

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce
Polyploidie u jeseterů

Autor: Jiří Srp
Vedoucí bakalářské práce: Doc. Ing. Martin Flajšhans Dr. rer. agr.
Konzultant bakalářské práce: Ing. Marek Rodina
Místo a rok odevzdání: České Budějovice, 2010

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Katedra rybářství a myslivosti

Akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jiří SRP**

Studijní program: **B4103 Zootechnika**

Studijní obor: **Rybářství**

Název tématu: **Polyploidie u jeseterů**

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 genetiky jeseterovitých ryb se zaměřením na cytogenetické aspekty polyploidie a osvojit si základy reprodukce a odchovu jeseterovitých ryb v podmínkách středoevropské akvakultury. Student získá přehled o metodách určení ploidní úrovně u ryb, metodách umělé reprodukce, způsobu značení ryb, odběrech a hodnocení vzorků populací pro účely cytogenetických analýz. V experimentální části bude student pracovat se vzorky různých druhů jeseterů a jejich hybridů, stanoví jejich ploidní úrovně a pokusí se na jejich základě odvodit dopady spontánní polyploidie a mezidruhové hybridizace na ochranu biodiverzity těchto ohrožených druhů.

Rozsah grafických prací: **podle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 - 30 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

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

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

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

a další podle požadavků vedoucího


Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Martin Flajšhans, Dr. rer. Agr.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Marek Rodina**
Katedra rybářství a myslivosti

Datum zadání bakalářské práce: **6. června 2008**
Termín odevzdání bakalářské práce: **15. dubna 2010**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13 ④
370 05 České Budějovice


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
děkan

L.S.


doc. Ing. Petr Hartvich, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 25. března 2009

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 případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU (viz opatření rektora č. R 83). Zveřejnění je elektronickou formou v databázi STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Datum: 5. 5. 2010

Podpis studenta:

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

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

Obsah

1. Úvod	6
2. Literární přehled	8
2.1 Systematické zařazení jeseterovitých ryb (<i>Acipenseridae</i>)	8
2.1.1 Zeměpisné rozšíření	10
2.2 Důvody úbytku jeseterů ve volných vodách a ochrana CITES	12
2.3 Historie jeseterů v bývalém ČSR a odchov v evropských podmínkách ..	15
2.4 Značení ryb a jejich umělá reprodukce	20
2.5 Biologie jeseterů	28
2.6 Polyploidie	30
2.6.1 Evoluční dopady polyploidie	34
2.7 Metody stanovení úrovně ploidie	35
2.8 Genetika jeseterovitých ryb	38
2.9 Ochrana genofondu	44
2.9.1 Ochrana rozmanitosti druhu	45
2.9.2 Ochrana vnitrodruhové (genetické) diverzity	46
3. Materiál a metodika	48
3.1 Použité druhy jeseterů	48
3.2 Získávání vzorků	51
3.3 Příprava vzorků a preparátů	53
3.4 Použité metody stanovení úrovně ploidie	56
3.5 Potřebná zařízení, přístroje, vybavení a jejich použití	59
4. Výsledky	61
4.1 Výsledky měření velikosti genomu	61
4.2 Stanovení velikosti genomu u standardních a polyploidních jedinců	67
4.3 Prokázání závislosti velikosti jádra na obsahu DNA	75
5. Diskuse	76
5.1 Vliv polyploidie v rybářské praxi	80
6. Závěr	82
7. Seznam literatury	83
8. Abstrakt	98
9. Přílohy	100

1. Úvod

Jeseteři (*Acipenseriformes*) jsou jedni z nejpozoruhodnějších a nejzajímavějších ryb, které nám na této planetě zatím ještě zůstaly. Jedná se o evolučně velmi starý řád ryb, patřící do nadřádu ryb chrupavčitých (*Chondrostei*). Z nalezených fosílií se odhaduje, že zástupci chrupavčitých se na Zemi vyskytují více než 250 miliónů let, tedy již hluboko v období druhohor. Jak nálezy dokazují, tak tento řád je znám již od období tzv. svrchní křídy, což je období cca před 66 až 97 miliony let (Goodrich 1909; Berg 1940, 1948, 1955; Sokolov et Berdičevskij 1989). Jisté prameny však uvádějí, že by se mohlo jednat o druh starý až 200 milionů let. Údaj ale zatím nebyl vědecky podložen a jedná se tedy o pouhou spekulaci.

Tyto „prehistorické“ ryby však nejsou zvláštní pouze tím, že jejich zrod a evoluční cesta jsou mnohem delší, než například naše cesty lidstva. Ale je naprosto úžasné, že dokázaly přežít miliony let bez významných evolučních změn. Což samo o sobě dokazuje výjimečnost a dokonalost tohoto druhu. Omezeným vývojem však došlo k postupnému snižování přizpůsobivosti a mnoho evolučně mladších druhů je dnes dokonaleji přizpůsobeno vůči svému prostředí. Ovšem už jen samotný fakt, že tyto ryby se po dobu desítek milionů let nepotřebovaly nadále evolučně vyvíjet, poukazuje na originalitu a jedinečnost jeseterovitých ryb.

Díky takto pozastavenému vývoji mají jeseteři mnoho odlišností od evolučně mladších ryb (*Teleostei*). Tou nejzajímavější zvláštností je jistě fakt, že se jedná o ryby chrupavčité (*Chondrostei*), tělo tedy postrádá celou kosterní soustavu. Osifikovaná je pouze část lebky a celá svalovina je podpírána nezaškrcovanou chordou (Baruš, 1995). Podobné anatomické vlastnosti mají pouze mořské paryby.

Dalšími neklamnými důkazy o výjimečnosti a stáří jeseterovitých ryb je jejich velikost, životní cyklus a zeměpisné rozšíření. V čeledi *Acipenseridae* se totiž nacházely jedny z největších ryb vůbec a zástupci tohoto druhu se vyskytovali prakticky v celé části severní polokoule a to jak ve velkých řekách, tak i v mořích.

Bohužel i tento majestátný druh má přes svoji velikost, dlouhověkost, bohaté zeměpisné zastoupení a evoluční stáří mnoho problémů se zachováním svojí vlastní existence. Dalo by se dokonce říci, že řád *Acipenseriformes* stojí na prahu samotného vyhynutí (někteří zástupci jsou již v dnešní době považováni za vyhynulé).

Příčin této smutné situace je mnoho. Stalo se tak zejména kvůli obchodu s kaviárem a masem jeseterů. Dále kvůli znečištění vod, devastaci trdlišť, stavbám přehrad a dalších překážek na řekách, které nejsou migrující ryby schopny překonat a dostat se na místa přirozeného výtěru.

V poslední době se však celková situace jeseterů začala pozvolna měnit. Jeseterovité ryby byly zařazeny do ochrany CITES I. a II. kategorie, začaly se chovat v umělých podmínkách a rozmnožují se pomocí umělého výtěru. Vědečtí pracovníci po celém světě začali se značením, monitoringem a zkoumáním problematiky těchto ryb v zájmu záchrany a reintrodukce. Při této snaze bylo zjištěno mnoho poznatků o jejich způsobu života, potravě, migraci, rozmnožování, aj.

Pro zkoumání a poznávání problematiky jeseterů, bylo též nutné začít i s výzkumem jejich genomu. A to ať již z důvodů systematického zařazení, rozmnožování, záchrany a tvorby generačních hejn, zakládání genetických bank a snahy o zachování čistoty genofondu a ochranu rozmanitosti druhu. Při zkoumání genomu bylo však též zjištěno, že jeseteři trpí tzv. evoluční polyploidíí (Mirsky a Riss, 1951; Ohno, 1969; Serebryakova, 1972), která může být umocněna autopolyploidíí. Tento jev může mít za následek např. snižování počtu erytrocytů, neplodnost a jiné negativní vlivy. Především však dochází k porušování genetické čistoty druhu.

I v České republice probíhají snahy o chov a výzkumy jeseterovitých ryb pro jejich záchranu a reintrodukci. Jsou to především Rybářství Hluboká cz s.r.o. a Rybníkářství Pohořelice a.s., kde probíhá chov jeseterovitých ryb v provozním měřítku a Fakulta rybářství a ochrany vod JU ve Vodňanech, jež se zabývá genomem jeseterovitých, chová čisté genetické linie a drží genetickou banku.

Účelem této práce je tedy pochopení celkové problematiky jeseterovitých ryb se zaměřením na cytogenetické aspekty polyploidie. Tato práce je stručnou charakteristikou jeseterů od jejich anatomie, fyziologie, způsobu chovu ve středoevropské akvakultuře, až po úroveň polyploidie a ochranu biodiverzity těchto ohrožených druhů. Během experimentální části bylo též naměřeno a zdokumentováno několik čistých druhů i několik polyploidních hybridů, jejichž studium může v budoucnu objasnit nebo potvrdit nové poznatky či domněnky o autopolyploidii jeseterů. Práce by měla podat maximální množství informací o jeseterech a přispět tak k zamezení dalšího vymírání těchto jedinečných druhů.

2. Literární přehled

2.1 Systematické zařazení jeseterovitých ryb (*Acipenseridae*)

Systematicky jsou chrupavčití řazeni (Rochard, et al., 1991; Hochleitner, 2004; www.wscs.info) takto:

Třída: *Osteichthyes* - Ryby

Podtřída: *Actinopterygii* - Paprskoploutví

Nadřád: *Chondrostei* - Chrupavčití

Čeleď: *Polyontidae* - Veslonosovití

Polyodon spathula veslonos americký

Psephurus gladius veslonos čínský

Čeleď: *Acipenseridae* - Jeseterovití

Rod: *Pseudoscaphirhynchus*

Pseudoscaphirhynchus kaufmanni lopatonos Kaufmannův

Pseudoscaphirhynchus hermannii lopatonos Hermannův

Pseudoscaphirhynchus fedtschenkoi lopatonos Fedčenkův

Rod: *Scaphirhynchus*

Scaphirhynchus albus lopatonos velký

Scaphirhynchus mexicanus lopatonos mexický

Scaphirhynchus platorhynchus lopatonos americký

Scaphirhynchus suttkusi lopatonos alabamský

Rod: *Huso*

Huso dauricus kaluga vyza malá

Huso huso vyza velká

Rod: *Acipenser* - Jeseter

Acipenser brevirostrum jeseter krátkorypý

Acipenser fulvescens jeseter jezerní

Acipenser medirostris jeseter sachalinský

*Acipenser oxyrhynchus** jeseter ostrorypý

Acipenser transmontanus jeseter bílý

Acipenser gueldenstaedtii jeseter ruský

Acipenser naccarii jeseter jadranský
Acipenser nudiventris jeseter hladký
Acipenser ruthenus jeseter malý
Acipenser stellatus jeseter hvězdnatý
*Acipenser sturio** jeseter velký
Acipenser baerii jeseter sibiřský
Acipenser dabryanus jeseter jihočínský
Acipenser kikuchii
Acipenser mikadoi jeseter severní
Acipenser multiscutatus jeseter štítkatý
Acipenser persicus jeseter perský
Acipenser schrenckii jeseter amurský
Acipenser sinensis jeseter čínský

* V současné době jsou ve vědeckých kruzích částečné rozpory na systematické řadení druhů *A. sturio* a *A. oxyrhynchus*. Výsledky provedených analýz vzorků DNA u těchto dvou druhů poskytují dvě možné hypotézy, že *A. sturio* a *A. oxyrhynchus* jsou samostatnou z vývojových větví rodu *Acipenser*:

1. Předpokládá se, že před 90 miliony let byla na Zemi původní forma jesetera atlantského, která dala základ pro vznik dvou blízkých druhů a to *A. sturio* a *A. oxyrhynchus*.
2. Je zastáván názor, že druhová podobnost je dána pomalou evolucí genomu jeseterovitých ryb a jedná se stále o jeden druh (Gela, 2008). Genetická podobnost některých populací byla v minulosti ještě upevněna vědecky potvrzenými sekundárními kontakty jedinců.

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

2.1.1 Zeměpisné rozšíření

Mezi jeseterovitými rybami nalezneme druhy jak sladkovodní, tak i brakické. Prakticky všechny druhy mají určitou migrační aktivitu a to převážně v období výtěru (migrační výtěrová aktivita). Jedná se jak o druhy katadromní, anadromní, tak i o druhy s pouhou poproudovou či protiproudovou migrací. Jejich zástupce můžeme tedy nalézt prakticky na všech kontinentech či mořích severní polokoule. Jeseteři totiž potřebují ke svému životu a následnému rozmnožování čisté, chladnější vody s následnou možností výtěrové migrace. Což jsou velká ústí řek převážně na severní polokouli.

Čeleď: *Polyontidae*

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

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

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

Čeleď *Acipenseridae*; Rod: *Scaphirhynchus*

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

Čeleď *Acipenseridae*; Rod: *Huso*

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

Čeleď *Acipenseridae*; Rod: *Acipenser*

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

2.2 Důvody úbytku jeseterů ve volných vodách a ochrana CITES

V současné době se díky činnosti člověka u všech druhů chrupavčitých ryb velmi dramaticky snižuje jejich přirozený výskyt ve volné přírodě (viz tab. č. 1 a 2). Příčiny snižování diverzity a početnosti jeseterů lze shrnout do následujících bodů dle Gela (2008):

- 1) Nadměrný legální a nelegální odlov ryb z volných vod za účelem získání luxusního zboží, tzv. kaviáru a prvotřídního rybího masa.
- 2) Pozdní pohlavní dospělost těchto ryb, která je ještě umocněna tím, že samice jsou schopny dalšího výtěru až za tři, někdy i za čtyři roky.
- 3) Výrazná třecí migrace většiny jeseterovitých a veslonosovitých druhů.
- 4) Vodní díla postavená člověkem, ale i jen „pouhá“ úprava vodních toků znemožňuje jeseterovitým rybám třecí migrace. Ani při výstavbě tzv. rybích přechodů nejsou často schopné vodní díla překonat a dorazit na svá třecí místa. Důvodem může být velikost ryb či ztráta proudění toku (Gela, 2008).
- 5) Znečištění řek a moří, které zhoršuje reprodukční schopnosti ryb, kvalitu pohlavních produktů, zapříčiňuje zvýšený výskyt abnormalit a vnímavosti ryb vůči nemocem a parazitům. Současně též snižuje dostupnost přirozené potravy pro všechny věkové kategorie ryb (Aluf'ev, 1997; Debus, 1997). Bohužel již nejsou ani vzácné přímé otravy ryb.
- 6) Poměrně malé investování finančních prostředků do výzkumu zaměřeného na zvládnutí managementu chovu a řízení reprodukce u většiny chrupavčitých ryb. V posledních několika letech však dochází k obratu této situace a finanční prostředky začínají být vynakládány na výstavbu nových objektů a financování nových projektů, které mají pomoci v záchraně chrupavčitých ryb.
- 7) Velká část jeseterovitých ryb přímo žije nebo při své migraci proplouvá chudými a politicky nestabilními státy, které se buď vůbec či nedostatečně věnují jejich ochraně. Poté se jeseteři mohou stávat nelegálním obchodním artiklem či vítaným zpestřením v jídelníčku místních obyvatel.

tab. č. 1: Snižování počtu generačních ryb ulovených ve Volze v jednotlivých obdobích (v tisících kusů) (Speer et al., 2000).

Rok	<i>H. huso</i>	<i>A. gueldenstaedtii</i>	<i>A. stellatus</i>
1961 - 1965	26,0	860,3	535,4
1966 - 1970	26,0	1569,9	538,7
1971 - 1975	20,7	1983,3	490,0
1976 - 1980	16,6	2743,0	572,2
1981 - 1985	14,6	1072,0	626,3
1986 - 1990	12,7	717,7	683,1
1991 - 1995	7,0	354,8	289,2
1996 - 1997	1,8	102,0	132,0

tab. č. 2: Roční výlovky (v tunách) z volných vod (www.fao.org).

Kontinent	Voda	Rod	2000	2001	2002	2003	2004
Severní Amerika	Vnitrozemní vody	Jeseter, veslonos	281	173	172	172	172
	Oceány a moře	Jeseter, veslonos	245	199	207	166	170
Severní Amerika celkem			526	372	379	338	342
Asie	Vnitrozemní vody	Jeseter, veslonos	1 288	1 231	961	831	836
	Oceány a moře	Jeseter, veslonos	4	3	7	5	4
Asie celkem			1 292	1 234	968	836	840
Evropa	Vnitrozemní vody	Jeseter, veslonos	704	677	526	600	286
	Oceány a moře	Jeseter, veslonos	81	30	35	14	11
Evropa celkem			785	707	561	614	297
Suma celkem			2 603	2 313	1 908	1 788	1 479

Ochrana CITES

CITES je mezinárodní zkratka úmluvy o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a rostlin (anglicky Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora či zkráceně Convention on International Trade in Endangered Species, známá též jako Washingtonská úmluva), jedná se o jednu z nejdůležitějších dohod chránících rostliny a živočichy na mezinárodní úrovni. Smyslem je celosvětová kontrola obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin. Smlouva nabyla platnosti v červenci r. 1975 a přijalo ji (stav roku 2006) 162 smluvních států (<http://cs.wikipedia.org/wiki/CITES>).



obr. č. 1: Logo CITES (www.cizp.cz/215).

CITES se však týká nejen exemplářů z přírody, ale i živočichů a rostlin odchovaných nebo vypěstovaných v zajetí, pokud žijí/rostou i ve volné přírodě (nezahrnuje domestikovaná zvířata a kulturní rostliny). Smlouva obsahuje seznamy druhů, kterých se týká. Tyto druhy jsou uvedeny v jednotlivých přílohách:

- příloha I obsahuje nejvíce ohrožené druhy, s nimiž je jakýkoliv mezinárodní obchod zakázán
- příloha II zahrnuje druhy, jejichž obchodování je na mezinárodní úrovni omezeno a podřízeno dozoru
- příloha III zahrnuje druhy lokálně ohrožené, u nichž je na mezinárodní úrovni kontrolován a omezen obchod pouze v určitých regionech

V souladu s výsledky 10. konference členských států CITES jsou od 1. 4. 1998 všechny druhy jeseterovitých ryb (*Acipenseriformes* spp.) zařazeny v příloze II k CITES, s výjimkou druhů *Acipenser brevirostrum* a *Acipenser sturio*, které jsou v příloze I. Tato smlouva však neplatí pouze na živé ryby, ale platí též pro jejich produkty a tkáňové deriváty. U jeseterů se jedná hlavně o velmi ceněný kaviár. Pro mezinárodní obchod s kaviárem je tedy též nutné mít doklady CITES. Zároveň bylo všem členským zemím doporučeno zrušení kontrol a vyžadování dokladů CITES pro dovoz a vývoz kaviáru k osobní spotřebě v množství do 250g/osobu. (www.env.cz).

2.3 Historie jeseterů v bývalém ČSR a odchov v evropských podmínkách

Ve volných vodách na našem území se vyskytuje prakticky jen *Acipenser ruthenus*, který dříve vystupoval ze slovenského úseku Dunaje do dolní části řeky Moravy. V poslední době je zde zaznamenáván ojediněle. V roce 1966 bylo v Československu uloveno 1160 kg, na počátku 80. let roční výlov vykazoval 40 kg ryb tohoto druhu (Lusk, 1983). V posledním desetiletí je každoročně několik hodnověrných zpráv o úlovcích v dolním toku Dyje. Na slovenském úseku řeky Dunaje reintrodukce jesetera malého již několik let probíhá, ale převážně z několika málo pohlavně dospělých ryb odlovených z přirozeného prostředí. Reintrodukce *Acipenser ruthenus* na moravské části řeky Moravy nebyla schválena.

Do rybářských revírů jsou vysazovány exempláře jeseterů pro svoji velikost a rybářský zážitek. Jde však většinou o druhy nepůvodní, hybridy či vyřazené samce (mlíčáky) ze zahraničních chovů. Tyto ryby nejsou schopny dalšího rozmnožování ani migrace. Další příčinou ojedinělého výskytu jeseterů ve volných vodách může být náhodné vysazení například nespokojenými akvaristy nebo únik chovaných jeseterů při povodních.

Ne vždy však stav jeseterovitých ryb v našich vodách vypadal takto. Ještě v minulém století jeseteři řekami v České republice a na Slovensku běžně migrovali či v nich trvale žili.

Jednalo se především o tyto druhy:

- *Acipenser sturio* – Žil v oblasti severního moře s následnou migrací po řece Labi. Touto cestou se poté vzácně dostával až na naše území. Od roku 1577 do roku 1933 bylo zaznamenáno 23 výskytů na území dnešní ČR (Flasar et Flasarová, 1976). Při velkém stavu vody jsou uváděny výskyty až v pražské Vltavě (Frič, 1872). V roce 1934 však došlo k výstavbě tarasu u Magdeburku (Baruš, 1995). Tím byla zničena migrační cesta. *Acipenser sturio* je dnes na území ČR považován za vyhynulého. Několik jedinců je však stále chováno ve Francii v Cemagref Toulouse a v IGB v Berlíně. V posledních letech se začalo s vysazováním *Acipenser oxyrinchus* například do řeky Odry a dalších polských řek, z důvodu shodného genomu s *Acipenser sturio*.

- *Acipenser ruthenus* – Tento druh žije v povodí Dunaje a jeho přítocích. Úbytek jeho stavů byl způsoben antropogenními vlivy, jako je znečištění vod a zničení migračních cest. Na konci roku 1990 se však situace výrazně zlepšila. Došlo ke snížení znečištění a začalo se stavbou rybích přechodů. Dunajem a jeho přítoky dnes mohou jeseterovité ryby opět migrovat.
- *Acipenser gueldenstaedtii* – Jedná se o druh zaznamenaný v Dunaji na území dnešního Slovenska. Tento jeseter nepatří mezi druhy s velkou migrační vzdáleností. Obývá pouze sladkovodní vody. Z dochovaných materiálů (1960 – 1970) je známo, že v těchto letech byl zaznamenán výskyt 4 až 5 kusů *Acipenser gueldenstaedtii* za rok (Baruš, 1995).
- *Acipenser nudiventris* – Velmi vzácně se tento druh vyskytoval v povodí Dunaje proti proudu do Bratislavy a u Vídně. Jedná se však o nejméně hojný druh v povodí Dunaje (Baruš, 1995).
- *Acipenser stellatus* – Ve slovenském úseku Dunaje tento jeseter i v minulosti patřil mezi vzácně se vyskytující druhy a jednotlivé úlovky byly samostatně evidovány. Například Grossinger (1794) píše o úlovku cca 4,5kg exempláře tohoto druhu, který byl uloven dne 16. 6. 1792 u Komárna. Uvádí i jeho popis, podle něhož je možné i druhové určení bezpečně potvrdit (Baruš, 1995).
- *Huso huso* – Na území dnešního Slovenska migrovala podzimní rasa nominotypické formy, která se ve velkém množství lovila v Malém Dunaji u Kolárova. Tato rasa vplouvala až do rakouského a ojediněle až do bavorského úseku Dunaje až po Straubing (Siebold, 1863). Po Bratislavu táhla víceméně pravidelně. Z Dunaje táhla i do dalších přítoků. Výskyt byl zaznamenán též v řece Moravě (Jeitteles 1864). Díky antropogenním vlivům je dnes *Huso huso* ulovena na území Slovenské republiky jen velmi vzácně a na území České republiky se vůbec nevyskytuje.

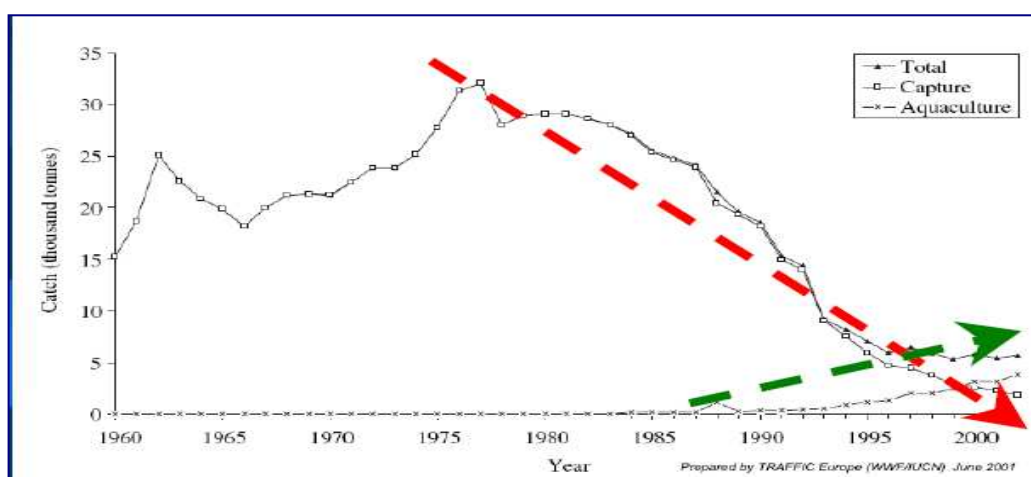
Odchov jeseterů ve středoevropských podmínkách

Z již výše uvedených důvodů a údajů, je úbytek jeseterovitých ryb z volných vod obrovský, a někdy až absolutní. Budoucnost produkce jeseterů ať již na maso, kaviár či jako další generace je v akvakultuře. Což znamená chov v uměle navozeném prostředí.

Počátky chovu jeseterů v uměle navozených podmínkách jsou datovány více než před 100 lety, kdy chovaní jedinci byli odlovováni z volně žijících populací. První pokusy o reprodukci v akvakultuře a odchovy v Evropě a Severní Americe jsou zaznamenány již z let 1880 až 1920. Za první zemi s úspěšným odchovem a reprodukci jeseterů se považuje Sovětský svaz a léta okolo roku 1930 (Doroshov, 1985). Do Evropy přicházejí tyto poznatky až o několik desítek let později. Prvním evropským státem, který dokázal jesetery chovat, ale i nadále rozmnožovat, byla Itálie, kde docházelo k odchovu a umělému výtěru *Acipenser transmontanus*, který byl dovezen roku 1978 z USA.

Jak ukazuje následující graf č. 1, tak odchov jeseterů v akvakultuře je v dnešní době již nevyhnutelný a je na vzestupu. Výlovek z volných vod se v posledním století až příliš dramaticky snížil. Akvakulturní chov se rozvíjí také díky možnostem chovu nepůvodních druhů jeseterů, pro které nejsou v dané lokalitě 100% příznivé podmínky.

graf č. 1: Nárůst chovaných jeseterů v akvakultuře.



