

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Určení kompetice mlíčáků kapra obecného (*Cyprinus carpio*) molekulárně
genetickými markery**

Studijní program: 4101 T Zemědělské inženýrství
Studijní obor: Rybářství

Autor: Vojtěch Kašpar

Vedoucí práce: Doc. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
Odborný konzultant: Dr. Klaus Kohlmann

České Budějovice

2006

Knihovna JU - ZF



3114703796

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: **Vojtěch Kašpar**

Studijní program: M 4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rybářství

Název tématu: **Určení kompetice mlíčáků kapra obecného (*Cyprinus carpio*)
molekulárně genetickými márkry**

Zásady pro vypracování:
(v zásadách pro vypracování uveďte cíl práce a metodický postup)

Cílem práce je identifikovat otcovství u potomstva kapra obecného pomocí mikrosatelitní DNA v experimentu zaměřeném na určení kompetice mlíčáků.

Metodika práce bude spočívat v odběru tkáně neinvazní metodou (malá část ploutve) u rodičů tzn. mlíčáků, ale i jikernačky s fixací v 80 % etanolu. Podle mikrosatelitových márkřů dojde k výběru vhodných otců, tak aby došlo k spolehlivému odlišení budoucího potomstva podle otců. Následně proběhne experiment s vytvořením dvou skupin potomstva. Pro první skupinu bude použito heterospermátu bez kvantifikování podílu jednotlivých otců v heterospermátu, pouze se určí celkové množství spermií na jikru. U druhé skupiny potomstva bude k oplození využito rovněž heteospermátu se stejným kvantem spermií ovšem rovněž s kalibrovaným spermatem, tzn. se stejným množstvím spermií po každém otcí. Dále bude stanoven podíl živých a mrtvých spermií (fluorescenční mikroskopii), procento pohyblivých spermií a rychlost pohybu spermií. Tyto ukazatele budou využity pro statistické výpočty pravděpodobnostního vlivu na dosaženou kompetici mlíčáků. Po vykulení potomstva dojde k individuální fixaci váčkového plůdku, předpokládá se vždy po 240-300 ks z každé skupiny. Molekulárně genetické analýzy DNA na úrovni mikrosatelitní DNA pro stanovení otcovství budou prováděny v rámci spolupráce s dr. Klausem Kolmanem v Ústavu rybářství v Berlíně podle standardní metodiky (Crooijmans et al., 1997; Kohlman et al., 2003, Vandeputte et al., 2004). DNA z odebraných vzorků (ploutev) a celých rybiček po vykulení bude extrahována a jednotlivé márkry v závislosti budou fluorescenčně označeny. Předpokládáme, že postačí 7-8 mikrosatelitů (MFW16, MFW26, MFW7, MFW11, MFW18, MFW9, MFW3, MFW20) z celé řady popsanych Crooijmansem et al. (1997). Metoda PCR amplifikuje dostatečné množství kopií těchto markérů a ty pak budou elektroforeticky odděleny a detekovány fluorescenčním skenerem.

Rozsah grafických prací: 10 - 20 tabulek a grafů

Rozsah průvodní zprávy: 40 - 55 stran

Seznam odborné literatury:

- Crooijmans R.P.M.A., Bierbooms V.A.F., Komen J., Vand Der Poel J.J., Groenen M.A.M., 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Anim. Genet.* 28, 129-134.
- Vandeputte M., Kocour M., Mauger S., Dupont-Nivet M., De Guerry D., Rodina M., Gela D., Vallod D., Chevassus B., Linhart O., 2004. Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* (in press).
- Kohlman K., Kersten P., 1999. Genetic variability of German and foreign common carp (*Cyprinus carpio*, L) populations. *Aquaculture* 173, 435-455.
- Flajšhans, M., Cosson, J., Rodina, M., Linhart, O., 2004. The application of image cytometry for viability assessment of dual fluorescent - stained spermatozoa of fish. *Cell. Biol. Int.* (in press) (IF 1,0).
- Linhart, O., Cosson J., Mims S.D., Shelton W.L., Rodina, M., 2002. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa. *Reproduction*, 124, 713-719 (IF 2.3)


Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Otomar Linhart, DrSc.


Konzultant: Ing. Klaus Kolman, PhD.

Datum zadání diplomové práce: únor 2004

Termín odevzdání diplomové práce: 30. 4. 2006

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


doc. Ing. Petr Hartvich, CSc.
Vedoucí katedry


doc. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.
Děkan

V Českých Budějovicích dne 10. 3. 2004

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Určení kompetice mličáků kapra obecného (*Cyprinus carpio*) molekulárně genetickými markery“ vypracoval samostatně na základě vlastních měření a materiálů, které uvádím v seznamu literatury.

V Českých Budějovicích, 28. dubna 2006.

.....
Vojtěch Kámp
.....
podpis

Děkuji vedoucímu diplomové práce panu Doc.Ing.Linhartovi a panu Ing. Rodinovi za jejich vedení, organizaci experimentu a připomínky vedoucí k sestavení této diplomové práce a děkuji i celému oddělení genetiky a šlechtění ryb VÚRH JU Vodňany.

Děkuji Dr. Kohlmannovi a Petře Kersten za úvod do práce s metodami molekulární biologie a jejich využitím v rybářství.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	2
2.1 MIKROSATELITNÍ MARKERY A RYBY.....	2
2.1.1 ZOOGEOGRAFIE A DOMESTIKACE KAPRA OBECNÉHO (<i>Cyprinus carpio</i> L.).....	2 2
2.1.2 METODY STUDIA JEDINCŮ A RYBÍCH POPULACÍ	4
2.1.3 MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ MARKERY	5
2.1.4 BIOCHEMICKÉ A MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ MARKERY A RYBY	6
2.1.5 MIKROSATELITY	8
2.1.6 IZOLACE MIKROSATELITNÍCH MARKERŮ.....	10
2.1.7 IZOLACE MIKROSATELITNÍCH MARKERŮ PRO KAPRA ...	13
2.1.8 PŘEHLED PRACÍ VYUŽÍVAJÍCÍCH MIKROSATELITNÍ MARKERY PRO KAPRA.....	16
2.2 KOMPETICE SPERMIÍ	29
2.2.1 KOMPETICE A EVOLUČNĚ STABILNÍ STRATEGIE	29
2.2.2 KOMPETICE A RYBY	29
2.2.3 KOMPETICE NA ÚROVNI „IN VITRO“ FERTILIZACE.....	31
2.2.4 „CRYPTIC FEMALE CHOICE“	33

3. MATERIÁL A METODIKA	34
3.1 VÝTĚR.....	34
3.1.1 VÝBĚR GENERAČNÍCH RYB	34
3.1.2 VÝTĚR, ZÍSKÁNÍ A UCHOVÁVÁNÍ GAMET.....	35
3.1.3 URČENÍ KONCENTRACE SPERMIÍ	35
3.1.4 OPLOZENÍ A INKUBACE	36
3.1.5 KONTROLA OPLOZENOSTI A LÍHNIVOSTI	37
3.1.6 ZÁZNAM POHYBLIVOSTI SPERMIÍ.....	37
3.1.7 VYHODNOCENÍ ZÁZNAMU POHYBLIVOSTI SPERMIÍ.....	38
3.2 ANALÝZA MIKROSATELITNÍCH MARKERŮ	39
3.2.1 IZOLACE DNA	39
3.2.2 TESTOVÁNÍ KVALITY IZOLÁTU	40
3.2.3 PCR – SLOŽENÍ SMĚSI PRO PCR	41
3.2.4 PCR – TEPLOTNÍ PRŮBĚH REAKCE	42
3.2.5 TESTOVÁNÍ KVALITY PCR PRODUKTŮ	44
3.2.6 ANALÝZA FRAGMENTŮ DNA.....	44
3.3 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT	48
3.3.1 KONTROLA OPLOZENOSTI A LÍHNIVOSTI	48
3.3.2 MOTILITA SPERMIÍ.....	48
3.3.3 RYCHLOST POHYBU SPERMIÍ.....	49
3.3.4 ZASTOUPENÍ MLÍČÁKŮ V POTOMSTVU	49
3.3.5 TESTOVÁNÍ HYPOTETICKÝCH MODELŮ	49

4. V Ý S L E D K Y	51
4.1 OPLOZENOST A LÍHNIVOST.....	51
4.1.1 OPLOZENOST – STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ.....	51
4.1.2 LÍHNIVOST – STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ.....	52
4.2 MOTILITA SPERMÍ.....	52
4.2.1 MOTILITA – STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ.....	53
4.3 RYCHLOST POHYBU SPERMÍ.....	53
4.3.1 RYCHLOST – STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ.....	54
4.4 ZASTOUPENÍ MLÍČÁKŮ V POTOMSTVU.....	55
4.5 TESTOVÁNÍ HYPOTETICKÝCH MODELŮ.....	56
5. D I S K U S E	59
6. Z Á V Ě R	62
7. P Ř Í L O H A	63
8. L I T E R A T U R A	66

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 MIKROSATELITNÍ MARKERY A RYBY

2.1.1 ZOOGEOGRAFIE A DOMESTIKACE KAPRA OBECNÉHO (*Cyprinus carpio* L.)

Kapr (*Cyprinus carpio* L.) patří do čeledi *Cyprinidae*, největší čeledi mezi sladkovodními kostnatými rybami (Nelson, 1994). Kapr (*Cyprinus carpio* L.) je pravděpodobně nejznámější kostnatou rybou světa. Je to částečně díky dlouhé historii domestikace a také širokým spektrem introdukcí, které vyústily početnými lokálně adaptovanými divokými liniemi či plemeny (Komen, 1990). Během dlouhého období vývoje a domestikace se působením různých vlivů vyvinulo z původní divoké formy kapra několik poddruhů a široká škála linií a plemen, jež se od sebe odlišují nejen v morfologických a morfometrických ukazatelích, ale také genetickou strukturou těchto linií a plemen. Variety (plemena a linie) kapra se vyvinuly díky kombinaci faktorů jako geografická izolace, adaptace, akumulace mutací a přirozenou selekcí a stejně tak selekčním tlakem způsobeným člověkem (Hulata, 1995). Tyto vlivy tedy mají za následek dnešní variabilitu druhu *C. carpio*. Původní předek kapra *C. carpio* pochází pravděpodobně z oblasti Kaspického moře a vzniknul během pleiocénu. Během pleistocénu se z tohoto předka vyvinul druh *C. carpio* a rozšířil se do Černého moře a Aralského jezera (Berg, 1964, cit. Kirpichnikov, 1967). Důkazem mají být fosilní zbytky nalezené v oblasti Černého moře. Berg se domnívá, že kapr během pleiocénu obýval území od Donu a Dunaje na západě až po oblast řeky Amur a Čínu na východě.

Podle Kirpichnikova (1967 a 1999) lze kapra rozdělit do čtyř odlišných poddruhů a to:

<i>Cyprinus carpio carpio</i>	-	Evropsko-zakavkazský
<i>Cyprinus carpio aralensis</i>	-	Středovýchodní
<i>Cyprinus carpio haematopterus</i>	-	Amursko – čínský
<i>Cyprinus carpio viridiviolaceus</i>	-	Jihoasijský a východoasijský

Balon (1974, 1995) rozlišuje druh *C. carpio* pouze na 2 poddruhy a to *C.c. carpio* a *C.c. haematopterus*.. Podle Balona (1969) jde o rozdělení druhu „velmi mladé“ díky čemuž mají oba poddruhy značnou morfologickou adaptabilitu. Jako původní areál kapra

označuje oblast Kaspického moře a Malé Asie, odkud se kapr šířil dále na západ do oblasti Dunaje a dále na východ - do Číny a jihovýchodní Asie.

Obě tato rozdělení byla založena na studii morfometrických a biometrických znaků ryb z různých geografických oblastí. V dnešní době se tyto metody již nepoužívají k přesnějšímu určování členění druhů a byly nahrazeny metodami biochemické analýzy a metodami molekulární biologie a proto i rozdělení druhu *C. carpio* pomocí těchto nových metod doznalo určitých změn. **Kohlmann (1999)** na základě analýzy 8 enzymatických systémů pomocí škrobové elektroforézy potvrdil status *C. c. carpio* pro kapra pocházejícího z Evropy a střední Asie a *C.c. haematopterus* pro jiho- a východoasijského kapra. Pomocí studia mitochondriální DNA byla rovněž potvrzena oprávněnost rozdělení do dvou odlišných skupin kapra *C.c. carpio* a *C.c. haematopterus* (**Gross a kol., 2002** , **Kohlmann a kol, 2003**).

Domestikace kapra obecného

Kapr je jednou z nejdříve domestikovaných ryb (**Balon, 1995**). Domestikace kapra probíhala hned ve dvou domestikáčnických centrech a to nejprve v Číně a později v Evropě. Předpokládá se že domestikace kapra v Číně (tedy u poddruhu *Cyprinus carpio haematopterus*) začala již přibližně 2000 let před n.l. – z této doby pocházejí první zmínky o umělém chovu ryb. Jelikož ovšem čínské jméno pro kapra dodnes zahrnuje i několik příbuzných nebo podobných druhů, mohou být tyto údaje poněkud matoucí (**Balon, 2004**).

Podle **Balona (1969)** začala domestikace kapra v Evropě na počátku našeho letopočtu a to domestikací divoké formy vyskytujících se v Dunaji, Dyji a Moravě. Přes Dunaj tehdy vedla známá Jantarová stezka Římanů a ti pravděpodobně zavlekli kapra i do dalších oblastí Evropy. Kostí kapra se objevily mezi vykopávkami římských pevností na slovensko-maďarském pomezí (**Balon, 1995**). Podle **Balona (1974, 1995)** tak Římané znali chov ryb v umělých nádržích a znali kapra jako rybí surovinu a dováželi jej do Říma. Římané tak zavlekli kapra do Itálie, Keltové zase zavlekli kapra do Německa a Francie.

O tom jakou měrou si Římané kapra cenili nebo jak intenzivně kapra chovali se vedou spory, někteří autoři namítají že jej sice znali, ovšem pochybují o tom že by jej chovali a začali tak s jeho domestikací (**Komen, 1990**).

V domestikaci kapra hrál bezesporu důležitou roli i klášterní chov ryb od počátku středověku, jelikož rybí maso bylo považováno za surovinu přípustnou k přípravě postních jídel. Zmínky o zakládání rybníků na území Čech jsou tak například v Kladrubské listině (1115) a nebo Kosmově kronice (konec 11.stol a počátek 12.stol.). Ze století dvanáctého tedy pocházejí první zmínky o chovu kapra na našem území, rozsáhlejší jsou až ze století šestnáctého – například dílo Dubravia. Kapr byl postupně zavlečen do celé Evropy, v devatenáctém století byl zavlečen do severní Ameriky (**McCrimmon, 1968**), Austrálie (**Butcher, 1962**), Afriky (**Jubb, 1967**).

2.1.2 METODY STUDIA JEDINCŮ A RYBÍCH POPULACÍ

- A) **Metody morfometrické** – založeny na studiu exteriéru – sledovány plastické znaky, ale současně sledovány užitkové vlastnosti a znaky reprodukční, u plemenných ryb a generačních hejn.
- B) **Metody cytogenetické** - studium chromozomální DNA, určení množství DNA a určení karyotypu a ploidní úrovně v případě že daný druh se vyskytuje i ve více ploidních úrovních nebo k určování mezidruhových hybridů mezi dvěma současně se vyskytujícími druhy.
- C) **Metody biochemické** – stanovení polymorfismu některého proteinového systému, pomocí škrobové nebo agarosové elektroforézy. K určení čistoty plemene nebo linie, hledání hybridů, ověřování původu apod.
- D) **Metody molekulární biologie** – v dnešní době nejvíce používané metody, jejich nevýhodou je finanční náročnost, v praxi se používá analýza mikrosatelitních markerů minisatelitů a také analýza mitochondriální DNA pomocí metody RFLP, metoda RAPD a metoda AFLP.

2.1.3 MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ MARKERY

Molekulárně-genetický marker je vysoce polymorfní znak, který vykazuje mendelistickou kodominantní dědičnost a je snadno a jednoznačně detekovatelný. Oproti klasickým markerům mají molekulárně-genetické markery řadu výhod. Jednou z nich je jejich početnost a relativně snadná identifikace. Jsou také vysoce informativní, mohou být získány i z velmi malého množství materiálu a také v libovolné fázi ontogenetického vývoje jedince včetně embryí a mohou být také získány z tělesných pozůstatků. V potřebných případech také mohou být izolovány z muzejních exponátů a nebo různých sbírek. Získaná DNA může být dlouhodobě archivována a lze ji použít opakovaně k analýze, většina analýz pracuje s velmi malým množstvím izolátu DNA.

ROZDĚLENÍ MARKERŮ :

- 1) **Kódující exprimované geny**, mají nízkou hladinu polymorfismu, jsou málo použitelné pro studie diverzity rodin a populací a nebo určování identity . Využívají se v komparativním mapování.
- 2) **Vysoce variabilní sekvence DNA** tj. především mikrosatelity (STR, SSR – *Short Tandem Repeats, Simple Sequence Repeats*) a minisatelity (VNTR – *Variable Number Tandem Repeats*). Tyto sekvence se vyznačují vysokým polymorfismem – velkým počtem různých allel. Díky tomu jsou zejména mikrosatelity vysoce informativní v populačních studiích a při určování rodičovství, určování identity nebo paternity, ale jsou také základem pro vazbové mapování genů – např. QTL (*Quantitative Trait Loci*).
- 3) **Jednonukleotidové polymorfismy** (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*), mohou být součástí kódujících úseků, častěji jsou ale v nekódujících oblastech - intronech. Jsou využitelné pro populační a rodinné studie. Vyskytují se v genomu přibližně každých 500-100 bp.

2.1.4 BIOCHEMICKÉ A MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ MARKERY A RYBY

Udržení genetické variability je základní součástí mnoha chovných programů různých rybích druhů, jelikož právě genetická variabilita umožňuje konkrétním druhům přizpůsobovat se měnícím se podmínkám a to jak ve volné přírodě tak v podmínkách selekce v kontrolovaných chovech.

Genetická variabilita populací byla zprvu studována pomocí polymorfismu krevních skupin, touto metodou byly zprvu studovány rozdíly např. mezi dvěma vzdálenými populacemi ryb (**Sick, 1961; citoval Ward a Grewe, 1994**).

Studium polymorfismu krevních skupin vystřídala jiná technika, výzkum se zaměřil na studium allozymové variability pomocí horizontální škrobové elektroforézy (**Harris a Hopkinson, 1976**). Perspektivy biochemických markerů u ryb popsal **Utter (1991)**. Tato metoda se stala účinným nástrojem studia struktury a variability vzdálených populací určitého druhu, dovozovala určování variability populací určitého druhu, určování rozdílů mezi divokými jedinci a chovanými plemeny určitého druhu, odlišení různých přírodních populací (**u kapra např. Davis a kol., 1999, Kohlmann a kol., 1999; Šlechtová a kol., 2002, Murakaeva a kol., 2003**). Dovoluje charakterizaci kulturních plemen, pomocí této metody byla také studována čistota chovaných linií a nebo plemene a nebo detekována přítomnost hybridních jedinců. Tato metoda se používá dodnes, někdy jako jediná metoda a jindy v porovnání s metodami molekulární biologie, například ve spojení s analýzou mtDNA pomocí RFLP, RAPD nebo analýzou mikrosatelitních markerů.

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, Botstein a kol., 1980) je metoda založená na prvotní amplifikaci určitého úseku DNA a poté je tento úsek štěpen různě specifickými restriktčními endonukleázami. DNA nebo její fragmenty získané amplifikací jsou vystaveny účinkům specifických endorestriktáz (podmínky inkubace závisí na enzymu) a poté jsou nově vzniklé fragmenty děleny na agarosovém nebo většinou akrylamidovém gelu. Na základě RFLP se identifikují allelely na základě přítomnosti nebo absence specifického restriktčního místa. Právě analýza **mtDNA** pomocí **RFLP** z části nahradila počátkem osmdesátých let do té doby používané allozomy (**Lansman a kol., 1981**). Analýza materiálně dědičné mtDNA pomocí RFLP je základem mnoha fylogenetických studií a ověřování mikrotaxonomického členění druhu (**Gross a**

kol., 2002, Kohlmann a kol., 2003), slouží také k určování přítomnosti hybridních jedinců.

Používá se i technika **RAPD / *Random Amplified Polymorphic DNA*, Williams a kol., 1990** / **RAPD** je metoda využívající krátkého specifického nukleotidu jako sondy k hybridizaci při PCR s genomovou DNA. Tato metoda je velmi vhodná k určování genetické variability druhů a nebo i určování konkrétních jedinců u druhů, které nebyly dosud důkladněji mapovány pomocí dalších technik molekulární biologie. Použití několika různých oligonukleotidů k RAPD tak dovoluje získat data vedoucí k určení variability (nebo i konkrétní identifikaci) u druhů které nebyly dosud geneticky mapovány a pro něž nebyly dosud vyvinuty specifické markery. Přehled využití RAPD v rybářství uvádí **Bahy a kol. (2005)**.

AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*, Vos a kol., 1995) je detekcí restričních fragmentů pomocí amplifikace PCR. Metoda je založena na úspěšné ligaci adaptorových sekvencí na konce restričních míst fragmentů DNA, tím vznikne místo univerzální pro primery pro PCR. Pomocí PCR je pak tento produkt amplifikován tak aby byl detekovatelný pomocí elektroforézy. Srovnání AFLP markerů a analýzy mikrosatelitních markerů za účelem určení rodičovství uvádí **Gerber a kol., 2000**.

V současnosti se používají zejména **VNTRs / *Variable Number Tandem Repeat loci*, Tautz a Renz, 1984; Jeffreys a kol., 1985a, 1985b; Tautz, 1989**/. VNTRs jsou repetitivní sekvence v genomové DNA, tyto sekvence vykazují značný délkový polymorfismus. Analýza markerů tohoto typu pracuje na základě PCR s primerovými páry pro danou sekvenci a následné detekci délky amplifikovaného úseku. VNTRs představují „minisatelity a mikrosatelity“. Převážně „mikrosatelity“ označované jako **SSRs** nebo **STRs** jsou v posledních letech nejčastěji používány jako markery ke studiu variability populací, genetické diverzity, slouží také k identifikaci jedinců, určení příslušnosti jedinců k populacím (**Hansen a kol., 2001**), určení rodičovství nebo otcovství (**Gerber a kol., 2000**). Ve srovnání s allozymovými markery, které u mnoha druhů a populací nejsou reprezentovány více než jednou nebo dvěma allelami, mikrosatelity jsou daleko proměnlivějšími, často s deseti a více allelami pro jediný lokus. (**Goldstein a Pollock, 1997**).

Praktickou výhodou všech metod molekulární biologie je že práce s pro analýzu je potřeba pouze malé množství DNA jejíž odběr je možný neinvazivní metodou (např. ústřížky ploutve) za účelem získání vzorku a tím širší je i jejich uplatnění v akvakultuře, k získání DNA je možno použít i muzejních preparátů, šupin a otholitů (**Hutchinson a kol., 1999; Nielsen a kol., 1999**).

2.1.5 MIKROSATELITY

Mikrosatelity jsou vysoce polymorfními DNA markery. Mikrosatelity jsou tandemové opakování krátkých nukleotidových motivů rozmístěné v jaderném genomu eukaryot (**Weber a May 1989**). Mikrosatelity jsou přítomny jak v kódujících tak v nekódujících oblastech genomu a jsou charakteristické vysokým stupněm polymorfismu. Jsou součástí heterochromatinu eukaryot i prokaryot a představují značnou část jejich genomu. Předpokládá se, že v genomu obratlovců se nachází přes 10^4 a pravděpodobně až 10^5 mikrosatelitů. (**Litt a Luty, 1989, Tautz a Renz 1984, Love a kol., 1990**). Mikrosatelitní markery jsou kodominantně děděnými markery.

Mikrosatelity se osvědčily jako vysoce účinný nástroj genového mapování mnoha organismů (**Schuler a kol., 1996**). Využití mikrosatelitních markerů je opravdu velmi široké, vysoká variabilita mikrosatelitů činí z těchto sekvencí velmi užitečné genetické markery a to pro mnoho rozličných aplikací. U ryb se předpokládá výskyt mikrosatelitních motivů v genomu přibližně každých 10 kb (**Wright, 1993**). Polymorfismus mikrosatelitních markerů je založen na různém počtu opakování mikrosatelitního motivu v genomové DNA. Mikrosatelitní markery podléhají ovšem také mutacím, předpokládá se že frekvence mutací mikrosatelitních markerů dosahuje 10^{-2} za jednu generaci (**Weber a Wong, 1993**), přičemž mutace je pak pouhým odlišením délky allelu o jediný bp nebo motiv mikrosatelitu. Díky vysoké úrovni variability roste význam mikrosatelitních markerů (SSRs) jak při genovém mapování tak při použití v populačních studiích (**Hammond a kol., 1998**). „Síla“ nebo spíše zobrazovací schopnost těchto markerů u konkrétního druhu se odvíjí od počtu izolovaných a použitelných markerů pro daný druh a také míry jejich polymorfismu v rámci druhu. Od tohoto polymorfismu se odvíjí také nutnost užití různého počtu lokusů v rámci populačních studií.

Identifikace mikrosatelitních lokusů (většinou dvounukleotidových motivů) je již dobře zdokumentována a propracována (**Hammond a kol., 1998**), viz. následující kapitola.

Přehled využití technologií založených na DNA fingerprintingu v rámci akvakultury popsal **Liu a Cordes, (2004)**. Využití mikrosatelitních markerů je velmi pestré. Díky jejich vysokému polymorfismu jsou vhodné k populačním studiím – určení standardní genetické vzdálenosti D_s (**Takezaki a Nei, 1996**), určení párových distancí D_A (**Nei a kol, 1983**) a ke konstrukci fylogenetických „stromů“ – diagramů znázorňujících přibližnou genetickou vzdálenost druhů, poddruhů, plemen nebo linií. Mikrosatelitní markery se využívají i k určení příslušnosti jedince k populaci nebo plemeni (**Hansen a kol., 2001**).

Určení paternity pomocí mikrosatelitních markerů je díky vysoké variabilitě mikrosatelitních markerů relativně snadno prokazatelné, zejména při existenci a možnosti použití více lokusů. K určení rodičovství nebo eventuelně otcovství se tak mikrosatelity používají poměrně často i u ryb (**např. Estoup a kol., 1998**), a to i v rámci chovných programů. Analýza mikrosatelitních markerů resp. segregace allel mikrosatelitních lokusů se používá i k určení úspěšnosti androgenese nebo gynogenese (**Erzaz a kol., 2004; Tanck a kol., 2001**).

Mikrosatelity lze využívat ke konstrukci „linkage maps“ event. jen k určování některých „linkage groups“, využívají se i k mapování QTL / *Quantitative Trait Loci*, **Cheverud a Routman, 1993** /. Ve spojení s těmito QTL lokusy mají mikrosatelity i potenciál v MAS / *Marker Assisted Selection* /. Pro ryby bylo zatím zmapováno jen velmi málo QTL lokusů. MAS u ryb, její možnosti a perspektivy byly zčásti popsány (**Liu, 2001**).

Mikrosatelitní markery izolované pro jeden druh jsou často použitelné v rámci blízkce příbuzných druhů, postup kdy mikrosatelitní markery s primery popsány pro jeden druh jsou použity pro druh příbuzný se nazývá „**crosspriming**“.

V rámci akvakultury je využitím mikrosatelitních markerů například možnost posouzení míry inbreedingu podle segregace allel několika mikrosatelitních lokusů, nebo posouzení příslušnosti jedince k linii či plemeni pomocí privátních allel, pokud ovšem takové allely byly detekovány a popsány. Vlastnosti a zejména využití mikrosatelitních markerů v rámci akvakultury a rybářství popsali **Wright a Benzen, (1994)**

2.1.6 IZOLACE MIKROSATELITNÍCH MARKERŮ

Standardním způsobem je screening genomové knihovny za účelem nalezení nových mikrosatelitů. Nově se k izolaci mikrosatelitních markerů používá metoda založená na principu hybridizace genomové knihovny se značenou sondou, tato metoda je založena na kombinaci několika základních metod molekulární biologie. Využívána je jak metoda PCR, hybridizace s biotinem značenou sondou a ligace takto značených fragmentů do vektoru. Postup izolace mikrosatelitních markerů velmi dobře popsal **Hammond a kol., 1998**.

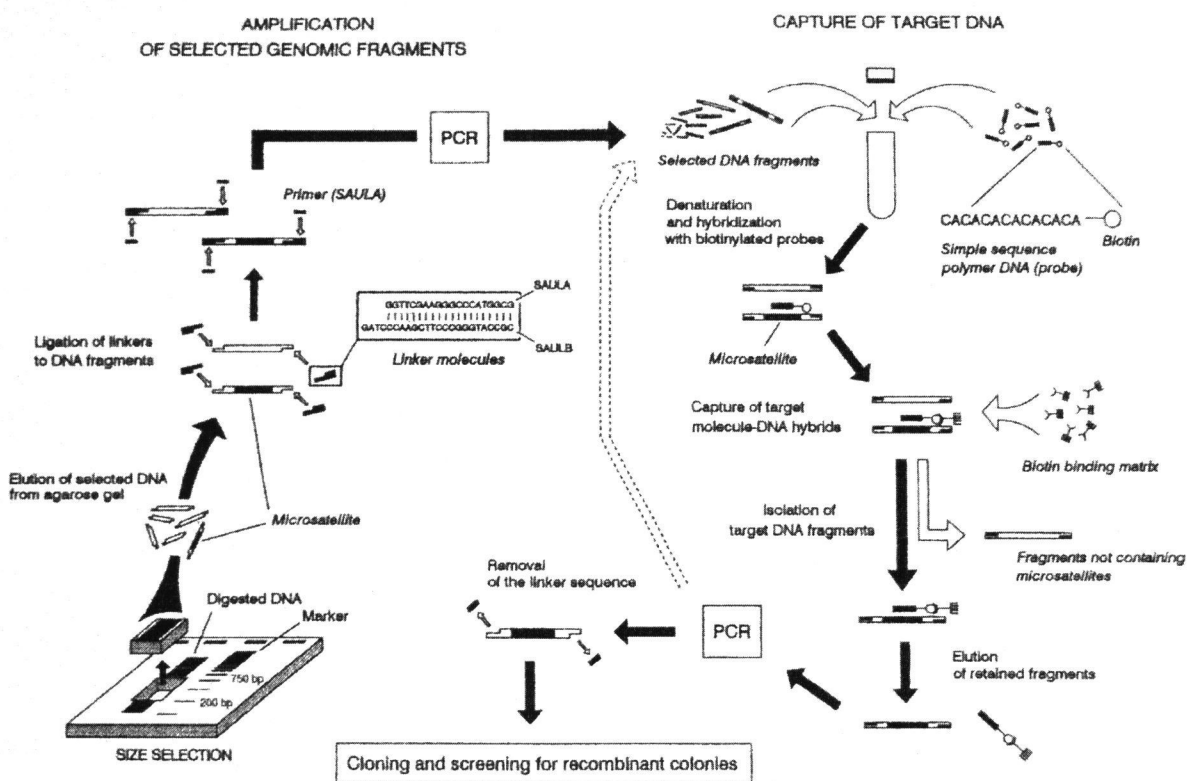


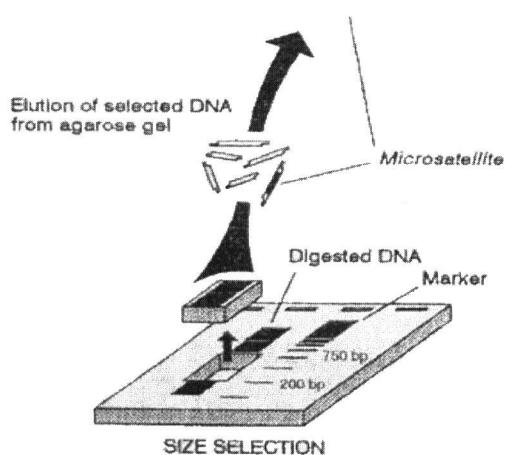
Fig. 15.1.1 Schematic of the steps required to create microsatellite enriched libraries.

Schéma vývoje mikrosatelitních markerů (Hammond a kol., 1998)

Pro izolaci mikrosatelitů je nutno aby standardní genomové knihovny dosáhly minimálně 5000 rekombinantů, jelikož množství rekombinantů obsahujících mikrosatelity obvykle dosahuje od 0,5 po 2%. Tradiční metody izolace mikrosatelitů spoléhají na screening obrovského počtu rekombinantů k tomu aby u některých z nich prokázaly přítomnost mikrosatelitu.

Metoda odhalení mikrosatelitu je kombinací PCR, hybridizace s biotinem značenou sondou, a následného „zachycení“ fragmentů bohatých na mikrosatelitních markery. Stejně jako v konvenčních metodách izolace mikrosatelitů, celá genomová DNA je nejprve vystavena působení enzymu - například *MboI*. Tento restriční enzym dosahuje nejvyšší počet fragmentů délky 300-750bp. Druhým krokem je ligace fragmentů k linkerům. Tyto linkery jsou vlastně přípravou fragmentu pro amplifikaci pomocí PCR, vytváří místa vhodná pro ligaci primerů, dovolující amplifikaci genomové DNA. Výsledné produkty amplifikace jsou pak hybridizovány s biotinem značenou sondou (např. CA, CAG, nebo AGAT opakování) a zachyceny pomocí biotin vázající matrice. Nehybridizující genomová DNA je odmyvána pryč sledem vysoce specifických mytí. Zbývající fragmenty, které jsou obohaceny mikrosatelitními markery jsou poté izolovány a amplifikovány v druhé PCR reakci. Následuje odstranění linkerových sekvencí, pozdější klonování, transformace, screening rekombinantů.

První krok práce zahrnuje přípravu genomové DNA k další práci, genomová DNA od několika jedinců – cca.10-20 jedinců podle **Hammonda (1998)**, u ryb se používají zejména gynogenetičtí jedinci a to z důvodů snazší identifikace allel. Několik jednotek enzymu a následná inkubace (podmínky závisí na použitém enzymu) vede k získání fragmentů o délce 300-750 bp. Právě tato délka se uvádí jako dostatečně dlouhá k tomu

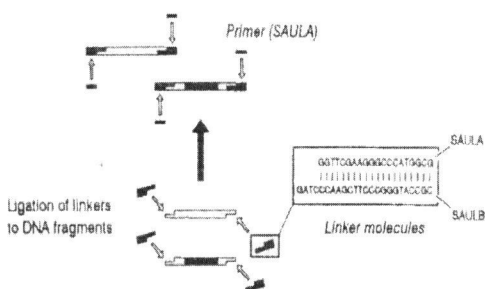


aby tato sekvence mohla obsahovat opakující se motiv mikrosatelitu včetně jeho lemujících oblastí, které jsou poté důležité pro konstrukci komplementárních primerů.

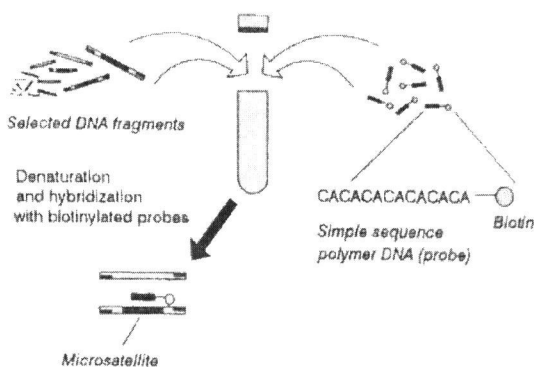
Po této inkubaci s enzymem je vzorek DNA nanesen na agarosový gel a elektroforeticky dělen a tím se vizualizuje množství fragmentů žádané délky 300-750bp. Fragmenty této délky jsou následně vyříznuty z gelu, uvolněny a pomocí

speciálního kitu vyčištěny od pozůstatků gelu a slouží k další práci.

Ligací jsou k těmto fragmentům přidány linkerové sekvence, specifické k restrikčním místům enzymu použitého v předešlém kroku. Tyto linkerové sekvence jsou komplementární k PCR primerům, jelikož po této ligaci linkerových sekvencí následují PCR ke zmnožení těchto fragmentů.

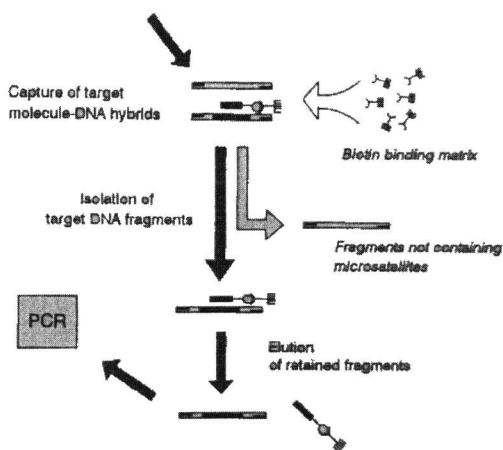


Množství fragmentů, získané po předchozí PCR je poté denaturováno, po dostatečně dlouhou dobu aby došlo o oddělení vláken dsDNA. Denaturovaná jednovláčková DNA je použita k hybridizaci se sondou, značenou biotinem.



Tato sonda obsahuje určitý specifický motiv – komplementární k motivu mikrosatelitu. Používá se buď jednoho druhu sondy, nebo i více různých motivů značené sondy.

Po úspěšné hybridizaci se sondou značený se fragment naváže k matrici a několikanásobným promytím se odstraní fragmenty u nichž hybridizace se sondou neproběhla. Značené fragmenty se použijí k další PCR reakci.



Jako nejvhodnější délka fragmentů pro další klonování se uvádí 200-1000 bp, fragmenty této délky by měly být taktéž dostatečně dlouhé k tomu aby obsahovaly mikrosatelitní motiv včetně lemujících sekvencí, které jsou důležité pro navržení a konstrukci odpovídajících primerů. Identifikace mikrosatelitních motivů včetně charakterizace úseků pro navržení primerů je zajištěna sekvenováním.

V posledních letech se mikrosatelity staly jedněmi z nejpůlárnějších molekulárních markerů s mnoha různými praktickými aplikacemi. Vysoká úroveň jejich polymorfismu je důvodem proč jsou používány v tolika různých studiích. **Zane (2002)** zdůrazňuje, že mikrosatelitní lokusy izolované v minulosti pro různé druhy organismů by v měly neustále procházet revizí a lokusy by měly být izolovány „*de novo*“ a primerové páry by měly být znovu navrženy tak aby byly zcela specifické a zajišťovaly vyšší čistotu amplifikátu. Ve svém přehledu uvádí řadu technik izolace mikrosatelitních lokusů založených na hybridizaci se značenou sondou.

2.1.7 IZOLACE MIKROSATELITNÍCH MARKERŮ PRO KAPRA

Mikrosatelitní markery pro kapra poprvé popsal **Crooijmans a kol. (1997)**, který na Wageningen Agricultural University izoloval tyto markery (CA typu) pomocí dříve popsané metody hybridizace se značenou sondou. Z čerstvé krve izoloval pomocí kitu geonomovou DNA ze které získal genovou knihovnu. Analyzoval přibližně 80 000 klonů značených pomocí oligonukleotidu (TG)₁₃ značeného [γ ³²P] ATP.

Sekvenování bylo prováděno pomocí Auto Read kitu (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) se standardními sekvenovacími primery na laserovém fluorescenčním sekvenátoru. Následně byly navrženy primerové páry k lokusům jež obsahovaly motiv (CA) nejméně v sedmi opakováních. Z každého primerového páru pro určitý lokus byl jeden značen fluorescenčním barvivem fluorprime (Pharmacia Biotech).

Takto navržené primery pro lokusy obsahující opakování motivu (CA) byly testovány na „test panelu“. Podstatou testování lokusů a pro ně navržených primerů bylo zjistit který z izolovaných lokusů je polymorfní. Sady primerů byly navrženy pro 41 sekvencí a poté testovány na osmi různých rybách, z těchto 41 se 32 markerů jeví jako polymorfních podle „test panelu“ složeného z několika jedinců kapra různého původu. Počet allel pro jednotlivý marker byl různý v rozmezí 2 – 7 s průměrem 4,7.

Pro testování polymorfismu bylo určeno složení a také podmínky programu polymerázové řetězové reakce (PCR) k amplifikaci mikrosatelitních lokusů. PCR byla realizována v celkovém objemu 12 μ l tak jak již dříve popsal **Crooijmans (1996)**. Program cycleru pro amplifikaci mikrosatelitních lokusů byl navržen takto: denaturace při 95°C po

5 min. a následovalo celkem 35 cyklů složených z denaturace při 95°C po dobu 30s, připojování primerů při 55°C nebo 50°C po 45s a prodlužování sekvence při 72°C po dobu 90s. Reakci zakončovala finální elongace při 72°C po dobu 10 min. Z takto získaného produktu PCR bylo 0,1 μl odebráno a smíšeno s 0,3 μl standardu Tamra-350 (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) a 3,0 μl 80% formamidu. Získaná směs byla dělena na 6% denaturujícím akrylamidovém gelu v automatickém sekvenátoru ABI 373 (Perkin Elmer). Pomocí standardu Tamra-350 byla určována délka amplifikovaných fragmentů.

Crooijmans v roce 1997 publikoval celkem 32 polymorfních mikrosatelitních lokusů označených jako MFW („Microsatelite-Fish-Wagenigen“) 1 – 32. Další lokusy publikovány nebyly, celkový počet lokusů izolovaných Crooijmansem byl ovšem vyšší – až 100 lokusů (**Kohlmann, ústní sdělení**).

Aliah a kol. (1999) izoloval další mikrosatelitní markery u kapra, k izolaci mikrosatelitních markerů použili několik jedinců Koi kapra. DNA byla izolována standardní fenol-chloroformovou metodou z krve. Stejně jako v předchozím případě, k nalezení mikrosatelitních opakování v genomové DNA bylo využito hybridizace fragmentů genomové knihovny se značenou sondou, v tomto případě (GT)₁₅. Nejprve však byla získána odpovídající genová knihovna, poté byly fragmenty použity k hybridizaci s touto sondou. Pozitivní klony byly osekvenovány tak aby k sekvencím lemujícím mikrosatelitní motiv bylo možno navrhnout odpovídající primery. Takto popsané lokusu byly nadále použity ke sledování dědičnosti mikrosatelitních motivů u několika skupin potomstva různých jedinců Koi a byl ověřován polymorfismus izolovaných mikrosatelitních opakování. Z celkem 30 izolovaných motivů se pouhé 3 jevily jako polymorfní.

