování však nejsou otázkou pouze mezidruhových hybridů. U jeseterovitých ryb je možný i jev tzv. autopolyploidie. Při němž dochází k navýšení sad chromozómů například při gametogenezi nebo v průběhu

procesu oplození a reprodukci jedinců stejného druhu o obvyklé úrovni ploidie pak mohou vzniknout v potomstvu např. jedinci s úrovní ploidie o 1/3 vyšší. Může tak dojít k tomu, že genetický základ v F<sub>1</sub> generaci nebude shodný se základem rodičů.

Hybridi ve volných vodách se vyskytují u druhů, které žijí ve stejném biotopu na stejném místě. Nejčastějším důvodem jejich vzniku jsou společná výtěrová místa (trdliště), která využívají oba druhy ve stejnou dobu. Je tak možné, aby došlo ke splynutí gamet obou rozdílných druhů. Tento druh hybridizace je přirozený. Ovšem díky antropogenním vlivům je mnohem častější. Je to zapříčiněno ničením trdlišť nebo zamezením přístupu k nim vytvořením migračních bariér (např. přehrad) v toku, což nutí jeseterovité ryby hledat nová možná třetí místa. To však velmi zvyšuje pravděpodobnost výskytu více druhů na trdlišti.

Velmi zajímavým faktem je, že pokud dojde ke křížení, při kterém vzniká triploidní jedinec (neplodný jedinec), tak tento jedinec zůstává prakticky celý svůj život v řece. Dochází k potlačení instinktů a migračních tahů do slaných či brakických vod za účelem dospění. Tato skutečnost je však velmi přínosná pro možné monitorování hybridních jedinců (Hochleitner, 2004).

Například v řece Volze se odhaduje, že žije 0,02 – 3,10% jeseteřích hybridů. Podle prvních výzkumů, které na řece Volze proběhly v letech 1964 - 1981 bylo zjištěno, že nejčastější hybrid je *Acipenser ruthenus* s *Acipenser gueldenstaedtii* a to z 51,3%. Dále následoval *Acipenser stellatus* s *Acipenser ruthenus* z 28,2% (Hochleitner, 2004).

Další výzkumy z let 1982 – 1994 však ukázaly, že zastoupení hybridů v populaci je schopné se velmi rychle měnit. Nyní byl nejčastějším hybridem *Acipenser gueldenstaedtii* s *Acipenser stellatus* z 55,7%. Následoval *Acipenser gueldenstaedtii* s *Acipenser ruthenus* z 33,9% a *Acipenser stellatus* s *Acipenser ruthenus* z 10,4%. To dokazuje, že vývoj hybridů je velmi dynamický a je schopen se měnit v krátké době (Hochleitner, 2004).

Bylo by však chybné se domnívat, že vznik hybridů je pouze náhodný a v podstatě nežádoucí. Od roku 1950 se v Rusku začalo s cíleným vytvářením a chovem hybridů. Dále se chov hybridů rozvinul v severní části Německa (1970) a v Japonsku (1980). Dnes se cílené vytváření a chov hybridů provádí prakticky na všech jeseteřích komerčních farmách. Hlavními hybridy, kteří stáli na počátku těchto chovů, byli tzv. Bestěr a Sibster. Jednalo se o potomstvo *Huso huso* s *Acipenser ruthenus* a *Acipenser baerii* s *Acipenser ruthenus*.

Důvodem proč se s těmito chovy hybridů začalo, byla snaha o zlepšení užitkových vlastností potomstva pro komerční účely za využití heterózního efektu. Tento jev má úzkou návaznost na varianci neaditivní složky genetické proměnlivosti a vyskytuje se zejména při křížení geneticky vzdálených plemen téhož druhu či inbredních linií. Jeho výsledkem je zlepšení celé řady fyziologických funkcí (Flajšhans a kol., 2008). V průběhu let se však zjistilo, že při heterózním efektu není možné překonat vlastnosti obou rodičů. Dochází pouze k jakémusi souladu a pozitivnímu průměru všech požadovaných vlastností.

Nevýhodou heterózního efektu je jeho dočasnost. Objevuje se zpravidla jen u první filiální generace ( $F_1$ ). V generaci  $F_2$  se již heterózní efekt prakticky neobjevuje. Proto se využívá pouze na produkci  $F_1$  generace, která je využita pro tržní účely.

Velkým nebezpečím těchto chovů bylo zjištění, že daní hybridy se nejlépe projevují ve slaných nebo brakických vodách. Bylo tedy často využíváno jejich chovů např. v různých klecích, jež byly umístěny ve volných vodách. Z těchto chovů ovšem hrozilo nebezpečí úniku daných hybridů, kteří by se mohli zapojit do reprodukčních cyklů jeseterů z volných vod (původních populací) a tím je znehodnotit nebo zničit.

Velmi zajímavým faktem je, že daní hybridy nenesou jen společné znaky různých komerčně využitelných vlastností. Dochází i k jisté kombinaci morfologických znaků sledovatelné na exteriéru ryb (viz obrázek č. 7) a způsobu života daného jedince.

Obr. č. 7: Hybrid tzv. bestěr s dlouhým rypcem, velkými ústy a zbarvením *Huso huso*.



(Hochleitner, 2004)

## 2.5 Metody stanovující úroveň ploidie a velikost genomu u jeseterů

Pro určení velikosti genomu je velmi podstatné si předem zvolit metodu stanovení, která je pro náš daný pokus nejvhodnější a jsme schopni ji technicky provést. Díky vyspělé technologii a neustálému vývoji ve studiu genetiky je dnes možné použít několik metod, které stanovují úroveň ploidie a velikost genomu na různých vypovídacích úrovních.

Velmi vhodným příkladem rozdílné velikosti genomu vlivem požití různých metod stanovení je lín obecný (*Tinca tinca*). Velikost genomu *Tinca tinca* byla již mnohokrát popsána a publikována. Stanovené hodnoty se však liší až to desítky procent (viz tabulka č. 7).

Tab. č. 7: Popsané velikosti genomu u *Tinca tinca*. BCA = Biochemická analýza, FD = Feulgen denzitometrická analýza, NS = Nespecifikováno, FCM = Průtoková cytometrie.

Druh	Obsah DNA (pg)	Metoda stanovení	Autor
<i>Tinca tinca</i>	0,81	BCA	Mauro, 1979
<i>Tinca tinca</i>	0,85	FD	Fontana, 1976
<i>Tinca tinca</i>	0,93	NS	Gerzeli, 1956
<i>Tinca tinca</i>	0,95	NS	Vialli, 1957a
<i>Tinca tinca</i>	0,97	BCA	Vendrely, 1953
<i>Tinca tinca</i>	0,98	BCA	Vendrely, 1952b
<i>Tinca tinca</i>	1,04	FD	Hafez, 1978
<i>Tinca tinca</i>	1,05	FD	Wolf, 1969
<i>Tinca tinca</i>	1,05	BCA	Vendrely, 1950
<i>Tinca tinca</i>	1,13	FCM	Collares, 1999

Prakticky stejné odlišnosti nalezneme i u všech druhů jeseterovitých ryb, které byly pozorovány několika různými metodami stanovení velikosti genomu.

Pro průkaznost a možnost porovnání stanovené velikosti genomu je tedy nutné:

- Zvolit si autora, s nímž chceme stanovené hodnoty porovnat
- Použít stejnou metodu měření
- Použít stejné vzorky pro měření (např. erytrocyty)



Pro stanovení velikosti genomu se u jeseterovitých ryb využívá nejčastěji čtyř metod stanovení. Jedná se o:

1. Průtoková cytometrie (Flow Cytometry, FCM)
2. Denzitometrická analýza obrazu buněk obarvených Feulgenovou reakcí (Feulgen Image Analysis Densitometry, FIA)
3. Denzitometrická analýza (Mikrodenzitometrie) (Feulgen Densitometry, FD)
4. Fluorometrická analýza objemu (Bulk Fluorometric Assay, BFA)

1. Průtoková cytometrie:

Jde se o přímou metodu stanovení, která vychází z kvantifikace obsahu DNA. Tato metoda je založena na obarvení jaderné DNA některým DNA-specifickým barvivem dle Pisano a kol. (2007). Výsledky jsou zobrazeny formou histogramu.

Metoda je velmi rychlá a přesná. Je možné s ní stanovovat velikost genomu, ale především úroveň ploidie. Jak uvádí tabulka č. 8, jedná se o nejvyužívanější metodu stanovení u jeseterovitých ryb.

Tab. č. 8: Stanovená velikost genomu jeseterů pomocí metody FCM.

Druh	Obsah DNA (pg)	Autor
<i>Acipenser baerii</i>	4,15	Birstein, 1993
<i>Acipenser brevirostrum</i>	6,54	Blacklidge, 1993
<i>Acipenser fulvescens</i>	4,45	Blacklidge, 1993
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	3,94	Birstein, 1993
<i>Acipenser medirostris</i>	4,41	Blacklidge, 1993
<i>Acipenser medirostris</i>	7,17	Birstein, 1993
<i>Acipenser nudiiventris</i>	1,97	Birstein, 1993
<i>Acipenser oxyrinchus</i>	2,28	Blacklidge, 1993
<i>Acipenser ruthenus</i>	1,87	Birstein, 1993
<i>Acipenser stellatus</i>	2,35	Kafiani, 1958
<i>Acipenser transmontanus</i>	4,73	Blacklidge, 1993

## 2. Denzitometrická analýza obrazu buněk obarvených Feulgenovou reakcí:

Jedná se o instrumentální metodu, která je založena na obarvení DNA Feulgenovou reakcí (Feulgen a Rossenbeck, 1924). Obarvené buňky jsou následně snímány a převedeny do elektronické podoby, kde pomocí počítačových analýz probíhá jejich vlastní měření (Flajšhans a kol, 2008; Hardie, 2002).

Metoda je poměrně časově náročná na přípravu vzorků a vlastní měření. Jedná se však o velmi přesnou metodu stanovení. Je možné jí využít ke stanovení velikosti genomu i ke stanovení úrovně ploidie.

Tab. č. 9: Stanovení velikosti genomu jeseterů pomocí metody FIA.

Druh	Obsah DNA (pg)	Autor
<i>Acipenser brevirostrum</i>	6,89	Hardie, 2004
<i>Acipenser oxyrinchus</i>	2,19	Hardie, 2004

## 3. Denzitometrická analýza:

Jde o kvantitativní instrumentální metodu (Gold a Price, 1985; Gold a Amemiya, 1987; Gold a kol., 1990), která je založena na měření absorbance barviva v buňkách nátěru obarveného Feulgenovou reakcí (Feulgen a Rossenbeck, 1924).

Tab. č. 10: Stanovení velikosti genomu jeseterů pomocí metody FD.

Druh	Obsah DNA (pg)	Autor
<i>Acipenser naccarii</i>	2,89	Fontana, 1976
<i>Acipenser sturio</i>	1,60	Mirsky, 1951

## 4. Fluorometrická analýza objemu:

Jedná se o kvantifikační metodu, která je založena na obarvení jaderné DNA určitým DNA barvivem a na měření fluorescence emitované komplexem obarvené DNA (Pisano, 2007).

Metoda je vhodná spíše pro stanovení úrovně ploidie. Pro měření velikosti genomu se příliš nevyužívá a u jeseterovitých ryb je touto metodou popsán jeden druh.

Tab. č. 11: Stanovení velikosti genomu jeseterů pomocí metody BFA.

Druh	Obsah DNA (pg)	Autor
<i>Acipenser transmontanus</i>	5,10	Hinegardner, 1976a

## 2.6 Fyziologické změny závislé na velikosti genomu

Za nejpodstatnější fyziologickou změnu, jež závisí na velikosti genomu, by se dala považovat velikost tělních buněk. Je prokázáno, že s rostoucí velikostí genomu roste i velikost buněk (Bytyutskyy, 2012). To je zapříčiněno zvětšujícím se obsahem DNA, které způsobuje růst jádra a tím i celé buňky.

Tato odlišnost samozřejmě přináší a způsobuje celou řadu dalších fyziologických změn. Je prokázáno, že vlivem nárůstu velikosti buněk se jejich počet přiměřeně reguluje (klesá). Tento fakt je velmi problematický především u erytrocytů (červené krvinky), které u ryb také obsahují jádro a přenášejí kyslík (Flajšhans a kol., 2008). Vlivem jejich úbytku a poměrně primitivnímu žabernímu aparátu jeseterů s nízkým počtem žaberních tyčinek může docházet k respiračním problémům. To se projevuje především při zhoršených kyslíkových podmínkách (např. převozy, lovení ryb).

Za další změnu závislou na velikosti genomu je možné považovat určité exteriérové vlastnosti jeseterů, jež vycházejí z fyziologického základu. Jedná se především o tvar těla a jeho velikost. U jistých druhů ryb (např. lín obecný) dochází vlivem nárůstu velikosti genomu ke změnám tvaru ploutví (Flajšhans a kol., 2008). Jeseteři však mají tento typ exteriérové změny prakticky neprokazatelný. Ovšem velmi zajímavou je otázka nárůstu velikosti těla. První teorie vycházeli z prakticky prosté dedukce, že pokud dochází k nárůstu tělních buněk, musí zákonitě docházet i k nárůstu celého těla, jež je z těchto buněk tvořeno. Další výzkumy však prokázaly, že dochází k výše zmiňované redukci počtu tělních buněk.

Nárůst genomu však za jistých okolností může ovlivnit velikost a rychlost růstu těla. Jedná se o případy, kdy nárůstem ploidie a tedy i velikosti genomu vzniká tzv. triploidní jedinec, který je neplodný. Tím nedochází k ukládání energie do tvorby pohlavních produktů, ale tato energie je vkládána do růstu svaloviny. Je tak zapříčiněno, že triploidní jedinci mají lepší růstové schopnosti než jedinci stejného druhu a stáří, kteří jsou plodní. U jeseterovitých ryb však dochází k tomu, že i vyskytující se triploidní jedinci jsou zcela plodní.

Zajímavostí také je, že mnoho druhů jeseterů jsou tzv. anadromní druhy, které potřebují k dospění migrovat z řek do slaných či brakických vod. U sterilních jedinců většinou k této migraci nedochází a daný jedinec nikdy neopustí sladké vody (Hochleitner, 2004).

Problematika reprodukčních schopností jeseterů s vyšší velikostí genomu je studována již několik let. Jedná se např. o možnost špatné pohyblivosti spermií a jejich malé schopnosti oplození (Kašpar, 2007). Dále jde o zhoršenou inkubaci oplozených jiker. Následné zhoršené kulení plůdku a velké ztráty při raném odchovu. Dodnes jsou však všechny tyto otázky předmětem dalšího zkoumání. Dosavadním výzkumům se nepodařilo dané teorie potvrdit ani vyvrátit.

Bylo by zde vhodné také zmínit, že změny závislé na velikosti genomu nejsou pouze fyziologického charakteru. Takováto změna v genetickém základu přináší dopady i v jiných odvětvích.

Rozdělení dopadů nárůstu velikosti genomu dle Otta (2007):

1. Fyziologické dopady
2. Genetické dopady
  - Stabilita genomu
  - Stabilita exprese genů
3. Evoluční dopady
  - Následný evoluční vývoj
  - Vznik nových rodů, čeledí a druhů

Pokud si všechny tyto možné dopady nárůstu velikosti genomu spojíme, dojdeme k závěru, že tímto způsobem v podstatě dochází k utváření nové evoluce celého druhu. Je tedy velmi diskutabilní zda se jedná o negativní jev či nikoliv.

### 2.6.1 Genofond jeseterovitých ryb a jeho ochrana

Z výše uvedených kapitol je patrné, že změna velikosti genomu má vliv na další fyziologické i genetické vlastnosti daného druhu. Dochází tak ke změnám v genofondu, který je ovšem třeba chránit v jeho původní podobě.

Pod pojmem genofond rozumíme soubor všech genotypů jedinců, které populaci nebo daný druh tvoří. Jeho podstatu tvoří genetická diverzita příslušného druhu, která je v rámci jednotlivých populací dědičná. Určitým způsobem je tedy adaptabilní. To je významný předpoklad zdárné existence a evoluce (Hanel a Lusk, 2005). Genofond není neměnný. Jedná se o dynamický systém, jež se přizpůsobuje biotickým a abiotickým podmínkám svého prostředí.

Genofond je dále základním pojmem tzv. konzervační genetiky. Tento genetický směr je zaměřen na odborně podloženou ochranu biodiverzity, a také na její udržení. Velmi podstatnou částí konzervační genetiky je také odborné šlechtění.

Ochranu genofondu je možné shrnout do těchto tří bodů:

1. Je nezbytně nutné udržení životaschopné populace daného druhu. Dá se i říci, že je nutné udržet životaschopnou populaci za jakoukoliv cenu. Velmi významný je časový aspekt. Populace musí být životaschopná dlouhodobě (nekonečně) (Flajšhans a kol., 2008). Pokud druh již jednou vymře, není dále co ochraňovat ani zachraňovat. Evoluční linie jsou totiž jedinečné a není možné je opakovat.

2. Musí být zachována schopnost přizpůsobovat se měnícímu prostředí a jeho vývoji, to znamená udržet dané genetické adaptační schopnosti. Celý druh musí být dlouhodobě geneticky zdravý (Flajšhans a kol., 2008). Pokud by z jistých důvodů došlo ke ztrátě genetické čistoty druhu, je následně velmi obtížné (až nemožné) genetickou čistotu daného druhu opět zajistit. To může znamenat až vyhynutí druhu tak jak byl znám.

3. Možnost udržení schopnosti pro další případné speciální události. Tohoto bodu není možné nikdy dosáhnout, jelikož vývoj daného druhu nikdy nekončí. Vývoj může skončit jen tím, že dojde k vyhynutí druhu. Tento extrémní případ však znamená, že ochranná opatření genofondu selhala a genofond daného druhu byl ztracen.

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1 Studované čisté druhy jeseterů

V praktické části této diplomové práce bylo studováno pět čistých druhů jeseterovitých ryb, které jsou v ČR nebo okolních státech dostupné a bylo možné získat jejich krevní vzorky.

Jednalo se o tyto druhy:

1. Jeseter malý (*Acipenser ruthenus*)
2. Jeseter sibiřský (*Acipenser baerii*)
3. Jeseter ruský (*Acipenser gueldenstaedtii*)
4. Jeseter hvězdnatý (*Acipenser stellatus*)
5. Vyza velká (*Huso huso*)

Tab. č. 12: Studování jedinci čistého druhu *Acipenser ruthenus*.

<i>Acipenser ruthenus</i>			
Jedinec	Identifikační číslo	Datum odběru	Současný název chovatele
1	171	28. 2. 2008	Líheň Velký Dvůr, Rybníkářství Pohořelice a.s.
2	12	14. 2. 2008	FROV JU
3	---	16. 4. 2008	FROV JU
4	2224	15. 3. 2006	FROV JU
5	47	14. 2. 2008	FROV JU
6	2183	---	FROV JU
7	26	---	FROV JU
8	2161	15. 3. 2006	FROV JU
9	1	13. 11. 2009	Líheň Velký Dvůr, Rybníkářství Pohořelice a.s.
10	2	13. 11. 2009	Líheň Velký Dvůr, Rybníkářství Pohořelice a.s.
11	4	13. 11. 2009	Líheň Velký Dvůr, Rybníkářství Pohořelice a.s.
12	6	13. 11. 2009	Líheň Velký Dvůr, Rybníkářství Pohořelice a.s.

13	7	13. 11. 2009	Líheň Velký Dvůr, Rybníkářství Pohořelice a.s.
14	8	13. 11. 2009	Líheň Velký Dvůr, Rybníkářství Pohořelice a.s.
15	9	13. 11. 2009	Líheň Velký Dvůr, Rybníkářství Pohořelice a.s..
16	10	13. 11. 2009	Líheň Velký Dvůr, Rybníkářství Pohořelice a.s.
17	---	16. 2. 2010	FROV JU
18	2172	16. 2. 2010	FROV JU
19	---	16. 2. 2010	FROV JU
20	---	16. 2. 2010	FROV JU

Tab. č. 13: Studování jedinci čistého druhu *Acipenser baerii*.

<b><i>Acipenser baerii</i></b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Identifikační číslo</b>	<b>Datum odběru</b>	<b>Současný název chovatele</b>
1	2117	16. 4. 2008	FROV JU
2	4020	14. 2. 2008	FROV JU
3	2	---	FROV JU
4	2346	16. 4. 2008	FROV JU
5	---	4. 3. 2008	FROV JU
6	2264	---	FROV JU
7	4190	14. 2. 2008	FROV JU
8	3520	16. 4. 2008	FROV JU
9	---	16. 4. 2008	FROV JU
10	2329	4. 3. 2008	FROV JU
11	2107	---	FROV JU
12	13	16. 4. 2008	FROV JU
13	2200	4. 3. 2008	FROV JU
14	2876	---	FROV JU
15	3482	4. 3. 2008	FROV JU
16	2332	---	FROV JU
17	---	16. 4. 2008	FROV JU
18	69	---	FROV JU
19	4085	13. 3. 2010	FROV JU
20	3569	4. 3. 2010	FROV JU

Tab. č. 14: Studování jedinci čistého druhu *Acipenser gueldenstaedtii*.

<b><i>Acipenser gueldenstaedtii</i></b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Identifikační číslo</b>	<b>Datum odběru</b>	<b>Současný název chovatele</b>
1	21	6. 4. 2008	FROV JU
2	2101	16. 4. 2008	FROV JU
3	---	16. 4. 2008	FROV JU
4	R23	22. 11. 2001	FROV JU
5	39	6. 4. 2008	FROV JU
6	---	6. 4. 2008	FROV JU
7	4467	---	FROV JU
8	R11	22. 11. 2001	FROV JU
9	2905	22. 11. 2001	FROV JU
10	33	---	FROV JU
11	2616	---	FROV JU
12	2592	16. 4. 2008	FROV JU
13	R1	17. 3. 1997	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
14	R3	17. 3. 1997	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
15	R4	17. 3. 1997	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
16	1	19. 9. 2000	FROV JU
17	R5	17. 3. 1997	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
18	2	19. 9. 2000	FROV JU
19	3	19. 9. 2000	FROV JU
20	R2	17. 3. 1997	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.

Tab. č. 15: Studování jedinci čistého druhu *Acipenser stellatus*.

<b><i>Acipenser stellatus</i></b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Identifikační číslo</b>	<b>Datum odběru</b>	<b>Současný název chovatele</b>
1	19	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
2	61	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
3	62	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo



4	66	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
5	69	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
6	18	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
7	5	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
8	7	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
9	31	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
10	38	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
11	45	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
12	---	11. 3. 2011	FROV JU
13	46	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
14	49	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
15	51	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
16	55	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
17	---	11. 3. 2011	FROV JU
18	57	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
19	58	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo
20	59	6. 3. 2008	Líheň Marjoss, Fischzucht Rhönforelle GmbH & Co. KG, Německo

Tab. č. 16: Studování jedinci čistého druhu *Huso huso*.

<b><i>Huso huso</i></b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Identifikační číslo</b>	<b>Datum odběru</b>	<b>Současný název chovatele</b>
1	136	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.

2	135	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
3	134	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
4	133	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
5	132	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
6	131	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
7	130	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
8	129	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
9	128	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
10	127	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
11	126	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
12	125	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
13	124	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
14	123	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
15	122	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
16	121	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
17	119	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
18	118	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
19	117	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.
20	116	20. 4. 1999	Rybí líheň Mydlovary, Rybářství Hluboká cz s.r.o.

### 3.2 Studování hybridů

V praktické části této diplomové práce byly studovány nejen čisté druhy jeseterů, ale i jejich záměrně vytvoření hybridů. Ti byli vytvořeni pro vědecké pozorování na rybí líhni FROV JU ve Vodňanech. Všichni hybridy, kteří byli pozorováni v této diplomové práci, dosahovali stáří cca jednoho roku.

Jednalo se o tyto typy hybridů:

(Dle zootechnických pravidel je samice uváděna vždy na prvním místě)

1. *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (12n)
2. *Acipenser baerii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n)
3. *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (10n)
4. *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n)

Tab. č. 17: Studování hybridů *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (12n).