Ceapa (2006)

Díky zvýšenému zájmu o chrupavčité ryby jako ohrožený druh s možností reintrodukce zpět do volné přírody, ale také díky neustálému rozšiřování znalostí a propracovaností metod chovu (speciální krmné směsi, rozkrmování váčkového plůdku, přechod na granuláty) a řízené reprodukce v intenzivních podmínkách (hormonální analogy, aktivační roztoky aj.) se pro stále více chovatelů jeví zvláště některé druhy chrupavčitých ryb jako perspektivní i pro akvakulturní chov.

Některé rybí farmy, které byly zakládány na konci minulého století, si jesetery vylepšují a rozšiřují svojí nabídku komerčních produktů. A některé farmy se dokonce na jeseterovité ryby již úzce specializují. Jeseteří farmy či nabídku jeseterovitých ryb nalezneme v dnešní době prakticky ve všech státech Evropy. Evropskou mocností v chovu jeseterů je Německo, poté následuje Francie, Itálie, Belgie a v posledních letech nastal velký nárůst v chovu jeseterovitých ryb v Polsku. I v České republice probíhá odchov jeseterů v akvakultuře. Jedná se však pouze o výzkumný ústav FROV JU, který drží generační hejna. Nebo soukromé osoby (podnikatelé), kteří vyrábějí tržní rybu, ale nejedná se o rybí farmu v pravém slova smyslu a s farmami z uvedených zahraničních států se nedají v žádném měřítku porovnat.

V důsledku ekonomického a konkurenčního tlaku, bylo nutné pro chov jeseterů v akvakultuře vybrat druhy pouze ekonomicky a tržně atraktivní. Následkem toho byly pro chov na jeseteřích farmách vybrány prakticky stejné druhy jeseterovitých ryb nebo jejich kříženci. Cílem bylo dosáhnout v co nejkratší době požadovanou tržní velikost a pohlavní produkty (kaviár). Hlavními faktory jsou tedy čas, náklady na chov a přijatelné zootechnické potřeby. Tyto podmínky splňují následující druhy, a jsou proto nejčastěji chovány v evropské akvakultuře:

- *Acipenser transmontanus* – Roku 1978 byl dovezen za účelem chovu z USA do Itálie a roku 1992 do Německa. Tržní hmotnost tohoto jesetera se pohybuje okolo 9 – 10kg. Je vhodný též na produkci kaviáru.
- *Acipenser baerii* – Pochází z povodí Leny ze Sibiře. Roku 1982 byl dovezen do Francie a roku 1992 do Itálie. Je to nejčastěji chovaný druh v akvakultuře. Je chován prakticky na všech farmách v celé Evropě. Jeho tržní hmotnost se pohybuje okolo 6 – 7 kil. Produkuje méně kvalitní kaviár.
- *Acipenser naccarii* – Poprvé uměle odchován v Itálii. Při odchovu na teplé vodě dosahuje velikosti 30 až 35kg za 7 až 8 let. Je však poměrně náročný na chov.

- *Acipenser ruthenus* – Je chován především v severní části Evropy. Dosahuje 2 až 3kg hmotnosti. Je hojně využíván ke křížení a získávání hybridů. Pro svou poměrně brzkou pohlavní dospělost oproti jiným jeseterovitým rybám se hodí i k získávání kaviáru.
- Bester – jedná se o uměle odchovaného hybrida *Huso huso* a *Acipenser ruthenus*. Je chován prakticky po celé Evropě a to především za účelem získávání kaviáru.
- *Acipenser gueldenstaedtii* – Je chován v Německu a Polsku za účelem kvalitního masa a kaviáru.
- *Acipenser stellatus* – Je taktéž chován v Německu a Polsku. Má nižší kvalitu kaviáru.

tab. č. 3: Roční produkce (v tunách) z akvakulturních chovů. Údaje ze statistiky FAO (www.fao.org).

Kontinent	Voda	Nadřád	2000	2001	2002	2003	2004
Evropa	Vnitrozemní	<i>Chondrostei</i>	3 787	3 764	4 336	4 464	4 556

2.4 Značení ryb a jejich umělá reprodukce

Značení ryb je opatření využívané jak v rámci chovatelské činnosti, tak v rámci terénních sledování. Umožňuje dokonalejší evidence v chovu, odlišení různých skupin ryb i odlišení jednotlivých jedinců na základě druhu, věku, původu, pohlaví, schopnosti výtěru a dalších vlastností dle potřeb a nároků chovatele.

Využívána bývá celá řada značících systémů. Pro rybářství v našich podmínkách jsou z hlediska praktičnosti, ale i cenové dostupnosti velmi vhodné a využívané systémy americké firmy Northwest Marine Technology, Inc. (NMT).

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

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



obr. č. 2: Ploutevní značky.

2. PIT systém: Jde o přidělování identifikačních čipů. Čipy jsou nejčastěji zaváděny injekčními aplikátory do svaloviny ryb, a to do levé partie hřbetu. Pro jejich identifikaci jsou zapotřebí čtecí zařízení a prakticky nezbytné je i propojení s počítačem. Výhodou této metody je unikátní identifikační číslo, které je nám čip schopen poskytnout. Naopak nevýhodou je velké množství doprovodné čtecí elektroniky a vysoké pořizovací náklady.



obr. č. 3: Injekční aplikátor.

3. VIE systém: Je určen především pro skupinové značení ryb. Využívá vizuální elastomerové značky tzv. VIE (Visible Implant Elastomer tags). Jedná se o barevné značky, které jsou viditelné pouhým okem, popřípadě lépe pod UV lampou. V současné době je na trhu 6 fluorescenčních barev a 4 nefluorescenční. Tyto značky se aplikují pod průhlednou epidermis (bez pigmentu). U jeseterů se osvědčila ventrální strana rypce (rostrum). Značky ryby nijak nepoškozují a jsou zdravotně nezávadné. Aplikace probíhá speciálními manuálními aplikátory, se kterými je nutná jistá zkušenost, jelikož ztrátovost značek může být až 50%. Tento způsob značení patří mezi nejnovější, je cenově přijatelný a je schopen označit velké množství ryb. Opět je nutné vést si podrobnou databázi barevných variant.



obr. č. 4: Elastomerové značky.

Umělá reprodukce

Z důvodů ohrožení a úbytku jeseterovitých ryb ve volných vodách, ale i se stoupající oblíbeností jejich produktů (maso, kaviár), bylo nutné začít s umělou reprodukcí i u tohoto druhu.

První zemí, která se začala touto problematikou zabývat a byla jí schopná učinit s pozitivním výsledkem, byl bývalý Sovětský svaz kolem roku 1930 (Doroshov, 1985). Výtěr ryb spočíval v odchytu generačních jedinců při migraci na trdliště nebo přímo na místech přirozeného výtěru. Pro následné odebrání ovulovaných ovocytů bylo nutné samice usmrtit. Až poté následovalo umělé osemnění, aktivace a inkubace jiker.

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

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

Původní způsob získávání generačních ryb odlovem z přirozeného prostředí se v současnosti využívá spíše pro zachování druhu, než pro reprodukci ke komerčnímu využití (odlovy *Acipenser sturio* ve Francii na řece Gironde, v Číně *Acipenser sinensis* na Yangtze River apod. – Williot et al., 2001; Wei et al., 2006).

Dnes je proto nejobvyklejší držení vlastních generačních hejn, která jsme si od juvenilních jedinců sami vybrali a chováme je v extenzivních či intenzivních podmínkách rybích farem. Jak již bylo uvedeno výše, velkou problematikou u tohoto chovu generačních hejn je jejich pozdní pohlavní dospělost.

tab. č. 4: Věk při dosažení pohlavní dospělosti (Hochleitner, 2004).

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

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

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

Rozpoznání pohlaví je v principu možné více způsoby:

- Biopsií tkáně gonád
- Sonograficky
- Podle hormonálního profilu krve

K určení stádia zralosti ovocytů se na většině farem provádí tzv. biopsie tkáně (příloha č. 4). Toto určení jde však provádět pouze u dospělých a zralých jedinců (tab. č. 4). K biopsii se využívá speciální trokar (sonda) (Kazanskii et al., 1978), který musí být přizpůsoben velikosti očekávaných ovocytů podle druhu ryby tak, aby nedošlo k následnému poškození.

tab. č. 5: Průměrná velikost jiker a počet zralých vytřených jiker v 1g (Hochleitner, 2004).

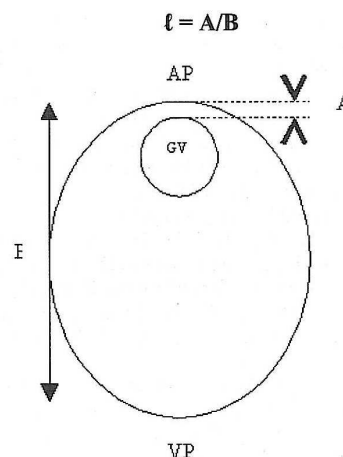
Druh	Velikost jiker (mm)	Počet jiker v 1g
<i>A. ruthenus</i>	1,9 – 2,5	110 – 120
<i>A. baerii</i>	2,4 – 2,9	50 – 55
<i>A. gueldenstaedtii</i>	2,8 – 3,8	45 – 70
<i>A. stellatus</i>	2,7 – 3,2	70 – 100
<i>H. huso</i>	3,3 – 4,5	27 – 45

Před vlastním odběrem musí být sonda dezinfikována (například roztok hypermanganu 1g.l⁻¹ teplé pitné vody). Trokarem poté penetrujeme břišní stěnu a zasuneme ho dostatečně hluboko, ale je nutná velká opatrnost a šetrnost, aby nedošlo k poškození vnitřních orgánů (především střeva). Následně šroubovitým otáčením odebereme část tkáně. Pokud jsme dodrželi směr a hloubku vpichu, tak se místo penetrace během několika týdnů zahojí. Po ukončení odběru je nutné místo odběru opět dezinfikovat.

Po odebrání vzorky fixujeme jikry v Serrově roztoku (složení na 100ml: 60ml ethanolu 96%, 30ml formaldehydu 38%, 10ml ledové kyseliny octové 99%; Rodina, 2006). Tento roztok způsobuje konzervaci ovocytů, a tak je možné s jejich určováním začít nejdříve po 24 hodinách. Určování probíhá pod stereomikroskopem, kde se určí plocha jádra (Kazanski et al., 1978; Rodina, 2006). Optimální polohu udává klasifikační index (ℓ) na úrovni 0,06.

obr. č. 5: Určení zralosti ovocytu dle Conte (1988).

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



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

K hormonální stimulaci samců se používá jednorázová nitrosvalová injekce suspenze kapří hypofýzy a fyziologického roztoku v dávce 4mg.kg⁻¹ živé hmotnosti ryby. K optimální spermiaci dochází asi po 36 hodinách od aplikování suspenze při již zmiňované teplotě 14 – 15°C.

Ke spermiaci se dá též použít jednorázová nitrosvalová dávka:

- Kobarelinu v množství 50 µg.kg⁻¹ živé hmotnosti
- Ovopelu v dávce 1 peletky.kg⁻¹ živé hmotnosti ryby

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

Pokud již nastala spermiace je samec položen hřbetem na výtěrový stůl. Velmi důležité je osušení pohlavního otvoru a jeho okolí. Sperma je poté odebíráno pomocí suché kanyly, jež je upravena do špičky. Velikost a průměr kanyly musíme přizpůsobit jedinci, kterému je sperma odebíráno. Kanyla je poté zasunuta

upraveným koncem do chámovodu a její volný konec se vloží do připravené suché nádoby. Při dobré připravenosti samců není nutná masáž břišní dutiny. Množství získaného spermatu je závislé na druhu a velikosti jedince, jedná se většinou o stovky mililitrů (u větších druhů se jedná až o tisíce mililitrů). Odebrané sperma je možné uchovávat až na dobu 72 hodin, nezbytné je však dodržení teploty 0 až 4°C. Sperma jeseterovitých ryb je bělavé až mléčně bílé, má vodnatou konzistenci. Koncentrace spermií je v rozmezí 0,01 – 1x10⁹ v 1ml.

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

1. První dávka je 0,5 mg.kg⁻¹ živé hmotnosti ryby. Po 12-ti hodinách následuje
2. Druhá dávka, a to 4,5 mg.kg⁻¹ živé hmotnosti ryby.

Časový rozdíl mezi první a druhou dávkou činí 12 hodin. Ovulace jiker poté nastává přibližně do 42 hodin od první dávky suspenze hypofýzy. Neklamným znakem je objevování ovulovaných černých jiker na dně nádrže.

Ovulující samici je nutné podrobit anestézii. Důvodem je zmírnění stresu, kterému je ryba vystavena, snadnější manipulace s jedincem a minimalizace následného možného poranění při nečekaném pohybu ryb v momentě provádění chirurgického řezu. K anestézii je využíván roztok hřebíčkového oleje o koncentraci 0,07 ml.l⁻¹. Po naprosté anestézii samici vyzvedneme z lázně a položíme jí na výtěrový stůl opět hřbetem dolů. Velmi podstatné je osušení pohlavního otvoru a jeho okolí. Vlastní chirurgický zákrok dle Štěcha a kol. (1999) spočívá v proříznutí vejcovodu v délce 20mm v místě před vyústěním do pohlavního otvoru. Poté následuje klasická masáž břišních partií. Nejdůležitější je úplné dotření ovulovaných ovocytů. Jikry, které zůstanou v břišní dutině, začnou podléhat následnému rozpadu a způsobí sepsi. Samice poté umírá. Celý zákrok by neměl překročit 10 minut.

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

Získané jikry se oplozují spermatem, které musí být předem smíseno s vodou. Důvodem tohoto postupu je větší počet mikropylí na animálním pólu zralé jikry, kudy proniká spermie do jikry (Linhart a Kudo, 1997). Použitím naředěného spermatu se tedy předchází polyspermii. K oplození a aktivaci 1000g jiker se použije 20 – 25ml heterospermatu, které je naředěno čtyřmi litry aktivační vody. Jikry je poté nutno několikrát důkladně propláchnout a z důvodu lepivosti jiker je nutné ihned začít s jejich odlepkováním. Jako odlepkovací suspenze je nejčastěji využíván jííl a to z důvodů chladné vody při výtěru (cca 15°C). Vlastní odlepkování trvá 60 minut (Gela et al., 2003). Jikry je nutno po celou dobu procesu míchat a to ručně či jinými pomůckami, které jsou většinou vyrobeny z peří (šetrné zacházení). Po odstranění lepivosti jiker je nutno odstranit suspenzi a čisté jikry jsou umístěny na inkubační aparáty. Inkubační aparáty i následná péče o jikry je prakticky srovnatelná se všemi ostatními druhy ryb, které jsou běžně uměle vytírány.

Jedinou výjimku tvoří odsávání uhynulých jiker, jelikož z důvodu tmavé barvy nejsme schopni rozpoznat uhynulé jikry od zdravých.

Líhnutí probíhá v dlouhém časovém intervalu po dobu 2 – 3 dnů (tab. č. 6). Vykulený plůdek velice ochotně pluje s vodou a je umístěn na odchovné žlaby, kde se následně rozplavává a je rozkrmován.

tab. č. 6: Inkubační doba jiker *Acipenser ruthenus* a *Acipenser baerii* od oplození (v hodinových stupnicích h° - tj. násobek počtu hodin a průměrné hodinové teploty vody).

Druh	Inkubační doba od začátku líhnutí (h°)	Inkubační doba do konce líhnutí (h°)
<i>A. ruthenus</i>	1 750	2 350
<i>A. baerii</i>	2 000	2 800

2.5 Biologie jeseterů

Řád *Acipenseriformes* je evolučně velmi starý řád chrupavčitých ryb (*Chondrostei*), jejichž první zástupci na Zemi žili již v období svrchní křídy, a proto se od evolučně mladších ryb kostnatých (*Teleostei*) výrazně odlišuje.

Dle Berga (1940) je řád popsán takto:

Jedná se o ryby protáhlého, vřetenovitého těla, v zadní části se laterálně zplošťuje. Kůži pokrývá 5 řad kostěných štítků. Tělo ale může být i holé, kromě horního laloku ocasní ploutve, který je pokryt zvláštním typem ganoidních šupin (*fulcræ*). Tyto šupiny mají tvar Λ . Pod nimi po stranách vzhůru ohnuté distální části ocasního násadce jsou ganoidní kosočtverečné šupiny. Ocasní ploutev je značně heterocerkní, ale u některých druhů bývá dobře vyvinutý i dolní lalok.

Chorda zůstává zachována a není zaškrvena. Lebka těchto ryb zůstává chrupavčitá, obsahuje jen několik zkostnatělých částí, nikdy však není zkostnatělá souvisle. Lebka je velmi masivní a vzadu přechází do bazidorzální, resp. baziventrální chrupavky chordy. Spojení čelistí je hyostylní (volné). Rypec je protáhlý, u některých druhů značně dlouhý, vytváří ho prodloužená střední čichová chrupavka (*cartilago ethmoidalis medialis*). Chrupavčitá je i kost klíční (*clavicula*). Nadočnicový kanál postranní čáry prochází mezi přední a zadní nozdrou, vzadu se spojuje s podočnicovým kanálem. Těla obratlů u jeseterovitých ryb zcela chybí. Žebra jsou spodní. Podpurná kostra hřbetní a řitní ploutve je také chrupavčitá. Na každé z radiálií těchto ploutví je několik těsně spojených paprsků.

Čeleď *Acipenseridae* byla již popsána mnoha autory. Její popis je znám již od začátku minulého století. Popis dle Berga (1911):

Vřetenovité tělo má pět řad kostěných štítků. Jedna řada je umístěna na hřbetě, dvě na bocích a dvě na břišních partiích. U adultních jedinců mohou kostěné štítky na břiše postupně vymizet. Mezi štítky jsou většinou malé kostěné struktury tvaru zrnek nebo destiček. Ganoinový povlak exoskeletonu během fylogenetického vývoje u jeseterovitých ryb vymizel a je nahrazen pojivem kostěným. Ocasní ploutev je heterocerkní. Zadní konec ocasního násadce pokrývají kosočtverečné šupiny. Vrchní část hlavy je pokryta dotýkajícími se nebo blízko sebe ležícími kostěnými štítky.

Rypec ryb bývá kuželovitý nebo lopatkovitý, na jeho spodní straně se nacházejí 4 hmatové vousky, ty jsou umístěny v příčné řadě. Ústa mají spodní postavení a jsou tedy na spodní straně rypane. Tvar úst je štěrbinovitý, u některých druhů mohou mít až tvar oblouku. Tluma je opatřena masitými pysky, které mohou vybíhat až na boky hlavy (*Huso huso*). Čelisti jsou u těchto ryb vysunovatelné a u dospělých jedinců jsou bezzubé. Drobné zuby se však nacházejí na patře. Víčková kost (*operculum*) a paprsky žaberní blány zcela chybí. Žaberní tyčinky se vyskytují v malém počtu (problematické dýchání).

Velmi neobvyklé je překrytí poslední části vejcovodu, který se ve své konečné části stáčí a napojuje se na močové cesty (problematický výtěr). Žebra jsou u jeseterů vyvinuta. Hřbetní ploutev je umístěna v poslední třetině těla. První paprsek prsních ploutví je přeměněn v tvrdý trn.

Biologické zvláštnosti a zajímavosti jeseterů:

- Jedná se o jedny z největších ryb vůbec. Příkladem je druh *Huso huso* (Linnaeus, 1758). Jedinci toho druhu mohou dosahovat až 10m a 3 200kg (Baruš, 1995).
- Jeseteři jsou migrující druhy. Mají převážně výtěrovou migraci, při které proplouvají sladkými i slanými vodami. Jde tedy o sladkovodní i diadromní druhy ryb.
- Diadromní druhy vytváření sezónní rasy. Jarní rasa je obvykle menší a tře se na jaře a v létě stejného roku. Podzimní rasa bývá zastoupena většími jedinci a přezimuje v řekách (Baruš, 1995).
- Z hlediska výtěru patří jeseterovití do skupiny jikry neochraňující a litofilní.
- Pohlavně zralé samice nejsou schopny výtěru každoročně (Hochleitner, 2004).
- Jeseterovité ryby postrádají některé reflexy, převážně reflex únikový.
- U jeseterů je počet mikropyíl nejen vyšší, ale také velmi variabilní v rámci jedince i druhu: *Acipenser ruthenus* 5-13, *Acipenser baerii* 2-10, *Acipenser stellatus* 1-13 mikropyíl, *Acipenser gueldenstaedtii* až 52 (Dettlaff a kol., 1993, Pšenička a kol., 2010).
- Spermie jeseterů zůstávají i po 2 minutách stále aktivní z 60 až 70%

2.6 Polyploidie

Výraz polyploidie znamená zmnožení celých chromozomových sad v somatických buňkách jedince nad jejich běžnou diploidní úroveň (Flajšhans a kol., 2008).

Polyploidie byla nejprve pozorována u rostlin, kde se zjistilo, že až 50% krytosemenných rostlin je polyploidního původu (Grant, 1977). Hypotézy o možnosti polyploidie u živočichů byly zprvu považovány za nemožné (Muller, 1925). Dalšími výzkumy však bylo zjištěno, že polyploidie je možná i u mnohobuněčných živočichů. U ryb byla polyploidie pozorována v roce 1945 (Svärdson) a v roce 1946 (White), jednalo se o ryby lososovité.

Prakticky většina mnohobuněčných živočišných organismů obsahuje v somatických buňkách dvě sady chromozomů, jedná se tedy o organizmy tzv. diploidní ($2n$). Vývoj pohlavních produktů (gametogeneze) probíhá pomocí meiotického buněčného dělení. Meióza obsahuje dvě následná jaderná dělení, ale pouze jeden cyklus replikace DNA. To umožňuje segregaci jedné kopie každého homologního chromozómu do každé nové gamety. Díky tomu, že v každé gametě je obsažena pouze jedna sada chromozomů (gameta je haploidní, $1n$), může po spojení samčí a samičí gamety opět vzniknout diploidní jedinec, který obsahuje $2n$ (Flajšhans a kol., 2008).

Pokud ovšem dochází ke zmnožení chromozomových sad, jedná se o již zmiňovanou polyploidii. Důvod vzniku polyploidie však nemusí být vždy stejný.

1. Autopolyploidie

Dochází k ní při zmnožení chromozomových sad u reprodukce jedinců stejného druhu. K autopolyploidii mohou vést například:

a) Poruchy gamet:

- Dvě meiotická dělení
- Selhání první nebo druhé fáze meiotického dělení
- Selhání rozchodu mitotických chromozomů

- b) Poruchy procesu oplození:
- Polyspermické oplození
 - Stárnutí ovulovaných oocytů
 - Poruchy organizace jádra

c) Vlivy prostředí

- Poruchy v procesu fertilizace gamet

(Purdom a Lincoln, 1973; Purdom, 1983; Thorgaard, 1983; Yamazaki, 1983; Thorgaard, 1986; Donaldson a Benfey, 1987; Chourrout, 1987; Benfey, 1989).

2. Alopolyplodie

Vzniká při zmnožení chromozomových sad u mezirodové či mezidruhové hybridizace. Přirozená mezidruhová hybridizace je u ryb velmi častým jevem, který byl již mnohokrát pozorován a je tedy velmi dobře zdokumentován (Blanc a Chevassus, 1982; Wladytchenskaya a Kedrova, 1982; Benfey, 1989; Vrijenhoek *a kol.*, 1989; Bullini, 1994; Scribner a kol., 2000 a další).

K alopolyploidii mohou vést například:

a) Hybridizace blízkých příbuzných:

- Životaschopné a plodné potomstvo

b) Hybridizace vzdálenějších rodičovských druhů:

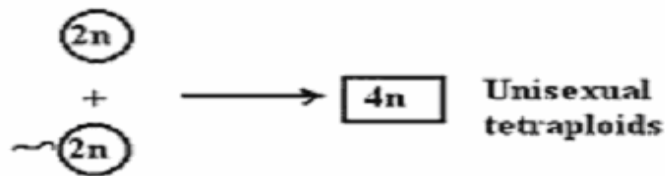
- Nekompatibilní genomy
- Genomické změny
- Androgenetický vývoj (Stanley a kol., 1976)
- Polyploidizace (Chevassus a kol., 1983)

Pokud k důvodům, které působí autopolyploidii nebo alopolyploidii dochází naprosto přirozeně (bez antropogenních vlivů), jedná se o tzv. spontánní polyploidii (Benfey, 1989; Ihssen a kol., 1990; Pandian a Koteeswaran, 1998 a další). Některé poruchy vedoucí k polyploidizaci mohou být také fixovány evolučně a mohou vést až ke vzniku nových rodů, druhů, linií či populací, které jsou evolučně polyploidního původu (Legatt a Iwama, 2003; Le Comber a Smith, 2004; Comai, 2005; Ráb *a kol.*, 2006).

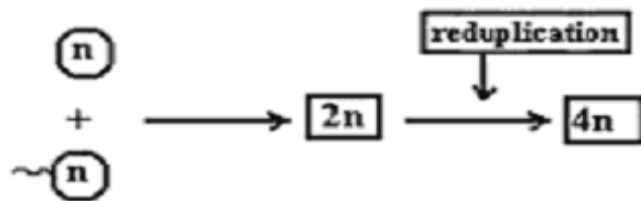
Takovéto poruchy a zejména jejich mechanismy vedoucí k simulaci nebo navození polyploidie byly v průběhu 20. století intenzivně zkoumány a poté celosvětově využívány k produkci neplodných, ale rychle rostoucích polyploidních jedinců, kteří sloužili pouze ke konzumním účelům. U jeseterovitých ryb se uměle navozené stavy polyploidie pro chov v akvakulturách nevyužívají.

obr. č. 6: Způsoby možného vzniku autotetraploidních jedinců. o = gamety, □ = jedinec (Vasil'ev, 1999).

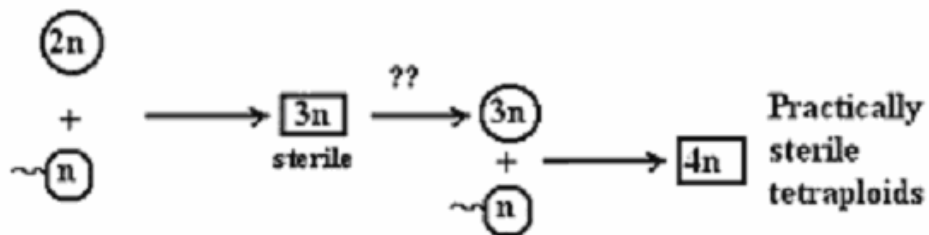
1. Oplození diploidního vajíčka pomocí diploidní spermie.



