

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Fakulta rybnářství a ochrany vod  
Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

# **INDUKCE GYNOGENEZE U JESETERA MALÉHO**

**Autor:** Martin Hubálek

**Vedoucí bakalářské práce:** prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr. rer. agr.

**Konzultanti bakalářské práce:** Doi Thi Vuong, MSc., Ievgen Lebeda,  
MSc., Ph.D.

**Studijní program a obor:** Zootechnika, Rybnářství

**Forma studia:** Prezenční

**Ročník:** 3.

České Budějovice, 2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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.

V Českých Budějovicích 30. dubna 2016

.....

Martin Hubálek

## **Poděkování**

Chtěl bych vyjádřit svůj velký dík vedoucímu bakalářské práce prof. Ing. Martinovi Flajšhansovi, Dr. rer. agr., který se se mnou nikdy neváhal podělit o své letité zkušenosti, vždy jednal ochotně a vstřícně, nikdy nemeškal s odpovědí na mé všetečné otázky a díky jehož odbornému vedení mohla tato práce vůbec vzniknout. Stejně tak bych z konzultantů rád poděkoval zvláště MSc. Ievgenovi Lebedovi, Ph.D. za velkou pomoc s experimentální částí práce, zasvěcení do tajů indukce gynogeneze a ověřování její úspěšnosti, za poskytnutí mnoha materiálů a v neposlední řadě za to, že mi byl ochoten poradit, ať už jsem ho svými dotazy zahlcoval v sebenevhodnější chvíli.

Výsledky byly získány za finanční podpory MŠMT projektu CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) a projektu CENAKVA II (LO1205 v rámci programu VA2 Biologie, ochrana a akvakultura jeseterů) a grantu GAČR 14-02940S.

Martin Hubálek

# Zadání

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
Fakulta rybářství a ochrany vod  
Akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martin HUBÁLEK**  
Osobní číslo: **V13B044P**  
Studijní program: **B4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Rybářství**  
Název tématu: **Indukce gynogeneze u jesetera malého**  
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský 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 nastudovat teoretické základy indukce gynogeneze u ryb obecně, blíže se zaměřit na publikované výsledky indukce gynogeneze u jeseterovitých ryb a osvojit si základy reprodukce a odchovu jeseterovitých ryb užívané v Evropě. Student získá přehled o způsobech inaktivace DNA k využití v metodách vyvolávajících uniparentální dědičnost, o zásadách užívaných k obnovení ploidní úrovně na běžnou úroveň somatické ploidie daného druhu, o indukci a využití indukované gynogeneze a o metodách ověření gynogeneze. Rovněž získá přehled o metodách umělé reprodukce a odchovu larev, stejně jako o odběrech a hodnocení vzorků populací pro účely cytogenetických analýz. V experimentální části bude student pracovat s populací jesetera malého v Genetickém rybářském centru FROV JU ve Vodňanech v rámci projektu NPU č. LO1205, program VA2 Biologie, ochrana a akvakultura jeseterů, účastní se umělých výtěrů, experimentální indukce mitotické gynogeneze, bude sledovat oplozenost a líhivost gynogenů, stanoví jejich ploidní úroveň a pokusí se stanovit úroveň jejich homozygotnosti. Ze získaných dat se pokusí odvodit vhodnost použité metody pro akvakulturu.

Rozsah grafických prací: podle potřeby

Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Bohlen Šlechtová, V., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2013. Genetika a šlechtění ryb, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV JU, 305 s.

Gela, D., Kahanec, M., Buřič, M., 2012. Technologie chovu jeseterů, Edice Metodik, FROV JU, Vodňany č. 140, 49 s.

Kašpar, V., Rodina, M., Flajšhans, M., 2014. Hromadná indukce gynogeneze a androgeneze u kapra obecného (*Cyprinus carpio*), Edice metodik FROV JU č. 145, 29 s.

a další podle požadavků vedoucího a konzultanta

Vedoucí bakalářské práce: prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr. rer. Agr.

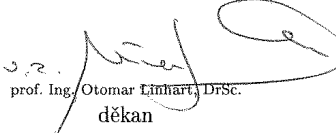
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant bakalářské práce: MSc. Thi Vuong Doi

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: 12. prosince 2014

Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2016

  
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD  
Zátiší 728/II  
389 25 Vodňany (2)

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

dne

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2. Literární přehled.....</b>	<b>10</b>
2.1. Gynogeneze .....	10
2.2. Přirozená gynogeneneze .....	11
2.3. Obecné základy indukované gynogeneze .....	12
2.3.1. Inaktivace otcovské DNA .....	12
2.3.2. Fertilizace.....	14
2.3.3. Rediploidizace .....	15
2.3.4. Metody ověření gynogenetické indukce .....	20
2.4. Indukovaná gynogeneze jeseterovitých ryb .....	21
2.4.1. Inaktivace paternálního genomu.....	22
2.4.2. Obnovení ploidní úrovně .....	24
2.4.3. Význam gynogeneze jeseterů.....	26
<b>3. Materiál a metodika .....</b>	<b>29</b>
3.1. Odběr gamet.....	29
3.2. Indukce gynogeneze .....	30
3.3. Stanovení úspěšnosti gynogeneze .....	32
3.3.1. Ověření ploidní úrovně .....	32
3.3.2. Stanovení rodičovství .....	33
3.4. Stanovení heterozygotnosti.....	35
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>36</b>
4.1. Neurulace a líhivost ve skupině č. 1 .....	36
4.1.1. Počet embryí ve stádiu neuruly a jejich procentuální podíl .....	36
4.1.2. Dosažená líhivost a množství vylíhnutého plůdku .....	36
4.1.3. Statistické zhodnocení neurulace.....	38
4.1.4. Statistické zhodnocení líhivosti .....	38
4.2. Neurulace a líhivost ve skupině č. 2 .....	39
4.2.1. Počet embryí ve stádiu neuruly a jejich procentuální podíl .....	39
4.2.2. Dosažená líhivost a množství vylíhnutého plůdku .....	39
4.3. Ploidní analýza skupiny č. 1 .....	40
4.4. Ploidní analýza skupiny č. 2 .....	41
4.5. Stanovení rodičovství ve skupině č. 2 .....	42
4.6. Stanovení heterozygotnosti ve skupině č. 2 .....	43
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>45</b>

5.1. Generační ryby a kvalita pohlavních produktů .....	45
5.2. Inaktivace paternálního genomu .....	46
5.3. Obnovení ploidní úrovně .....	47
5.4. Úspěšnost indukce mitotické gynogeneze .....	49
5.5. Heterozygotnost gynogenů .....	51
<b>6. Závěr .....</b>	<b>52</b>
<b>7. Seznam použité literatury .....</b>	<b>53</b>
<b>8. Seznam obrázků, grafů a příloh .....</b>	<b>61</b>
<b>9. Přílohy .....</b>	<b>63</b>
<b>10. Abstrakt.....</b>	<b>68</b>
<b>11. Abstract .....</b>	<b>69</b>

# 1. Úvod

Jeseteři (*Acipenseriformes*) jsou nejstaršími paprskoploutvými rybami, které se dochovaly do dnešní doby. Navzdory faktu, že se vyvinuli podle odhadů před více než 200 miliony let, doznali do dnešních dní pouze minimum morfologických změn, což jim vysloužilo přezdívku „žijící fosílie“. Pro svůj mimořádně ceněný černý kaviár se však jeseteři stali obětí exploatace, podporované lukrativním trhem s tímto luxusním produktem. Spolu se ztrátou původních habitatů a znečištěním prostředí znamenalo drancování pro populace této unikátní a reliktní linie chrupavčitých ryb tlak, kterému nebyly schopny čelit do nekonečna. V současné době se tak jeseteři ocitli na pokraji vyhynutí. Jako jedna z možností jejich ochrany se jeví snížení nákladů na akvakulturní produkci kaviáru, které by zároveň mohlo znamenat snížení jeho ceny a možnost lépe konkurovat produktu, pro jehož získávání jsou decimovány zbytky volně žijících populací. Především z tohoto důvodu začaly být na zástupcích řádu *Acipenseriformes* testovány a optimalizovány metody uniparentální dědičnosti v čele s indukovanou gynogenezí.

Gynogeneze je genomovou manipulací, při jejímž uplatnění dědí nově vzniklé potomstvo pouze mateřskou DNA. Dochází při ní k aktivaci vývoje oocyty spermií, aniž by byl do zárodku inkorporován její paternální genom. Indukovaná gynogeneze sestává ze tří hlavních kroků, kterými jsou umělá inaktivace paternálního genomu spermií, oplození oocyty geneticky inaktivovaným spermatem a šokování oocyty z důvodu obnovení normální ploidní úrovně, tzv. rediploidizace. Mechanismus působení šoku se liší v závislosti na době jeho aplikace po fertilizaci. Pokud šok způsobí rediploidizaci v důsledku retence druhého pólóvého tělíška, gynogenezí nazýváme meiotickou. Druhý případ spočívá v obnovení ploidní úrovně zadržením prvního mitotického dělení a je nazýván mitotickou gynogenezí.

Gynogeneticky získané potomstvo dědí od matky rovněž faktory determinující jeho pohlaví. Pohlavní determinační mechanismus jeseterovitých ryb není kvůli absenci cytogeneticky demonstrovatelných chromosomů zatím stále znám, předpokládá se však přítomnost samičí heterogamety (typ Abraxas). Gynogenezí tohoto typu vzniká potomstvo s majoritním podílem samic, které mají v chovu větší význam z hlediska možné produkce kaviáru a nového potomstva. Možnost predikce vyššího zastoupení samic činí odchov ekonomicky výhodnějším oproti konvenční akvakultuře, při níž musí být obě pohlaví odchovávána po několik let společně až do doby, kdy je bude možno diagnosticky rozlišit. Analýza gynogeneticky získaného potomstva jeseterů může navíc pomoci poodhalit řadu



nevysvětlených záhad v oblasti genetiky těchto prehistorických tvorů a to například i dosud neznámý pohlavní determinační mechanismus.

K historicky první gynogenetické indukci jeseterů došlo roku 1962. Ačkoliv se první snahy o získání gynogenetického potomstva minuly účinkem, řada vědců byla motivována zmíněnými přednostmi gynogenetické indukce jeseterů k dalším pokusům o její optimalizaci. Díky tomu byl úspěšný postup gynogenetické indukce popsán již u několika druhů jeseterů. Všechny dosud publikované studie se však zabývaly výhradně meiotickou gynogenezí, kterou je obecně snazší indukovat.

Teoretická část této práce si klade za cíl seznámit čtenáře s obecnými základy gynogenetické indukce u ryb obecně a blíže se zaměřit na publikované výsledky gynogeneze jeseterovitých ryb. Přináší obecné shrnutí metod, které se při indukci používají, a podrobně popisuje její jednotlivé kroky. Dále sumarizuje metody, které byly dosud využity při indukované gynogenezí jeseterů, a popisuje význam jejího praktického uplatnění. Experimentální část práce přináší výsledky jedné z vůbec prvních indukcí mitotické gynogeneze jeseterů, pro kterou byl jako modelový druh zvolen jeseter malý *Acipenser ruthenus*. Odůvodňuje použitý postup a pokouší se usuzovat na jeho správnost. Shrnutím úspěšnosti jednotlivých kroků přináší jedny z prvních informací o optimalizaci protokolu mitotické gynogeneze jesetera malého.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Gynogeneze

Gynogeneze je jednou z metod genomových (chromozomových) manipulací, jež vede k dědičnosti výhradně mateřského genetického materiálu (Lebeda, 2014). Spolu s genetickou informací dědí nově vznikající potomstvo od matky rovněž faktory určující jeho pohlaví. Tyto faktory umožňují rozhodnout o determinaci pohlaví u konkrétních druhů (Recoubratsky a kol., 2003).

Příkladem může být živočišný druh s chromozomovým určením pohlaví typu *Drosophila* (XX, XY; samice nese vždy pohlavní chromozóm X, samec nese pohlavní chromozóm X nebo Y), u něhož povede gynogeneze k produkci celosamičí populace potomstva XX (Lebeda a kol., 2015). Někteří vědci přesto popisují přítomnost samčího pohlaví v gynogenetickém plůdku potomstva s XX/XY determinacním mechanismem, přikládají ji však přítomnosti jiných, minoritních pohlaví spoluurčujících genů, které mohou ležet na nepohlavních chromozómech (Komen a Thorgaard, 2007), nebo působení environmentálních faktorů, například teploty (Felip a kol., 2001).

Gynogenetické potomstvo je produkováno stejným mechanismem, jako je tomu v případě spontánní partenogeneze, oocyt však musí být stimulován k vývoji přítomností spermie (Lebeda, 2014). DNA spermie (samčího prvojádra) se ale neúčastní tvorby genomu embrya (Flajšhans a kol., 2013), samčí chromozomy nejsou do vývoje zárodku zapojeny (Recoubratsky a kol., 2003).

Neúčast genetické informace spermie při tvorbě nového genomu může být zapříčiněna přirozeně se vyskytujícím mechanismem (tzv. přirozená gynogeneze, vyskytující se u některých rybích druhů, například živorodky trpasličí, *Poecilia formosa* (Schlupp a kol., 1991), karase stříbřitého *Carassius gibelio*, několika zástupců čeledi *Cobitidae* a dalších (Lebedeva a kol., 2005)), nebo umělou, záměrnou destrukcí otcovského genomu (Linhart a kol., 1995). Druhá ze zmiňovaných možností se nazývá indukovaná gynogeneze. Indukovanou gynogenezi lze využít k reprodukci rybích druhů s vnějším oplozením (Komen a Thorgaard, 2007).

Proces gynogeneze spadá pod tzv. uniparentální dědičnost. Tento termín označuje pochody, při kterých je potomstvu předávána výhradně genetická informace jednoho z rodičů. Další možností uniparentální dědičnosti je androgenese, v jejímž případě dochází pouze k předání genetické informace otce (Flajšhans a kol., 2013).

Gynogeneze je spolu s triploidií a tetraploidií používána v základním a aplikovaném výzkumu, rybářském managementu a akvakultuře (Esmaily a kol., 2004). Má velký význam pro experimentální studium genetické determinace pohlaví u jeseterů (Fopp–Bayat, 2010), protože u jeseterů nelze rozlišit pohlavní chromozómy a dosud nejsou známy geny nebo skupiny genů, které by bylo možné využít jako mákrk determinace pohlaví. Vysoká míra homozygotnosti potomstva získaného mitotickou gynogenezí může pomoci při různých genetických a šlechtitelských studiích (Lebeda a kol., 2015). Změna poměru samců a samic v produkovaném potomstvu by mohla například u jeseterů významným způsobem ovlivnit produkci kaviáru, jenž je velmi žádaný navzdory úbytku těchto archaických ryb (Fopp–Bayat, 2010). V současné době se navíc gynogeneze využívá pro produkci celosamičích populací například pstruha duhového *Oncorhynchus mykiss* a obecného *Salmo trutta*, kapra obecného *Cyprinus carpio* nebo platýse *Paralichthys olivaceus* (Cal a kol., 2006).

## 2.2. Přirozená gynogeneze

Přirozená (spontánní) gynogeneze je jedním z mechanismů unisexuální reprodukce, jenž je charakteristický pro rozmnožování celosamičích populací ryb a některých populací hybridních diploidně – polyploidních druhových komplexů (Flajšhans a kol., 2013). Tyto rybí populace se třou s blízkými příbuznými druhy a jejich sperma používají pouze k aktivaci vývoje oocytů (Lebeda, 2014).

Hlavní podmínkou přirozené gynogeneze je diploidní oocyt, aby bylo po aktivaci vývoje spermií dosaženo diploidního stavu potomstva. Diploidních oocytů je u rybích druhů se spontánní gynogenezí dosaženo různými mechanismy. Nejběžnější způsob zahrnuje genomovou duplikaci následovanou normálním buněčným dělením, během kterého se sesterské chromozomy převážně párují. Nedochozí k rekombinaci a segregace je potlačena, v důsledku čehož je dědičnost výhradně maternální (Komen a Thorgaard, 2007).

První gynogeneticky se rozmnožující ryba byla objevena roku 1932 a jednalo se o druh živorodka trpasličí, *Poecilia formosa* (Hubbs a Hubbs, 1932). Kromě několika druhů mexických *Poeciliidae* se takto reprodukuje rovněž populace karase stříbřitého, *Carassius gibelio* (Thorgaard, 1983). Horváth a Orbán (1995) uvádí, že u karase dochází při oogenezi k vynechání první fáze meiotického dělení a tudíž k zachování duplikované chromozomové sádky. Samice karase tedy sexuálně parazitují na reprodukci jiných kaprovitých ryb, jež oseměněním aktivují oocyty, následně probíhá druhá fáze meiotického dělení, oddělí se druhé

pólové tělísko a zůstanou triploidní zygoty, z nichž se vyvinou opět triploidní samice (Flajšhans a kol., 2013).

### **2.3. Obecné základy indukované gynogeneze**

Indukovaná gynogeneze je formou unisexuální reprodukce, při které je docíleno aktivace vývoje zárodku pomocí geneticky inaktivovaného spermatu (Esmaily a kol., 2004). Míra úspěšnosti gynogenetické indukce se velmi různí v rámci jednotlivých rybích druhů (Lebeda, 2014). Indukce gynogeneze sestává ze tří hlavních kroků – inaktivace samčí genetické informace, fertilizace a obnovení diploidního stavu (Ihssen a kol., 1990).

#### ***2.3.1. Inaktivace otcovské DNA***

Při gynogenezi je aktivace vývoje zygoty indukována geneticky inaktivovaným spermatem. Sperma je možné inaktivovat ionizujícím (gama nebo rentgenovým) zářením nebo UV zářením (Kašpar a kol., 2014). Užití ultrafialového záření je obecně nejčastěji používanou technikou inaktivace, nicméně účinné jsou i metody využívající jiná ošetření (Esmaily a kol., 2004).

Inaktivované sperma sloužící k dalšímu použití může být jak homologní (sperma je z ryby stejného druhu jako oocyty), tak heterologní (sperma je z jiného, někdy i nepříbuzného druhu) (Pandian a Koteeswaran, 1998). V případě použití heterologního spermatu zcela nepříbuzného druhu vzniká výhradně gynogenetické potomstvo, negynogenetičtí jedinci totiž nejsou životaschopní (Felip a kol., 2001). Pokud je použito sperma homologní, v potomstvu se mohou vyskytovat i negynogenetičtí jedinci, vzniklí normálním oplozením (Morgan a kol., 2006). Pandian a Koteeswaran (1998) uvádějí, že nejvyšších procent přežití dosahují gynogeni, jenž vznikli aktivací oocyty heterologním spermatem, které bylo ošetřeno UV zářením za nepřítomnosti denního nebo umělého světla. To by totiž mohlo způsobit aktivaci procesu zvaného fotoreaktivace (Lebeda a kol., 2015).

Fotoreaktivace je na světle závislý enzymatický mechanismus, jenž opravuje škody v DNA. Spermie držena po DNA inaktivujícím ošetření na viditelném světle opravuje poškozenou DNA a obnovuje svoji fertilizační schopnost (Lebeda, 2014). V důsledku toho může docházet k narušení výsledků gynogeneze, způsobeném posunem optimální dávky záření (Lebeda a kol., 2015). Lebeda a kol. (2015) doporučují osvětlit pracovní plochu pro oplozování a aktivaci červeným světlem, které fotoreaktivaci nezpůsobuje a nenarušuje tudíž indukci gynogeneze.

### **2.3.1.1. UV záření**

Inaktivace paternálního genomu UV zářením je v praxi nejčastěji používanou metodou (Lebeda a kol., 2014b). Je tomu tak, neboť se jedná o metodu levnou a snadno aplikovatelnou (Flajšhans a kol., 2013), která je zároveň lehce dostupná a s minimálním nebezpečím pro obsluhu. Na druhou stranu stochastický charakter UV záření způsobuje, že je obtížnější najít kompromis mezi kompletní inaktivací DNA a destrukcí pohybového aparátu spermie (Lebeda a Flajšhans, 2016). Citlivost pohybového aparátu spermií je obvykle hlavním limitujícím faktorem gynogenetické indukce (Lebeda a kol., 2014a). Penetrační schopnost UV záření není příliš velká, vrstva ozařovaného spermatu by tedy měla být nízká a sperma by mělo být v průběhu ozařování mícháno a chlazeno (Komen a Thorgaard, 2007). Pokud je ozařováno sperma o vysoké optické hustotě, je vhodné jej optimalizovat odpovídajícím poměrem ředění (Kašpar a kol., 2014). Sperma je ředěno buď semennou plazmou, nebo médiem, jehož složení je semenné plazmě podobné, případně má vyšší koncentraci inhibujících iontů a nižší koncentraci iontů aktivujících (Lebeda a kol., 2015). Pro ozařování se obvykle používá UV záření o vlnové délce přibližně 250–260 nm (Lebeda a Flajšhans, 2016). Dávka UV záření je charakterizována jednotkou  $J \times m^{-2}$  a závisí na druhu ryby a cíli gynogenetické indukce. Ozařování je v praxi realizováno pomocí UV zářivek, UV sterilizátorů nebo nejčastěji používanými komerčně dostupnými systémy, kterými jsou různé typy UV crosslinkerů (Lebeda a kol., 2015).

### **2.3.1.2. Ionizující záření**

Gama záření a rentgenové paprsky si zachovávají skvělé penetrační schopnosti i při vyšších vrstvách spermatu (Thorgaard, 1983). Kvůli této vlastnosti, účinně indukující chromozomovou fragmentaci, je ionizující záření vhodné na ozařování větších objemů spermatu (Pandian a Koteeswaran, 1998). Limitním faktorem pro praktickou aplikaci je však dostupnost ionizujícího záření a s ní spojená nutnost přepravy pohlavních produktů k jeho zdroji, nutnost načasování všech kroků od samotného výtěru až po začátek inkubace oocytů, nutnost uvažovat délku přepravy jako faktor ovlivňující úspěšnost gynogeneze, dokonale zvládnutá manipulace s gametami včetně jejich uchování a podobně (Kašpar a kol., 2014). Právě z těchto důvodů je většinou pro inaktivaci paternálního genomu upřednostňováno UV záření (Flajšhans a kol., 2013).