<b><i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (8n) x <i>Acipenser baerii</i> (12n)</b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Identifikační číslo</b>	<b>Datum odběru</b>	<b>Původ</b>
1	339 (šedý žlab č. 11)	10. 2. 2011	FROV JU
2	340 (šedý žlab č. 11)	10. 2. 2011	FROV JU
3	341 (šedý žlab č. 11)	10. 2. 2011	FROV JU
4	342 (šedý žlab č. 11)	10. 2. 2011	FROV JU
5	343 (šedý žlab č. 11)	10. 2. 2011	FROV JU
6	344 (šedý žlab č. 11)	10. 2. 2011	FROV JU
7	345 (šedý žlab č. 11)	10. 2. 2011	FROV JU
8	346 (šedý žlab č. 11)	10. 2. 2011	FROV JU
9	347 (šedý žlab č. 11)	10. 2. 2011	FROV JU
10	348 (šedý žlab č. 11)	10. 2. 2011	FROV JU

Tab. č. 18: Studování hybridů *Acipenser baerii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n).

<b><i>Acipenser baerii</i> (8n) x <i>Acipenser ruthenus</i> (4n)</b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Identifikační číslo</b>	<b>Datum odběru</b>	<b>Původ</b>
1	219	6. 2. 2011	FROV JU
2	221	6. 2. 2011	FROV JU
3	223	6. 2. 2011	FROV JU
4	226	6. 2. 2011	FROV JU

5	227	6. 2. 2011	FROV JU
6	229	6. 2. 2011	FROV JU
7	230	6. 2. 2011	FROV JU
8	231	6. 2. 2011	FROV JU
9	232	6. 2. 2011	FROV JU
10	233	6. 2. 2011	FROV JU

Tab. č. 19: Studování hybridů *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (10n).

<b><i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (8n) x <i>Acipenser baerii</i> (10n)</b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Identifikační číslo</b>	<b>Datum odběru</b>	<b>Původ</b>
1	243	11. 2. 2011	FROV JU
2	244	11. 2. 2011	FROV JU
3	245	11. 2. 2011	FROV JU
4	246	11. 2. 2011	FROV JU
5	247	11. 2. 2011	FROV JU
6	248	11. 2. 2011	FROV JU
7	249	11. 2. 2011	FROV JU
8	250	11. 2. 2011	FROV JU
9	251	11. 2. 2011	FROV JU
10	252	11. 2. 2011	FROV JU

Tab. č. 20: Studování hybridů *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n):

<b><i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (8n) x <i>Acipenser ruthenus</i> (4n)</b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Identifikační číslo</b>	<b>Datum odběru</b>	<b>Původ</b>
1	363	6. 2. 2011	FROV JU
2	364	6. 2. 2011	FROV JU
3	365	6. 2. 2011	FROV JU
4	366	6. 2. 2011	FROV JU
5	367	6. 2. 2011	FROV JU
6	368	6. 2. 2011	FROV JU
7	369	6. 2. 2011	FROV JU
8	370	6. 2. 2011	FROV JU
9	371	6. 2. 2011	FROV JU
10	372	6. 2. 2011	FROV JU

### 3.3 Získávání vzorků

V experimentální části této diplomové práce bylo použito tří rozdílných metod pozorování. Jednalo se o obrazovou cytometrii, průtokovou cytometrii a konfokální mikroskopii (viz kapitola 3.5).

I přesto, že výše uvedené metody se od sebe liší jak způsobem pozorování, provádění, tak i výsledným zobrazením, bylo získávání vzorků pro jejich pozorování identické. Všechny uvedené metody vycházely z analýz červených krvinek (erytrocytů), přesněji jader erytrocytů, ve kterých je uložena DNA. Vlastní měření vycházela z krve studovaných jedinců, kterou bylo třeba náležitým způsobem odebrat.

Veškeré odběry krve probíhaly dle metodiky Svobodové a kol. (1986), jež byla upravena a rozšířena Pravdou a Svobodovou (2003).

Vlastní odběr krve byl vždy prováděn u jeseterovitých ryb s hmotností přesahující 200g, a to prostřednictvím punkce ocasních cév. Krev byla odebírána injekční jehlou nasazenou na 1ml injekční stříkačku. K zamezení srážení odebraného krevního vzorku byly jehly i injekční stříkačky předem vypláchnuty vodným roztokem sodné soli heparinu (Heparin SPOFA). Po odebrání potřebného množství krve byl vzorek převeden do předem připravené skleněné uzavíratelné nádoby vhodného objemu (viz obr. č. 8). Tato nádoba byla předem vymyta, vysušena, vypláchnuta vodným roztokem sodné soli heparinu a opět vysušena. Tím bylo zajištěno, že vzorek nebude kontaminován a nedojde k nežádoucímu srážení odebraného krevního vzorku do doby jeho přípravy v laboratoři. Po převedení krve do nádoby bylo na její zátku zapsáno identifikační číslo vzorku.



Obr. č. 8: Vybavení na odběr vzorků.

Pro přemístění krevních vzorků z rybí líhně do laboratoře bylo použito tzv. termotašek, které byly z 10% vyplněny šupinkovým ledem.

Oproti kostnatým rybám, kde techniku odběru popisuje Pravda a Svobodová (2003), bylo nutné postup u jeseterovitých ryb modifikovat. Jelikož céva, ze které byla krev odebírána, leží v průsečíku horizontální přímky vedené napříč ocasním násadcem v rovině řitní ploutve, a vertikální přímky (tj. kolmice na první přímku) spuštěné ze spodního cípu kostěného štítku v boční řadě (Flajšhans, 2008, úst. sděl.)

Jesetera, kterému byla krev odebírána, bylo nutné fixovat. Toho se dosáhlo na horizontální podložce zakrytím hlavy a ocasu vlhkou tkaninou. U větších jedinců však fixace pouhou vlhkou tkaninou nebyla dostatečná a bylo nutné využít fixace rukama přítomných pracovníků, kteří daného jedince přidržovali na horizontální podložce. Injekční stříkačka s jehlou byla nasazena v oblasti ocasního násadce kolmo, pod spodní cíp dobře viditelného kostěného štítku (viz obrázek č. 9).



Obr. č. 9: Odebírání krve z ocasní cévy.

Jediná tkáň, která při tomto způsobu odběru kladla jehle odpor, byla stěna cévní. Její překonání bylo signalizováno náběrem krve do stříkačky (Flajšhans, 2008, úst. sděl.). Velmi častou komplikací bylo však proniknutí jehly skrz cévu, při kterém se již krev ve stříkačce objeví, ale dále neteče. V tomto případě bylo nutné jehlu opět povytáhnout, dokud se nevrátí zpět do středu cévy.

Výhodou metody byla její nenáročnost a dostatečné množství získané krve. Při dodržení všech postupů by také nemělo docházet ani k minimálním ztrátám. Proto je nutná účinná, ale šetrná manipulace s rybami, která je zakončena dezinfekcí místa odběru. Nevýhodou byla obtížná manipulace s většími jedinci a nebezpečí náhodného pohybu ryb při provádění vpichu. U generačních ryb bylo tedy vhodné provádění anestézie či fixace ryby více rukama přítomných pracovníků.

### 3.4 Příprava vzorků pro počítačové analýzy 2-D a 3-D obrazu

Jelikož v experimentální části této diplomové práce bylo vybráno několik metod pro stanovení úrovně ploidie a velikosti genomu jeseterů, bylo nutné pozorované vzorky připravovat pro veškeré metody samostatně.

#### 1. Příprava vzorků pro metodu obrazové cytometrie:

Jedná se o denzitometrickou analýzu množství DNA v jádrech erytrocytů, kterou je nutné pro dané pozorování kvantitativně obarvit. Pro obarvení DNA se využívá tzv. Feulgenovy reakce (Feulgen a Rossenbeck, 1924), která je sérií specifických histochemických reakcí a využívá:

- a) Hydrolýzy DNA na preparátu silnou kyselinou (kys. chlorovodíkovou), která vede ke vzniku aldehydových skupin v molekule DNA.
- b) Barvení preparátu – tj. volných aldehydových skupin v molekule DNA Schiffovým činidlem (fuchsinem odbarveným  $\text{SO}_2$ ), kdy obarvená DNA získává růžovočervenou barvu.

Veškerá měření obrazové cytometrie vycházela z krevních nátěrů. Ty byly vytvořeny dle metodiky Svobodové a kol. (1986), která byla upravena Pravdou a Svobodovou (2003).

Správně vytvořený krevní nátěr byl ihned označen příslušnými informacemi a ponechán uschnout. Po uplynutí cca 2 hodin byl zcela suchý krevní nátěr ošetřen 96% methylalkoholem a ponechán opět uschnout. Pro přípravu vzorků obrazové cytometrie bylo použito kitu fy. Merck „DNA Staining Kit According to Feulgen“ (Merck Co.; Darmstadt, Germany). Postup barvení DNA Feulgenovou reakcí byl prováděn podle protokolu Hardie a kol. (2002).

Všechny operace probíhaly v odvětrávaném prostoru (digestoři) a za použití vhodných ochranných prostředků.

Do první kyvety, která byla označena jako „HCl“, byla vložena skla s nátěry, tak aby nedocházelo k jejich dotyku. Následně bylo přidáno 5M HCl na hydrolýzu DNA. Hydrolýza DNA probíhala 50 minut. Po uplynutí této doby byla kys. chlorovodíková přelita z kyvety do předem připravených sběrných nádob. Po vylití kyseliny následovalo

propláchnutí vzorků destilovanou vodou na dobu 2 minut. Poté byla destilovaná voda také vylita a propláchnutí bylo ještě jednou opakováno.

Dále byla propláchnutá skla se vzorky přesunuta do další kyvety, která byla předem vyhrazena pro aplikaci Schiffova činidla. Roztok činidla byl naléván pouze k zabroušeným okrajům vzorků. Aplikace Schiffova činidla trvala 60 minut.

Při hodinové prodlevě, kdy působilo Schiffovo činidlo, byl připravován pracovní roztok pyrosiřičitanu sodného  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , který musel být na každé barvení tzv. čerstvý. Tento pracovní roztok byl namíchan ze 190ml destilované vody, 10ml zásobního roztoku pyrosiřičitanu sodného a 2ml 5M HCl. Tyto množství odpovídalo použité kyvetě s osmi skly se dvěma opakováními.

Po uplynutí 60 minut bylo Schiffovo činidlo převedeno z kyvety do předem připravené nádoby. Následně byla kyveta naplněna připraveným pracovním roztokem pyrosiřičitanu sodného a to na dobu 3 minut. Tento krok byl dvakrát opakován. Pokud již byla obě opakování splněna, bylo třeba skla opět propláchnout destilovanou vodou po dobu 2 minut ve dvou opakováních.

Předposledním krokem bylo převedení vzorků do čisté kyvety a postupné lázně ve zvyšujících se koncentracích alkoholu (etanolu):

Tab. č. 21: Alkoholové lázně.

Doba lázně (minuty)	Koncentrace alkoholu (%)
1	50
1	70
1	80
1	96

Posledním krokem přípravy vzorků bylo přesunutí skel do kyvety s xylenem, kde byly ponechány po dobu jedné minuty. Použitý xylene byl poté převeden do předem připravené nádoby. Skla byla následně opatrně osušena, opatřena popisem a uložena. Počet nabarvených skel byl zaznamenán kvůli expiraci činidel.

Nakonec veškeré pomůcky či laboratorní sklo, které se dostalo do kontaktu se Schiffovým činidlem bylo nutné nejprve opláchnout v kyselé lázni, poté pitnou vodou a nakonec destilovanou vodou.

Po sérii těchto kroků byly vzorky připraveny k měření úrovně ploidie, resp. velikosti genomu pomocí metody obrazové cytometrie.



## 2. Příprava vzorků pro metodu průtokové cytometrie:

Jedná se o instrumentální metodu, která využívá obarvení jaderné DNA a její následné naměření fluorescence, která je emitována komplexem obarvené DNA (viz kapitola 2.5).

Pro barvení jaderné DNA na průtokovém cytometru bylo využito DNA barvivo 4',6-diamidino-2-phenylindolem (DAPI). Na začátku samotného barvení bylo velmi důležité připravit si veškeré pomůcky, které byly k barvení jaderné DNA potřeba. Jednalo se o stojan na zkumavky o vhodné kapacitě, kalibrované zkumavky, čistá filtrační síťka na zkumavky, mikropipeta o objemu 1 000 $\mu$ l a mikropipeta o objemu 20 $\mu$ l.

Čisté kalibrované zkumavky byly vkládány do připraveného stojanu. Zkumavky byly umístěny ve třech stejných řadách za sebou. Poslední řada zkumavek byla opatřena filtračními sítky (viz přílohy č. 3).

Po rozmístění zkumavek byly přineseny na místo barvení potřebné chemikálie, kterým bylo barvivo DAPI. Následně byly také vyjmuty ze šupinkového ledu nádoby s odebranou krví jeseterů.

Do první řady zkumavek bylo převedeno pomocí mikropipety 1 000 $\mu$ l NaCl. Dále do každé zkumavky, jež se nacházela v první řadě, bylo přidáno mikropipetou 20 $\mu$ l jeseteří krve. Každá zkumavka byla poté vyjmuta ze stojanu a její obsah byl velmi dobře promíchán. Před jejím návratem do stojanu byla opatřena popiskem.

Následně do druhé řady zkumavek bylo převedeno mikropipetou 1 000 $\mu$ l DNA barviva DAPI. Po naplnění všech zkumavek druhé řady do nich bylo dále přidáno 20 $\mu$ l roztoku NaCl s jeseteří krví z řady první. Vzniklý roztok byl opět důkladně promíchán.

Posledním krokem přípravy bylo převedení obsahu druhé řady zkumavek do řady třetí přes filtrační síťka. Po přefiltrování roztoku byla filtrační síťka odstraněna a stojan se zkumavkami byl na 20 minut zakryt a umístěn mimo přímé světelné záření.

Po uplynutí výše zmiňované doby byly již vzorky jednotlivě odebírány a vkládány přímo do průtokového cytometru, kde následně probíhá jejich měření.

## 3. Příprava vzorků pro metodu konfokální mikroskopie:

Jde o typ optického mikroskopu s vyšší rozlišovací schopností, která je dána detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu (Claxton, 2009). Snímky fluorescenčně značeného objektu v jednotlivých rovinách jsou skenovány a specifickým softwarem se pak vytváří 3-D rekonstrukce zobrazeného objektu, v tomto případě jádra erytrocytu.

V experimentální části bylo pro barvení jaderné DNA a fixaci buněk v konfokální mikroskopii použito preparátů DRAQ5 a fixace buněk v gelu CyGEL, obojí od BioStatus Ltd. (Anglie).

Proces přípravy vzorků pro konfokální mikroskopii byl rozdělen do tří následujících částí dle protokolu Bytyutskyy et al. (2012):

a) Příprava CyGEL a DRAQ5

CyGEL byl vyjmut z chladničky a vložen do šupinkového ledu na dobu 1 – 2 minut. Do ledu byly také umístěny násadky od mikropipet a zkumavky Eppendorf. Následně bylo naběráno 250 $\mu$ l CyGEL a převedeno do vychlazené zkumavky Eppendorf. Dále bylo přidáno 6,4 $\mu$ l preparátu PBS a následovalo velmi důkladné promíchání. Při promíchání však nesmělo dojít ke tvorbě bublin. Dále bylo do zkumavky přidáno 1,02 $\mu$ l DRAQ5 a opět velmi pečlivě promícháno. Poté se zkumavka uzavřela a umístila do šupinkového ledu nebo chladničky.

b) Barvení buněk pomocí DRAQ5

Nejprve bylo nutné připravit buněčnou suspenzi. Ta byla vytvořena tak, že bylo nabráno 0,5ml fyziologického roztoku a přidáno do něj 20 $\mu$ l jeseť krve, která byla již při odebrání ošetřena heparinem (viz kapitola 3.3). Dále bylo mikropipetou převedeno 20 $\mu$ l připraveného roztoku DRAQ5 + PBS + CyGEL do vychlazené zkumavky Eppendorf. Do této zkumavky byly poté přidány 2 $\mu$ l buněčné suspenze a poté byla velmi dobře promíchána. Zkumavka Eppendorf byla následně označena číslem příslušného vzorku a uzavřena. Poté byla umístěna do šupinkového ledu na dobu 60 min.

c) Fixace vzorku na pozorovací sklíčko

Na čisté podložní sklo s teflonovými komůrkami byl mikropipetou převeden již připravený vzorek s obarvenými buňkami. Kapka umístěna do oblasti komůrky byla zakryta krycím sklíčkem o rozměrech 20x40mm. Po tomto úkonu byl ještě celý vzorek položen na šupinkový led (cca 5 minut). Po uplynutí této doby byl vzorek vyjmut, pečlivě osušen a ponechán k zahřátí na pokojovou teplotu.

Na horní povrch krycího skla byl aplikován imerzní olej. Pro prvotní hledání buněk bylo zvoleno nižší rozlišení mikroskopu (25x). Teprve po zaostření mikroskopu a nalezení buněk bylo nastaveno vyšší rozlišení (100x) pro skenování konfokální mikroskopii.

### 3.5 Použité metody stanovující úroveň ploidie a velikost genomu

Pro tuto diplomovou práci byly vybrány tři vhodné metody ke stanovení úrovně ploidie a velikosti genomu jeseterů. Jednalo se o dvě metody, jež vycházejí ze zpracování obrazu ve formě 2-D a 3-D a metodu průtokové cytometrie, která byla využita jako kontrolní měření k ověření ploidie.

Jako hlavní způsob stanovení byla zvolena denzitometrická analýza absolutního objemu DNA v jádrech krvinek obarvených Feulgenovou reakcí. Současně byly u měřených jader zjišťovány i geometrické charakteristiky (obvod, délka, příčná osa).

Konfokální mikroskopie byla pro tuto diplomovou práci zvolena k pozorování stavby jader erytrocytů metodou 3-D zobrazení. Jedná se však o novější metodu, která v dané problematice (prostorové konformace a obsah DNA) není standardní a její využití není plošně praktikováno.

#### 1. Denzitometrická analýza obrazu (obrazová cytometrie):

V této diplomové práci byla jako nejvhodnější metoda vybrána denzitometrická analýza obrazu buněk, které jsou obarveny Feulgenovou reakcí (viz kapitola 2.5).

Jako interní standard byl použit *Tinca tinca* (obsah DNA 2.04 a 3.10 pgDNA.jádra<sup>-1</sup>) jež byl vytvořen dle metodiky Flajšhans a kol. (2004). Všechny vzorky byly obarveny pomocí DNA barviva Kit According to Feulgen (Merck Co.; Darmstadt, Germany). Denzitometrická analýza obrazu byla provedena dle Hardie a kol. (2002). Pro měření integrované optické hustoty (IOD) v jádrech erytrocytů byla použita kamera 3CCD Sony DXC-9100P, jež byla připojena k mikroskopu Olympus BX50 (objektiv 100x). Pro analýzu obrazu byl použit softwar Olympus MicroImage v. 4.0 (Olympus Corp., Tokio, Japonsko). Software pracuje v RGB barevném modelu. Barva byla nastavena na zeleném kanálu s maximální intenzitou 190 pixelů, svítivost kalibrace byla nastavena na standardní optické hustotě.

Výpočet množství DNA v buněčném jádře je založen na mezinárodních standardech. V tomto případě na línu obecném (obsah DNA 2.04 a 3.10 pgDNA.jádra<sup>-1</sup>), Pro výpočet je nutné naměřit IOD standardu a IOD měřeného vzorku.

Vzorec Obsahu DNA:

$$\text{Obsah DNA}_{\text{vzorek}} = \text{DNA}_{\text{standard}} \times \left( \frac{\text{prům. IOD}_{\text{vzorek}}}{\text{prům. IOD}_{\text{standard}}} \right)$$

Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky (SD) byly vypočteny pro každý vzorek a každou úroveň ploidie samostatně. Vliv úrovně ploidie na relativní obsah DNA, na absolutní obsah DNA a na jádra erytrocytů byly hodnoceny pomocí ANOVA následovaná roztroušené v Tukey v srovnávacím testu s použitím Statgraphics v. 5. Hladina významnosti byla stanovena na  $p < 0,01$ .

2. Konfokální epi-fluorescenční mikroskopie s laserovým skenováním (konfokální mikroskopie) dle Fellers a Davidson (2009):

Snímky jednotlivých jader erytrocytů byly získány na excitační vlně o délce 568nm (KR-Ar laser, operační napětí 12mW) s UPlanApo objektivem 100X a filtrem BA585IF ve dvou kanálech.

V prvním kanále byl obraz procházejícím světlem zaznamenán a ve druhém kanále o rozsahu 585nm byl obraz detekován. Velikost mikroskopického otvoru clonky byla 150nm. Konfokální obrazy jader byly získávány po krocích 0,20 $\mu$ m. Každý jednotlivý snímek byl později zpracován v programu ImageJ 1.44 (Abramof et al, 2004). Dále byly použity Bio-Formaty pro import a určení biologického obrazového formátu a MicroSCoBioJ pro vytváření a zobrazování 3-D fluorescenční intenzity. Také byl použit 3-D Objekt Counter pro výpočet povrchu a objemu každého jádra erytrocytu (Bolte & Cordelieres, 2009).

Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byly stanoveny pro každý vzorek a každou velikost genomu samostatně. Úroveň velikosti genomu a objem jader erytrocytů byly hodnoceny v programu ANOVA a Tukey's Multiple comparison testu v programu Statgraphics v.5.

3. Kvantifikace obsahu DNA instrumentálními metodami (průtoková cytometrie):

Před přípravou vzorků pro obrazovou cytometrii a konfokální mikroskopii byla každému vzorku ověřena úroveň ploidie, jako relativní obsah DNA v krevních buňkách (erytrocytech) pomocí průtokové cytometrie pomocí 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Partec GmbH, Münster, Německo) dle Linhart a kol. (2006).

### 3.6 Potřebné vybavení pro počítačové analýzy a jejich použití

V experimentální části této diplomové práce na FROV JU ve Vodňanech, kde všechna měření probíhala, bylo použito pro dané metody následujících přístrojů a vybavení:

1. Denzitometrická analýza množství DNA v jádrech krvinek obarvených Feulgenovou reakcí (denzitometrická analýza obrazu, resp. obrazová cytometrie):
  - Světelný mikroskop Olympus BX50 s kamerou Sony DXC 9100P
  - PC se software Windows XP a Olympus MicroImage v. 4.0

Postup prací při nastavení pro kvantitativní měření byl podle následujících kroků (Flajšhans a Drozd, 2009, úst. sděl.):

- Zapnout příslušné PC
- Zapnout kameru, která snímá obraz z mikroskopu
- Spustit program Micro Image
- V programu Micro Image zapnout snímání obrazu
- Zaostrit na plochu preparátu, která je bez buněk a sejmut snímek
- Vyvážit bílou barvu pomocí tlačítka White Balance
- Sejmut obraz s nabarvenými jádry a vypnout live image
- Nastavení Standard optical na Free form density
- Otevřít intenzitu světla u kanálu Green, která musí být 170 až 190
- Nastavení z Free form přepnout na Standard optical density
- U každého snímku zvolit zobrazování pouze kanálu Green
- Nastavení kalibrace na obj. conf 100x
- Načtení souboru Feulgen ery
- Naměření hodnot jader
- Import naměřených dat do programu Excel

Pro určení vzorku bylo třeba naměřit minimálně 50 kvalitně vybarvených jader s koncentrovaným chromatinem. V případě absolutně neznámého vzorku byl měřen vyšší počet jader (kolem 100).

2. Kvantifikace obsahu DNA instrumentálními metodami (průtoková cytometrie):

Měření průtokové cytometrie probíhalo na průtokovém cytometru Partec CCA (Partec GmbH, Münster, Německo).

Příprava a nastavení průtokového cytometru (Flajšhans, 2009, úst. sděl.):

- Zapnout průtokový cytometr
- Vyčistit aplikátor
- Vložit preparát standardu
- Vytvořit histogram standardu
- Stisknout tlačítko CLEAR
- Vložit preparát vzorku
- Vytvořit histogram vzorku
- Porovnat histogramy
- Vyhodnotit a zapsat údaje MEAN a CV%
- Stisknout tlačítko CLEAR

Při stanovování nižšího počtu vzorků bylo dostačující připravit a použít pouze jeden standard *Tinca tinca*. Pokud však bylo pozorováno vyšší množství vzorků na průtokovém cytometru, bylo vhodné mít připraveno několik standardů *Tinca tinca*.