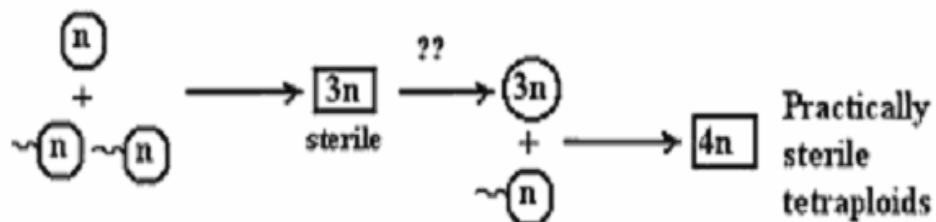
2. Oplození haploidního vajíčka pomocí haploidní spermie s následnou reduplikací během prvního dělení.



3. Oplození diploidního vajíčka pomocí haploidní spermie za vzniku triploidní samice, která produkuje triploidní vajíčka a následný vznik tetraploidní zygoty.



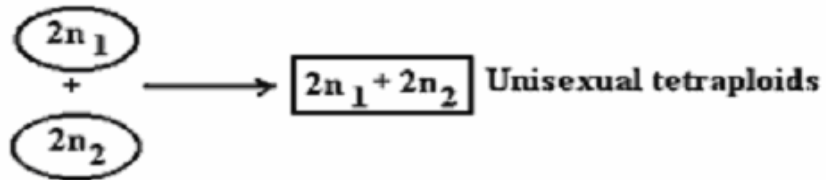
4. Tento případ je pouze u jeseterů. Oplození haploidního vajíčka pomocí dvou spermíí.



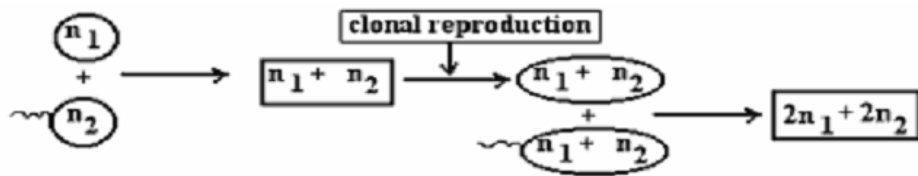
obr. č. 7: Způsoby možného vzniku alotertraploidních jedinců. o = gamety, □ = zygota (Vasil'ev, 1999).

I. Přímá cesta.

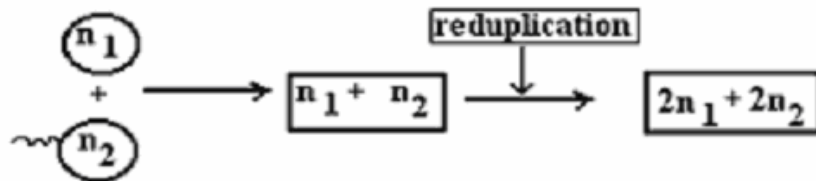
1. Oplození diploidního vajíčka pomocí diploidní spermie jiného druhu.



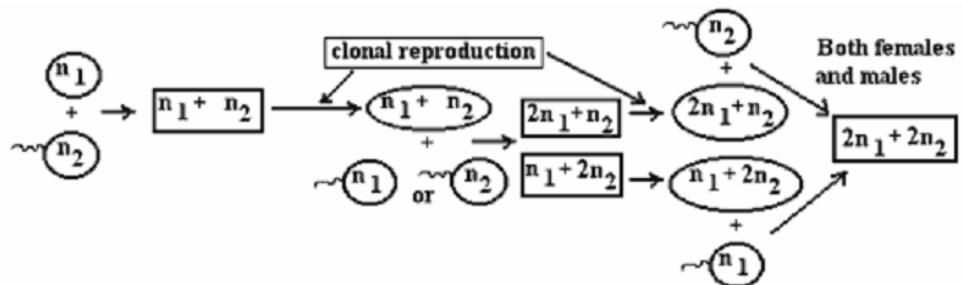
2. Hybridizace mezi diploidními druhy vede ke vzniku hybridů s následným splynutím jejich gamet.



3. Reduplikace diploidního zárodku během prvního dělení.



II. Nepřímá cesta.



2.6.1 Evoluční dopady polyploidie

Polyploidie je velmi závažný zásah do genomu jedince, ale i celého druhu. Takto veliká změna v genetickém základu musí takřka nevyhnutelně přinášet i své následky. Dopady polyploidie by se dali rozdělit do tří provázaných skupin dle Otta (2007):

1. Fyziologické dopady

- Velikost buněk
- Velikost a tvar těla

2. Genetické dopady

- Stabilita genomu
- Stabilita exprese genů

3. Evoluční dopady

- Následný evoluční vývoj
- Vznik nových rodů, čeledí a druhů

Při spojení všech tří skupin dochází k utváření nové evoluce celého druhu.

2.7 Metody stanovení úrovně ploidie

Pro určování ploidie je velmi důležité si předem zvolit danou metodu, která je pro náš konkrétní pokus nejvhodnější a jsme na ni technicky vybaveni. Rozdělení je popsáno dle Flajšhans a kol. (2008).

Metody stanovení se dělí na 2 části:

1. Přímé
2. Nepřímé

Přímé metody obsahují:

- a) Stanovení karyotypu
- b) Kvantifikaci obarvených jadérek v buňkách (NOR)
- c) Kvantifikaci obsahu DNA ve specificky barvených jádrech
 - Průtoková cytometrie
 - Spektrofluorometrie
 - Mikrodenzitometrie

Nepřímé metody obsahují:

- d) Coulterova metoda (impedance)
- e) Měření buněčných a jaderných geometrických charakteristik
- f) Molekulárně genetické techniky (elektroforéza enzymů)
- g) Morfologické rozdíly mezi diploidy a polyploidy

Nepřímé metody stanovení ploidie se liší od přímých tím, že jsou založeny na stanovení velikosti buněk a buněčných jader klasickými hematologickými postupy (Flajšhans a kol., 2008).

Přímé metody

a) Stanovení karyotypu:

Tato metoda se může provádět přímou preparací chromozómů z kraniální části ledvin, ze sleziny, z gonád nebo z epitelu žaberního aparátu. Další možností je odběr fibroblastů a leukocytů z ploutevního lemu. Velmi vhodným materiálem je též odebraná krev živých ryb. Z ohledu rychlosti vyšetření je stanovení karyotypu relativně namáhavé a pomalé. Tato metoda nelze využít v provozním měřítku. Velkým kladem tohoto stanovení je však to, že se jedná o nejpřesnější možnou metodu. Pomocí toho stanovení jsme schopni odhalit i jisté abnormality jako je například aneuploidie. Stanovení karyotypu je základní referenční metoda.

b) Kvantifikace obarvených jader v buňkách (NOR):

Při této metodě nemusí být obarvena pouze oblast organizátoru jadérka. Může zde být obarveno i celé jadérko metafázních nebo interfázních buněk. Pro barvení buněk je využito stříbro (Ag). Jedná se o rychlou a levnou metodu. Její využití je však možné pouze u druhů, které mají v haploidní sadě chromozómů jen jeden chromozóm s NOR (Philips, 1986; Flajšhans, 1992). Tato metoda je pro jeseterovité ryby nevhodná.

c) Kvantifikace obsahu DNA ve specificky barvených jádrech:

Tato metoda je založena na permeabilizaci buněčných membrán a obarvení jaderné DNA, s následným naměřením fluorescence, která je emitována komplexem obarvené DNA. NA tomto základě probíhá měření pomocí průtokové cytometrie (blíže v kapitole 3.4) a spektrofluorometrie. Dále mezi tyto metody patří mikrodensitometrie (Gold a Price, 1985; Gold a Ameniya, 1987; Gold, 1990), která je založena na měření absorbance barviva v buňkách nátěru obarveného Feulgenovou reakcí a je často používána i ke stanovení velikosti genomu.

Nepřímé metody

d) Coulterova metoda (impedance):

Jedná se o elektronické měření objemu jádra. Je založeno na změně impedance při průchodu částice mezi elektrodami, která odpovídá množství elektrolytu nahrazeného buňkou. Tím pádem musí odpovídat i jejímu objemu. Poprvé tuto metodu ke stanovení ploidie využil Wattendorf (1986) a ověřoval s ní triploidii u amura bílého. Princip této metody je využít i v mnoha hemoanalýzách, které jsou schopny počítat jaderné erytrocyty. Stanovení ploidie poté vychází z průkazné odlišnosti objemu erytrocytů u diploidů a triploidů (Svobodová 1998).

e) Měření geometrických charakteristik buněk a jader:

Vychází z rozdílné velikosti u ryb diploidních, triploidních, tetraploidních, ale případně i u vyšších ploidních úrovní (blíže v kapitole 3.4).

f) Molekulárně genetické techniky:

Ke stanovení ploidní úrovně jsou využívány jen ojediněle, ale jejich použití k těmto účelům je možné. Příkladem je elektroforéza enzymů, která je založena na separaci proteinů z tkání, jejich elektroforetické separaci a barvení jednoho či několika alozymů. Je zde využít stupeň polymorfismu odlišných alel v různých lokusech účastnících se translace specifických enzymů. Kvůli těmto vlastnostem je poté možné odlišit diploida od triploida díky silnějšímu barvení pruhu produkovaného dvojitou alelou triploida. Dále je možné využít i DNA fingerprinting (Han, 1992). Pomocí těchto metod lze stanovit též relativní podíl rodičovských genomů u hybridů (Sousa-Santos, 2005).

g) Morfologické rozdíly mezi diploidy a triploidy:

Tato metoda je založena na fenotypovém projevu jedince vůči jeho genomu a je vhodná pouze pro mezidruhové jedince. Jedná se však pouze o orientační stanovení, metoda je nepřesná a nelze jí brát jako jediné a hlavní kritérium. Stanovení jsou pro vědecké účely zcela nedostačující a pro jeseterovité ryby naprosto nevhodná.

2.8 Genetika jeseterovitých ryb

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

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

a) Cytogenetika dle Fontana a Zane (2007):

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

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

Přibližně ve stejné době pozoroval Ohno (1969), že karyotyp jesetera *Scaphirhynchus platyrhynchus* byl tvořen 112 chromozómy, z nichž 48 byly mikrochromozómy. Taktéž si všiml, že množství nukleární DNA bylo 3,6pg. Tento velký rozdíl v počtu chromozómů v porovnání s tím co bylo pozorováno ruskými výzkumníky, byl zřejmě zapříčiněn nízkým rozlišením předchozí techniky, která nebyla schopna rozpoznat mikrochromozómy.

Další vyvinutou metodou na zjištění karyotypu bylo sušení vzduchem v kombinaci s předošetřením mitotickými inhibitory (Fontana a Colombo, 1974).

Touto metodou bylo zjištěno, že karyotyp u *Huso huso* a *Acipenser sturio* se skládá ze 116 chromozómů, ale u *Acipenser naccarii* je již složen z 240 chromozómů.

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

tab. č. 7: Stanovený karyotyp u vybraných druhů jeseterovitých ryb.

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

Všechna tato data podpořila přítomnost dvou skupin jeseterů:

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

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

Objevení metody průtokové cytometrie učinilo kvantitativní stanovení obsahu nukleární DNA mnohem snadnější a rychlejší. Tato metoda je též považována za jednu z nejspolehlivějších. Velikost genomu u sedmi druhů amerických jeseterů byla nalezena v rozmezí 4,6 – 13,1pg (Blacklidge a Bidwell, 1993). Autoři poté rozdělili zmiňovaných 7 druhů jeseterů do 3 skupin a to v poměru 1:2:3, kde byly považovány:

- Tetraploidní druhy za ty s nejnižší hodnotou.
- Oktaploidní druhy dosahovaly středních hodnot.
- Dodekaploidní druhy dosahovaly nejvyšších hodnot.

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

- Tetraploidní
- Oktaploidní
- Hexadekaploidní

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

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

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

tab. č. 8: Počet chromozómů a obsahu DNA u *Acipenseriformes* skupiny A.

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

tab. č. 9: Počet chromozómů a obsahu DNA u *Acipenseriformes* skupiny B.

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

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

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

b) Molekulární genetika dle Fontana a Zane (2007):

Kromě přímé vizualizace chromozómů lze u jeseterovitých ryb zkoušet molekulárně biologické techniky. U jeseterovitých ryb je možné využít metodu fylogenetické rekonstrukce, která je založena na molekulárních značkách (Birstein *et al.*, 1997, 1998; Krieger *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2001). Stejně tak je možné využít metodu mapování počtu chromozómů na fylogenetických stromech (Maddisonem a Maddisonem, 1992). Nyní je metoda fylogenetických stromů využívána pro 22 z 27 druhů *Acipenseriformes* (Ludwig *et al.* 2001).

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

Nejpoužívanějšími značkovači jsou mikrosatelitní markry, které byly nalezeny ve všech prokaryotických a eukariotických genomech analyzovaných do dnešní doby. Převážně jsou obsaženy v nekódujících oblastech. Jedná se o nesmírně cenný nástroj pro studium genetické variability (Zane *et al.*, 2002). Mikrosatelitní markry byly poprvé izolovány z *Acipenser fulvescens* s 240 chromozómy (May *et al.* 1997).

Mikrosatelitní markry mohou být postiženy určitými problémy:

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

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

tab. č. 10: Testování a izolování mikrosatelitních lokusů dle May et al. (1997) (M) a Ludwig et al. (2001) (L). **p** = Polymorfní; **m** = Monomorfní; **n** = Neaktivní.

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

2.9 Ochrana genofondu

Genofond je základním pojmem tzv. konzervační genetiky, která je zaměřena na odborně podloženou ochranu biodiverzity, na její udržení a odborné šlechtění. Genofondem rozumíme soubor všech genotypů jedinců, jež populaci nebo daný druh tvoří. Podstatu genofondu tvoří genetická diverzita příslušného druhu, která je v rámci jednotlivých populací dědičná, svým způsobem je adaptabilní, což je významný předpoklad zdárné existence a evoluce (Hanel a Lusk, 2005). Genofond tedy není neměnný, je to dynamický systém, který se přizpůsobuje biotickým a abiotickým podmínkám svého prostředí.

Ochrana genofondu by se dala shrnout do následujících třech bodů:

1. Je nezbytné udržení životaschopné populace daného druhu. Dalo by se říci, že je nutné udržet životaschopnou populaci za jakoukoliv cenu. Nesmírně důležitý je zde časový aspekt, populace musí být životaschopná dlouhodobě (nekonečně) (Flajšhans a kol., 2008). Pokud druh jednou vymře, není již co ochraňovat ani zachraňovat. Evoluční linie jsou jedinečné a není možné je nijak opakovat.
2. Dále musí být zachována schopnost neustále se přizpůsobovat měnícímu se prostředí. To znamená udržení geneticky daných adaptačních schopností. Celý druh musí být dlouhodobě geneticky zdravý (Flajšhans a kol., 2008). Pokud by z nějakých důvodů došlo ke ztrátě genetické čistoty druhu, je poté velmi obtížné (někdy až nemožné) genetickou čistotu daného druhu opět zajistit. Může dojít až k vyhynutí druhu tak jak byl znám.
3. Možnost udržení schopnosti pro další případné speciální události. Tohoto bodu se v podstatě nikdy nedá dosáhnout, protože vývoj daného druhu nikdy nekončí. Vývoj může skončit pouze tím, že dojde k vyhynutí druhu. To by ovšem znamenalo, že ochranná opatření genofondu selhala a genofond daného druhu byl ztracen.

Všechny výše uvedené kroky je třeba provádět pečlivě a správně, ale i s patřičnou rychlostí a rasantností. Jelikož u jeseterovitých druhů „již zítra nemusí být co ochraňovat“.

2.9.1 Ochrana rozmanitosti druhu

V současné době je již velmi dobře zmapován původní výskyt mnoha druhů. Díky získaným poznatkům z minulých let, není dnes složité určit původní ichthyofaunu dané oblasti či biotopu.

Problémem dnešní doby tedy není rozpoznat původ daného druhu, ale jeho udržení (či navrácení) v přirozené oblasti, a to v dostatečném a životaschopném stavu.

Rozmanitost druhu je dle Hanela a Luska (2005) nejvíce ovlivněna těmito faktory:

- Podélná migrace
- Příčná migrace (velké toky)
- Znečištění vod
- Lov ryb (legální i nelegální)

Jak je vidět z výše uvedených bodů jedná se o faktory antropogenního původu. Vlivem staveb vodních děl (migrace), průmyslových závodů blízko toků (znečištění) a rybářského tlaku (kaviár) jsou jeseteři na mnoha místech již vyhubeni nebo jim vyhubení hrozí. Počty jeseterů v některých lokalitách jsou dnes již tak minimální, že se prakticky nejedná o životaschopný druh.

Je tedy nesmírně důležité zabývat se nejen ochranou určitých druhů, ale také ochranou jejich rozmanitosti. Druh totiž musí být ochraňován v určitém počtu, poměru pohlaví, věku atd. aby se dal považovat za dále životaschopný. Velkým problémem je však fakt, že jeseterovité ryby se vyskytují v mnoha státech, které se například z politických důvodů ochranou původních druhů či rozmanitosti druhu nemohou zabývat nebo se zabývají nedostatečně (například okolí Kaspického moře). V mnoha případech je tedy jedinou možností záchranný chov daného druhu v jiném státě.

Ochrana rozmanitosti druhu je v dnešní době pro jeseterovité ryby již nutností a je třeba, aby její pravidla byla ustanovena legislativou. V České republice se této problematice věnuje například vyhláška 395/1992 Sb., NATURA 2000 a CITES (Hanel a Lusk, 2005).

2.9.2 Ochrana vnitrodruhové (genetické) diverzity

Vnitrodruhová diverzita je studována pomocí prostředků genetiky populací. I když nejdůležitějším faktorem je velikost populace, tak z hlediska genetického je důležitější efektivní velikost populace. Efektivní velikost populace bývá zpravidla menší, jelikož se jedná o množství jedinců, kteří předají svůj genofond další generaci (Flajšhans a kol., 2008).

Pokud se hodnota efektivní velikosti bude stále snižovat, dostaví se tři úzce související populačně genetické procesy:

1. Efekt hrdla láhve (*bottleneck effect*):

Jde o náhlé a velké snížení velikosti populace, kdy dojde k uplatnění jen malé části genotypů. Důvodem takového efektu může být například vytrávení úseku řeky. Dochází tak k úbytku určitých alel a ztrátě části genofondu (Flajšhans a kol., 2008).

2. Náhodný genetický posun (*genetic drift*):

Je následkem toho, že v přirozených podmínkách jsou velké populace vlastně rozděleny do několika subpopulací a čím je subpopulace menší, tím se zvětšuje efekt náhodného genetického posunu. Doprovodnými vlastnostmi tohoto jevu je ztráta určitých alel, ovšem i jejich fixace. Náhodný genetický posun se asi nejvíce objevuje při určitých speciálních událostech, jako jsou změny povodí, umělé vodní nádrže, závalová jezera atd. Po těchto událostech mohou vznikat lokálně omezené endemické druhy (Flajšhans a kol., 2008).

3. Úzká příbuzenská plemenitba (*inbreeding*):

Jedná se pravděpodobně o nejzávažnější problém malých a zmenšujících se populací. Při tomto procesu se velmi zvyšuje míra homozygotnosti. To znamená, že při úzké příbuzenské plemenitbě se velmi rychle převádí alely z heterozygotního do homozygotního stavu. Což má za následek negativní ovlivnění veškerých vlastností, jež jsou spojeny s rozmnožováním (plodnost, pohyblivost atd.). Dalším problémem je selekce. Ve většině umělých chovů nebo záchranných chovů není žádaná náhodná či nezáměrná selekce. Dochází tak k rozmnožování stále stejných jedinců a následně jejich potomků. Takovýto jedinci však nemusí být zcela vhodné například k doplňování původních populací (Flajšhans a kol., 2008).

Pro ochranu vnitrodruhové diverzity je nesmírně důležité, aby žádný z výše uvedených procesů nenastal a byly dodrženy tyto parametry:

- Efektivní velikost populace by měla být 300 – 500 kusů (Gela, 2008)
- Určení původní populace (Gela, 2008)
- Ochrana existující populace a preferování její násady (Hanel a Lusk, 2005)
- Zásadně nepřesouvat násady mimo původní hydrologický systém (Hanel a Lusk, 2005)
- Snaha o zabránění mimodruhového křížení (Hanel a Lusk, 2005)
- Odhalování genetických vad a hybridů a jejich odstraňování z chovů (Flajšhans a kol., 2008)
- V záchranných chovech neprovádět naprostou selekci (Flajšhans a kol., 2008)

Posledním velkým problémem je fakt, že ochrana vnitrodruhové diverzity nemá doposud v České republice pevné legislativní předpisy. Záleží tedy na každém individuálním chovu a chovateli jak tuto ochranu pojme a provádí (Hanel a Lusk, 2005).

3. Materiál a metodika

3.1 Použité druhy jeseterů

Pro praktickou část této bábaklářské práce bylo vybráno 5 druhů jeseterovitých ryb. Jednalo se o tyto druhy:

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

tab. č. 11: Pozorování jedinci u *Acipenser ruthenus*.

<i>Acipenser ruthenus</i>			
Jedinec	Identifikační číslo	Datum odběru	Původ
1	171	28. 2. 2008	Rybníkářství Pohořelice a.s.
2	12	14. 2. 2008	FROV JU
3	2015	16. 4. 2008	FROV JU
4	2224	15. 3. 2006	FROV JU
5	47	14. 2. 2008	FROV JU
6	2183	---	FROV JU
7	26	---	FROV JU
8	2161	15. 3. 2006	FROV JU

tab. č. 12: Pozorování jedinci u *Huso huso*.

<i>Huso huso</i>			
Jedinec	Identifikační číslo	Datum odběru	Původ
1	6516	1. 12. 2003	FROV JU
2	25	1. 11. 2003	FROV JU
3	6120	1. 12. 2003	FROV JU
4	22	1. 12. 2003	FROV JU

tab. č. 13: Pozorování jedinci u *Acipenser baerii*

<i>Acipenser baerii</i>			
Jedinec	Identifikační číslo	Datum odběru	Původ
1	2117	16. 4. 2008	FROV JU
2	4020	14. 2. 2008	FROV JU
3	2	---	FROV JU
4	2346	16. 4. 2008	FROV JU
5	2370	4. 3. 2008	FROV JU
6	2264	---	FROV JU
7	4190	14. 2. 2008	FROV JU
8	3520	16. 4. 2008	FROV JU
9	3553	16. 4. 2008	FROV JU
10	2329	4. 3. 2008	FROV JU
11	2107	---	FROV JU
12	13	16. 4. 2008	FROV JU
13	2200	4. 3. 2008	FROV JU
14	2876	---	FROV JU

tab. č. 14: Pozorování jedinci u *Acipenser gueldenstaedtii*.

<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>			
Jedinec	Identifikační číslo	Datum odběru	Původ
1	21	6. 4. 2008	FROV JU
2	2401	16. 4. 2008	FROV JU
3	2403	16. 4. 2008	FROV JU
4	R23	22. 11. 2001	FROV JU
5	39	6. 4. 2008	FROV JU
6	2814	6. 4. 2008	FROV JU
7	4467	---	FROV JU
8	R11	22. 11. 2001	FROV JU
9	2905	22. 11. 2001	FROV JU
10	33	---	FROV JU
11	2616	---	FROV JU
12	2592	16. 4. 2008	FROV JU

tab. 15: Pozorování jedinci u *Acipenser stellatus*.

<i>Acipenser stellatus</i>			
Jedinec	Identifikační číslo	Datum odběru	Původ
1	19	6. 3. 2008	Germany
2	61	6. 3. 2008	Germany
3	62	6. 3. 2008	Germany
4	66	6. 3. 2008	Germany
5	69	6. 3. 2008	Germany
6	18	6. 3. 2008	Germany
7	5	6. 3. 2008	Germany
8	7	6. 3. 2008	Germany

3.2 Získávání vzorků

Příprava preparátů závisí na zvolené metodě určování úrovně ploidie (viz kapitola 3.4). V experimentální části této práce byla zvolena metoda obrazové cytometrie jader červených krvinek (erytrocytů) barvených Feulgenovou reakcí (Hardie a kol., 2002), která využívá pro densitometrická měření integrovanou optickou hustotu DNA v jádrech erytrocytů. Vlastní měření tedy vychází z krve zkoumaných jedinců a jejich krevních nátěrů.

Odběry krve vycházejí z metodiky dle Svobodové a kol. (1986), jež byla upravena Pravdou a Svobodovou (2003).

Odběr krve byl prováděn u ryb s hmotností nad 200g prostřednictvím punkce ocasních cév. Krev byla odebírána injekční jehlou nasazenou na 1ml injekční stříkačku. K zamezení srážení odebraného krevního vzorku byly jehly i stříkačky předem vypláchnuty vodným roztokem sodné soli heparinu (Heparin SPOFA).



obr. č. 8: Injekční jehla, injekční stříkačka.

Oproti kostnatým rybám, kde techniku odběru popisuje Pravda a Svobodová (2003), byl postup u jeseterovitých modifikován, protože céva leží v průsečíku horizontální přímky vedené napříč ocasním násadcem v rovině řitní ploutve, a vertikální přímky (tj. kolmice na první přímku) spuštěné ze spodního cípu kostěného štítu v boční řadě.

Jeseter byl fixován na horizontální podložce zakrytím hlavy a ocasu vlhkou tkaninou. Injekční stříkačka s jehlou byla nasazena v oblasti ocasního násadce kolmo, pod spodní cíp dobře viditelného kostěného štítu.



obr. č. 9: Odběr krve z ocasní cévy.

Jediná tkáň, která při tomto způsobu odběru klade jehle odpor, je stěna cévní. Její překonání je signalizováno náběrem krve do stříkačky (Flajshans, 2008, ústní sdělení).

Výhodou této metody je její nenáročnost, dostatečné množství odebrané krve a při dodržení všech postupů by nemělo docházet ani k minimálním ztrátám (nutná dezinfekce). Nevýhodou je obtížná manipulace s většími jedinci a nebezpečí náhodného pohybu ryb při provádění vpichu. U generačních ryb je tedy vhodné provádění anestézie či fixace ryby rukama přítomných pracovníků.