### 2.3.1.3. Jiná ošetření

Jinou metodou inaktivace DNA spermie může být použití chemických prostředků, jež selektivně ničí DNA při zachování minimálního nebezpečí pro pohybový aparát a akrozóm spermie (Lebeda a kol., 2014b). Úspěšně použitými chemikáliemi byly například toluidinová modř, ethylenmočovina a dimethylsulfát (Thorgaard, 1983).

### 2.3.2. Fertilizace

V druhém kroku je aktivován vývoj haploidního oocyty spermií s inaktivovanou genetickou informací – dochází k osemenění a aktivaci gamet (Pandian a Koteeswaran, 1998). Hlavním předpokladem úspěchu je použití gamet nejvyšší možné kvality (Bartley, 1997). Vzhledem k závislosti stupně zralosti gamet na prostředí a chovných podmínkách je nezbytná příprava generačních ryb, jež obvykle spočívá v temperaci vody a hormonální stimulaci. U některých ryb se setkáváme s absencí sekundárních pohlavních znaků (např. jeseteři), v takových případech lze jejich pohlaví určit například biopsií gonád. Biopsie může rovněž pomoci se selekcí samic vhodných pro hormonální stimulaci, jelikož nám podává informaci o stupni vývoje oocytů (Gela a kol., 2008).

Účelem samotné hormonální stimulace je urychlení a synchronizace ovulace a spermiace ryb před následným umělým výtěrem. Nejčastěji se provádí intramuskulární nebo intraperitoneální aplikací suspenze kapří hypofýzy, možné je však použít rovněž synteticky připravené analogy gonadotropního hormonu nebo další přípravky (Velíšek a Pyszko, 2014). Po aplikaci poslední injekce a uplynutí určitého časového úseku, jež byl pro vytíraný rybí druh stanoven na základě dávky hypofýzy nebo hormonálního přípravku a teplotě vody, se přistupuje ke zkoušce umělého výtěru abdominální masáží. U druhů, které se běžně vytírají bez hypofýzace (např. pstruh duhový, tilapie, danio atd.) je na čas výtěru usuzováno např. zkouškou abdominální masáží nebo na základě reprodukčního chování.

Správné načasování výtěru je klíčovým faktorem především pro kvalitu oocytů, které nesmí být nedozrálé nebo naopak přezrálé (Komen a Thorgaard, 2007). Kromě ovariální biopsie jsou dalšími významnými faktory pro selekci vhodných oocytů množství, získané od jedné samice, průměr oocytů a stupeň jejich vývoje (Felip a kol., 2001).

Úspěšnost gynogenetické indukce je výrazně ovlivněna rovněž kvalitou použitého spermatu, které je po umělém výtěru vhodné analyzovat pod světleným mikroskopem s cílem zjištění koncentrace spermií a jejich motility. Během plánování gynogeneze je třeba vzít v potaz obzvlášť proměnlivost motility spermií jednotlivých samců jako odezvu na UV

ozáření (Lebeda a kol., 2015). Lebeda a kol. (2015) proto pro zajištění dostatečného množství kvalitních gamet doporučuje přiměřeně zvýšit počet samců připravovaných k umělému výtěru oproti počtu samic pro klasický umělý výtěr, tj. asi o polovinu.

Postup samotného umělého výtěru záleží na druhu ryby, její velikosti a použití anestezie (Kouřil a kol., 2008). Ovulované oocyty lze od samic získat pomocí různých metod, např. klasickou metodou abdominální masáže, chirurgickým řezem stěnou břišní nebo mikrochirurgickým řezem stěnou vejcovodu (Lebeda a kol., 2015). Odebírají se do suchých polypropylenových misek. Sperma je vhodné odebírat do injekčních stříkaček nebo suchých nádob (např. nádoby na uchovávání mikrobiálních kultur) (Kašpar a kol., 2014). U druhů, jejichž sperma je kontaminováno močí, jež působí předčasnou aktivaci spermií, se sperma odebírá do příslušného imobilizačního roztoku (Rodina a kol., 2004). Po nezbytně dlouhou dobu (gynogenetická indukce by měla začít nedlouho po odběru gamet) lze oocyty uchovávat při teplotě okolního prostředí přikryté navlhčeným hadrem, sperma se uchovává na drceném ledu. V obou případech je nezbytné zamezit vniknutí vody do uchovávaných gamet (Kašpar a kol., 2014).

Posloupnost osemenění a aktivace oocytů inaktivovaným spermatem je zapotřebí přizpůsobit konkrétnímu rybímu druhu (Kašpar a kol., 2014, Lebeda a kol., 2015). Používají se suché metody výtěru, jejichž podstatou je, aby oocyty a sperma nepřišly do styku s vodou, která se k vytřeným a smíchaným pohlavním produktům přidává až při aktivaci spermií v procesu oplozování. Běžně používané suché metody jsou německá, při které se oocyty ponechávají s ovariální plazmou, a ruská, při níž se jí zbavují (Kouřil a kol., 2008). U zástupců chrupavčitých ryb je postup mírně odlišný, nejprve je zapotřebí smícháním s vodou aktivovat sperma a to následně použít k osemenění a oplození (Gela a kol., 2008).

### ***2.3.3. Rediploidizace***

Při indukované gynogenezi je oocyt, který za normálních podmínek nese haploidní počet chromozómů ( $1n$ , tj. poloviční vůči somatickým buňkám matky), oplozen geneticky inaktivovanou spermií, rovněž s haploidním počtem chromozómů, jejíž genetická informace se nepodílí na vývoji zárodku. Vzniklo by tedy haploidní embryo, které by bylo částečně schopné vývoje a vykolení, ale u něhož nedochází k plnohodnotnému vývoji trupu ani orgánových soustav, a proto by po vstřebání žloutkového váčku uhynulo. Nezbytným krokem k zajištění normálního vývoje oocytu a získání životaschopného potomstva je proto obnovení normální ploidní úrovně –  $2n$  (Linhart a kol., 1995). Hovoříme o tzv. rediploidizaci (Komen

a Thorgaard, 2007), jejímž principem je zdvojení genetického materiálu zygoty retencí druhého pólového tělíska nebo blokadí prvního mitotického dělení. První jmenovaný způsob nazýváme meiotickou gynogenezí, druhý gynogenezí mitotickou (Esmaily a kol., 2004). Toto zdvojení genetického materiálu je obvykle realizováno vystavením aktivovaných oocytů šoku (Pandian a Koteeswaran, 1998).

### 2.3.3.1. Šoky

Používaný šok, jemuž jsou oocyty vystavovány, bývá obvykle teplotní nebo tlakový (Recoubratsky a kol., 2003). Teplotní šok lze dále dělit na teplý nebo studený (Linhart a kol., 1995). Morgan (2006) odkazuje rovněž na možnost užití šoků elektrických a chemických. Chemické šoky mohou být realizovány řadou látek, například cytocholazinem B, kolchicinem, kolcemidem nebo rajským plynem, příliš často se však nepoužívají (Kašpar a kol., 2014). Teplotní a tlakové šoky jsou charakterizovány třemi základními parametry: čas iniciace šoku od oplození (jenž může být vyjádřen v minutách nebo mitotickém intervalu), intenzita šoku a doba jeho trvání (Felip a kol., 2001).

Pro úspěšné získání diploidního gynogenetického potomstva je zapotřebí optimalizovat druh šoku a jednotlivé parametry, budou se totiž velmi lišit v rámci různých rybích druhů (Mims a kol., 1997).

Obzvláště čas iniciace šoku od oplození je klíčovým parametrem gynogenetické indukce. V praxi je určen typem gynogeneze, jenž je naším úmyslem indukovat (meiotická nebo mitotická) a délkou  $\tau_0$  (Lebeda a kol., 2015). Veličina  $\tau_0$  značí dobu trvání jednoho mitotického cyklu při synchronním dělení buněk nebo interval mezi dvěma po sobě jdoucími děleními. Běžně se vyjadřuje v minutách a je druhově specifická. Hodnota veličiny se mění s teplotou vody, která obecně ovlivňuje rychlost embryonálního vývoje ryb jakožto poikilotermních organismů (Shelton a kol., 1997). Příkladem může být mitotický cyklus veslonose amerického *Polyodon spathula*, který při 15 °C trvá 80 minut, zatímco při 20 °C pouhých 52 minut (Mims a kol., 2005). Čas samotné aplikace šoku se potom vyjadřuje v délce  $\tau_0$ , Mims a kol. (2005) například uvádí, že největšího množství diploidních gynogenetických larev bylo při meiotické gynogenezí zmiňovaného veslonose získáno při šokování oocytů v intervalu 0,22–0,26  $\tau_0$ .



### ***Tlakový šok***

Princip tlakového šoku spočívá ve vystavení oocytů vysokému tlaku vody v uzavřené tlakové jednotce na krátkou dobu 1–3 minut (Flajšhans a kol., 2013). Takový tlak lze vyvolat v tlakové jednotce zhotovené na zakázku nebo komerčně dostupné. Tlak používaný k navození genomové duplikace typicky kolísá od 52 do 78 MPa (Komen a Thorgaard, 2007). Anglosaská literatura uvádí rovněž jednotku psi (libry na čtvereční palec), zmiňované rozmezí odpovídá 7538–11,378 psi. Tlakové šoky je na větší objemy oocytů obtížnější standardizovat a aplikovat než šoky teplotní (Komen a Thorgaard, 2007). Morgan a kol. (2006) však uvádí, že užití tlakového šoku obvykle znamená vyšší přežití gynogenů ve srovnání s jinými metodami rediploidizace.

### ***Teplotní šok***

Teplotní šok je rychlou, nenáročnou a levnou cestu k obnovení diploidního stavu při indukci gynogeneze. Realizujeme jej krátkodobým vystavením oocytů vodní lázni, jejíž teplota byla upravena na požadovanou hodnotu (Lebeda a kol., 2015). Obecně se jedná o teploty o 15–20 °C nižší nebo vyšší, než je fyziologické teplotní optimum pro daný druh. V prvním případě pak hovoříme o šoku chladovém, v druhém případě o šoku teplém (Piferrer a kol., 2009).

Teplotní šok je obzvlášť vhodný pro oocyty těch druhů ryb, které je lepší k substrátu (vodním rostlinám, na jejich kořeny apod.). Tyto oocyty mohou být na umělém substrátu snadno přendávány z jedné vodní lázně do druhé (Komen a Thorgaard, 2007). To se týká především ryb jeseterovitých, kaprovitých, okounovitých, sumců a sumečků (Dubský a kol., 2003). Pokud však není lepení k substrátu žádoucí, je možné oocyty odlepkovat před expozicí teplotnímu šoku, nebo mohou být ponořovány přímo do odlepkovacího média o rozdílné teplotě, jež šok zároveň realizuje (Lebeda, 2014).

Optimální teploty pro chladové šoky se obecně pohybují v rozmezí -1 až 4 °C na dobu desítek minut (Piferrer a kol., 2009). Optimální chladový šok pro lína obecného k zadržení druhého pólového tělíska v druhé fázi meiózy je například 2 °C na dobu 35 min (Flajšhans a kol., 1993).

Optimální teploty pro teplé šoky jsou druhově specifické a kolísají od 27–36 °C pro lososovité (Komen a Thorgaard, 2007), přes 33–37 °C pro jeseterovité (Lebeda, 2014) až do 42 °C pro teplomilné ryby, jako například kaprovité a tilápie. Pro nejvíce druhů kaprovitých je za optimální považováno 40–41 °C. Co se týká doby trvání teplých šoků, uvádí

Piferrer a kol. (2009) rozmezí 45 s až 3,5 min pro teplovodní druhy nebo druhy mírného pásma a 10–25 min pro druhy studenovodní. Teploty účinného teplého šoku jsou blízko horních limitů tolerance, protože působí přes depolymerizaci proteinových komplexů. Nalezení správné kombinace teploty a trvání je tudíž nezbytné (Komen a Thorgaard, 2007).

### **2.3.3.2. Čas uplatnění šoků**

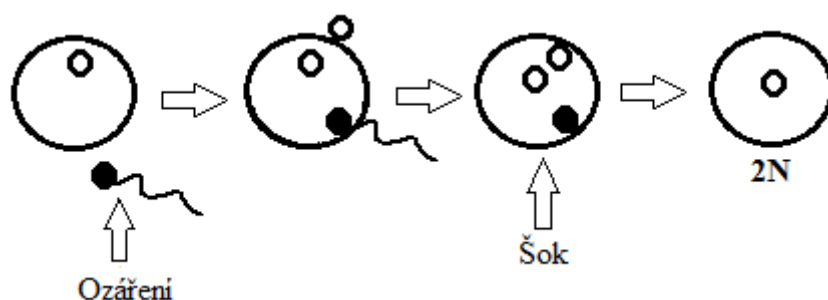
Gynogenezi lze indukovat pouze v raných stádiích ontogeneze – buď během druhé fáze meiotického dělení oocytů, nebo prvního mitotického dělení zygoty. Tyto dvě periody ontogenetického vývoje jsou vhodné pro manipulaci s geneticky determinovaným pohlavím (Horváth a Orbán, 1995). Podle času uplatnění šoku od osemenění gamet a tím pádem i mechanismu jeho působení můžeme indukovanou gynogenezi rozdělit na mitotickou a meiotickou (Kašpar a kol., 2014). Hlavní rozdíl protokolů gynogenezí spočívá v načasování rediploidizačního šoku (Lebeda a kol., 2015). Ve výsledku se gynogeni liší mírou homozygotnosti a rovněž životaschopností, která je vyšší v případě meiotické gynogeneze (Felip a kol., 2001).

### ***Meiotická gynogeneze***

Meiotická gynogeneze spočívá v aplikaci šoku za účelem retence prvního nebo druhého pólového tělíška (Linhart a kol., 1995), viz Obr. č. 1. Aplikovaný šok zabrání vypuzení pólového tělíška, jehož fúzí dojde ke vzniku diploidního embrya, obsahujícího dvě kompletní sady mateřských chromozomů (Morgan a kol., 2006). Jedná se tedy o obdobný princip, jaký je využíván při indukci triploidie (Lebeda, 2014).

V případě meiotické gynogeneze je úroveň homozygotnosti limitována frekvencí crossing-overů během prvního meiotického dělení (Recoubratsky a kol., 2003). Pro určitou míru heterozygotnosti bývá tedy potomstvu, jež vzniklo meiotickou gynogenezí, přezdíváno gynogenetičtí heterozygoti (Flajšhans a kol., 2013).

Flajšhans a kol. (2013) uvádí, že různými autory bylo meiotickou gynogenezí získáno u pstruha duhové 48–63 %, u kapra obecného 29–38 % a u tilápie nilské 19–27 % živého diploidního gynogenetického potomstva. Rovněž konstatují, že vyššího procenta životaschopných diploidních potomků bylo dosaženo použitím heterologního spermatu a/nebo tlakového šoku.



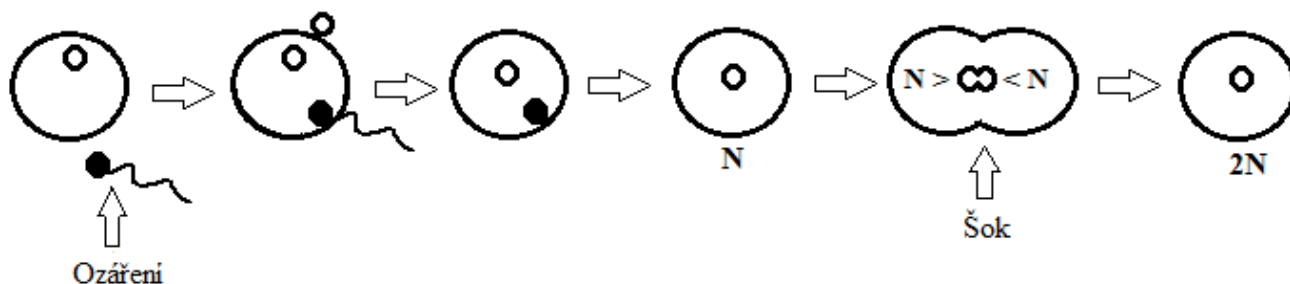
Obr. č. 1: Schéma indukce meiotické gynogeneze (upraveno podle Flajšhans a kol., 2013).

### ***Mitotická gynogeneze***

Principem mitotické gynogeneze je potlačení první nebo druhé fáze embryonálního mitotického dělení (Linhart a kol., 1995), viz Obr. č. 2. V praxi tedy probíhá mitotická gynogeneze následovně: ovulovaný oocyt je ve stádiu metafáze 2 meiotického dělení, ozářená spermie aktivuje jeho vývoj a původně haploidní oocyt v rámci probíhajícího buněčného cyklu dojde do stádia prvního mitotického dělení. V tento moment je vystaven šoku odpovídajících parametrů, jenž mitotické dělení zastaví v okamžiku, kdy již dojde k duplikaci genetického materiálu (tedy z haploidního počtu chromozómů na diploidní), ale ještě nedojde k jeho rozejití do dceřiných buněk a buňka zůstává diploidní (Kašpar a kol., 2014). Parametry aplikovaného šoku jsou obdobné jako při indukci tetraploidie (Ihssen a kol., 1990) a získanému potomstvu je obvykle přezdíváno „dvojití haploidi“ (Komen a Thorgaard, 2007).

Mitotická gynogeneze je postkaryogamickou zygotickou manipulací, vedoucí ke vzniku homozygotního potomstva. Nejedná se však o klonální linii, neboť nemusí sdílet stejné alely vzhledem k proměnné segregaci chromozómů a genetické rekombinaci během gametogeneze (Liu a kol., 2010). Klonální linie může být však vytvořena za dvě následující generace (Kašpar a kol., 2014).

Procentuální přežití dvojitých diploidů je nižší, než je tomu v případě meiotické gynogeneze (Felip a kol., 2001). Flajšhans a kol. (2013) uvádí, že v závislosti na použití heterologního nebo homologního spermatu bylo různými autory u pstruha duhového získáno 1–5 %, u kapra 1–15 % a u tilápie nilské 1–25 % živého diploidního gynogenetického potomstva.



Obr. č. 2: Schéma indukce mitotické gynogeneze (upraveno podle Flajšhanse a kol., 2013).

#### 2.3.4. Metody ověření gynogenetické indukce

I přes správně optimalizovaný postup gynogenetické indukce nelze vyloučit vznik určitého podílu negynogenetického potomstva. Může to být zapříčiněno heterogenitou a stochastickým charakterem UV záření, jež dostatečně neinaktivovalo paternální genom, nebo špatným průběhem rediploidizace (Lebeda a kol., 2015). Kašpar a kol. (2014) tedy poukazují na nezbytnost ověření všech tří kroků – dostatečné inaktivace DNA druhé rodičovské gamety, odpovídající míry homozygotnosti potomstva a rovněž diploidní úroveň vznikajících embryí.

Míra inaktivace paternálního genomu se nejnázve ověřuje kontrolním křížením, při němž se využívá nějakého kvalitativního znaku (např. recesivně dědičného zbarvení) jako márkru. Další možností je použití molekulárně genetické metody k ověření nepřítomnosti otcovských genotypů (Flajšhans a kol., 2013). Technologie mikrosatelitních DNA márkru je velmi účinnou metodou pro potvrzení výhradně maternálního přenosu a odhad míry rekombinace u gynogenů (Zou a kol., 2011). Jedná se o spolehlivý postup, který je zároveň pracný a nákladný (Lebeda a kol., 2015). Užití biochemických a molekulárních márkru je však pro demonstraci výlučně mateřské dědičnosti nezbytné (Felip a kol., 2001).

Míra homozygotnosti se ověřuje pomocí genetických metod a márkru, dříve k tomuto účelu sloužily i márkry biochemické, využívající polymorfni proteinové systémy. Nyní se pro daný účel používají především mikrosatelitní márkry (Kašpar a kol., 2014). Felip a kol. (2001) uvádí, že molekulární přístupy poskytují jednoznačnou identifikaci gynogenů a jsou proto v současné době upřednostňovány.

U plůdku se můžeme kromě žádoucího diploidního potomstva hypoteticky setkat s haploidy, u nichž byla správně inaktivována DNA otce, nastala však chyba v rediploidizaci, a rovněž s triploidy, jež vznikli správnou rediploidizací embrya se špatně inaktivovaným paternálním genomem (Lebeda a kol., 2015). Haploidní plůdek je možno odlišit od ostatního pouhým pohledem – u plůdku se vyskytuje tzv. haploidní syndrom (Felip a kol., 2001), jenž

se vyznačuje rohlíčkovitě zakřiveným tvarem jedinců, kteří hynou nejpozději při přechodu na exogenní výživu (Flajshans a kol., 2013). Triploidi však mohou být životaschopní (Felip a kol., 2001). Ploidní úroveň přeživších jedinců se ověřuje karyologickou analýzou a průtokovou cytometrií (Peruzzi a Chatain, 2000). Lebeda (2015) doporučuje stanovení relativního obsahu DNA průtokovou cytometrií, odkazuje také na možnost individuálního stanovení ze vzorku krevních buněk u starších ryb.

## 2.4. Indukovaná gynogeneze jeseterovitých ryb

Gynogeneze je jednou z metod, která může pomoci objasnit pohlavní determinační mechanismus jeseterů (Recoubratsky a kol., 2003). Rovněž se předpokládá, že u některých druhů jeseterů může vést k získání potomstva, ve kterém bude mít majoritní podíl samičí pohlaví (Lebeda a kol., 2014a). Tím by mohla gynogeneze zároveň pomoci zvýšit produktivitu akvakultury jeseterů (Lebeda a kol., 2015).