Další mikrosatelitní motivy z genomové DNA Koi kapra izoloval **David a kol, (2001)**. Genomovou DNA získal z krve koi kapra (Showa) také použitím Puregene kitu (Gentra Systems, Minn, USA). Genomová knihovna byla zkonstruována pomocí pBluescript plazmidů, z genomové DNA byla získána genomová knihovna fragmentací. K další práci byly použity fragmenty o délce 0,5-0,7 kb. Fragmenty byly použity k hybridizaci se značenými sondami – tentokrát motivy (GT)₁₂ a (GA)₁₂ značené ³²P. Pozitivně reagující plazmidy byly použity k izolaci DNA a poté prošly sekvenováním na ABI Prism 377 DNA sekvenátoru (Perkin Elmer, USA). Primery byly navrženy k sekvencím lemujícím mikrosatelitní motiv, nejméně v délce 16 bp. Screeningu bylo

podrobeno i 40 známých sekvencí z GenBank, mezi nimi bylo nalezeno 12 mikrosatelitních motivů. Izolovány byly lokusy s motivem dokonalým i smíšeným, celkem bylo izolováno 47 nových lokusů. Mikrosatelitní lokusy tvoří podle **Davida (2001)** asi 0,6% celkové genomové DNA kapra.

Dalších 36 mirosatelitů v genomu kapra identifikoval **Yue a kol., (2004)**. K nalezení nových mikrosatelitních lokusů byly softwarovým screeningem prohledávány sekvence genomové DNA kapra uložené v GenBank. Hledány byly dvou a třínukleotidové tandemové repetice vyskytující se v EST sekvencích uložených v GenBank. Zároveň byla zkonstruována genomová DNA knihovna obsahující CA repetice zmnožena pomocí reversních primerů a poté byly sekvence v délkách od 250bp po 1000bp osekvenovány (ABI 3700, Applied Biosystems) a k repetitivním sekvencím byly navrženy primerové páry. Z cDNA knihovny získané izolací z testes byly po sekvenování podrobeny softwarovým screeningem EST sekvence obsahující repetitivní motiv.

Z nově izolovaných mikrosatelitních lokusů se za základě testovacího panelu (18 jedinců, 3 odlišné skupiny) jevílo 34 lokusů jako polymorfních, čtyři z primerových párů však při PCR amplifikovaly produkt dvou různých lokusů. Publikována byla charakteristika všech nově izolovaných mikrosatelitních markerů, včetně souboru 21 mikrosatelitních markerů doporučených pro druh *C. carpio*.

2.1.8 PŘEHLED PRACÍ VYUŽÍVAJÍCÍCH MIKROSATELITNÍ MARKERY PRO KAPRA

Tabulka: Přehled prací využívajících mikrosatelitní markery pro kapra

Kolektiv autorů:	Zdroj:	Titulek publikace:
Kohlmann, Kersten, Flajšhans	AQUACULTURE 247 (1-4): 253-266 JUN 30 2005	Micro satellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.) populations
Lehoczky I, Jeneý Z, Magyary I, Hancz C, Kohlmann K	AQUACULTURE 247 (1-4): 45-49 JUN 30 2005	Preliminary data on genetic variability and purity of common carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.) strains kept at the live gene bank at Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation (HAKI) Szarvas, Hungary
Grobler JR, Kotze A, Swart H, Hallerman EM	SOUTH AFRICAN JOURNAL OF SCIENCE 101 (1-2): 19-21 JAN-FEB 2005	The application of microsatellite DNA markers for forensic analysis of koi carp (<i>Cyprinus carpio</i>)
Lehoczky I, Magyary I, Hancz C, Weiss S	HYDROBIOLOGIA 533: 223-228 JAN 15 2005	Preliminary studies on the genetic variability of six Hungarian common carp strains using microsatellite DNA markers
Yan JP, Liu SJ, Sun YD, et al.	AQUACULTURE 243 (1-4): 49-60 JAN 3 2005	RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (<i>Carassius auratus</i>) x common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)
Zhou J, Wu Q, Wang Z, et al.	RUSSIAN JOURNAL OF GENETICS 40 (10): 1144-1148 OCT 2004	Genetic variation analysis within and among six varieties of common carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.) in china using microsatellite markers
Sun XW, Liang LQ	AQUACULTURE 238 (1-4): 165-172 SEP 1 2004	A genetic linkage map of common carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.) And mapping of a locus associated with cold tolerance
Vandeputte M, Kocour M, Mauger S, et al.	AQUACULTURE 235 (1-4): 223-236 JUN 1 2004	Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.)

Yue GH, Ho MY, Orban L, Komen J	AQUACULTURE 234 (1-4): 85-98 MAY 3 2004	Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp
Kohlmann K, Gross R, Murakaeva A, et al.	AQUATIC LIVING RESOURCES 16 (5): 421-431 OCT 2003	Genetic variability and structure of common carp (<i>Cyprinus carpio</i>) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers
David L, Blum S, Feldman MW, Lavi U, Hillel J	MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION 20 (9): 1425-1434 SEP 2003	Recent duplication of the, common carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci
Bartfai R, Egedi S, Yue GH, et al.	AQUACULTURE 219 (1-4): 157- 167 APR 2 2003	Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers
Tong J, Wang Z, Yu X, et al.	MOLECULAR ECOLOGY NOTES 2 (3): 245-247 SEP 2002	Cross-species amplification in silver carp and bighead carp with microsatellite primers of common carp
David L, Rajasekaran P, Fang J, et al.	MOLECULAR GENETICS AND GENOMICS 266 (3): 353-362 NOV 2001	Polymorphism in ornamental and common carp strains (<i>Cyprinus carpio</i> L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers
Tanck MWT, Palstra AP, van de Weerd M, et al.	GENOME 44 (5): 743-751 OCT 2001	Segregation of microsatellite alleles and residual heterozygosity at single loci in homozygous androgenetic common carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.)
Desvignes JF, Laroche J, Durand JD, et al.	AQUACULTURE 194 (3-4): 291- 301 MAR 15 2001	Genetic variability in reared stocks of common carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.) based on allozymes and microsatellites
Tanck MWT, Baars HCA, Kohlmann K, et al.	AQUACULTURE RESEARCH 31 (10): 779-783 OCT 2000	Genetic characterization of wild Dutch common carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.)
Aliah RS, Takagi M, Dong S, et al.	FISHERIES SCIENCE 65 (2): 235- 239 APR 1999	Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp <i>Cyprinus carpio</i>
Crooijmans RPMA, Bierbooms VAF, Komen J, et al.	ANIMAL GENETICS 28 (2): 129- 134 APR 1997	Microsatellite markers in common carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.)

První ze studií s použitím dříve izolovaných mikrosatelitních markerů publikoval **Tanck a kol., (1999)**. Mikrosatelitní markery společně s markery allozymovými použil ke studiu místní populace kapra vyskytující se v regionu nazývaném Anna Paulowna Polder v Nizozemí (dále *AP*). V této oblasti se vyskytují ryby s odlišným fenotypem, ryby s torpedovitým tvarem těla, podobné rybám pocházejícím z Rýna. Účelem práce Tancka bylo zjistit jestli ryby z tohoto regionu jsou původní „divokou“ a samostatně se rozmnožující populací nebo jestli se jedná o hybridy mezi „divokými“ a domestikovanými rybami. Frekvence allel zjištěná u této populace byla porovnávána s frekvencí allel šesti domestikovaných plemen kapra získaných z chovů. Odchycené ryby, zástupci populace *AP*, nepoužil Tanck k dalším analýzám přímo ale bylo vytvořeno F1 potomstvo s využitím jikernačky inbrední linie (homozygotní) a šesti odchycených mlíčáků *AP*. Genotypy šesti mlíčáků použitých k vytvoření potomstva tak byly určovány zpětně podle genotypů jejich potomstva a tyto hodnoty byly použity ke kalkulaci allelických frekvencí a také určení genetické vzdálenosti *F_{st}*.

Genomová DNA byla získána z plné krve, použitím Puregene DNA kitu (Gentra systems Inc, NC, USA). Z potomstva každého z *AP* mlíčáků bylo odebráno deset jedinců, aby bylo možno určit genotypy mlíčáků použitých k reprodukci. Z domestikovaných populací linií *Dor-70*, *R3*, *R8*, *W*, *E4* a *E5* bylo použito po jednom zástupci.

Fragmenty DNA jednotlivých lokusů byly získány pomocí PCR za podmínek které popsal a které také použil pro testování izolace mikrosatelitních lokusů pro kapra **Crooijmans a kol., (1997)**. Určování délek amplifikovaných fragmentů byla zjišťována pomocí automatického sekvenátoru ABI 373 (Perkin Elmer) na 6% denaturujícím akrylamidovém gelu. Jelikož bylo vždy analyzováno několik lokusů zároveň v multiplexech, bylo předtím pro amplifikaci pomocí PCR zvoleno odlišného značení primerů. V některých multiplexech tak byly analyzovány až 4 lokusy zároveň, celkem bylo sledováno 28 lokusů. Na základě analýzy mikrosatelitů bylo zjišťováno procentuální zastoupení polymorfních lokusů u všech domestikovaných linií a u odchycených jedinců *AP*. Procentuální zastoupení polymorfních lokusů domestikovaných plemen a skupiny odchycených ryb *AP* nebylo signifikantně odlišné, stejně tak průměrný počet allel na lokus nebyl výrazně odlišný, ovšem jedinci *AP* ve svých genotypech vykazovali „privátní allely“ nezjištěné u domestikovaných

linií. Genetická vzdálenost F_{ST} (Nei, 1978) mezi odchycenými jedinci a domestikovanými liniemi činila 0,25.

Desvignes a kol. (2001) použil ve své práci zároveň mikrosatelitních markerů a allozymových markerů. Cílem jeho práce bylo určení genetické variability francouzských plemen Dombes (**DO1, DO2, DO3 a DO4**) a Forez (**FO1, FO2, FO3**) a srovnání s pěti liniemi získanými z VÚRH Vodňany a zároveň vzájemné porovnání těchto dvou typů markerů. Vzorky z VÚRH Vodňany se skládaly ze zástupců z hybridních linií **CZ1-ML/R*M4, CZ2-M72*M/A, CZ3-M72*15, CZ4-M72** a zástupců plemene Ropsha..

Jedinci uvedených plemen byli usmrceni, pro potřeby analýzy allozymů byly odebrány vzorky jater a svaloviny, zatímco pro analýzu mikrosatelitních markerů se jednalo pouze o šupiny a ploutevní ústřížky. Analýza allozymů se prováděla u všech linií a v 31 lokusech, zatímco analýza mikrosatelitů se prováděla jen u **DO3, DO4, FO3** a všech linií „českých“ a to v celkem pěti lokusech. Genomová DNA pro analýzu mikrosatelitů byla získána z „fin clipů“ za použití DNAeasy Tissue Kitu (QIAGEN). Sledovány byly čtyři lokusy popsané pro kapra **MFW7, MFW13, MFW16 a MFW26** (Crooijmans, 1997) a jeden z lokusů popsaných pro karasa **GF29** (Zheng a kol., 1995). PCR mikrosatelitní DNA byla realizována v cykleru Pekin-Elmer Cetus 9600. Reakce v celkovém objemu 25 μ a podmínky amplifikace se výrazně nelišily od těch které popsal Crooijmans (1997). PCR produkt byl elektroforeticky dělen pomocí Pharmacia ALFexpress (Pharmacia Biotech) DNA sekvenátoru na denaturujícím polyakrylamidovém gelu.

Heterozygotnost určená na základě analýzy 31 allozymových markerů byla znatelně nižší pro francouzské linie kapra a stejně tak procentuelní zastoupení polymorfních lokusů bylo nižší pro linie francouzské ve srovnání s českými. Allelické frekvence z analýzy mikrosatelitních markerů a zjištěná heterozygotnost nevykazovala žádné signifikantní rozdíly mezi francouzskými a českými liniemi.

Další aplikací mikrosatelitních markerů byla detekce úspěšnosti androgeneze. **Tanck a kol. (2001)** použili mikrosatelitních markerů k tomu aby celkem u 33 různých androgenetických populací zjišťovali pomocí segregace allel v 11 mikrosatelitních lokusech úspěšnost androgeneze. Cílem práce bylo jednak určit úspěšnost androgeneze pomocí

homozygotnosti potomstva ve sledovaných mikrosatelitních lokusech, zjistit segregaci allel a také naleznout nějaké souvislosti mikrosatelitních allel s fenotypovými znaky. Jelikož díky androgenetickému vzniku potomstva byla předpokládána homozygotnost téměř všech sledovaných jedinců, PCR všech sledovaných lokusů probíhala v jednom „multiplexu“ tj. reakce obsahovala primery pro všech jedenáct lokusů. Předpokládaná homozygotnost androgenetického potomstva by totiž měla být výrazným ulehčením v identifikaci allel pomocí sekvenátoru. DNA byla izolována pomocí Puregene DNA isolation kitu (Gentra Systems, USA). PCR probíhala tedy v jednom „multiplexu“, za podmínek které popsal **Crooijmans a kol, (1997)**. Sledovány byly lokusy **MFW 1, 2, 9, 28 (Crooijmans a kol., 1997)** a lokusy **MFW 35, 40, 46, 48, 50, 59 a 71 (Crooijmans, nepublikováno)**.

Určování délky zajišťovalo sekvenování na ABI 373 sekvenátoru (Perkin Elmer, USA). Celkem u 566 jedinců z 33 androgenetických populací bylo prokázáno 92% jedinců homozygotních ve všech sledovaných lokusech, zbylých 8% - tj. 47 jedinců bylo v některém z lokusů heterozygotních.

David a kol. (2001) izoloval další mikrosatelitní markery pro kapra a to celkem 47 nových lokusů. K izolaci použil krve Koi kapra (*C.c.haematopterus*). Cílem studie bylo zjištění segregace allel u několika linií Koi kapra a srovnání s dalšími liniemi kapra a albinotickou linií amura (*Ctenopharyngodon idella*). **Kohlman a Kersten, (1999)** pomocí allozymových markerů prokázali že Koi kapři jsou geneticky vzdálenější od běžných linií než jednotlivé linie samy mezi sebou. Cílem práce bylo toto tvrzení potvrdit nebo vyvrátit a to na základě analýzy pomocí AFLP a nebo mikrosatelitních markerů.

DNA byla získána izolací z krve jednoho jedince Koi kapra (Showa) pomocí Puregene kitu (Gentra Systems, Minneapolis, USA). Genomová knihovna byla zkonstruována pomocí pBluescript plazmidů, z genomové DNA byla získána genomová knihovna fragmentací pomocí restriktáz. K další práci byly použity fragmenty o délce 0,5-0,7 kb. Fragmenty byly použity k hybridizaci se značenými sondami – **(GT)₁₂** a **(GA)₁₂** značenými ³²P. Pozitivně reagující plazmidy byly použity k izolaci DNA a poté prošly sekvenací na ABI Prism 377 DNA sekvenátoru (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA). Primery byly navrženy k sekvencím lemujícím mikrosatelitní motiv a to nejméně v délce 16 bp. Segregace allel byla

sledována u 43 lokusů, analýze bylo podrobena 9 různých jedinců – White Koi, Black Koi, Kohaku, Sanke, Showa, albinotický amur, Dor-70, jugoslávský kapr a komerční hybrid

Tong a kol. (2002) využili markerů pro kapra k tzv. crossprimingu. Primery navržené k mikrosatelitním motivům kapra (*C. carpio*) použili pro tolstolobika (*H. molitrix*) a tolstolobce (*A. nobilis*). Crosspriming je možný u blízce příbuzných druhů a jelikož izolace vlastních mikrosatelitních motivů z genomu tolstolobika nebo tolstolobce nebyla dosud provedena, byla zkoušena možnost použití několika markerů izolovaných původně pro kapra (**Crooijmans, 1997**). Všechny tři druhy náleží do stejné čeledi *Cyprinidae*, ovšem zatímco kapr spadá do podčeledi *Cyprininae*, tolstolobik a tolstolobec jsou zástupci z podčeledi *Hypophthalmichthyinae*.

DNA byla izolována standartní fenol-chloroformovou metodou (**Taggart a kol, 1992**) z ploutevnických ústřížků deseti jedinců každého druhu odchycených na dvou různých lokalitách řeky Yangtze. Pokus o amplifikaci byl prováděn s 18 lokusy, PCR probíhala v celkovém objemu 25 μ l. Složení bylo následující – 20-100ng genomové DNA, 1xPCR buffer (10mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5mM MgCl₂, 50mM KCL), 120 μ M dNTPs, 0,15 μ M každého z primerů, 1 U Taq polymerázy (BioStar). Amplifikace byla prováděna v MJ termocykleru a skládala se z 35-38 cyklů denaturace po 40s při 94 C, 45s při doporučené teplotě annealingu a 50s při 72 C. Těmto cyklům ovšem předcházela počáteční denaturace – 5 minut při 94 C a naopak její uzavírala finální extenze při 72 C po 10 minut. 5 μ l PCR produktu bylo děleno na 6% nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu při 200 V po dobu 2,5 hodiny za použití 1xTBE bufferu v gelu i zásobníku, gel byl následně barven 0,5 μ g/l ethidium bromidem a poté vizualizován UV světlem. Velikost mikrosatelitních allel byla zjišťována porovnáváním s 20bp DNA ladderem, exponováním gelu pod UV světlem na fotografický film.

Z 18 párů SSR primerů pro lokusy **MFW 1,2,4,5,7,8,11,13,17,19, 20,24,25,26, 27,28,30** čtyři primerové páry – **MFW 4,11,26,30** při amplifikaci produkovaly velmi slabé a tím pádem v akrylamidovém gelu neanalyzovatelné pruhy. 7 primerových párů pro mikrosatelitní lokusy kapra při amplifikaci neprodukovalo žádný produkt – **MFW 2,7,8,12,13,25,27**. Nicméně, 7 párů (38,9%), respektive 6 párů (33,3%) poskytovalo kvalitní produkty u tolstolobika a tolstolobce.

Bártfai a kol. (2003) publikovali studii dvou maďarských linií kapra pomocí mikrosatelitních markerů. Linie Attala a Dinnyes byly porovnávány s ostatními liniemi - Boszormeny, Tata, Bikal, Szajol a několika jedinci získanými odchylem z volných vod. K získání DNA byla použita standardní fenol-chloroformová metoda (**Sambrook a kol, 1989**) a DNA byla izolována z „fin clipů“. Analýza probíhala u lokusů **MFW 4, 7, 9, 13, 17, 20, 26 a 31**. V jedné reakci byl amplifikován jeden z duplexů **MFW 7/9, MFW 4/31**. PCR byla realizována v celkovém objemu 10 μ l s 1xPCR bufferem, 200 μ M dNTP mixu, 200nM každého z primerů, 2mM MgCl₂, 40 ng templátu a 0,25 U Taq polymerázy (Promega). Cyklus PCR byl odlišný od podmínek popsaných Crooijmansem, skládal se z počáteční denaturace po 5 minut při 95°C, poté deseti cyklů denaturace při 94°C po 20s, 30s při 63°C a 20s při 72°C. Po proběhnutí těchto deseti cyklů následovalo dalších 25 cyklů složených z 20s při 94°C, 30s při 53°C a 20s při 72°C. Závěrečná elongace probíhala 7 minut při 72°C.

Dělení fragmentů probíhalo na denaturujícím polyakrylamidovém gelu, produkt amplifikace byl nejprve denaturován při 96°C a poté bylo 8 μ l vloženo do akrylamidu obsahujícího 6M močoviny. Elektroforetické dělení probíhalo jako „delayed double duplex“ tj. do jedné dráhy v gelu byl nejprve nanesen jeden z duplexů a poté co dostatečně vymigroval byl nanesen druhý duplex, tím pádem jedna dráha dovolovala dělení čtyřech lokusů překrývajících se v délce allel. Pokud i přesto došlo k tomu že se jednotlivé lokusy nebylo možno dělit společně, byly mikrosatelitní lokusy znovu amplifikovány a znovu děleny, tentokrát už samostatně. Barvení akrylamidových gelů probíhalo pomocí stříbra tzv. „silver staining“. Gely byly vyhodnocovány tak že byly určeny allely stejné délky a poté bylo z každé skupiny allel stejné délky několik PCR produktů analyzováno pomocí sekvenátoru ABI 377 (Perkin Elmer) s použitím standardu Tamra - GS-500. Z analýzy mikrosatelitních markerů byla vyhodnocována heterozygotnost, počet allel, přítomnost privátních allel, frekvence allel a shoda s Hardy-Weinbergovým zákonem. Společně a analýzou mikrosatelitů probíhala i RAPD s několika typy primerů, k porovnání výsledků s analýzou mikrosatelitních markerů

Analýzováno bylo celkem 80 jedinců linie Attala, 196 linie Dinnyes, 96 jedinců několika dalších linií a 8 jedinců získaných odchylem. Frekvence výskytu privátních allel byla velmi nízká, ale v každé ze skupin byla prokázána existence tří privátních allel, pouze linie Attala vykazovala v rámci čtyřech lokusů jen jedinou privátní allelu. Mezi heterozygotností sledovaných linií Attala a Dinnyes nebyl prokázán signifikantní rozdíl. Dendrogramy

genetických vzdáleností byly velmi podobné pro obě dvě techniky – analýzu mikrosatelitních markerů a RAPD.