3.3 Příprava vzorků a preparátů

Pro obarvení DNA se používá tzv. Feulgenova reakce (Feulgen a Rossenbeck, 1924). Což je vlastně série specifických histochemických reakcí, která využívá:

- 1) hydrolýzy DNA na preparátu silnou kyselinou (kys. chlorovodíkovou), která vede ke vzniku aldehydových skupin v molekule DNA,
- 2) barvení preparátu – tj. volných aldehydových skupin v molekule DNA Schiffovým činidlem (fuchsinem odbarveným SO_2), kdy obarvená DNA získává růžovočervenou barvu.

Použito bylo kitu fy. Merck „DNA Staining Kit According to Feulgen“. Před začátkem každé série barvení vzorků je nutno zkontrolovat následující vlastnosti:

- Teplota v místnosti by měla být $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$
- Dostatečné množství a kvalita pracovních roztoků
- Schiffovo činidlo musí být bezbarvé
- Používané roztoky nesmí být expirované
- Barvené vzorky musejí být jasně označeny (nepopisovat fixem)
- Barvené vzorky musejí být barveny spolu se standardy

Pokud všechny vzorky a používané roztoky splňují výše uvedené parametry, je možné začít s barvením. Veškeré operace by měly probíhat v odvětrávané digestoři, jelikož pracujeme s nebezpečnými a žíravými látkami. Je tedy nezbytné i použití vhodných ochranných prostředků (bavlněný plášť, gumové rukavice, pinzeta, ochranné brýle aj.).

Do první kyvety, kterou si označíme jako „HCl“ vložíme skla s nátěry. Velmi podstatné je, aby se žádná sklíčka s nátěry vzorků vzájemně nedotýkala. Pokud by se tak stalo, nemohlo by dojít ke stejnoměrnému nabarvení a vzorek by byl nenávratně zničen. Když jsme ujištěni, že skla jsou v kyvetě dobře umístěna, přidáme 5M HCl na hydrolýzu DNA. Hladina kys. chlorovodíkové by neměla dosahovat až k označení vzorku (po zabroušené okraje). Hydrolýza DNA probíhá 50 minut, je nutné měřit čas. Po uplynutí 50minut odstraníme kys. chlorovodíkovou z kyvety do předem připravených sběrných nádob. Při veškeré manipulaci s kyvetou je nutná opatrnost.

Když je kyselina odstraněna, je nutné vzorky propláchnout destilovanou vodou. Kyvetu naplníme na 2 minuty, opět měříme čas a dobu dodržujeme. Vodu poté opět odstraníme a propláchnutí ještě jednou opakujeme na 2 minuty.

Po propláchnutí skla se vzorky přesuneme do další kyvety, kterou máme předem vyhrazenou pro aplikaci Schiffova činidla. Roztok naléváme opět pouze k zabroušeným okrajům vzorků. Skla se nesmějí v žádném případě vzájemně dotýkat. Aplikace Schiffova činidla trvá 60 minut. Doba musí být přesně dodržena.

Při hodinovém čekání, kdy působí Schiffovo činidlo, si můžeme připravit pracovní roztok pyrosiřičitanu sodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, který musí být na každé barvení čerstvý (nelze připravit dopředu). Tento pracovní roztok namícháme ze 190ml destilované vody, 10ml zásobního roztoku pyrosiřičitanu sodného a 2ml 5M HCl. Tyto množství odpovídají kyvetě s osmy skly se dvěma opakováními.

Po uplynutí 60 minut slijeme Schiffovo činidlo z kyvety do předem připravené nádoby. Nádobu je nutné pečlivě uzavřít a uchovávat v temnu. Poté kyvetu naplníme předem připraveným pracovním roztokem pyrosiřičitanu sodného a to na dobu 3 minut. Tento krok dvakrát opakujeme. Pokud jsou obě opakování splněna je třeba skla propláchnout destilovanou vodou po dobu 2 minut, propláchnutí poté opakujeme ještě jednou.

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

tab. č. 16: Alkoholové lázně.

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

Posledním krokem přípravy vzorků je přesunutí skel do kyvety s xylenem, kde je necháme po dobu jedné minuty. Použitý xylene poté slijeme do předem připravené nádoby. Skla opatrně osušíme, opatříme je popisem (datum, standard atd.) a uložíme. Počet nabarvených skel zaznamenáváme kvůli expiraci činidel.

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

Po sérii těchto kroků máme připraveny vzorky k měření úrovně ploidie, resp. velikosti genomu pomocí metody obrazové cytometrie. Pokud dodržíme výše uvedený postup, je metoda relativně snadná a praktická. Jedinou nevýhodou je časová náročnost. Obarvení jedné kyvety může trvat 2,5 až 3 hodiny. Velmi vhodné je tedy používání větších kyvet (kapacita až 100 skel). Tím by došlo k výrazné úspoře času a snižování počtu standardů, jenž jsou určeny pouze pro vzorky, se kterými byly barveny.

3.4 Použité metody stanovení úrovně ploidie

Pro tuto bakalářskou práci byly vybrány dvě vhodné metody stanovení úrovně ploidie. Jednou z nich bylo měření geometrických charakteristik buněk a jader, zejména pak denzitometrická analýza množství DNA v jádrech krvinek obarvených Feulgenovou reakcí (denzitometrická analýza obrazu, resp. obrazová cytometrie). Jako druhá metoda byla vybrána kvalifikace obsahu DNA instrumentálními metodami (průtoková cytometrie). Obrazová cytometrie byla zvolena jako hlavní způsob stanovení, a jako varianta možného kontrolního měření byla ustanovena metoda průtokové cytometrie. Použité metody stanovení jsou popsány dle Flajšhanse a kol. (2008).

Obě metody byly vybrány z těchto důvodů:

- Vhodnost pro jeseterovité ryby
- Dostupnost techniky a preparátů
- Přesnost a spolehlivost metod
- Snadné měření či výpočty
- Přijatelná časová náročnost

1) Denzitometrická analýza obrazu (obrazová cytometrie):

Metoda vychází z rozdílné velikosti buněčných jader u diploidů, triploidů, tetraploidů a případně i u ryb s vyšší ploidní úrovní. Rozměry erytrocytů byly většinou zjišťovány z barevných krevních nátěrů pod mikroskopem s mikrometrem nebo z mikrofotografií. Tuto metodu poprvé použil Swarup (1959). Délka celého erytrocytu nebo jádra erytrocytu (podélná osa) jsou obecně považovány za nejlepší ukazatel ploidní úrovně u diploidních a triploidních jedinců (Wolters 1982; Benfey 1984; Borón, 1994). Naproti tomu šířka celého erytrocytu a šířka jeho jádra (příčná osa) se s úrovní ploidie prakticky nemění a je nevýznamná.

Použití a rozvoj techniky digitalizace mikroskopického obrazu a počítačové analýzy obrazu mělo za následek výrazné urychlení a zpřesnění této metody. V dnešní době se jedná v podstatě o alternativu průtokové cytometrie (Cormier, 1993; Flajšhans, 1997). Kromě délky erytrocytu a jeho jádra je možné jako indikátor ploidie použít i další přímo měřené vlastnosti. Jedná se například o plochu erytrocytu,

o plochu jádra erytrocytu, jejich obvody a densitometrii (Svobodová, 1998; Flajšhans a Vajcová, 2000; Linhart, 2001; Ráb, 2006). Pro tuto bakalářskou práci však jako indikátor ploidie byla vybrána densitometrická analýza obrazu buněk, které jsou obarveny Feulgenovou reakcí (více viz kapitola 3.3). Stanovení touto metodou je založeno na skutečnosti, že množství navázaného barviva odpovídá množství DNA. Množství barviva se stanoví změřením množství světla, které absorbuje. To znamená, že se změří jeho densita (hustota). Ta se však vypočítává nepřímou optickou denzitou z množství světla, které prochází objektem (Hardie a kol., 2002). Integrovaná optická hustota (IOD) se vypočítá z optických hustot v každém pixelu digitalizovaného objektu, což znamená, že hodnoty buněčných jader proti pixelům okolí se rovnají pozadí.

Výpočet množství DNA v buněčném jádře (C-hodnota) je založen na mezinárodních standardech. V tomto případě na kuru domácím (*Gallus domesticus*), který obsahuje 1,25 pgDNA.jádro⁻¹. Je tedy nutné naměřit IOD standardu a IOD měřeného vzorku (C-hodnota standardu je celosvětově udána).

Vzorec C-hodnoty:

$$\text{C-hodnota}_{\text{vzorek}} = \text{DNA}_{\text{standard}} \times (\text{prům. IOD}_{\text{vzorek}} / \text{prům. IOD}_{\text{standard}})$$

Na FROV JU ve Vodňanech kde měření probíhalo, byl použit i interní standard lín obecný (*Tinca tinca*), který obsahuje 1,01 pgDNA.jádro⁻¹. Interní vzorek však slouží pouze jen jako kontrola nastavení a kalibrace přístrojů.

Pro měření úrovně ploidie touto metodou je velmi nutné mít pozorované vzorky a standardy správně připraveny (viz kapitola 3.3).

Tato metoda je velmi vhodná pro stanovení úrovně ploidie jeseterovitých ryb, jelikož je schopna určit úroveň u tetraploidů, pentaploidů a hexaploidů, eventuálně i u vyšších úrovně ploidie které se u těchto druhů mohou vyskytnout. Při měření hodnot erytrocytů nového jedince, u kterého doposud neznáme úroveň ploidie, je vždy nutné vycházet z referenčních hodnot diploidních jedinců téhož druhu a jako ověření je vhodné provést další měření pomocí jiné metody stanovení úrovně ploidie a výsledky mezi sebou porovnat. Pokud se úrovně ploidie shodují z obou způsobů měření je chyba takřka vyloučena.

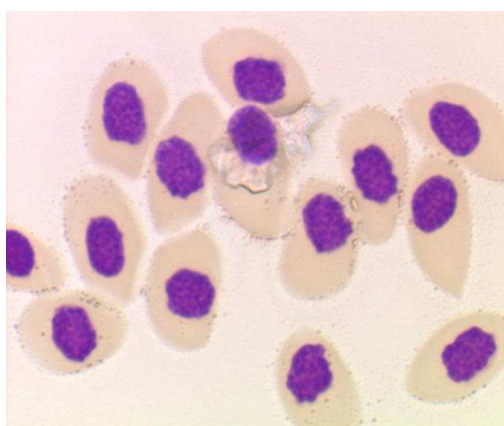
2) Kvalifikace obsahu DNA instrumentálními metodami (průtoková cytometrie):

Principem této metody je permeabilizace buněčné membrány, následné obarvení jaderné DNA některým DNA barvivem (například 4',6-diamidino-2-phenylindolem, DAPI nebo propidiumjodidem a PI), a poté naměření fluorescence, která je emitována komplexem obarvené DNA.

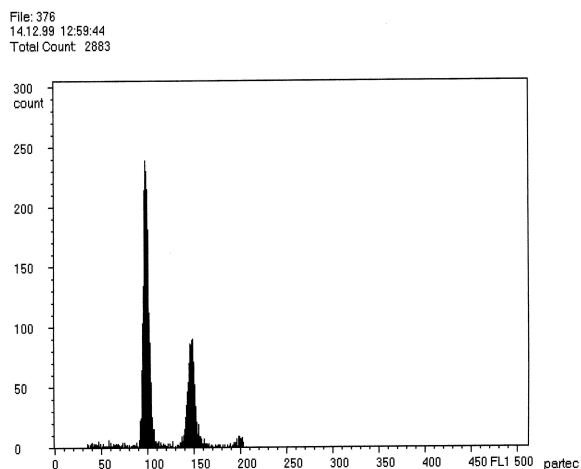
Výsledky měření bývají většinou zobrazeny formou histogramu intenzity fluorescence v jádrech analyzované suspenze. Z výše uvedených poznatků můžeme tedy usoudit, že například jedinec, který je triploid a má tudíž tři sady chromozómů a tím i 1,5x více DNA než jedinec stejného druhu, který je diploid, musí poté vrchol histogramu být cca 1,5x dále na ose X než u diploida.

Průtoková cytometrie je rychlá a přesná metoda pro určení ploidie, která je od 80. let minulého století celosvětově používána ke studiu diploidně-polyplodních komplexů ryb (Ráb, 2006). Tato metoda je schopna určit ploidii i u embryí (Lecommandeur, 1994) a larev (Ewing, 1991), ale i u starších jedinců z buněk tkání a krve (Thorgaard, 1982; Allen, 1983). Jedinou nevýhodou tohoto měření je, že konkrétní vzorek jsme schopni naměřit jen jednou. Při průtokové cytometrii se vzorek spotřebovává, vzorek který vložíme do přístroje, již nikdy nejsme schopni získat zpět.

Metoda průtokové cytometrie byla pro tuto bakalářskou práci zvolena jako možnost kontroly, avšak v důsledku správných stanovení a přesných výsledků pomocí obrazové cytometrie nebyla průtoková cytometrie zapotřebí, a tudíž nebyla při této práci použita.



obr. č. 10: Jádra erytrocytů obarvená Feulgenovou reakcí.



obr. č. 11: Histogram relativního obsahu DNA diploidů a triploidů. Dle Flajšhane a Linharta (2000).

3.5 Potřebná zařízení, přístroje, vybavení a jejich použití

Pro správnou volbu metody měření úrovně ploidie je nutné předem zvážit nejen fakt, jestli se daná metoda pro zkoumaný druh hodí, ale také jestli jsme na ni dostatečně technicky vybaveni a jsme tedy schopni měření vůbec uskutečnit.

Veškeré drobné vybavení, které bylo potřebné například pro získávání vzorků je popsáno v minulých kapitolách (viz kapitoly 3.2 a 3.3). Ovšem pro vlastní měření úrovně ploidie pomocí metody obrazové cytometrie, jež byla vybrána jako hlavní metoda stanovení (viz kapitola 3.4), bylo třeba použít určité technické vybavení.

Na FROV JU ve Vodňanech kde měření probíhalo, bylo použito následujících přístrojů a vybavení:

1. Hardware

- Mikroskop
- Světlo k mikroskopu
- Kamera snímající vzorek
- PC
- Přídavná obrazovka (není nutná)

2. Software

- Windows XP
- Micro Image

Pro správné stanovení ploidie však nestačí mít pouze k dispozici výše uvedené vybavení, je též nutné při začátku každého měření správné nastavení přístrojů a sladění hardwaru se softwarem. Pečlivost této přípravy je nezbytně nutná pro objektivitu každého měření.

Příprava a nastavení přístrojů má svůj pevný řád, který se musí striktně dodržovat a skládá se z těchto následujících po sobě jdoucích kroků (Flajšhans a Drozd, 2009, ústní sdělení):

1. Zapnout příslušného PC
2. Zapnout kameru, která snímá obraz z mikroskopu
3. Zapnout program Micro Image
4. V programu Micro Image zapnout snímání obrazu
5. Zaostřit na plochu preparátu, která je bez buněk a sejmout snímek
6. Vyvážit bílou barvu pomocí tlačítka White Balance
7. Sejmout obraz s nabarvenými jádry a vypnout live image
8. Nastavení Standard optical na Free form density
9. Ověřit intenzitu světla u kanálu Green, která musí být 170 – 190
10. Nastavení z Free form přepnout na Standard optical density
11. U každého snímku zvolit zobrazování pouze kanálu Green
12. Nastavení kalibrace na obj. conf. x 100
13. Načtení souboru Feulgen ery
14. Naměření hodnot jader
15. Import naměřených dat do programu Excel

Celý výše uvedený postup se prováděl pouze u tzv. prvního skla dne (první měření). Pro měření dalších vzorků (skel) se prvních šest bodů může vynechat, jelikož jsou již nastaveny z prvního měření. Pro určení vzorku bylo třeba naměřit minimálně 50 dobře vybarvených jader s koncentrovaným chromatinem. V případě absolutně neznámého vzorku bylo vhodné naměřit minimálně 130 jader.

Velmi důležitá je přesnost u prvního měření a určení standardu kura domácího (*Gallus domesticus*) a lína obecného (*Tinca tinca*), podle kterého se odvíjí veškerá další měření. Naměřením IOD kura domácího (*Gallus domesticus*) a lína obecného (*Tinca tinca*) bylo vypočteno IOD lína a tato hodnota musela být 1,01 pgDNA.jádro⁻¹ (více viz kapitola 3.5.) Teprve po tomto přesném naměření standardů bylo možné začít měřit neznámé vzorky.

4. Výsledky

4.1 Výsledky měření velikosti genomu

Měření velikosti genomu probíhalo u 5 vybraných druhů jeseterovitých ryb. Jednalo se o zástupce těchto druhů:

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

* Druh *Huso huso* byl však pro špatnou kvalitu vzorků a následnou neprůkaznost z této bakalářské práce vyřazen.

Při stanovování velikosti genomu u těchto 5 druhů jeseterovitých ryb byl použit jeden mezinárodní standard a jeden interní:

- *Gallus domesticus* (mezinárodní standard)
- *Tinca tinca* 2n a 3n (interní standard)

* Mezinárodní standard je původem z firmy Vodňanská drůbež, s.r.o. a interní standard je původem z FROV JU ve Vodňanech.

tab. č. 17: Výsledky měření velikosti genomu u *Acipenser ruthenus*.

<i>Acipenser ruthenus</i>								
Jedinec	1	2	3	4	5	6	7	8
C-hodnota	1,86 ± 0,015	1,87 ± 0,013	1,84 ± 0,018	1,85 ± 0,009	1,84 ± 0,011	2,95 ± 0,03	2,92 ± 0,026	2,98 ± 0,031

tab. č. 18: Výsledky měření velikosti genomu u *Acipenser baerii*.

<i>Acipenser baerii</i>							
Jedinec	1	2	3	4	5	6	7
C-hodnota	4,15 ± 0,024	4,17 ± 0,019	4,1 ± 0,025	4,18 ± 0,022	4,11 ± 0,016	4,18 ± 0,018	4,16 ± 0,023
Jedinec	8	9	10	11	12	13	14
C-hodnota	4,16 ± 0,019	4,17 ± 0,027	4,13 ± 0,022	6,45 ± 0,043	6,19 ± 0,039	3,11 ± 0,03	4,5 ± 0,029

tab. č. 19: Výsledky měření velikosti genomu u *Acipenser gueldenstaedtii*.

<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>						
Jedinec	1	2	3	4	5	6
C-hodnota	3,96 ± 0,031	3,87 ± 0,024	3,92 ± 0,011	3,95 ± 0,019	3,94 ± 0,023	3,95 ± 0,021
Jedinec	7	8	9	10	11	12
C-hodnota	3,93 ± 0,027	3,95 ± 0,02	3,96 ± 0,019	3,9 ± 0,025	6,05 ± 0,051	5,92 ± 0,043

tab. č. 20: Výsledky měření velikosti genomu u *Acipenser stellatus*.

<i>Acipenser stellatus</i>								
Jedinec	1	2	3	4	5	6	7	8
C-hodnota	2,37 ± 0,032	2,32 ± 0,023	2,32 ± 0,019	2,35 ± 0,022	2,31 ± 0,03	2,31 ± 0,028	2,29 ± 0,026	2,28 ± 0,018

tab. č. 21: Výsledky měření velikosti genomu u mezinárodního standardu *Gallus domesticus*.

<i>Gallus domesticus</i>			
Jedinec	1	2	3
C-hodnota	1,25 ± 0	1,25 ± 0	1,25 ± 0

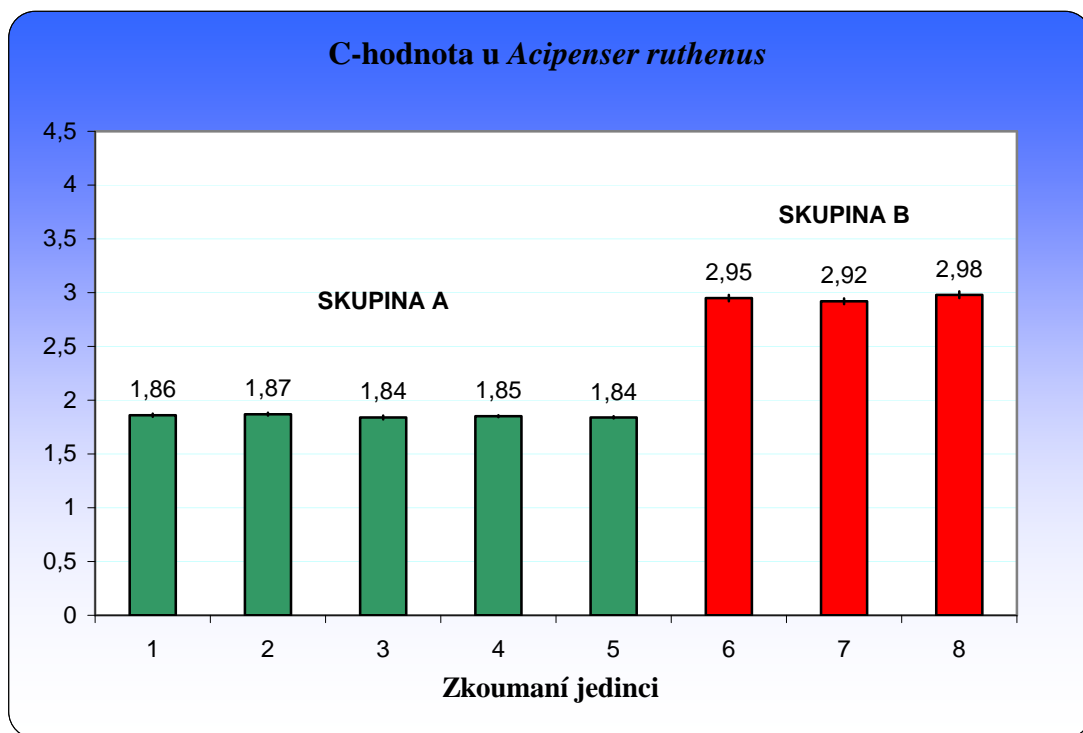
tab. č. 22: Výsledky měření velikosti genomu u *Tinca tinca* 2n.

<i>Tinca tinca</i> 2n						
Jedinec	1	2	3	4	5	6
C-hodnota	1,01 ± 0,023	1,05 ± 0,019	0,99 ± 0,021	1,06 ± 0,031	1,06 ± 0,024	1,02 ± 0,022

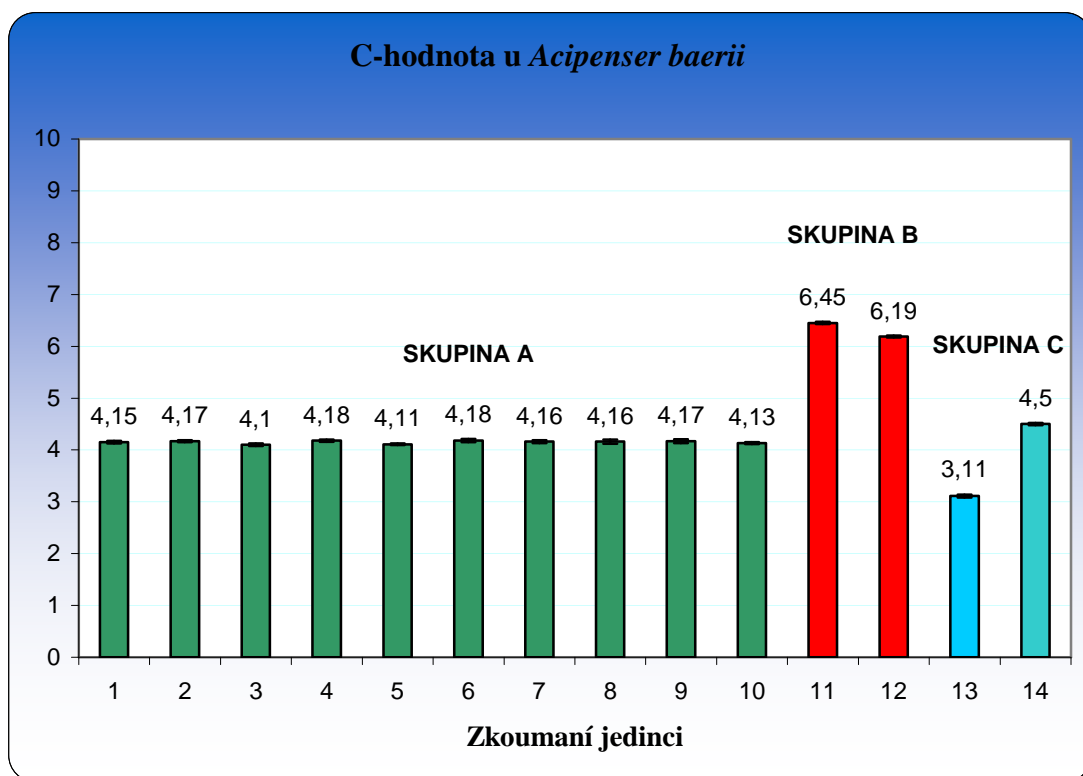
tab. č. 23: Výsledky měření velikosti genomu u *Tinca tinca* 3n.

<i>Tinca tinca</i> 3n						
Jedinec	1	2	3	4	5	6
C-hodnota	1,55 ± 0,03	1,5 ± 0,028	1,59 ± 0,019	1,55 ± 0,023	1,55 ± 0,021	1,51 ± 0,016

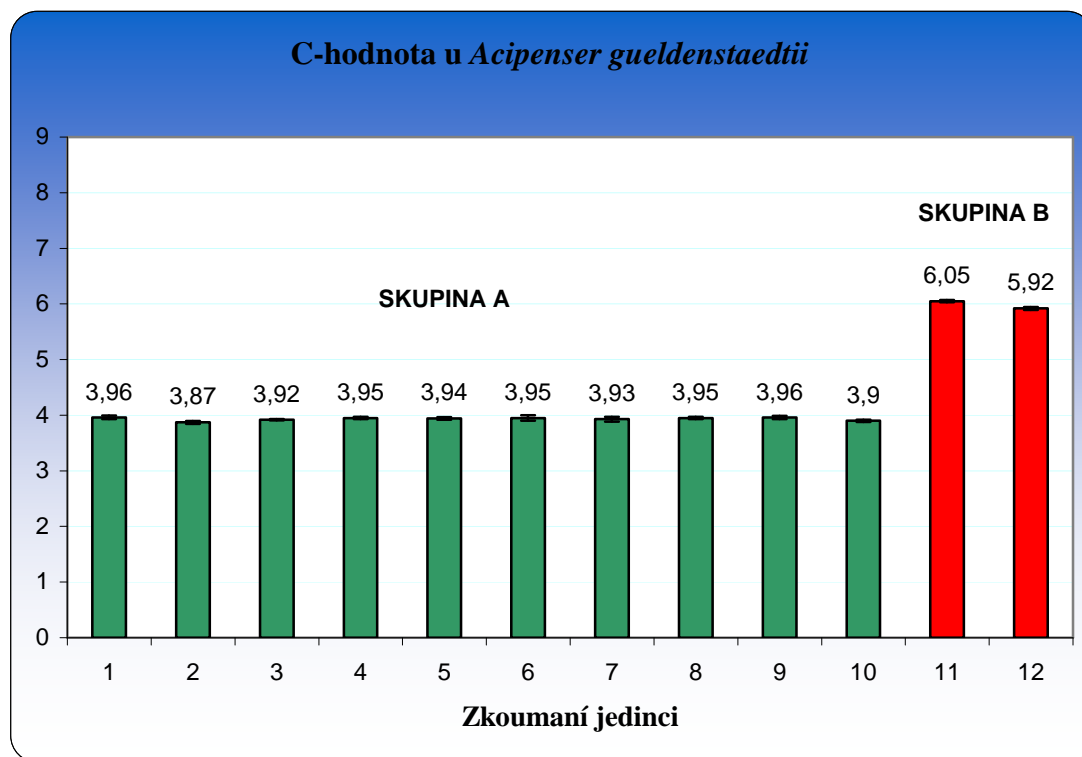
graf č. 2: Porovnání C-hodnot u *Acipenser ruthenus*. Skupiny A a B se mezi sebou statisticky významně liší ($P < 0,05$).