Pohlaví určující mechanismus u jeseterů a veslonosů stále není zcela znám, jelikož cytogenetické studie neodhalily přítomnost heterochromozomů u samic ani samců (Van Eenennaam a kol., 1996). Badrtdinov a kol. (2008) uvádí, že jednou z možností rozšifrování mechanismu genetické determinace pohlaví jeseterů je analýza poměru samic a samců v potomstvu získaném meiotickou gynogenezí. V případě samčí heterogamety by bylo tímto typem gynogeneze produkováno celosamičí potomstvo. Pokud je heterogameta samičí, gynogenezí mohou vznikat ZZ samci, WW supersamice a/nebo ZW samice v různém poměru (Van Eenennaam, 1996). Poměr pohlaví je závislý na frekvenci crossing – overů mezi pohlavními chromozomy a životaschopnosti „WW“ supersamic (Badrtdinov a kol., 2008).

V případě jeseterů se běžně akceptuje hypotéza samičí heterogamety, odpovídá jí variabilní poměr samic a samců s vyšším procentem samic v gynogenetickém potomstvu: jeseter bílý *Acipenser transmontanus* 82 % (Van Eenennaam a kol., 1999), j. sibiřský *A. baerii* 81 % (Fopp–Bayat, 2010), bestěr 70–80 % (Omoto a kol., 2005), j. krátkorypý *A. brevirostrum* 65 % (Flynn a kol., 2006). Studie meiotické gynogeneze u veslonosa amerického *Polyodon spathula* však vedla k různým závěrům. Mims a kol. (1997) získali gynogenezí celosamičí populaci veslonosa, předpokládali tedy přítomnost samčí heterogamety. Roku 2012 však Shelton a Mims analýzou pohlaví staršího gynogenetického potomstva zjistili poměr 19,8 % ku 80,2% ve prospěch samic a přiklonili se rovněž k teorii existence samičí heterogamety u veslonosa.

Obecně akceptovaná hypotéza o tomto typu chromozomového určení pohlaví (typ Abraxas) predikuje přítomnost WW supersamic v gynogenetickém potomstvu jeseterů (Lebeda a kol., 2015). Křížením supersamic s běžnými ZZ samci by teoreticky mohla být produkována celosamičí populace (Fopp–Bayat, 2010). Některé studie jeseterů však tuto teorii popírají, například Badrtdinov a kol. (2008), jež popsali kompletně samčí gynogenetické potomstvo u jesetera hvězdnatého a Grunina a kol. (2011), kteří objevili samice v androgenetickém potomstvu jesetera sibiřského.

Prvními, kdo indukovali gynogenezi jeseterů, byli Romashov a kol. a stalo se tak v roce 1963. Pro iradiaci spermatu jesetera malého bylo při tomto pokusu využito ionizující záření (Mims a kol., 1997). Žádný gynogen však nepřežil déle než 192 dní od vylíhnutí. Další experimentální produkce jeseteřích gynogenů, kterou realizoval roku 1987 Kowtal, skončila rovněž neúspěšně (Van Eenennaam, 1996). Od té doby proběhly různé studie technik produkce gynogenetického potomstva rozdílných druhů jeseterů, Zou a kol. (2011) uvádí, že gynogeneze byla již studována u druhů: jeseter bílý (Van Eenennaam a kol., 1996), veslonos americký (Mims a kol., 1997), lopatonos americký *Scaphirhynchus platorynchus* (Mims and Shelton, 1998), vyza velká *Huso huso* a j. perský *Acipenser persicus* (Pourkazemi a kol., 2000), j. ruský *A. gueldenstaedtii* (Recoubratsky a kol., 2003), j. hvězdnatý *A. stellatus* (Recoubratsky a kol., 2003, Saber a kol., 2008), bestěr (Omoto a kol., 2005), j. malý *A. ruthenus* (Fopp–Bayat a kol., 2007; Lebeda a kol., 2014b, Lebeda a Flajšhans, 2016) a j. sibiřský *A. baerii* (Fopp–Bayat, 2010, Lebeda a kol., 2014a).

## **2.4.1. Inaktivace paternálního genomu**

### **2.4.1.1. UV záření**

Nejběžněji používanou metodou inaktivace genomu spermie jeseterů je ozařování spermatu UV světlem. Je tomu tak i navzdory faktu, že studie vlivu UV záření na motilitu jeseteřích spermií prokázaly vysokou citlivost jejich pohybového aparátu k tomuto druhu ošetření (Lebeda a kol., 2014b). I malé dávky UV záření totiž negativně působí na akrozóm, který zůstal jeseteřím spermiím, na rozdíl od spermií kostnatých ryb, zachován (Recoubratsky a kol., 2003).

Pro inaktivaci DNA jsou obvykle používány různé zdroje UV, vydávající světlo o vlnové délce 254–260 nm, dané rozmezí totiž DNA nejvíce absorbuje. Použití vyšší intenzity iradiace po kratší čas je výhodnější než dlouhodobé ozařování. Je tomu tak kvůli negativním efektům

světlem vyzařovaného tepla a rovněž kvůli fotoreaktivacímu procesu, způsobujícím odstraňování lézí DNA zaviněných UV světlem (Lebeda a Flajšhans, 2016).

Lebeda a kol. (2015) uvádí, že při správném ředění a technice ozařování je pro jesetery k inaktivaci paternální DNA obecně vhodná dávka cca 200–500 J×m<sup>-2</sup>. V případě jesetera malého upřesňují Lebeda a kol. (2015) dávku dostačující k iradiaci na 100–200 J×m<sup>-2</sup>. Předpokládá se, že hlavní parametr, způsobující rozdíly v optimálních dávkách UV světla mezi jednotlivými druhy jeseterů, je evoluční ploidní úroveň. S ní souvisí faktory, ovlivňující úspěšnost UV ošetření, kterými jsou obsah DNA spermií a jejich velikost (Lebeda a kol., 2014a).

Optimalizace UV ozařovacího protokolu je mimo jiné komplikována vysokou optickou hustotou spermatu a významným rozdílem hustoty spermatu mezi jednotlivými samci (Lebeda, 2014). Výsledky některých studií poukazují na vysoké procento negynogentických larev v neředěném spermatu a stochasticitu UV záření (Lebeda a kol., 2014a). Ředění spermatu může pomoci zmíněné problémy optimalizace překonat a umožnit jeho homogenní ozáření. Stanovení ředícího poměru se odvíjí od denzity spermatu (Lebeda a kol., 2015). Někteří autoři navrhuji ještě jiný způsob optimalizace dávky UV záření a to optimalizaci na základě odezvy motility spermií, Mims a Shelton (1995) například tvrdili, že letální dávka pro 40% spermií je dostatečná pro inaktivaci otcovského genomu při současném zachování jejich pohybové aktivity. Obdobného principu využili Van Eenennaam a kol. (1996) při indukci gynogeneze jesetera bílého s tím rozdílem, že zvolená letální dávka byla 50 %.

Za využití UV světla pro inaktivaci paternálního genomu byla gynogeneze indukována například u jesetera krátkorýpého (Flynn a kol., 2006), jesetera bílého (Van Eenennaam a kol., 1996), jesetera hvězdnatého a ruského (Recoubratsky a kol., 2003), jesetera sibiřského (Fopp–Bayat, 2010), veslonosa amerického (Shelton a Mims, 2012) a dalších druhů. UV záření je běžně používáno i při gynogenezi jesetera malého (Lebeda a kol., 2015, Fopp–Bayat a kol., 2007, Recoubratsky a kol., 2003), ačkoliv Fopp–Bayat a kol. (2007) uvádí, že jeho spermie jsou k UV světlu ještě citlivější než spermie ostatních jeseteřích druhů.

#### **2.4.1.2. Ionizující záření**

Felip a kol. (2001) uvádí, že předností ionizujícího záření je schopnost indukce drobných paternálních fragmentů DNA (minichromozomů), které UV záření neinaktivuje. Jeho nevýhodou je však, že jen velmi málo laboratoří má ve svém okolí vhodné zdroje záření (Komen a Thorgaard, 2007), pro indukci gynogeneze jeseterovitých ryb bylo tedy používáno

především na začátku jejích studií (Lebeda, 2014). Ionizující záření bylo použito například při indukci gynogeneze jesetera sibiřského Gruninou a Neifakhem roku 1991 (Komen a Thorgaard, 2007), jesetera malého Romashovem a kol. r. 1963 (Mims a kol., 1997) nebo veslonosa amerického Mimssem a kol. (1997).

#### **2.4.1.3. Chemická inaktivace DNA**

Inaktivace DNA spermií chemickými látkami, jež DNA selektivně poškozují, je alternativou gynogenetické indukce. Chemická inaktivace paternálního genomu může být vhodnou substitucí za běžné UV především při práci s většími objemy spermatu (Lebeda, 2014). Úspěšnost chemické inaktivace je však ve srovnání s běžným ozářením UV nižší (Lebeda a kol., 2015). Lebeda a kol. (2015) uvádí, že nejvyšší dosažená úspěšnost byla 19,8 % gynogenů z 23 % vykuleného plůdku a byla získána s použitím spermatu inkubovaného aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralenem (AMT) jako látky ke zvýšení propustnosti pro UV záření a následným ozářením UV-A (360 nm). Rovněž dodává, že svojí schopností zvětšení propustnosti spermatu pro záření UV-A umožňuje AMT zvýšit objem ozařovaného spermatu dvakrát až třikrát oproti objemům pro běžně používané záření UV-C (Lebeda a kol., 2015). Další chemikálie přicházející v úvahu jsou: jiné psoraleny (PS), dimethyl sulfát (DMS) a různá barviva, například ethydiumbromid (EB) a toluidinová modř (Lebeda, 2014). Studie chemické indukce gynogeneze u jesetera malého, vedená Lebedou a kol. (2014b), vyhodnotila všechny zmiňované látky jako možné pro produkci gynogenů. DMS však prokázalo nízkou schopnost inaktivace paternálního genomu. Koncentrace, způsobující kompletní inaktivaci DNA, ovlivňovaly velmi negativně i motilitu spermií, takže efektivita byla pouze 2–3 % vylíhnutých larev ve srovnání s kontrolou. PS a EB působily na motilitu spermií rovněž velmi negativně (Lebeda a kol., 2014).

#### **2.4.2. Obnovení ploidní úrovně**

Diploidie může být u oplozených oocytů obnovena pomocí tepelného nebo tlakového šoku (Saber a kol., 2008). U jeseterů lze obdobně jako u jiných rybích druhů indukovat buď gynogenezi meiotickou nebo mitotickou (Lebeda a kol., 2015). O mitotické gynogenezi jeseterů podávají bližší informaci pouze Lebeda a kol. (2015), kteří konstatují, že v případě její realizace u jesetera malého je vhodné aplikovat šok v čase 0,9 τ. Ostatní předkládané studie se zabývaly výhradně meiotickou gynogenezí.



Délka  $\tau$  činí při 16 °C pro jesetera malého 63–65 minut, pro vyzu velkou 60 minut, pro j. ruského 55 minut, pro j. hvězdnatého 50 minut (Lebeda a kol., 2015). Parametry šoku je zapotřebí přizpůsobit délce mitotického cyklu indukovaného druhu při konkrétní teplotě a vhodně je optimalizovat (Mims a kol., 1997).

Obdobně jako při inaktivaci paternálního genomu je však optimalizace komplikována rozdíly mezi jednotlivými, uměle vytřenými jedinci (Van Eenennaam a kol., 1996). Van Eenennaam a kol. (1996) uvádí, že přesné načasování teplotního šoku je závislé na specifickém vývojovém stupni každé dávky oocytů. Potvrzuje to například studie indukce gynogeneze u lopatonose amerického (Mims a Shelton, 1998), ve které byly ošetřeny oocyty třech různých samic a největšího množství životaschopných jedinců bylo od každé samice získáno při jiném čase aplikace šoku – 0,25, 0,30 a 0,35  $\tau$ .

#### **2.4.2.1. Teplý šok**

Teplý šok je nejefektivnějším a jednoduše provozně zvládnutelným ošetřením k obnově diploidie u jeseterů (Lebeda a kol., 2015). Jeseteří oocyty jsou při něm obvykle exponovány teplotám 33–37 °C po dobu 2–5 minut v čase 0,2–0,35  $\tau$  (Lebeda, 2014).

Pro získání gynogenetického potomstva jesetera malého doporučuje Lebeda a kol. (2015) dvouminutovou expozici oocytů šoku o teplotě 34 °C, následovanou propláchnutím v 16 °C vodě pro rychlé zchlazení a následnou inkubaci. Uvádí rovněž, že vhodný čas pro vystavení šoku je 0,25–0,3  $\tau$ . Pro získání gynogenetického potomstva jesetera malého použili šok obdobných parametrů (34 °C po dobu 2 minut) i Fopp–Bayat a kol. (2007), kteří jej aplikovali v čase 18 minut po oplození, před nímž byly oocyty inkubovány při teplotě 15 °C. Recoubratsky a kol. (2003) použili k šokování oocytů jesetera malého v čase 0,3  $\tau$  teplotu 37 °C, jíž byly oocyty vystaveny po dobu 2,5 minuty. Ačkoliv byl pokus dvakrát opakován, gynogenetická embrya vždy zahynula bezprostředně po aplikaci šoku (Recoubratsky a kol., 2003).

Gynogeneze dalších druhů jeseterů byla úspěšně indukována za použití šoků s mírně odlišnými parametry než ve zmiňovaných studiích, Recoubratsky a kol. (2003) například uspěli při gynogenezi jesetera hvězdnatého a ruského aplikací stejného šoku, jenž se jim neosvědčil v případě jesetera malého. Tento byl aplikovaný v intervalu 0,25–0,35  $\tau$  po inseminaci. Gynogenezí jesetera sibiřského se zabývali Fopp–Bayat a kol. (2010), úspěšně ji indukovali za použití 37 °C šoku. Oocyty byly šoku exponovány po dobu 2 minut 18 minut po jejich aktivaci, po níž byly přechovávány při 15 °C. První úspěšnou indukci gynogeneze

jesetera bílého uskutečnili Van Eenennaam a kol (1996). Testovali šoky různých parametrů, jako nejúspěšnější se jevila teplota 34 °C po dobu 3 minut, které byly oocyty vystaveny 15 minut po inseminaci (Van Eenennaam a kol., 1996).

Gynogenezi veslonose amerického se zabývala řada studií, oplozené oocyty byly obvykle exponovány dvouminutovému šoku o teplotě 35–37 °C (Mims a kol., 2005, Mims a kol., 1997, Shelton a Mims, 2012). Mims a kol. (2005) získali největšího množství diploidních gynogenetických larev při šokování v intervalu 0,22–0,26 τ, časy z daného intervalu se pro gynogenezi veslonose osvědčily i při jiných studiích (Mims a kol., 1997, Shelton a Mims, 2012).

#### **2.4.2.2. Studený šok**

Přesto, že se nejedná o obvyklou alternativu, byl i studený šok při indukci gynogeneze jeseterů několikrát použit, Saber a kol. (2008) například získali gynogenetické potomstvo jesetera hvězdnatého za použití 3 °C šoku, jemuž byly oocyty vystaveny po dobu 60 minut. Stalo se tak 10 minut po jejich aktivaci, teplota vody před vystavením šoku činila 20 °C. Van Eenennaam a kol. (1996) použili studený šok pro gynogenezi jesetera bílého. Množství získaných gynogenů bylo však o hodně nižší, než v případě teplého šoku, jenž byl v pokusu aplikován na jinou skupinu jeseteřích gamet. Použitá teplota byla rovněž 3 °C, expozice 12 minut po fertilizaci, před níž byly oocyty inkubovány při 16 °C, a jako nejlepší se jevilo vystavit je šoku po dobu 60 minut (Van Eenennaam a kol., 1996).

#### **2.4.2.3. Tlakový šok**

Ošetření tlakovým šokem vyžaduje nelepivé oocyty, před jeho aplikací je tedy opět zapotřebí uplatnit odlepkovací lázeň (Lebeda, 2014). Tlakového šoku bylo využito například při první úspěšné produkci gynogetického potomstva jesetera krátkorypého, při níž Flynn a kol. (2006) vystavili oocyty 20 minut po oplození tlaku 8500 psi po dobu 5 minut. Tyto byly po celou dobu drženy při konstantní teplotě 13 °C (Flynn a kol., 2006).

### **2.4.3. Význam gynogeneze jeseterů**

Zvládnutí indukované gynogeneze jeseterů je předmětem zájmu komerční akvakultury i vědy (Van Eenennaam a kol., 1996). Úspěšně realizovaná gynogeneze jeseterů může znamenat změnu poměru pohlaví v produkovaném potomstvu ve prospěch samic, které jsou zdrojem žádaného černého kaviáru (Lebeda a kol., 2015). Dříve byl kaviár získáván z volně

žijících ryb, což vedlo spolu s dalšími antropogenními faktory k enormnímu poklesu jejich populací. Okolo roku 1990 došlo tedy rovněž k poklesu produkce takto získávaného kaviáru (Ludwig a kol., 2002), se kterým souviselo znatelné zvyšování jeho ceny. Ta se výrazně lišila od ceny kaviáru z chovů, což se ukázalo jako příležitost pro jeho akvakulturní produkci, jež je schopna nabízet levnější produkt garantované kvality (Williot a kol., 2001) a tím zároveň pomoci čelit tlaku na zbývající volně žijící populace jeseterů (Wirth a kol., 2002).

Cena kaviáru jesetera malého na českém trhu činí 15 400 Kč za 1 kg, čímž se řádově liší od ceny 1 kg jeseteřího masa (350 Kč) (Lebeda a kol., 2015). Ceny kaviáru jiných jeseterů se značně různí v závislosti na tom, o který druh se jedná, kilogram vzácného vyzího kaviáru nejvyšší kvality může být například prodáván za více než 10 000 €, u běžně chovaných jeseteřích druhů dosahují ceny zhruba desetin této hodnoty. Ceny jsou dále výrazně odlišné v různých částech světa, 1 kg kaviáru jesetera bílého například stojí 300 US\$ v Severní Americe, v Evropě se cena obvykle pohybuje okolo 600 €, v Itálii však činí více než 2000 € (Bronzi a kol., 2011). Ve srovnání s cenou 1 kg masa téhož druhu, která koreluje v rozmezí 3.86–5.73 US\$ (přibližně 3,5–5.2 €), je však stále řeč o značném nepoměru (Sanders a kol., 2003).

Z uvedených skutečností vyplývá, že chov populace s převahou samic je ekonomicky o hodně významnější, než rovnoměrné zastoupení obou pohlaví (Flynn a kol., 2006). S přihlédnutím k faktu, že pohlaví jeseterů lze diagnostickými metodami rozlišit až po několika letech odchovu, může chov gynogenetických jedinců znamenat významné ekonomické zvýhodnění oproti konvenční akvakultuře, jelikož se při něm dá převaha samic predikovat (Lebeda a kol., 2015).

Za pomoci gynogeneze by hypoteticky mohla být produkována dokonce populace celosamičí, pro jejíž vznik je určujícím předpokladem přítomnost WW supersamic v gynogenetickém potomstvu. Od těchto ryb by bylo dalším křížením monosexní potomstvo získáváno (Shelton a Mims, 2012). Jedná se však zatím o pouhou hypotézu, která u jeseterů předpokládá přítomnost samičí heterogamety, ačkoliv mechanismus genetické determinace jejich pohlaví stále nebyl rozšifrován (Lebeda, 2014).

Cytogenetické studie zatím neodhalily přítomnost heteromorfických chromozomů u žádného jeseteřího druhu. I přes absenci cytogeneticky demonstrovatelných chromozomů však mohou genetické přístupy pomoci potvrdit, že je pohlaví těchto archaických ryb determinováno právě chromozomovým systémem typu Abraxas. Jedním z uplatňovaných genetických přístupů je i indukovaná gynogeneze (Van Eenennaam a kol., 1999).

Gynogenetičtí jedinci totiž dědí pohlaví determinační faktory pouze od matky, což může k objasnění mechanismu genetické determinace pohlaví jeseterů významně přispět (Recoubratsky a kol., 2003). Vysoká úroveň homozygotnosti mitotických gynogenů může rovněž znamenat nové poznatky v oblasti genetiky chrupavčitých (Lebeda a kol., 2014a). Jako další nápověda se jeví analýza poměru pohlaví v potomstvu produkovaném meiotickou gynogenezí (Badrtdinov a kol., 2008).

Pokles populací jeseterů ve volných vodách znamenal zvýšené požadavky na jejich chov v zajetí a s ním související produkci kaviáru navzdory faktu, že dosažení pohlavní dospělosti je u těchto archaických ryb otázkou pěti až patnácti let v závislosti na druhu (Mims a Shelton, 1998). Tento fakt zapříčinil popularizaci metod uniparentální dědičnosti, mezi něž se řadí indukovaná gynogeneze (Lebeda a kol., 2015). Po desetiletí studií a experimentů se však gynogeneze jeseterovitých potýká s řadou problémů, jimiž jsou například nízké přežití gynogenů, velká variability výsledků, nedostatek vědomostí ohledně genetiky a další. Ačkoliv by tedy mohla znamenat vylepšení jeseteří akvakultury, její aplikace se zatím jeví spíše jako záležitost daleké budoucnosti (Lebeda, 2014). Navzdory tomu se však jedná o metodu s velkým potenciálem (Van Eenennaam a kol., 1996).