Segregace allel mikrosatelitních lokusů byla sledována ve čtyřech skupinách potomstva, F2 generace vzniklé reprodukcí umělou reprodukcí čtyřech jedinců (**David a kol., 2003**). Cílem bylo ověřit ploidní úroveň kapra, event. možnost že genomová DNA prošla během evoluce druhu *C. carpio* duplikací. Sledováno bylo 53 mikrosatelitních markerů (MFW, CCA, Koi) u dvou vzniklých skupin F2 potomstva, pro zbylé dvě skupiny bylo navíc použito dalších šest markerů. Nejprve byly genotypovány generační ryby a poté byla ověřována segregace allel u potomstva. PCR produkty pro genotypizaci potomstva byly značeny ³²P a poté děleny na 6% akrylamidu.

Z 59 párů primerů pro mikrosatelitní lokusy, 6 párů primerů amplifikovalo jediný produkt (10%). Dalších 21 primerových párů amplifikovalo produkty 2 (36%) a 31 párů amplifikovalo 2 a více produktů (54%). Celkem v 86% sledovaných případů segregace allel v F2 generaci by pak nasvědčovalo duplikaci původních lokusů.

Kohlmann a kol. (2003) analýze mikrosatelitních markerů podrobil do té doby největší počet různých populací kapra. K dispozici byly vzorky celkem 31 populací, z nichž 23 populací bylo podrobeno analýze allozymových markerů, 11 populací analýze mikrosatelitních markerů a 21 populací bylo podrobeno analýze mitochondriální DNA. Kolekce vzorků z Evropy, Střední Asie a Jižní a Jihovýchodní Asie byly zastoupeny v každém z typů analýzy.

Mitochondriální DNA byla porovnávána hlavně z toho důvodu aby potvrdila nebo vyvrátila domněnky a úvahy o samostatném statutu *C. c. aralensis* pro kapra z oblasti Střední Asie. Allozymové markery a mikrosatelitní markery byly sledovány k určení rozdílů mezi domestikovanými populacemi a jedinci získanými odchytom z volných vod a také k určení rozdílů mezi jednotlivými populacemi pomocí těchto dvou typů markerů a určení které z nich zobrazuje lépe variabilitu jednotlivých linií. Pomocí allozymových markerů bylo sledováno osm enzymatických systémů (22 lokusů), z mikrosatelitních markerů byly sledovány **MFW1, MFW6, MFW7 a MFW28**. Amplifikace těchto lokusů byla prováděna tak jak ji popsal **Crooijmans a kol., 1997**. Jeden z primerových párů daného lokusu byl fluorescenčně

značen, analýza délek amplifikovaných úseků DNA probíhala pomocí sekvenátoru ABI 310. Mitochondriální DNA byla podrobována analýze úseků ND-3/4 a ND-5/6 pomocí PCR-RFLP, podle metodiky kterou už předtím použil **Gross a kol., 2002**.

Výsledkem analýzy 22 allozymových lokusů bylo zjištěno průměrně 1,06-1,81 allel na každý z lokusů, 6,2-43,8% polymorfních lokusů. Variabilita hodnocená podle počtu allel a heterozygotnosti byla nejvyšší u populací z východní a jihovýchodní Asie.

Mikrosatelitní lokusy zobrazovaly daleko vyšší variabilitu než allozymové markery, průměrný počet allel na lokus byl od 2,5 až po 14. Variabilita hodnocená podle počtu allel a heterozygotnosti (allelic richness) byla vyšší u populací z Evropy a střední Asie. Na základě dat analýzy allozymových markerů a mikrosatelitů byly určeny genetické vzdálenosti jednotlivých populací. PCR-RFLP s pomocí 10 restričních enzymů zobrazila deset haplotypů, největší variabilitu (podle počtu haplotypů) bylo zjištěno u populací ze střední Asie, Číny a Vietnamu. V konečném součtu všech použitých metod byly nalezeny dvě znatelně odlišné skupiny, jedna z nich zahrnuje populace z Evropy a střední Asie, druhá populace z jižní a jihovýchodní Asie.

Mikrosatelity izolované pro kapra byly také použity ke studiu karasa stříbřitého (*Carassius auratus gibelio*), **Yue a kol., 2004**. Celkem 36 nových mikrosatelitních lokusů bylo nalezeno screeningem sekvencí genomové DNA kapra uložených v GenBank, cDNA izolované z testes kapra a genomové DNA kapra. Na testovacím panelu složeném z 18ti jedinců kapra byl následně testován polymorfismus jednotlivých lokusů, všechny lokusy vyjma dvou se jely jako polymorfní s průměrným počtem 7,3 allel na lokus (od 2 po 15 allel). Amplifikace stejných lokusů u karasa (*Carassius auratus gibelio*) byla úspěšná v 41,7% případů použití jednotlivých primerových párů. Vyšší úspěšnost amplifikace byla u mikrosatelitních lokusů izolovaných a charakterizovaných z genomové DNA kapra (62,8%) oproti mikrosatelitním motivům získaným z EST sekvencí cDNA. Úspěšně amplifikované lokusy se tak jeví jako vhodné například pro studium reprodukčních strategií karasa. **Yue (2004)** popsal sadu 34 nových polymorfních lokusů a odpovídajících primerových párů pro studium genetické diverzity kapra, 15 z nich se poté při crossprimingu úspěšně amplifikovalo u karasa.

Jako nástroje k určení paternity v práci zaměřené na určení koeficientu heritability růstových vlastností (délky, hmotnosti, Fultonova koeficientu) použil analýzu mikrosatelitních markerů **Vandeputte a kol., (2004)**. Určení rodičovství bylo prováděno u ryb pocházejících z křížení 10 jikernaček a 24 mlíčáků, celkem u 550 jedinců a to pomocí 8 mikrosatelitních markerů **MFW 16, MFW26, MFW7, MFW11, MFW18, MFW9, MFW3 a MFW20**. PCR podmínky byly obdobné těm které popsány Crooimansem, určování délek amplifikovaných fragmentů probíhalo na denaturujícím akrylamidovém gelu.

Pomocí 272 molekulárních markerů, z nichž 110 byly mikrosatelitní markery, byla sestrojena „linkage map“ kapra (**Sun a Liang, 2004**). Tato sada molekulárních markerů byla sledována u 46 haploidních gynogenetických jedinců a poté bylo zpětně porovnáváním s genotypy ryb z minulé generace určovány „linkage groups“ jednotlivých markerů. Jako markery byly použity jednak genové markery (celkem 105), mikrosatelitní markery (110) a RAPD markery (57). Sada mikrosatelitních markerů se skládala z 26 lokusů izolovaných pro kapra (**Crooijmans a kol., 1997**), 19 lokusů izolovaných pro karasa (**Ohara a kol., 1999**) a 65 lokusů pro zebřičku *Danio reiro* (**Knapik a kol., 1998**). Porovnáváním genotypů haploidního potomstva s genotypy ryb o generaci zpět bylo softwarově zjištěno 50 „linkage groups“ odpovídajících 50ti chromozomům druhu *Cyprinus carpio*.

Zároveň byl také sledován gen pro rezistenci vůči chladu, jehož přítomnost byla předpokládána u kapra *C.c. haematopterus* a který by měl chybět u kapra „Boshi carp“ *C. pellegrini pellegrini*. Hybridi těchto dvou druhů byli vystaveni podmínkám vyhovujícím pouze jedincům odolným vůči chladu, u ryb přežívajících byl předpokládán gen pro odolnost vůči chladu, u ryb které tyto podmínky nepřežily Sun a Liang předpokládali absenci tohoto genu. Následnou RAPD genomové DNA byl zjištěn odlišný genotyp obou skupin potomstva, gen pro odolnost vůči chladu byl zařazen do jedné z „linkage groups“ LG5.

K určení genetické variability šesti různých linií kapra použil mikrosatelitní markery **Zhou a kol., (2004)**. Pět linií čínských a jedna introdukovaná z Ruska byly podrobeny analýze mikrosatelitních lokusů **MFW1, MFW2, MFW5, MFW18 a MFW30**. Izolace genomové DNA z ústřížků ploutví standardní fenol-chloroformovou metodou (**Sambrook a kol., 1989**). PCR byla realizována v celkovém objemu 25 μ l (100 μ mol/l dNTPs, 0,2 μ mol/l každého

z primerů, 1xPCR buffer, 1 U polymerázy), teplotní podmínky: iniciační denaturace 94°C, 40 cyklů – denaturace 94 °C po 30s, 30s při teplotě annealingu specifické pro každý z lokusů, elongace při 72 °C po 60s, finální extenze při 72°C po 10 minut. Genotypy byly určeny po dělení PCR produktu na 8% akrylamidu.

Zjištěn byl vysoký polymorfismus všech sledovaných lokusů, zjištěno u pěti lokusů od 4 až po 13 allel. Zhou předpokládá existenci dvou amplifikovaných lokusů u markeru MFW1, přičemž se odvolává na teorii evoluce genomu z tetraploidní úrovně.

Pomocí mikrosatelitních markerů byla studována genetická variabilita šesti maďarských plemen kapra (**Lehoczky a kol., 2005a**). Genetická variabilita byla posuzována pomocí dvanácti mikrosatelitních lokusů – **MFW3, MFW6, MFW7, MFW9, MFW10, MFW12, MFW13, MFW14, MFW16, MFW23, MFW29** a **CCA21 (Crooijmans a kol., 1997, Aliah a kol., 1999)**. Variabilita byla studována u šesti linií kapra, 3 domestikovaných (Tata, Biharugrai, Szarvasi), dvou divokých (Tiszai a Dunai) a jedné získané odchtem z volné vody (Kis-Balaton). Genomová DNA byla extrahována z fin clipů, PCR probíhala za standardních podmínek v celkovém objemu 10μl. Délky amplifikovaných fragmentů byly určovány dělením na 7% denaturujícím polyakrylamidu a posouzením vůči 2-bp standardu.

V rámci zkoumaných 12 lokusů bylo u těchto linií nalezeno 26 privátních allel, v rámci linií bylo zjištěno od 3,9 po 8,2 allel na lokus. Z celkem 168 zkoumaných jedinců napříč všemi skupinami, 152 jedinců se podařilo zpětně přiřadit k populaci na základě segregace allel mikrosatelitních lokusů. Takto vysoká úspěšnost byla velkým počtem detekovaných privátních allel, vyšší úspěšnost zařazení jedinců byla u divokých ryb.

Charakteristiku 31 linií kapra chovaných v živé genové bance HAKI Szarvas a také dvou divokých linií popsal **Lehoczky a kol., (2005b)**. K tomu bylo použito jednak mikrosatelitních markerů – **MFW1, MFW6, MFW7** a **MFW28** a pak také mitochondriální DNA – lokusy NADH-3,4 a NADH-5,6. Pomocí mtDNA byla vyloučena přítomnost hybridů s *C.c.haematopterus*, všechny ryby analyzované ryby byly evropského haplotypu. 31 linií kapra bylo podrobena analýze mikrosatelitních markerů MFW1, MFW6, MFW7 a MFW28, z toho 18 maďarských linií a 13 linií pocházejících ze střední nebo východní Evropy a Asie (chovaných v HAKI Szarvas). Genotypizace mikrosatelitních lokusů probíhala pomocí PCR

se značeným primerovým párem, podmínky PCR byly následující: 2min. denuraci při 94°C, a 35 cyklů složených z 40s při 94°C, 50s při 55°C a 90s při 72°C, finální extenze při 72°C. Analýza amplifikovaných fragmentů probíhala na sekvenátoru ABI 310 (Applied Biosystems). Z dat získaných analýzou byly určovány hodnoty zjištěné heterozygotnosti, genetické vzdálenosti jednotlivých linií F_{ST} . Nejvyšší variabilitu mikrosatelitů vykazovaly ryby odchycené z volných vod, označené jako linie Tiszai a Dunai.

Genetická variabilita různých populací kapra byla studována s využitím mikrosatelitních markerů **MFW1**, **MFW6**, **MFW7** a **MFW28**, sledovány byly populace z Evropy (celkem 14), střední Asie (4) a jihovýchodní Asie (4) s cílem zjistit diferenciaci takových populací (**Kohlman a kol., 2005**). Cílem bylo také ověřit mikrotaxonomické členění druhu *C. carpio*, založené na morfologických rozdílech (**Kirpitchenkov, 1967**). Celkem tedy 22 populací a z každé z nich kolem 30 jedinců (kulturních plemen, v zajetí chovaných nebo odchycených populací) bylo podrobena studiu variability čtyřech mikrosatelitních lokusů. PCR amplifikace byla prováděna se značenými primerovými páry za standardních podmínek a určování délek fragmentů probíhalo na sekvenátoru ABI 310 (Applied Biosystems). U celkem 577 analyzovaných jedinců těchto 22ti populací bylo nalezeno od průměrně 2,5 allele na lokus u Amurského sazana až po 14,25 allele pro jednu ze středoasijských populací. Určována byla variabilita uvnitř jednotlivých populací a stejně tak genetická vzdálenost jednotlivých populací F_{ST} . Co se týče privátních allele, nejvyšší počet privátních allele vykazovaly populace z jižní a jihovýchodní Asie a stejně tak nejvyšší genetickou variabilitu jednotlivých populací vykazovaly populace z jižní a jihovýchodní Asie. Genetické vzdálenosti byly určovány jednak mezi skupinami populací s odlišných geografických regionů, stejně tak mezi jednotlivými populacemi. Nejnižší diferenciaci jednotlivých populací byla zjištěna u ryb ze střední Asie. Na základě porovnání jednotlivých geografických oblastí byla zjištěna nižší vzdálenost mezi evropskými a středoasijskými populacemi, oproti těm jiho- a východoasijským.

Přehled prací využívající mikrosatelitní markery pro kapra zahrnuje aplikace kde mikrosatelitní markery sloužily k ověření úspěšnosti gynogeneze, určení paternity a nebo kdy byly primery pro druh *C. carpio* využity k „crossprimingu“. V případě ostatních publikací

(kdy mikrosatelitní markery sloužily k určování genetické variability nebo vzdálenosti jednotlivých populací) nejsou v tomto přehledu publikovány konkrétní údaje určující variabilitu jednotlivých plemen nebo populací. To především z toho důvodu, že každý z autorů nebo resp. každý tým autorů využívá odlišné markery a i rozsah jednotlivých prací co se týče počtu analyzovaných jedinců je velmi různý. Určení struktury populací z analýzy mikrosatelitních markerů závisí jednak na samotném počtu vzorků, počtu analyzovaných lokusů, počtu detekovaných allel a rozsahu délek allel (**Ruzzante, 1998**). Vzájemná porovnatelnost a reprodukovatelnost takových prací je tak velmi nízká.

2.2 KOMPETICE SPERMIÍ

2.2.1 KOMPETICE A EVOLUČNĚ STABILNÍ STRATEGIE

Kompetice spermií je jev kdy spermie několika samců se uchází o oplození (**Parker, 1970, Parker a kol., 1998, Gage a kol., 2004**). Ke kompetici spermií dochází když účinek spermií dvou nebo více samců se překrývá prostorově a časově (**Wigby, Chapman, 2004**). Vliv této post-kopulační selekce je určován jako významný vliv v evoluci biologie reprodukce samčího pohlaví a klíčový determinant různého reprodukčního úspěchu samců (**Birkhead, Møller, 1998**).

Vztahy mezi vlastnostmi gamet a relativním vlivem gamet při oplození se řídí zákonitostmi „evolučně stabilní strategie“ (ESS – „**Evolutionarily Stable Strategy**“, **Smith, 1982**). Teorie ESS v podstatě navazuje na Darwinovu teorii přirozeného výběru. Evolučně stabilní strategie představují popis chování, které různé organismy používají k tomu, aby své geny přenesly do další generace. U populací tak úspěšnost v jednom „kole volby“ určuje počet jedinců vstupujících do „kola volby“ dalšího.

Podle konceptu ESS tak optimální reprodukční strategie jedince z určité populace závisí na reprodukční strategii ostatních jedinců v této populaci (**Parker, 1996, 1998, Petersen a Warner, 1998**).

2.2.2 KOMPETICE A RYBY

Různorodost způsobů rozmnožování u ryb je až překvapivá. Relativně snadné pozorování ryb, společně s vysokou diverzitou způsobů rozmnožování dělá z ryb velmi vhodné objekty ke studiu kompetice spermií a provedení intraspecifických a interspecifických studií k ověření teorie kompetice spermií (**Petersen a Warner, 1998**).

Jev kompetice spermií dvou nebo i více samců o oplození samice nebo určitého množství jiker vyústil široké spektrum behaviorálních, morfologických a fyziologických adaptací aby tyto zajistily relativně vyšší realizaci samců na potomstvu oproti dalším rivalům (**Parker, 1970, Smith, 1982 a 1984**).

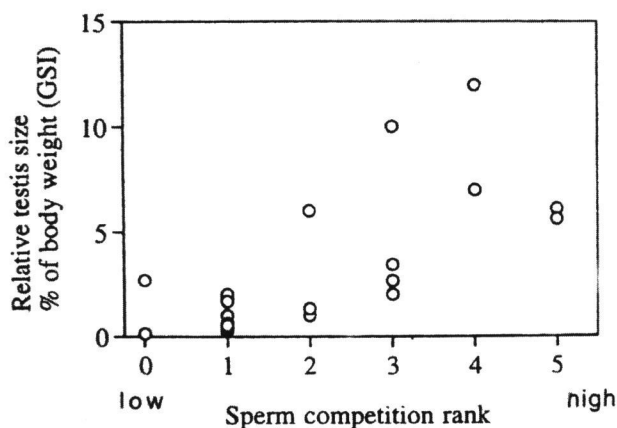
Míra kompetice mlíčáků jednotlivých rybích druhů může být posuzována na základě rozmnožovacího chování druhu a nebo pozorování rozmnožování konkrétních jedinců, určení

kompetice mlíčáků je pak samozřejmě snazší u druhů s vnějším oplozením. Kompetici mlíčáků, sledované podle chování při rozmnožování se věnovala celá řada studií. U některých druhů se objevují dvě odlišné formy samců s odlišnou reprodukční strategií – popisovány jsou alternativní „parazitické“ formy rozmnožování a různé „role“ samců (Taborsky, 1994, 1998).

Ze sladkovodních ryb jsou sledovány rozmnožovací taktiky nejčastěji u druhů *Rhodeus sericeus* (Candolin a Reynolds, 2002, Smith a kol., 2003, Reichard a kol., 2004a, 2004b), *Lepomis macrochirus* (Leach a Montgomerie, 2001, Neff a kol., 2003, Burnes et al. 2004), *Salmo salar* (Gage, 1995 a 1998) ale sexuální parazitismus byl pozorován i u druhu *Rutilus rutilus* (Kortet a kol., 2004).

Kompetice mlíčáků byla sledována v rámci mezidruhových i vnitrodruhových srovnání. Jako obecně platný princip pro rozdílné druhy se předpokládá že zvyšující se intenzita kompetice pozitivně koreluje s vynaloženým množstvím ejakulátu (Parker, 1982). Teorie kompetice předpokládá že rostoucí efekt kompetice spermií by mohl vést k vyšší investici do produkce spermií (Parker, 1990). Další možností posouzení míry kompetice mlíčáků různých rybích druhů je pak posouzení podle jejich „investice“ do vytváření gamet, určené podle jejich gonadosomatického indexu – GSI. Srovnávací studie několika druhů s různými reprodukčními taktikami a jak vnějším tak vnitřním oplozením prokázala, že gonadosomatický index GSI a počet spermií roste s intenzitou kompetice spermií u různých rybích druhů, zároveň ovšem klesá délka spermií (Stockley, 1997). Druhy charakteristické dvěma morfologicky odlišnými typy samců kteří se liší také strategií rozmnožování mohou

částečně být náchylné ke zkreslené interpretaci úrovně kompetice mlíčáků podle hodnot gonadosomatického indexu (Stoltz, 2005).



Stockley (1997) znázornila vztah intenzity kompetice spermií a gonadosomatickeho indexu u celkem 24 druhů ryb zde uvedeným grafem.

Vodorovná osa znázorňuje intenzitu kompetice těchto druhů, zařazených do následujících

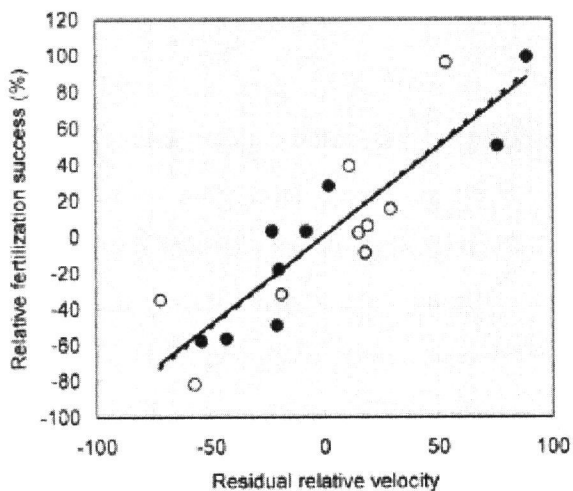
skupin: **0**-druhy s vnitřním oplozením (včetně oplození v tlamě samice), **1**-vnitřní oplození, nízká úroveň polygamie a nebo vnější oplození u druhů s výrazným párováním, **2**-vnitřní oplození u druhů se společným výtěrem nebo vnější oplození u druhů s párovým výtěrem, **3**-vnější oplození u ryb s párovým výtěrem a nebo ojedinele společný výtěr několika jedinců, **4**-vnější oplození, společný výtěr, **5**-vnější oplození a společný výtěr velkého počtu jedinců.