3. Konfokální epi-fluorescenční mikroskopie s laserovým skenováním (konfokální mikroskopie).

a) Hardware:

- Mikroskop BX50
- Kamera Sony DXC 9100P
- Laser Olympus FluoView
- Napájení laseru Omnicrome
- Chlazení laseru Omnicrome
- PC

b) Software:

- Windows XP
- FluoView
- ImageJ 1.44
- Bio Formats
- MicroSCoBioJ
- Objekt Counter

Postup stanovení pro konfokální mikroskopii (barveno DRAQ5) dle protokolu Bytyutskyy (2012):

- Zapnout napájení
- Zapnout PC
- Spustit Software FluoView
- Zapnout a zahřát laser otočením klíčkem na START
- Vybrat laserový paprsek o intenzitě 568nm
- Nastavit filtry
- Kanál 1 nastavit na přenos obrazu
- Kanál 2 nastavit pro fluorescenci
- Vložit pásmo propustnosti BA585IF
- Zadat laserovou intenzitu na 20%
- Vybrat konfokální clonu pro zvětšení 100x
- Nastavit světlo na binocular
- Vybrat nastavení LSM
- Nastavit prahování
- Zvolit napětí PMT (1/3), Gain (1/3) a Offset (1/10)
- Nastavit Fast Scan Speed
- Vybrat XY
- Stisknout tlačítko Once

Při dodržení výše uvedeného postupu byly získány desítky snímků buněk, které byly ve své podstatě jejími řezy po krocích 0,2 $\mu$ m. Z řezů byla sestavena 3-D rekonstrukce. K tomu byl jako nejvhodnější program zvolen ImageJ 1.44 (Abramof et al, 2004).

Sestavení vizualizace vzorku ve 3-D formátu a výpočet objemu buňky pomocí programu ImageJ 1.44 dle protokolu Bytyutskyy (2012):

- a) Instalace programu ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).
- b) Stáhnout Bio-formáty Java knihovny pro čtení a zápis obrazových formátů u biologických na odkazu: <http://www.loci.wisc.edu/software/bio-formats>. Stažené Bio-formáty byly umístěny do C: \ Program Files \ \ ImageJ složky plugins.
- c) Stáhnout program MicroscobioJ Plugin na veřejných stránkách <http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:stacks:microscobioj:start>. Program byl rozbalen a umístěn ho do C:\Program Files\ImageJ\plugins.
- d) Stáhnout program 3D-Object Counter plugin. Tato aplikace byla stáhnuta zde: ([http://imagejdocu.tudor.lu/lib/exe/fetch.php?media=plugin:analysis:3d\\_object\\_counter:3d-oc\\_.jar](http://imagejdocu.tudor.lu/lib/exe/fetch.php?media=plugin:analysis:3d_object_counter:3d-oc_.jar)). Po stažení byl program umístěn do C:\Program Files\ImageJ\plugins.
- e) Spustit aplikaci ImageJ. Otevřít záložku Bioformats importer: Plugins LOCI Bioformats Importer (záložka by měla mít pouze jeden kanál).
- f) Zkontrolovat RGB kanál, Autoscale a Split channels. Po kontrole stisknout OK.
- g) Zkontrolovat vlastnosti obrázku: Image-Properties.
- h) Spustit 3D-OC: Plugins - 3D Object Counter - 3D Object counter. Zkontrolovat jednotlivé vrstvy. Vybrat Summary a stisknout OK.



## 4. Výsledky

### 4.1 Výsledky měření velikosti genomu

Měření velikosti genomu probíhalo u 5 čistých druhů a 4 uměle vytvořených hybridů jeseterovitých ryb.

Jednalo se o zástupce těchto čistých druhů:

- *Acipenser ruthenus*
- *Acipenser baerii*
- *Acipenser gueldenstaedtii*
- *Acipenser stellatus*
- *Huso huso*

Jednalo se o zástupce těchto hybridů:

- *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (12n)
- *Acipenser baerii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n)
- *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (10n)
- *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n)

Při stanovování velikosti genomu výše uvedených jeseterovitých ryb byl použit jako standard *Tinca tinca* 2n a 3n. Standard byl původem z FROV JU ve Vodňanech.

Čisté druhy jeseterů:

Tab. č. 22: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser ruthenus*.

<i>Acipenser ruthenus</i>					
Jedinec	1	2	3	4	5
Obsah DNA	3,72 ± 0,013	3,74 ± 0,021	3,68 ± 0,015	3,70 ± 0,019	3,68 ± 0,013
Jedinec	6	7	8	9	10
Obsah DNA	5,90 ± 0,023	5,96 ± 0,011	5,84 ± 0,026	3,96 ± 0,013	3,80 ± 0,016
Jedinec	11	12	13	14	15
Obsah DNA	3,74 ± 0,019	3,78 ± 0,016	3,68 ± 0,010	3,70 ± 0,017	3,72 ± 0,021
Jedinec	16	17	18	19	20
Obsah DNA	3,78 ± 0,019	3,74 ± 0,012	3,68 ± 0,016	3,70 ± 0,014	3,72 ± 0,015

Tab. č. 23: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser baerii*.

<i>Acipenser baerii</i>					
Jedinec	1	2	3	4	5
Obsah DNA	8,30 ± 0,017	8,34 ± 0,025	8,20 ± 0,029	8,36 ± 0,031	8,22 ± 0,017
Jedinec	6	7	8	9	10
Obsah DNA	8,36 ± 0,030	8,32 ± 0,019	8,32 ± 0,022	8,34 ± 0,026	8,26 ± 0,033
Jedinec	11	12	13	14	15
Obsah DNA	12,90 ± 0,043	12,38 ± 0,029	6,22 ± 0,030	6,28 ± 0,029	6,26 ± 0,027
Jedinec	16	17	18	19	20
Obsah DNA	6,22 ± 0,036	8,32 ± 0,019	8,24 ± 0,023	10,32 ± 0,036	10,16 ± 0,041

Tab. č. 24: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser gueldenstaedtii*.

<b><i>Acipenser gueldenstaedtii</i></b>					
<b>Jedinec</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Obsah DNA</b>	7,92 ± 0,028	7,74 ± 0,035	7,84 ± 0,018	7,90 ± 0,035	7,88 ± 0,039
<b>Jedinec</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Obsah DNA</b>	7,90 ± 0,027	7,86 ± 0,022	7,90 ± 0,020	7,72 ± 0,026	7,80 ± 0,031
<b>Jedinec</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>
<b>Obsah DNA</b>	12,10 ± 0,052	11,84 ± 0,043	7,98 ± 0,023	7,80 ± 0,019	8,84 ± 0,034
<b>Jedinec</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
<b>Obsah DNA</b>	9,74 ± 0,025	9,72 ± 0,017	9,74 ± 0,041	9,78 ± 0,035	13,86 ± 0,039

Tab. č. 25: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser stellatus*.

<b><i>Acipenser stellatus</i></b>					
<b>Jedinec</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Obsah DNA</b>	4,74 ± 0,022	4,64 ± 0,031	4,64 ± 0,029	4,70 ± 0,025	4,62 ± 0,028
<b>Jedinec</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Obsah DNA</b>	4,62 ± 0,033	4,58 ± 0,019	4,56 ± 0,034	4,58 ± 0,029	4,72 ± 0,031
<b>Jedinec</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>
<b>Obsah DNA</b>	4,60 ± 0,019	4,74 ± 0,028	4,56 ± 0,018	4,60 ± 0,031	4,76 ± 0,026
<b>Jedinec</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
<b>Obsah DNA</b>	4,56 ± 0,022	4,58 ± 0,028	4,56 ± 0,023	4,68 ± 0,033	4,70 ± 0,029

Tab. č. 26: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Huso huso*.

<i>Huso huso</i>					
Jedinec	1	2	3	4	5
Obsah DNA	3,78 ± 0,027	3,60 ± 0,031	3,72 ± 0,027	3,68 ± 0,019	3,72 ± 0,036
Jedinec	6	7	8	9	10
Obsah DNA	3,64 ± 0,043	3,62 ± 0,029	3,70 ± 0,035	3,68 ± 0,026	3,60 ± 0,033
Jedinec	11	12	13	14	15
Obsah DNA	3,70 ± 0,031	3,62 ± 0,029	3,72 ± 0,046	3,70 ± 0,019	3,68 ± 0,028
Jedinec	16	17	18	19	20
Obsah DNA	3,60 ± 0,034	3,66 ± 0,022	3,64 ± 0,026	3,60 ± 0,037	3,74 ± 0,025

Hybridi jeseterů:

Tab. č. 27: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u hybrida *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (12n).

<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (8n) x <i>Acipenser baerii</i> (12n)					
Jedinec	1	2	3	4	5
Obsah DNA	10,00 ± 0,026	12,16 ± 0,041	12,12 ± 0,035	12,16 ± 0,039	10,06 ± 0,027
Jedinec	6	7	8	9	10
Obsah DNA	10,02 ± 0,045	10,04 ± 0,032	9,16 ± 0,022	10,04 ± 0,038	9,84 ± 0,043

Tab. č. 28: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser baerii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n).

<b><i>Acipenser baerii</i> (8n) x <i>Acipenser ruthenus</i> (4n)</b>					
<b>Jedinec</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Obsah DNA</b>	5,94 ± 0,042	6,06 ± 0,032	6,00 ± 0,028	6,04 ± 0,029	6,16 ± 0,037
<b>Jedinec</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Obsah DNA</b>	6,16 ± 0,041	6,18 ± 0,027	6,16 ± 0,035	6,14 ± 0,033	6,12 ± 0,027

Tab. č. 29: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (10n).

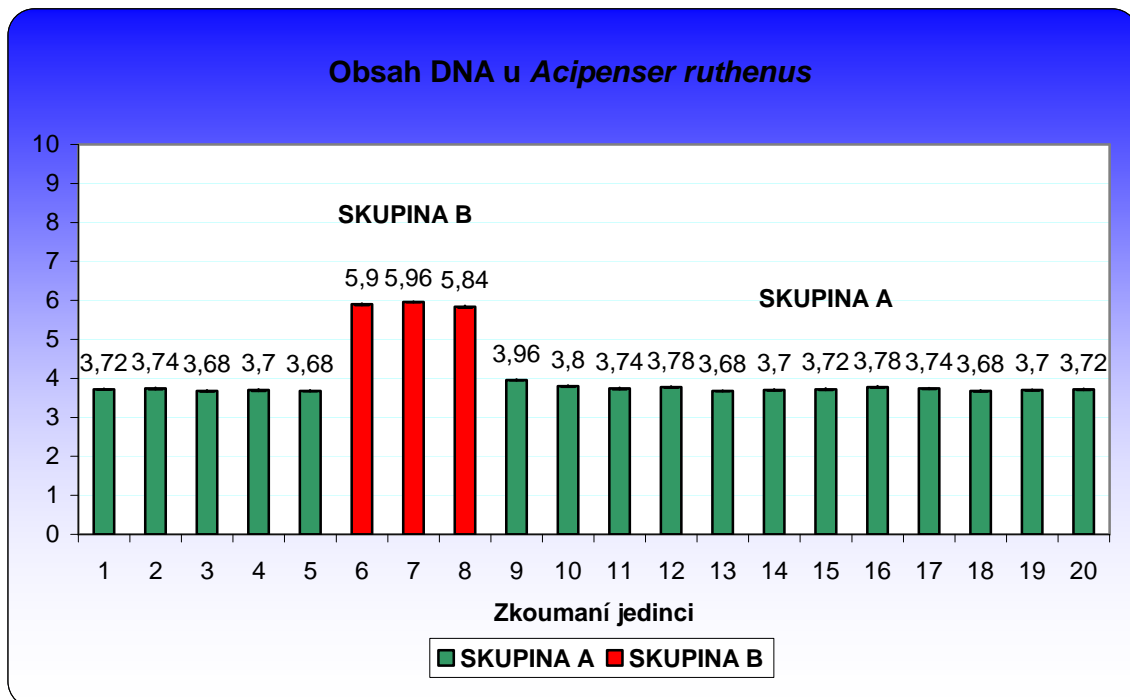
<b><i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (8n) x <i>Acipenser baerii</i> (10n)</b>					
<b>Jedinec</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Obsah DNA</b>	13,06 ± 0,049	9,14 ± 0,038	9,16 ± 0,027	9,06 ± 0,031	9,14 ± 0,029
<b>Jedinec</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Obsah DNA</b>	9,08 ± 0,022	9,10 ± 0,021	9,12 ± 0,034	9,18 ± 0,019	9,16 ± 0,036

Tab. č. 30: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n).

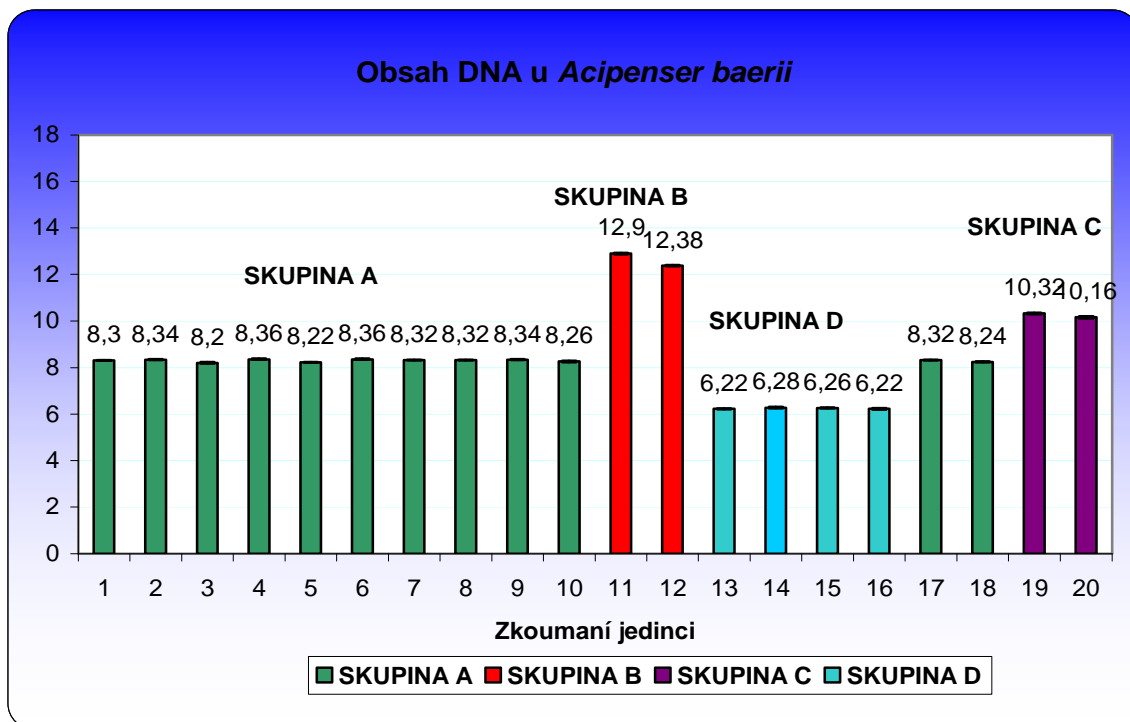
<b><i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (8n) x <i>Acipenser ruthenus</i> (4n)</b>					
<b>Jedinec</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Obsah DNA</b>	5,86 ± 0,028	5,86 ± 0,031	5,82 ± 0,019	5,84 ± 0,024	5,82 ± 0,021
<b>Jedinec</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Obsah DNA</b>	5,84 ± 0,025	5,82 ± 0,026	5,82 ± 0,020	5,84 ± 0,031	5,84 ± 0,022

Čisté druhy jeseterů:

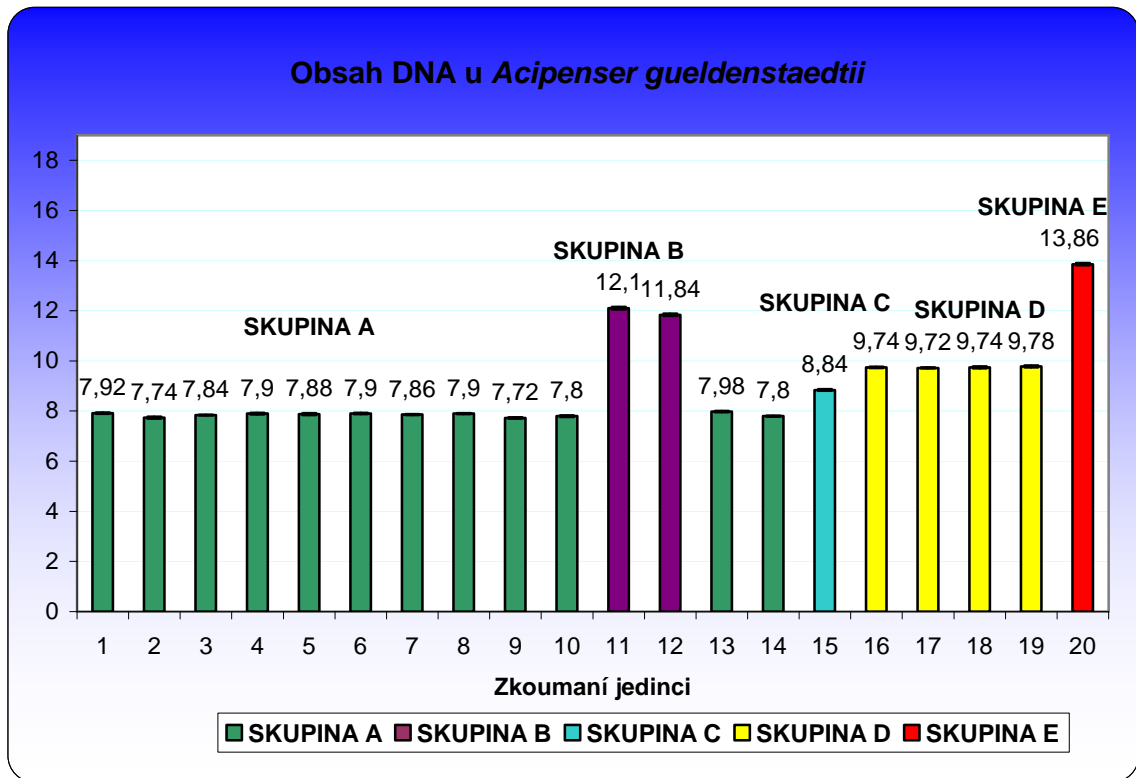
Graf č. 1: Měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser ruthenus*. Skupiny A a B se mezi sebou statisticky významně liší (P < 0,05).



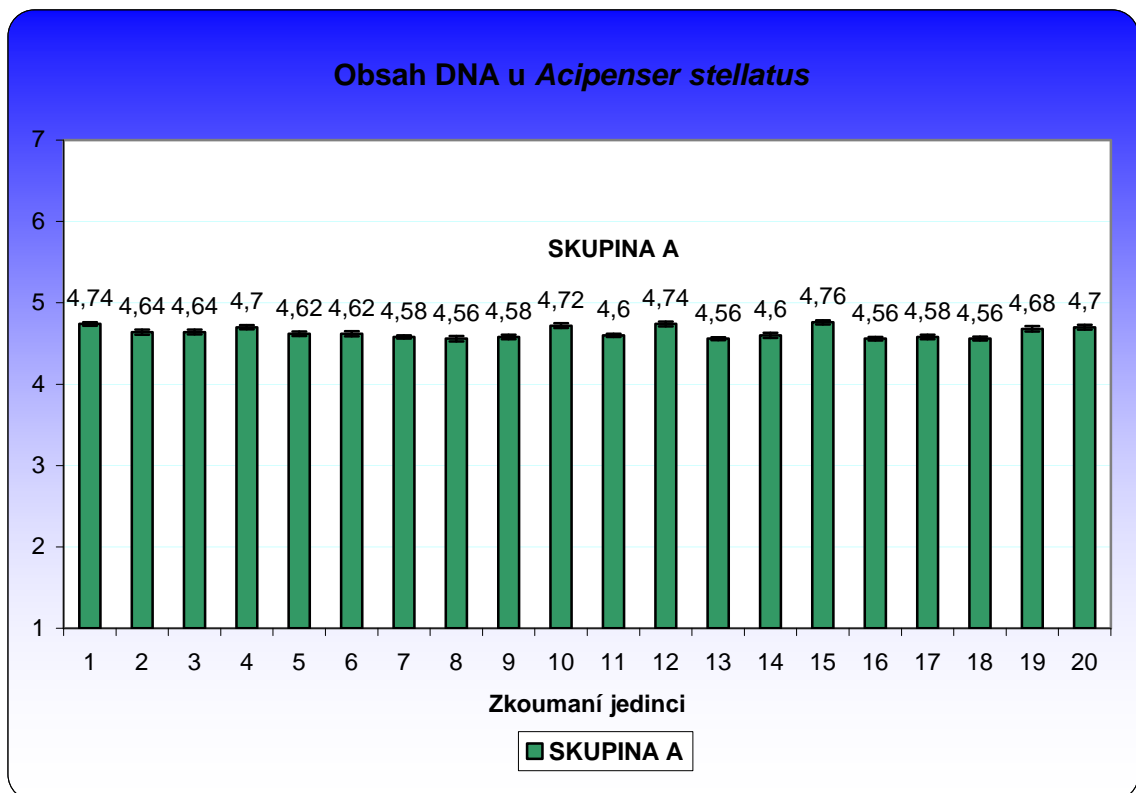
Graf č. 2: Měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser baerii*. Skupiny A, B, C a D se mezi sebou statisticky významně liší (P < 0,05).



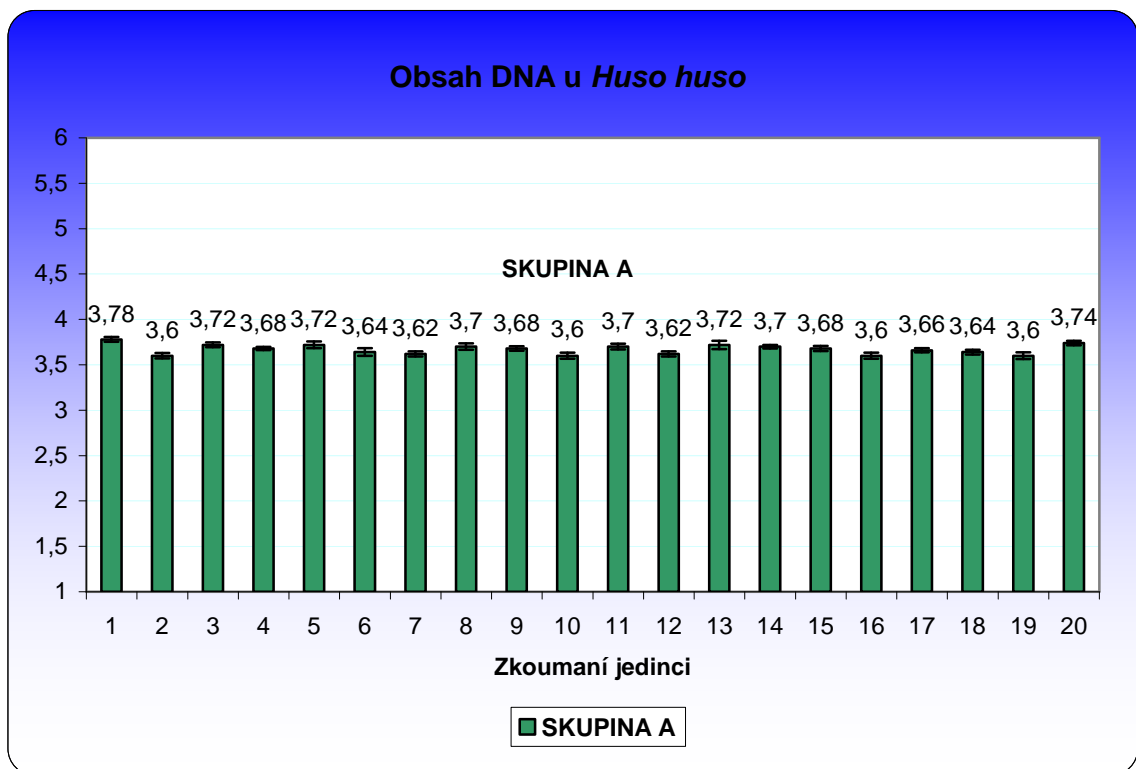
Graf č. 3: Měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser gueldenstaedtii*. Skupiny A, B, C, D a E se mezi sebou statisticky významně liší (P < 0,05).



Graf č. 4: Měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser stellatus*, kde byla nalezena jen skupina A.