### 3. Materiál a metodika

V experimentální části bylo pracováno s populací jesetera malého, *Acipenser ruthenus* v Genetickém rybářském centru Fakulty rybářství a ochrany vod ve Vodňanech (FROV JU) v rámci projektu NPU č. LO1205, programu VA2 Biologie, ochrana a akvakultura jeseterů. Na líhni ve Vodňanech proběhl nejprve umělý výtěr ryb a následná experimentální indukce mitotické gynogeneze. Poté zde byla stanovována oplozenost a líhnivost vyprodukovaného potomstva. Úspěšnost gynogenetické indukce byla dále ověřována v laboratořích FROV JU ve Vodňanech. Proběhlo zde stanovení ploidní úrovně, rodičovství a míry homozygotnosti plůdku.

#### 3.1. Odběr gamet

Pro úspěšnou indukci gynogeneze bylo v první řadě zapotřebí zajistit kvalitní gamety. Výtěrová stimulace a následný umělý výtěr proběhly podle Gely a kol. (2008).

Vybrané generační ryby [samci (mlíčáci) o hmotnosti 1–2 kg a samice (jikernačky) o hmotnosti 2–3 kg] byly nejprve umístěny do připravených bazénů s postupnou teplotou vody na konečných 14–15 °C a při této teplotě drženy po dobu jednoho týdne. Po uplynutí tohoto časového úseku bylo přistoupeno k hormonální stimulaci, která byla naplánována tak, aby bylo možno obě pohlaví vytřířit ve stejný čas. U samců byla stimulace realizována jednorázovou vnitrosvalovou injekcí suspenze kapří hypofýzy ve fyziologickém roztoku v dávce  $4 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  hmotnosti ryby, ke zkoušce umělého výtěru se přistoupeno přibližně po 36 hodinách. Ke stimulaci samic byla použita rovněž vnitrosvalová injekce suspenze kapří hypofýzy ve fyziologickém roztoku, zde byly však použity dvě dávky – první dávka  $0,5 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti ryby byla po 12 hodinách následována dávkou  $4,5 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ . Přibližně po 42 hodinách od první hypofyzace bylo na dně bazénu možno pozorovat samovolně ovulované oocyty, mohlo být tedy přistoupeno k umělému výtěru.

Samci byli nejprve položeni hřbetem na výtěrový stůl a bylo jim osušeno okolí pohlavního otvoru, aby nedošlo k předčasné aktivaci spermatu kontaminací vodou. Následně jim byla do chámovodu zaváděna kanyla o délce přibližně 20 cm, jejíž druhý konec byl vložen do suchého kontejneru pro buněčné kultury, který byl držen pod úrovní odebírané ryby. Tím bylo docíleno samovolného vytékání spermatu do kontejneru, jenž byl po ukončení odběru uzavřen, označen kódem druhu a číslem značky (pasivního integrovaného transpondéru) odebíraného jedince a následně přechováván na ledu. Odběr oocytů probíhal metodou mikrochirurgického řezu popsanou Štěchem a kol. (1999), kdy byl na hřbet

položeným samicím s osušeným pohlavním otvorem skalpelem proříznut vejcovod v místě před vyústěním do pohlavního otvoru. Následoval výtěr metodou abdominální masáže, ovulované oocyty byly před začátkem gynogenetické indukce přechovávány v suché polypropylenové misce, označené číslem příslušné samice a přikryté navlhčeným hadrem.

U každého vytíraného jedince obou pohlaví byl ze spodního laloku ocasní ploutve sterilním způsobem odebrán cca 1 cm<sup>2</sup> velký kousek tkáně, jenž byl následně fixován v 96% etanolu pro účely cytologických analýz.

Gynogenetická indukce měla být realizována za použití dvou skupin gamet, získaných z různých generačních ryb. Pro pokus bylo zapotřebí vybrat z odebraných pohlavních produktů ty nejkvalitnější. Oocyty byly posuzovány makroskopicky, vybrány byly dvě várky oocytů, přičemž každá pocházela od jiné samice. Pro získání spermatu požadované kvality bylo zapotřebí nejprve vytříit větší množství samců a následně vybrat sperma s největším procentem pohyblivých spermií. Bylo použito metody podle Linharta a kol. (2000), sperma bylo 400× naředěno imobilizačním roztokem a poté byla sledována pohyblivost (motilita) spermií pod světelným mikroskopem. Pro pokus bylo zvoleno sperma dvou samců, jejichž motilita spermií dosahovala minimálně 90 %.

### **3.2. Indukce gynogeneze**

Pokus probíhal ve dvou skupinách. Ve skupině č. 1 byly uplatněny oocyty první samice a sperma prvního samce, ve skupině č. 2 oocyty druhé samice a sperma druhého samce. Každá skupina se skládala z několika podskupin. Podskupina kontroly vznikla oplozením oocytů neozářeným spermatem. V podskupině kontrola UV byly oocyty oplozeny ozářeným spermatem a ponechány bez rediploidizačních opatření. V podskupině kontroly šoku byly oocyty oplozené neozářeným spermatem vystavovány teplému šoku 50, 55 a 60 minut po fertilizaci. Poslední byla podskupina mitotických gynogenů, která se od podskupiny kontroly šoku lišila pouze použitím ozářeného spermatu. Na každou ze skupin byl použit následující postup.

Vybrané jeseteří sperma určené k ozáření UV světlem bylo nejprve v poměru 1:4 naředěno umělým médiem, napodobujícím svým iotovým složením přirozenou seminální tekutinu (pH 8,1; koncentrace Ca<sup>2+</sup> 0.16 mM; Na<sup>+</sup> 20.1 mM; K<sup>+</sup> 1.5 mM; osmolalita upravena 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diolem (trisem) na 80 mOsmol×kg<sup>-1</sup>) s přidavkem 0,1 % Pluronicu F127 k usnadnění tvorby tenké vrstvy spermatu na Petriho misce podle protokolu Lebedy a kol. (2015). Část spermatu určená pro oplození kontrolní podskupiny

a podskupiny kontrola šoku byla ponechána bez ošetření, zbylé sperma bylo na Petriho miskách vloženo do komory UV cross-linkeru CL-1000 (viz Příloha č. 1) a ozářeno za použití UV světla o vlnové délce 254 nm a intenzitě  $45 \text{ W} \times \text{m}^{-2}$ . 500  $\mu\text{l}$  spermatu naředěného 1:4 bylo v Petriho misce o průměru 9 cm ozařováno dávkou  $300 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ , stejně jako uvádí Lebeda a kol. (2014a). Poté bylo ozářené sperma z Petriho misek přelito do mikrozkmavek (typ Eppendorf), jež byly zabaleny do hliníkové fólie za účelem zabránění přístupu světla, které by mohlo aktivovat fotoreaktivací proces. Do samostatné mikrozkmavky bylo přelito i sperma určené pro kontrolu a kontrolu šoku, na které nebyla iradiace uplatněna. Mikrozkmavky byly umístěny na led. Motilita spermií byla po naředění a ozáření opět mikroskopicky ověřena podle Linhart a kol. (2000).

Při oplození bylo nejprve 125  $\mu\text{l}$  spermatu (jehož celkový objem byl ředěním upraven na 625  $\mu\text{l}$ ) naředěno ve 20 ml vody (15 °C) a bezprostředně na to vylito na 4 g jeseteřích oocytů. Výjimkou byl pouze kontrolní vzorek, kde byly použity jen 2 gramy oocytů a 60  $\mu\text{l}$  spermatu (celkový objem upraven ředěním na 300  $\mu\text{l}$ ), naředěného 10 ml vody. Menší objem oocytů byl v tomto případě použit jako prevence před jejich nadměrným nahuštěním na Petriho miskách, které by mohlo vést ke snížení životaschopnosti embryí kontrolní podskupiny. Kromě experimentu mitotické gynogenese bylo navíc stejné parentální křížení použito i při hromadné reprodukci j. malého, kde probíhalo oplození obdobným způsobem jako v kontrolní podskupině, jelikož při něm nebylo uplatněno ošetření spermatu ani oocytů.

Pro oplození kontrolní podskupiny a podskupiny kontroly šoku bylo použito neozářené sperma, na zbytek vzorků bylo použito sperma ozářené. Oocyty byly oplozovány po dobu 2 minut za současného opatrného míchání a následně rozděleny do Petriho misek tak, aby byly pokud možno jednotlivě a nevytvářely shluky. Poté, co došlo k jejich přichycení, byly Petriho misky ponořovány do nádrže, v níž byla pomocí termostatu udržována konstantní teplota 16 °C. Při této teplotě byly oocyty inkubovány, než bylo přistoupeno k ošetření teplým šokem. Toto ošetření bylo vynecháno v případě podskupiny sloužící jako kontrola pro UV ozáření a kontrolního vzorku, jenž vznikl normálním oplozením.

Teplý šok byl realizován ponořením Petriho misek s oocytami do vody o teplotě 37 °C na dobu 2 minut v době 50, 55 a 60 min po oplození. Teplota lázně byla udržována termostatem Julabo (ThermoFisher Scientific). Po šokování byly Petriho misky s oocytami neprodleně umístěny do inkubačního systému a inkubovány při 16 °C. V případě celé skupiny č. 1 a kontroly, UV kontroly a kontrol šoku skupiny č. 2 byla každá Petriho miska umístěna do vlastního boxu maloobjemového průtočného inkubátoru (viz Příloha č. 2). Po dvou dnech

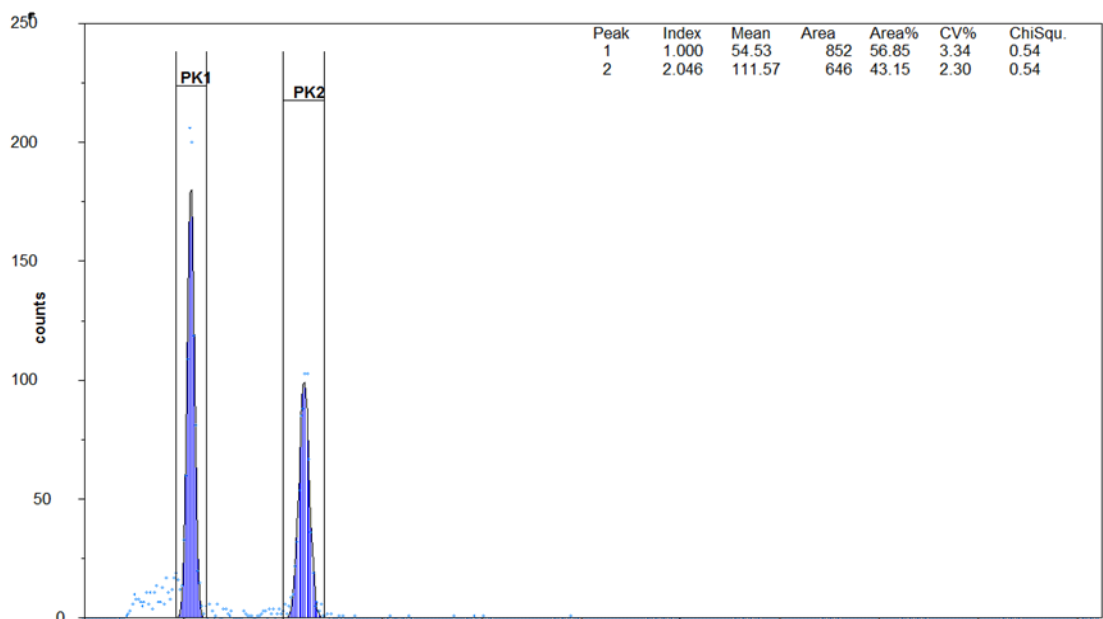
této inkubace byly odstraněny mrtvé oocyty za účelem zabránění plísňové infekci. Současně byl stanoven počet oocytů ve stádiu neuruly a procento oocytů, jež tohoto stádia dosáhly, jelikož neurální trubice byla tou dobou již dobře patrná (viz Příloha č. 3). Poté byly Petriho misky s oocyty vráceny do inkubátoru. Po vylíhnutí plůdku (viz Příloha č. 4) byl stanoven jeho počet a procentuální líhnivost v každém boxu. Petriho misky s gynogeny skupiny č. 2 byly uloženy do klasického inkubátoru. V tomto případě byly mrtvé oocyty odstraňovány z misek každý den z důvodu maximalizace snahy o zabránění infekce živých oocytů a stanovován byl pouze počet vylíhlých jedinců na konci inkubace.

### **3.3. Stanovení úspěšnosti gynogeneze**

#### **3.3.1. *Ověření ploidní úrovně***

V dalším kroku byla stanovována úspěšnost rediploidizačních ošetření analýzou ploidní úrovně larev z každé Petriho misky pomocí průtokové cytometrie. Postup popsali Lebeda a kol. (2015). Plůdek byl nejprve usmrcen předávkováním CO<sub>2</sub> a následně přenesen na hodinové sklo, sterilním způsobem přeřat za žlutkovým váčkem a opláchnut fyziologickým roztokem. Větší část s hlavou byla umístěna do 96% etanolu pro pozdější molekulární analýzu. Ocasní část, určena ke stanovení ploidie, byla důkladně rozmělněna ve fyziologickém roztoku, aby se do suspenze uvolnily jednotlivé buňky. Následně bylo mikropipetou přidáno 200  $\mu\text{m}$  pufru pro extrakci buněčných jader (Nuclei Extraction Buffer – CyStain DNA 2step, Partec GmbH, Germany), vzniklá suspenze byla poté přefiltrována přes 30  $\mu\text{m}$  filtr do kyvety pro průtokovou cytometrii. Do vzorku bylo přidáno fluorescenční barvivo 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI), jež se váže na jadernou DNA. Po uplynutí inkubační doby byl u vzorků zjišťován relativní obsah DNA buněk za použití průtokového cytometru Cube 8 (Partec GmbH, Germany) (viz Obr. č. 3). Zvolená rychlost průtoku suspenze buněčných jader komůrkou cytometru činila 0,1  $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ . Neošetřený diploidní plůdek jesetera malého z kontrolní podskupiny byl použit jako referenční vzorek.





Obr. č. 3: Histogram smíšeného vzorku buněk larvální tkáně haploidního a diploidního plůdku j. malého z průtokové cytometrie. Relativní obsah DNA haploidního plůdku se nachází přibližně na kanále 55 (PK1), zatímco relativní obsah DNA diploidního plůdku je patrný na kanále 112 (PK2). Histogram zpracován v programu FloMax (Partec GmbH).

### 3.3.2. Stanovení rodičovství

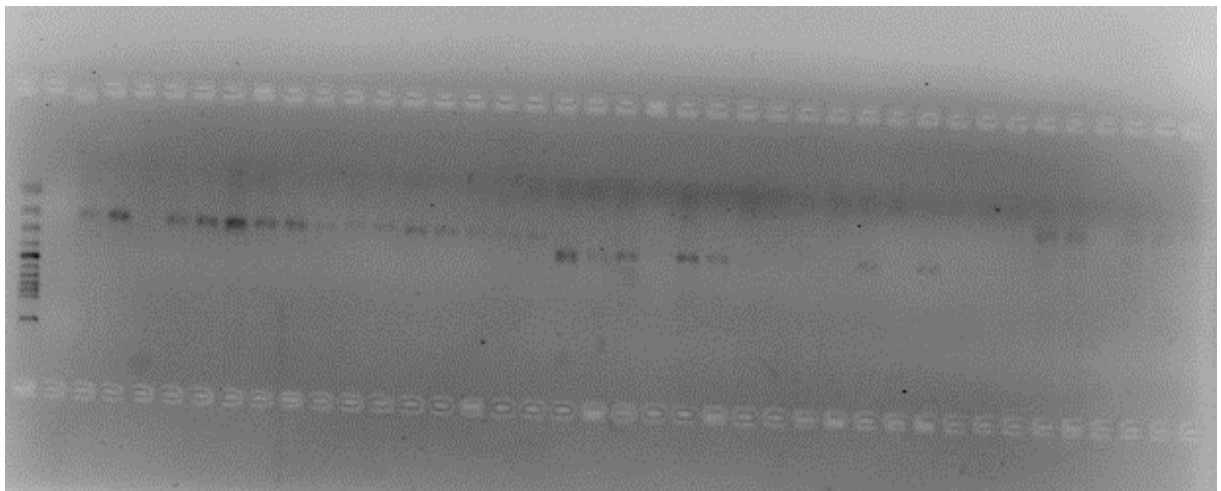
Míra homozygotnosti byla stanovována mikrosatelitní analýzou u skupiny č. 2. Nejprve bylo zapotřebí izolovat DNA ze vzorků plůdku a částí ploutví rodičů, které byly pro tento účel přechovávány v 96% etanolu. DNA byla extrahována za použití NucleoSpin®Tissue kitu podle manuálu od výrobce.

Pro testování rodičovství byly použity 3 skupiny mikrosatelitních márkřů, jež byly vyvinuty speciálně pro jesetery: Spl 101; Spl 163; Spl 173; dále Aox 45; AfuG 135; AciG 35 a Anac E4 s Afug 54 (McQuown a kol., 2000). PCR probíhalo za použití „Poor Man’s PCR“ protokolu, jenž byl popsán Schuelkem (2000). Pro amplifikaci byl zvolen následující reakční profil: jeden cyklus při 95 °C po dobu 3 minut, poté 10 cyklů při 95 °C, následovaných pomalým snižováním annealingové teploty z 63 °C na 54 °C, 16 cyklů při annealingové teplotě 53 °C a závěrečný krok 72°C po dobu 10 minut. V každé skupině byl jeden primer, jenž měl na svém hlavním 5' konci navázaný ještě konec s barvivem (M13, CAG nebo HILL).

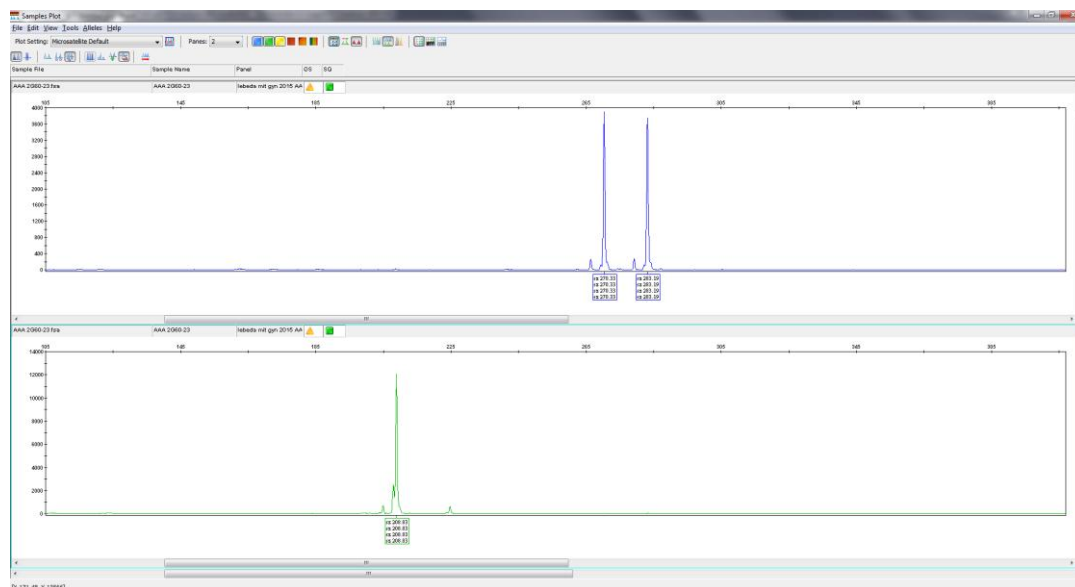
Kvalita výsledných PCR produktů byla poté zkontrolována elektroforézou na agarózovém gelu (viz Příloha č. 5). 150 ml agarózového roztoku o koncentraci 2,5 % bylo opakovaně přiváděno k varu v mikrovlnné troubě a promícháváno, následně ponecháno vychladnout

a obarveno 5  $\mu$ l barviva Good view. Poté byl vzniklý gel nalit do elektroforézní komůrky, zbaven nežádoucích bublinek a byl do něj vložen hřeben k vytvoření jamek pro vzorky. Zatímco gel chladl, byly 3  $\mu$ l každého vzorku obarvovány 2  $\mu$ l barviva loading buffer a připravovány na parafinový papír, odkud byly poté pipetovány do jamek vzniklých v gelu vyjmutím hřebenu. Jako pozitivní kontrola sloužil ladder o délce 100 bp. Elektroforéza probíhala po dobu 40 minut při 75 V. Poté byl výsledný produkt (viz Obr. č. 4) vyjmut z elektroforézní komůrky a následně vizualizován v UV světle pomocí transiluminátoru.

Vybrané vzorky byly připraveny na genetickou analýzu. Do 0,5  $\mu$ l každého vzorku byl pipetován mix 10  $\mu$ l Hi-Di formamidu s 0,5  $\mu$ l Lizu 600. Poté byly vzorky zahřáty na 95 °C po dobu 5 minut, aby došlo k denaturaci DNA. Následně byly zchlazeny na ledě a centrifugovány, aby bylo zabráněno vniknutí vzduchu do kapilár analyzáru. Vzorky byly analyzovány za použití přístroje Analyzer 3500 (Applied Biosystems, TM), postupováno bylo podle manuálu od výrobce. Genotypy rodičů a potomstva byly zaznamenávány a vyhodnocovány za použití softwaru GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems, TM) (viz Obr. č. 5).



Obr. č. 4: Výsledný produkt elektroforézy. Foto I. Lebeda



Obr. č. 5: Výsledek mikrosatelitní analýzy ze sekvenátoru Analyzer 3500 (Applied Biosystems, TM), zobrazený v programu GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems, TM). Na snímku je patrný mikrosatelitový lokus AcIG35, zastoupený dvěma alelami v délkách 270 bp a 283 bp, a mikrosatelitový lokus AfuG135, zastoupený jednou alelou délky 209 bp.

### 3.4. Stanovení heterozygotnosti

Heterozygotnost plůdku z podskupiny gynogenů byla stanovena pomocí programu Microsatellite analyzer (MSA) 4.05 a rovněž doplňku programu MICROSOFT EXCEL – Microsatellite toolkit. Výstupem byly hodnoty očekávané heterozygotnosti a skutečné heterozygotnosti.