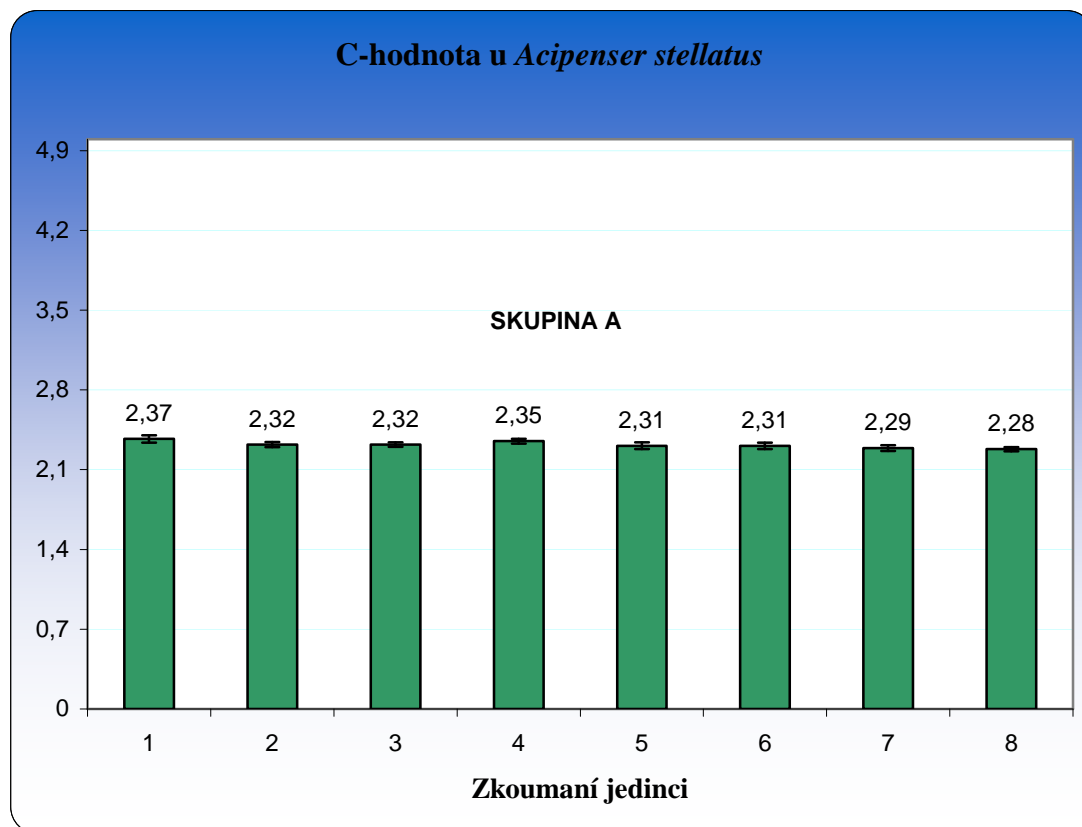
graf č. 3: Porovnání C-hodnot u *Acipenser baerii*. Skupiny A, B a C se mezi sebou statisticky významně liší ($P < 0,05$).



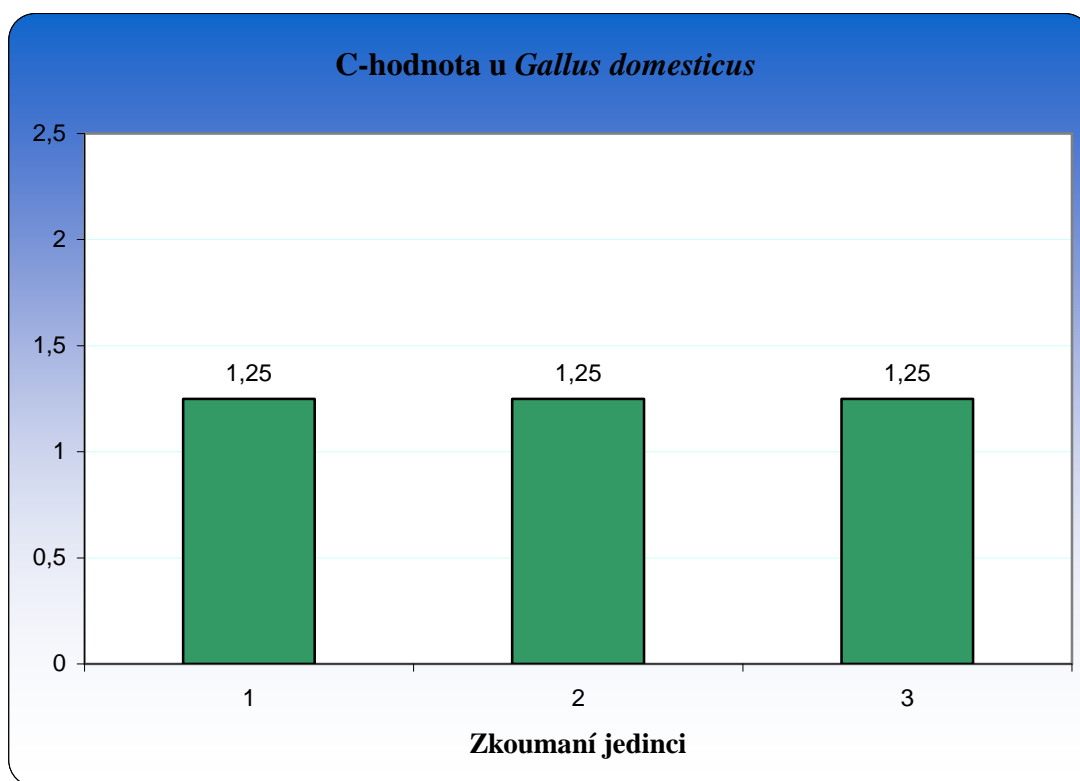
graf č. 4: Porovnání C-hodnot u *Acipenser gueldenstaedtii*. Skupiny A a B se mezi sebou statisticky významně liší ($P < 0,05$).



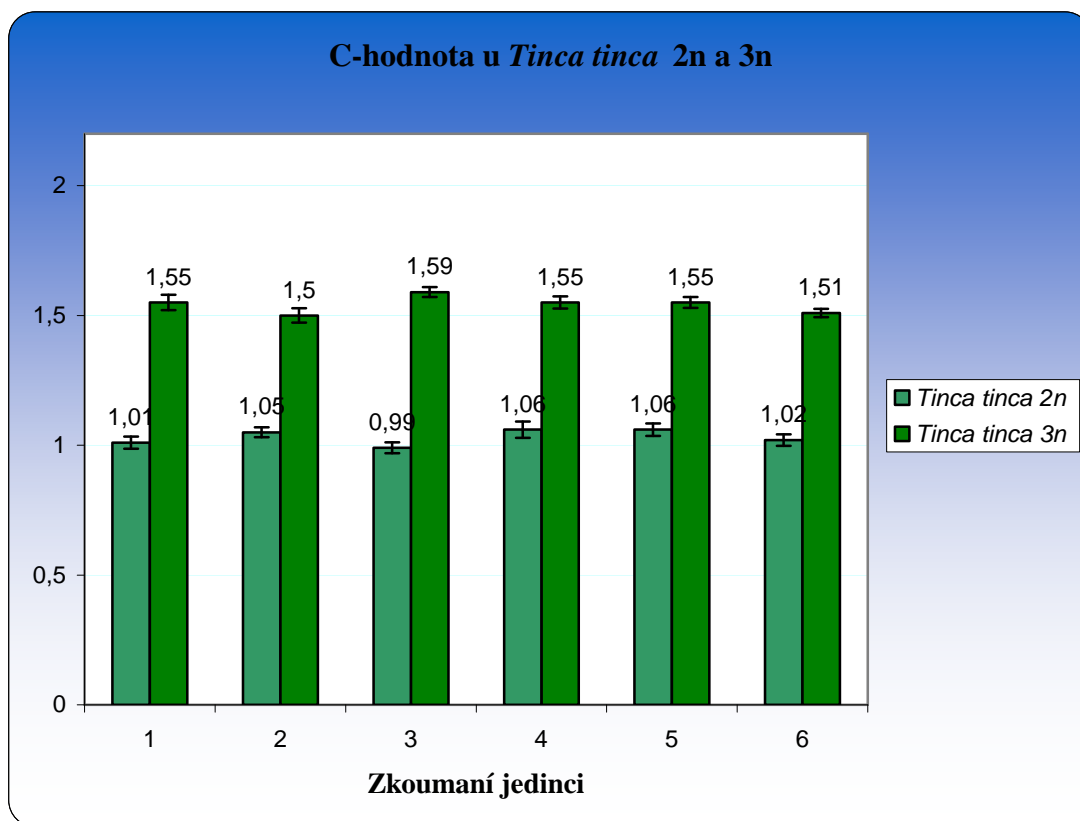
graf č. 5: Porovnání C-hodnot u *Acipenser stellatus*, kde byla nalezena pouze skupina A.



graf č. 6: Porovnání C-hodnot u standardu *Gallus domesticus*.



graf č. 7: Porovnání C-hodnot u standardů *Tinca tinca* 2n a 3n.



4.2 Stanovení velikosti genomu u standardních a polyploidních jedinců

Z výsledků měření velikosti genomu (viz kapitola 4.1) je jasné patrné, že u tří ze čtyř zkoumaných druhů byli nalezeni jedinci, kteří se svými hodnotami výrazně odlišují od ostatních zkoumaných jedinců svého druhu.

Na základě těchto výsledků bylo dále naměřeno a zjištěno:

- Plocha jádra (μm^2)
- pg. DNA na μm^2 (**vztah: C-hodnota / Plocha jádra (μm^2)**)
- Karyotyp jedince

tab. č. 24: Stanovení velikosti genomu u standardních jedinců *Acipenser ruthenus*.

<i>Acipenser ruthenus</i> (standardní)			
Karyotyp	Plocha jádra (μm^2)	C-hodnota	pgDNA na μm^2
4n	19,21 ± 0,813	1,86 ± 0,013	0,097 ± 0,002
4n	20,03 ± 0,752	1,87 ± 0,021	0,094 ± 0,003
4n	18,27 ± 0,874	1,84 ± 0,015	0,101 ± 0,006
4n	21,06 ± 0,101	1,85 ± 0,019	0,088 ± 0,004
4n	20,32 ± 0,937	1,84 ± 0,013	0,091 ± 0,003
Průměr	19,777	1,855	0,094
Směrodatná odchylka	0,958	0,017	0,004
Variační koeficient	4,844	0,905	4,750

tab. č. 25: Stanovení velikosti genomu u polyploidních jedinců *Acipenser ruthenus*.

<i>Acipenser ruthenus</i> (polyploidní)			
Karyotyp	Plocha jádra (μm^2)	C-hodnota	pgDNA na μm^2
6n	23,84 ± 0,511	2,95 ± 0,023	0,123 ± 0,004
6n	22,93 ± 0,325	2,98 ± 0,011	0,129 ± 0,004
6n	23,74 ± 0,83	2,92 ± 0,026	0,122 ± 0,003
Průměr	23,504	2,945	0,125
Směrodatná odchylka	0,406	0,031	0,003
Variační koeficient	1,732	1,067	2,640

tab. č. 26: Stanovení velikosti genomu u standardních jedinců *Acipenser baerii*.

<i>Acipenser baerii</i> (standardní)			
Karyotyp	Plocha jádra (μm^2)	C-hodnota	pgDNA na μm^2
8n	29,16 ± 0,836	4,15 ± 0,017	0,142 ± 0,005
8n	29,4 ± 0,776	4,17 ± 0,025	0,142 ± 0,002
8n	33,12 ± 0,948	4,1 ± 0,029	0,124 ± 0,006
8n	32,72 ± 0,491	4,18 ± 0,031	0,128 ± 0,003
8n	33,07 ± 0,843	4,11 ± 0,017	0,124 ± 0,003
8n	29,92 ± 1,023	4,18 ± 0,03	0,140 ± 0,005
8n	30,66 ± 0,74	4,16 ± 0,019	0,136 ± 0,004
8n	30 ± 0,639	4,16 ± 0,022	0,139 ± 0,002
8n	29,98 ± 0,538	4,17 ± 0,026	0,139 ± 0,004
8n	29,95 ± 0,98	4,13 ± 0,033	0,138 ± 0,006
Průměr	30,758	4,152	0,135
Směrodatná odchylka	1,410	0,026	0,006
Variační koeficient	4,585	0,623	4,768

tab. č. 27: Stanovení velikosti genomu u hybridních a polyploidních jedinců *Acipenser baerii*.

<i>Acipenser baerii</i> (hybridní a polyploidní)			
Karyotyp	Plocha jádra (μm^2)	C-hodnota	pgDNA na μm^2
6n	22,08 ± 0,55	3,11 ± 0,03	0,141 ± 0,01
10n	31,17 ± 1,28	4,5 ± 0,029	0,144 ± 0,02

<i>Acipenser baerii</i> (polyploidní)			
Karyotyp	Plocha jádra (μm^2)	C-hodnota	pgDNA na μm^2
12n	46,59 ± 1,12	6,45 ± 0,043	0,14 ± 0,01
12n	37,32 ± 1,103	6,19 ± 0,029	0,166 ± 0,018
Průměr	41,955	6,32	0,153
Směrodatná odchylka	4,635	0,13	0,013
Variační koeficient	11,047	2,057	8,497

tab. č. 28: Stanovení velikosti genomu u standardních jedinců *Acipenser gueldenstaedtii*.

<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (standardní)			
Karyotyp	Plocha jádra (μm^2)	C-hodnota	pgDNA na μm^2
8n	31,55 ± 0,821	3,96 ± 0,028	0,126 ± 0,003
8n	32,1 ± 1,02	3,87 ± 0,035	0,121 ± 0,002
8n	30,84 ± 0,746	3,92 ± 0,018	0,127 ± 0,004
8n	28,48 ± 0,938	3,95 ± 0,035	0,138 ± 0,006
8n	30,1 ± 0,743	3,94 ± 0,039	0,131 ± 0,006
8n	29,14 ± 0,884	3,95 ± 0,027	0,136 ± 0,004
8n	28,74 ± 1,249	3,93 ± 0,022	0,137 ± 0,003
8n	30,45 ± 0,93	3,95 ± 0,02	0,13 ± 0,002
8n	28,17 ± 1,036	3,86 ± 0,026	0,137 ± 0,005
8n	29,32 ± 0,733	3,9 ± 0,031	0,133 ± 0,003
Průměr	29,889	3,923	0,131
Směrodatná odchylka	1,267	0,033	0,005
Variační koeficient	4,239	0,853	4,212

tab. č. 29: Stanovení velikosti genomu u polyploidních jedinců *Acipenser gueldenstaedtii*.

<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (polyploidní)			
Karyotyp	Plocha jádra (μm^2)	C-hodnota	pgDNA na μm^2
12n	35,1 ± 1,23	6,05 ± 0,052	0,172 ± 0,009
12n	38,1 ± 1,33	5,92 ± 0,043	0,155 ± 0,015
Průměr	36,6	5,985	0,164
Směrodatná odchylka	1,5	0,065	0,008
Variační koeficient	4,098	1,086	5,182

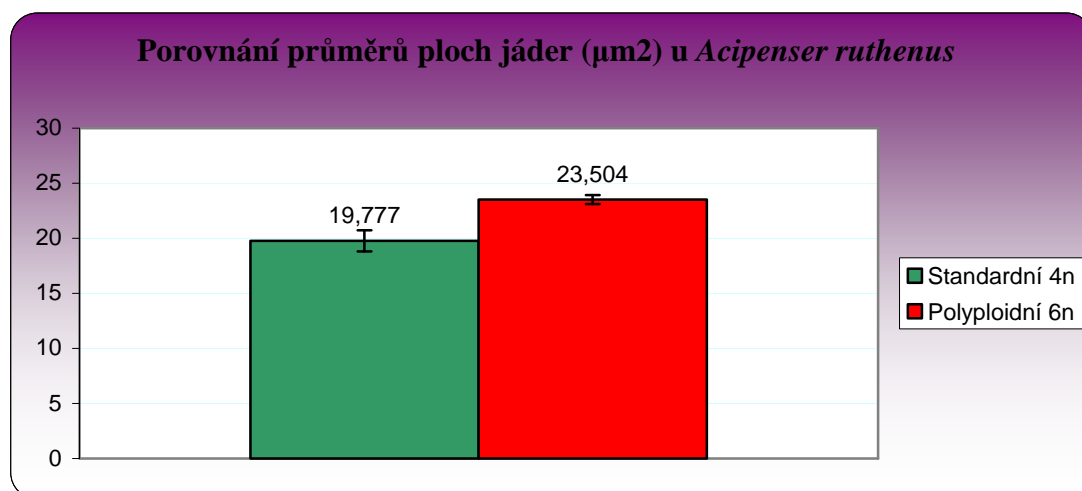
tab. č. 30: Stanovení velikosti genomu u standardních jedinců *Acipenser stellatus*.

<i>Acipenser stellatus</i> (standardní)			
Karyotyp	Plocha jádra (μm^2)	C-hodnota	pgDNA na μm^2
4n	19,39 ± 0,724	2,37 ± 0,022	0,124 ± 0,005
4n	21 ± 0,654	2,32 ± 0,031	0,110 ± 0,007
4n	20,42 ± 0,342	2,32 ± 0,029	0,114 ± 0,004
4n	18,24 ± 1,103	2,35 ± 0,025	0,129 ± 0,006
4n	20,69 ± 0,88	2,31 ± 0,028	0,112 ± 0,002
4n	18,09 ± 0,934	2,31 ± 0,033	0,128 ± 0,004
4n	20,07 ± 0,639	2,29 ± 0,019	0,114 ± 0,003
4n	22 ± 0,665	2,28 ± 0,034	0,103 ± 0,008
Průměr			
	19,987	2,318	0,117
Směrodatná odchylka			
	1,264	0,04	0,009
Variační koeficient			
	6,322	1,717	7,410

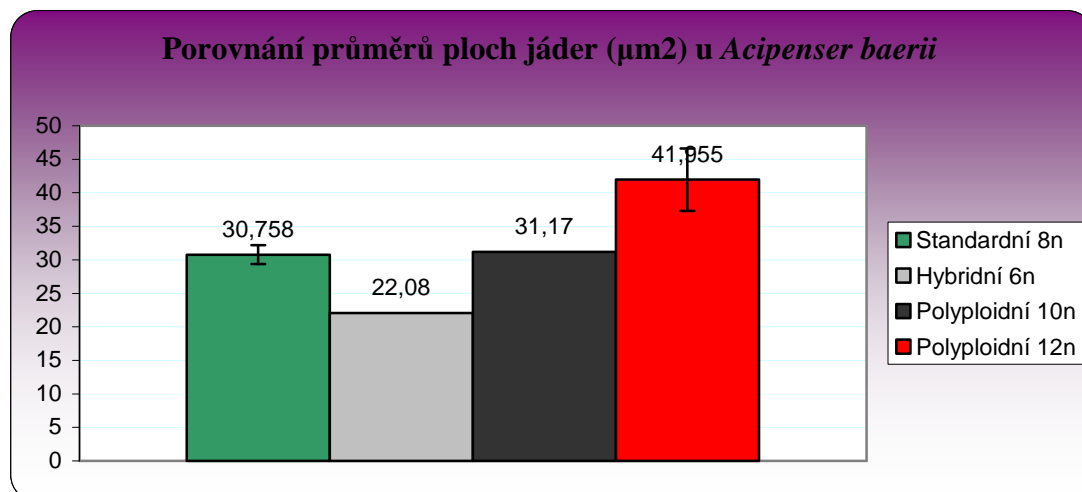
* U druhu *Acipenser stellatus* nebyli nalezeni polyploidní jedinci.

* Při nalezení pouze jednoho polyploidního či hybridního jedince daného druhu není možné stanovit průměr, směrodatnou odchylku ani variační koeficient.

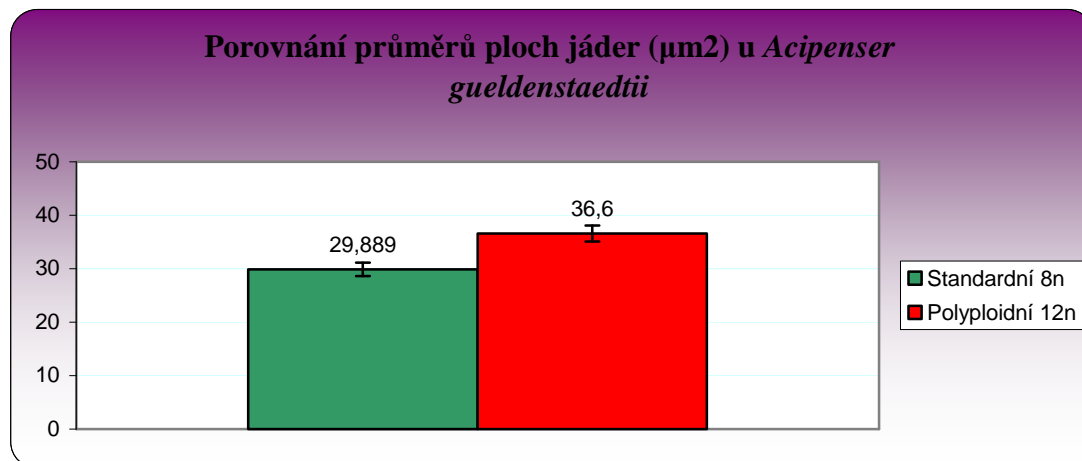
graf č. 8: Porovnání průměrů ploch jader (μm^2) standardních a polyploidních jedinců u *Acipenser ruthenus*.



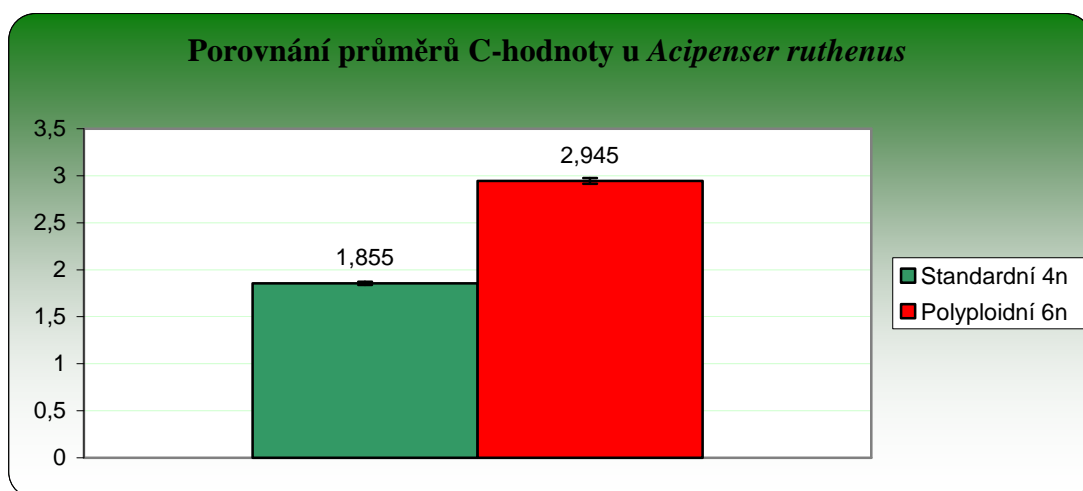
graf č. 9: Porovnání průměrů ploch jader (μm^2) standardních, polyploidních a hybridních jedinců u *Acipenser baerii*.



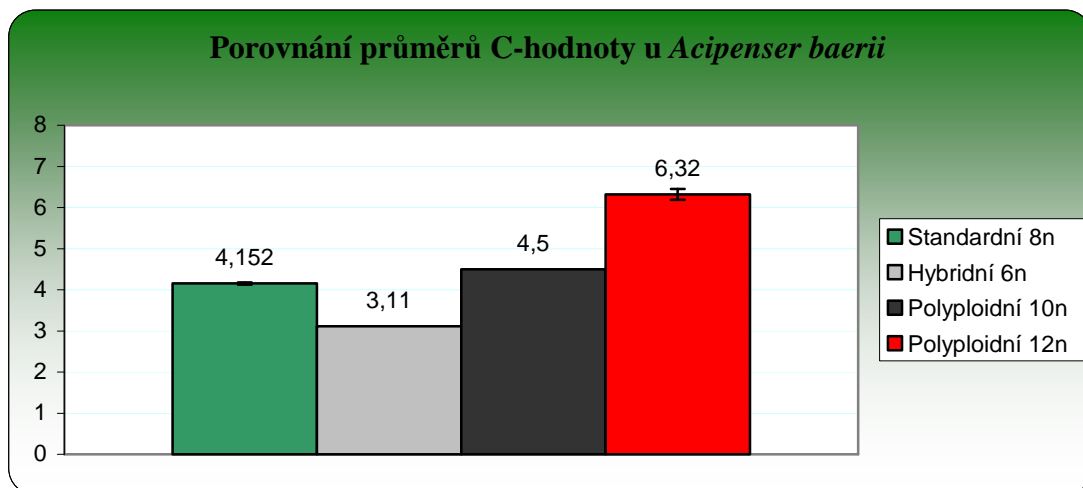
graf č. 10: Porovnání průměrů ploch jader (μm^2) standardních a polyploidních jedinců u *Acipenser gueldenstaedtii*.