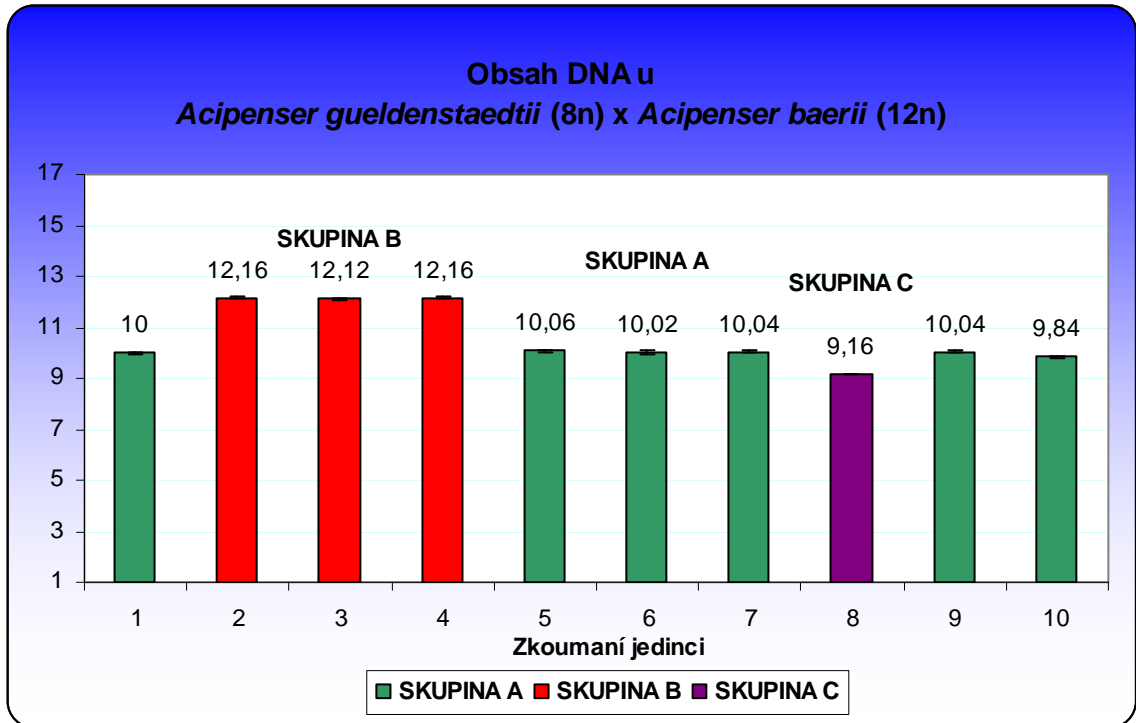
Graf č. 5: Měření obsahu DNA ( $\mu\text{gDNA}\cdot\text{jádro}^{-1}$ ) u *Huso huso*, kde byla nalezena pouze skupina A.



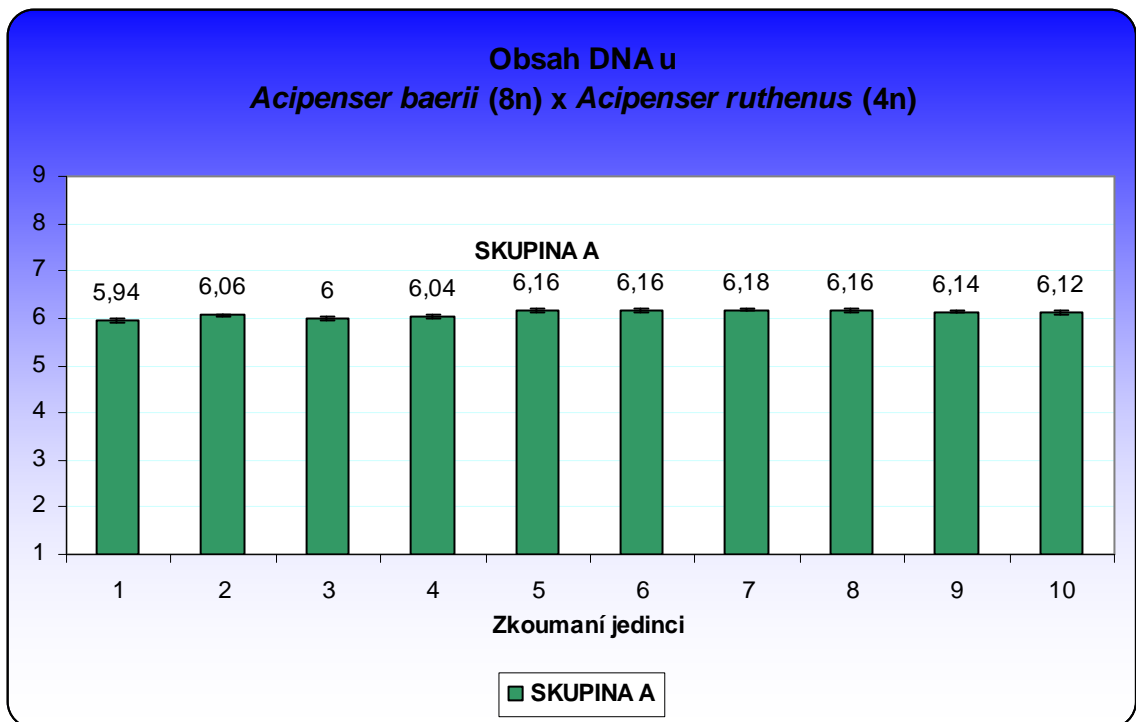


Hybridi jeseterů:

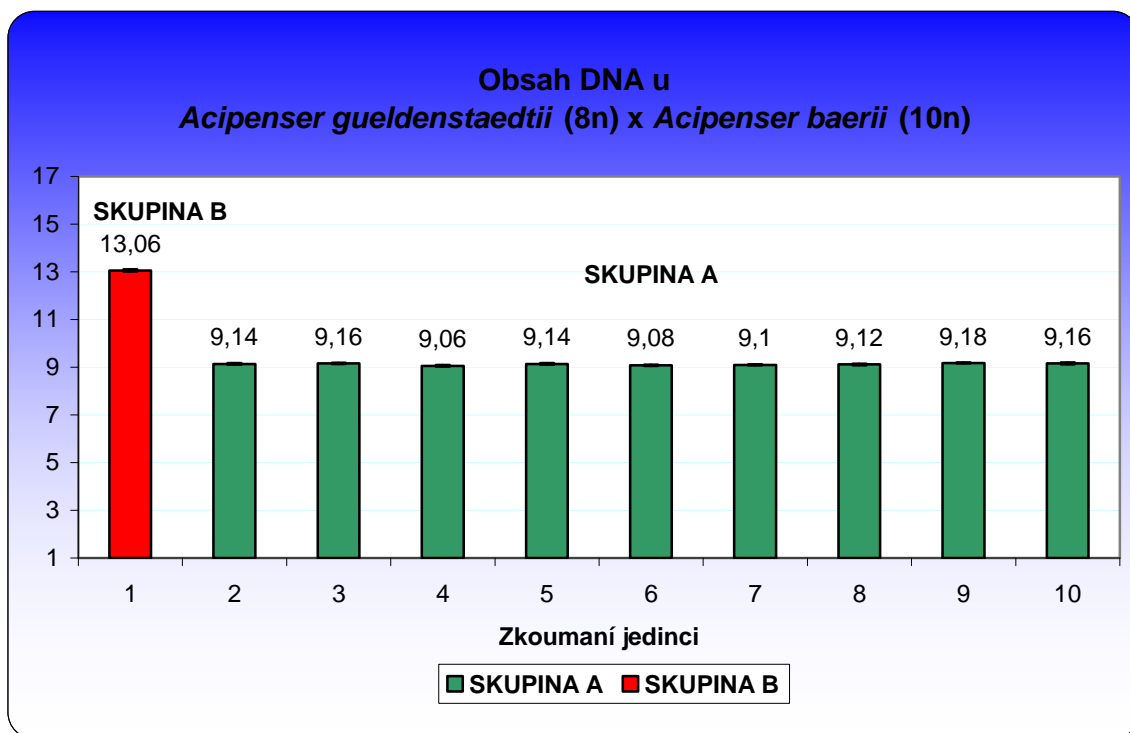
Graf č. 6: Měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (12n). Skupiny A, B a C se mezi sebou statisticky významně liší (P < 0,05).



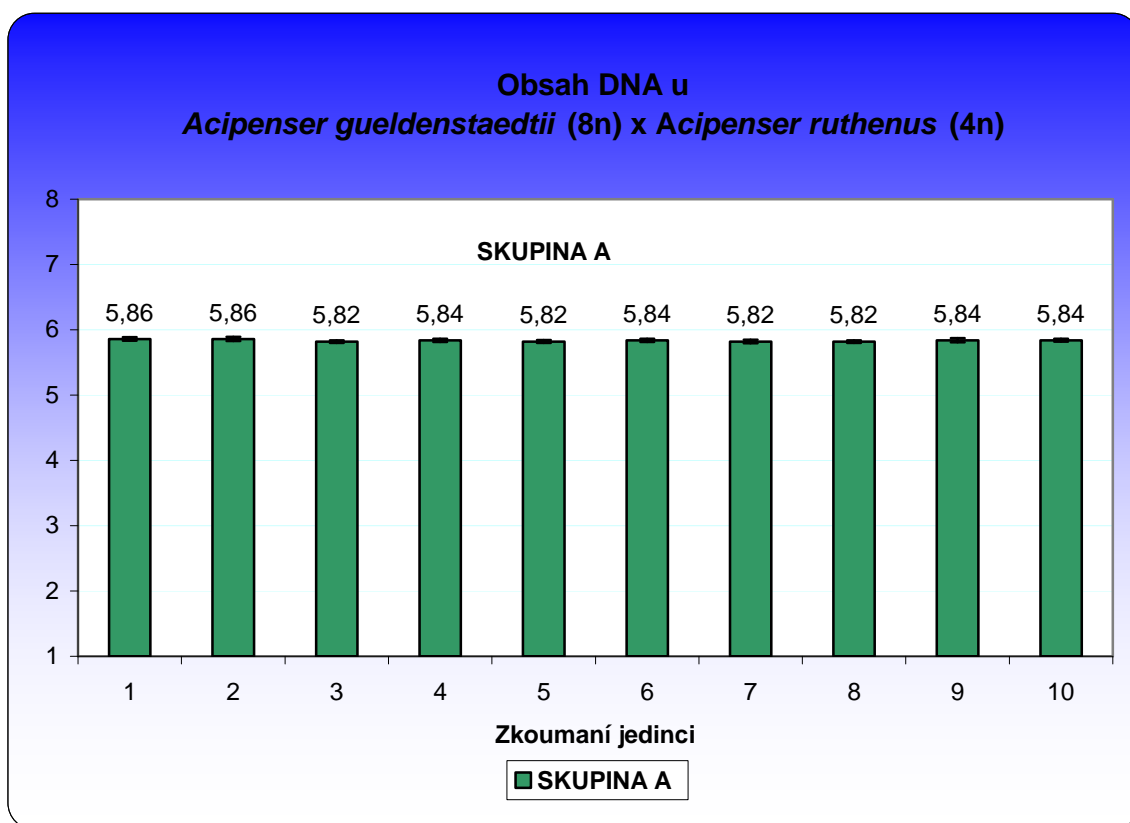
Graf č. 7: Měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser baerii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n), kde byla nalezena pouze skupina A.



Graf č. 8: Měření obsahu DNA ( $\text{pgDNA.jádro}^{-1}$ ) u *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (10n). Skupiny A a B se mezi sebou statisticky významně liší ( $P < 0,05$ ).



Graf č. 9: Měření obsahu DNA ( $\text{pgDNA.jádro}^{-1}$ ) u *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n), kde byla nalezena pouze skupina A.



## 4.2 Porovnání standardní a nestandardní velikosti genomu

Z výsledků měření velikosti genomu (viz kapitola 4.1) je jasně patrné, že u tří z čistých druhů jeseterů a dvou druhů hybridů byli nalezeni jedinci, kteří se svými hodnotami výrazně odlišovali od ostatních zkoumaných jedinců svého druhu.

Na základě těchto výsledků bylo dále naměřeno a zjištěno:

- Plocha jádra ( $\mu\text{m}^2$ )
- Koncentrace DNA v buněčném jádru (v pgDNA na  $1 \mu\text{m}^2$  jádra erytrocytu)

Tab. č. 31: Hodnoty pro standardní velikost genomu u *Acipenser ruthenus*.

<i>Acipenser ruthenus</i> standardní			
Jedinec	Plocha jádra ( $\mu\text{m}^2$ )	Obsah DNA (pgDNA.jádro <sup>-1</sup> )	pgDNA na $\mu\text{m}^2$
1	19,21 ± 0,813	3,72 ± 0,013	0,194 ± 0,002
2	20,03 ± 0,752	3,74 ± 0,021	0,188 ± 0,003
3	18,27 ± 0,874	3,68 ± 0,015	0,202 ± 0,006
4	21,06 ± 0,101	3,70 ± 0,019	0,176 ± 0,004
5	20,32 ± 0,937	3,68 ± 0,013	0,182 ± 0,003
9	19,65 ± 0,429	3,96 ± 0,013	0,192 ± 0,003
10	19,85 ± 0,791	3,80 ± 0,016	0,190 ± 0,004
11	19,41 ± 0,553	3,74 ± 0,019	0,192 ± 0,002
12	19,97 ± 0,194	3,78 ± 0,016	0,188 ± 0,003
13	20,32 ± 0,439	3,68 ± 0,010	0,180 ± 0,002
14	19,48 ± 0,232	3,70 ± 0,017	0,188 ± 0,003
15	19,61 ± 0,682	3,72 ± 0,021	0,188 ± 0,003
16	19,94 ± 0,381	3,78 ± 0,019	0,190 ± 0,002
17	20,47 ± 0,671	3,74 ± 0,012	0,182 ± 0,004
18	20,36 ± 0,753	3,68 ± 0,016	0,180 ± 0,004
19	19,92 ± 0,364	3,70 ± 0,014	0,184 ± 0,003
20	19,69 ± 0,492	3,72 ± 0,015	0,188 ± 0,002

Tab. č. 32: Hodnoty pro nestandardní velikosti genomu u *Acipenser ruthenus*.

<b><i>Acipenser ruthenus</i> nestandardní</b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Plocha jádra (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Obsah DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>)</b>	<b>pgDNA na <math>\mu\text{m}^2</math></b>
6	23,84 ± 0,511	5,90 ± 0,023	0,246 ± 0,004
7	22,93 ± 0,325	5,96 ± 0,011	0,258 ± 0,004
8	23,74 ± 0,830	5,84 ± 0,026	0,244 ± 0,003

Tab. č. 33: Hodnoty pro standardní velikost genomu u *Acipenser baerii*.

<b><i>Acipenser baerii</i> standardní</b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Plocha jádra (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Obsah DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>)</b>	<b>pgDNA na <math>\mu\text{m}^2</math></b>
1	29,16 ± 0,836	8,30 ± 0,017	0,284 ± 0,005
2	29,40 ± 0,776	8,34 ± 0,025	0,284 ± 0,002
3	33,12 ± 0,948	8,20 ± 0,029	0,248 ± 0,006
4	32,72 ± 0,491	8,36 ± 0,031	0,256 ± 0,003
5	33,07 ± 0,843	8,22 ± 0,017	0,248 ± 0,003
6	29,92 ± 1,023	8,36 ± 0,030	0,280 ± 0,005
7	30,66 ± 0,740	8,32 ± 0,019	0,272 ± 0,004
8	30,00 ± 0,639	8,32 ± 0,022	0,278 ± 0,002
9	29,98 ± 0,538	8,34 ± 0,026	0,278 ± 0,004
10	29,95 ± 0,980	8,26 ± 0,033	0,276 ± 0,006
17	29,59 ± 0,832	8,32 ± 0,019	0,282 ± 0,005
18	29,88 ± 0,947	8,24 ± 0,023	0,276 ± 0,002

Tab. č. 34: Hodnoty pro nestandardní velikosti genomu u *Acipenser baerii*.

<b><i>Acipenser baerii</i> nestandardní</b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Plocha jádra (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Obsah DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>)</b>	<b>pgDNA na <math>\mu\text{m}^2</math></b>
13	22,08 ± 0,550	6,22 ± 0,030	0,282 ± 0,010
14	23,17 ± 1,280	6,28 ± 0,029	0,266 ± 0,002
15	23,91 ± 0,582	6,26 ± 0,027	0,262 ± 0,003
16	23,44 ± 0,712	6,22 ± 0,036	0,264 ± 0,004
19	35,25 ± 0,984	10,32 ± 0,036	0,292 ± 0,004
20	34,98 ± 1,022	10,16 ± 0,041	0,290 ± 0,003
11	46,59 ± 1,120	12,90 ± 0,043	0,280 ± 0,010
12	37,32 ± 1,103	12,38 ± 0,029	0,332 ± 0,018

Tab. č. 35: Hodnoty pro standardní velikost genomu u *Acipenser gueldenstaedtii*.

<b><i>Acipenser gueldenstaedtii</i> standardní</b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Plocha jádra (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Obsah DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>)</b>	<b>pgDNA na <math>\mu\text{m}^2</math></b>
1	31,55 ± 0,821	7,92 ± 0,028	0,252 ± 0,003
2	32,10 ± 1,020	7,74 ± 0,035	0,242 ± 0,002
3	30,84 ± 0,746	7,84 ± 0,018	0,254 ± 0,004
4	28,48 ± 0,938	7,90 ± 0,035	0,276 ± 0,006
5	30,1 ± 0,743	7,88 ± 0,039	0,262 ± 0,006
6	29,14 ± 0,884	7,90 ± 0,027	0,272 ± 0,004
7	28,74 ± 1,249	7,86 ± 0,022	0,274 ± 0,003
8	30,45 ± 0,930	7,90 ± 0,020	0,260 ± 0,002
9	28,17 ± 1,036	7,72 ± 0,026	0,274 ± 0,005
10	29,32 ± 0,733	7,80 ± 0,031	0,266 ± 0,003
13	30,91 ± 0,835	7,98 ± 0,023	0,248 ± 0,003
14	30,38 ± 0,937	7,80 ± 0,019	0,256 ± 0,015

Tab. č. 36: Hodnoty pro nestandardní velikosti genomu u *Acipenser gueldenstaedtii*.

<b><i>Acipenser gueldenstaedtii</i> nestandardní</b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Plocha jádra (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Obsah DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>)</b>	<b>pgDNA na <math>\mu\text{m}^2</math></b>
15	32,39 ± 0,992	8,84 ± 0,034	0,272 ± 0,004
16	34,21 ± 1,031	9,74 ± 0,025	0,286 ± 0,005
17	34,38 ± 0,851	9,72 ± 0,017	0,282 ± 0,005
18	33,95 ± 0,897	9,74 ± 0,041	0,286 ± 0,004
19	34,01 ± 0,945	9,78 ± 0,035	0,286 ± 0,003
11	35,10 ± 1,230	12,10 ± 0,052	0,344 ± 0,009
12	38,10 ± 1,330	11,84 ± 0,043	0,310 ± 0,015
20	39,76 ± 0,979	13,86 ± 0,039	0,348 ± 0,005

Tab. č. 37: Hodnoty pro standardní velikost genomu u *A. gueldenstaedtii* (8n) x *A. baerii* (12n).

<b><i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (8n) x <i>Acipenser baerii</i> (12n) standardní</b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Plocha jádra (μm<sup>2</sup>)</b>	<b>Obsah DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>)</b>	<b>pgDNA na μm<sup>2</sup></b>
1	26,46 ± 0,430	10,00 ± 0,026	0,378 ± 0,002
5	26,45 ± 0,328	10,06 ± 0,027	0,380 ± 0,002
6	26,45 ± 0,279	10,02 ± 0,045	0,378 ± 0,003
7	26,56 ± 0,243	10,04 ± 0,032	0,378 ± 0,002
9	27,65 ± 0,452	10,04 ± 0,038	0,362 ± 0,003
10	27,12 ± 0,366	9,84 ± 0,043	0,362 ± 0,003

Tab. č. 38: Hodnoty pro nestandardní velikosti genomu u *A. gueldenstaedtii* (8n) x *A. baerii* (12n).

<b><i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (8n) x <i>Acipenser baerii</i> (12n) nestandardní</b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Plocha jádra (μm<sup>2</sup>)</b>	<b>Obsah DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>)</b>	<b>pgDNA na μm<sup>2</sup></b>
8	24,26 ± 0,847	9,16 ± 0,022	0,378 ± 0,002
2	32,16 ± 0,237	12,16 ± 0,041	0,379 ± 0,003
3	32,10 ± 0,374	12,12 ± 0,035	0,376 ± 0,002
4	32,20 ± 0,279	12,16 ± 0,039	0,378 ± 0,002

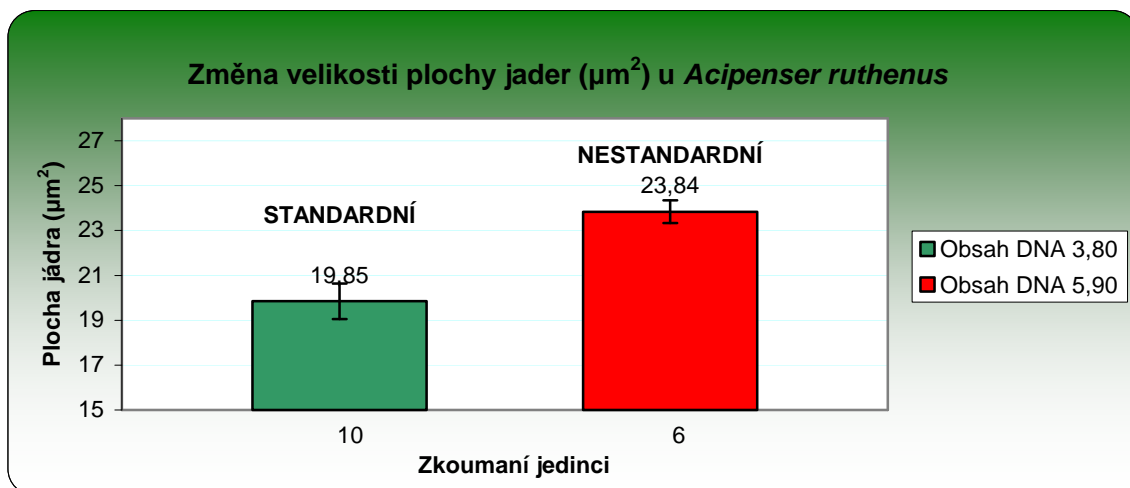
Tab. č. 39: Hodnoty pro standardní velikost genomu u *A. gueldenstaedtii* (8n) x *A. baerii* (10n).

<b><i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (8n) x <i>Acipenser baerii</i> (10n) standardní</b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Plocha jádra (μm<sup>2</sup>)</b>	<b>Obsah DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>)</b>	<b>pgDNA na μm<sup>2</sup></b>
2	25,06 ± 0,218	9,14 ± 0,038	0,364 ± 0,002
3	25,37 ± 0,225	9,16 ± 0,027	0,360 ± 0,003
4	25,05 ± 0,218	9,06 ± 0,031	0,361 ± 0,003
5	25,31 ± 0,306	9,14 ± 0,029	0,360 ± 0,003
6	25,15 ± 0,274	9,08 ± 0,022	0,361 ± 0,003
7	25,20 ± 0,277	9,10 ± 0,021	0,360 ± 0,003
8	25,26 ± 0,282	9,12 ± 0,034	0,360 ± 0,002
9	25,43 ± 0,206	9,18 ± 0,019	0,360 ± 0,003
10	25,36 ± 0,267	9,16 ± 0,036	0,361 ± 0,003

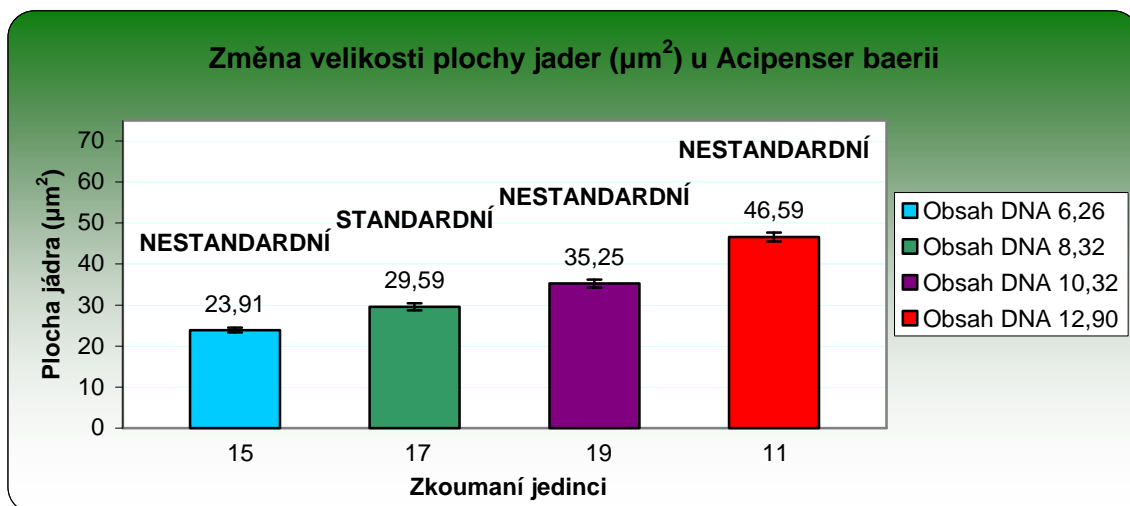
Tab. č. 40: Hodnoty pro nestandardní velikosti genomu u *A. gueldenstaedtii* (8n) x *A. baerii* (10n).