## 4. Výsledky

### 4.1. Neurulace a líhnivost ve skupině č. 1

Procentuální hodnoty neurulace a líhnivosti při různých typech ošetření znázorňuje Graf č. 1.

#### 4.1.1. Počet embryí ve stádiu neuruly a jejich procentuální podíl

V kontrolním vzorku, vzniklém prostým oplozením bez iradiace a rediploidizačních opatření, dosáhlo stádia neuruly 52,55 % embryí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů. Celkem bylo stádia dosaženo u 103 kusů.

V podskupině kontrola UV, kde byly oocyty oplozeny spermatem vystaveným záření  $300 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$  a ponechány bez rediploidizace, byla neurální trubice patrná u  $41,72 \pm 4,92$  % (průměr  $\pm$  S.D.) embryí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů, což odpovídalo celkovému počtu 145 embryí.

V podskupině nazvané kontrola šoku, kde byly oocyty bez iradiačního zásahu v různých časech exponovány teplotnímu šoku  $37^\circ\text{C}$  po dobu 2 minut, bylo nejvyššího množství embryí ve stádiu neuruly získáno při šokování 55 minut po oplození. Neuruly dosáhlo při tomto způsobu ošetření 212 kusů embryí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů, tedy  $63,01 \pm 1,74$  %. Při uplatnění šoku po 50 minutách dosáhlo stádia  $51,54 \pm 13,64$  % embryí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů, odpovídajících 168 kusům. Nejnižší počet embryí ve stádiu neurulace byl získán při šokování 60 minut po oplození gamet. V pozorovaném stádiu se nacházelo celkem 161 kusů embryí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů, průměrně ho dosáhlo  $45,07 \pm 1,7$  %.

V podskupině mitotických gynogenů se největšího počtu embryí ve stádiu neuruly – 164 kusů podařilo získat při aplikaci šoku 60 minut po oplození, průměrně zde neurulace dosáhlo  $52,30 \pm 17,24$  % embryí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů. Při šokování po 50 minutách bylo získáno  $38,74 \pm 4,13$  % embryí s diferencovanou neurální trubicí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů, což odpovídalo 103 kusům. Při aplikaci po 55 minutách byl výsledkem získáno  $36,66 \pm 9,09$  % a 130 kusů embryí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů.

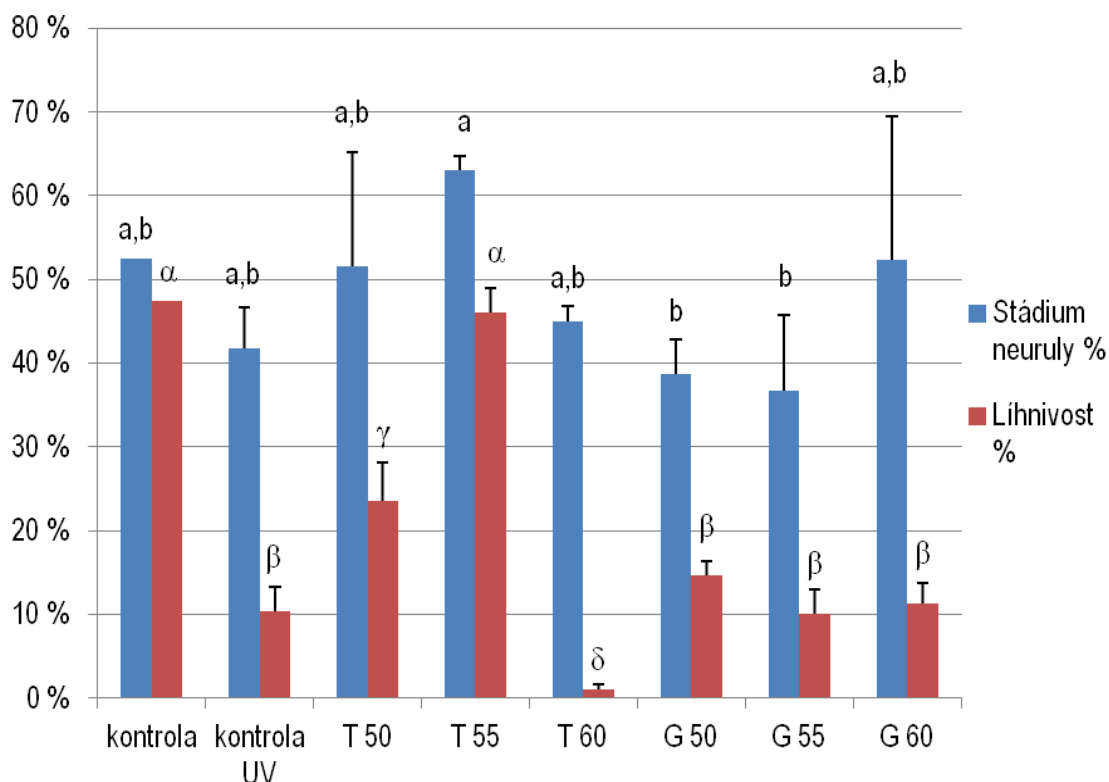
#### 4.1.2. Dosažená líhnivost a množství vylíhnutého plůdku

V kontrolní podskupině činila líhnivost 47,45 %. Celkem se v ní vylíhlo 93 kusů plůdku.

V kontrolní podskupině pro UV byla průměrná líhivost stanovena na  $10,33 \pm 2,97$  %. Bylo zde získáno celkem 36 kusů plůdku.

V podskupině kontrola šoku bylo největší množství plůdku získáno za aplikace šoku 55 minut po oplození. Toto ošetření vedlo k zisku 155 jedinců a líhivost byla rovna  $46,00 \pm 2,9$  %. Líhivost skupiny, na niž byl šok uplatněn 50 minut po fertilizaci, činila  $23,61 \pm 4,54$  %, vylíhlo se zde celkem 79 kusů plůdku. Obdobně jako v případě neurulace bylo nejmenšího množství vylíhlých jedinců dosaženo šokováním 60 minut po fertilizaci. Ošetřením byly získány jen 4 kusy plůdku, což znamenalo líhivost na úrovni pouhých  $1,07 \pm 0,6$  %.

U podskupiny mitotických gynogenů se nejvíce jedinců vylíhlo při aplikaci šoku 50 minut po oplození oocytů ozářeným spermatem. Tímto způsobem bylo získáno 39 kusů plůdku, líhivost byla stanovena na  $14,67 \pm 1,75$  %. Aplikace šoku po 60 minutách znamenala líhivost na úrovni  $11,33 \pm 2,42$  %, odpovídající 36 kusům plůdku. Šokováním oocytů 55 minut po fertilizaci bylo dosaženo líhivosti  $10,15 \pm 2,84$  %, zisk byl rovněž 36 kusů plůdku.



Graf č. 1: Procentuální hodnoty neurulace a líhivosti při použití různých ošetření ve skupině č. 1.

\*a, b, alpha, beta, gamma, delta – statisticky odlišné kategorie;  $P < 0,05$  (ANOVA, LSD test)

### **4.1.3. Statistické zhodnocení neurulace**

Kontrola bez iradiace a šoku se procentuálním množstvím embryí ve stádiu neuruly z počtu oplozených a aktivovaných oocytů výrazně nelišila od ostatních podskupin.

Podskupina UV kontrola prokázala nižší procento embryí ve stádiu neuruly z počtu oplozených a aktivovaných oocytů než kontrola šoku s jeho aplikací 55 minut po oplození ( $P < 0,1$ ). Jinak se podskupina kontrola UV od jiných výrazně nelišila.

V kontrole šoků bylo jeho použitím 55 minut po fertilizaci docíleno vyššího procenta embryí ve stádiu neuruly z počtu oplozených a aktivovaných oocytů než při použití šoku po 60 minutách ( $P < 0,1$ ). Porovnáním jednotlivých kategorií kontroly šoku mezi sebou nebyla zjištěna jiná výrazná odlišnost. Při srovnání podskupiny kontrola šoku s podskupinou gynogenů bylo dokázáno, že procento embryí ve stádiu neuruly z počtu oplozených a aktivovaných oocytů ve vzorcích kontroly šoku uplatněného po 55 minutách bylo výrazně vyšší ( $P < 0,05$ ) než procento embryí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů gynogenů získaných šokováním 50 a 60 minut od fertilizace.

Vzájemným porovnáním jednotlivých kategorií gynogenů nebyla zjištěna žádná výrazná rozdílnost.

### **4.1.4. Statistické zhodnocení líhivosti**

Kontrolní podskupina prokázala signifikantně vyšší líhivost ( $P < 0,001$ ) ve srovnání se všemi ostatními podskupinami (kontrola UV, kontroly šoku, gynogeni) kromě jedné kategorie kontroly šoku – kontrola šoku s jeho aplikací po 55 minutách, od které se výrazně nelišila.

Líhivost v kontrole UV byla výrazně nižší ( $P < 0,05$ ) než líhivost v kontrolách šoku, kde byl tento aplikován po 50 a 60 minutách od fertilizace, a signifikantně nižší ( $P < 0,001$ ) než při kontrole šoku, jenž byl použit po 55 minutách.

Porovnáním kategorií kontroly šoku bylo dokázáno, že líhivost kategorie šokované po 55 minutách byla signifikantně vyšší ( $P < 0,001$ ) než při aplikaci ošetření po 50 a 60 minutách. Šok po 50 minutách se dále svou vyšší účinností výrazně lišil ( $P < 0,05$ ) od šoku uplatněného po 60 minutách.

Srovnání podskupin kontroly šoku a gynogenů vedlo k závěru, že v kontrolní podskupině s ošetřením po 55 minutách bylo získáno signifikantně vyšší procento ( $P < 0,001$ ) plůdku než ve všech kategoriích podskupiny gynogenů. Dále bylo zjištěno, že kontrola šoku s jeho

aplikací po 50 minutách znamenala zisk výrazně vyššího procenta ( $P < 0,05$ ) plůdku z počtu oplozených a aktivovaných oocytů, než tomu bylo v případě jednotlivých kategorií gynogenů. V případě kontroly šoku byla za jeho aplikace po 60 minutách líhnivost naopak výrazně nižší ( $P < 0,05$ ) než u podskupiny gynogenů.

Porovnáním líhnivostí podskupiny gynogenů nebyla mezi jejími kategoriemi zjištěna výrazná odlišnost.

## **4.2. Neurulace a líhnivost ve skupině č. 2**

U podskupiny gynogenů, inkubované v klasickém inkubátoru, byla mrtvá embrya odstraňována každý den inkubace a procentuální neurulace a líhnivost nebyla stanovována, tudíž nemohla být ani statisticky porovnávána. Líhnivost a neurulace jsou tedy uvedeny jen u zbylých podskupin, jejichž inkubace proběhla v průtočném inkubátoru.

### ***4.2.1. Počet embryí ve stádiu neuruly a jejich procentuální podíl***

V kontrole bylo stádia neuruly dosaženo u 26,54 % embryí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů, což odpovídalo 43 kusům.

Oplození oocytů ozářeným spermatem ve skupině kontrola UV vedlo k zisku 161 embryí, jež dosáhla neurulace. Průměrně bylo tohoto stádia dosaženo u  $42,27 \pm 1,09$  % embryí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů.

Ve skupině kontrola šoku bylo největšího množství embryí ve stádiu neuruly získáno při aplikaci šoku 60 minut po fertilizaci – 187 kusů. Neurulace při tomto ošetření dosáhlo  $51,70 \pm 10,49$  % embryí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů. Při užití šoku po 55 minutách od oplození byla neurální trubice pozorována u  $48,00 \pm 2,04$  % embryí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů, tedy 177 kusů embryí. Šokování 50 minut po oplození znamenalo zisk 145 embryí, což odpovídalo  $38,19 \pm 4,27$  % embryí ve stádiu neuruly z počtu oplozených a aktivovaných oocytů.

### ***4.2.2. Dosažená líhnivost a množství vylíhnutého plůdku***

V kontrolní skupině se vylíhlo 25,93 % plůdku z počtu oplozených a aktivovaných oocytů, což se rovnalo 42 jedincům.

Kontrola UV prokázala líhnivost na úrovni  $8,77 \pm 0,1$  %. Zisk plůdku z této podskupiny činil 33 kusů.

Největšího zisku vylíhlých jedinců bylo ve skupině kontroly šoku dosaženo při jeho aplikaci 55 minut po oplození. Zisk činil 163 kusů plůdku a průměrná líhivost  $44,11 \pm 3,46$  %. Podobná účinnost byla zaznamenána při šokování oocytů 60 minut po fertilizaci, kde se vylíhlo 151 kusů plůdku a průměrná líhivost činila  $42,06 \pm 11,67$  %. Aplikací šoku po 50 minutách bylo získáno 117 kusů plůdku a průměrná líhivost byla  $30,81 \pm 3,06$  %.

U gynogenů nebyla hodnocena průměrná líhivost, pouze počty vylíhlých jedinců. Šokováním oocytů 60 minut po oplození ozářeným spermatem bylo získáno největšího množství plůdku, celkem 64 kusů. Když byl šok použit 50 minut po fertilizaci, vylíhlo se 41 kusů, při užití po 55 minutách pouhý 1 kus.

### **4.3. Ploidní analýza skupiny č. 1**

Úspěšnost jednotlivých ošetření, hodnocenou jako procento získaného plůdku požadované ploidie z celkového množství analyzovaného plůdku, zachycuje Graf č. 2.

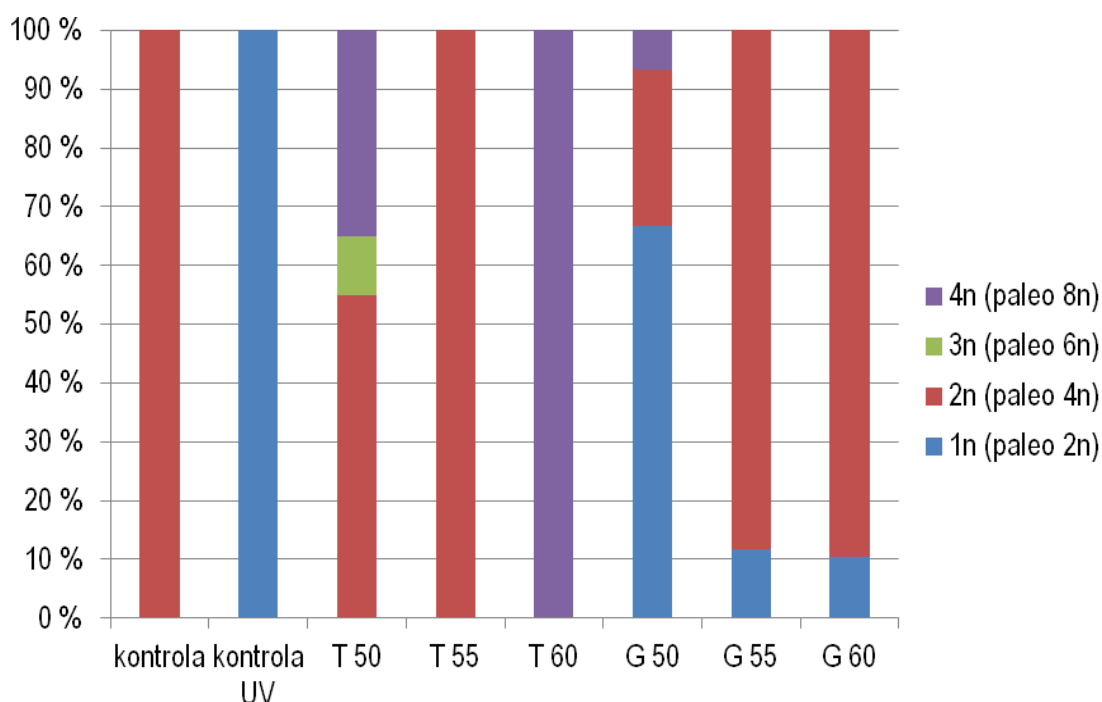
V podskupině kontrola UV byli všichni testovaní jedinci (45 kusů) haploidní (jelikož je jeseter malý paleotetraploidní, haploidní úroveň odpovídá paleo  $2n$ ). Tato skutečnost poukazuje na správnou inaktivaci DNA spermií, protože v případě nesprávné inaktivace vzniká plůdek normálním oplozením a je tudíž diploidní (paleo  $4n$ ).

Při správném průběhu šoku měl být v jeho kontrole získán tetraploidní (paleo  $8n$ ) plůdek, jelikož mělo dojít k duplikaci genomu potomstva vzniklého běžným oplozením. Ploidní analýza 20 jedinců, na něž byl šok aplikován 50 minut po oplození, však prokázala tetraploidii u pouhých 7 jedinců. Zbylý plůdek byl diploidní v počtu 11 kusů (šok nebyl účinný) a triploidní (paleo  $6n$ ) v počtu 2 kusy (šokem byla způsobena říze pólového tělíska). Z podskupiny získané šokováním 55 minut od oplození bylo testováno 7 kusů plůdku, přičemž byl všechn diploidní. Pouze u podskupiny, na níž byl šok aplikován 60 minut po oplození, byli všichni 4 testovaní jedinci tetraploidní.

U podskupiny gynogenů měla být aplikací šoku obnovena normální ploidní úroveň –  $2n$ . Při aplikaci šoku 50 minut po fertilizaci byla diploidie zjištěna pouze u 4 z 15 testovaných jedinců. U 10 kusů plůdku byla v důsledku špatné účinnosti šoku potvrzena haploidní úroveň, 1 kus byl naopak tetraploidní (oplození oocytů neinaktivovanou spermií a správný šok). Mnohem lepší účinnost šoku byla prokázána při aplikaci 55 minut po oplození, kde byla diploidie obnovena u 30 z 34 kusů plůdku. Zbylí jedinci byli haploidní. Z potomstva



získaného vystavením oocytů šoku 60 minut po oplození bylo testováno 19 kusů plůdku. U 17 z nich byla potvrzena diploidie, haploidní byli pouze 2 testovaní jedinci.



Graf č. 2: Procentuální zastoupení jednotlivých ploidních úrovní analyzovaného plůdku ze skupiny č. 1 při použití různých ošetření.

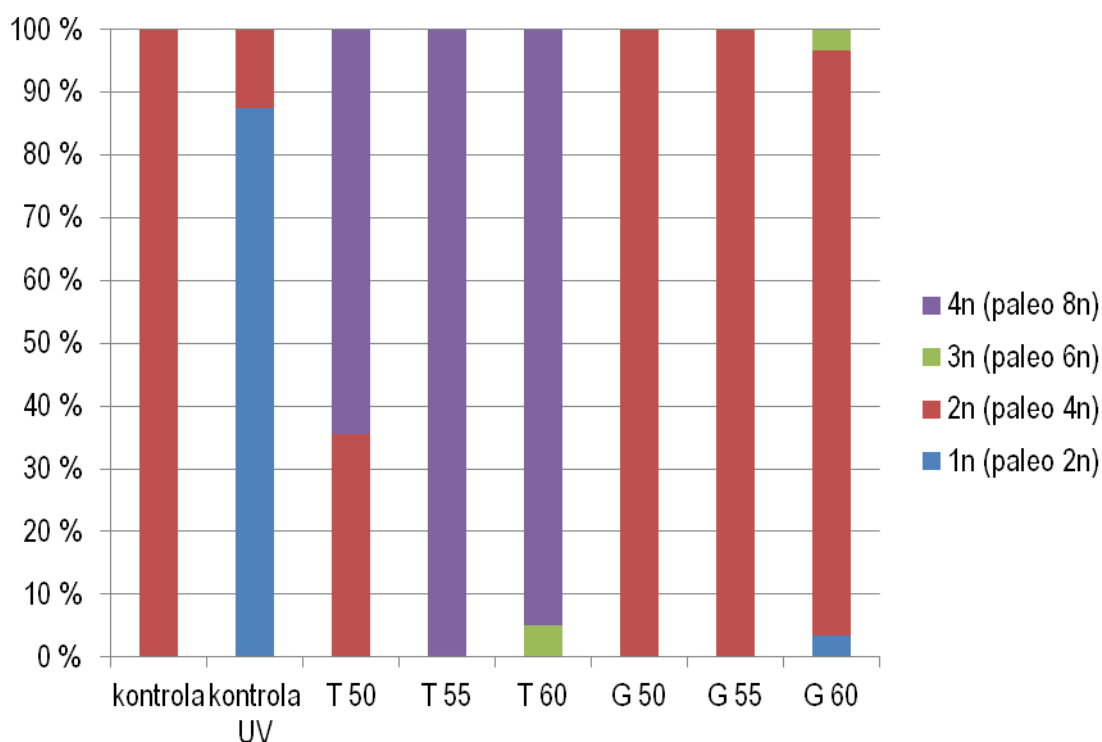
#### 4.4. Ploidní analýza skupiny č. 2

Úspěšnost jednotlivých ošetření, hodnocenou jako procento získaného plůdku požadované ploidie z celkového počtu analyzovaného plůdku, zachycuje Graf č. 3.

Ve druhé skupině bylo průtokovou cytometrií analyzováno 8 kusů plůdku z podskupiny UV kontrola. Inaktivace DNA spermií, vedoucí k zisku haploidního potomstva, byla prokázána u 7 kusů. 1 jedinec zůstal diploidní, což poukazuje na neúplnou inaktivaci.

V podskupině kontrola šoku vykázal šok aplikovaný 50 minut po fertilizaci stejně jako v případě skupiny č. 1 největší množství nežádoucího diploidního plůdku. Jeho počet činil 11 kusů, tetraploidů bylo ve stejně ošetřené podskupině zjištěno 20. Ploidní analýza jedinců šokovaných 55 minut po oplození naopak prokázala tetraploidii u všech 20 pozorovaných kusů. Zkoumáním 20 kusů plůdku, na něž byl šok uplatněn 60 minut po fertilizaci, bylo zjištěno 19 tetraploidů. Šok neproběhl úspěšně pouze u jediného jedince, jenž byl triploidní.