Alternativní rozmnožovací taktiky a samotné rozmnožovací chování bylo sledováno nejen na základě sledování rozmnožovacího chování nebo podle spermiace a kvality spermatu, ale také na základě určení paternity vzniklého potomstva pomocí metod molekulární biologie (Reichard a kol., 2004a, 2004b, Burnes a kol., 2004, Gage, 2004).

2.2.3 KOMPETICE NA ÚROVNI „IN VITRO“ FERTILIZACE

Na úrovni „in vitro“ fertilizace byla kompetice spermií několika samců zkoumána u ryb jen velmi málo, většina studií se věnuje kompetici spermií na úrovni druhu nebo konkrétní populace a popisuje určitý model kompetice předpokládaný pro tento druh. V podmínkách umělé reprodukce byla kompetice spermií studována u atlantského lososa (Gage a kol., 2004) a také kapra (Linhart a kol., 2005).

Experiment který realizoval Gage a kol. (2004), využívá určení paternity potomstva vzniklého „in vitro“ oplozením pomocí mikrosatelitních markerů izolovaných pro lososa (Slettan, Olsaker, Lie, 1995, O'Reilly, Hamilton, McConnell, Wright, 1996). Sperma 18ti mlíčáků seřazených do 9ti párů bylo použito k oplození jiker 9ti jikernaček. Množství asi 500 jiker bylo oploženo 1 ml spermatu obou mlíčáků, poprvé v objemovém poměru 1:1 a podruhé v objemovém poměru 1:2 ve prospěch jednoho ze samců. Jikry byly inkubovány a po vykulení byla určována paternita analýzou několika mikrosatelitních lokusů. U spermatu použitého k oplození byla sledována koncentrace spermií a jejich pohyblivost a životnost a následně byl sledován jejich vliv na úspěch oplození. Gage jako hlavní vliv úspěšnosti oplození prokázal rychlost pohybu krátce po aktivaci (vyhodnocována rychlost pohybu 10s po aktivaci). Naopak životnost spermií negativně korelovala s úspěšností oplození.



Graf znázorňuje vliv relativní rychlosti spermií v 10s od jejich aktivace na relativní úspěch oplození při párovém porovnávání úspěšnosti oplození mlíčáků lososa *Salmo salar* v podmínkách in vitro fertilizace (Gage a kol., 2004).

Obdobně kompetici spermií v podmínkách „in vitro“ fertilizace studoval **Linhart a kol., (2005)**. Kompetice spermií mlíčáků kapra *C. carpio* byla sledována na základě určení paternity potomstva získaného oplozením spermatem dvou samců. Otcovství bylo určováno pomocí barvy potomstva děděné podle mendelistické dědičnosti. Pět normálních mlíčáků (dominantně homozygotních) kapra a šest mlíčáků Koi (recesivně homozygotních) bylo použito k oplození jiker heterozygotní jikernačky. Testováno bylo všech 30 vzájemných kombinací mlíčáků obou skupin. a vyhodnocovalo se uplatnění spermií jednotlivých mlíčáků v potomstvu. Nebyla prokázána přímá spojitost mezi rychlostí pohybu spermií a uplatněním jednotlivých mlíčáků v potomstvu v rámci kompetice a stejně tak mezi rychlostí pohybu spermií a výsledky kontroly oplození ($N=11$, $r^2=0,03$, $P>0,6$), ovšem patrný byl vliv motility na kontrolu líhivosti ($N=11$, $r^2=0,38$, $P<0,05$). Podle statistického zpracování dat popisujících parametry spermatu použitého k oplození lze 17,1% variability v zastoupení jednotlivých mlíčáků v potomstvu vysvětlit rozdíly v motilitě spermií a 33% lze vysvětlit rozdílným výsledkem kontroly líhivosti, ale pro celkem 42% variability v zastoupení mlíčáků v potomstvu se nepodařilo najít vysvětlení.

2.2.4 „CRYPTIC FEMALE CHOICE“

Interakce mezi gametami nejsou pouze na úrovni kompetice mezi spermii jednotlivých mlíčáků. Termínem „**cryptic female choice**“ (dále jako „CFC“) jsou označovány vztahy mezi gametami opačného pohlaví, nebo také různé fyziologické adaptace samičího pohlavního ústrojí k postkopulačním výběru. Vztahy mezi gametami byly zprvu studovány pouze na úrovni kompetice spermií, „cryptic female choice“ představuje postkopulační pohlavní výběr prostřednictvím samičího pohlaví.

Je popsána řada mechanismů, prostřednictvím nichž je takovýto pohlavní výběr realizován (**Eberhard, 1996**). Tyto modely většinou zahrnují druhy s vnitřním oplozením, pro ryby popsal **Wedekind (2004)** tři potencionální možnosti jak je „cryptic female choice“ realizována u ryb s oplozením vnějším. Všechny předpokládané alternativy jsou založeny na MHC genech (MHC-major histocompatibility complex), jejichž prvotním úkolem je kontrola interakcí mezi hostiteli a patogeny. Stále více je dokumentována role MHC genů při pohlavním výběru - „mate choice“ (**Penn a Potts, 1999, Wedekind, 2002, review Piertney a Oliver, 2006**). Výběr založený na MHC byl zdokumentován například u myši a nebo také u člověka, u ryb-konkrétně u koljušky tuto selekci popsal **Reusch a kol., 2001**. MHC lokusy jsou vysoce polymorfními geny u většiny obratlovců a tato diverzita pak umožňuje následnou selekci (**Apanius a kol., 1997, Penn a Potts, 1999**).

Wedekind (2004) jako alternativy pro „CFC“ u ryb s vnějším oplozením popsal:

- 1) Spermie signalizují jejich haploidní specifitu v určitém z lokusů a jikry je na základě takových signálů rozeznají a akceptují.
- 2) Selekcce je účinná později, tj. po fúzi gamet a vytvoření sekundárního polárního tělíska.
- 3) Selektivní efekt ovarialní plazmy, na základě zjištěného efektu ovarialní plazmy na pohyblivost spermií (**Turner a Montgomerie, 2002**).

3. M A T E R I Á L A M E T O D I K A

3.1 V Ý T Ě R

3.1.1 V Ý B Ě R G E N E R A Č N Í C H R Y B

Z potencionálně vhodných ryb byly vybírány ryby na základě určení jejich genotypů v mikrosatelitních lokusech předpokládaných pro následné určení paternity vzniklého potomstva. U ryb značených mikročipovými značkami byla izolována DNA z ústřížků ploutví a analyzovány mikrosatelitní lokusy předpokládané pro určení paternity potomstva (metodika dále). Určení vhodných generačních ryb bylo stěžejní pro následné určení paternity potomstva pomocí pouhých čtyřech mikrosatelitních lokusů. Vybrána byla taková kombinace mlíčáků, aby rozmanitost allel v jednotlivých lokusech byla co nejvyšší a tím také nejvyšší pravděpodobnost určení paternity pomocí čtyřech mikrosatelitů. Konečný výběr ryb byl ještě ovlivněn kvalitou pohlavních produktů.

Použita byla jikernačka amurského sazana a pět mlíčáků. Mlíčáci pocházeli z linie C434 nebo C435. Označení mlíčáků a jejich genotypy v mikrosatelitních lokusech pro následné určení paternity potomstva jsou v následující tabulce.

Tabulka 1: Genotypy generačních ryb

MLÍČÁCI			G E N O T Y P Y			
OZNAČENÍ	P.I.T.	LINIE	MFW1	MFW6	MFW7	MFW28
M1	...1877748	C434	211 - 211	150 - 158	199 - 199	306 - 306
M2	...1881034	C434	169 - 219	128 - 158	197 - 203	294 - 298
M3	...1869956	C435	211 - 225	150 - 154	195 - 271	292 - 296
M4	...1875703	C435	169 - 219	158 - 158	197 - 203	306 - 306
M5	...1875472	C435	217 - 217	150 - 154	195 - 261	294 - 294

JIKERNAČKA						
F	7F7A164977	AMUR	217 - 223	136 - 162	191 - 253	-----

3.1.2 VÝTĚR, ZÍSKÁNÍ A UCHOVÁVÁNÍ GAMET

3.1.2.1 GENERAČNÍ RYBY

Ryby určené k umělému výtěru byly do doby samotného výtěru drženy odděleně, nejprve v rybnících a poté na líhni v nádržích o objemu 4 m³, s přítokem vody asi 0,2 l.s⁻¹. Teplota vody v tancích byla udržována v rozmezí 18-22°C, obsah kyslíku ve vodě činil 6-7 mg.l⁻¹.

Výtěr ryb byl indukován injekční aplikací roztoku kapří hypofýzy. Do hřbetní svaloviny byl mlíčákům podán roztok kapří hypofýzy v dávce 1 mg.kg⁻¹ a to 24 hodin před předpokládanou dobou výtěru. Jikernače byla nejprve injekčně aplikována dávka 0,4 mg.kg⁻¹ a to 24 hodin před výtěrem, druhá dávka 2,1 mg.kg⁻¹ byla aplikována 12 hodin před samotným výtěrem. V době očekávaného výtěru byly ryby neustále kontrolovány. Ryby připravené k umělému výtěru byly anestetizovány 2-phenoxyethanolem (ředění 1: 1000) a bylo přistoupeno k samotnému umělému výtěru.

3.1.2.2 ODBĚR A SKLADOVÁNÍ GAMET

Osušená jikernačka byla vytírána do suché plastové nádoby, veškeré nečistoty včetně jiker se zbytky krve byly odstraněny. Miska s jikrami byla přikryta zvlčenou utěrkou a uložena na chladné místo v líhni.

Sperma mlíčáků bylo jímáno do suchých plastových nádob, původně určených pro pěstování buněčných kultur. Poměrně velký objem nádob vůči relativně malému objemu jímaného spermatu umožňoval skladování spermatu v tenké vrstvě a s přístupem vzduchu. Nádoby byly po dobu skladování nutnou k určení koncentrace a záznamu motility spermií uloženy v termoboxu na vrstvě šupinkového ledu.

3.1.3 URČENÍ KONCENTRACE SPERMIÍ

Schéma experimentu vyžadovalo určit koncentraci spermií ve spermatu jednotlivých mlíčáků. Koncentrace spermií byla určována z čerstvého, nijak nefixovaného spermatu pomocí Burkerova haemocytometru (Burkerova počítací komůrka) a mikroskopu Olympus BX 41 se zvětšením 400x. Sperma bylo pro stanovení koncentrace dvoustupňově ředěno, finální naředění 10 000x.

Dávka spermií k oplození skupiny potomstva označené jako „N-progenies“ byla vypočtena ze zjištěné koncentrace spermií a to tak aby byl dosažen počet 200 000 spermií na jikru, který je doporučován pro umělou reprodukci kapra (Billard a kol., 1995, Linhart a kol., 2003). Tato dávka byla určována pro 200g jiker za předpokladu 800 ks/g .

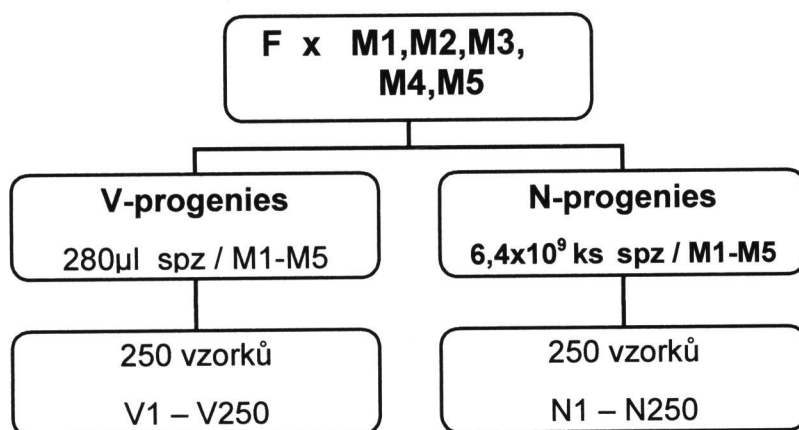
Tabulka 2: Určení koncentrace spermií a dávky spermatu k oplození

MLÍČÁCI	P.I.T.	KONCENTRACE SPERMIÍ		DÁVKA SPERMATU [μ l]	
		$\times 10^9$. ml	$\pm \times 10^9$. ml	V-progenies	N-Progenies
M1	...1877748	34,53125	34,53	280	185
M2	...1881034	22,1875	22,19	280	288
M3	...1869956	24,0625	24,06	280	266
M4	...1875703	23,75	23,75	280	270
M5	...1875472	17,96875	17,97	280	980

3.1.4 OPLOZENÍ A INKUBACE

Dávkou spermatu byly oplozeny dvě dávky po 200g jiker (předpoklad 800ks/g jiker). Dávky spermatu (resp. objem) byly určeny na základě určení koncentrace spermatu v případě vytváření skupiny potomstva označené jako „N-progenies“ (Tabulka 2, 3.1.3 Určení koncentrace spermií). Pro získání potomstva označeného jako „V-progenies“ byla k oplození byl použit jednotný objem spermatu každého z mlíčáků a to 280 μ l.

Diagram 1: Schéma oplození



Dávky spermatu použitého k získání N-progenies jsou určeny v tabulce. Po přidání spermatu byla provedena aktivace vodou z líhně v poměru jiker k aktivující vodě 1:1 (Linhart a kol., 2003) a směs jiker a spermatu byla smísena. Odlepkování jiker bylo prováděno mlékem po dobu 60 minut. Poté byly jikry nasazeny k líhnutí do Zugských lahví. Po cca 4,5 dnech inkubace při teplotě vody 22° C došlo k vylíhnutí.

Z každé skupiny potomstva bylo po vylíhnutí odebráno 250 jedinců a individuálně uloženo do eppendorfek o objemu 1,5 ml obsahujících 96% ethanol. Z těchto jedinců pak byla následně izolována DNA a provedeno určení paternity pomocí mikrosatelitních markerů.

3.1.5 KONTROLA OPLOZENOSTI A LÍHNIVOSTI

Kontrola oplozenosti byla prováděna pro každého z mlíčáků. Jikry oplozené spermatem jednotlivých mlíčáků byly umístěny do experimentálních boxu kde byly inkubovány, voda v tomto boxu byla sterilizována UV lampou. 5 g jiker bylo oplozeno množstvím spermatu odpovídajícím 8×10^8 spermii. Z oplozených jiker bylo odebráno malé množství jiker, ty byly nanесeny na Petriho misku s vodou a poté byla celá miska umístěna do boxu. Během líhnutí byly odstraňovány a zaznamenávány neoplozené jikry a jikry zasažené plísní. Po vykulení (cca 4,5 dne při 22°C) byl určen počet vykulených jedinců a líhnivost vůči celkovému počtu jiker takto inkubovaných.

3.1.6 ZÁZNAM POHYBLIVOSTI SPERMIÍ

Pro vyhodnocení pohyblivosti a rychlosti pohybu spermii byl zaznamenáván pohyb spermii mikroskopií v černém poli pod stroboskopickým osvětlením (Linhart a kol., 2002). Zdrojem stroboskopického osvětlení byla lampa Strobex 9630 (Chadvick-Helmut, USA), frekvence stroboskopické lampy byla synchronizována s frekvencí snímků záznamového zařízení (50Hz). Použit byl mikroskop Olympus BX 50, záznam byl snímán CCD kamerou Sony SSC-DC50AP a přenášen na videomonitor a zaznamenávám pomocí S-VHS rekordéru Sony SVO-9500 MDP.

Pro určení pohyblivosti byl napipetován 1 μ l předředěného vzorku spermatu (ředění v imobilizačním roztoku, v poměru 1:200), toto množství bylo napipetováno na podložní sklíčko (přímo na desce mikroskopu) do 49 μ l destilované vody obsahující 0,1% BSA (finální naředění spermatu 1:10 000). Přídavek BSA ve vodě k aktivaci gamet zabraňuje adhezi hlaviček spermií k samotnému podložnímu sklíčku. S aktivací gamet vodou na podložním sklíčku byl spuštěn záznam, který trval přibližně po dobu pohyblivosti spermií, cca. 2 minuty. Pro každého jedince byly pořízeny nejméně tři záznamy pohybu spermií.

3.1.7 VYHODNOCENÍ ZÁZNAMU POHYBLIVOSTI SPERMIÍ

Pořízený videozáznam pohybu spermií byl vyhodnocován s pomocí programu **Olympus MicroImage v 4.0.1**. Složením pěti po sobě následujících snímků byly znázorněny trajektorie spermií. Různé barvy snímků (resp. hlaviček spermií zachycených na snímku) navíc znázorňovaly směr pohybu spermií. Hlavičky spermií na prvním ze složených snímků byly znázorněny červeně, hlavičky spermií na posledním pátém snímku modře čímž byl zvýrazněn směr pohybu spermií. Spermie které v době záznamu nebyly pohyblivé se nacházely ve všech snímcích ve stejné pozici. Z pozic hlaviček spermií na takto složených snímcích byla určována délka jejich trajektorií a podle časového odstupu snímků byla určována rychlost pohybu spermií v $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Záznam pohyblivosti spermií byl pořízen nejméně ve třech opakováních pro každého z mlíčáků použitých k experimentu. Záznam byl vyhodnocován v čase 15, 30, 45 a 59s od aktivace spermií. Pokud to záznam dovoloval, byly určovány délky trajektorií 15ti spermií pro určení rychlosti jejich pohybu. Zároveň byl určován počet pohyblivých spermií a počet spermií nepohyblivých.

3.2 ANALÝZA MIKROSATELITNÍCH MARKERŮ

3.2.1 IZOLACE DNA

Prvním krokem při práci s nukleovými kyselinami je jejich izolace v nativním stavu z přirozeného materiálu a to v dostatečném množství a čistotě. Nejlevnější metodou izolace DNA z biologického materiálu je klasická fenol-chloroformová nebo fenol-ethanolová metoda (Sambrook a kol., 1989, Taggart, 1992). Další možností je využití některého z kitů. Tyto kity pracují na principu adsorbce nukleových kyselin na křemičité sklo v přítomnosti chaotropních solí, výhodou těchto kitů je zejména nižší pracnost patrná zejména při zpracovávání většího počtu vzorků, nižší riziko kontaminace vzorků při laboratorním zpracování. Jak již bylo v předchozích řádcích řečeno, kity využívají adsorbce nukleových kyselin na křemičité sklo (silikátovou membránu) v přítomnosti chaotropních solí (jodid sodný, guanidin thiokyanát, guanidin hydrochlorid). Při tomto způsobu izolace je důležité promývání vzorku k odstranění proteinů a dalších kontaminat. Následně je elucí z membrány uvolněna izolovaná DNA, děje se tak pomocí pufru s nízkou koncentrací solí.

Především z důvodů izolace DNA z velkého počtu vzorků byla izolace prováděna pomocí **E.Z.N.A. Tissue DNA Kitu** z produkce fy **Peqlab GmbH**. Kit obsahuje kromě ethanolu všechny reagenty potřebné pro izolaci DNA, dva typy pufrů (TL a BL, promývací pufr, eluční pufr) a proteázu. Tento kit dovoluje práci s přibližně 30mg materiálu, z nějž dokáže získat až 30ng genomové DNA, kit zajišťuje vysokou čistotu vzorku a minimální riziko kontaminace vzorku. Principem kitu je homogenizace vzorku, lýza buněk a denaturace vzorku, poté je DNA navázána na silikátovou membránu promýváním jsou odplaveny zbytky proteinů a ostatních kontaminujících látek. Následnou elucí je získána DNA o vysoké čistotě.

Práce s tímto kitem představovala uložení vzorku do 200 μ l BL pufru, poté byla přidána OB proteáza a následně byl vzorek inkubován při 55°C za současného třepání na termomixeru (Eppendorf Thermomixer comfort). Délka inkubace by měla být až 3 hodiny ale závisí především na povaze materiálu k izolaci. Námí použitým materiálem byl vylíhnutý

plůdek, tudíž nebylo potřeba tak dlouhé inkubace s proteázou. Poté bylo přidáno 220 μ l TL pufru, důkladně promícháno a uloženo k inkubaci při 70°C po 10 minut. Po této inkubaci jsme přidali 220 μ l ethanolu (96%) a vzorkem jsme přelili fritu se silikátovou membránou. Následovala centrifugace po 1 minutu při 8000 rpm, poté bylo na fritu naneseno 700 μ l promývacího pufru a znovu byla frita centrifugována. Promývání bylo ještě jednou opakováno a poté byla frita vysušována centrifugací po 2 minuty při maximální možné rychlosti. Na osušenou fritu bylo naneseno 200 μ l elučního pufru, předehřátého na 70°C a po 3 minutách inkubace byl izolát zcentrifugován do nové zkumavky.