<b><i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (8n) x <i>Acipenser baerii</i> (10n) nestandardní</b>			
<b>Jedinec</b>	<b>Plocha jádra (μm<sup>2</sup>)</b>	<b>Obsah DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>)</b>	<b>pgDNA na μm<sup>2</sup></b>
1	35,78 ± 0,893	13,06 ± 0,049	0,364 ± 0,002

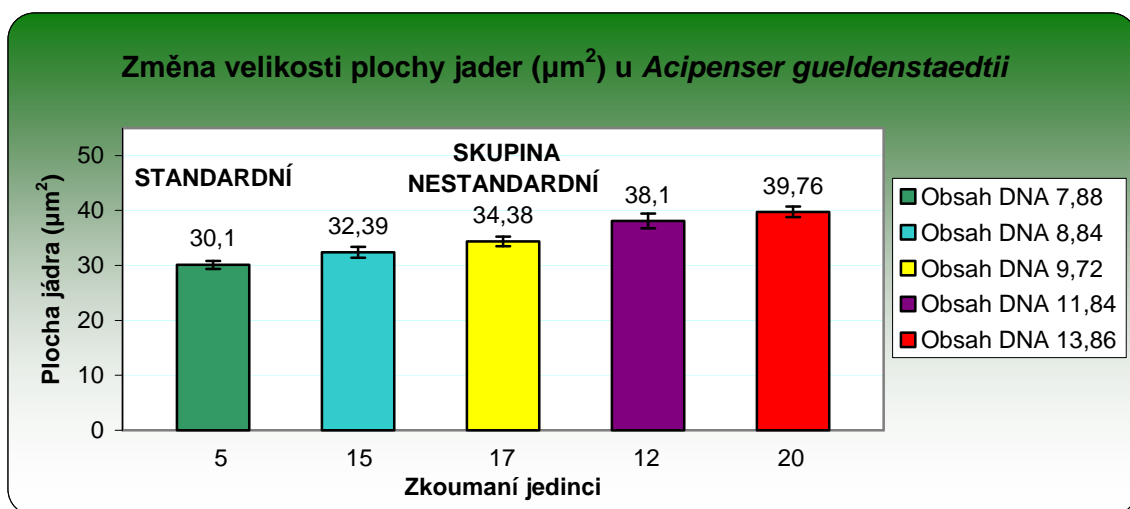
Graf č. 10: Změna velikosti plochy jader ( $\mu\text{m}^2$ ) u *Acipenser ruthenus*.



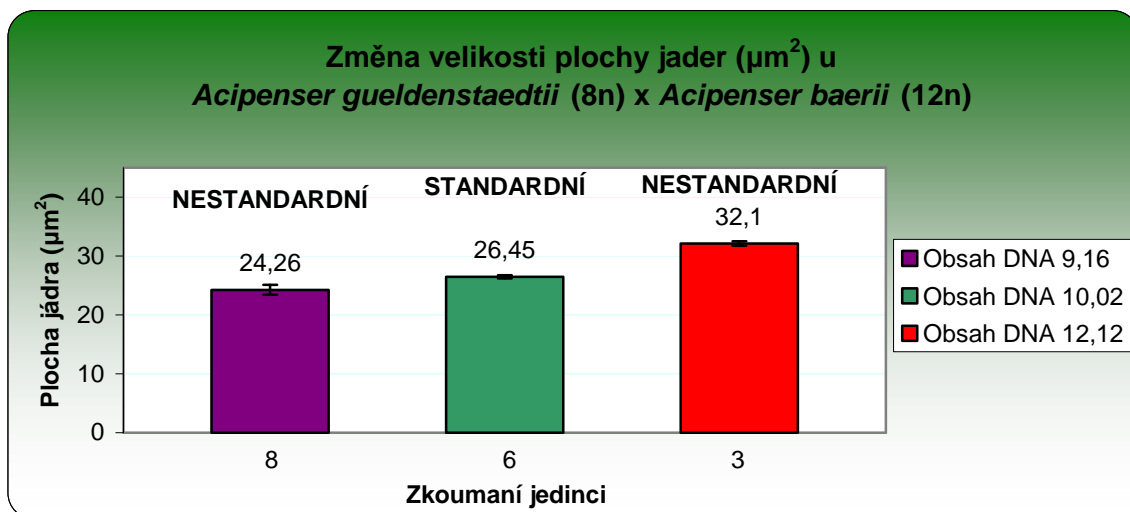
Graf č. 11: Změna velikosti plochy jader ( $\mu\text{m}^2$ ) u *Acipenser baerii*.



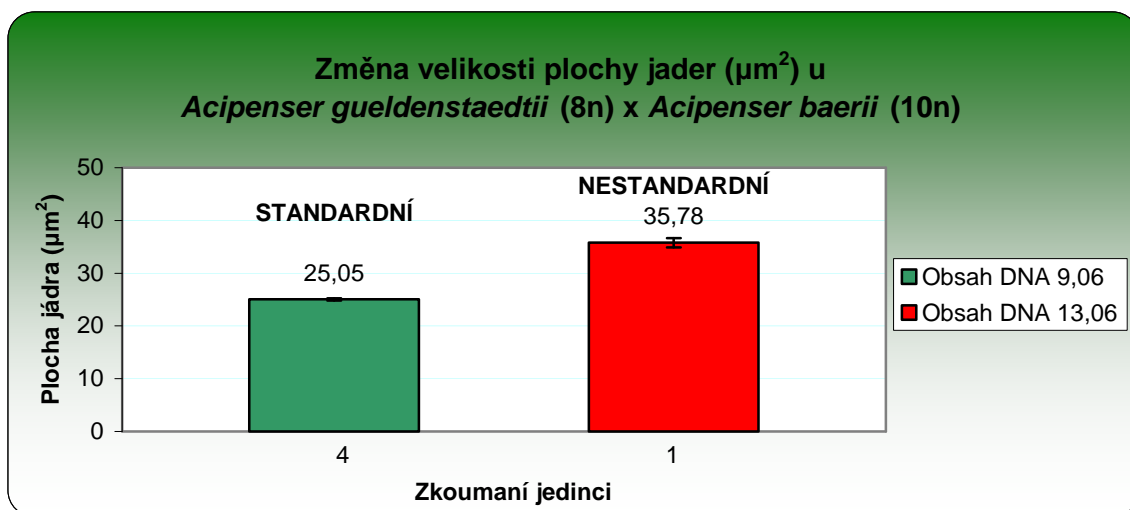
Graf č. 12: Změna velikosti plochy jader ( $\mu\text{m}^2$ ) u *Acipenser gueldenstaedtii*.



Graf č. 13: Změna velikosti plochy jader ( $\mu\text{m}^2$ ) u *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (12n).



Graf č. 14: Změna velikosti plochy jader ( $\mu\text{m}^2$ ) u *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (10n).



\* U druhů *Acipenser stellatus*, *Huso huso* a hybridů *Acipenser baerii* (8n) s *Acipenser ruthenus* (4n) a *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) s *Acipenser ruthenus* (4n) nebyli nalezeni jedinci s nestandardní velikostí genomu.

\* Při nalezení pouze jednoho jedince dané velikosti genomu z určitého druhu není možné stanovit průměr, směrodatnou odchylku ani variační koeficient. Z těchto důvodů byli jedinci daného druhu rozděleni do skupin dle velikosti genomu (viz kapitola 4.1) a pro porovnání byl vždy vybrán jeden jedinec, který svými hodnotami charakterizoval danou skupinu.



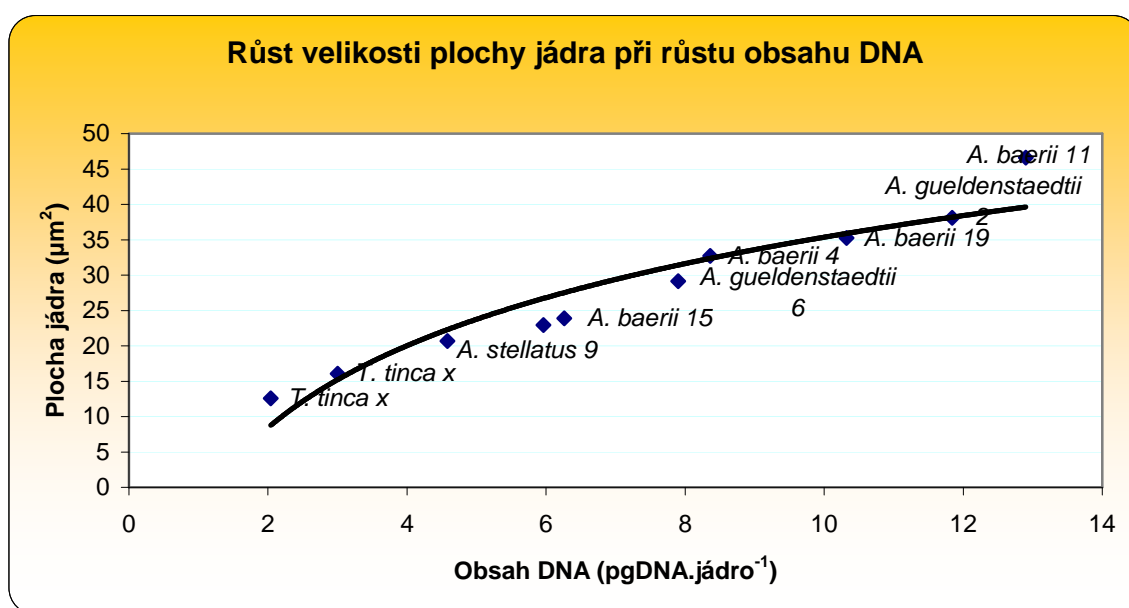
### 4.3 Změny prostorové konformace jádra v závislosti na velikosti genomu

Z výsledků výše uvedených kapitol (viz kapitoly 4.1 a 4.2) je průkazné, že při zvýšení hodnot obsahu DNA také dochází k nárůstu velikosti jádra. Dá se tedy říci, že velikost jádra je závislá na obsahu DNA v jádře.

Tab. č. 41: Prokázání vztahu mezi nárůstem velikosti jádra a zvyšujícím se obsahem DNA.

Druh	Jedinec	Plocha jádra ( $\mu\text{m}^2$ )	Obsah DNA (pgDNA.jádro <sup>-1</sup> )	pgDNA na $\mu\text{m}^2$
<i>T. tinca</i>	x	12,6 ± 0,450	2,04 ± 0,022	0,161 ± 0,003
<i>T. tinca</i>	x	16,05 ± 0,610	3,00 ± 0,028	0,181 ± 0,001
<i>A. stellatus</i>	9	20,67 ± 0,375	4,58 ± 0,029	0,220 ± 0,004
<i>A. ruthenus</i>	7	22,93 ± 0,325	5,96 ± 0,011	0,258 ± 0,004
<i>A. baerii</i>	15	23,91 ± 0,582	6,26 ± 0,027	0,262 ± 0,003
<i>A. gueldenstaedtii</i>	6	29,14 ± 0,884	7,90 ± 0,027	0,272 ± 0,004
<i>A. baerii</i>	4	32,72 ± 0,491	8,36 ± 0,031	0,256 ± 0,003
<i>A. baerii</i>	19	35,25 ± 0,984	10,32 ± 0,036	0,292 ± 0,004
<i>A. gueldenstaedtii</i>	12	38,10 ± 1,330	11,84 ± 0,043	0,310 ± 0,015
<i>A. baerii</i>	11	46,59 ± 1,120	12,90 ± 0,043	0,280 ± 0,010

Graf č. 15: Grafické znázornění vztahu mezi nárůstem velikosti jádra a zvyšujícím se obsahem DNA.

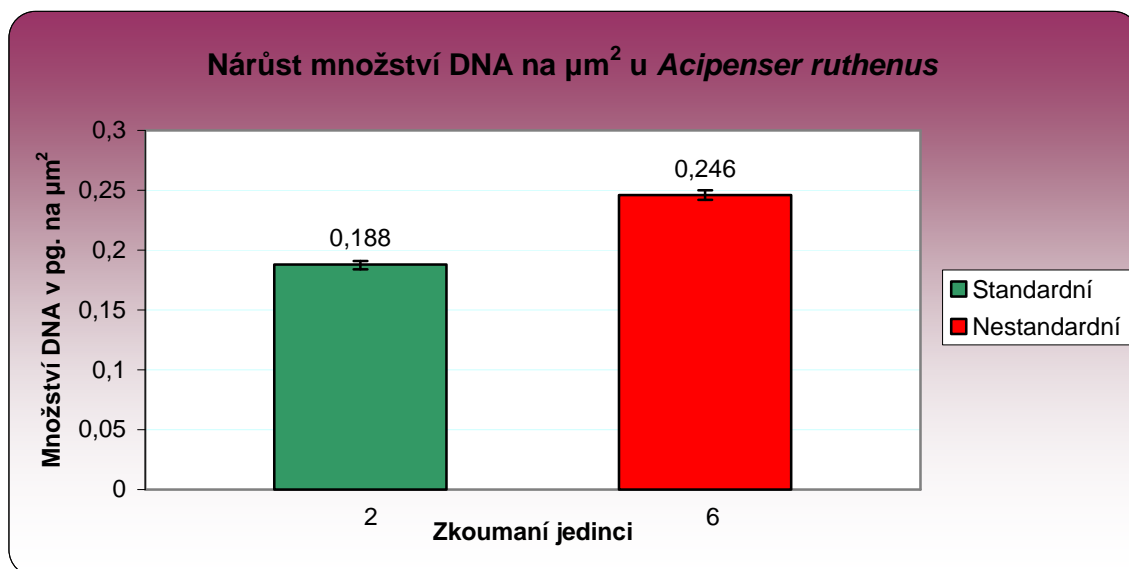


Dále je z výsledků patrné, že při nárůstu obsahu DNA nedochází pouze k růstu velikosti jádra erytrocytu, ale také dochází ke zvýšení množství DNA v pg. na  $1 \mu\text{m}^2$ , a to vlivem kondenzace DNA.

Tab. č. 42: Nárůst množství DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  vlivem nárůstu obsahu DNA u *Acipenser ruthenus*.

<i>Acipenser ruthenus</i>			
Jedinec	Plocha jádra ( $\mu\text{m}^2$ )	Obsah DNA (pgDNA.jádro <sup>-1</sup> )	pgDNA na $\mu\text{m}^2$
2	$20,03 \pm 0,752$	$3,74 \pm 0,021$	$0,188 \pm 0,003$
6	$23,84 \pm 0,511$	$5,90 \pm 0,023$	$0,246 \pm 0,004$

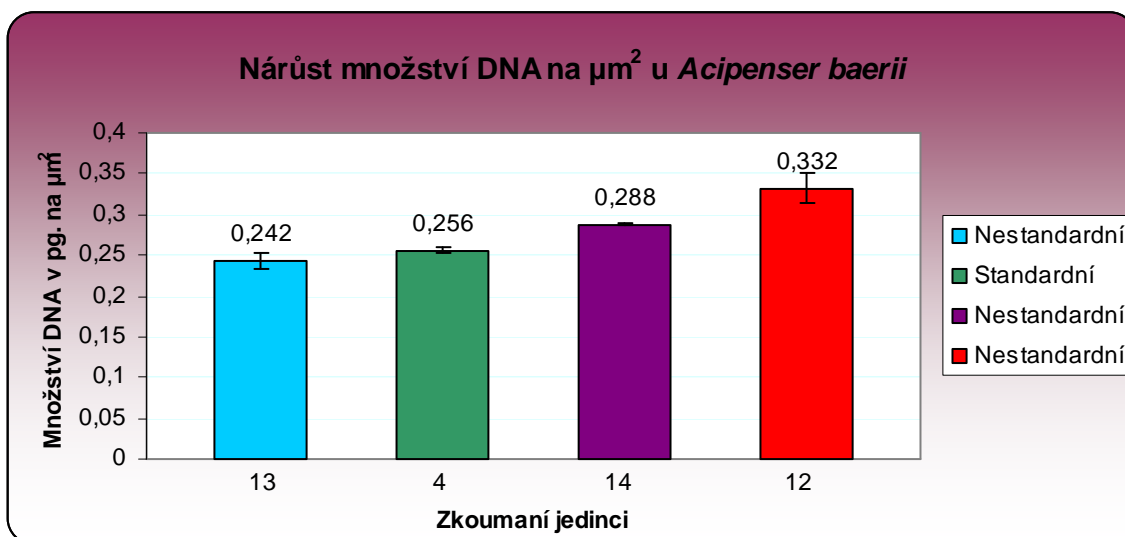
Graf č. 16: Grafické znázornění nárůstu DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  vlivem nárůstu obsahu DNA u *Acipenser ruthenus*.



Tab. č. 43: Nárůst množství DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  vlivem nárůstu obsahu DNA u *Acipenser baerii*.

<i>Acipenser baerii</i>			
Jedinec	Plocha jádra ( $\mu\text{m}^2$ )	Obsah DNA (pgDNA.jádro <sup>-1</sup> )	pgDNA na $\mu\text{m}^2$
13	$22,08 \pm 0,550$	$6,22 \pm 0,030$	$0,242 \pm 0,010$
4	$32,72 \pm 0,491$	$8,36 \pm 0,031$	$0,256 \pm 0,003$
14	$31,17 \pm 1,280$	$9,00 \pm 0,029$	$0,288 \pm 0,002$
12	$37,32 \pm 1,103$	$12,38 \pm 0,029$	$0,332 \pm 0,018$

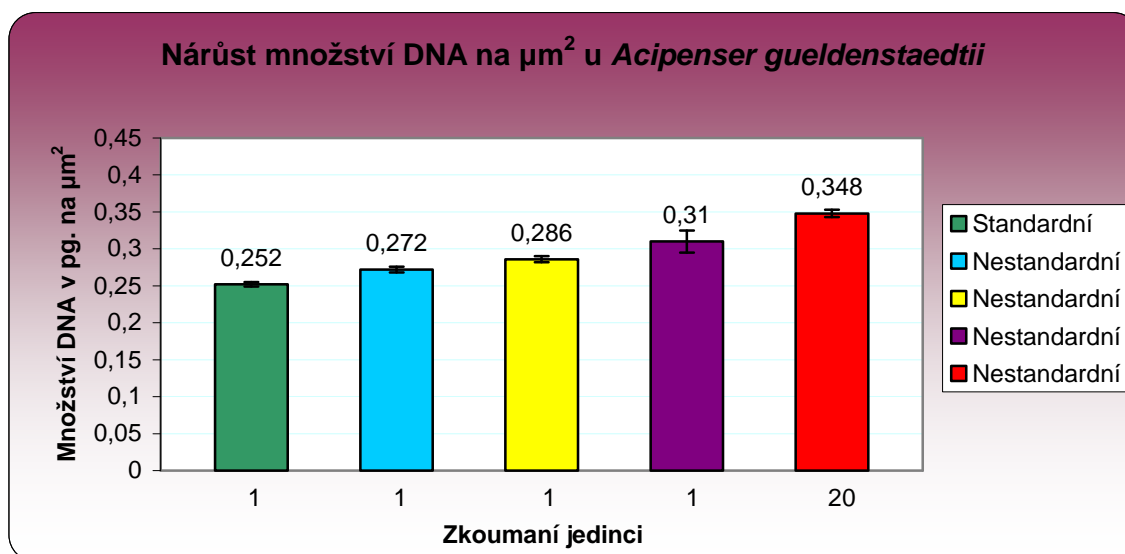
Graf č. 17: Grafické znázornění nárůstu DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  vlivem nárůstu obsahu DNA u *Acipenser baerii*.



Tab. č. 44: Nárůst množství DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  vlivem nárůstu obsahu DNA u *Acipenser gueldenstaedtii*.

<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>			
Jedinec	Plocha jádra ( $\mu\text{m}^2$ )	Obsah DNA (pgDNA.jádro <sup>-1</sup> )	pgDNA na $\mu\text{m}^2$
1	31,55 ± 0,821	7,92 ± 0,028	0,252 ± 0,003
15	32,39 ± 0,992	8,84 ± 0,034	0,272 ± 0,004
18	33,95 ± 0,897	9,74 ± 0,041	0,286 ± 0,004
12	38,10 ± 1,330	11,84 ± 0,043	0,310 ± 0,015
20	39,76 ± 0,979	13,86 ± 0,039	0,348 ± 0,005

Graf č. 18: Grafické znázornění nárůstu DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  vlivem nárůstu obsahu DNA u *Acipenser gueldenstaedtii*.

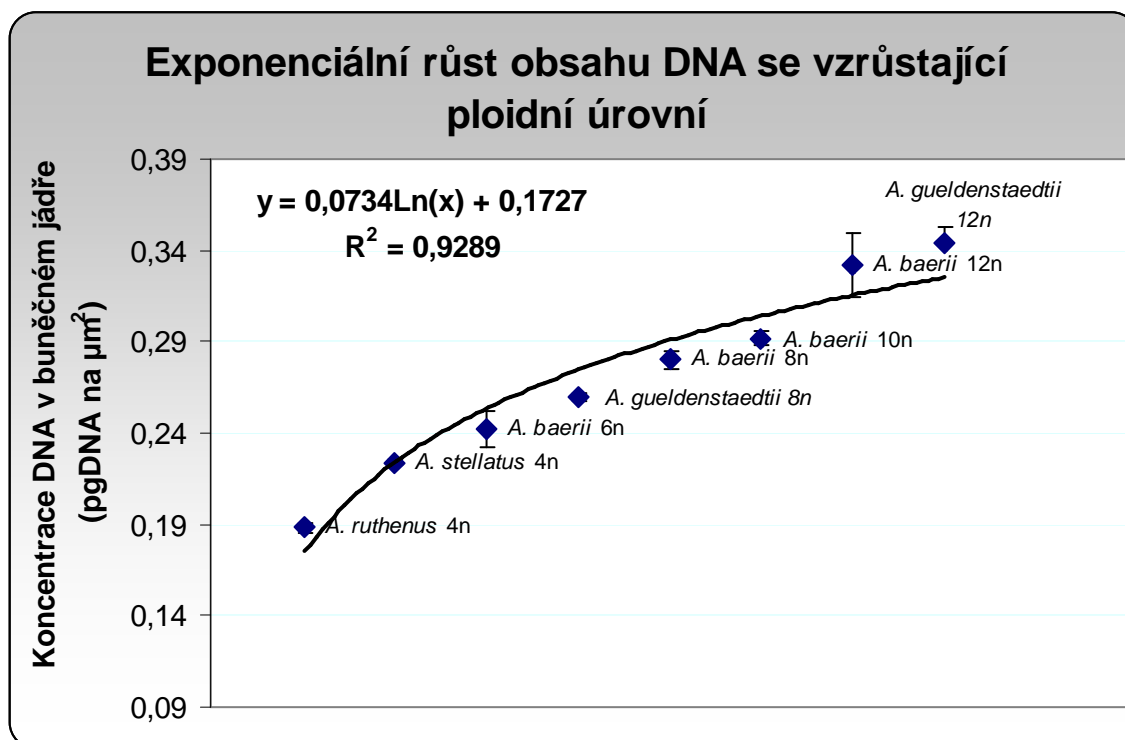


K tomuto nárůstu množství DNA v pg. na  $1 \mu\text{m}^2$  však nedochází pouze v rámci jednoho druhu. Exponenciální nárůst lze pozorovat i u různých druhů jeseterů, kteří vykazují postupný nárůst obsahu DNA a úrovně ploidie.