Ploidní analýzou podskupiny mitotických gynogenů, kde došlo k aplikaci šoku 50 minut po oplození oocytů ozářeným spermatem, byla u testovaných vzorků zjištěna velká účinnost rediploidizačního ošetření – všech 21 kusů plůdku bylo diploidních. Šokováním oocytů 55 minut po fertilizaci byl získán pouze 1 jedinec, jemuž byla zjištěna rovněž diploidní úroveň. Z 30 kusů pozorovaného plůdku, na něž byl šok použit 60 minut po oplození, bylo u 28 kusů zjištěno správné obnovení ploidní úrovně. U dvou zbylých jedinců byla pozorována haploidie a triploidie.



Graf č. 3: Procentuální zastoupení jednotlivých ploidních úrovní analyzovaného plůdku ze skupiny č. 2 při použití různých ošetření.

#### 4.5. Stanovení rodičovství ve skupině č. 2

Detailní výsledky genetické analýzy obsahují Příloha č. 6 a Příloha č. 7.

Maternální alely lokusu AciG 35 měly délku 270, 274 a 283 bp. Pozorované paternální alely lokusu se vyznačovaly délkou 275, 286 a 291 bp. U všech zkoumaných jedinců z podskupin UV kontrola a gynogeni se lokus AciG 35 vyznačoval pouze alelami v délce shodné s délkou alel samičích.

Na lokusu AfuG 54 byly u rodičů nalezeny shodně dlouhé alely 236 a 255 bp. Dále byly u samice zaznamenány alely dlouhé 259 bp a u samce 263 bp. Alely 256 bp dlouhé, jež byly pro samce typické, nebyly u podskupiny UV kontrola ani podskupiny gynogenů zaznamenány. Vyskytly se pouze u kontroly šoku, kde k přenosu paternální genetické informace přirozeně dochází.

Lokus AfuG 135 vykázal přítomnost alel v délce 205, 209 a 213 bp u obou rodičů. Jelikož byly alely otce i matky stejně dlouhé, zkoumání lokusu nemohlo přinést informaci o přenosu alel konkrétního rodiče.

U lokusu Aox 45 byla zjištěna přítomnost matčiny alely délky 140 a 150 bp. Jediná zjištěná délka otcovské alely činila 150 bp. Jelikož byla tato délka shodná s délkou matčiny alely, nemohlo být u vzorků usuzováno na přítomnost či nepřítomnost paternálního genomu.

Pozorování lokusu Spl 101 u otce nepřineslo žádnou informaci o délce jeho alel, z čehož vyplývá, že analýza lokusu u potomstva nemohla informovat o přenosu paternální genetické informace. Samičí alela lokusu měla délku 313 bp.

Délky alel 219 a 223 bp lokusu Spl 163 byly charakteristické pro samici, zatímco délky alel 211 a 215bp pro samce. V UV kontrole ani v podskupině gynogenů nebyly samčí alely pozorovány. Stalo se tak pouze u podskupiny kontrola šoku.

Na lokusu Spl 173 byly u matky zaznamenány alely délky 121, 233 a 249 bp. Alely otce délky 121 a 233 bp byly tedy shodné s matčinými a nebylo možné usuzovat na jejich přenos.

Lokus Anac E4 byl u samice i samce reprezentován délkou alel 344 bp. U samce byla dále zjištěna délka 342 bp, jež pro něj byla charakteristická. Mezi alelami UV kontroly a gynogenů nebyla tato délka pozorována.

#### **4.6. Stanovení heterozygotnosti ve skupině č. 2**

Při vyhodnocování míry očekávané a skutečné heterozygotnosti plůdku z podskupiny gynogenů bylo oběma použitými programy dosaženo stejných výsledků. Hodnoty byly stanoveny u sedmi z osmi zkoumaných lokusů. U lokusu Spl 101 nebyla heterozygotnost stanovována, jelikož byl lokus reprezentován pouze jednou alelou, která byla navíc pozorována jen u nízkého počtu analyzovaných jedinců.

Hodnoty očekávané heterozygotnosti jednotlivých lokusů se pohybovaly v širokém rozmezí 0–0,642. Konkrétně odpovídaly 0,642 pro lokus AciG 35; 0,609 pro AfuG 54; 0,478 pro AfuG 135; 0,499 pro Aox 45; 0,508 pro Spl 163; 0,618 pro Spl 173 a 0 pro Anac E4.

Dále bylo zjištěno, že hodnota skutečné heterozygotnosti třech zkoumaných lokusů odpovídala nule. Konkrétně se jednalo o lokusy AfuG 135, Aox 45 a Anac E4. Velmi nízkou úroveň skutečné heterozygotnosti, která měla hodnotu 0,059, vykazoval dále lokus Spl 163. U lokusů AciG 35 a Afu G 54 byla naopak pozorována heterozygotnost kompletní, tedy odpovídající hodnotě 1. V případě lokusu Spl 173 činila hodnota skutečné heterozygotnosti 0,889.

## 5. Diskuze

### 5.1. Generační ryby a kvalita pohlavních produktů

Pro experimentální indukci mitotické gynogeneze jeseterů byl jako modelový druh zvolen jeseter malý. Tato ryba se ve srovnání s jinými druhy jeseterů vyznačuje dřívějším dosahováním pohlavní dospělosti (v přirozených podmínkách samci pohlavně dospívají ve 3.–5. roce života a samice v 5.–8. roce, v řízeném prostředí k tomu dochází ještě o něco dříve) a možností opětovného využití pro výtěr v nedlouhém časovém intervalu (samice dozrávají v jednoletých až dvouletých cyklech, samce lze během jednoho roku využít dokonce několikrát). Tyto vlastnosti činí j. malého vhodným pro vědecké účely (Gela a kol., 2012) a tudíž i pro tento pokus.

Pro výtěr byly vybrány ryby vhodné velikosti a dobré kondice. Snahou bylo získat pro pokus pohlavní produkty nejvyšší možné kvality, proto bylo vytřeno větší množství ryb, jak doporučuje Lebeda a kol. (2015). Po makroskopickém posouzení oocytů a mikroskopickém posouzení spermatu byly pro experiment zvoleny ty pohlavní produkty, které se zdály ze všech posouzených nejkvalitnější.

Na základě nízkých hodnot líhnivosti a neurulace v kontrolních podskupinách, vzniklých prostým oplozením, by se navzdory maximální snaze o vhodnou volbu gamet dalo usuzovat na jejich neuspokojivý výběr. Dettlaff a kol. (1993) uvádí, že pokud jsou inseminovány oocyty dobré kvality, jejich oplozenost se u jeseterů pohybuje mezi 80–90 %. Gela a kol. (2012) tvrdí, že oplozenosti na úrovni 90 % odpovídá líhnivost mezi 60–70 %. V tomto experimentu bylo však v kontrole skupiny č. 1 dosaženo líhnivosti pouhých 47,45 %, v případě skupiny č. 2 dokonce jen 25,93 %. S přihlédnutím k faktu, že motilita spermií se u obou samců pohybovala na úrovni 90 % a více se lze domnívat, že byla nízká úspěšnost zaviněna spíše volbou oocytů.

Na druhou stranu ve skupině č. 1 vykazala procentuální líhnivost podskupiny kontroly šoku aplikovaného po 55 minutách velmi podobnou hodnotu, jako kontrolní podskupina, na kterou nebyl šok uplatněn ( $46,00 \pm 2,9$  %). Ve skupině č. 2 odpovídala líhnivost v kontrolách šoku hodnotám  $30,81 \pm 3,06$  %,  $44,11 \pm 3,46$  % a  $42,06 \pm 11,67$  % (šok 50, 55 a 60 minut po oplození), kontrolní podskupina byla tedy předčena dokonce všemi kategoriemi podskupiny kontrola šoku. Tento fakt se jeví iracionálně, jelikož zastavení mitotického dělení vede k nízkému přežití a častému výskytu abnormálního vývoje po aplikaci šoku, jak uvádí Sakao a kol. (2006). Je tedy možné, že hodnoty neurulace a líhnivosti kontrolních podskupin

byly zkresleny nižším množstvím oocytů ve srovnání s ostatními podskupinami. Toto nižší množství bylo paradoxně zvoleno z důvodu prevence před vysokou mortalitou v průběhu embryogeneze, která by mohla být zaviněna přílišným nahroučením oocytů. Jak totiž uvádí Keskin a kol. (1994), inkubace oocytů při nižších hustotách by měla být nejefektivnější metoda minimalizace rizika jejich infekce, obzvláště pokud jsou v průběhu této inkubace pravidelně odstraňovány oocyty mrtvé, jako tomu bylo v našem pokusu.

## 5.2. Inaktivace paternálního genomu

Pro inaktivaci otcovského genomu bylo v experimentu použito UV záření, jež bývá, jak uvádí Flajšhans a kol. (2013), pro tento účel nejčastěji využíváno. Ozařování bylo realizováno UV crosslinkerem, jenž je, jak zmiňuje Lebeda a kol. (2015), schopen zajistit správné měření dávky UV a celý proces do velké míry usnadňuje. Crosslinkery jsou při indukcích gynogeneze j. malého běžně používány (Lebeda a kol., 2015, Lebeda a kol., 2014b, Lebeda a Flajšhans, 2016). Někteří autoři však pro inaktivaci paternálního genomu j. malého používají i UV lampy (Fopp–Bayat a Woznicki, 2007, Fopp–Bayat a kol., 2007, Recoubratsky a kol., 2003).

Zvolená dávka iradiace byla  $300 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ , ačkoliv Lebeda a kol. (2015), v případě meiotické gynogeneze jesetera malého uvádí jako dostačující dávky v rozmezí  $100\text{--}200 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ . V tomto pokusu byla však zvolena vyšší dávka iradiace z důvodu snahy o maximalizaci inaktivace paternálního genomu, jelikož při ošetření spermatu nižšími dávkami záření hrozí značné riziko, že nebudou malé paternální fragmenty DNA inaktivovány a dojde k jejich přenosu na potomstvo (Komen a Thorgaard, 2007). To poté může, jak uvádí i Lebeda a kol. (2015), vykazovat vyšší procento líhnivosti, je však negynogenetické, což v pokusu není žádoucí.

Jako prevence před fotoreaktivačním procesem bylo v pokusu uplatněno zabalení mikrozkušavek do hliníkové fólie, jež mělo za úkol znemožnit přístup světla ke spermatu do doby aktivace oocytů. Tuto metodu zabránění fotoreaktivačnímu procesu doporučují Lebeda a Flajšhans (2016).

Z důvodu ověření inaktivace paternálního genomu UV světlem zvolených parametrů byla do pokusu zařazena podskupina kontrola UV. Na úspěšnost ošetření lze usuzovat na základě ploidní a mikrosatelitní analýzy jedinců této podskupiny. Ploidie byla analyzována u 53 kusů plůdku obou skupin. Diploidní úroveň byla zjištěna u jediného jedince, zbytek analyzovaného plůdku (98,11%) byl haploidní, což poukazuje na úspěšnou inaktivaci DNA spermatu.

Mikrosatelitní analýza čtyř kusů plůdku vedla ke stejnému závěru, jelikož při ní nebyla na žádném lokusu pozorována alela typická pro samce.

Fopp–Bayat a kol. (2007) použili ve svém pokusu indukce meiotické gynogeneze jesetera malého rovněž několik UV (haploidních) kontrol, přičemž dosáhli kompletní inaktivace (ověřené u každé UV kontroly mikrosatelitní analýzou DNA 10 jedinců a vizuálním potvrzením haploidního syndromu) při úrovních procentuální neurulace 21 a 24 % a líhnivosti 13 a 10 % haploidů. V našem pokusu byla neurální trubice patrná u přibližně u dvojnásobného procenta embryí –  $41,72 \pm 4,92$  % ve skupině č.1 a  $42,27 \pm 1,09$  ve skupině č. 2. Líhnivosti však byly s pokusem Fopp–Bayat a kol. (2007) srovnatelné – skupina č. 1 –  $10,33 \pm 2,97$  % a skupina č. 2 –  $8,77 \pm 0,1$  %.

Na správnou optimalizaci UV ozařovacího protokolu lze dále usuzovat především na základě mikrosatelitní analýzy plůdku z podskupiny gynogenů. Analýze bylo podrobena celkem 20 jedinců, u kterých bylo zkoumáno 8 lokusů. Přítomnost samčích alel nebyla zaznamenána na žádném z pozorovaných lokusů. Vzhledem k tomuto faktu lze konstatovat, že inkorporace paternálního genomu nebyla potvrzena, jelikož byl paternální genom úspěšně inaktivován. Získaný plůdek lze tedy označit za gynogenetický.

### 5.3. Obnovení ploidní úrovně

Pro požadovanou účinnost rediploidizace je zapotřebí optimalizovat všechny 3 parametry šoku – intenzitu, dobu trvání a čas aplikace šoku po fertilizaci (Felip a kol., 2001). Oocyty byly po oplození šokovány ve třech různých časech, což mělo napomoci při hledání optimálního času pro úspěšnou rediploidizaci a čímž mělo být zároveň zamezeno neúspěchu gynogeneze v důsledku špatné volby tohoto parametru. Intenzita šoku a doba jeho trvání byla však totožná u všech vzorků, správná volba těchto parametrů byla tudíž pro úspěch o to více klíčová.

Lebeda a kol. (2015) doporučuje pro indukci meiotické gynogeneze u jesetera malého použití šoku o teplotě 34 °C na dobu 2 minut. Šok totožných parametrů vedl k úspěšnému zisku meiotických gynogenů j. malého i v experimentu Fopp–Bayat a kol. (2007) nebo Fopp–Bayat a Woznicki (2007). Lebeda (2014) se však zabýval také optimalizací parametrů šoku pro indukci tetraploidie u j. malého a nejvyšší dosaženou úspěšnost uvádí při použití šoku 37 °C po dobu 2 minut. Zároveň dodává, že poznatek je uplatnitelný i při indukci gynogeneze. Protokol šoku je totiž v případě indukce tetraploidie obdobný jako při mitotické gynogenezi, jak píše například Flajšhans a kol. (2013). Proto byl i v tomto pokusu zvolen šok

teploty 37 °C, jemuž byly oplozené oocyty vystavovány po dobu 2 minut. Na základě 88,24–100% zastoupení jedinců s požadovanou úrovní ploidie ve většině vzorků na něž byl šok aplikován (podskupiny kontrola šoku a gynogeni) lze usuzovat na vhodnou volbu intenzity a doby trvání šoku. Recoubratsky a kol. (2003) se šokem o teplotě 37 °C při indukci meiotické gynogeneze j. malého neuspěli, na rozdíl nás však použili 2,5 minutovou expozici šoku. Fopp–Bayat a kol. (2007) vyhodnotili jako příčinu jejich neúspěchu právě podmínky šoku, které byly v tomto případě už příliš striktní.

Kontrola šoku (tetraploidizace), zařazená do pokusu, měla za cíl informovat o úspěšnosti zdvojení genomu a procentuálním podílu vylíhnutých jedinců z počtu oplozených a aktivovaných oocytů při časech aplikace šoku 50, 55 a 60 minut po oplození. Indukcí tetraploidie u jeseterů malého a sibiřského se zabývali Lebeda a Flajšhans (2015) a tito autoři uvádí, že vysoké efektivity tetraploidizace bylo dosaženo při použití šoku o teplotě 37 °C po dobu 2 minut, aplikovaného mezi koncem formování samičího prvojádra a začátkem jeho migrace. Tento čas podle autorů odpovídá 0,8–1 to. Dettlaff a kol. (1993) uvádí, že délka mitotického cyklu jesetera malého činí při 16 °C 63–65 minut, pokud by tedy byl brán v úvahu čas 64 minut, šok byl v našem pokusu aplikován při 0,78; 0,86 a 0,94 to. Aplikace šoku 50 minut po fertilizaci tedy těsně nespadá do intervalu, u něhož popisují Lebeda a Flajšhans (2015) vysokou efektivitu. Toto ošetření se také z podskupiny kontroly šoku jeví jako nejméně účinné, jelikož ploidní analýza takto získaných jedinců potvrdila tetraploidii u pouhých 35 % jedinců ze skupiny č. 1 a 64,52 % ze skupiny č. 2. Lebeda (2014) uvádí nejvyšší efektivitu při aplikaci šoku 56 minut po fertilizaci, ošetřením dosáhl líhivosti 34,5±4,3 % a tetraploidie byla potvrzena u 100 % vylíhých jedinců. V našem pokusu byl použit šok aplikovaný o minutu dříve, v první skupině prokázal vysokou hodnotu líhivosti – 46,00±2,9 %, bohužel byli všichni analyzovaní jedinci nežádoucí diploidní úrovně. Ve skupině č. 2 bylo však dosaženo líhivosti 44,11±3,46 a 100 % tetraploidů. Tyto zcela nesourodé výsledky lze vysvětlit snad jen specifickým vývojovým stupněm každé dávky oocytů, který, jak popisuje Van Eenennaam a kol. (1996), optimalizaci vždy velmi komplikuje. K velmi odlišným výsledkům vedla i aplikace šoku při 0,94 to a to v hodnotách procentuální líhivosti, jež dosáhly ve skupině č. 2 42,06±11,67 %, ale ve skupině č. 1 pouhých 1,07±0,6 %. Ploidní úroveň byla však úspěšně obnovena u 90,48 a 100 % plůdku, což lze považovat za nejlepší výsledek podskupiny kontrola šoku.

Šok aplikovaný v čase 0,94 to se jevil jako nejefektivnější ošetření i v případě samotné indukce gynogeneze. Ve skupině č. 1 vedl k líhivosti 11,33±2,42 %, odpovídající 36 kusům



plůdku. Ploidní analýza 19 jedinců vedla k závěru, že diploidie byla obnovena u 89,47 % z nich. Ve skupině č. 2 bylo získáno dokonce 64 kusů plůdku, z 28 kusů vybraných k analýze bylo diploidních 93,33 %. Při šokování v čase 0,78 a 0,86  $\tau$ o již nebyly výsledky tak jednoznačné – v první skupině byl úspěšnější interval 0,86  $\tau$ o (zisk 36 kusů plůdku, líhivost  $10,15 \pm 2,84$  %, 88,24 % diploidů), ve druhé skupině však zcela selhal a byl jím získán pouze jeden jedinec. Šokování v intervalu 0,78  $\tau$ o vedlo k zisku 41 kusů a 100 % účinnosti rediploidizace ve skupině č. 2, ve skupině č. 1 bylo ale z  $14,67 \pm 1,75$  % vylíhlého plůdku pouhých 26,67 % diploidních.

Lebeda a kol. (2015) uvádí jako vhodný čas aplikace šoku při indukci mitotické gynogeneze j. malého 0,9  $\tau$ o, který nebyl v našem pokusu přímo testován. Jelikož se však nachází přesně mezi hodnotami 0,86 a 0,94  $\tau$ o, jež znamenaly zisk mitotických gynogenů s úspěšně obnovenou ploidii vždy minimálně v jedné skupině, lze usuzovat, že bude šokování při 0,9  $\tau$ o vést rovněž k úspěšnému zisku mitotických gynogenů j. malého.

Nejefektivnější čas aplikace šoku v tomto experimentu indukce mitotické gynogeneze (0,94  $\tau$ o) spadá do intervalu, v němž uvádí Lebeda a Flajšhans (2015) vysokou efektivitu tetraploidizace u jesetera malého a sibiřského, tedy 0,8–1  $\tau$ o. Podobný interval 0,8–0,9  $\tau$ o uvádí Shelton (2006) jako optimální i pro indukci mitotické gynogeneze tilapie nilské *Oreochromis niloticus* za použití teplého šoku. U pstruha duhového *Oncorhynchus mykiss* byla mitotická gynogeneze indukována při aplikaci teplého šoku v čase 0,9–1,1  $\tau$ o (Palti a kol., 1997). Některé druhy se však hodnotou  $\tau$ o vhodnou pro aplikaci teplého šoku při indukci značně odlišují, Kašpar a kol. (2014) například doporučuje indukovat mitotickou gynogenezi kapra obecného *Cyprinus carpio* aplikací šoku v čase, jenž při přepočtu na  $\tau$ o odpovídá hodnotě 1,45. Při aplikaci teplého šoku v čase 1,4  $\tau$ o bylo zase získáno největší procentuální množství dvojitých haploidů štiky muskalungy *Esox masquinongy* (Lin a Dabrowski, 1998).

#### **5.4. Úspěšnost indukce mitotické gynogeneze**

Jak uvádí Komen a Thorgaard (2007), potlačení prvního mitotického dělení výrazně zvyšuje mortalitu, snižuje oplozenost a líhivost a vede k vysokému procentu malformovaného potomstva, jež hyne těsně po vykulení. Navzdory těmto faktům bylo v tomto pokusu získáno určité množství gynogenetického potomstva j. malého. Dosažená procentuální líhivost dvojitých haploidů se pohybovala okolo 11 % ve skupině č. 1 (ve skupině č. 2 dá usuzovat i na výrazně vyšší líhivost), což lze považovat za úspěch

s přihlédnutím k faktu, že o mitotické gynogenezi jeseterů bylo dosud k dispozici zcela minimální množství dostupných informací. Ve srovnání s produkcí dvojitých haploidů jiných rybích druhů bylo dosaženo podobné procentuální líhivosti jako v případě experimentu s mořčákem evropským *Dicentrarchus labrax*, u něhož činila okolo 10 % (Francescon a kol., 2004). Vyšší líhivost zaznamenali například Marx a Sukumaran (2007) při indukci mitotické gynogeneze keříčkovce červenolemého *Clarias gariepinus* – 15,33 %. U kapra obecného dosáhl Komen (1990) zisku nejvíce 15 % živého gynogenetického potomstva. Podobně uspěli i Michalik a kol. (2015) při indukci pstruha obecného *Salmo trutta*, v jejichž pokusu se nejvyšší procentuální hodnoty líhivosti pohybovaly okolo 16 %. Naopak při indukci mitotické gynogeneze lína obecného *Tinca tinca* Nowosadem a kol. (2015) nepřesáhlo procentuální množství rozplavaných jedinců 2 %.