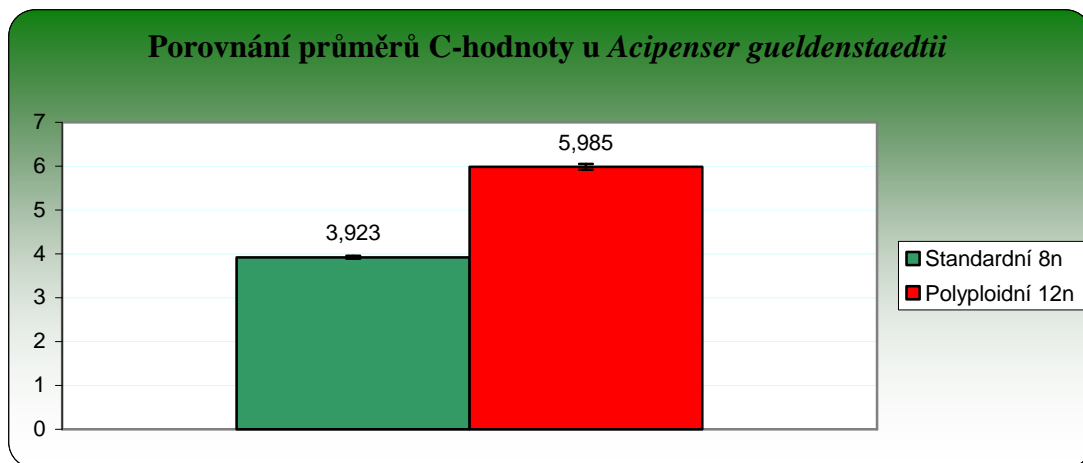
graf č. 11: Porovnání průměrů C-hodnoty standardních a polyploidních jedinců u *Acipenser ruthenus*.



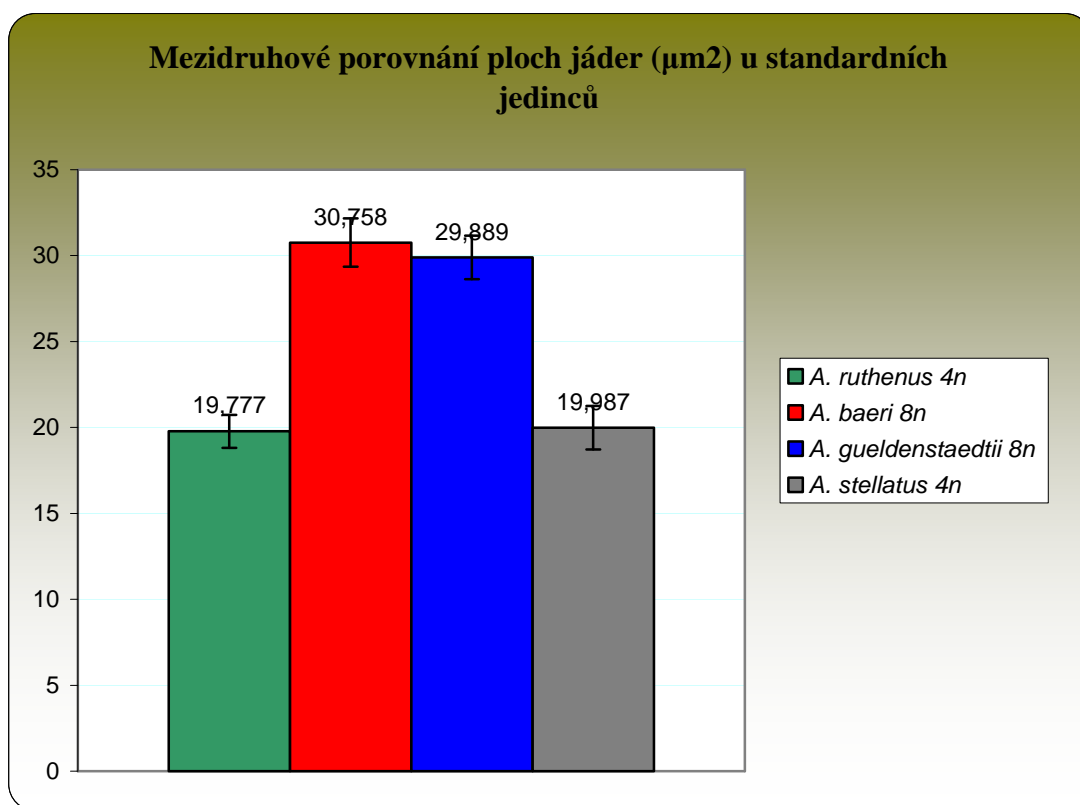
graf č. 12: Porovnání průměrů C-hodnoty standardních, polyploidních a hybridních jedinců u *Acipenser baerii*.



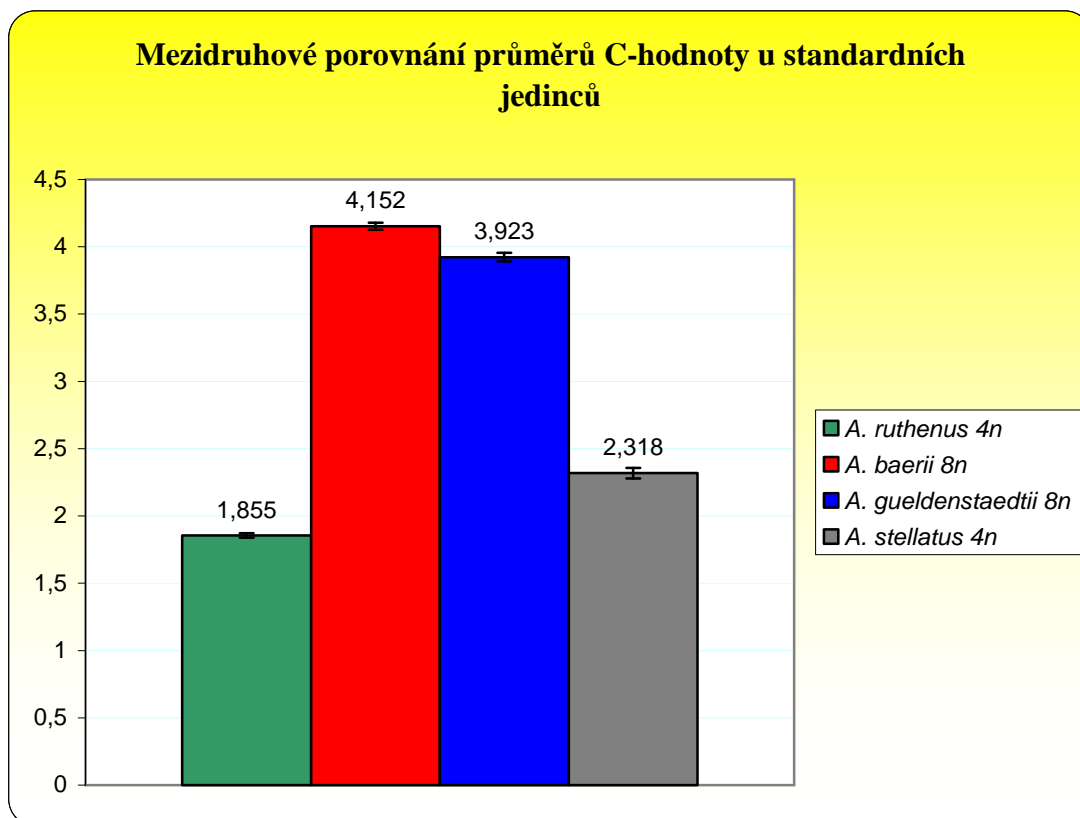
graf č. 13: Porovnání průměrů C-hodnoty standardních a polyploidních jedinců u *Acipenser gueldenstaedtii*.



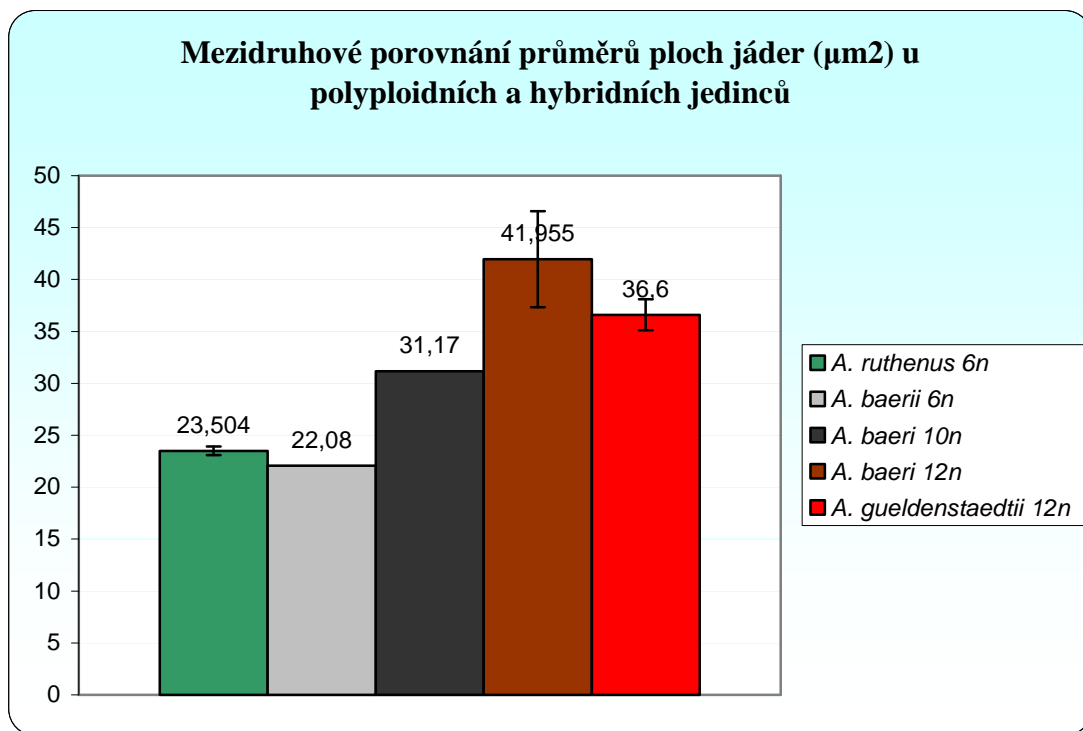
graf č. 14: Mezidruhové porovnání průměrů ploch jader (μm^2) u standardních jedinců.



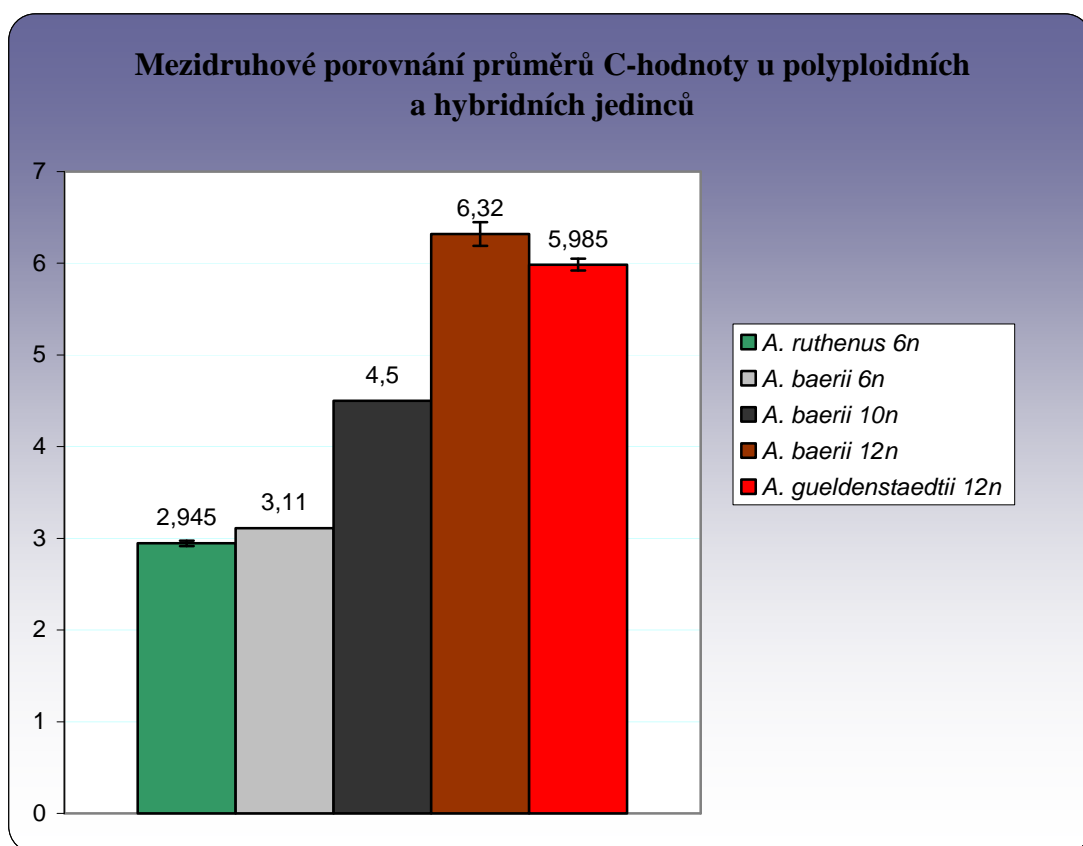
graf č. 15: Mezidruhové porovnání průměrů C-hodnoty u standardních jedinců.



graf č. 16: Mezidruhové porovnání průměrů ploch jader (μm^2) u polyploidních a hybridních jedinců.



graf č. 17: Mezidruhové porovnání průměrů C-hodnoty u polyploidních a hybridních jedinců.



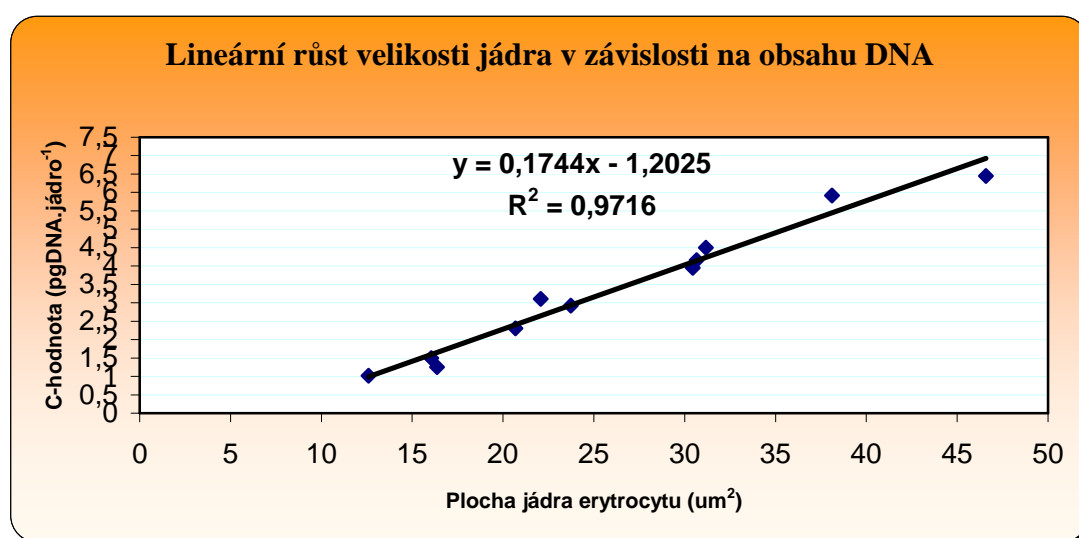
4.3 Prokázání závislosti velikosti jádra na obsahu DNA

Z výsledků výše uvedených kapitol (viz kapitoly 4.1 a 4.2) je prokazatelné, že při výskytu polyploidie dochází ke zvýšení hodnot obsahu DNA (C-hodnota), ale také k přímo úměrnému nárůstu velikosti jádra. Dá se tedy říci, že velikost jádra je závislá na obsahu DNA v jádře.

tab. č. 31: Prokázání vztahu mezi nárůstem velikosti jádra a zvyšující se ploidní úrovní.

Druh	Karyotyp	Plocha jádra (μm^2)	C-hodnota	pgDNA na μm^2
<i>T. tinca</i>	2n	12,6 ± 0,45	1,02 ± 0,022	0,08 ± 0,003
<i>G. domesticus</i>	2n	16,36 ± 0,32	1,25 ± 0	0,076 ± 0,001
<i>T. tinca</i>	3n	16,05 ± 0,61	1,5 ± 0,028	0,093 ± 0,001
<i>A. stellatus</i>	4n	20,69 ± 0,88	2,31 ± 0,028	0,112 ± 0,002
<i>A. ruthenus</i>	6n	23,74 ± 0,83	2,92 ± 0,026	0,122 ± 0,003
<i>A. baerii</i>	6n (hybrid)	22,08 ± 0,55	3,11 ± 0,03	0,141 ± 0,01
<i>A. gueldenstaedtii</i>	8n	30,45 ± 0,93	3,95 ± 0,02	0,13 ± 0,002
<i>A. baerii</i>	8n	30,66 ± 0,74	4,16 ± 0,019	0,136 ± 0,004
<i>A. baerii</i>	10n	31,17 ± 1,28	4,5 ± 0,029	0,144 ± 0,02
<i>A. gueldenstaedtii</i>	12n	38,1 ± 1,33	5,92 ± 0,043	0,155 ± 0,015
<i>A. baerii</i>	12n	46,59 ± 1,12	6,45 ± 0,043	0,14 ± 0,01

graf č. 18: Grafické znázornění lineárního růstu velikosti jádra v závislosti na obsahu DNA.



5. Diskuse

Polyploidie je u jeseterovitých ryb zakódována již evolučně. Její pozorování a stanovení bylo však možné až ve druhé polovině minulého století, a to díky technickému pokroku ve vědě. Za tuto dobu, po kterou je polyploidie u jeseterů pozorována, byly již stanoveny úrovně ploidie prakticky u většiny nadřádu *Chondrostei*.

V praktické části této bakalářské práce byly však pozorovány a stanovovány pouze tyto čtyři duhy:

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

Celosvětově uznávanými stanoveními úrovně ploidie u těchto čtyř druhů (z nichž vycházela i tato bakalářská práce) jsou měření dle Fontana (1994) a Birstein et al. (1993). Velikosti genomu jsou však popsány i dalšími autory.

tab. č. 32: Publikované velikosti genomu u *Acipenser ruthenus*.

<i>Acipenser ruthenus</i> (publikovaný)		
Autor	Karyotyp	C-hodnota
Fontana et al., 1975; 1994	4n	1,87
Birstein et al., 1993; 1997b	4n	1,87
Fontana et al., 1994	6n	2,81

tab. č. 33: Výsledky stanovené velikosti genomu v praktické části bakalářské práce u *Acipenser ruthenus*.

<i>Acipenser ruthenus</i> (pozorovaný)	
Karyotyp	C-hodnota
4n	1,855 ± 0,017
6n	2,945 ± 0,031

tab. č. 34: Publikované velikosti genomu u *Acipenser baerii*.

<i>Acipenser baerii</i> (publikovaný)		
Autor	Karyotyp	C-hodnota
Vasil'ev et al., 1980	8n	4,15
Birstein et al., 1993	8n	4,15
Fontana et al., 1994	8n	4,15
Fontana et al., 1994	12n	6,23

tab. č. 35: Výsledky stanovené velikosti genomu v praktické části bakalářské práce u *Acipenser baerii*.

<i>Acipenser baerii</i> (pozorovaný)	
Karyotyp	C-hodnota
8n	4,152 ± 0,026
6n	3,11 ± 0,047
10n	4,5 ± 0,061
12n	6,32 ± 0,13

tab. č. 36: Publikované velikosti genomu u *Acipenser gueldenstaedtii*.

<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (publikovaný)		
Autor	Karyotyp	C-hodnota
Birstein and Vasil'ev, 1987	8n	3,94
Birstein et al., 1993	8n	3,94
Fontana et al., 1994	8n	3,94
Fontana et al.,	12n	5,91

tab. č. 37: Výsledky stanovené velikosti genomu v praktické části bakalářské práce u *Acipenser gueldenstaedtii*.

<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (pozorovaný)	
Karyotyp	C-hodnota
8n	3,923 ± 0,033
12n	5,985 ± 0,065

tab. č. 38: Publikované velikosti genomu u *Acipenser stellatus*.

<i>Acipenser stellatus</i> (publikovaný)		
Autor	Karyotyp	C-hodnota
Birstein and Vasil'ev, 1987	4n	2,35
Birstein et al., 1993	4n	2,35
Fontana et al., 1994	4n	2,35
Kafiani et al., 1958	4n	2,35
Fontana et al., 1994	6n	3,53

tab. č. 39: Výsledky stanovené velikosti genomu v praktické části bakalářské práce u *Acipenser stellatus*.

<i>Acipenser stellatus</i> (pozorovaný)	
Karyotyp	C-hodnota
4n	2,318 ± 0,04

Při porovnání naměřených hodnot z praktické části této bakalářské práce s hodnotami, které již byly publikovány v jiných odborných literaturách, je velmi dobře patrná shoda se všemi autory. Shoda dat je prokazatelná jak u jedinců se standardní úrovní ploidie, tak u polyploidních jedinců (především triploidních jedinců).

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

Kvalita preparátu při stanovení úrovně ploidie by se dala považovat za nejdůležitější vlastnost celého měření. Jelikož i když vybereme správnou metodu stanovení, všechny potřebné přístroje budou naprosto dokonale nastaveny a personál, který měření provede, bude danou metodu ovládat, tak v případě nekvalitního preparátu není možné danou úroveň ploidie zjistit. Preparát musí být kvalitně odebrán, nanesen, velmi pečlivě nabarven a poté dobře uchováván. Neměl by být vystavován přímému slunci, extrémním teplotám, jiným chemikáliím, hrubým povrchům (poškrábání) aj (Hardie and Gregory, 2002). Správné a šetrné nakládání se

vzorkem je naprosto nevyhnutelné, jelikož jednotlivý vzorek je velmi často to jediné, co ze zkoumaného jedince máme a můžeme pozorovat.

Velmi zajímavým faktem je, že pozorování ploidní úrovně u jeseterovitých ryb probíhá již přes půl století, ale doposud je velmi málo publikovaných údajů o triploidních jedincích u tohoto druhu. A to i přesto, že triploidní jedinci se mohou vyskytovat spontánně ve volné přírodě, ale i jsou uměle vytvářeni u mnoha komerčně chovaných druhů ryb a korýšů (Piferrer et al., 2009). V praktické části této bakalářské práce bylo však popsáno sedm polyploidních jedinců ze čtyř zkoumaných druhů jeseterovitých ryb. Polyploidní úroveň $12n$ u *Acipenser gueldenstaedtii* byla dokonce v této práci publikována poprvé.

Důvod proč je triploidních jedinců mezi jeseterovitými rybami málo, ikdyž jsou tyto ryby chovány v komerčních či záchranných chovech, je velmi prostý. Triploidní jedinci se obecně vyznačují vyšší růstovou schopností díky tomu, že triploidní jedinci jsou neplodní (sterilní). Neztrácejí tedy velkou část své energie tvorbou pohlavních produktů (gonád). Sterilita je však u jeseterovitých ryb jak v komerčních tak záchranných chovech silně nežádoucí. Velká část zisku u komerčních chovů totiž pochází z výroby kaviáru a záchranné chovy bez schopnosti tvorby další generace ztrácí veškerý svůj smysl a důležitost. Triploidní jedinci u jeseterů jsou tedy prakticky ve všech možných odvětví chovu nežádoucí a jsou ihned po odhalení vyřazováni.

Naproti tomu byly zjištěny případy výskytu plodných triploidů u jeseterovitých ryb, jako např. *Acipenser baerii*, u kterého bylo prokázáno, že triploidní jedinec není sterilní a je schopen dalšího rozmnožování (Flajšhans et al., 2009). Ovšem i takovýto triploidní-plodný jedinec je v chovu nežádoucí, jelikož svojí genetickou vadu předává další generaci a ničí tak genetickou čistotu druhu. Pokud je takovýto jedinec odhalen, měl by být z chovu vyřazen a poskytnut příslušnému genetickému pracovišti pro další vědeckou práci.

V praktické části této bakalářské práce se také podařilo prakticky poprvé popsat a prokázat závislost velikosti jádra na obsahu DNA u jeseterovitých ryb. Větší množství DNA v buněčném jádře je charakterizováno zvětšeným objemem jader. Velikost buněk je kompenzována jejich úbytkem. Tento jev se podařilo prokázat již u triploidních *Tinca tinca* (Svobodová et al., 1998), u pstruha obecného (*Salmo trutta*) (Benfey and Sutterlin 1984), u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Yamamoto and Iida, 1994) aj. U jeseterovitých ryb byl však tento jev popsán poprvé.

5.1 Vliv polyploidie v rybářské praxi

Jak již bylo v této bakalářské práci mnohokrát zmíněno, tak polyploidie v plemenitbě ve své podstatě představuje dosti závažný problém, ať je její výskyt spojen se sterilitou, či plodností polyploidních ryb. Ovlivnění rybářské praxe by se dalo rozdělit do tří následujících okruhů:

1. Chov pro komerční účely
2. Umělý odchov a rozmnožování
3. Zachování a záchrana druhu

1. Chov pro komerční účely

V komerčních chovech může být polyploidie považována jak za žádoucí, tak za nežádoucí jev. Je totiž nezbytné si předem ujasnit, co od komerčního chovu jeseterovitých ryb očekáváme a požadujeme.

Pokud se jedná o komerční chov za účelem produkce jeseteřího masa a zejména kaviáru (tj. v podstatě solí konzervovaných oocytů), je polyploidie spojená se sterilitou silně nežádoucím jevem, jelikož triploidní jedinci ($3n$) nejsou schopni produkce kaviáru.

Když se však jedná o komerční chov pouze za účelem jeseteřího masa či odchovem jedinců pro sportovní rybolov, je možné polyploidii považovat za kladný jev. Triploidní jedinci mají totiž oproti standardním jedincům výborné růstové schopnosti a dosahují požadovaných rozměrů mnohem dříve.

2. Umělý odchov a rozmnožování

V umělých odchovech je polyploidie prokazatelně nežádoucím jevem. Polyploidní jedinci mají totiž vlivem nárůstu DNA zvětšeny erytrocyty. Tento nárůst kompenzuje jejich úbytek. S úbytkem erytrocytů dochází k úměrnému klesání přenosu kyslíku v těle. Dále může polyploidie mít za následek neplodnost jedinců. Může také ovlivňovat pohyblivost spermií (není plně prokázáno), či přežití potomstva (není plně prokázáno).