Tab. č. 45: Nárůst množství DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  u různých druhů jeseterů.

Druh	Jedinec	Plocha jádra ( $\mu\text{m}^2$ )	Obsah DNA (pgDNA.jádro <sup>-1</sup> )	pgDNA na $\mu\text{m}^2$
<i>A. ruthenus</i>	2	20,03 ± 0,752	3,74 ± 0,021	0,188 ± 0,003
<i>A. stellatus</i>	5	20,69 ± 0,880	4,62 ± 0,028	0,224 ± 0,002
<i>A. baerii</i>	13	22,08 ± 0,550	6,22 ± 0,030	0,242 ± 0,010
<i>A. gueldenstaedtii</i>	8	30,45 ± 0,930	7,90 ± 0,020	0,260 ± 0,002
<i>A. baerii</i>	6	29,92 ± 1,023	8,36 ± 0,030	0,280 ± 0,005
<i>A. baerii</i>	19	35,25 ± 0,984	10,32 ± 0,036	0,292 ± 0,004
<i>A. baerii</i>	12	37,32 ± 1,103	12,38 ± 0,029	0,332 ± 0,018
<i>A. gueldenstaedtii</i>	11	35,10 ± 1,230	12,10 ± 0,052	0,344 ± 0,009

Graf. č. 19: Grafické znázornění nárůstu množství DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  u různých druhů jeseterů.



Z výše uvedených výsledků je jasné patrné, že nárůst obsahu DNA má vliv na celkový růst plochy jádra erytrocytu, a také na růst množství DNA v pg. na  $1 \mu\text{m}^2$ . Tento nárůst množství DNA v pg. na  $1 \mu\text{m}^2$  je s největší pravděpodobností zapříčiněn kondenzací DNA v jádře erytrocytu. Dále díky těmto nárůstům dochází u vyšších úrovní ploidie k elipsoidním tvarům jader erytrocytů.

Tyto změny prostorové konformace buněčného jádra se podařilo prokázat a potvrdit také u výsledků měření metodou konfokální mikroskopie.

Metodou konfokální mikroskopie byli měřeni tyto čisté druhy:

- *Acipenser ruthenus*
- *Acipenser baerii*
- *Acipenser gueldenstaedtii*

Měření konfokální mikroskopii proběhlo také u těchto vytvořených hybridů:

- *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (12n)
- *Acipenser baerii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n)
- *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (10n)
- *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n)

Změny prostorové konformace se však podařilo prokázat pouze u:

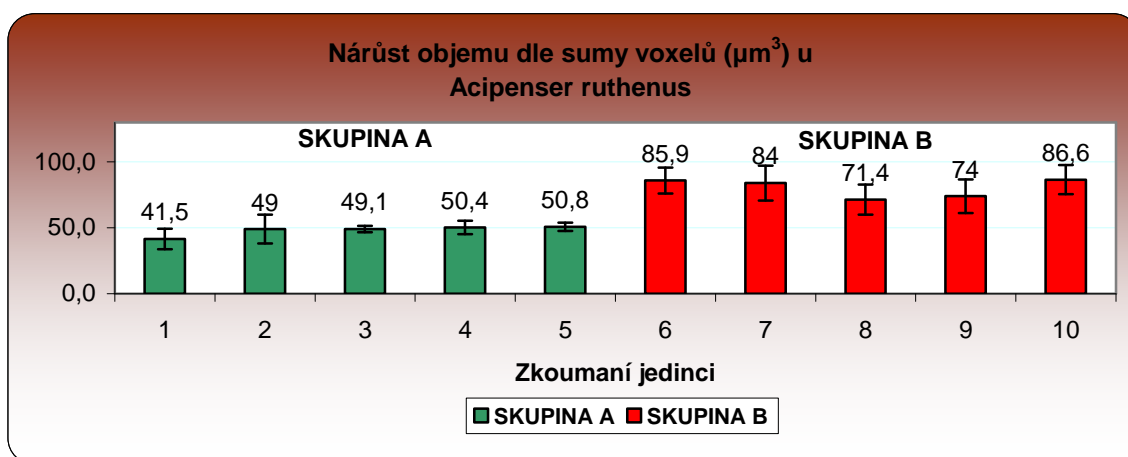
- *Acipenser ruthenus*
- *Acipenser baerii*

U všech ostatních čistých druhů i hybridů se pomocí metody konfokální mikroskopie nepodařilo naleznout polyploidní jedince s nestandardní velikostí genomu. Tudíž u těchto druhů nemohlo dojít k dalšímu porovnání.

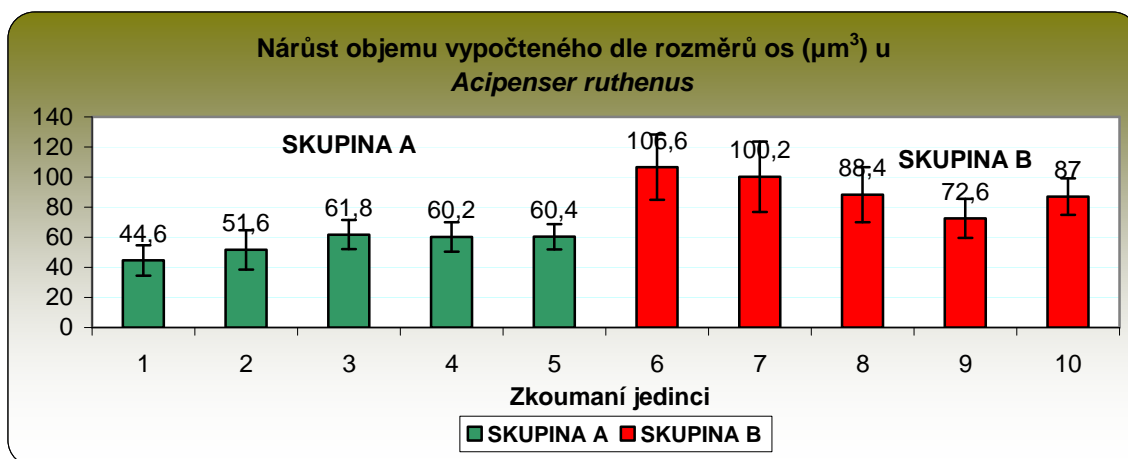
Tab. č. 46: Výsledky měření metodou konfokální mikroskopie u *Acipenser ruthenus*.

<i>Acipenser ruthenus</i>			
Jedinec	Úroveň ploidie	Objem dle sumy voxelů ( $\mu\text{m}^3$ )	Objem vypočtený podle rozměrů os ( $\mu\text{m}^3$ )
1	4n	41,5 ± 7,8	44,6 ± 10,9
2	4n	49,0 ± 10,9	51,6 ± 13,1
3	4n	49,1 ± 2,4	61,8 ± 9,6
4	4n	50,4 ± 5,1	60,2 ± 9,7
5	4n	50,8 ± 3,2	60,4 ± 8,4
6	6n	85,9 ± 9,9	106,6 ± 21,8
7	6n	84,0 ± 13,2	100,2 ± 23,4
8	6n	71,4 ± 11,5	88,4 ± 18,3
9	6n	74,0 ± 12,7	72,6 ± 13,0
10	6n	86,6 ± 11,1	87,0 ± 12,1

Graf č. 20: Grafické znázornění nárůstu objemu dle sumy voxelů ( $\mu\text{m}^3$ ) u *Acipenser ruthenus*.



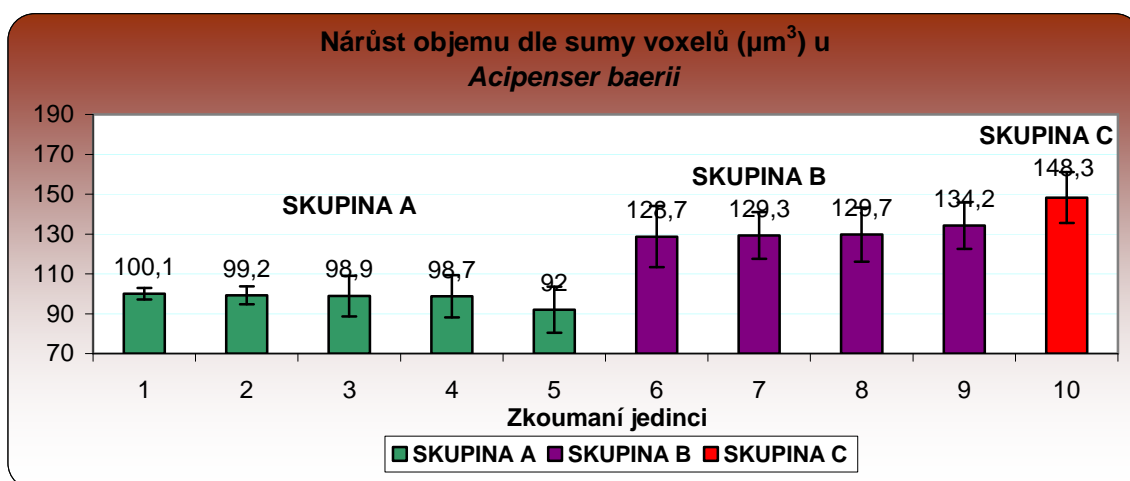
Graf č. 21: Grafické znázornění nárůstu objemu vypočteného dle rozměrů os ( $\mu\text{m}^3$ ) u *Acipenser ruthenus*.



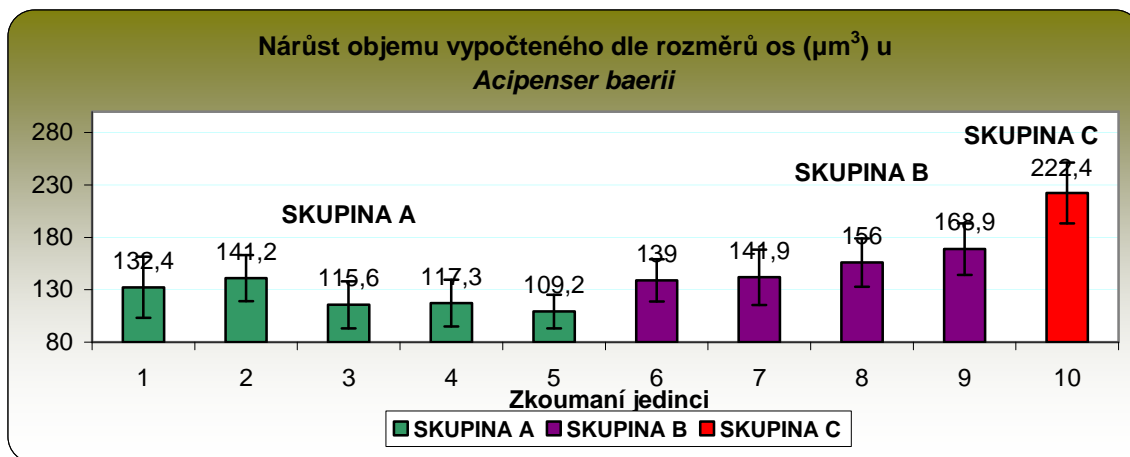
Tab. č. 47: Výsledky měření metodou konfokální mikroskopie u *Acipenser baerii*.

<i>Acipenser baerii</i>			
Jedinec	Úroveň ploidie	Objem dle sumy voxelů ( $\mu\text{m}^3$ )	Objem vypočtený podle rozměrů os ( $\mu\text{m}^3$ )
1	8n	100,1 ± 2,9	132,4 ± 29,2
2	8n	99,2 ± 4,5	141,2 ± 22,0
3	8n	98,9 ± 10,2	115,6 ± 22,5
4	8n	98,7 ± 10,6	117,3 ± 22,2
5	8n	92,0 ± 11,5	109,2 ± 16,1
6	10n	128,7 ± 15,4	139,0 ± 20,1
7	10n	129,3 ± 11,7	141,9 ± 26,5
8	10n	129,7 ± 13,6	156,0 ± 23,1
9	10n	134,2 ± 11,7	168,9 ± 24,6
10	12n	148,3 ± 12,8	222,4 ± 29,0

Graf č. 22: Grafické znázornění nárůstu objemu dle sumy voxelů ( $\mu\text{m}^3$ ) u *Acipenser baerii*.



Graf č. 23: Grafické znázornění nárůstu objemu vypočteného dle rozměrů os ( $\mu\text{m}^3$ ) u *Acipenser baerii*.



## 5. Diskuse

Jeseteři jsou nejstarší dnes žijící skupinou paprskoploutvých ryb, jsou žijícími zkamenělinami, rybami, které doslova „zapomněly vymřít“. Evolučně patří k primitivním druhům. Evoluce genomu je u jeseterovitých ryb odlišná již kvůli třetí totální duplikaci genomu ( $3R$  hypotéza), která proběhla až po jejich oddělení od linie obratlovců (Froschauer a kol., 2006). Chromozómy u těchto ryb tak nemají obdobu u ostatních paprskoploutvých. Jejich karyotypy jsou složeny z menšího počtu makrochromozómů a velkého počtu mikrochromozómů postupně klesající velikosti. Počty chromozómů pak svědčí o velké úloze polyploidizačních událostí při formování genomu jeseterovitých ryb.

Pozorování a stanovení velikosti genomu, úrovně ploidie, či karyotypu bylo však možné až ve druhé polovině minulého století, a to díky technickému pokroku ve vědě. Za tuto dobu, po kterou je velikost genomu a polyploidie u jeseterů pozorována, byly již stanoveny hodnoty u většiny nadřádu *Chondrostei*.

V praktické části této diplomové práce bylo však pozorováno a stanovováno pouze těchto pět čistých druhů: 1) *Acipenser ruthenus*, 2) *Acipenser baerii*, 3) *Acipenser gueldenstaedtii*, 4) *Acipenser stellatus*, 5) *Huso huso*.

Dále byl v praktické části stanoven obsah DNA u těchto cíleně vytvořených hybridů: 1) *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (12n), 2) *Acipenser baerii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n), 3) *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (10n), 4) *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n).

Oproti stanovením úrovně ploidie, která jsou celosvětově uznávána dle Fontana (1994) a Birstein et al. (1993), tak velikost genomu (obsah DNA) jeseterovitých ryb je popsána dalšími autory.

Porovnání publikovaných hodnot obsahu DNA u čistých druhů jeseterů, jež byli v této diplomové práci pozorováni, od dalších autorů (Kafiani et al, 1958;. Blacklidge a Bidwell, 1993; Birstein et al, 1993;. Vasil'ev, 1999; Zhou et al., 2011) jsou uvedeny v tabulce č. 48.

Všichni zmiňovaní autoři používají pro stanovení obsahu DNA metodu průtokové cytometrie. Autoři se ovšem liší různými přístupy v principech průtokové cytometrie. Dochází k měření různých typů buněk nebo k použití různého fluorescenčního barviva.



Například Kafiani et al. (1958) analyzoval spermie obarveny propidium jodidem (PI), zatímco většina ostatních autorů (Blacklidge a Bidwell, 1993; Birstein et al, 1993) pracovali s PI analyzovány červených krvinek (erytrocytů). Oproti tomu Zhou et al. (2011) používal také červené krvinky, avšak obarveny barvivem DAPI.

Při bližším porovnání hodnot obsahu DNA uvedených v tabulce č. 48, je jasné, že údaje získané od různých autorů se ne vždy zcela shodují. Zřejmě to lze vysvětlit rozdílným principem barviv PI a DAPI (Jones a Kniss, 1987, Vinogradov 1994).

Proto je nutné pro přesná měření a možnost porovnání s ostatními autory použít oba typy barvení, nebo alespoň porovnat stejný typ buněk, jež byly obarveny stejným barvivem (Gregory, osobní sdělení, 2011).

Ovšem žádný z autorů zabývajících se obsahem DNA u druhů jeseterů, jež byly pozorovány v této diplomové práci, zatím metodu FIA nepoužil. A však výsledky získané metodou FIA byly velmi dobře shodné s hodnotami, jež stanovili a publikovali ostatní autoři (viz tabulka č. 48). Jedinou výjimkou byly hodnoty dle Zhou et al. (2011). Dalším důvodem rozdílných hodnot obsahu DNA může být rozdílné zpracování červených krvinek. Většina autorů využívá čerstvé červené krvinky pro své analýzy, zatímco Birstein et al. (1993) používal červené krvinky fixované. Obsah DNA, jež byl naměřen v této diplomové práci, vykazovala vysokou podobnost s hodnotami, které uvádí Birstein et al. (1993).

Minimální odchylky mezi údaji jsou prakticky zanedbatelné a mohly být způsobeny například nevhodnými vlastnostmi chemikálií při přípravě vzorku, stavem pozorovaného preparátu atd.

Kvalita preparátu při stanovení velikosti genomu by se dala považovat za nejdůležitější vlastnost celého měření. I když vybereme správnou metodu stanovení, všechny potřebné přístroje budou naprosto dokonale nastaveny a personál, který měření provede, bude danou metodu ovládat, tak v případě nekvalitního preparátu není možné danou velikost genomu správně určit. Preparát musí být kvalitně odebrán, nanesen, velmi pečlivě nabarven a poté dobře uchováván. Neměl by být vystavován přímému slunci, extrémním teplotám, jiným chemikáliím, hrubým povrchům (poškrábání) aj (Hardie and Gregory, 2002). Správné a šetrné nakládání se vzorkem je naprosto nevyhnutelné, jelikož jednotlivý vzorek je velmi často to jediné, co ze zkoumaného jedince máme a můžeme pozorovat.

Další problematikou je velmi nízké množství výsledků o velikosti genomu (obsahu DNA) u jeseterů s ploidní úrovní vyšší než  $8n$  evoluční (funkční  $4n$ ), které byly

zatím publikovány. Ve skutečnosti pouze Blacklidge a Bidwell (1993) a Hardie a Hebert (2003, 2004) publikovali údaje o obsahu DNA pro evoluční dodecaploidy u *A. brevirostrum*. Dále Drauch Schreier et al. (2011) nedávno zveřejnili údaje o obsahu DNA pro evoluční dekaploidy, (funkční pentaploidy) u *A. transmontanus*. Ovšem k nízkému počtu těchto unikátních vzorků, jež byly doposud zaznamenány, je velmi obtížné vyvozovat jakékoliv závěry. V této diplomové práci byl naměřen dokonce jedinec s ploidní úrovní 14n u druhu *Acipenser gueldenstaedtii*. Jedinec o takovéto úrovni ploidie byl naměřen a publikován prakticky poprvé a proto jeho porovnání s dalšími autory není možné.

Výsledky praktické části této diplomové práce přinesly nový pohled na obsah DNA u jeseterovitých ryb. A to jak u evolučních hexaploidů, tak u evolučních dekaploidů (*Acipenser gueldenstaedtii*, *Acipenser baerii*) i u evolučních dodekaploidů. Naměřené výsledky v kapitole 4.2 a 4.3 jasně dokazují závislost velikosti jádra na obsahu DNA u jeseterovitých ryb. Při nárůstu velikosti genomu totiž dochází k růstu velikosti jádra erytrocytu, které se však nezvětšuje lineárně, a proto o vyšších úrovních ploidie tuto nelze dostatečně přesně stanovit pouze měřením plochy jádra. Velikost buněk je pak dále kompenzována jejich úbytkem. Tento jev se podařilo prokázat již u triploidních *Tinca tinca* (Svobodová et al., 1998), u pstruha obecného (*Salmo trutta*) (Benfey and Sutterlin 1984), u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Yamamoto and Iida, 1994) aj. U jeseterovitých ryb se však stále jedná o minimálně popsany jev.

Dalším jevem, který se podařilo v praktické části této diplomové práce popsat je exponenciální nárůst množství DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$ . Za důvod tohoto exponenciálního nárůstu je možné považovat kondenzaci DNA (Bytyutskyy et al., 2012).

Díky pozorování většího množství druhů se také podařilo prokázat, že stejná velikost plochy jádra se v rámci dalších druhů nemusí vyznačovat stejným množstvím obsahované DNA. Velmi dobrým příkladem je porovnání druhů *Acipenser baerii* a *Acipenser gueldenstaedtii*, kdy při naměření velikosti plochy jádra  $32,72 \pm 0,491$  a  $32,10 \pm 1,020 \mu\text{m}^2$  bylo množství DNA  $8,36 \pm 0,031$  a  $7,74 \pm 0,035 \text{ pgDNA.jádro}^{-1}$ . Ke shodným závěrům došel i Bytyutskyy et al. (2012).

Nestandardní jevy byly nalezeny i u dvou druhů pozorovaných hybridů (*Acipenser gueldenstaedtii* (8n) s *Acipenser baerii* (12n) a *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) s *Acipenser baerii* (10n)), kdy se podařilo stanovit jedince s takovou velikostí genomu, která neodpovídala ostatním jedincům daného druhu a dokonce svojí hodnotou převyšovala i velikost genomu obou rodičů. Tento jev se dá vysvětlit nestandardním

dělením sad chromozómů při vzniku haploidních pohlavních produktů, k němuž může dojít u jedinců s vysokou úrovní ploidie či polyploidie (Linhart, 2006).

Tato diplomová práce poskytla celkově lepší náhled na velikost genomu u vytvořených hybridů. Získaná data ovšem není možné porovnat s ostatními autory, jelikož takto uměle vytvořené hybridy, u kterých je dokonale doložen poměr rodičů i s jejich velikostí genomu, byl v této práci publikován prakticky poprvé. Vytvoření takto unikátních vzorků bylo možné jen díky dlouholetým pokusům a bohaté zásobě genetického materiálu na líně FROV JU ve Vodňanech.

Denzitometrická analýza absolutního objemu DNA v jádrech krvinek obarvených Feulgenovou reakcí není jako metoda pro stanovení velikosti genomu u jeseterů příliš používána. Většina genetických laboratoří, jež se zabývá velikostí genomu u ryb, využívá některou z instrumentálních metod, zejména průtokové cytometrie. Ovšem denzitometrická analýza absolutního objemu DNA je pro danou problematiku velmi vhodná a již Hardie a Gregory (2002) navrhoval vyšší využívání této metody v příslušných genetických laboratořích. Metoda je snadná a velmi spolehlivá. A narozdíl od průtokové cytometrie je tato metoda schopna vyjádřit vztah mezi obsahem DNA a velikostí jader erytrocytů. Tento vztah je totiž možné považovat za velmi významný rys, který by mohl pomáhat např. molekulární či evoluční biologii v dokonalejší charakteristice genomu.

Další metodou, která byla v této diplomové práci použita, byla konfokální mikroskopie. Ta však nesloužila k vlastnímu stanovení velikosti genomu jeseterů. Její měření přinesla nové údaje o velikosti a 3-D konformaci jader erytrocytů.

Z výsledků v kapitole 4.3 a přílohy č. 8 je jasně patrné, že jádra erytrocytů oktaploidních jedinců mají tvar protáhlých elipsoidů. Ovšem u jedinců, kteří mají vyšší úroveň než oktaploidní začíná převažovat tvar elipsoidů zploštělých.

Dále výsledky konfokální mikroskopie potvrdily, že s rostoucí úrovní ploidie je možné vidět exponenciální růst objemu jádra erytrocytu a zvýšení obsahu DNA vlivem jeho kondenzace. Je tedy možné, že kondenzace DNA má také vliv na změny ve tvaru jader erytrocytů. Důvodů, které ovlivňují tvar jader erytrocytů, však může být mnohem více. Nelze opomenout ani stáří erytrocytu či dobu, po kterou zůstává v krevním řečišti.

Metoda konfokální mikroskopie je však v této problematice nová. Není tedy možné ji porovnat s ostatními autory. A tvrzení konkrétních závěrů se dá považovat za předčasné. Je tedy velmi nutné v těchto měření i nadále pokračovat a dané závěry potvrdit, vyvrátit či stanovit zcela nové.

Konfokální mikroskopie je metoda náročná na technické vybavení, čas i zkušenosti personálu. Neměří vlastní velikost genomu, ale je velmi vhodná pro stanovení velikosti objemu jádra a jeho tvaru díky výslednému formátu ve 3-D, který například metoda denzitometrické analýzy absolutního objemu DNA poskytnout nemůže. Dalšími výbornými vlastnostmi této metody je, že jsme schopni pozorovat živé objekty, při fixaci vzorku pomocí preparátu CyGEL nedochází k jeho deformaci a jsme schopni pozorovat změny živých buněk v čase. Což například metoda skenovací elektronové mikroskopie neumožňuje.