Jak uvádí Pandian a Koteeswaran (1998), potlačení prvního mitotického dělení vede k signifikantně vyšší mortalitě než retence druhého pólového tělíska, přežití mitotických gynogenů je tedy obvykle nižší než přežití meiotických gynogenů. Nejinak je tomu i v případě jesetera malého, kde bylo meiotickou gynogenezí získáno 25 % (Fopp–Bayat a kol., 2007) a 21 % vylíhlých jedinců (Fopp–Bayat a Woznicki, 2007) ve srovnání s našimi 11 %, získanými mitotickou gynogenezí. Při meiotické gynogenezí albinotické formy j. malého činila líhivost jen do 5 %, tento experiment však nelze srovnávat s experimenty na běžně zbarvené formě, jelikož recesivně dědičný a pleiotropně působící albinismus výrazně snižuje životaschopnost a líhivost plůdku (Fopp–Bayat a Ocalewicz, 2015). Lze tedy zjednodušeně konstatovat, že v našem pokusu mitotické gynogeneze bylo dosaženo přibližně poloviční procentuální líhivosti plůdku j. malého ve srovnání s gynogenezí meiotickou. U jiných ryb se lze obvykle setkat s výraznějším rozdílem, meiotická gynogeneze keříčkovce červenolemého například vedla k líhivosti 68,66 %, zatímco mitotická v témže pokusu pouze k líhivosti 15,33 % (Marx a Sukumaran, 2007). Flajšhans a kol. (2013) uvádí, že meiotickou gynogenezí kapra obecného bylo různými autory získáno 29–38 % živého diploidního gynogenetického potomstva, zatímco gynogenezí mitotickou 1–15 % potomstva. S řádovým rozdílem se lze setkat u lína obecného, u něhož získali Linhart a kol. (1995) retenci pólového tělíska 21 % rozplavaného plůdku, zatímco Nowosad a kol. (2015) dosáhli supresí mitotického dělení jen 2 % zisku rozplavaných jedinců. U pstruha duhového zase Flajšhans a kol. (2013) uvádí, že různými autory bylo získáno 48–63 % živého diploidního potomstva při meiotické gynogenezí, ale pouhých 1–5 % při gynogenezí mitotické.

## 5.5. Heterozygotnost gynogenů

Aplikace mikrosatelitních DNA márků je, jak uvádí Fopp–Bayat a Furgala–Selezniow (2010), spolehlivou metodou pro studium genové diverzity, proto byla použita i v případě našeho pokusu. Stanovením skutečných hodnot heterozygotnosti bylo však u různých lokusů dosaženo poněkud nesourodých výsledků. Správnost samotného výpočtu byla z tohoto důvodů ověřena použitím dvou programů. Shodnost získaných výsledků prokázala objektivitu výpočtu.

Stanovením míry genetické variability běžně chované populace jesetera malého se zabývali Fopp–Bayat a Furgala–Selezniow (2010). Tito autoři analyzovali šest mikrosatelitních lokusů u 35 kusů ryb a hodnoty heterozygotnosti vyhodnotili rovněž pomocí doplňku programu MICROSOFT EXCEL Microsatellite toolkit. Úrovně skutečné heterozygotnosti jednotlivých lokusů se v jejich experimentu pohybovaly v rozmezí 0,515–0,971, je zde tedy patrná výrazná odchylka od hodnot získaných v našem pokusu. V tom totiž skutečná heterozygotnost hned čtyř lokusů odpovídala výrazně nižší úrovni (0–0,059). Tento patrný rozdíl v úrovních heterozygotnosti mezi běžně chovanými rybami a gynogeny bylo možné předpokládat, jelikož, jak uvádí například Lebeda a kol. (2014b), jedním z typických znaků gynogenetického potomstva je vysoká úroveň homozygotnosti.

Thorgaard (1983) však na druhou stranu uvádí, že mitotiční gynogeni jsou kompletně homozygotní v každém lokusu. Homozygotnosti všech zkoumaných lokusů docílil například Hussain a kol. (1998) při mitotické gynogenezi tilapie nilské. Při některých indukcích mitotické gynogeneze však kompletní homozygotnosti dosaženo nebylo, stejně jako v případě našeho pokusu. Příkladem může být mitotická gynogeneze pstruha duhového (Purdom a kol., 1985), kapra obecného (Komen a kol., 1991) nebo sumečka skvrnitého *Ictalurus punctatus* (Waldbieser a kol., 2010).

## 6. Závěr

Cílem autora bakalářské práce bylo indukovat mitotickou gynogenezí u jesetera malého a seznámit čtenáře s výsledky této indukce.

K inaktivaci paternálního genomu bylo použito UV záření o vlnové délce 254 nm a intenzitě  $45 \text{ W}\times\text{m}^{-2}$  v dávce  $300 \text{ J}\times\text{m}^{-2}$ . Po inaktivaci bylo sperma přechováváno za nepřítomnosti světla, aby bylo zabráněno fotoreaktivačnímu procesu. Oplození a aktivace gamet, stejně jako jejich inkubace do začátku šoku, byly provedeny při fyziologicky normální teplotě pro jesetery, tj.  $16 \text{ }^\circ\text{C}$ . K obnově normální ploidní úrovně byly inaktivovaným spermatem oplozené oocyty vystavovány šoku o teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 2 minut. Tento šok byl iniciován v časech 50, 55 a 60 minut po oplození oocytů. Pro stanovení úspěšnosti jednotlivých ošetření byla do pokusu dále zahrnuta kontrola UV a kontrola šoku. Po realizaci všech ošetření byly oocyty inkubovány při teplotě  $16 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Z důvodu ověření úspěšnosti gynogenetické indukce byla u získaného plůdku provedena mikrosatelitní a ploidní analýza. Mikrosatelitní analýza neprokázala přítomnost paternálního genomu u žádného zkoumaného jedince z podskupiny gynogenů ani UV kontroly. O úspěšnosti inaktivace paternálního genomu vypovídá rovněž ploidní analýza jedinců z kontroly UV, již byla zjištěna haploidní úroveň u 98,11 % ze všech analyzovaných kusů plůdku. Ploidní analýza podskupiny gynogenů vedla k závěru, že nejúspěšnějším rediploidizačním opatřením byl šok aplikovaný 60 minut po oplození, po jehož použití vykazovalo diploidní úroveň 91,84 % všech analyzovaných kusů plůdku.

Na základě výsledků mikrosatelitní a ploidní analýzy lze konstatovat, že použitý postup vedl k zisku mitotických gynogenů j. malého a lze jej tudíž vyhodnotit jako správný. Jako nejefektivnější se jevila aplikace šoku v čase 60 minut po oplození oocytů inaktivovaným spermatem, což odpovídá přibližně 0,94  $\tau$ . Použití šoku tohoto parametru vedlo k dosažení stádia neuruly u  $52,30\pm 17,24 \%$  embryí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů a líhivosti na úrovni  $11,33\pm 2,42 \%$ .

Indukce mitotické gynogeneze j. malého proběhla úspěšně a použitý postup je tudíž možné doporučit. Jelikož se jednalo o jednu z vůbec prvních indukcí mitotické gynogeneze jeseterů, může být zvolený postup zároveň inspirací pro nové studie, zabývající se danou problematikou. Tyto studie by mohly být klíčem k dalšímu poznání v oblasti jeseteří genetiky. Analýza mitotických gynogenů, které se vyznačují vysokou úrovní homozygotnosti, může totiž znamenat rozhodující krok k objasnění pohlavního determinačního mechanismu jeseterů a poodhalit tak další tajemství těchto tajuplných, archaických ryb.

## 7. Seznam použité literatury

- Badrtdinov, O.A., Kovalev, K.V., Lebedeva, E.B., Vasil'eva, E.D., Recoubratsky, A.V., Grunina, A.S., Chebanov, M.S., Vasil'ev, V.P., 2008. Entirely male gynogenetic offspring of *Acipenser stellatus* (Pisces, Acipenseridae). Doklady Akademii Nauk 423(1), 120–123.
- Bartley, D.M., 1997. Genetics and breeding in aquaculture: current status and trends. Cahiers Options Méditerran 34, 13–30.
- Bronzi, P., Rosenthal, H., Gessner, J., 2011. Global sturgeon aquaculture production: an overview. Journal of Applied Ichthyology 27(2), 169–175.
- Cal, R.M., Vidal, S., Martínez, P., Álvarez–Blázquez, B., Gómez, C., Piferrer, F., 2006. Growth and gonadal development of gynogenetic diploid *Scophthalmus maximus*. Journal of Fish Biology 68(2), 401–413.
- Dettlaff, T.A., Ginsburg A.S., Schmalhausen O.I., 1993. Sturgeon fishes: developmental biology and aquaculture. Springer London, United Kingdom, p. 313.
- Dubský, K., Kouřil, J., Šrámek, V., 2003. Obecné rybářství. Informatorium Praha, 308 s.
- Velíšek, J., Pyszko, M., 2014. Endokrinní soustava. In: Kolářová, J. (Ed.), Anatomie a fyziologie ryb. FROV JU, Vodňany, pp. 123–130.
- Esmaily, A.H., Kalbassi, M.R., Pusti, I., Abdolhay, H., 2004. Induction of mitotic and meiotic gynogenesis in rainbow trout (with emphasis on determination of polar body extrusion and first cleavage times). Proceedings of the fourth International Iran & Russia Conference, Iran, September 8–10, 2004, pp. 74–80.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F., 2001. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. Genetica 111(1–3), 175–195.
- Flajšhans, M., Ráb, P., Linhart, O., 2013. In: Flajšhans (Ed.), Genetika a šlechtění ryb. Druhé rozšířené a upravené vydání. FROV JU, pp. 151–196.

- Flajšhans, M., Linhart, O., Kvasnička, P., 1993. Genetic studies of tench (*Tinca tinca* L.): induced triploidy and tetraploidy and first performance data. *Aquaculture* 113(4), 301–312.
- Flynn, S.R., Matsuoka, M., Reith, M., Martin–Robichaud, D.J., Benfey, T.J., 2006. Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. *Aquaculture* 253(1), 721–727.
- Fopp–Bayat, D., 2010. Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Aquaculture* 305(1), 174–177.
- Fopp–Bayat, D., Furgała–Selezniew, G., 2010. Application of microsatellite DNA variation in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*) and sterlet *Acipenser ruthenus* cultured in a Polish fish farm. *Polish Journal of Natural Sciences* 25(2), 173–181.
- Fopp–Bayat, D., Kolman, R., Woznicki, P., 2007. Induction of meiotic gynogenesis in sterlet (*Acipenser ruthenus*) using UV-irradiated bester sperm. *Aquaculture* 264(1), 54–58.
- Fopp–Bayat, D., Ocalewicz, K., 2015. Activation of the albino sterlet *Acipenser ruthenus* eggs by UV-irradiated bester hybrid spermatozoa to provide gynogenetic progeny. *Reproduction in domestic animals* 50(4), 554–559.
- Fopp–Bayat, D., Woznicki, P., 2007. Spontaneous and induced gynogenesis in sterlet *Acipenser ruthenus* Brandt. *Caryologia* 60, 315–318.
- Francescon, A., Libertini, A., Bertotto, D., Barbaro, A., 2004. Shock timing in mitogynogenesis and tetraploidization of the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 236(1), 201–209.
- Gela, D., Kahanec, M., Rodina, M., 2012. Metodika odchovu raných stadií jeseterovitých ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 126, 46 s.
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). Edice Metodik, VÚRH JU Vodňany, č. 78, 24 s.
- Grunina, A.S., Recoubratsky, A.V., Tsvetkova, L.I., Barmintseva, A.E., Vasil'eva, E.D., Kovalev, K.V., Poluektova, O.G., 2011. Dispermic androgenesis in sturgeons with the help of cryopreserved sperm: production of androgenetic hybrids between Siberian and Russian sturgeons. *Ontogenez* 42(2), 133–145.

- Horváth, L., Orbán, L., 1995. Genome and gene manipulation in the common carp. *Aquaculture* 129(1), 157–181.
- Hubbs, C.L., Hubbs, L.C., 1932. Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish of hybrid origin. *Science* 76, 628–630.
- Hussain, M.G., Penman, D.J., McAndrew, B.J., 1998. Production of heterozygous and homozygous clones in Nile tilapia. *Aquaculture International* 6(3), 197–205.
- Ihsen, P.E., McKay, L.R., McMillan, I., Phillips, R.B., 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. *Transactions of the American Fisheries Society* 119(4), 698–717.
- Kašpar, V., Rodina, M., Flajšhans, M., 2014. Hromadná indukce gynogeneze a androgeneze u kapra obecného (*Cyprinus carpio*). *Edice Metodik č. 145, FROV JU, Vodňany*, 29 s.
- Keskin, M., Keskin, M., Rosenthal, H., 1994. Pathways of bacterial contamination during egg incubation and larval rearing of turbot, *Scophthalmus maximus*. *Journal of applied ichthyology* 10(1), 1–9.
- Komen, J., 1990. Clones of common carp, *Cyprinus carpio*: New perspectives in fish research. Ph.D. dissertation, Agricultural University Wageningen, Department of Fish Culture and Fisheries, and Department of Experimental Animal Morphology and Cell Biology, Netherlands.
- Komen, J., Bongers, A.B.J., Richter, C.J.J., Van Muiswinkel, W.B., Huisman, E.A., 1991. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.): II. The production of homozygous gynogenetic clones and F1 hybrids. *Aquaculture* 92, 127–142.
- Komen, H., Thorgaard, G.H., 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. *Aquaculture* 269(1), 150–173.
- Kouřil, J., Mareš, J., Pokorný, J., Adámek, Z., Randák T., Kolářová, J., Palíková, M., 2008. Chov lososovitých druhů ryb, lipana a síhů. *VÚRH JU Vodňany*, 141 s.
- Lebeda, I., 2014. Optimization of chromosomal manipulations in Acipenserids. Ph.D. dissertation, FROV JU, Vodňany.

- Lebeda, I., Dzyuba, B., Rodina, M., Flajšhans, M., 2014a. Optimization of sperm irradiation protocol for induced gynogenesis in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Aquaculture international* 22(2), 485–495.
- Lebeda, I., Flajšhans, M., 2015. Technical note: Production of tetraploid sturgeons. *Journal of animal science* 93(8), 3759–3764.
- Lebeda, I., Flajšhans, M., 2016. Influence of photoreactivation on induction of gynogenesis in sterlet, *Acipenser ruthenus*. *Aquaculture Research* 47(4). 1364–1368.
- Lebeda, I., Flajšhans, M., Rodina, M., Havelka, M., Gela, D., 2015. Produkce gynogenetických populací jesetera malého. *Edice Metodik č. 149, FROV JU, Vodňany*, 32 s.
- Lebeda, I., Gazo, I., Flajšhans, M., 2014b. Chemical induction of haploid gynogenesis in sterlet *Acipenser ruthenus*. *Czech Journal of Animal Science* 59(7), 310–318.
- Lebedeva, E.B., Vasil'ev, V.P., Ryskov, A.P., 2005. The gynogenetic form of fish from the genus *Cobitis (Cobitidae)* in a region of its geographic range is monoclonal: DNA fingerprinting data. *Doklady Biological Sciences* 401(1), 107–109.
- Lin, F., Dabrowski, K., 1998. Androgenesis and homozygous gynogenesis in muskellunge (*Esox masquinongy*): evaluation using flow cytometry. *Molecular Reproduction and Development* 49(1), 10–18.
- Linhart, O., Gela, D., Rodina, M., 2000. Umělá reprodukce veslonosa amerického (*Polyodon spathula*). *Edice Metodik, VÚRH Vodňany, č. 64*, 16 s.
- Linhart, O., Kvasnička, P., Flajšhans, M., Kasal, A., Ráb, P., Paleček J., Šlechta, V., Hamáčková, J., Prokeš, M., 1995. Genetic studies with tench, *Tinca tinca* L.: induced meiotic gynogenesis and sex reversal. *Aquaculture* 132(3), 239–251.
- Liu, S., Qin, Q., Wang, Y., Zhang, H., Zhao, R., Zhang, C., Luo, K., 2010. Evidence for the formation of the male gynogenetic fish. *Marine biotechnology* 12(2), 160–172.
- Ludwig, A., Debus, L., Jenneckens, I., 2002. A molecular approach to control the international trade in black caviar. *International Review of Hydrobiology* 87(5–6), 661–673.



- Marx, K.K., Sukumaran, N., 2007. Comparison of effectiveness of heat and cold shocks applied in the induction of gynogenesis in *Clarias gariepinus* (Burchell). *Bangladesh Journal of Fisheries Research* 11(2), 131–140.
- McQuown, E.C., Sloss, B.L., Sheehan, R.J., Rodzen, J., Tranah, G.J., May, B., 2000. Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: new primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*. *Transactions of the American Fisheries Society* 129(6), 1380–1388.
- Michalik, O., Dobosz, S., Zalewski, T., Sapota, M., Ocalewicz, K., 2015. Induction of gynogenetic and androgenetic haploid and doubled haploid development in the brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus 1758). *Reproduction in domestic animals* 50(2), 256–262.
- Mims, S.D., Shelton, W.L., Linhart, O., Wang, Ch., Gomelsky, B., Onders, R.J., 2005. Application of a temperature-dependent mitotic interval ( $\tau_0$ ) for induction of diploid meiotic gynogenetic paddlefish. *North American Journal of Aquaculture* 67(4), 340–343.
- Mims, S.D., Shelton, W.L., Linhart, O., Wang, C.Z., 1997. Induced meiotic gynogenesis of paddlefish *Polyodon spathula*. *Journal of the World Aquaculture Society* 28(4), 334–343.
- Mims, S.D., Shelton, W.L., 1995. A method for irradiation of shovelnose sturgeon, *Scaphirhynchus platyrhynchus*, milt to induce gynogenesis for paddlefish, *Polyodon spathula*. In: *Proceedings of the Fourth Asian Fishery Forum, Beijing*, pp. 395–397.
- Mims, S.D., Shelton, W.L., 1998. Induced meiotic gynogenesis in shovelnose sturgeon. *Aquaculture International* 6(5), 323–329.
- Morgan, A.J., Murashige, R., Woolridge, C.A., Luckenbach, J.A., Watanabe, W.O., Borski, R.J., Godwin, J., Daniels, H.V., 2006. Effective UV dose and pressure shock for induction of meiotic gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) using black sea bass (*Centropristis striata*) sperm. *Aquaculture* 259(1), 290–299.
- Nowosad, J., Kucharczyk, D., Liszewski, T., Targońska, K., Kujawa, R., 2015. Comparison of temperature shock timing to induced artificial mitotic gynogenesis and androgenesis in common tench. *Aquaculture International* 23(1), 45–53.
- Omoto, N., Maebayashi, M., Adachi, S., Arai, K., Yamauchi, K., 2005. Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female x *Acipenser ruthenus* male). *Aquaculture* 245(1), 39–47.

- Palti, Y., Li, J.J., Thorgaard, G.H., 1997. Improved efficiency of heat and pressure shocks for producing gynogenetic rainbow trout. *The Progressive fish-culturist* 59(1), 1–13.
- Pandian, T.J., Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384(1–3), 167–243.
- Peruzzi, S., Chatain, B., 2000. Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability. *Aquaculture* 189(1), 23–37.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J–C., Flajšhans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293(3), 125–156.
- Pourkazemi, M., Mohseni, M., Nowrouzfashkhami, M.R., Baradaran Noveiri, S., Alipour, A., 2000. Induction of gynogenesis in beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). International Sturgeon Research Institute in Iran personal communication.
- Purdom, C.E., Thompson, D., Lou, Y.D., 1985. Genetic engineering in rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, by the suppression of meiotic and mitotic metaphase. *Journal of fish biology* 27(1), 73–79.
- Recoubratsky, A., Grunina, A., Barmintsev, V., Golovanova, T., Chudinov, O., Abramova, A., Panchenko, N., Kupchenko, S., 2003. Meiotic gynogenesis in the stellate and Russian sturgeon and sterlet. *Russian Journal of Developmental Biology* 34(2), 92–101.
- Rodina, M., Cosson, J., Gela, D., Linhart, O., 2004. Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture International* 12(1), 119–131.
- Saber, M.H., Noveiri, S.B., Pourkazemi, M., Yarmohammadi, M., 2008. Induction of gynogenesis in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) and its verification using microsatellite markers. *Aquaculture Research* 39(14), 1483–1487.
- Sakao, S., Fujimoto, T., Kimura, S., Yamaha, E., Arai, K., 2006. Drastic mortality in tetraploid induction results from the elevation of ploidy in masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Aquaculture* 252(2), 147–160.