3. Zachování a záchrana druhu

Při snaze o zachování a záchranu druhu je polyploidie, ať vzniklá uvnitř druhu nebo na základě mezidruhového křížení rodičovských druhů o různých úrovních ploidie, jedním z nejzávažnějších negativních vlivů vůbec. Výskyt polyploidního jedince v generačním hejnu záchranného chovu je velmi závažným problémem. Sterilní jedinec není schopen reprodukce nebo tvorby životaschopného potomstva; plodný polyploidní jedinec, zejména při hromadné reprodukci pro obnovu hejna nebo populace může narušit generaci potomstva a poškodit genetickou čistotu druhu.

Polyploidní jedinci se přitom mohou velmi snadno do záchranného chovu dostat. Kvůli momentální situaci, ve které se jeseteři nacházejí, je některých jedinců na světě již tak málo, že veškerý zaznamenaný kus daného druhu je okamžitě převážen do záchranného chovu. Při těchto aktivitách se mnohdy nehledělo na původní výskyt jedince ani na genetickou čistotu. Velmi často se tedy stává, že záchranný chov je sestaven z jedinců, kteří by se ve volné přírodě nikdy nemohli setkat.

6. Závěr

Bakalářskou prací „Polyploidie u jeseterů“ jsem chtěl popsat nejen problematiku polyploidie u tohoto druhu, ale také vytvořit celkový náhled na jeseterovité ryby, které jsou stále i pro některé profesionální rybáře velkou neznámou. Práce by po prostudování měla podat veškeré základní informace o tomto druhu, ať již z hlediska evoluce, historie, chovu, ochrany nebo problematiky dnešní doby.

V teoretické části práce bylo popsáno a shrnuto že:

1. Jeseteři patří mezi jedny z nejvíce ohrožených druhů dnešní doby.
2. Jeseterovité ryby stojí na prahu vyhynutí.
3. Budoucnost jeseterů je v umělých chovech.
4. Jeseteři patří k náročnějším rybám na chov a následný odchov.
5. Je nezbytný genetický dohled na umělé chovy.

V praktické části práce se podařilo prokázat že:

1. Prakticky u všech pozorovaných druhů jeseterovitých ryb byli nalezeni jedinci, kteří neodpovídali standardní úrovni ploidie a byli vyhodnoceni jako jedinci s neobvyklou úrovní ploidie.
2. Neobvyklá úroveň polyploidie u jeseterů není ojedinělým jevem.
3. Byla prokázána závislost velikosti jádra na obsahu DNA.
4. Byli nalezeni jedinci o ploidní úrovni $12n$ u *Acipenser baerii* a *Acipenser gueldenstaedtii*, kteří doposud nebyli popsáni.

Závěrem této bakalářské práce bych velmi rád znovu zdůraznil nutnost pozorování a dalšího studování polyploidie a jejího výskytu u jeseterovitých ryb v umělých chovech na celém světě. Budoucnost jeseterů dnes již není ve volných vodách, ale je pevně nasměrována do umělých a řízených chovů. Je tedy nesmírně důležité pokračovat ve sledování ploidních úrovní u všech generačních jedinců daného chovu, nacházet nové důvody vzniku polyploidie, a také nacházet metody, které by tomuto vzniku předcházely. Tato genetická „vada“ nesmí být nadále předávána další generaci a tím ničit genovou čistotu daného druhu, který je již tak velice ohrožen.

7. Seznam literatury

- Allen, Jr. S. K., 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture* 33, 317-328.
- Altuf'ev, Y., 1977. Morphofunctional abnormalities in the organs and tissues of the Caspian sea sturgeons cause by ecological changes, same volume. 1997. In: Birstein, V.J., Bauer, A., Kaiser-Pohlmann, A. (eds.). Proceedings of the Sturgeon Populations and Caviar Trade Workshop, IUCN SSC p. 81.
- Arefjev, V.A. 1983. Polykaryogram analysis of ship, *Acipenser nudiventris* Lovetsky (Acipenseridae, Chondrostei). *Voprosy Ichthyology* 23: 209-216. (In Russian).
- Baruš, V., Oliva, O. 1995. Mihulovci a ryby. *Academia Praha*, 623 s.
- Benfey, T. J., 1989. A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 1682, 33 p.
- Benfey, T.J., Sutterlin A. M., Thompson, R. J., 1984. Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, 980-984.
- Berg, L.S. 1962. Freshwater Fishes of the USSR and Adjacent Countries, Vol. 1. (Translated by Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem) Oldbourne Press, London.
- Berg, L.S., 1911. Ryby. Marsipobrančii i Pisces. Fauna Rossii i sopredel'nych stran. Izd. Zool. Muz. AN Petrograd, díl 1, 337 pp.; vyp. 2, 1914. Ostariophysi (neukonč.), pp. 337-704; pokrač. V r. 1933, pp. 705-846 (Fauna SSSR i sopredel'nych stran, Izd. AN SSSR, Leningrad).
- Berg, L.S., 1940. Sistema ryboobraznych i ryb, nyne živuščich i iskopajemych. *Trudy Zool. Inst. AN SSSR*, 5 (2): 87-517.
- Birstein, V.J. and V.P. Vasil' ev. 1987. Tetraploid-octoploid relationships and karyological evolution in the order Acipenseriformes (Pisces): karyotypes, nucleoli, and nucleolus organizer regions in four acipenserid species. *Genetica* 73: 3-12.
- Birstein, V.J., A.I. Poletaeu, and B.F. Goncharov. 1993. The DNA content in eurasian sturgeon species determined by flow cytometry. *Cytometry* 14: 337-383.

- Birstein, V.J., R. Hanner and R. DeSalle. 1997. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. *Environmental Biology of Fishes* 48: 127-155.
- Blackledge, K.H. and C.A. Bidwell. 1993. Three ploidy levels indicated by genome quantification in Acipenseriformes of North America. *The Journal of Heredity*: 84: 427-430.
- Blanc, J. M., Chevassus, B., 1982. Interspecific hybridization of salmonid fish.2. Survival and growth up to the 4th. month after hatching in F1-generation hybrids. *Aquaculture* 29 (3-4), 383-387.
- Boroń, A., 1994. Use of erythrocyte measurements to detect natural triploids of spined loach *Cobitis taenia* (L.). *Cytobios* 78, 197-202.
- Bullini, L., 1994. Origin and evolution of animal hybrid species. *Trends in Ecology and Evolution* 9 (11), 422-426.
- Burtzev, J.A., J. Nikoljukin and E.V. Serebryakova. 1976. Karyology of the Acipenseridae family in relation to the hybridization and taxonomy problems. *Acta biologica Jugoslavica. Serija E. Ichthyologia* 8: 27-34.
- Ceapa, C. 2006. Acadian sturgeon and Caviar Inc, Canada. EUROTIER 2006 / Hanover, Germany.
- Comai, L., 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature* 6, 836-846.
- Conte, F.S., et al., 1988. Hatchery manual for the white sturgeon, Div. of Agricul. and Natural Resources University of California, USA, 1-103.
- Cormier, S. M., Neiheisel, T. W., Williams, D. E., Tiersch, T. R., 1993. Natural occurrence of triploidy in a wild brown bullhead. *Trans. Am. Fish. Soc.* 122, 390-392.
- Debus, L., 1997. Sturgeons in Europe and causes in their decline. In: Birstein, V.J., Bauer, A., Kaiser-Pohlmann, A. (eds.). *Proceedings of the Sturgeons Populations and Caviar Trade Workshop*, IUCN SSC Paper No. 17: 55-68.
- Dettlaff, T. A.; Ginsburg, A. S.; Schmalhausen, O. I., 1993: *Sturgeon Fishes. Developmental Biology and Aquaculture*. Springer-Verlag, Berlin.

- Donaldson, E. M., Benfey, T.J., 1987. Current status of induced sex manipulation. *In* : Proc. Third Int. Symp. on the Reproductive Physiology of Fish (Idler, D. R., Crim, L. W., and Walsh, J. M., Eds.), Memorial Univ. of Nfld., St. John, pp. 108-119.
- Doroshov, S.I., Binkowski, F.P., 1985. Epilogue: a perspective on sturgeon culture *In*: Binkowski, F.P., Doroshov, S.I. (eds.). North American Sturgeons. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- Ewing, R. R., Scalet, C. G., Evenson, D. P., 1991. Flow cytometric identification of larval triploid walleyes. *Prog. Fish-Cult.* 53, 177-180.
- Feulgen, R., Rossenbeck, H. 1994. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleisäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe Seyler Z Physiol Chem* 135:203-248.
- Flajšhans, M., Vajcová, V., 2000. Odd ploidy levels in sturgeons suggest a backcross of interspecific hexaploid sturgeon hybrids to evolutionarily tetraploid and/or octaploid parental species. *Folia Zoologica*, 49 (2): 133 - 138.
- Flajšhans, M., 1997. A model approach to distinguish diploid and triploid fish by means of computer-assisted image analysis. *Acta veterinaria Brno* 66, 101-110.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Šlechta, V., Linhart, O., 2008. *Genetika a šlechtění ryb (Fish Genetics and Breeding)*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 232 pp.
- Flajšhans, M., Ráb, P., Dobosz, S., 1992. Frequency analysis of active NORs in nuclei of artificially induced triploid fish. *Theor. Appl. Genet.* 85, 68-72.
- Flajšhans, M., Ráb, P., Rodina, M., Gela, D., Rábová, M., Pšenička, M., Kašpar, V., Hulák, M., 2009. Spawning of fertile hexaploid sturgeons may jeopardize the conservation effort. *In*: Rosenthal, H., Bronzi, P., Wei, Q., Shi, Y., Qian, H. (Eds.) *Book of Abstracts, Oral Presentations, 6th. International Symposium on Sturgeon*, Wuhan, China. Chinese Academy of Fisheries Sciences, Wuhan: pp. 155-157.
- Flasar, I. et Flasarová, M., 1976. Úlovky jesetera velkého (*Acipenser sturio*) v severních Čechách. *Živa*, 24: 225.

- Fontana, F. 1976. Nuclear DNA content and cytometric of erythrocytes of *Huso huso* L., *Acipenser sturio* L. and *Acipenser Naccarii* Bonaparte. *Caryologia* 29: 127-138.
- Fontana, F. and G. Colombo. 1974. The chromosomes of Italian sturgeons. *Experientia* 30: 739-742.
- Fontana, F., 1994. Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in *Acipenseriformes* (Pisces). *Genome* 37: 888-892.
- Fontana, F., et al., 2008. Comparison of karyotypes of *Acipenser oxyrinchus* and *Acipenser sturio* by chromosome banding and fluorescent in situ hybridization. *Genetica*, 132: 281-286.
- Fontana, F., R.M. Bruch, F.P. Binkowski, M. Lanfredi, M. Chicca, N. Beltrami and L. Congiu. 2004. Karyotype characterization of the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens* (Rafinesque, 1817) by chromosome banding and fluorescent in situ hybridization. *Genome* 47: 742-746.
- Fontana, F., Zane, L., Pepe, A., 2007. Congiu L. Polyploidy in *Acipenseriformes*: cytogenetic and molecular approaches. In *Fish Cytogenetics*. Eds: E. Pisano, C. Ozouf-Costaz, F. Foresti & B.G. Kapoor. Science Publisher, Inc. New Hampshire, USA. pp. 385-403.
- Frič, A., 1872. O rybářství v řekách českých a o jeho poměru k umělému pěstování ryb a k průmyslu. *Arch. přír. k proskoumání Čech*, II. díl, IV. Odd., pp. 151-189.
- Gela, D., Linhart, O., Flajšhans, M., Rodina, M., 2003. Egg incubation time and hatching success in tench (*Tinca tinca* L.) related to the procedure of egg stickiness elimination. *Journal of Appl. Ichtyol.*, 19: 132-133.
- Gela, D., M., Flajšhans, M. Kocour, M. Rodina, M., Linhart, O., 2006. Tench (*Tinca tinca*) broodstock management in breeding station under conditions of pond culture. *Aquaculture International*, 14: 195-2003.
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). *Edice metodik VÚRH JU, Vodňany*, 78, 1-24.
- Gold, J. R., Amemiya, C. T., 1987. Genome size variation among North American minnows (*Cyprinidae*). II. Variation among 20 species. *Genome* 29, 481-489.

- Gold, J. R., Price, H. J., 1985. Genome size variation among North American minnows (*Cyprinidae*). I. Distribution of the variation in five species. *Heredity* 54, 297-305.
- Gold, J. R., Ragland, C. J., Schliesing, L. J., 1990. Genome size variation and evolution in North American cyprinid fishes. *Genet Sel. Evol.* 22, 11-29.
- Goodpasture, C. and S.E. Bloom. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- Grant V. 1977. *Organismic Evolution*. W.H. Freeman, San Francisco.
- Grossinger, J.B., 1794. *Universa historia physica Regni Hungariae. Regni Animalis, pars III. Ichthyologia. Posonii et Comaromii* (sec. Holčík 1986).
- Han, H. S., Mannen, A., Tsujimora, Taniguciii, A., 1992. Application of DNA fingerprinting to confirmation of clone in ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 2027-2031.
- Hanel, L., Lusk, S., 2005: *Ryby a mihule České republiky. Rozšíření a ochrana. Český svaz ochránců přírody, Vlašim, 447 pp.*
- Hardie, D.C., Gregory, T.R., Hebert, P. Dn. N., 2002. From pixels to picograms: A beginner's guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. *J. Histochem. Cytochem.* 50 (6): 735-749.
- Heinrich, A., 1856. *Mährens und K.K. Schlesiens Fische, Reptilien und Vögel. Ein Beitrag zur Fauna beider Kronländer. (Fische: 5-32 pp.).* Brünn, 200 pp.
- Hochleitner, M., 2004. *Störe – Biologie und Aquakultur.* AquaTech Publications, p. 9-222.
- Chevassus, B., Guyomard, R., Chourrout, D., Quillet, E., 1983. Production of viable hybrids in salmonids by triploidization. *Genet. Sci. Evol.* 15, 519-532.
- Chourrout, D., 1987. Genetic manipulations in fish: review of methods. In: Tiews, K., (Ed.) *Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*, vol. 2. Heenemann Verlagsgesellschaft mbH, Berlin, pp.111-126.
- Ihssen, P. E., McKay, L. R., McMillan, I., Phillips, R. B., 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: Cytogenetic and fisheries applications. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119, 698-717.
- Jeitteles, L.H., 1864. *Die Fische der March bei Olmütz. Abth. Jahresbericht über das k. k. Gymnasium in Olmütz während des Schuljahres 1863 u. 1864, I: 3-33, II: 3-26.*

- Kafiani, K.A., R.I. Tatarskaia, and S.M. Kanopkaite (1958). Phosphorus metabolism in the embryonic development of sturgeon. *Biochemistry* **23**: 389-399. - Species listed Record id: [242]
- Kazanskii, B.N., Feklov, Yu.A., Podushka, S.B., Molodsov, A.N., 1978. Express metod for determining the degree of gonad maturity in sturgeon spawners. *Rybnoe Khozajstvo* 2: 24-27.
- Kolman, R., 2008. Restytucja jesiotra baltyckiego. Přednáška VÚRH JU Vodňany.
- Krieger J., P.A. Fuerst and T.M. Cavender. 2000. Phylogenetic relationships of the North American sturgeon (Order Acipenseriformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 64-72.
- Landfredi, M., L. Congiu, M.A. Garrido-Ramos, R. De La Herrán, M. Leis, M. Chicca, R. Rossi, J. Tagliavini, C. Ruiz Rejón, M. Ruiz Rejón, and F. Fontana. 2001. Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. *Chromosome Research* 9:47-52.
- Le Comber, S., Smith, C., 2004. Polyploidy in fishes: patterns and processes. *Biol. J. Linnean Society* 82, 431-442.
- Lecommandeur, D., Haffray, P., Philippe, L., 1994. Rapid flow cytometry method for ploidy determination in salmonid eggs. *Aquaculture and Fisheries Management* 25, 345-350.
- Legatt, R. A., Iwama, G. K., 2003. Occurrence of polyploidy in the fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13, 237-246.
- Linhart, O., Gela, D., Rodina, M., 2000. Umělá reprodukce veslonosa amerického (*Polyodon spathula*). *Edice metodik*, 64: 1-15.
- Linhart, O., Haffray, P., Ozouf-Costaz, C., Flajshans, M., Vandeputte, M., 2001. Triploidization of European catfish (*Silurus glanis* L.) with heat-, cold-, hydrostatic pressure shocks and growth experiment. *Journal Appl. Ichtyol.* 17, 247-255.
- Linhart, O., Kudo, S., 1997. Surface ultrastructure of paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum, 1792) eggs before and after fertilization. *J. Fish Biology*, 51: 573-582.
- Linnaeus, C., 1758. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis.* Tomus I, Ed. Decima, reformata. L. Salvii, Holmiae, 823 pp.; Ed. XII., 532 pp.

- Ludwig, A., Debus, L., Lieckfeldt, D., Wirgin, I., Benecke, N., Jenneckens, I., Williot, P., Waldman, J.R., Pitra, C., 2002. When the American sturgeon swam east. *Nature* 419: 447-448.
- Ludwig, A., N.M. Belfiore, C. Pittra, V. Svirsky and I. Jenneckens. 2001. Genome duplication events and functional rediction of ploidy levels in sturgeon (Acipenser, Huso and Scaphirhynchus). *Genetics* 158: 1203-15.
- Maddison, W.P. and D.R. Maddison. 1992. Macclade. Analysis of Phylogeny and Character Evolution. Version 3. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- May, B., C.C. Krueger and H.L. Kincaid. 1997. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in Acipenser and Scaphirhynchus. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 1542-1547.
- McQuown, E., G.A.E. Gall and B. May. 2002. Characterization and inheritance of six microsatellite loci in lake sturgeon (Acipenser fulvescens). *Transactions of the American Fisheries Society* 131: 299-307.
- Mirsky, A.E. and H. Riss. 1951. The DNA content of animals cells and its evolutionary significance. *Journal of General Physiology* 34: 451-462.
- Muller, H.J. 1925. Why polyploidy is rarer in animals than in plants. *Am Nat* 59:346–353.
- Ohno, S., J. Muramoto, C. Stenius, L. Christian and W.A. Kitterell. 1969. Microchromosomes in holocephalian, chondrosteian and holostean fishes. *Chromosoma* 226: 35-40.
- Olson, M.S. 1997. Bayesian procedures for discriminating among hypotheses eith discrete distributions: Inheritance in the tetraploid Astilbe biternata. *Genetics* 147: 1933-1942.
- Otto, S.P., 2007. The Evolutionary Consequences of Polyploidy *Cell*, 131 (3), pp. 452-462.
- Pandian, T. J., Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384, 167-243.
- Phillips, R. B., Zajicek, K. D., Ihssen, P. D., Johnson, O., 1986. Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. *Aquaculture* 54, 313-319.

- Piferrer, F.; Beaumont, A.; Falguière, J.C.; Flajšhans, M.; Haffray, P.; Kolombo, L., 2009: Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* **293**, 125–156.
- Pravda, D, Svobodová, Z. 2003. Haematology of fishes. In: Doubek J, Bouda J, Doubek M, Fürll M, Knotková Z, Pejřilová S et al., editors. *Veterinary Haematology Brno: Noviko 2003*; p.381–397 (in Czech).
- Pšenička, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010. Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (*Acipenser*), function of acrosome and prevention of polyspermy. *Animal Reproduction Science* 117 (2010) 147–154.
- Purdom, C. E., 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture* 33, 287-300.
- Purdom, C. E., Lincoln, R. F., 1973. Chromosome manipulation in fish. In J. Schroder (ed.), *Genetic and mutagenesis of fish*, Springer, Berlin, 38-39.
- Pyatskowitz, J.D., C.C. Krueger, H.L. Kincaid and B. May. 2001. Inheritance of microsatellite loci in the polyploid lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Genome* 44: 185-191.
- Ráb, P., Bohlen, J., Rábová, M., Flajšhans, M., Kalous, L., 2006. Cytogenetics as a tool box in fish conservation: The present situation in Europe. In: *Fish Cytogenetics* (E. Pisano, C. Ozouf-Costaz, F. Foresti and B.G. Kapoor, Eds.) Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, p. 215 – 241.
- Ramsey, J., and Schemske, D.W. (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33, 589–639.
- Rodina, M., Flajšhans, M., 2008. Využití RFID technologie ke značení ryb v ČR. *Bull. VÚRH Vodňany* 44 (4): 100-108 (in Czech).
- Rochard, E., P. Williot, G. Gastelnaud and M. Lepage. 1991. Elements de systematique et de biologie des populations sauvages d' esturgeons. In: *Acipenser*, P. Williot (ed.). Cemagref Publications Bordeaux, pp. 475-507.
- Rzemieniecki, A., Domagala, J., Glogowski, J., Ciereszko, A., Trzebiatowski, R., Kouřil, J. Hamáčková, J., Babiak, I., 2004. Induced spermination in 3-year-old sterlet, *Acipenser ruthenus*. *Aquaculture Research*, 35: 144-151.

- Scribner, K. T., Page, K. S., Bartron, M. L., 2000. Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10, 293-323.
- Serebryakova, E. V. 1972. Some data on the chromosome complexes in Acipenseridae. In: *Genetics, Selection, and Hybridization of Fish*, B. I. Cherfas (ed.). Translated from Russian by Israel Program for Scientific Translations. Keter Press Binding: Wiener Bindery Ltd., Jerusalem, pp. 98-106.
- Siebold, C.T.E., 1863. *Die Süßwasserfische von Mitteleuropa*. W. Engelmann, Leipzig, 430 pp.
- Sousa-Santos, C., Robalo, J. I., Collares-Pereira, M. J., Almada, V. C., 2005. Heterozygous indels as useful tools in the reconstruction of DNA sequences and in the assessment of ploidy level and genomic constitution on hybrid organisms. *DNA Sequence* 16, 462-467.
- Speer, L., 2000. Roe to ruin: The Decline of Sturgeon in the Caspian Sea and the Road to Recovery. www.seaweb.org, 1-4.
- Stanley, J. G., Jones, J. B., 1976. Morphology of androgenetic and gynogenetic grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *J. Fish Biol.* 9, 523-528.
- Svärdson G. 1945. Chromosome studies on Salmonidae. *Rep Inst Freshwater Res Drottingholm* 23:1-151.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Flajšhans, M., 1998. The first findings of the differences in complete blood count between diploid and triploid tench, *Tinca tinca* L. *Acta vet. Brno* 67, 243-248.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J. 1986. Jednotné metody hematologického vyšetření ryb. *Edice metodik VÚRH JU, Vodňany*, 64, 1-20.
- Swarup, H., 1959. Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L.). *J. Genet.* 56, 143-155.
- Štěch, L., Linhart, O., Shelton, W.L., Mirns, S.D., 1999. Minimally invasive surgical removal of ovulated eggs from paddlefish (*Polyodon spathula*). *Aquaculture International*, 7: 129-133.
- Thorgaard, G. H., 1986. Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture* 57, 57-64.

- Thorgaard, G. H., Rabinovitch, P. S., Shen, M. W. Gall, G. A. E., Propp, J., Utter, F. M., 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquaculture* 29, 305-309.
- Tiedemann, R., Moll K., Paulus, K.B., Scheer, M., Williot, P., Bartel, R., Gessner, J., Kirschbaum, F., 2007. Atlantic sturgeons (*Acipenser sturion*, *Acipenser oxyrinchus*): American females successful in Europe. *Naturwissenschaften* 94: 213-217.
- Tiersch, T.R., R.W. Chandler, S.S. Wachtel and S. Elias. 1989. Reference standarts for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry* 10: 706-710.
- Van Eenennaam, A.L., J.D. Murray and J.F. Medrano. 1998. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson (Pisces, Acipenseridae), a fish with a very high chromosome number. *Genome* 41: 51-61.
- Vasil'ev, V.P., L.I. Sokolov and E.V. Sebryakova. 1980. Karyotype of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt from the Lena River and some questions of the acipenserid karyotypic evolution. *Voprosy Ichthyology* 23: 814-822.
- Vasil'ev VP. 1999. Polyploidization by reticular speciation in Acipenseriform evolution: a working hypothesis. *J Appl Ichthyol* 15:29–31.
- Vrijenhoek, R. C., Dawley, R. M., Cole, C. J. Bogart, J. P., 1989. A list of the known unisexual vertebrates. In: *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates* (Dawley, R. M., and Bogart, R. P., eds.). Bull. New York State Mus., Albany, New York, USA, 19-23.
- Wattendorf, R. J., 1986. Rapid identification of triploid grass carp with a Coulter Counter and Channelyzer. *Prog. Fish Cult.* 48, 125-132.
- Wei, Q., W., Yang, D.G., Kynard, B., Chen, X.H., Liu, J.Y., Zhu, Y.Y., 2006. Reproduction of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) since the completion of Gezhouba dam: timing and locations (J). *Journal of Applied Ichthyology*, 21: 4-6.
- White MJD. 1946. The evidence against polyploidy in sexually reproducing animals. *Am Nat* 80:610–618.

- Williot, P., Rouault, T., Pelard, M., Mercier, D., 2001. Preliminary succesful results in larval rearing of the endangered western European sturgeon, *Acipenser sturion*, allowing the initiation of restocking and further konservative rearing program. 4th International symposium on sturgeon, Extended Abstracts, AQ61, Oshkosh, Wisconsin, USA.
- Wladytchenskaya, N. S., Kedrova, O. S., 1982. Genome structure of fish hybrids obtained by interspecific hybridization. *Genetika* 18, 1721-1727.
- Wolters, W. R., Chrisman, C. L., Libey, G. S., 1982. Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Biol.* 20, 253-258.
- Yu, X. 1987. On the karyosystematics of cyprinid fishes and a summary of fish chromosome studies in China. *Genetica* 72: 225-236.
- Zane, L., L. Bargelloni and T. Patarnello. 2002. Sttategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zhang, S., Y. Yang, H. Deng, Q. Wei and Q. Wu. 1999. Genome size, ploidy charakters of several species of sturgeons and paddlefishes with comment on cellular evolution of Acipenseriformes. *Acta Zoologica Sinica* 45: 200-206.
- Zhang, S., Y. Zhang, X. Zheng, Y. Chen, H. Deng, D. Wang, Q. Wie, Y. Zhang, L. Nie and Q. Wu. 2000. Molecular phylogenetic systematics of twelve species of Acipenseriformes based on mtDNA ND4L-ND4 gene sequence analysis. *Science in China (C)* 43: 129-137.