Tab. č. 48: Porovnání naměřených hodnot velikosti genomu a hodnot publikovaných.

Druh	Úroveň ploidie		Plocha jádra ( $\mu\text{m}^2$ )	Obsah DNA (pgDNA.jádro <sup>-1</sup> )	Obsah DNA PUBLIKOVANÝ (pgDNA.jádro <sup>-1</sup> )	Autor
	Evoluční	Funkční				
<i>Tinca tinca</i>	2n	2n	11,84 ± 0,870	2,04 ± 0,028	2,1 1,94	Wolf et al. (1969) Hafez et al. (1978)
<i>Tinca tinca</i>	3n	3n	15,69 ± 2,220	3,10 ± 0,027	-	-
<i>A. ruthenus</i>	4n	2n	19,21 ± 0,813	3,72 ± 0,013	3,74 4,1	Birstein et al. (1993) Zhou et al. (2001)
<i>A. stellatus</i>	4n	2n	19,68 ± 0,435	4,65 ± 0,032	3,74 4,4 4,7	Birstein et al. (1993) Zhou et al. (2011) Kafiani et al. (1958)
<i>Huso huso</i>	4n	2n	20,02 ± 0,394	3,66 ± 0,022	2,44 3,60	Birstein et al. (1993) Fontana (1976)
<i>A. ruthenus</i>	6n	3n	23,84 ± 0,511	5,90 ± 0,023	5,62	Fontana et al. (1994)
<i>A. baerii</i>	6n	3n	23,91 ± 0,582	6,26 ± 0,027	6,30	Bytyutsky et al. (2012)
<i>A. gueldenstaedtii</i>	8n	4n	30,84 ± 0,746	7,84 ± 0,018	7,86 – 7,87 8,4	Birstein et al. (1993) Zhou et al. (2011)
<i>A. baerii</i>	8n	4n	32,72 ± 0,491	8,36 ± 0,031	8,29 – 8,31 8	Birstein et al. (1993) Zhou et al. (2011)
<i>A. baerii</i>	10n	5n	34,98 ± 1,022	10,16 ± 0,041	8,99	Bytyutsky et al. (2012)
<i>A. baerii</i>	12n	6n	37,32 ± 1,103	12,38 ± 0,029	12,69	Bytyutsky et al. (2012)
<i>A. gueldenstaedtii</i>	12n	6n	38,10 ± 1,330	11,84 ± 0,043	12,00	Bytyutsky et al. (2012)

## 6. Závěr

Diplomovou prací „Stanovení velikosti genomu jeseterů 2-D a 3-D obrazovou cytometrií“ jsem chtěl popsat nejen problematiku nestandardní velikosti genomu u čistých druhů jeseterů a jejich hybridů, jež je i pro mnohé profesionální rybáře velkou neznámou, ale také samotnou problematiku vlastního stanovení velikosti genomu. Práce by po prostudování měla podat veškeré základní informace o velikosti genomu jeseterovitých ryb a o metodách, které je možno k tomuto pozorování využít.

V teoretické části práce bylo popsáno a shrnuto že:

1. Jeseterovité ryby patří mezi jedny z nejvíce ohrožených druhů dnešní doby.
2. Jeseterovité ryby evolučně patří k primitivním druhům.
3. Budoucnost jeseterů je v řízené akvakultuře.
4. Jeseteři mají vynikající schopnost mezidruhového a mezirodového křížení.
5. Je nezbytně nutný genetický dohled na umělé chovy.
6. Je velmi důležité vhodně zvolit metodu pro pozorování dané problematiky.
7. Na velikosti genomu jsou přímo závislé jisté fyziologické změny.

V praktické části práce se podařilo prokázat že:

1. Nestandardní velikost genomu není u jeseterů neobvyklým jevem.
2. Vlivem velikosti genomu dochází ke změnám v prostorové konformaci jader erytrocytů.
3. Existuje závislost velikosti buněčného jádra na obsahu DNA.
4. Při nárůstu velikosti genomu dochází ke kondenzaci DNA v jádře erytrocytu.
5. Existuje možnost nepravidelnosti ve velikosti genomu u hybridního potomstva.
6. Volba správné metody pro pozorování dané problematiky je klíčová.

Závěrem této diplomové práce bych rád znovu zdůraznil nutnost pozorování a dalšího studování velikosti genomu jeseterovitých ryb. Budoucnost jeseterů dnes již není ve volných vodách, ale je pevně nasměrována do řízených chovů. Je tedy nesmírně důležité pokračovat ve sledování velikosti genomu u všech generačních jedinců daných chovů. Zdokonalovat metody pozorování nebo dokonce objevovat nové, aby bylo možné lépe poznat tento ohrožený druh a zachovat ho v jeho původní čisté formě.

## 7. Seznam literatury

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J., 2004: Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, volume 11, issue 7, pp. 36-42.
- Arefjev, V.A. 1983. Polykaryogram analysis of ship, *Acipenser nudiventris* Lovetsky (Acipenseridae, Chondrostei). *Voprosy Ichthyology* 23: 209-216. (In Russian).
- Baruš, V., Oliva, O. 1995. *Mihulovci a ryby*. Academia Praha, 623 s.
- Benfey, T.J., Sutterlin A. M., Thompson, R. J., 1984. Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, 980-984.
- Berg, L.S. 1962. *Freshwater Fishes of the USSR and Adjacent Countries, Vol. 1.* (Translated by Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem) Oldbourne Press, London.
- Berg, L.S., 1911. *Ryby. Marsipobranchii i Pisces. Fauna Rossii i sopredel'nych stran.* Izd. Zool. Muz. AN Petrograd, díl 1, 337 pp.; vyp. 2, 1914. *Ostariophysi* (neukonč.), pp. 337-704; pokrač. V r. 1933, pp. 705-846 (Fauna SSSR i sopredel'nych stran, Izd. AN SSSR, Leningrad).
- Berg, L.S., 1940. *Sistema ryboobraznych i ryb, nyne živuščich i iskopajemych.* *Trudy Zool. Inst. AN SSSR*, 5 (2): 87-517.
- Birstein, V.J. and V.P. Vasil' ev. 1987. Tetraploid-octoploid relationships and karyological evolution in the order Acipenseriformes (Pisces): karyotypes, nucleoli, and nucleolus organizer regions in four acipenserid species. *Genetica* 73: 3-12.
- Birstein, V.J., A.I. Poletaev, and B.F. Goncharov. 1993. The DNA content in eurasian sturgeon species determined by flow cytometry. *Cytometry* 14: 337-383.
- Blacklidge, K.H. and Bidwell, C.A., 1993: Three ploidy levels indicated by genome quantification in Acipenseriformes of north America. *J. Heredity* 84, 427-430.
- Bolte, S. & Cordelieres F.P., 2009: A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy, *Journal of Microscopy*, Volume 224, Issue 3: 213-232.
- Burtzev, J.A., J. Nikoljukin and E.V. Serebryakova. 1976. Karyology of the Acipenseridae family in relation to the hybridization and taxonomy problems. *Acta biologica Jugoslavica. Serija E. Ichthyologia* 8: 27-34.

- Bytyutskyy, D., Srp, J. and Flajšhans, M., 2012: Use of Feulgen image analysis densitometry to study the effect of genome size on nuclear size in polyploid sturgeons. *Bulletin FROV JU Vodňany* 4: 2 – 16.
- Claxton N. S., Fellers T.J., Davidson M. W. 2009 *Laser Scanning Confocal Microscopy*.
- Collares-Pereira, M.J. and L. Moreira da Costa (1999). Intraspecific and interspecific genome size variation in Iberian Cyprinidae and the problem of diploidy and polyploidy, with review of genome sizes within the family. *Folia Zoologica* 48: 61-76. - Species listed | Record id: [93]
- Conte, F.S., et al., 1988. Hatchery manual for the white sturgeon, Div. of Agricul. and Natural Resources University of California, USA, 1-103.
- Dettlaff, T. A.; Ginsburg, A. S.; Schmalhausen, O. I., 1993: *Sturgeon Fishes. Developmental Biology and Aquaculture*. Springer-Verlag, Berlin.
- Doroshov, S.I., Binkowski, F.P., 1985. Epilogue: a perspective on sturgeon culture In: Binkowski, F.P., Doroshov, S.I. (eds.). *North American Sturgeons*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- Drauch Schreier A, Gille DA, Mahardja B, May B (2011) Neutral markers confirm the octoploid origin and reveal spontaneous polyploidy in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *J Appl Ichthyol* 27(Suppl 2):24–33
- Fellers, T., Davidson, W., National High Magnetic Field Laboratory, 1800 East Paul Dirac Dr., The Florida State University, Tallahassee, Florida, 32310.
- Feulgen, R, Rossenbeck, H. 1994. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleisäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe Seyler Z Physiol Chem* 135:203-248.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Gela, D., Piačková, V., 2004: The first results on relationships among amphimictic diploid, diploid gynogenic and triploid tench, *Tinca tinca* L. under communal testing. *Aquaculture International* 12 (1), 103-118.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Šlechta, V., Linhart, O., 2008. *Genetika a šlechtění ryb (Fish Genetics and Breeding)*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 232 pp.



- Fontana, F. (1976). Nuclear DNA content and cytometry of erythrocytes of *Huso huso* L., *Acipenser sturio* L. and *Acipenser naccarii* Bonaparte. *Caryologia* 29: 127-137. - Species listed | Record id: [132]
- Fontana, F. and G. Colombo. 1974. The chromosomes of Italian sturgeons. *Experientia* 30: 739-742.
- Fontana, F., 1994. Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in *Acipenseriformes* (Pisces). *Genome* 37: 888-892.
- Fontana, F., et al., 2008. Comparison of karyotypes of *Acipenser oxyrinchus* and *Acipenser sturio* by chromosome banding and fluorescent in situ hybridization. *Genetica*, 132: 281-286.
- Fontana, F., R.M. Bruch, F.P. Binkowski, M. Lanfredi, M. Chicca, N. Beltrami and L. Congiu. 2004. Karyotype characterization of the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens* (Rafinesque, 1817) by chromosome banding and fluorescent in situ hybridization. *Genome* 47: 742-746.
- Fontana, F., Tagliavini, J., Congiu, C. (2001) Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives. *Genetica* 111, 359 – 373.
- Fontana, F., Zane, L., Pepe, A., 2007. Congiu L. Polyploidy in *Acipenseriformes*: cytogenetic and molecular approaches. In *Fish Cytogenetics*. Eds: E. Pisano, C. Ozouf-Costaz, F. Foresti & B.G. Kapoor. Science Publisher, Inc. New Hampshire, USA. pp. 385-403.
- Froschauer, et al. (2006). "Helitron Transposons on the Sex Chromosomes of the Platyfish *Xiphophorus maculatus* and Their Evolution in Animal Genomes." *Zebrafish* 3(1): 39-52.
- 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., Linhart, O., Flajšhans, M., Rodina, M., 2003. Egg incubation time and hatching success in tench (*Tinca tinca* L.) related to the procedure of egg stickiness elimination. *Journal of Appl. Ichtyol.*, 19: 132-133.
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). *Edice metodik VÚRH JU, Vodňany*, 78, 1-24.

- Gerzeli, G., C. Casati, and A. Meneghetti Gennaro (1956). I volumi nucleari e cellulari in relazione al tenore di acido desossiribonucleico in eritrociti di alcune specie di Vertebrati. *Rivista di Istochimica Normale e Patologica* 2: 149-155. - Species listed | Record id: [152]
- Goodpasture, C. and S.E. Bloom. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- Hafez, R., R. Labat, and R. Quillier (1978). Teneurs nucléaires en A.D.N. et relations évolutives dans la famille des cyprinides (Teleostei). *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse* 114: 71-84. - Species listed | Record id: [199]
- Hanel, L., Lusk, S., 2005: Ryby a mihule České republiky. Rozšíření a ochrana. Český svaz ochránců přírody, Vlašim, 447 pp.
- Hardie, D.C. & Hebert, P.D.N., 2003: The nucleotypic effects of cellular DNA content in cartilaginous and ray-finned fishes. *Genome* 46: 683–706.
- Hinegardner, R. (1976a). The cellular DNA content of sharks, rays and some other fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 55B: 367-370. - Species listed Record id: [219]
- Hochleitner, M., 2004. Störe – Biologie und Aquakultur. AquaTech Publications, p. 9-222.
- Jones, K.H., Kniss, D.A., 1987: Propidium iodide as a nuclear counterstain for immunofluorescence studies on cells in culture. *J Histochem Cytochem* 35(1):123-5.
- Kafiani, K.A., R.I. Tatarskaia, and S.M. Kanopkaite (1958). Phosphorus metabolism in the embryonic development of sturgeon. *Biochemistry* 23: 389-399. - Species listed Record id: [242]
- 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.
- Kazanskii, B.N., Feklov, Yu.A., Podushka, S.B., Molodsov, A.N., 1978. Express method for determining the degree of gonad maturity in sturgeon spawners. *Rybnoe Khozajstvo* 2: 24-27.
- Kim, T. H. et al. 2005. Direct isolation and identification of promoters in the sturgeon genome. *Genome Res.* 15, 830 – 839 .
- Kolman, R., 2008. Restytucja jesiotra baltyckiego. Přednáška VÚRH JU Vodňany.

- Landfredi, M., L. Congiu, M.A. Garrido-Ramos, R. De La Herrán, M. Leis, M. Chicca, R. Rossi, J. Tagliavini, C. Ruiz Rejón, M. Ruiz Rejón, and F. Fontana. 2001. Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. *Chromosome Research* 9:47-52.
- Linhart, O., Gela, D., Rodina, M., 2000. Umělá reprodukce veslonosa amerického (Polyodon spathula). *Edice metodik*, 64: 1-15.
- Linhart, O., Rodina, M., Flajšhans, M., Mavrodiev, N., Nebesarova, J., Gela, D. & Kocour, M., 2006: Studies on sperm of diploid and triploid tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture International* 14, 9 -25.
- Linnaeus, C., 1758. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Tomus I, Ed. Decima, reformata. L. Salvii, Holmiae, 823 pp.; Ed. XII., 532 pp.
- Ludwig, A., N.M. Belfiore, C. Pittra, V. Svirsky and I. Jenneckens. 2001. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* 158: 1203-15.
- Maddison, W.P. and D.R. Maddison. 1992. *Macclade. Analysis of Phylogeny and Character Evolution*. Version 3. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Mauro, M.L. and G. Micheli (1979). DNA reassociation kinetics in diploid and phylogenetically tetraploid cyprinidae. *Journal of Experimental Zoology* 208: 407-416. - Species listed | Record id: [319]
- May, B., C.C. Krueger and H.L. Kincaid. 1997. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 1542-1547.
- McQuown, E., G.A.E. Gall and B. May. 2002. Characterization and inheritance of six microsatellite loci in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Transactions of the American Fisheries Society* 131: 299-307.
- Mirsky, A.E. and H. Riss. 1951. The DNA content of animal cells and its evolutionary significance. *Journal of General Physiology* 34: 451-462.
- Ohno, S., J. Muramoto, C. Stenius, L. Christian and W. A. Kitterell. 1969. Microchromosomes in holocephalian, chondrosteian and holosteian fishes. *Chromosoma* 226: 35-40.

- Olson, M.S. 1997. Bayesian procedures for discriminating among hypotheses with discrete distributions: Inheritance in the tetraploid *Astilbe biternata*. *Genetics* 147: 1933-1942.
- Otto, S.P., 2007. The Evolutionary Consequences of Polyploidy *Cell*, 131 (3), pp. 452-462.
- Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G. (Eds.) *Fish Cytogenetics*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, 518 s.
- Pravda, D, Svobodová, Z. 2003. Haematology of fishes. In: Doubek J, Bouda J, Doubek M, Fűrll M, Knotková Z, Pejřilová S et al., editors. *Veterinary Haematology* Brno: Noviko 2003; p.381–397 (in Czech).
- Pšenička, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010. Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (*Acipenser*), function of acrosome and prevention of polyspermy. *Animal Reproduction Science* 117 (2010) 147–154.
- Pyatskowitz, J.D., C. C. Krueger, H.L. Kincaid and B. May. 2001. Inheritance of microsatellite loci in the polyploid lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Genome* 44: 185-191.
- Rodina M., Flajshans M., Mavrodiev N., Nebesarova J., Gela D., Kocour M., 2006. Studies on sperm of diploid and triploid tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture International* 14, 9 -25.
- Rodina, M., Flajšhans, M., 2008. Využití RFID technologie ke značení ryb v ČR. *Bull. VÚRH Vodňany* 44 (4): 100-108 (in Czech).
- Rochard, E., P. Williot, G. Gastelnaud and M. Lepage. 1991. Elements de systematique et de biologie des populations sauvages d' estrungeons. In: *Acipenser*, P. Williot (ed.). Cemagref Publications Bordeaux, pp. 475-507.
- Rzemieniecki, A., Domagala, J., Glogowski, J., Ciereszko, A., Trzebiatowski, R., Kouřil, J. Hamáčková, J., Babiak, I., 2004. Induced spermination in 3-year-old sterlet, *Acipenser ruthenus*. *Aquaculture Research*, 35: 144-151.
- Serebryakova, E. V. 1972. Some data on the chromosome complexes in *Acipenseridae*. In: *Genetics, Selection, and Hybridization of Fish*, B. I. Cherfas (ed.). Translated from Russian by Israel Program for Scientific Translations. Keter Press Binding: Wiener Bindery Ltd., Jerusalem, pp. 98-106.
- Speer, L., 2000. Roe to ruin: The Decline of Sturgeon in the Caspian Sea and the Road to Recovery. [www.seaweb.org](http://www.seaweb.org), 1-4.

- 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 vet. Brno* 67, 243-248.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J. 1986. Jednotné metody hematologického vyšetření ryb. *Edice metodik VÚRH JU, Vodňany*, 64, 1-20.
- Štěch, L., Linhart, O., Shelton, W.L., Mirns, S.D., 1999. Minimally invasive surgical removal of ovulated eggs from paddlefish (*Polyodon spathula*). *Aquaculture International*, 7: 129-133.
- 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.
- Tiersch, T.R., R.W. Chandler, S.S. Wachtel and S. Elias. 1989. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry* 10: 706-710.
- Vasil' ev, V.P., L.I. Sokolov and E.V. Sebryakova. 1980. Karyotype of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt from the Lena River and some questions of the acipenserid karyotypic evolution. *Voprosy Ichthyology* 23: 814-822.
- Vendrely, R. and C. Vendrely (1950). Sur la teneur absolue en acide désoxyribonucléique du noyau cellulaire chez quelques espèces d'oiseaux et de poissons. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 230: 788-790. - Species listed | Record id: [524]
- Vendrely, R. and C. Vendrely (1952b). Sur la teneur individuelle en arginine des spermatozoïdes comparée à la teneur individuelle en arginine des noyaux d'érythrocytes chez quelques espèces de poissons. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 235: 444-446. - Species listed | Record id: [527]
- Vendrely, R. and C. Vendrely (1953). Arginine an deoxyribonucleic acid content of erythrocyte nuclei and sperms of some species of fishes. *Nature* 172: 30-31. - Species listed | Record id: [525]
- Vialli, M. (1957a). Volume et contenu en ADN par noyau. *Experimental Cell Research Suppl.* 4: 284-293. - Species listed | Record id: [534]
- Vinogradov, A.E., 1994: Measurements by flow cytometry of genomic AT/GC ratio and genome size. *Cytometry* 16:34 – 40.

- Wei, Q., W., Yang, D.G., Kynard, B., Chen, X.H., Liu, J.Y., Zhu, Y.Y., 2006. Reproduction of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) since the completion of Gezhouba dam: timing and locations (J). *Journal of Applied Ichthyology*, 21: 4-6.
- Williot, P., Rouault, T., Pelard, M., Mercier, D., 2001. Preliminary successful results in larval rearing of the endangered western European sturgeon, *Acipenser sturio*, allowing the initiation of restocking and further conservative rearing program. 4th International symposium on sturgeon, Extended Abstracts, AQ61, Oshkosh, Wisconsin, USA.
- Wolf, U., H. Ritter, N.B. Atkin, and S. Ohno (1969). Polyploidization in the fish family Cyprinidae, Order Cypriniformes. I. DNA-content and chromosome sets in various species of Cyprinidae.. *Humangenetik* 7: 240-244. - Species listed Record id: [562]
- Yamamoto, A. & T. Iida. 1994. Hematological characteristics of triploid rainbow trout. *Fish Pathol.* 29: 239–243.
- Yu, X. 1987. On the karyosystematics of cyprinid fishes and a summary of fish chromosome studies in China. *Genetica* 72: 225-236.
- Zane, L., L. Bargelloni and T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zhang, S., Y. Yang, H. Deng, Q. Wei and Q. Wu. 1999. Genome size, ploidy characters of several species of sturgeons and paddlefishes with comment on cellular evolution of *Acipenseriformes*. *Acta Zoologica Sinica* 45: 200-206.
- Zhang, S., Y. Zhang, X. Zheng, Y. Chen, H. Deng, D. Wang, Q. Wie, Y. Zhang, L. Nie and Q. Wu. 2000. Molecular phylogenetic systematics of twelve species of *Acipenseriformes* based on mtDNA ND4L-ND4 gene sequence analysis. *Science in China (C)* 43: 129-137.
- Zhou, H., Fujimoto, T., Adachis, S., Yamaha, E. and Arai, K., 2011: Genome size variation estimated by flow cytometry in *Acipenser mikadoi*, *Huso dauricus* in relation to other species of *Acipenseriformes*. *J. Appl. Ichthyol.* 27: 484–491.

## 8. Seznam tabulek, obrázků, grafů a příloh

### 1. Tabulky:

Tab. č. 1: Věk při dosažení pohlavní dospělosti (Hochleitner, 2004).

Tab. č. 2: Průměrná velikost jiker a počet zralých vytřených jiker v 1g (Hochleitner, 2004).

Tab. č. 3: Stanovený karyotyp u vybraných druhů jeseterovitých ryb.

Tab. č. 4: Počet chromozómů a obsah DNA u *Acipenseriformes* skupiny A (evolučně tetraploidní, 4n).

Tab. č. 5: Počet chromozómů a obsahu DNA u *Acipenseriformes* skupiny B (evolučně oktaploidní, 8n).

Tab. č. 6: Testování a izolování mikrosatelitních lokusů dle May et al. (1997) (**M**) a Ludwig et al. (2001) (**L**). **p** = Polymorfní; **m** = Monomorfní; **n** = Neaktivní.

Tab. č. 7: Popsané velikosti genomu u *Tinca tinca*. BCA = Biochemická analýza, FD = Feulgen denzitometrická analýza, NS = Nespecifikováno, FCM = Průtoková cytometrie.

Tab. č. 8: Stanovená velikost genomu jeseterů pomocí metody FCM.

Tab. č. 9: Stanovení velikosti genomu jeseterů pomocí metody FIA.

Tab. č. 10: Stanovení velikosti genomu jeseterů pomocí metody FD.

Tab. č. 11: Stanovení velikosti genomu jeseterů pomocí metody BFA.

Tab. č. 12: Studování jedinci čistého druhu *Acipenser ruthenus*.

Tab. č. 13: Studování jedinci čistého druhu *Acipenser baerii*.

Tab. č. 14: Studování jedinci čistého druhu *Acipenser gueldenstaedtii*.

Tab. č. 15: Studování jedinci čistého druhu *Acipenser stellatus*.

Tab. č. 16: Studování jedinci čistého druhu *Huso huso*.

Tab. č. 17: Studování hybridů *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (12n).

Tab. č. 18: Studování hybridů *Acipenser baerii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n).

Tab. č. 19: Studování hybridů *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (10n).

Tab. č. 20: Studování hybridů *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n).

Tab. č. 21: Alkoholové lázně.

Tab. č. 22: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser ruthenus*.

Tab. č. 23: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser baerii*.

Tab. č. 24: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser gueldenstaedtii*.

Tab. č. 25: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser stellatus*.