Kit je uzpůsoben pracovat i s velmi malým množstvím materiálu k izolaci genomové DNA, izolace DNA z čerstvě vykuleného jedince byla bez nejmenších problémů, pro vyšší koncentraci byla závěrečná eluce upravena na použití 150 μ l elučního pufru. Při práci s ploutevními ústřížky pro izolaci DNA generačních ryb bylo důležité k izolaci použít jen velmi malé množství materiálu. Pokud bylo použito neúměrně velkého množství materiálu, proteiny a další kontaminanty obsažené v lyzátu ucpávaly silikátovou membránu a tím znesnadňovaly centrifugaci vzorku.

3.2.2 TESTOVÁNÍ KVALITY IZOLÁTU

Testování kvality izolátů DNA probíhalo na 1,5% agarosovém gelu (ROTH GmBh) o velikosti 12 x 12 cm, tloušťka gelu přibližně 1 cm. Pro vizualizaci pomocí UV světla byla přidána kapka 1% roztoku ethidiumbromidu. Ethidiumbromid využívá vlastnosti molekuly ethidiumbromidu interkalovet do vláken nukleových kyselin, detekuje tak jednořetězcové i dvouřetězcové molekuly, jedná se o nespecifické barvení molekul DNA. Ethidiumbromid je silný mutagen a toxická látka, práce s ním vyžaduje opatrnost a použití odpovídajících ochranných pomůcek a odpovídající způsob likvidace odpadů.

K rozvaření gelu sloužil 0,5x TBE pufr, tímto puftrem byla i naplněna i vana elektroforetické kolony. Vzorky byly nanášeny do jamek o šířce 4 mm, nanášeno bylo 5 μ l vzorku smíšeného s nanášecím barvivem – směsí roztoku xylencyanolu a glycerolu, chránící vzorek proti vyplavení z jamky v gelu.

Testování izolace DNA probíhalo někdy souběžně s testováním produktů PCR, tedy elektroforetické dělení probíhalo při 50mA, 50V po 90 minut. V případě že byly testovány pouze izoláty DNA, parametry elektrického pole zůstaly nezměněny ale doba byla výrazně kratší, kolem 30 minut. Tato doba byla dostatečná k tomu aby izolovaná DNA vmigrovala do gelu a mohla být vizualizována UV světlem (312 nm, iluminátor Vilber Lourmat). Více kapitola 3.2.5 Testování kvality PCR produktů.

3.2.3 PCR – SLOŽENÍ SMĚSI PRO PCR

PCR (Polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) je „in vitro“ amplifikace části DNA. Pro chod této reakce je důležité složení reakční směsi a cyklické střídání specifických teplot.

Reakční směs obvykle obsahuje templátovou **DNA**, **PCR pufr** (udržuje stabilní pH a obsahuje ionty - $MgCl_2$), $MgCl_2$ nebo amonný pufr, směs deoxyribonukleotidů - **dNTP's** (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), **primerové páry** (navržené pro daný úsek amplifikované DNA), **enzym** polymerázu (většinou **Taq**) a také někdy další **aditiva** (BSA, DMSO, glycerol).

Aditiva pracují na různém principu, **BSA** (bovinní serový albumin, až 10%) by měl v PCR mixu zvyšovat teplotní stabilitu polymerázy a obdobně by měl fungovat i přídavek **glycerolu** (5-20%) do „master mixu“ pro PCR. Stejným způsobem funguje preparát s označením **Tween 20**, který bývá obvyklou součástí komerčně distribuovaných PCR master mixů. Přídavek **DMSO** (dimethylsulfoxid, 1-10%) nebo **formamidu** (1-10%) může zvyšovat specifitu reakce tím že snižuje teplotu tání a separace a tím zlepšuje nasedání primerů.

Pro amplifikaci byly použity reagenty z produkce fy Fermentas (10X *Taq* Buffer with KCl and 15mM $MgCl_2$, $MgCl_2$, dNTP's set, *Taq* polymerase), primerové páry byly na základě popsaných primerových sekvencí pro lokusy **MFW1**, **MFW6**, **MFW7** a **MFW28** vyrobeny firmou Proliigo. K zajištění stability polymerázy při vysokých teplotách byl přidáván 1% roztok BSA. *Taq* mix obsahoval 0,5 U *Taq* polymerázy na jeden amplifikovaný produkt.

Amplifikace mikrosatelitních markerů probíhala jako „hot start“ PCR, kdy byla polymeráza přidávána do reakční směsi až po déletrvající počáteční denaturaci templátové DNA v samotné reakční směsi. Tudíž reakční směs byla rozdělena na „**PCR mix**“ a „**Taq**

ix“, program termocyklieru byl nastaven tak aby po úvodní denaturaci bylo možno ke každému vzorku přidat polymerázu rozpuštěnou v „Taq mixu“. Po úvodní denaturaci bylo do PCR mixu v objemu 9 μl přidáno 6 μl Taq mixu, do PCR mixu bylo ovšem ještě před počáteční denaturací přidáno 20 μl minerálního oleje (Sigma) z důvodů zabránění evaporace vzorku a to i přes skutečnost že používaný termocyklier Eppendorf Mastercycler gradient má vyhřívané víko termobloku.

Tabulka 3: Složení PCR mixu

		MFW1, MFW6, MFW7	MFW28
PCR mix	dH₂O	0.3 μl	1.5 μl
	Buffer (Fermentas, 10 x)	1.5 μl (bez MgCl ₂ !)	1.5 μl ((NH ₄) ₂ SO ₂)
	BSA (1%)	1.2 μl	-
	dNTP's (1.25 mM)	1.2 μl	1.2 μl
	MgCl₂ (25 mM)	1.2 μl	1.2 μl
	Primer A (10 pmol/ μl)	0.3 μl	0.3 μl
	Primer B (10 pmol/ μl)	0.3 μl	0.3 μl
	Templátová DNA	3.0 μl	3.0 μl
Taq mix	Taq	0,09 μl (0,5U)	0,09 μl (0,5U)
	dH₂O	5.91 μl	5.91 μl

3.2.4 PCR – TEPLOTNÍ PRŮBĚH REAKCE

Pro průběh polymerázové řetězové reakce je nutné kromě správného složení reakční směsi dodržet optimální teplotní průběh reakce. Cyklické střídání teplot je realizováno v termocyklieru, námi byl používán termocyklier **Eppendorf Mastercycler gradient**. Z popisu složení reakční směsi je patrné že jsme PCR realizovali jako „hot start“, zejména z důvodu delší počáteční denaturace, předcházející samotnému cyklu PCR. Tato denaturace probíhala při 95°C po dobu 5 minut a poté již následoval samotný cyklus.

Polymerázová řetězová reakce byla realizována v celkem 35 cyklech, každý z cyklů začínala denaturace při 90°C po dobu 30s, poté následoval annealing primerových párů při

55°C po 45s (teplota zvolena podle primerových sekvencí popsaných pro dané lokusy, popsaných Croojmansem, 1997), vlastní cyklus ukončila elongace nově vznikajícího řetězce DNA při 72°C po 60s. Po 35 cyklech reakci ukončila finální 7 minutová elongace při 72°C. Tímto programem PCR označeným jako „CARP PROGRAM“ byly amplifikovány lokusy **MFW1**, **MFW6**, **MFW7**, pro lokus **MFW28** byl následujícím způsobem program PCR upraven. Počáteční denaturace i finální elongace zůstala nezměněna, prvních 5 cyklů vlastní PCR bylo upraveno na vyšší teplotu denaturace tj. 95°C a také delší časový interval jednotlivých kroků vlastní cyklu 60s. Složení tohoto programu je v tabulce pod textem pod označením „TENCH PROGRAM“.

Během celého cyklu bylo využíváno předehřátí víka cykleru na 100°C k zabránění evaporace vzorku, snížení množství a kvality amplifikátu PCR.

Tabulka 4: Teplotní průběh PCR

	"CARP PROGRAM"	"TENCH PROGRAM"
počáteční denaturace:	95°C, 5 minut	95°C, 5 minut
denaturace annealing elongace	90°C, 30 s	95°C, 60 s
	55°C, 45 s 35x	55°C, 60 s 5x
	72°C, 60 s	72°C, 60 s
denaturace: annealing: elongace:		90°C, 30 s
		55°C, 45 s 30x
		72°C, 60 s
finální elongace:	72°C, 7 minut	72°C, 7 minut

3.2.5 TESTOVÁNÍ KVALITY PCR PRODUKTŮ

Testování kvality produktů PCR probíhalo na 1,5% agarosovém gelu (ROTH GmbH) o velikosti 12 x 12 cm, tloušťka gelu přibližně 1 cm. Pro vizualizaci pomocí UV světla byla přidána kapka 1% roztoku ethidiumbromidu. K rozvaření gelu sloužil 0,5x TBE pufr, stejným pufrům byla i naplněna i vana elektroforetické kolony. Vzorky byly nanášeny do jamek o šířce 4 mm, nanášeno bylo 5 μ l vzorku s 1,5 μ l nanášecího barviva – směsi roztoku xylencyanolu a glycerolu, chránící vzorek proti vyplavení z jamky v gelu. Souběžně se vzorky byl nanášen i žebřík (100bp Ladder, Fermentas), tj. směs fragmentů známé délky, podle nějž je na gelu možno posuzovat kvalitativně ale i kvantitativně produkty PCR. Elektroforetické dělení probíhalo při 50mA, 50V po 90 minut. Gely byly vizualizovány UV světlem (312 nm, iluminátor Vilber Lourmat) a snímány dokumentačním zařízením DOC-PRINT (Vilber Lourmat). Ze snímků byla vyhodnocována kvalita izolátů a zejména kvalita amplifikátů PCR - přítomnost nežádoucích produktů různé délky - „artificial bandů“ a vhodnost pro následnou fragmentovou analýzu pomocí sekvenátoru.

3.2.6 ANALÝZA FRAGMENTŮ DNA

Produkty polymerázové řetězové reakce procházely analýzou délek amplifikovaných fragmentů na základě posouzení jejich kvality z agarosového gelu. Produkty o dostatečné čistotě, absenci „artificial bandů“, tj. svévolně vznikajících fragmentů různých délek, byly analyzovány automatickým sekvenátorem.

Dělení fragmentů a následné určení jejich délek umožňuje elektroforetické dělení na akrylamidovém gelu (PAGE) o vysoké hustotě akrylamidu (až 20%) a vysoké koncentraci močoviny. Produkty jsou porovnávány vůči standardům – směsí fragmentů různých délek na snímku vizualizovaného gelu, délky fragmentů jsou pak určovány softwarově digitálního obrazu. Analýza fragmentů vzniklých amplifikací mikrosatelitních lokusů za použití takto koncentrovaných gelů je možná i v „duplexech“ lokusů o vzdálenějších délkách amplifikovaných fragmentů, použít lze i dvojí nanášení produktů PCR do stejné dráhy

v akrylamidovém gelu (poté co nanesené vzorky vmigrují dostatečně daleko jsou do stejné dráhy nanесeny další) a porovnávání délek vůči dvěma standardům (ladderům nanášeným společně se vzorky).

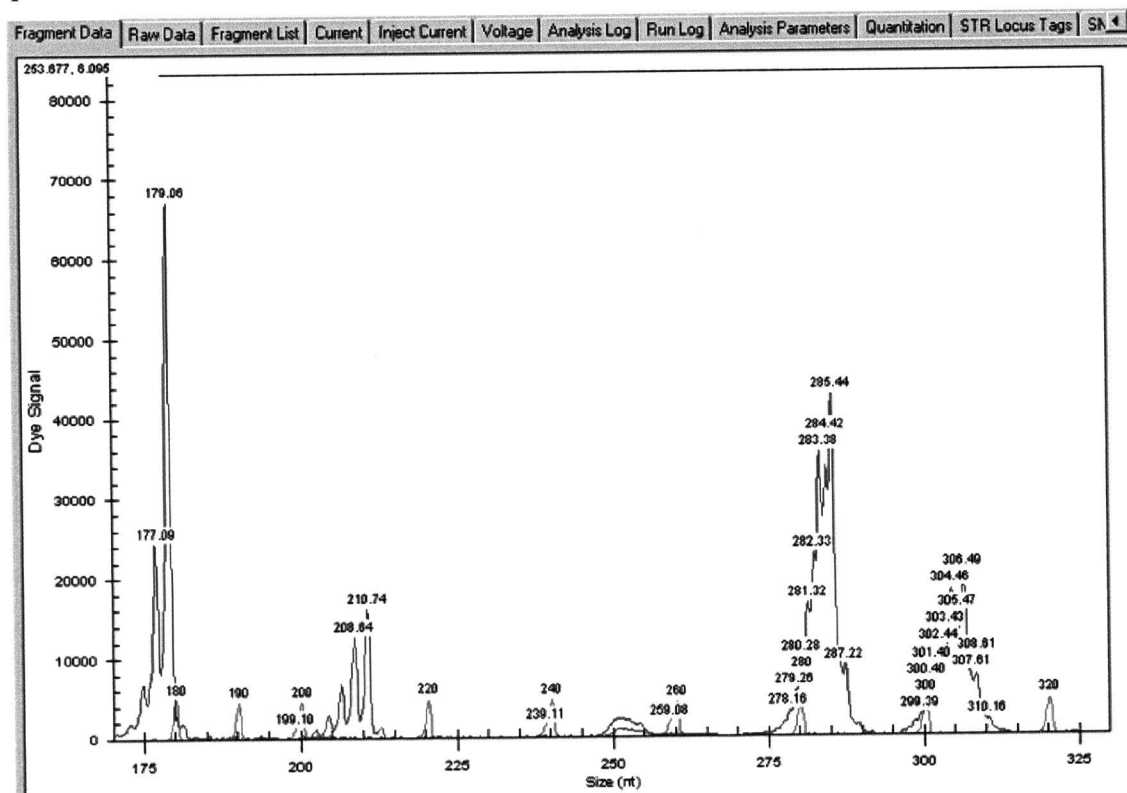
Další možností je využití automatického sekventárovu a zjednodušeného programu pro analýzu délek amplifikovaných fragmentů. Automatický sekvenátor využívá kapilární elektroforézy vzorku společně se standardem a následně screening laserovým paprskem aktivujícím fluorescenční značení fragmentů DNA (z primerových párů) a identifikaci vlnové délky emitovaného světla. Kapilára je plněna speciálním polymerem na bázi akrylamidu, fluorescenční značení fragmentů je laserovým paprskem aktivováno když fragmenty opouští kapiláru. Emitované světlo je detekováno a podle optické aktivity fluorescenčního barviva je určeno o jaký fragment DNA se jedná, jestli o fragment standardu nebo samotný vzorek. Software sekvenátoru pak na základě porovnání s délkami fragmentů obsažených ve standardu určí délku alel amplifikovaných mikrosatelitních lokusů.

Určení délek allel amplifikovaných mikrosatelitních lokusů bylo prováděno pomocí fragmentové analýzy na automatickém sekvenátoru **Beckmann Coulter CEQ 8000**. Analýza produktů amplifikace mikrosatelitních lokusů probíhala v duplexech, tj. dva lokusy byly analyzovány společně, díky odlišným očekávaným délkám allel a díky odlišnému barvení jejich primerů. Jeden z primerových párů pro PCR byl značen fluorescenčním barvivem Beckman Coulter **Dye D3** (zelené značení, reversní primery pro lokusy MFW 1 a MFW 6) nebo fluorescenčním barvivem Beckman Coulter **Dye D4** (modré značení, reversní primery pro lokusy MFW 7 a MFW 28). Produkty PCR byly nanášeny tedy společně v duplexech **MFW 1 a MFW 28, MFW 6 a MFW 7**. Do jediné jamky v plátu sekvenátoru byly tak nanášeny produkty v množství závislém na použitém barevném značení – produkty značené barvivem **D3** byly nanášeny po 1 μ l a produkty značené barvivem **D4** po 2 μ l produktu. Produkty byly nanášeny do 28 μ l SLS (Sample Loading Solution, Beckman Coulter) a k produktům byl přidáván 1 μ l standardu **CEQ DNA Size Standard Kit – 400** značeného barvivem **Ceq WellRed**. Tento standard obsahuje směs fragmentů o délkách 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400 a 420 bp. Sekvenátor pracoval s kapilárami **CEQ DNA Sequencing Capillary Array** (Beckman

Coulter) o délce 50 cm a průměru 100 µm, kapiláry byly plněny sekvenačním gelem s označením **CEQ Separation Gel LPA-1** (Beckman Coulter).

Program sekvenátoru k dělení fragmentů nesl označení **FRAG 3**, tento program dovoluje dělení fragmentů až do délky 500 bp. Kapiláry jsou plněny sekvenačním polymerem na bázi akrylamidu **CEQ Separation Gel LPA-1** a poté se kapiláry přehřívají na teplotu 50 °C. Následně jsou vzorky z plátu denaturovány při 90 °C a probíhá injekce vzorků do gelu pod napětím 2,0 kV po dobu 30 s, tuto dobu lze měnit podle kvality PCR produktů a tím ovlivňovat množství nanesené směsi produktů do gelu. Dělení probíhalo pod napětím 6,0 kV po dobu 35 minut.

Automatický sekvenátor zaznamenává fragmenty procházející kapilárou, podle jejich fluorescenčního značení identifikuje fragmenty standardu **CEQ DNA Size Standard Kit – 400**. Pro tento standard a pro způsob značení reversních primerů byla také zvolena odpovídající kalibrace Cubic 400. Pomocí software jsou těmto fragmentům přiřazeny příslušné délky a následně jsou pak podle nich stanovovány délky allel mikrosatelitních lokusů. Výsledkem je graf s peaky standardu a amplifikátu každého z lokusů v daném duplexu. Odečet délek allel byl prováděn vizuálně ze záznamu sekvenátoru.



Obrázek 1: Záznam sekvenátoru

3.2.7 URČENÍ PATERNITY

Segregace allel čtyřech analyzovaných mikrosatelitních lokusů určila paternitu všech 500 jedinců ovzorkovaných ze dvou skupin potomstva. Jednoznačné určení paternity všech jedinců pomocí tak malého počtu markerů umožnil především výběr generačních ryb se specifickými allelami v některých ze sledovaných lokusů. Díky tomuto výběru bylo nakonec možno určit otcovství u všech vzorkovaných jedinců pomocí dvou nebo tří mikrosatelitních lokusů.

3.3 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

3.3.1 KONTROLA OPLOZENOSTI A LÍHNIVOSTI

Metodika kontroly oplozenosti a líhnivosti je uvedena v kapitole 3.1.5 Pro každého z mlíčáků byla prováděna kontrola oplozenosti a líhnivosti ve čtyřech opakováních a z dat popisujících procentuální zastoupení oplozených resp. vykulených jiker byl(a) určován(a):

a) aritmetický průměr

b) směrodatná odchylka

c) Leveneho test (určení homogenity rozptylů) pro zjištění možnosti následně provést analýzu rozptylů středních hodnot - ANOVA

d) ANOVA – analýza rozptylů středních hodnot, určení statisticky významných rozdílů na hladině významnosti α

e) LSD test, v případě že analýza rozptylů středních hodnot ANOVA prokáže statisticky významné rozdíly. K určení statisticky významných rozdílů mezi konkrétními dvěma skupinami dat (řazených podle jednotlivých mlíčáků), když pro několik takových skupin byly analýzou rozptylů středních hodnot prokázány statisticky významné rozdíly.

Data byla zpracována pomocí programu STAT SOFT Statistica® 6.0

3.3.2 MOTILITA SPERMIÍ

Popis metodiky záznamu pohybu spermií a jeho vyhodnocení je uveden v kapitolách 3.1.6 a 3.1.7, pro každého z mlíčáků byl záznam pohybu spermií pořízen ve třech opakováních, vyhodnocováno bylo procentuální zastoupení pohyblivých spermií. Z dat popisujících pohyblivost spermií pak byl(a) určován(a):

a) aritmetický průměr

b) směrodatná odchylka

c) Leveneho test

d) ANOVA

e) LSD test, pokud nebude prokázána shoda rozptylů stř.hodnot (ANOVA)

3.3.3 RYCHLOST POHYBU SPERMIÍ

V každém ze tří opakování záznamu pohybu spermií (pro každého z pěti mlíčáků) byly určovány délky trajektorií 15 spermií v čase 15,30,45 a 59s od aktivace. Poté byla určována rychlost pohybu spermií. V rámci statistického zpracování pak byl(a) určován(a):

- a) **počet n platných měření** – počet spermií jejichž trajektorie byly měřeny pro následné určení rychlosti pohybu spermií
- b) **aritmetický průměr** rychlosti pohybu spermií určených z takových měření
- c) **směrodatná odchylka**
- c) **Leveneho test**
- d) **ANOVA**
- e) **LSD test**, pokud nebude prokázána shoda rozptylů stř.hodnot (ANOVA)

3.3.4 ZASTOUPENÍ MLÍČÁKŮ V POTOMSTVU

Na základě určení otcovství 250 jedinců z každé skupiny potomstva bylo vypočteno procentuální zastoupení jednotlivých mlíčáků v potomstvu.