- Sanders, B.J., Fadel, J.G., Wade, E.M., 2003. Economic optimization modeling of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) caviar and meat production under different management conditions. *Aquaculture* 217(1), 409–430.
- Shelton, W.L., 2006. Regulated sex control in commercially important fishes – a physiological perspective. *The Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh* 58(4), 351–365
- Shelton, W.L., Mims, S.D., Clark, J.A., Hiott, A.E., Wang, Ch., 1997. A temperature-dependent index of mitotic interval ( $\tau$ ) for chromosome manipulation in paddlefish and shovelnose sturgeon. *The Progressive Fish-Culturist* 59(3), 229–234.
- Shelton, W.L., Mims, S.D., 2012. Evidence for female heterogametic sex determination in paddlefish *Polyodon spathula* based on gynogenesis. *Aquaculture* 356, 116–118.
- Schlupp, I., Parzefall, J., Scharl, M., 1991. Male mate choice in mixed bisexual/unisexual breeding complexes of *Poecilia* (*Teleostei: Poeciliidae*). *Ethology* 88(3), 215–222.
- Schuelke, M., 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology* 18(2), 233–234.
- Štěch, L., Linhart, O., Shelton, W.L., Mims, S.D., 1999. Minimally invasive surgical removal of ovulated eggs from paddlefish. *Aquaculture International* 7(2), 129–133.
- Cheeseman, K.H., Slater, J.F., 1992. An introduction to free radical biochemistry. In: Cheeseman, K.H., Slater, T.S. (Eds.), *Free Radicals in Medicine*. Churchill Livingstone, New York, pp. 481–493.
- Thorgaard, G.H., 1983. Chromosome sex manipulation and sex control in fish. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), *Fish physiology: Volume IX: Reproduction: Part B: Behavior and Fertility control*. Academic Press, New York, pp. 405–434.
- Van Eenennaam, A.L., Van Eenennaam, J.P., Medrano, J.F., Doroshov, S.I., 1996. Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). *Aquaculture* 147(3), 177–189.
- Van Eenennaam, A.L., Van Eenennaam, J.P., Medrano, J.F., Doroshov, S.I., 1999. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. *Journal of Heredity* 90(1), 231–233.

- Waldbieser, G.C., Bosworth, B.G., Quiniou, S.M., 2010. Production of viable homozygous, doubled haploid channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Marine biotechnology* 12(4), 380–385.
- Williot, P., Sabeau, L., Gessner, J., Arlati, G., Bronzi, P., Gulyas, T., Berni, P., 2001. Sturgeon farming in Western Europe: recent developments and perspectives. *Aquatic Living Resources* 14(6), 367–374.
- Wirth, M., Kirschbaum, F., Gessner, J., Williot, P., Patriche, N., Billard, R., 2002. Fatty acid composition in sturgeon caviar from different species: Comparing wild and farmed origins. *International review of hydrobiology* 87(5–6), 629–636.
- Zou, Y.C., Wei, Q.W., Pan, G.B., 2011. Induction of meiotic gynogenesis in paddlefish (*Polyodon spathula*) and its confirmation using microsatellite markers. *Journal of Applied Ichthyology* 27(2), 496–500.

## 8. Seznam obrázků, grafů a příloh

### Obrázky:

Obr. č. 1: Schéma indukce meiotické gynogeneze (upraveno podle Flajšhanse a kol., 2013).....	19
Obr. č. 2: Schéma indukce mitotické gynogeneze (upraveno podle Flajšhanse a kol., 2013).....	20
Obr. č. 3: Histogram směsného vzorku haploidního a diploidního plůdku j. malého z průtokové cytometrie.....	33
Obr. č. 4: Výsledný produkt elektroforézy.....	34
Obr. č. 5: Výsledek mikrosatelitní analýzy ze sekvenátoru Analyzer 3500 (Applied Biosystems, TM), zobrazený v programu GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems, TM).....	35

### Grafy:

Graf č. 1: Procentuální hodnoty neurulace a líhivosti při použití různých ošetření ve skupině č. 1.....	37
Graf č. 2: Procentuální zastoupení jednotlivých ploidních úrovní analyzovaného plůdku ze skupiny č. 1 při použití různých ošetření.....	41
Graf č. 3: Procentuální zastoupení jednotlivých ploidních úrovní analyzovaného plůdku ze skupiny č. 2 při použití různých ošetření.....	42

### Přílohy:

Příloha č. 1: UV crosslinker CL-1000, použitý k inaktivaci paternálního genomu spermatu. Foto I. Lebeda.....	63
--	----

Příloha č. 2: Inkubace oocytů na Petriho miskách v maloobjemovém průtočném inkubátoru. Foto I. Lebeda.....	63
Příloha č. 3: Embrya ve stádiu neuruly, zdokumentovaná po dvou dnech inkubace v maloobjemovém průtočném inkubátoru. Foto I. Lebeda.....	64
Příloha č. 4: Makroskopicky rozpoznatelný rozdíl mezi diploidním plůdkem (vlevo) a haploidním plůdkem (vpravo). Foto I. Lebeda.....	64
Příloha č. 5: Příprava na elektroforézu za účelem kontroly kvality PCR produktů. Foto I. Lebeda.....	65
Příloha č. 6: Výsledky mikrosatelitní analýzy pro markery AciG 35, AfuG 54, AfuG 135 a Aox 45.....	66
Příloha č. 7: Výsledky mikrosatelitní analýzy pro markery Spl 101, Spl 163, Spl 173 a Anac E4.....	67

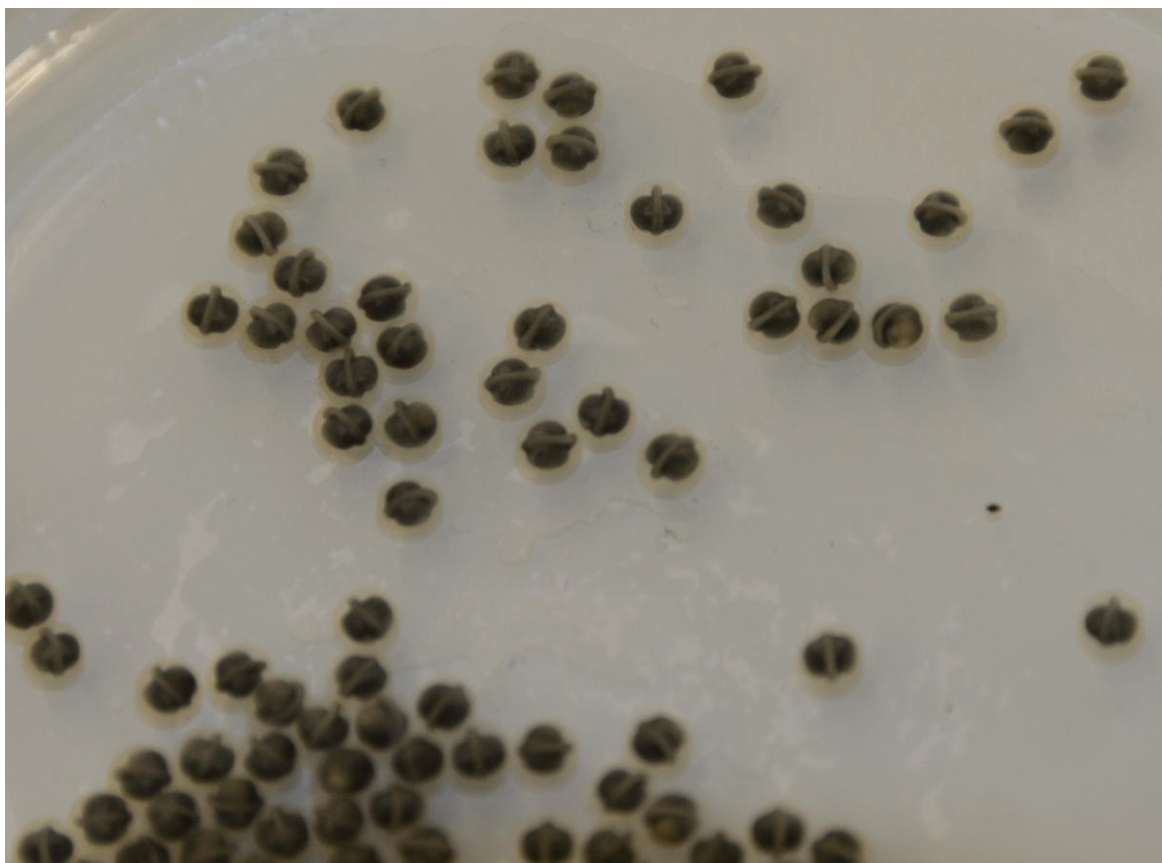
## 9. Přílohy



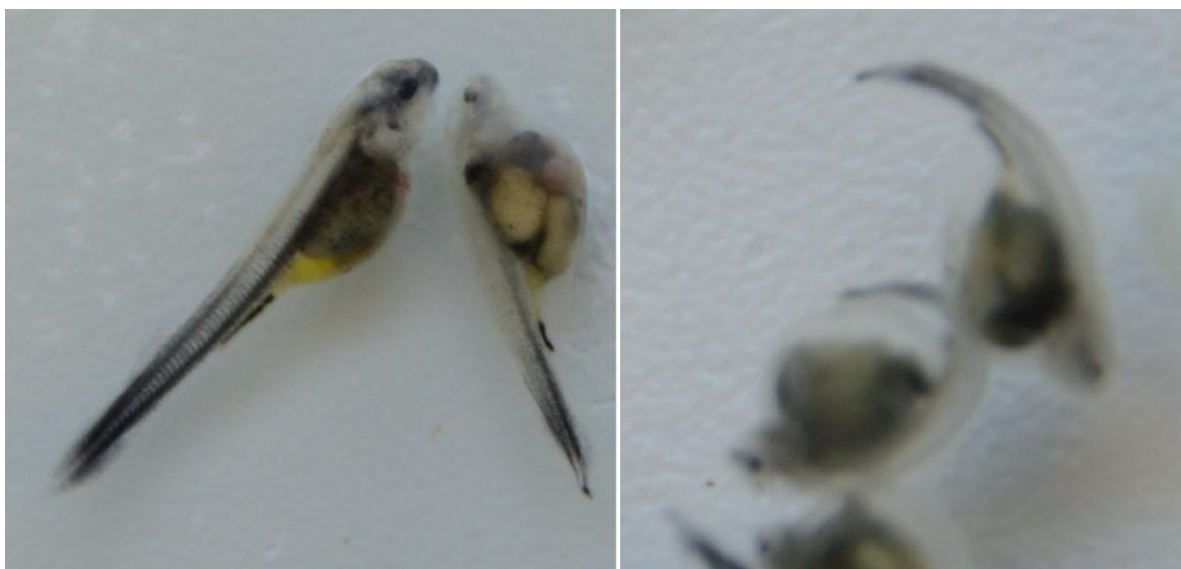
Příloha č. 1: UV crosslinker CL-1000, použitý k inaktivaci paternálního genomu spermatu. Foto I. Lebeda



Příloha č. 2: Inkubace oocytů na Petriho miskách v maloobjemovém průtočném inkubátoru. Foto I. Lebeda

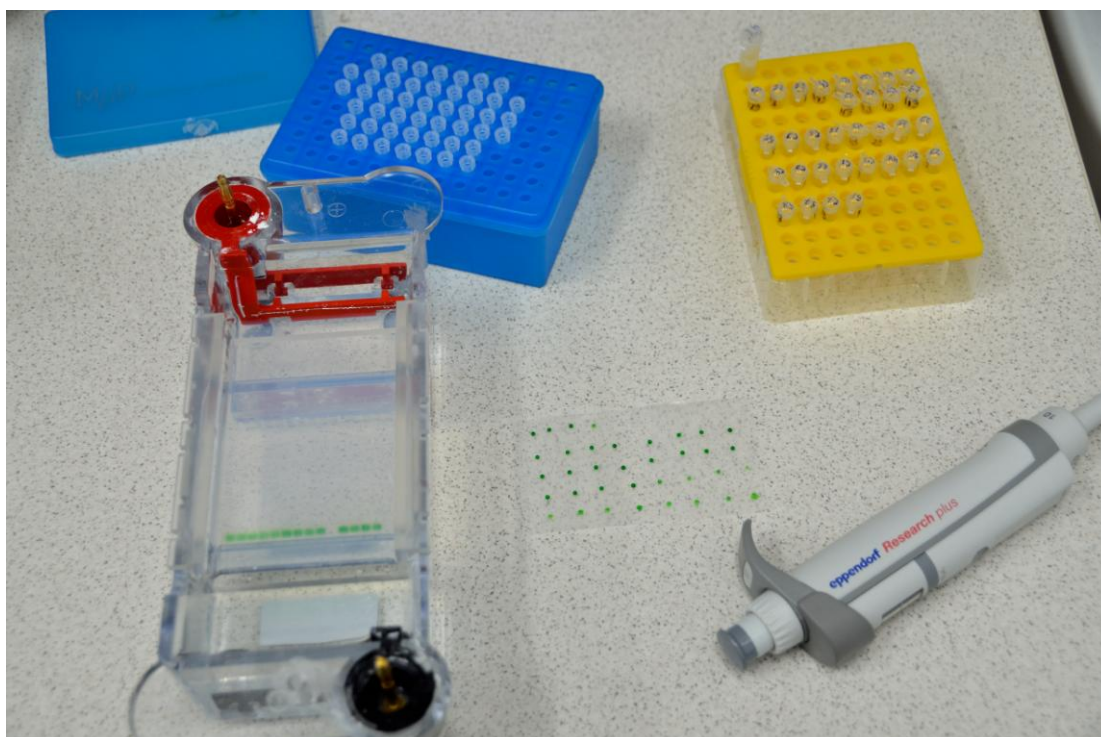


Příloha č. 3: Embrya ve stádiu neuruly, zdokumentovaná po dvou dnech inkubace v maloobjemovém průtočném inkubátoru. Foto I. Lebeda



Příloha č. 4: Makroskopicky rozpoznatelný rozdíl mezi diploidním plůdkem (vlevo) a haploidním plůdkem (vpravo). Foto I. Lebeda





Příloha č. 5: Příprava na elektroforézu za účelem kontroly kvality PCR produktů. Foto I. Lebeda

Příloha č. 6: Výsledky mikrosatelitní analýzy pro markery AciG 35, AfuG 54, AfuG 135 a Aox 45.

vzorek	dávka, J/m <sup>2</sup>	čas šoku, min	AciG 35						AfuG 54				AfuG 135			Aox 45	
			270	274	275	283	286	291	236	255	259	263	205	209	213	140	150
samice 3150	samice 3150	samice 3150	3966	3739		6875			*	*	*			15531	13514	2983	2464
samice 3150	samice 3150	samice 3150	4917	4409		8105			*	*	*		864	14877	10170	1724	1419
samec 4536	samec 4536	samec 4536			1965		3457	1681	*	*		*	7120	6914	6646		1639
samec 4536	samec 4536	samec 4536							*	*		*	16137	1447	15127		3503
2UV CONT1	300	---	735			718			*		*						949
2UV CONT2	300	---		506		464			*	*					1151		467
2UV CONT3	300	---		700		637			*		*			2195			294
2UV CONT5	300	---	1810			1756			*	*					1983		260
2T50 - 3	300	50		939		836	791	797	*	*		*	2412		2121	315	307
2T50 - 4	300	50	418			362	373	340	*	*			3901		2638		898
2T50 - 5	300	50	756			704	642	649	*		*	*		1270	1120	203	186
2T50 - 6	300	50	855		814	753	716		*	*			3523		3415		772
2G50 - 1	300	50	1250			1210			*	*				2851			494
2G50 - 2	300	50		1260		1173			*	*				20859		1379	
2G50 - 3	300	50		1953		1897			*		*			32508		603	
2G50 - 4	300	50	1440			1331			*		*			3916			339
2G50 - 5	300	50		2673		2539			*	*					8007		683
2G50 - 6	300	50	1641			1614			*	*					5455		300
2G50 - 7	300	50	2733			2567			*	*				6781		581	
2G60 - 1	300	60	1230			1271			*	*							558
2G60 - 3	300	60		1067		1073			*	*					7713	740	
2G60 - 4	300	60		664		689			*	*					2393		207
2G60 - 5	300	60	1040			973			*	*				12645			281
2G60 - 6	300	60		1123		1086			*	*					6318		
2G60 - 21	300	60	2552			2399			*		*			11345		940	
2G60 - 22	300	60		1878		1871			*	*					6034		
2G60 - 23	300	60	3902			3752			*	*				12051		1024	
2G60 - 24	300	60	2686			2525			*	*				13710		1583	
2G60 - 25	300	60		3306		3202			*		*			12578			1851
2G60 - 27	300	60		182		184			*		*			12452			3770
2G60 - 28	300	60	1541			1389			*	*					9703		
2G60 - 29	300	60							*	*				15893			1583

Příloha č. 7: Výsledky mikrosatelitní analýzy pro markery Spl 101, Spl 163, Spl 173 a Anac E4.

vzorek	dávka, J/m <sup>2</sup>	čas šoku, min	Spl 101	Spl 163				Spl 173			Anac E4	
				313	211	215	219	223	121	233	249	342
samice 3150	samice 3150	samice 3150	7775				10930	9661	2494			*
samice 3150	samice 3150	samice 3150	9020				17237	15278	7809	5707	5531	*
samec 4536	samec 4536	samec 4536		14637	12764				962	365		*
samec 4536	samec 4536	samec 4536		17288	15163				1235	585		*
2UV CONT - 1	300	---					15738		1541	4110		*
2UV CONT - 2	300	---										*
2UV CONT - 3	300	---										*
2UV CONT - 5	300	---										*
2T50 - 3	300	50	974	10873				9554				*
2T50 - 4	300	50	2197	6103				5508				*
2T50 - 5	300	50			2927			2675				*
2T50 - 6	300	50		7415				6359	87			*
2G50 - 1	300	50					7305		43			*
2G50 - 2	300	50						3805	1399		2785	*
2G50 - 3	300	50					4463		417	221		*
2G50 - 4	300	50	3533				12266		216	78		*
2G50 - 5	300	50					11546		629		189	*
2G50 - 6	300	50						6115	2074	4317		*
2G50 - 7	300	50					801		256	163		*
2G60 - 1	300	60						4313	296		532	*
2G60 - 3	300	60						55				*
2G60 - 4	300	60	3025					1878		719	1898	*
2G60 - 5	300	60						9052	208	111		*
2G60 - 6	300	60						3755				*
2G60 - 21	300	60							1507		3522	*
2G60 - 22	300	60						11503	322	344		*
2G60 - 23	300	60							3094	8782		*
2G60 - 24	300	60						14242	929	3758		*
2G60 - 25	300	60	16760					1870	14769	1323	3867	*
2G60 - 27	300	60						17518			6444	*
2G60 - 28	300	60						2447	1008	3600		*
2G60 - 29	300	60	31020						1026	2724		*

## 10. Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá indukovanou gynogenezí jeseterovitých ryb.

Teoretická část práce popisuje obecné základy indukované gynogeneze ryb a blíže se zaměřuje na publikované výsledky gynogeneze jeseterů. Shrnuje používané metody a jednotlivé kroky gynogenetické indukce a v neposlední řadě také význam jejího praktického využití.

Praktická část práce seznamuje s výsledky experimentální indukce mitotické gynogeneze jesetera malého. Shrnuje úspěšnost jednotlivých kroků, usuzuje na správnost použitého postupu, porovnává zjištěné výsledky a přináší jedny z prvních informací o optimalizaci protokolu mitotické gynogeneze jeseterů.

Úspěšnost experimentální mitotické gynogeneze byla vyhodnocena pomocí mikrosatelitní a ploidní analýzy. Mikrosatelitní analýza neprokázala přítomnost paternálního genomu v získaném potomstvu. Ploidní analýzou bylo zjištěno, že obnovení běžné somatické úrovně proběhlo neefektivněji při uplatnění teplého šoku 60 minut po oplození oocytů inaktivovaným spermatem. Aplikace šoku tohoto parametru vedla k dosažení stádia neuruly u  $52,30 \pm 17,24$  % embryí z počtu oplozených a aktivovaných oocytů a líhivosti na úrovni  $11,33 \pm 2,42$  %.

Mikrosatelitní a ploidní analýza potvrdily úspěšnost gynogenetické indukce a tudíž i správnost uplatněného postupu. Líhivost mitotických gynogenů jesetera malého byla srovnatelná s líhivostmi mitotických gynogenů jiných rybích druhů, na základě čehož lze experiment rovněž označit za úspěšný.

Jelikož se jednalo o jednu z prvních indukcí mitotické gynogeneze jeseterů, může být zvolený postup inspirací pro nové studie této problematiky. Analýza mitotických gynogenů může v budoucnu přispět k objasnění dosud nepříliš prozkoumaného pohlavního determinačního mechanismu jeseterů.

Klíčová slova: mitotická gynogeneze, jeseter malý, teplý šok, mikrosatelitní analýza, analýza ploidní úrovně

## 11. Abstract

This bachelor thesis deals with the induction of gynogenesis in sturgeons.

Theoretical part of thesis describes general basics of the induction of gynogenesis in fish and focuses on the published results of gynogenesis in sturgeon. It recapitulates the methods used and the different steps of gynogenesis induction and, last but not least, the importance of its practical use.

Practical part of thesis acquaints with the results of experimental induction of mitotic gynogenesis in sterlet. It recapitulates the effectiveness of different steps, concludes on correctness of the performed process, compares the obtained results and brings one of the first information about optimization of the mitotic gynogenesis protocol in sturgeons.

The effectiveness of experimental mitotic gynogenesis was assessed by ploidy level analysis and microsatellite analysis. Microsatellite analysis did not show the presence of paternal genome in the progeny obtained. Ploidy level analysis revealed that the most successful way of somatic ploidy restoration was applying of heat shock 60 minutes after fertilization of oocytes by genetically inactivated sperm. The application of shock with this parameter resulted in reaching the neurula stage in  $52,30 \pm 17,24$  % embryos from a number of fertilized and activated oocytes, and the hatching rate was  $11,33 \pm 2,42$  %.

Microsatellite and ploidy level analyses verified the effectiveness of gynogenesis induction as well as the correctness of the process used. Hatching rate of sterlet mitotic gynogens was comparable to the hatching rates of other fish species. It means that the experiment could be classified as successful.

The process used could be an inspiration for new studies, because this study is one of the first inductions of mitotic gynogenesis in sturgeons so far. Analysis of mitotic gynogens could contribute to the investigation of yet not very well understood sex determination system of sturgeons in the future.

Keywords: mitotic gynogenesis, sterlet, heat shock, microsatellite analysis, ploidy level analysis