- Tab. č. 26: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Huso huso*.
- Tab. č. 27: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u hybrida *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (12n)
- Tab. č. 28: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser baerii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n).
- Tab. č. 29: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (10n).
- Tab. č. 30: Výsledky měření obsahu DNA (pgDNA.jádro<sup>-1</sup>) u *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n).
- Tab. č. 31: Hodnoty pro standardní velikost genomu u *Acipenser ruthenus*.
- Tab. č. 32: Hodnoty pro nestandardní velikosti genomu u *Acipenser ruthenus*.
- Tab. č. 33: Hodnoty pro standardní velikost genomu u *Acipenser baerii*.
- Tab. č. 34: Hodnoty pro nestandardní velikosti genomu u *Acipenser baerii*.
- Tab. č. 35: Hodnoty pro standardní velikost genomu u *Acipenser gueldenstaedtii*.
- Tab. č. 36: Hodnoty pro nestandardní velikosti genomu u *Acipenser gueldenstaedtii*.
- Tab. č. 37: Hodnoty pro standardní velikost genomu u *A. gueldenstaedtii* (8n) x *A. baerii* (12n).
- Tab. č. 38: Hodnoty pro nestandardní velikosti genomu u *A. gueldenstaedtii* (8n) x *A. baerii* (12n).
- Tab. č. 39: Hodnoty pro standardní velikost genomu u *A. gueldenstaedtii* (8n) x *A. baerii* (10n).
- Tab. č. 40: Hodnoty pro nestandardní velikosti genomu u *A. gueldenstaedtii* (8n) x *A. baerii* (10n).
- Tab. č. 41: Prokázání vztahu mezi nárůstem velikosti jádra a zvyšujícím se obsahem DNA.
- Tab. č. 42: Nárůst množství DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  vlivem nárůstu obsahu DNA u *Acipenser ruthenus*.
- Tab. č. 43: Nárůst množství DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  vlivem nárůstu obsahu DNA u *Acipenser baerii*.
- Tab. č. 44: Nárůst množství DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  vlivem nárůstu obsahu DNA u *Acipenser gueldenstaedtii*.
- Tab. č. 45: Nárůst množství DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  u různých druhů jeseterů.
- Tab. č. 46: Výsledky měření metodou konfokální mikroskopie u *Acipenser ruthenus*.
- Tab. č. 47: Výsledky měření metodou konfokální mikroskopie u *Acipenser baerii*.
- Tab. č. 48: Porovnání naměřených hodnot velikosti genomu a hodnot publikovaných.



## 2. Obrázky

Obr. č. 1: Uložení a stavba orgánů u jeseterů.

Obr. č. 2: Ploutevní značky.

Obr. č. 3: Injekční aplikátor.

Obr. č. 4: Značky VIE.

Obr. č. 5: Biopsie gonád sondou u jesetera malého.

Obr. č. 6: Určení zralosti ovocytu dle Conte (1988).

Obr. č. 7: Hybrid tzv. bestěr s dlouhým rypcem, velkými ústy a zbarvením *Huso huso*.

Obr. č. 8: Vybavení na odběr vzorků.

Obr. č. 9: Odebírání krve z ocasní cévy.

## 3. Grafy

Graf č. 1: Měření obsahu DNA ( $\text{pgDNA.jádro}^{-1}$ ) u *Acipenser ruthenus*. Skupiny A a B se mezi sebou statisticky významně liší ( $P < 0,05$ ).

Graf č. 2: Měření obsahu DNA ( $\text{pgDNA.jádro}^{-1}$ ) u *Acipenser baerii*. Skupiny A, B, C a D se mezi sebou statisticky významně liší ( $P < 0,05$ ).

Graf č. 3: Měření obsahu DNA ( $\text{pgDNA.jádro}^{-1}$ ) u *Acipenser gueldenstaedtii*. Skupiny A, B, C, D a E se mezi sebou statisticky významně liší ( $P < 0,05$ ).

Graf č. 4: Měření obsahu DNA ( $\text{pgDNA.jádro}^{-1}$ ) u *Acipenser stellatus*, kde byla nalezena jen skupina A.

Graf č. 5: Měření obsahu DNA ( $\text{pgDNA.jádro}^{-1}$ ) u *Huso huso*, kde byla nalezena pouze skupina A.

Graf č. 6: Měření obsahu DNA ( $\text{pgDNA.jádro}^{-1}$ ) u *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (12n). Skupiny A, B a C se mezi sebou statisticky významně liší ( $P < 0,05$ ).

Graf č. 7: Měření obsahu DNA ( $\text{pgDNA.jádro}^{-1}$ ) u *Acipenser baerii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n), kde byla nalezena pouze skupina A.

Graf č. 8: Měření obsahu DNA ( $\text{pgDNA.jádro}^{-1}$ ) u *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (10n). Skupiny A a B se mezi sebou statisticky významně liší ( $P < 0,05$ ).

Graf č. 9: Měření obsahu DNA ( $\text{pgDNA.jádro}^{-1}$ ) u *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser ruthenus* (4n), kde byla nalezena pouze skupina A.

Graf č. 10: Změna velikosti plochy jader ( $\mu\text{m}^2$ ) u *Acipenser ruthenus*.

Graf č. 11: Změna velikosti plochy jader ( $\mu\text{m}^2$ ) u *Acipenser baerii*.

Graf č. 12: Změna velikosti plochy jader ( $\mu\text{m}^2$ ) u *Acipenser gueldenstaedtii*.

Graf č. 13: Změna velikosti plochy jader ( $\mu\text{m}^2$ ) u *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (12n).

Graf č. 14: Změna velikosti plochy jader ( $\mu\text{m}^2$ ) u *Acipenser gueldenstaedtii* (8n) x *Acipenser baerii* (10n).

Graf č. 15: Grafické znázornění vztahu mezi nárůstem velikosti jádra a zvyšujícím se obsahem DNA.

Graf č. 16: Grafické znázornění nárůstu DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  vlivem nárůstu obsahu DNA u *Acipenser ruthenus*.

Graf č. 17: Grafické znázornění nárůstu DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  vlivem nárůstu obsahu DNA u *Acipenser baerii*.

Graf č. 18: Grafické znázornění nárůstu DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  vlivem nárůstu obsahu DNA u *Acipenser gueldenstaedtii*.

Graf. č. 19: Grafické znázornění nárůstu množství DNA v pg. na  $\mu\text{m}^2$  u různých druhů jeseterů.

Graf č. 20: Grafické znázornění nárůstu objemu dle sumy voxelů ( $\mu\text{m}^3$ ) u *Acipenser ruthenus*.

Graf č. 21: Grafické znázornění nárůstu objemu vypočteného dle rozměrů os ( $\mu\text{m}^3$ ) u *Acipenser ruthenus*.

Graf č. 22: Grafické znázornění nárůstu objemu dle sumy voxelů ( $\mu\text{m}^3$ ) u *Acipenser baerii*.

Graf č. 23: Grafické znázornění nárůstu objemu vypočteného dle rozměrů os ( $\mu\text{m}^3$ ) u *Acipenser baerii*.

#### 4. Přílohy

Příloha č. 1: Genetické pracoviště na FROV JU ve Vodňanech.

Příloha č. 2: Průtokový cytometr Partec CCA.

Příloha č. 3: Příprava vzorků pro metodu průtokové cytometrie.

Příloha č. 4: Kvalitně připravený standard.

Příloha č. 5: Nevhodný standard.

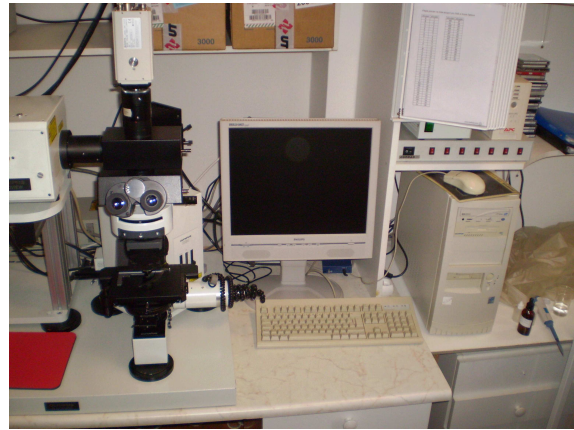
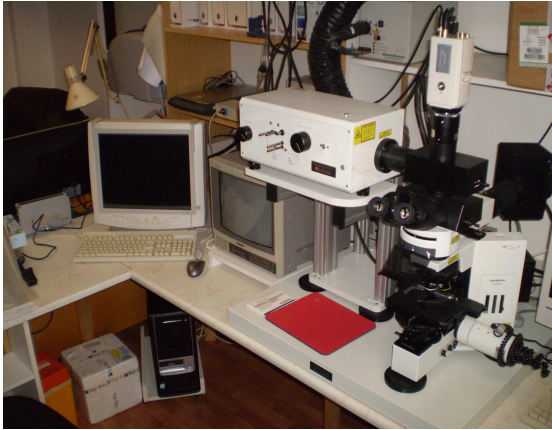
Příloha č. 6: Kvalitně připravení vzorek *Acipenser baerii* 6n.

Příloha č. 7: Nekvalitně nabarvený vzorek *Acipenser baerii* 8n.

Příloha č. 8: Výsledné znázornění velikosti jader erytrocytů ve formátu 3-D u různých úrovní ploidie.

## 9. Přílohy

Příloha č.1: Genetické pracoviště na FROV JU ve Vodňanech.



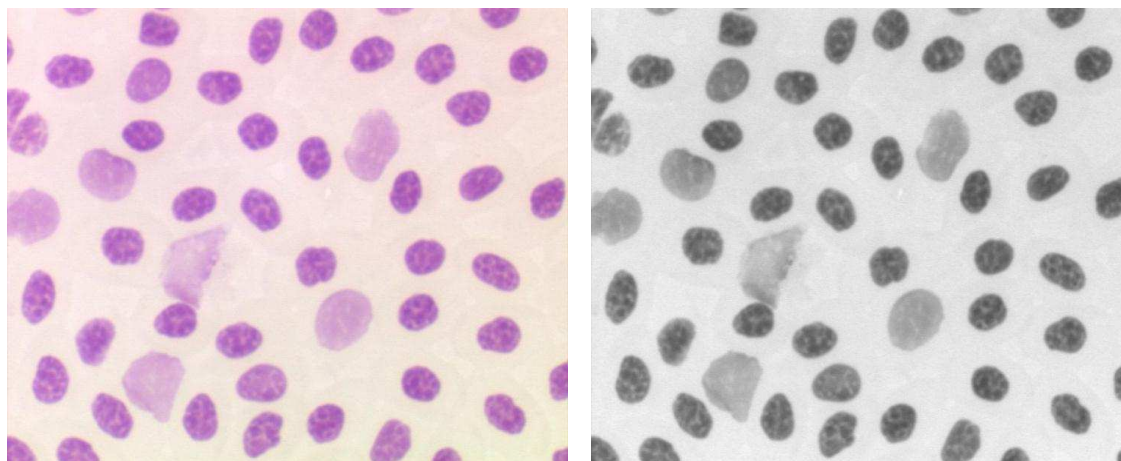
Příloha č. 2: Průtokový cytometr Partec CCA.



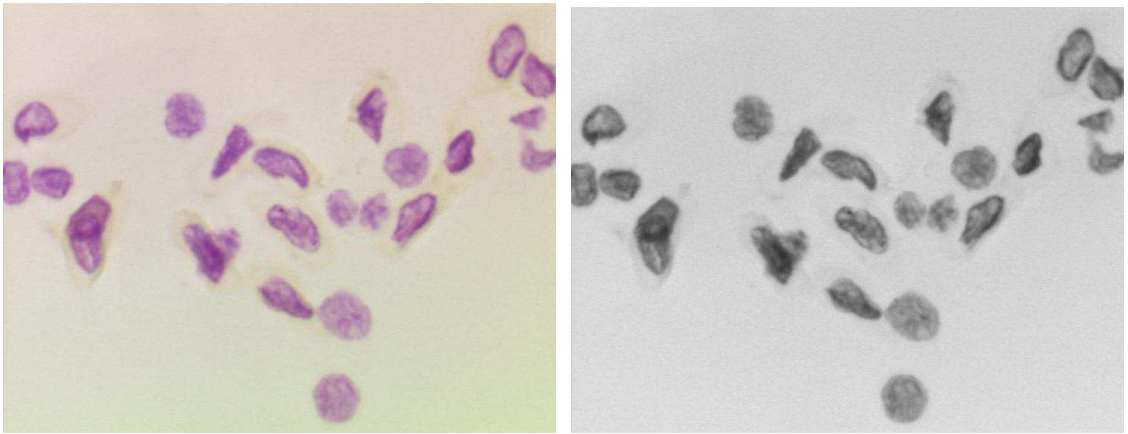
Příloha č. 3: Příprava vzorků pro metodu průtokové cytometrie.



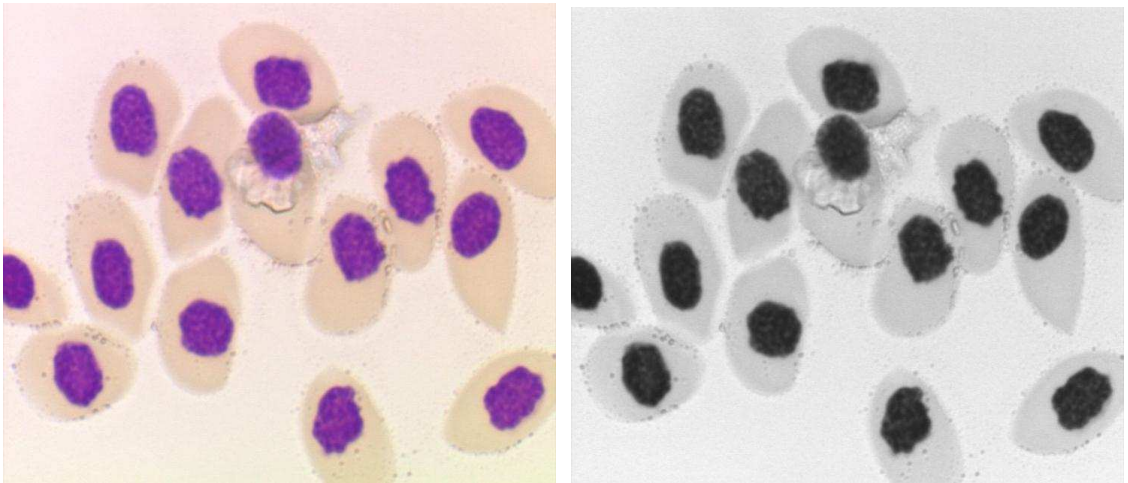
Příloha č. 4: Kvalitně připravený standard.



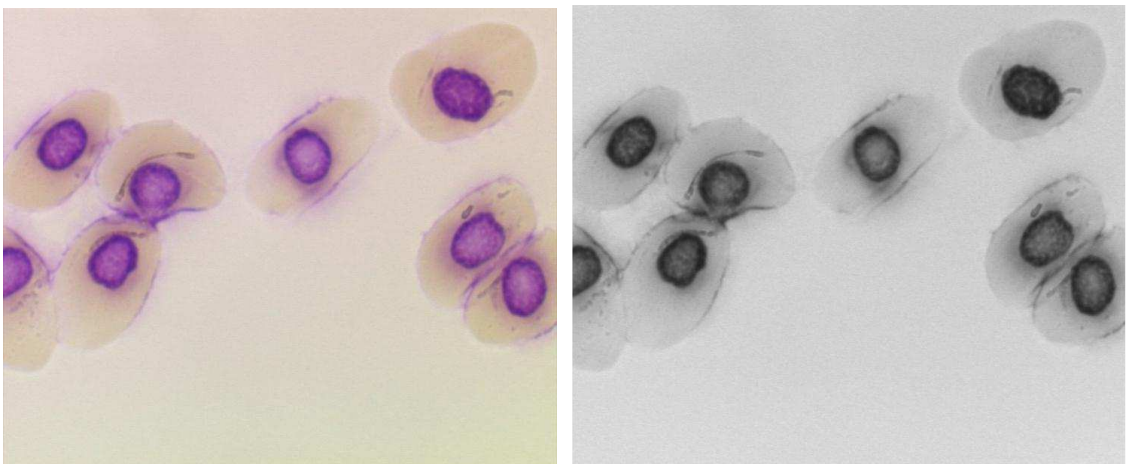
Příloha č. 5: Nevhodný standard.



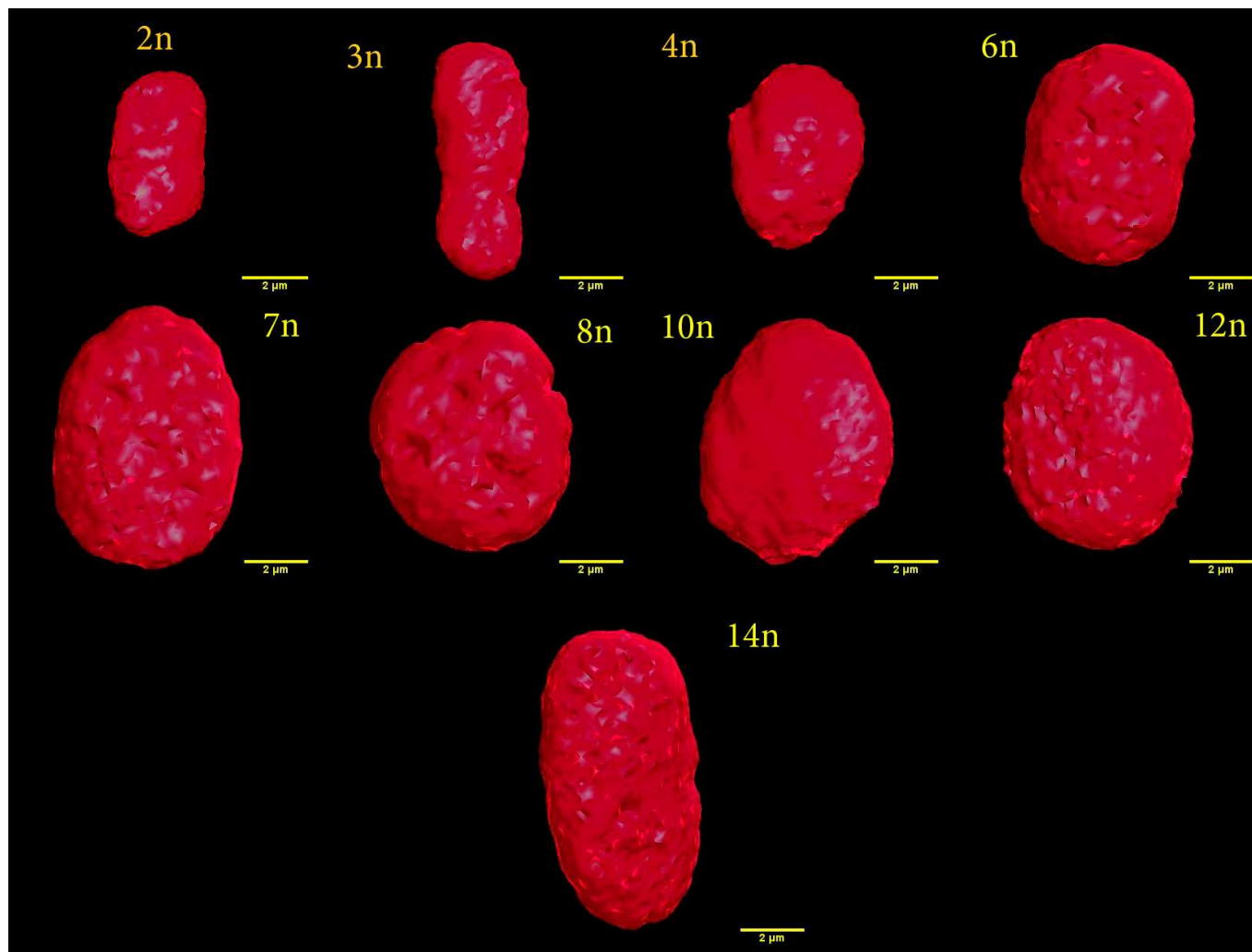
Příloha č. 6: Kvalitně připravení vzorek *Acipenser baerii* 6n.



Příloha č. 7: Nekvalitně nabarvený vzorek *Acipenser baerii* 8n.



Příloha č. 8: Výsledné znázornění velikosti jader erytrocytů ve formátu 3-D u různých úrovní ploidie.



Bytyutskyy (2012)

## 10. Abstrakt

### Stanovení velikosti genomu jeseterů 2-D a 3-D obrazovou cytometrií

Velikost genomu evolučně polyploidních, neopolyploidních a hybridních jeseterů se vyznačuje velmi vysokou variabilitou.

Cílem této práce bylo stanovit 1) velikost genomu evolučně polyploidních a neopolyploidních jeseterů metodami počítačové analýzy 2-D a 3-D obrazu specificky barvených buněčných jader s 2) hodnocením vzorků populací pro účely cytogenetických analýz a 3) vzájemným hodnocením metod stanovení velikosti genomu a následným zaprotokolováním získaných údajů, ať za účelem dalšího zkoumání či například vyřazení z generačního hejna.

Pokus probíhal na FROV JU ve Vodňanech, na všech zde dostupných jeseterovitých rybách i na vzorcích odebraných z jeseterovitých farem v zahraničí, se kterými FROV JU spolupracuje. Jednalo se o *Acipenser ruthenus*, *A. baerii*, *A. stellatus*, *A. gueldenstaedtii* a *Huso huso*. Dále pokus probíhal na záměrně vytvořených hybridech *A. gueldenstaedtii* (8n) x *A. baerii* (12n), *A. baerii* (8n) x *A. ruthenus* (4n), *A. gueldenstaedtii* (8n) x *A. baerii* (10n) a *A. gueldenstaedtii* (8n) x *A. ruthenus* (4n). Metodami měření byly zvoleny obrazová cytometrie a konfokální mikroskopie, při nichž je využíváno digitalizace obrazu s následnou počítačovou analýzou. Velikost genomu byla měřena ze specificky barvených jader červených krvinek (erytrocytů) vybraných jedinců.

Výsledkem práce bylo naměření velikosti genomu studovaných jedinců různými metodami pozorování, zaprotokolování získaných údajů, popsání změn prostorové konformace buněčného jádra se zvětšující se plochostí a odvozením dopadů na jejich fyziologii a vzájemné porovnání metod pozorování mezi sebou.

Závěrem práce je nutnost dalších stanovení velikosti genomu u jeseterů, výběr nejvhodnějších metod pozorování velikosti genomu, tak aby bylo možné efektivnější vyhledávání či zkoumání nestandardních (polyploidních) jedinců a následné zkoumání jejich fyziologických odlišností.

Klíčová slova: *Acipenseridae*, obrazová cytometrie, konfokální mikroskopie, erytrocyty, cytogenetika

## 11. Abstract

### **The genome size determination in sturgeons using 2-D and 3-D image cytometry**

The genome size of evolutionary polyploid, neopolyploid and hybrid sturgeons is well known for its high variability.

Aim of this study was 1) to specify the genome size of polyploid and neopolyploid sturgeons using an analysis of 2-D and 3-D images of specifically stained cells nuclei, 2) to evaluate the samples of populations for cytogenetic analysis needs and thereafter, 3) to compare both methods and record the data either for next research or for negative selection from the broodstock.

This test has been done at the laboratory of molecular, cellular and quantitative genetics, Faculty of Fisheries and Protection of Waters USB in Vodňany using all sturgeons spawners and using samples obtained from some foreign fish farms which cooperated with the faculty. The samples included *A. ruthenus*, *A. baerii*, *A. stellatus*, *A. gueldenstaedtii* and *Huso huso*, intentionally bred hybrids of *A. gueldenstaedtii* (8n) x *A. baerii* (12n), *A. baerii* (8n) x *A. ruthenus* (4n), *A. gueldenstaedtii* (8n) x *A. baerii* (10n) a *A. gueldenstaedtii* (8n) x *A. ruthenus* (4n). As methods have been chosen image cytometry and confocal microscopy which use image digitalization and subsequently its computer analysis. The genome size was measured from the size of specifically stained nuclei of erythrocytes in specimens sampled.

Result of this study was measuring the genome size in sturgeons under study using different methods, recording the obtained data, description of spatial conformation changes of cell nucleus with increasing ploidy level and deduction of impact to their physiology and comparing the methods between each other.

The conclusion is necessity of another sturgeons genome size determination, choice of the best methods for more effective search and research of non-standard individuals and subsequently an examination of their physiological differences.

Keywords: *Acipenseridae*, image cytometry, confocal microscopy, erythrocytes, cytogenetics