Jelikož někteří mlíčáci byli zastoupeni velmi nízkým počtem jedinců v analyzovaném potomstvu, bylo provedeno statistické přerozdělení – Monte-Carlo (diskrétní rozdělení pro 100 000 případů). Poté byla zpracována chi-kvadrát statistika porovnávající podíly jednotlivých mlíčáků vůči rovnoměrné distribuci, kdy by každý z mlíčáků měl v potomstvu 20% podíl. Přerozdělení Monte-Carlo a chi-kvadrát statistika byly zpracovávány v programu SAS-Freq ®.

3.3.5 TESTOVÁNÍ HYPOTETICKÝCH MODELŮ

Pro vysvětlení odlišného zastoupení mlíčáků v potomstvu bylo testováno několik hypotéz. Pro obě skupiny potomstva byly tak testovány následující modely, zohledňující odlišné faktory (koncentraci spermatu, jejich motilitu a rychlost) pro vysvětlení poměrného zastoupení mlíčáka v potomstvu (p).

Pro skupinu potomstva označenou jako “**V-progenies**” byly testovány následující modely:

Model 1, předpokládající poměrné zastoupení mlíčáků v potomstvu ($p_{1i} = 0.2$ pro každého z mlíčáků).

Model 2, který zohledňuje koncentraci spermatu ($p_{2i} = C_i / \sum_i C_i$), kde C_i je zjištěnou koncentrací spermatu.

Model 3, který kromě koncentrace zohledňuje motilitu spermatu ($p_{3i} = C_i M_i / \sum_i C_i M_i$), kde M_i vyjadřuje motilitu spermií v čase 15s od jejich aktivace.

Model 4, které kromě předchozí faktorů zohledňuje také rychlost pohybu spermií ($p_{4i} = C_i M_i V_i / \sum_i C_i M_i V_i$), kde V_i je zjištěnou rychlostí spermií v čase 15s od jejich aktivace.

U skupiny potomstva označené jako “**N progenies**” díky kvantifikaci dávky spermatu k oplození je model pro rovnoměrné zastoupení mlíčáků (**Model 1**) a model zohledňující koncentraci spermatu (**Model 2**) ekvivalentní. Pro další statistické zpracování jsou označeny jako **Model 2**. Další dva modely zůstávají nezměněny.

Tyto hypotézy jsou testovány podle logaritmicko-pravděpodobnostní rovnice k testování hypotéz, podle vzorce:

$$\log \left(\frac{P(X|Mod_a)}{P(X|Mod_b)} \right) = \sum_i N_i \log \left(\frac{p_{ai}}{p_{bi}} \right),$$
 kde X nahrazuje zjištěný soubor dat a N_i vyjadřuje

zjištěné zastoupení mlíčáka i v analyzovaném potomstvu. Testování hypotéz bylo prováděno pomocí programu SAS-Freq®.

4. V Ý S L E D K Y

4.1 OPLOZENOST A LÍHNIVOST

Zpracovávána data ze čtyřech opakování, určen aritmetický průměr hodnot oplozenosti a líhnivosti (%) včetně směrodatné odchylky (SD). Stejně alfabetické indexy u hodnot aritmetického průměru označují hodnoty pro něž nebyla prokázána statisticky významná odlišnost na hladině významnosti $\alpha=0,05$ (viz. další kapitoly). Data z tabulky jsou navíc znázorněna v grafu v příloze (Graf 1).

Tabulka 5: Oplozenost a líhnivost

MLÍČÁCI	OPLOZENOST		LÍHNIVOST	
	%	SD	%	SD
M1	93,33^a	1,67	85,89^a	5,66
M2	97,56^b	1,77	90,79^a	1,91
M3	93,73^a	1,32	80,93^a	4,14
M4	94,56^a	2,79	87,55^a	5,24
M5	93,37^a	1,94	87,95^a	5,04

4.1.1 OPLOZENOST – STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Pomocí Levenova testu byla prokazována homoskedasticita (homogenita rozptylů) jednotlivých souborů dat (čtyřech opakování pro každého z mlíčáků) na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Poté co byla prokázána homogenita rozptylů jednotlivých souborů dat, byla zpracována analýza rozptylů středních hodnot ANOVA.

V porovnání oplozenosti pro jednotlivé mlíčáky **byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými mlíčáky** na hladině významnosti $\alpha=0,05$, jelikož hodnota pravděpodobnosti shody rozptylů středních hodnot **$p=0,04069$** .

Z toho důvodu byl zpracován **LSD** test k určení statisticky významných rozdílů při vzájemném porovnání libovolných dvou mlíčáků při $\alpha = 0,05$. Výsledky jsou znázorněny v tabulce na další straně, statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny tučně.

Tabulka 6: LSD test – oplozenost ($\alpha=0,05$)

LSD test; proměnná: OPLOZENOST (ANOVA) Tučně označené rozdíly jsou významné na hlad. $p < ,05000$						
MLICACI oplozenost	M=93,735 {1}	M=97,555 {2}	M=93,334 {3}	M=93,374 {4}	M=94,555 {5}	
1 {1}		0,014621	0,776466	0,798129	0,562112	
2 {2}	0,014621		0,008136	0,008627	0,046824	
3 {3}	0,776466	0,008136		0,977452	0,391719	
4 {4}	0,798129	0,008627	0,977452		0,406962	
5 {5}	0,562112	0,046824	0,391719	0,406962		

Z porovnání libovolných dvou mlíčáků, znázorněných v tabulce LSD testu na předchozí stránce je patrné, že **statisticky významně** (na hladině významnosti $\alpha=0,05$) se v oplozenosti odlišoval mlíčák označený jako **M2**. Tato ryba se odlišovala od všech ostatních a naopak **nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi ostatními rybami M1,M3,M4 a M5**.

4.1.2 LÍHNIVOST – STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Poté co byla prokázána homogenita rozptylů jednotlivých souborů dat (čtyřech opakování kontroly líhnivosti pro každého z mlíčáků) na hladině významnosti $\alpha=0,05$ byla provedena analýza rozptylů středních hodnot **ANOVA**.

V porovnání líhnivosti určené pro jednotlivé mlíčáky **nebyly prokázány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými mlíčáky** na hladině významnosti $\alpha=0,05$, jelikož hodnota pravděpodobnosti shody rozptylů středních hodnot **$p=0,0865$** . Byla prokázána **vyrovnaná líhnivost jiker oplozených jednotlivými mlíčáky** v kontrole oplozenosti a líhnivosti, líhnivost jiker pak kompenzovala rozdíly zjištěné v oplozenosti (mlíčák M2).

4.2 MOTILITA SPERMIÍ

Motilita spermií (v %) byla určována ze třech opakování záznamu pohybu spermií a poté byl určen aritmetický průměr z těchto třech opakování, včetně směrodatné odchylky (SD). Stejně alfabetické indexy u hodnot aritmetického průměru označují

hodnoty pro něž nebyla prokázána statisticky významná odlišnost na hladině významnosti $\alpha=0,05$ (viz. další kapitola). Data jsou uvedena v následující tabulce, motilita spermií 15s od aktivace je pro jednotlivé mlíčky znázorněna v grafu v příloze (Graf 2).

Tabulka 7: Motilita spermií v čase 15, 30, 45 a 59s od aktivace

MLÍČÁCI	15s		30s		45s		59s	
	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD
M1	94,97^a	4,55	64,36	12,53	15,72	6,02	3,36	3,59
M2	98,34^a	1,84	70,60	10,75	17,42	7,43	0,85	1,48
M3	98,44^a	2,21	73,91	8,06	15,20	0,90	0,95	0,88
M4	71,29^a	26,46	55,51	10,12	9,93	1,83	3,19	3,13
M5	88,37^a	5,52	65,78	7,92	15,59	7,04	3,25	3,88

4.2.1 MOTILITA – STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Motilita v čase 15s od aktivace spermií bude dále použita pro testování hypotetických modelů pro vysvětlení zastoupení jednotlivých mlíčků v potomstvu. Leveneho test prokázal homogenitu rozptylů jednotlivých souborů dat a tudíž byla testována shoda rozptylů středních hodnot ANOVA, která **na hladině významnosti $\alpha=0,05$ neprokázala statisticky významné rozdíly ($p=0,10458$)** v motilitě spermií jednotlivých mlíčků v čase 15 s od jejich aktivace.

Jako statisticky významně odlišný nebyl shledán ani mlíček s označením M4, pro kterého byl aritmetický průměr motility určen pouze ze 2 měření (90% a 52,58%) a s vysokou směrodatnou odchylkou (SD 26,46).

4.3 RYCHLOST POHYBU SPERMIÍ

Rychlost pohybu spermií byla určována podle trajektorií spermií za určitý časový interval. Následující tabulka obsahuje počet takto měřených trajektorií n , podle nichž pak byla určena průměrná rychlost v [$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$] a její směrodatná odchylka (SD). Stejně alfabetické indexy u hodnot aritmetického průměru rychlosti pohybu označují hodnoty pro něž nebyla prokázána statisticky významná odlišnost na hladině významnosti $\alpha=0,05$ (viz. další kapitola). Data popisující rychlost pohybu spermií v jednotlivých časových intervalech

jsou seřazena v následujících tabulkách, rychlost pohybu spermií jednotlivých mlíčáků v čase 15s od aktivace je pak znázorněna v grafu v příloze (Graf 3).

Tabulka 8: Rychlost pohybu spermií v časech 15s a 30s od aktivace

MLÍČÁCI	15s			30s		
	n	v [$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]	SD	30s	v [$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]	SD
M1	43	135,58^a	24,49	40	51,95	15,75
M2	45	154,95^b	21,77	45	65,47	11,74
M3	30	152,60^b	24,16	45	62,86	14,67
M4	30	96,79	25,88	33	54,38	16,07
M5	43	140,44^a	27,91	44	61,66	21,80

Tabulka 9: Rychlost pohybu spermií v časech 45s a 59s od aktivace

MLÍČÁCI	45s			59s		
	n	v [$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]	SD	n	v [$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]	SD
M1	21	30,78	6,90	5	29,71	5,22
M2	29	36,02	9,16	2	24,20	3,56
M3	36	36,36	9,03	3	36,36	2,60
M4	18	34,37	7,33	7	26,06	2,82
M5	23	31,06	6,56	4	31,51	10,58

4.3.1 RYCHLOST – STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Rychlost pohybu spermií v čase 15s od aktivace je dalším z faktorů zohledněných v testování hypotetických modelů pro vysvětlení zastoupení jednotlivých mlíčáků v potomstvu. Leveneho test prokázal homogenitu rozptylů jednotlivých souborů dat popisujících rychlost spermií v čase 15s od aktivace a tudíž byla testována shoda rozptylů středních hodnot ANOVA. **Na hladině významnosti $\alpha=0,05$ byly prokázány statisticky významné rozdíly ($p=0,0000$).** Poté byl tedy proveden **LSD test** k určení signifikantních rozdílů v rychlosti pohybu spermií mezi libovolnými dvěma mlíčáky. Výsledky LSD testu jsou znázorněny v následující tabulce, statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny tučně.

Tabulka 10: LSD test – rychlost ($\alpha=0,05$)

LSD test; proměnná: Rychlost15 (ANOVA) Tučně označené rozdíly jsou významné na hlad. $p < ,05000$					
MLICACI rychlost15	M=135,58 {1}	M=154,95 {2}	M=152,60 {3}	M=96,795 {4}	M=140,44 {5}
1 {1}		0,000339	0,004503	0,000000	0,366652
2 {2}	0,000339		0,688705	0,000000	0,006822
3 {3}	0,004503	0,688705		0,000000	0,041260
4 {4}	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000
5 {5}	0,366652	0,006822	0,041260	0,000000	

Výrazně nižší rychlost spermií byla zaznamenána u mlíčka s označením M4. **Statisticky významné rozdíly** v rychlosti pohybu spermií **nebyly nalezeny mezi mlíčky** označenými jako **M1** a **M5** a stejně tak mezi mlíčky **M2** a **M3**. **Tyto ryby se pak statisticky neodlišovaly ($\alpha=0,05$) v líhivosti, motilitě a ani rychlosti pohybu spermií.**

4.4 ZASTOUPENÍ MLÍČÁKŮ V POTOMSTVU

Zastoupení jednotlivých mlíčáků v obou skupinách potomstva bylo určováno na základě určení paternity pomocí mikrosatelitních markerů. Díky výběru generačních ryb použitých pro experiment bylo možno určit paternitu u všech 250 jedinců z každé skupiny. Procentuální zastoupení jednotlivých mlíčáků v potomstvu je znázorněno v následující tabulce a grafech v příloze (Graf 4, Graf 5).

Tabulka 11: Zastoupení mlíčáků v potomstvu

MLÍČÁCI	„V-progenies“		„N-progenies“	
	počet	%	počet	%
M1	56	22.4	81	32.4
M2	55	22.0	45	18.0
M3	125	50.0	103	41.2
M4	1	0.4	6	2.4
M5	13	5.2	15	6.0
CELKEM	250	100	250	100

Motilita a rychlost pohybu spermií je mnoha autory považována za klíčový faktor ovlivňující úspěšnost oplození. Mlíčák M4, který ve výrazně lišil od všech ostatních ryb v hodnotách motility i rychlosti pohybu spermií skutečně vykazoval výrazně nejnižší zastoupení v obou skupinách potomstva (0,4 a 2,4%).. Jestliže v předchozí části nebyly prokázány statisticky významné rozdíly v líhivosti, motilitě a rychlosti pohybu spermií mezi některými mlíčky, jejich zastoupení v potomstvu označeném jako „*N-progenies*“ by mělo být porovnatelné. Takové rozdíly nebyly nalezeny konkrétně mezi rybami označenými jako **M1** a **M5**, jejich zastoupení v „*N-progenies*“ ovšem činí **32,4** a **6%**. Dále pak nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi mlíčky **M2** a **M3**, jejich zastoupení v „*N-progenies*“ pak činí **18** a **41,2%**.

Zastoupení jednotlivých mlíčáků v potomstvu bylo srovnáváno s rovnoměrným zastoupením, kdy byl předpokládán 20% podíl každého z mlíčáků. Jelikož někteří mlíčáci byli v analyzovaných skupinách potomstva zastoupeni nižším počtem než pět jedinců, pro statistické zpracování bylo využito přerozdělení Monte-Carlo (diskretní rozdělení pro 100 000 případů).

V obou skupinách potomstva byla dokázáno odlišné zastoupení jednotlivých mlíčáků, vyjádřené chi-kvadrát statistikou (chi-kvadrát určován oproti 20% zastoupení jednotlivých mlíčáků). Pro skupinu označenou jako „*V-progenies*“ byl určen $\chi^2=189$ (při 4 d.f., $p<0.0001$), přičemž pro skupinu označenou jako „*N-progenies*“ byl určen $\chi^2=139$ (při 4 d.f., $p<0.0001$). Zastoupení jednotlivých mlíčáků v potomstvu bylo znatelně odlišné pro obě skupiny potomstva ($p<0.05$), čímž byl prokázán efekt kvantifikace dávky spermatu pro „*N-progenies*“.

4.5 TESTOVÁNÍ HYPOTETICKÝCH MODELŮ

Pro vysvětlení odlišného zastoupení mlíčáků v potomstvu vzniklém při oplození směsí jejich spermatu bylo testováno několik hypotéz. Pro obě skupiny potomstva byly tak testovány následující modely, zohledňující odlišné parametry (koncentraci spermatu, jejich motilitu a rychlost) pro vysvětlení poměrného zastoupení mlíčka v potomstvu (p).

Pro skupinu potomstva označenou jako „*V-progenies*“ byly testovány následující modely:

Model 1, předpokládající poměrné zastoupení mlíčáků v potomstvu ($p_{1i} = 0.2$ pro každého z mlíčáků).

Model 2, který zohledňuje koncentraci spermatu ($p_{2i} = C_i / \sum C_i$), kde C_i je zjištěnou koncentrací spermatu, viz. **3.1.3 Určení koncentrace spermií**.

Model 3, který kromě koncentrace zohledňuje motilitu spermatu ($p_{3i} = C_i M_i / \sum C_i M_i$), kde M_i vyjadřuje motilitu spermií v čase 15s od jejich aktivace.

Model 4, které kromě předchozí faktorů zohledňuje také rychlost pohybu spermií ($p_{4i} = C_i M_i V_i / \sum C_i M_i V_i$), kde V_i je zjištěnou rychlostí spermií v čase 15s od jejich aktivace.

U skupiny potomstva označené jako “*N progenies*” díky kvantifikaci dávky spermatu k oplození je model pro rovnoměrné zastoupení mlíčáků (**Model 1**) a model zohledňující koncentraci spermatu (**Model 2**) ekvivalentní. Pro další statistické zpracování jsou označeny jako **Model 2**. Další dva modely zůstávají nezměněny.

Tyto hypotézy jsou testovány podle logaritmicko-pravděpodobnostní rovnice k testování hypotéz, podle vzorce:

$$\log \left(\frac{P(X|Mod_a)}{P(X|Mod_b)} \right) = \sum_i N_i \log \left(\frac{p_{ai}}{p_{bi}} \right),$$

kde X nahrazuje zjištěný soubor dat a N_i vyjadřuje

zjištěné zastoupení mlíčáka i v analyzovaném potomstvu. Testování hypotéz bylo prováděno pomocí programu SAS-Freq®.

Výsledkem testování hypotéz jsou odhady pravděpodobnosti uvedené v následujících dvou tabulkách.

Tabulka 12: Testování hypotetických modelů –“*N progenies*”

„V“	odhad pravděpodobnosti			
	<i>Model 1</i>	<i>Model 2</i>	<i>Model 3</i>	<i>Model 4</i>
<i>Model 1</i>		15,5	21,6	26,9
<i>Model 2</i>			5,9	11,3
<i>Model 3</i>				5,4

Tabulka 13: Testování hypotetických modelů – „V-progenies“

„N“	odhad pravděpodobnosti		
	<i>Model 1</i>	<i>Model 3</i>	<i>Model 4</i>
<i>Model 1</i>		6,6	11,7
<i>Model 3</i>			5,2

Jestliže je pak vzájemné porovnání pravděpodobnosti těchto modelů vyjádřeno

vztahem: $\log\left(\frac{P(X|Mod4)}{P(X|Mod3)}\right)$, prostým odlogaritmováním tohoto vztahu pak určíme kolikrát je jeden ze vztahů pravděpodobnější. Podle nejnižších hodnot v tabulkách je pak zřejmé, že nejpravděpodobnějším modelem pro vysvětlení variability zastoupení jednotlivých mlíčáků je **Model 4**, zohledňující koncentraci, motilitu i rychlost pohybu spermií použitých k oplození. Odlogaritmováním tohoto vztahu pak le možno určit, že pravděpodobnost **Modelu 4** je oproti **Modelu 3** rovna v případě „V-progenies“ hodnotě $10^{5,4}$ a v případě „N-progenies“ hodnotě $10^{5,2}$, tj. tyto modely jsou řádově statisíckrát pravděpodobnější než **Model 3**.

Model zohledňující faktory jako koncentraci spermatu, motilitu spermií a jejich rychlost se jeví jako nejpravděpodobnější z testovaných modelů. Z tabulky popisující zastoupení mlíčáků v potomstvu (kap. 4.4, Tabulka 11: Zastoupení mlíčáků v potomstvu) a ze statistického zpracování sledovaných faktorů (líhivost, oplozenost, motilita a rychlost pohybu) je patrné, že i pro jedince u kterých nebyly prokázány statisticky významné rozdíly sledovaných faktorů (M1 a M5, M2 a M3) se analýzou paternity prokazuje relativně vysoká variabilita v zastoupení těchto mlíčáků v potomstvu.

5. DISKUSE

V rámci experimentu byly vytvořeny 2 skupiny potomstva, první ze skupin vznikla oplozením jiker jednotným objemem spermatu 5ti mlíčáků (“*V-progenies*”), druhá ze skupin vznikla oplozením jiker dávkou kvantifikovanou početně podle zjištěné koncentrace spermatu (“*N-progenies*”).

Určení paternity 250 jedinců z každé ze skupin potomstva pomocí mikrosatelitních markerů prokázalo statisticky významný vliv kvantifikace množství spermií k oplození skupiny ozn. “*N-progenies*” odlišným zastoupením všech pěti mlíčáků v obou skupinách potomstva.