Seznam tabulek, obrázků, grafů a příloh

1. Tabulky

tab. č. 1: Snižování počtu generačních ryb ulovených ve Volze v jednotlivých obdobích (v tisících kusů) (Speer et al., 2000).

tab. č. 2: Roční výlovky (v tunách) z volných vod (www.fao.org).

tab. č. 3: Roční produkce (v tunách) z akvakulturních chovů. Údaje ze statistiky FAO (www.fao.org).

tab. č. 4: Věk při dosažení pohlavní dospělosti (Hochleitner, 2004).

tab. č. 5: Průměrná velikost jiker a počet zralých vytřených jiker v 1g (Hochleitner, 2004).

tab. č. 6: Inkubační doba jiker *Acipenser ruthenus* a *Acipenser baerii* od oplození (v hodinových stupnicích h° - tj. násobek počtu hodin a průměrné hodinové teploty vody).

tab. č. 7: Stanovený karyotyp u vybraných druhů jeseterovitých ryb.

tab. č. 8: Počet chromozómů a obsahu DNA u *Acipenseriformes* skupiny A.

tab. č. 9: Počet chromozómů a obsahu DNA u *Acipenseriformes* skupiny B.

tab. č. 10: Testování a izolování mikrosatelitních lokusů dle May et al. (1997) (**M**) a Ludwig et al. (2001) (**L**). **p** = Polymorfní; **m** = Monomorfní; **n** = Neaktivní.

tab. č. 11: Pozorování jedinci u *Acipenser ruthenus*.

tab. č. 12: Pozorování jedinci u *Huso huso*.

tab. č. 13: Pozorování jedinci u *Acipenser baerii*.

tab. č. 14: Pozorování jedinci u *Acipenser gueldenstaedtii*.

tab. č. 15: Pozorování jedinci u *Acipenser stellatus*.

tab. č. 16: Alkoholové lázně.

tab. č. 17: Výsledky měření velikosti genomu u *Acipenser ruthenus*.

tab. č. 18: Výsledky měření velikosti genomu u *Acipenser baerii*.

tab. č. 19: Výsledky měření velikosti genomu u *Acipenser gueldenstaedtii*.

tab. č. 20: Výsledky měření velikosti genomu u *Acipenser stellatus*.

tab. č. 21: Výsledky měření velikosti genomu u mezinárodního standardu *Gallus domesticus*.

tab. č. 22: Výsledky měření velikosti genomu u *Tinca tinca* 2n.

tab. č. 23: Výsledky měření velikosti genomu u *Tinca tinca* 3n.

tab. č. 24: Stanovení velikosti genomu u standardních jedinců *Acipenser ruthenus*.

tab. č. 25: Stanovení velikosti genomu u polyploidních jedinců *Acipenser ruthenus*.

tab. č. 26: Stanovení velikosti genomu u standardních jedinců *Acipenser baerii*.

tab. č. 27: Stanovení velikosti genomu u hybridních a polyploidních jedinců *Acipenser baerii*.

tab. č. 28: Stanovení velikosti genomu u standardních jedinců *Acipenser gueldenstaedtii*.

tab. č. 29: Stanovení velikosti genomu u polyploidních jedinců *Acipenser gueldenstaedtii*.

tab. č. 30: Stanovení velikosti genomu u standardních jedinců *Acipenser stellatus*.

tab. č. 31: Prokázání vztahu mezi nárůstem velikosti jádra a zvyšující se ploidní úrovní.

tab. č. 32: Publikované velikosti genomu u *Acipenser ruthenus*.

tab. č. 33: Výsledky stanovené velikosti genomu v praktické části bakalářské práce u *Acipenser ruthenus*.

tab. č. 34: Publikované velikosti genomu u *Acipenser baerii*.

tab. č. 35: Výsledky stanovené velikosti genomu v praktické části bakalářské práce u *Acipenser baerii*.

tab. č. 36: Publikované velikosti genomu u *Acipenser gueldenstaedtii*.

tab. č. 37: Výsledky stanovené velikosti genomu v praktické části bakalářské práce u *Acipenser gueldenstaedtii*.

tab. č. 38: Publikované velikosti genomu u *Acipenser stellatus*.

tab. č. 39: Výsledky stanovené velikosti genomu v praktické části bakalářské práce u *Acipenser stellatus*.

2. Obrázky

obr. č. 1: Logo CITES (www.cizp.cz/215).

obr. č. 2: Ploutevní značky.

obr. č. 3: Injekční aplikátor.

obr. č. 4: Elastomerové značky.

obr. č. 5: Určení zralosti ovocytu dle Conte (1988).

obr. č. 6: Způsoby možného vzniku autotetraploidních jedinců. o = gamety, □ = jedinec (Vasil'ev, 1999).

obr. č. 7: Způsoby možného vzniku alotetraploidních jedinců. o = gamety, □ = jeidnec (Vasil'ev, 1999).

obr. č. 8: Injekční jehla, injekční stříkačka.

obr. č. 9: Odběr krve z ocasní cévy.

obr. č. 10: Jádra erytrocytů obarvená Feulgenovou reakcí.

obr. č. 11: Histogram relativního obsahu DNA diploidů a triploidů. Dle Flajšhanse a Linhartu (2000).

3. Grafy

graf č. 1: Nárůst chovaných jeseterů v akvakultuře.

graf č. 2: Porovnání C-hodnot u *Acipenser ruthenus*. Skupiny A a B se mezi sebou statisticky významně liší ($P < 0,05$).

graf č. 3: Porovnání C-hodnot u *Acipenser baerii*. Skupiny A, B a C se mezi sebou statisticky významně liší ($P < 0,05$).

graf č. 4: Porovnání C-hodnot u *Acipenser gueldenstaedtii*. Skupiny A a B se mezi sebou statisticky významně liší ($P < 0,05$).

graf č. 5: Porovnání C-hodnot u *Acipenser stellatus*, kde byla nalezena pouze skupina A.

graf č. 6: Porovnání C-hodnot u *Gallus domesticus*.

graf č. 7: Porovnání C-hodnot u *Tinca tinca* 2n a 3n.

graf č. 8: Porovnání průměrů ploch jader (μm^2) standardních a polyploidních jedinců u *Acipenser ruthenus*.

graf č. 9: Porovnání průměrů ploch jader (μm^2) standardních, polyploidních a hybridních jedinců u *Acipenser baerii*.

graf č. 10: Porovnání průměrů ploch jader (μm^2) standardních a polyploidních jedinců u *Acipenser gueldenstaedtii*.

graf č. 11: Porovnání průměrů C-hodnoty standardních a polyploidních jedinců u *Acipenser ruthenus*.

graf č. 12: Porovnání průměrů C-hodnoty standardních, polyploidních a hybridních jedinců u *Acipenser baerii*.

graf č. 13: Porovnání průměrů C-hodnoty standardních a polyploidních jedinců u *Acipenser gueldenstaedtii*.

graf č. 14: Mezidruhové porovnání průměrů ploch jader (μm^2) u standardních jedinců.

graf č. 15: Mezidruhové porovnání průměrů C-hodnoty u standardních jedinců.

graf č. 16: Mezidruhové porovnání průměrů ploch jader (μm^2) u polyploidních a hybridních jedinců.

graf č. 17: Mezidruhové porovnání průměrů C-hodnoty u polyploidních a hybridních jedinců.

graf č. 18: Grafické znázornění lineárního růstu velikosti jádra v závislosti na obsahu DNA.

4. Přílohy

příloha č. 1: Fotogalerie Nadřádu *Chondrostei* (www.google.com).

příloha č. 2: Kaspické moře, ze kterého pochází 80% výlovku jeseterů na světě (www.google.com).

příloha č. 3: Genetické pracoviště na FROV JU ve Vodňanech.

příloha č. 4: Biopsie jiker u samice *Acipenser ruthenus* (Gela, 2008).

příloha č. 5: Kvalitně připravený *Gallus domesticus*.

příloha č. 6: Nevhodný standard *Gallus domesticus*.

příloha č. 7: Kvalitně připravený vzorek vzorek *Acipenser baerii* 8n.

příloha č. 8: Nekvalitně nabarvený vzorek *Acipenser baerii* 6n.

8. Abstrakt

Polyploidie u jeseterů

Polyploidie má za následek zmnožení celých chromozómových sad v somatických buňkách jedince nad jeho běžnou úroveň.

Cílem této práce bylo pochopení a popsání poznatků o jeseterovitých rybách se zaměřením na cytogenetické aspekty jejich polyploidie. Nalezení hybridů a polyploidních jedinců. Naměření jejich ploidní úrovně, porovnání s jedinci stejného rodu a standardní úrovně ploidie a následné zaprotokolování těchto údajů, ať již za účelem dalšího zkoumání či vyřazení z generačního hejna.

Pokus probíhal na FROV JU ve Vodňanech, na všech zde dostupných jeseterovitých rybách i na vzorcích odebraných z jeseterovitých farem v zahraničí, se kterými FROV JU spolupracuje. Nejčastěji se jednalo o *Acipenser ruthenus*, *Acipenser gueldenstaedtii* a *Acipenser baerii*. Metodou měření byla zvolena obrazová cytometrie při níž je využívána digitalizace obrazu a jeho následná počítačová analýza. Ploidní úroveň byla měřena z velikosti jader červených krvinek (erytrocytů) vybraných jedinců.

Výsledkem práce bylo naměření zástupců rodu *Acipenseridae* se standardní úrovní ploidie, zaprotokolování získaných údajů a nalezení několika polyploidních jedinců, kteří jsou chováni na evropských rybích farmách.

Závěrem práce je nutnost dalších stanovování ploidních úrovní u jeseterů, hledání polyploidních jedinců a jejich následné zkoumání či odstraňování z intenzivních chovů, aby již nebylo možné pokračování ničení genofondu těmito hybridy.

Klíčová slova: *Acipenseridae*, ploidie, polyploidie, cytogenetické, FROV JU, obrazová cytometrie, erytrocyty

Polyploidy in sturgeons

The effect of polyploidy means that the whole chromosomal sets are multiplied over their normal level. The point of this thesis was to understand and to describe all information about these species, especially focused on the cytogenetic aspects of polyploidy, and to find hybrids and polyploid individuals thereafter to appoint their ploidy level, to compare the results with the standard individuals of the same species and to record the data for the next needs. This test has been done at the laboratory of molecular, cellular and quantitative genetics, Faculty of Fisheries and Protection of Waters USB in Vodňany using all sturgeons spawners and using samples obtained from some foreign fish farms which cooperated with the faculty. The samples included mostly *Acipenser ruthenus*, *Acipenser gueldenstaedtii* and *Acipenser baerii*. The method of choice was image cytometry which used image digitalization and subsequently its computer analysis. The ploidy level was measured as erythrocyte nuclear size and the genome size in selected individuals.

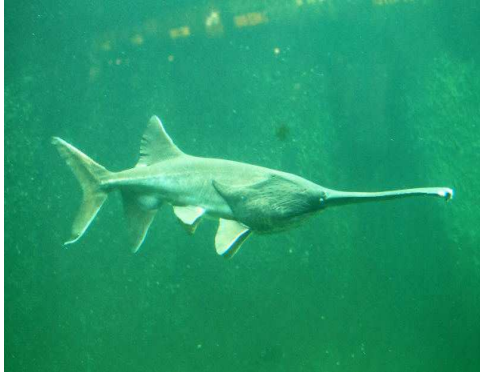
The upshot of the thesis was determination of standard individuals of *Acipenseridae*, recording the obtained data and finding several polyploid individuals bred on European fish farms. As the result is necessary to say that another monitoring of reared fish needs to be done. The polyploid fish needs to be found either for next research or for negative selection from the broodstock so that they couldn't damage gene resources anymore.

Key words: *Acipenseridae*, polyploidy, cytogenetics, image cytometry, erythrocytes.

9. Přílohy

příloha č. 1: Fotogalerie Nadřádu *Chondrostei* (www.google.com).

Čeleď: *Polyontidae* (www.google.com)



Polyodon spathula



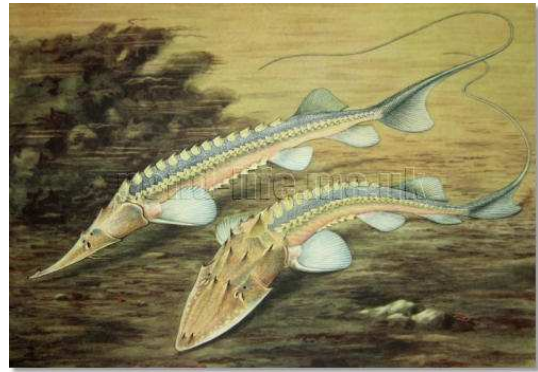
Psephurus gladius

Čeleď: *Acipenseridae* (www.google.com)

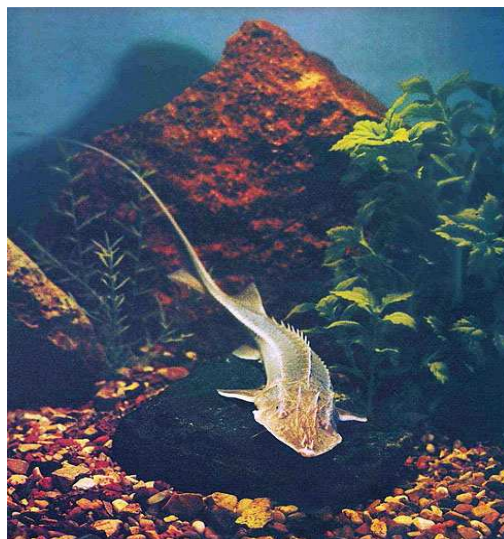
Rod: *Pseudoscaphirhynchus*



Pseudoscaphirhynchus kaufmanni



Pseudoscaphirhynchus hermannii



Pseudoscaphirhynchus fedtschenkoi

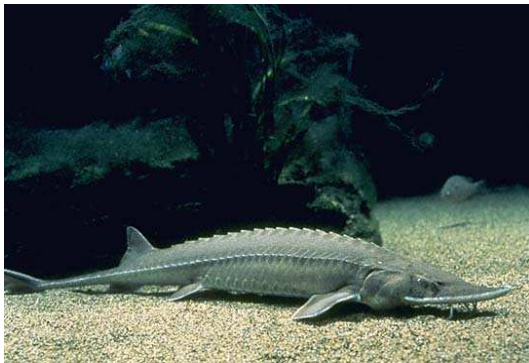
Rod: *Scaphirhynchus* (www.google.com)



Scaphirhynchus albus



Scaphirhynchus mexicanus



Scaphirhynchus platorhynchus



Scaphirhynchus suttkusi

Rod: *Huso* (www.google.com)

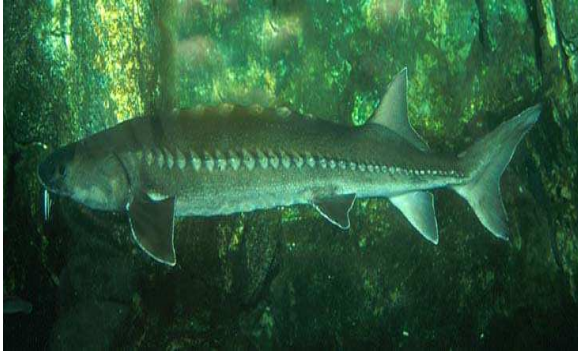


Huso dauricus kaluga

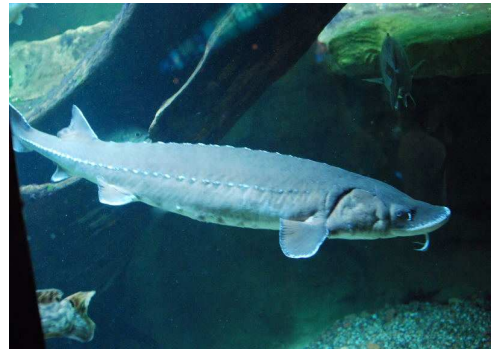


Huso huso

Rod: *Acipenser* (www.google.com)



Acipenser brevirostrum



Acipenser fulvescens



Acipenser medirostris



Acipenser oxyrinchus



Acipenser transmontanus



Acipenser gueldenstaedtii



Acipenser naccarii



Acipenser nudiventris



Acipenser ruthenus



Acipenser sturio



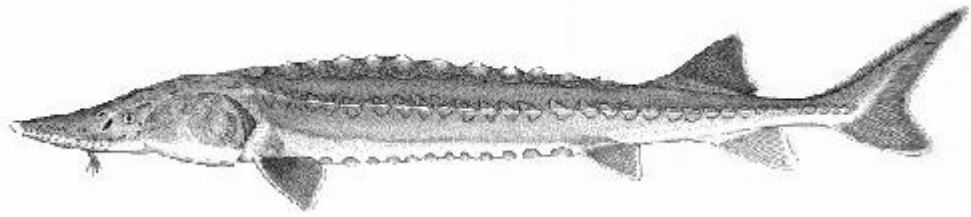
Acipenser stellatus



Acipenser baerii



Acipenser dabryanus



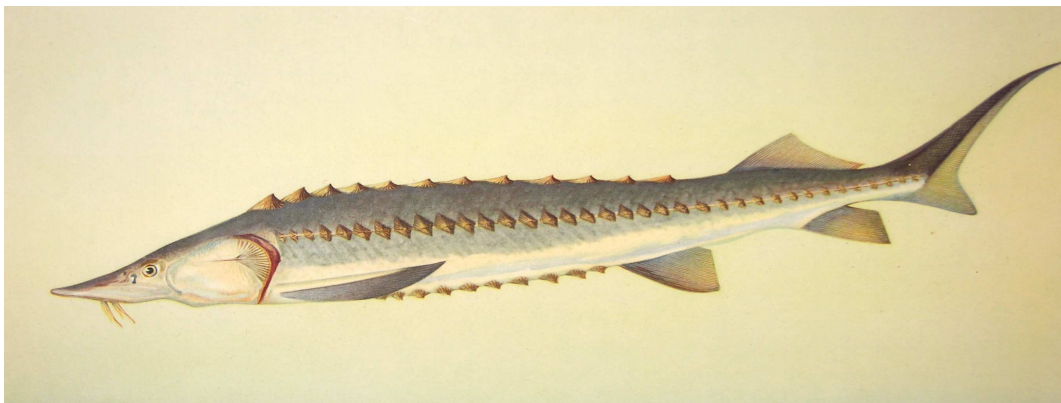
Acipenser kikuchii



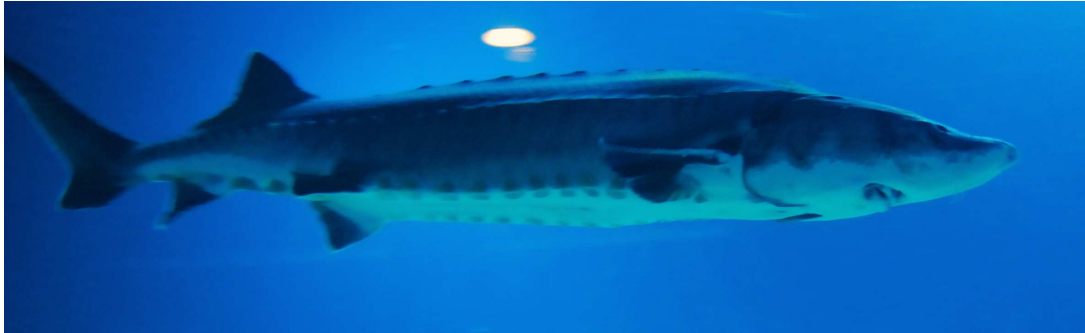
Acipenser mikadoi



Acipenser persicus



Acipenser schrenckii

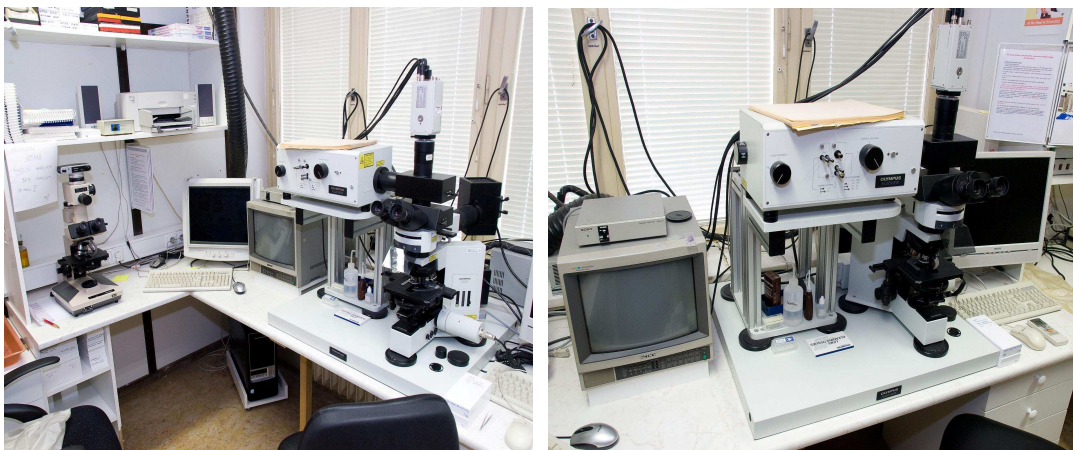


Acipenser sinensis

příloha č. 2: Kaspické moře, ze kterého pochází 80% výlovku jeseterů na světě (www.google.com).



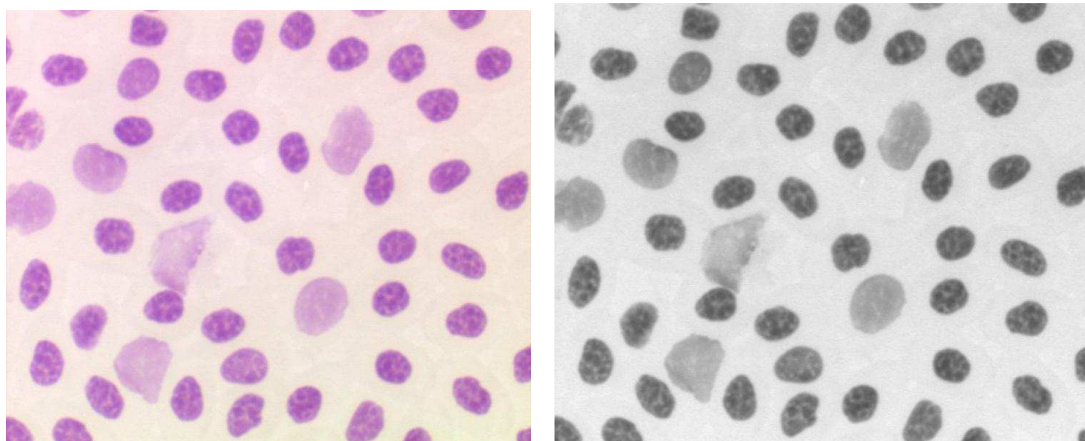
příloha č. 3: Genetické pracoviště na FROV JU ve Vodňanech.



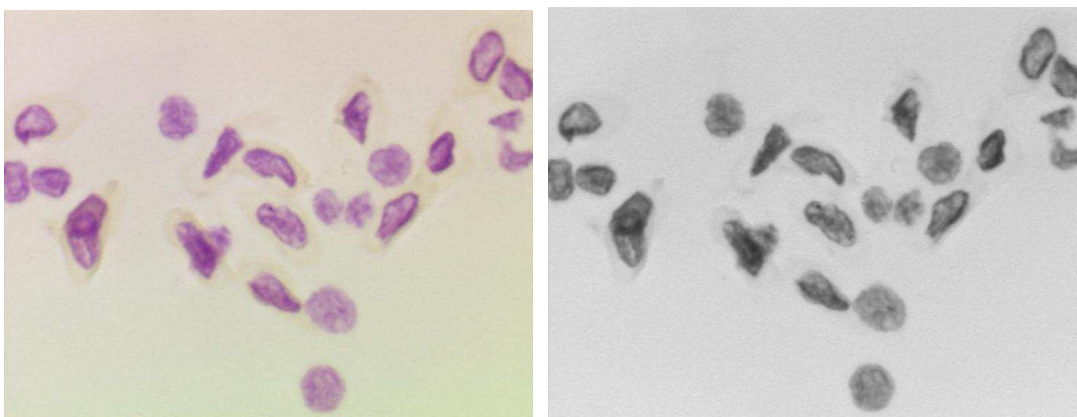
příloha č. 4: Biopsie jiker u samice *Acipenser ruthenus* (Gela, 2008).



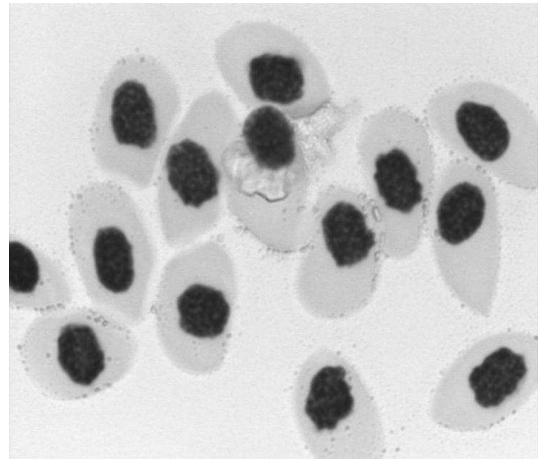
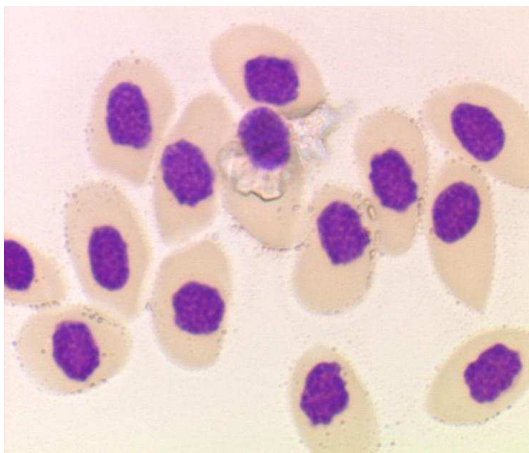
příloha č. 5: Kvalitně připravený standard *Gallus domesticus*.



příloha č. 6: Nevhodný standard *Gallus domesticus*.



příloha č. 7: Kvalitně připravení vzorek *Acipenser baerii* 6n.



příloha č. 8: Nekvalitně nabarvený vzorek *Acipenser baerii* 8n.