K oplození jiker bylo použito sperma s vysokou úrovní motility. K oplození jiker bylo v obou případech použito množství spermatu odpovídající poměru 200 000 ks spermií na jikru, odpovídající množství doporučenému pro umělou reprodukci kapra (Linhart a kol., 2003). Takto vysoké množství spermií by mělo eliminovat rozdíly v motilitě a rychlosti pohybu spermií jednotlivých mlíčáků ($96-152 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Stejný poměr spermií na jikru byl použit i v případě kontroly oplozenosti a líhivosti, jejíž vyhodnocením byly nejprve prokázány rozdíly v určované oplozenosti ($\alpha=0,05$), líhivost jiker oplozených spermatem mlíčáků v rámci této kontroly však byla vyrovnaná. Motilita spermií rovněž nevykazovala statisticky významné rozdíly ($\alpha=0,05$). Rychlost pohybu spermií v čase 15s od aktivace vykazovala statisticky významné rozdíly. Fisherův LSD k určení signifikantních rozdílů mezi jednotlivými kombinacemi mlíčáků (kap. 4.3.1, Tabulka 10:LSD test - rychlost) určil za statisticky významně nižší rychlost pohybu spermií mlíčka označeného jako **M4**, jehož podíl je v obou skupinách nejnižší. V případě mlíčka s označením **M4** lze usoudit že výrazně nižší rychlost pohybu spermií negativně ovlivnila úspěšnost oplození Podle LSD testu nebyly statisticky signifikantní rozdíly v rychlosti pohybu spermií mezi dvěma páry mlíčáků – **M1** a **M5**, **M2** a **M3**. Zastoupení těchto mlíčáků v rámci potomstva *N-progenies* bylo však velmi rozdílné (kap. 4.4, Tabulka 11:Zastoupení mlíčáků v potomstvu). Pro mlíčky **M1** a **M5** byl tento rozdíl představován procentuálním zastoupením mlíčka v potomstvu *N-progenies* v hodnotách **32,4** a **6%**, u mlíčáků **M2** a **M3** činilo jejich zastoupení v potomstvu **18** a **41,2%**.

Nevyrovnané zastoupení těchto mlíčáků by podporovalo předpoklad, že na oplození působí další faktory a je představováno zejména interakcemi na bázi mlíček-jikernačka,

resp. vajíčko-spermie. Vliv motility a rychlosti pohybu se však výrazně podepsal na uplatnění jedné z ryb.

Kompetici spermií kapra obecného studoval **Linhart (2005)**. Kompetice spermií byla sledována podle paternity potomstva získaného oplozením 5g jiker spermatem dvou samců, k oplození bylo použito sperma s vyrovnanou úrovní motility (93-100%). Oplození bylo realizováno v poměru 200 000 spermií na jikru a od každého z mlíčáků byla použita dávka představující poloviční podíl celkového počtu spermií. Otcovství bylo určováno pomocí barvy potomstva - 5 normálních mlíčáků (dominantně homozygotních) a 6 mlíčáků Koi (recesivně homozygotních) bylo použito k oplození jiker heterozygotní jikernačky. Testováno bylo všech 30 vzájemných kombinací mlíčáků obou skupin, vyhodnocováno bylo uplatnění spermií jednotlivých mlíčáků v potomstvu. Uplatnění jednotlivých mlíčáků v potomstvu vykazovalo velmi vysokou variabilitu, pro kterou se nepodařilo najít vysvětlení jen v rozdílných hodnotách rychlosti pohybu spermií ($112-163 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$).

Výsledky této diplomové práce, stejně jako výsledky **Linharta (2005)**, kontrastují s výsledky které získal sledováním kompetice spermií na úrovni "in vitro" fertilizace u lososa **Gage a kol., 2004**. Gage použil 18 mlíčáků v 9 párech k oplození jiker 9 různých jikernaček. V rámci experimentu bylo oplozeno kolem 500 ks jiker spermatem dvou mlíčáků a to ve dvou opakováních. Poprvé bylo použito sperma obou mlíčáků v objemovém poměru 1:1 a podruhé v poměru 1:2. Relativní úspěch oplození byl určován na základě analýzy mikrosatelitů u přibližně 30 jedinců z každé skupiny. Relativní úspěšnost samců při oplození byla porovnáвана s charakteristikami spermatu použitého k oplození - koncentrace, motilita, rychlost pohybu (10s od aktivace), délka pohyblivosti spermií a samotná délka spermií. Vícenásobná regresní statistika prokázala že motilita spermií a také jejich délka nikterak neovlivnily výsledky experimentu. Naproti tomu rychlost pohybu spermií ovlivňovala úspěšnost oplození pozitivně a délka jejich pohyblivosti ovlivňovala oplození negativně. Zjištění že rychlost spermií ovlivnila úspěšnost oplození více než jejich počet nebo zjištěná motilita koliduje s teorií kompetice, podle které mlíčáci dosahují většího vlivu vyšší produkcí gamet (**Parker, 1982**).

Podle různého zastoupení mlíčáků jejichž sperma vykazuje podobné parametry (oplozenost, líhnivost, motilita a rychlost pohybu spermií) by šlo usoudit že na úspěšnost

oplození mohou působit i další faktory, představované interakcemi mezi vajíčkem a spermií. Možnost že oplození je ovlivňováno interakcemi mezi vajíčkem a spermií uvádí i **Birkhead a Møller (1998)**. Takové interakce, založené na bázi kompatibility lokusů primárně kontrolujících imunokompatibilitu, byly zdokumentovány například u myši domácí (**Wedekind, 1995, 1996, Acaro a Eklund, 1999**). MHC lokusy (*Major Histocompatibility Complex*) jsou základem imunitního systému obratlovců, stále více je však dokumentována i jejich role při pohlavním výběru - “*mate choice*” (**Penn a Potts, 1999, Wedekind, 2002, review Piertney a Oliver, 2006**) a jako faktor ovlivňující „*non-random gamete fusion*“ (**Wedekind, 1995**). Tyto lokusy jsou vysoce polymorfními u většiny obratlovců a jejich polymorfismus pak umožňuje následnou selekci (**Apanius a kol., 1997, Penn a Potts, 1999**

Role MHC lokusů při pohlavním výběru byla sledována i u ryb. **Landry a kol. (2001)** prokázali, že jedinci lososa *Salmo salar* preferovali při pohlavním výběru jedince opačného pohlaví, kteří byli výrazně odlišní v genotypu MHC lokusů, aby zvýšili heterozygotnost a tím pravděpodobně i kondici a přežití potomstva. U koljušky *Gasterosteus aculeatus* bylo popsáno doslova “počítání allel”. **Reusch a kol. (2001)** sledovali diverzitu MHC lokusů IIB reprezentovaných celkem šesti lokusy. Bylo prokázáno, že samice preferovaly samce s vyšším počtem allel oproti samcům s počtem allel nízkým.

Wedekind a kol.(2004) sledovali “*Cryptic Female Choice*” respektive vliv MHC lokusů na fúzi gamet u síhů *Coregonus sp.* v podmínkách umělé reprodukce. Žádný vliv MHC lokusů na fúzi gamet při oplození však nebyl nalezen. Autor tuto skutečnost vysvětluje podstatou MHC lokusů signalizovat příbuznost či podobnost jedinců a zabránit inbreedingu, přičemž riziko inbreedingu je při rozmnožování velkých populací síhů minimální. Zároveň **Wedekind (2004)** popisuje 3 alternativy pro “*Cryptic Female Choice*” u rybích druhů s vnějším oplozením, jedna z alternativ je založena na selektivním vlivu ovariální plazmy, další dvě z těchto alternativ jsou založeny na selektivním vlivu samotných gamet při jejich fúzi.

U ryb byla role MHC zatím zdokumentována při pohlavním výběru, potencionálně by však mohla být i faktorem ovlivňujícím fúzi gamet ve vodním prostředí tak, aby nedocházelo čistě k náhodnému splynutí gamet.

6. Z Á V Ě R

V rámci experimentu byly získány dvě skupiny potomstva, jedna z nich byla získána oplozením jiker jednotným objemem spermatu pěti různých mlíčáků. Druhá byla naopak získána oplozením jiker vyrovnaným počtem spermií od každého z těchto pěti mlíčáků.

Paternita byla určována u 250 jedinců z každé skupiny pomocí mikrosatelitních markerů MFW1, MFW6, MFW7 a MFW28. Díky výběru vhodných generačních ryb bylo možno identifikovat otcovství u všech analyzovaných jedinců. Sledováno bylo zastoupení jednotlivých mlíčáků v obou skupinách potomstva ve vztahu k parametrům jejich spermatu (koncentrace, motilita, rychlost pohybu) a ve vztahu k výsledkům kontroly oplozenosti a líhivosti.

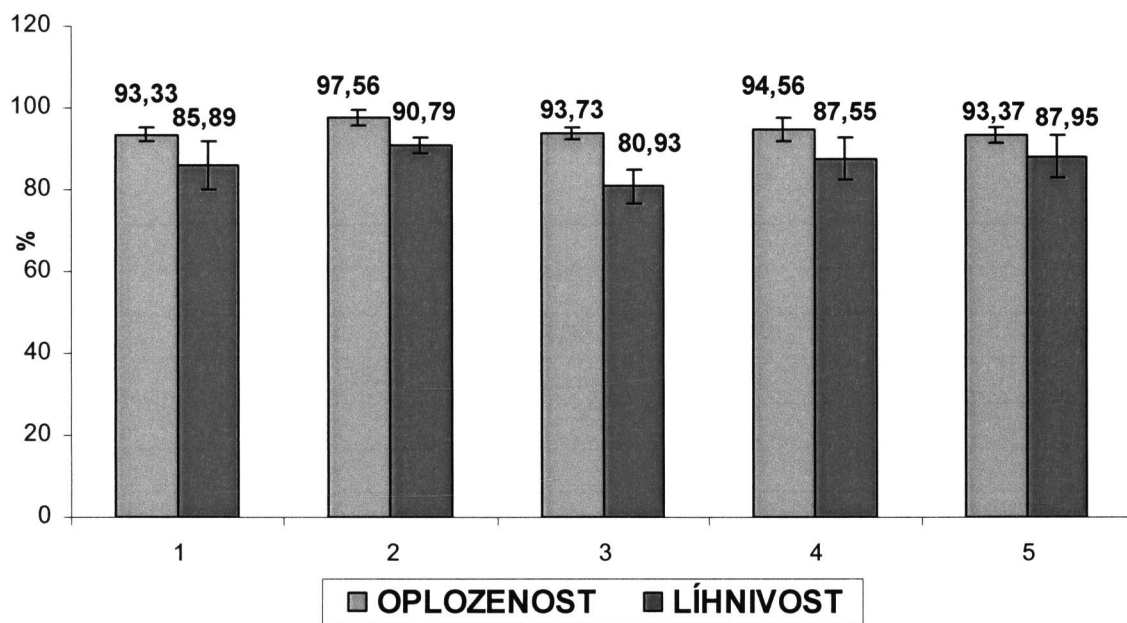
V zastoupení mlíčáků v obou skupinách potomstva byly na základě chi-kvadrát statistiky nalezeny statisticky významné rozdíly mezi skupinou potomstva vzniklou oplozením jiker stejným objemem spermatu od každého z mlíčáků ($\chi^2=189$, 4 d.f., $p<0.0001$) a skupinou vzniklou oplozením jiker početně kvantifikovanou dávkou spermatu ($\chi^2=139$, 4 d.f., $p<0.0001$).

Z testování hypotetických modelů pro vysvětlení zastoupení mlíčáků v obou skupinách potomstva (zohledňujících faktory jako koncentraci spermatu, motilitu spermií a rychlost jejich pohybu) se jeví jako nejpravděpodobnější z testovaných modelů právě ten, který zohledňující veškeré tyto sledované faktory.

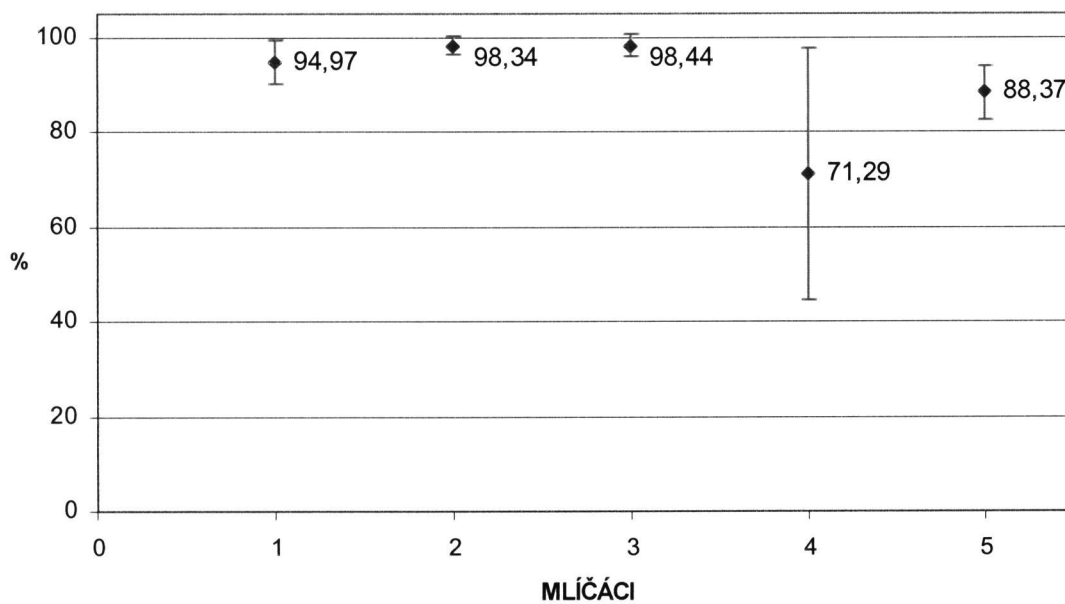
Ze statistického zpracování výsledků kontroly oplozenosti a líhivosti, určení motility a rychlosti pohybu spermií je patrné, že i mezi mlíčáky pro které nebyly prokázány statisticky významné rozdíly ($\alpha=0,05$; v líhivosti, motilitě a rychlosti pohybu spermií) se objevují relativně vysoké rozdíly v zastoupení těchto ryb v potomstvu.

7. PŘÍLOHA

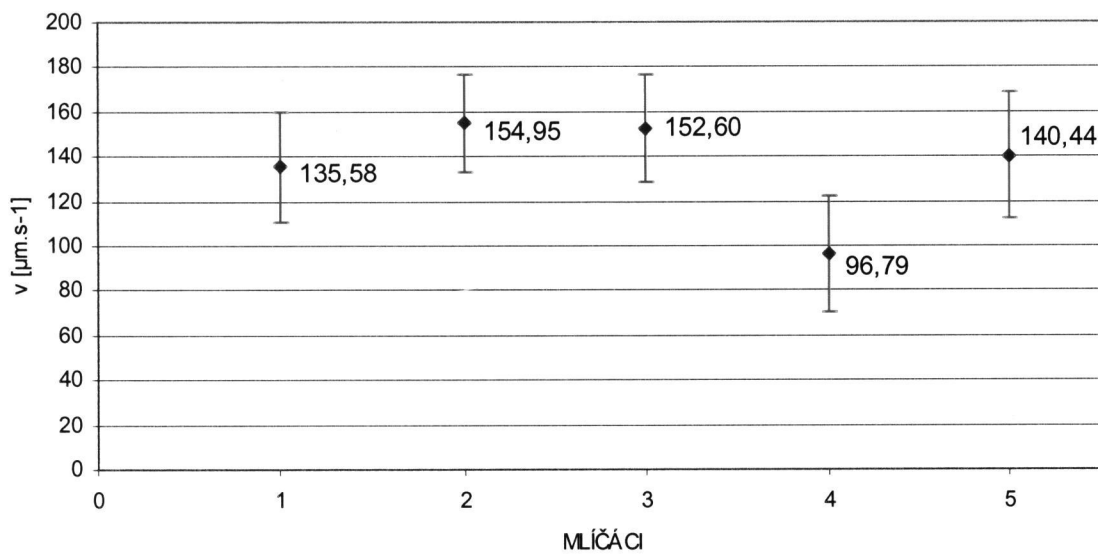
Graf 1: Kontrola oplozenosti a líhnivosti



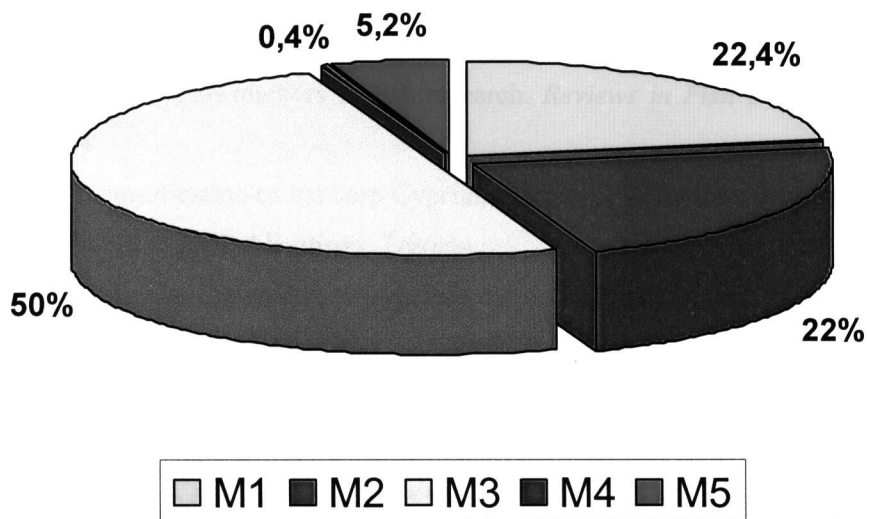
Graf 2: Motilita spermií mlíčáků M1-M5 v čase 15s od aktivace



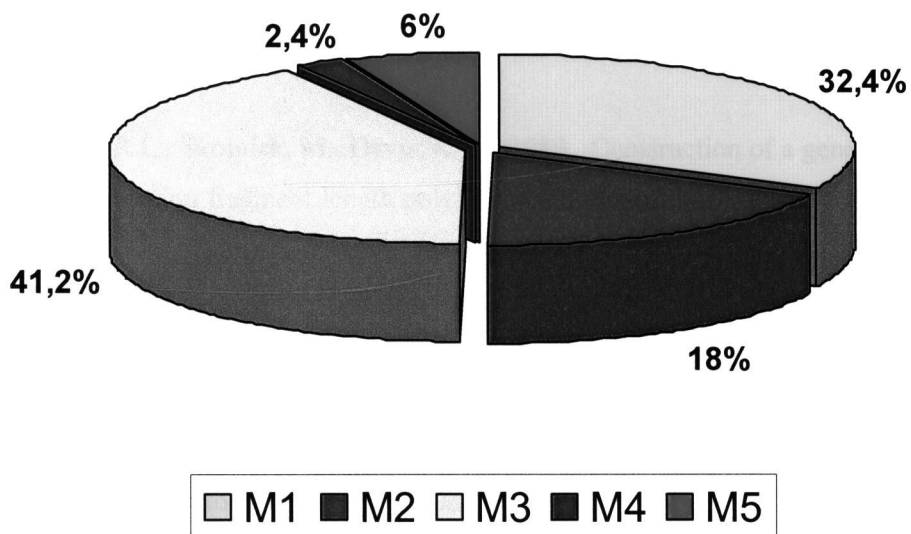
Graf 3: Rychlost pohybu spermií mlíčáků M1 až M5 v čase 15s od aktivace



Graf 14: Zastoupení mlíčáků v potomstvu "V-progenies"



Graf 15: Zastoupení mlíčáků v potomstvu "N-progenies"



8. L I T E R A T U R A

- Aliah, R.S., Takagi, M., Dong, S., Teoh, C.T., Taniguchi, N., 1999. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio*. *Fisheries Science* 65, 235-239.
- Apanius, V., Penn, D., Slev, P.R., Ruff, L.R., Potts, W.K., 1997. The nature of selection on the major histocompatibility complex, *Critical Reviews in Immunology* 17, 179-224.
- Bahy, A.A., Tian-Hua, H., Da-Nian, Q., Xiao-Mei, W., 2004. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14(4), 1573-5184.
- Balon, E.K., 1974. Domestication of the carp *Cyprinus carpio* L. Toronto: Royal Ontario Museum Life Science Miscellaneous Publications. Toronto.
- Balon, E.K., 1969. Studies on the wild carp *Cyprinus carpio* L. Royal Ontario Mus. Life Sci. Misc. Publ., Toronto. 37 pp.
- Balon, E.K., 1995. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture* 129: 3-48
- Balon, E.K., 2004. About the oldest domesticates among fishes. *Journal of Fish Biology* 65, 1-27.
- Bartfai, R., Egedi, S., Yue, G.H., Kovacs, B., Urbanyi, B., Tamas, G., Horvath, L., Orban, L., 2003. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD nad microsatellite markers. *Aquaculture* 219, 157-167.
- Berg, L.S., 1964. Freshwater Fishes of the U.S.S.R. and the Adjacent Countries, vol.2. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 496 pp.
- Billard, R., Cosson, J., Perchec, G, Linhart, O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* 129, 95-112.
- Birkhead, T.R., Møller, A.P., 1998. Sperm Competition and Sexual Selection, Academic Press, London.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 43(3), 314-31.
- Burnes, G., Casselman, S.J., Schulte-Hostedde, A.I., Moyes, C.D., Montgomerie, R., 2004. Sperm swimming speed and energetics vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 56, 65-70.
- Butcher, A.D., 1962. The implication of the introduction of European carp into Victoria waters. Fish. Wildlife Publ., Victoria, Australia. 73 pp.
- Candolin, U., Reynolds, J.D., 2002. Why do males tolerate sneakers? Tests with European bitterling, *Rhodeus sericeus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 51, 146-152.

- Crooijmans R., Bierboms, V.A.F., Komen, J., VanderPoel, J.J., Groenen, M.A.M., 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Animal Genetics* 28, 129-134.
- David, L., Blum, S., Feldman, M.W., Lavi, U., Hillel, J., 2003. Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution* 20(9),1425-1423.
- David, L., Rajasekaran, P., Fang, J., Hellel, J., Lavi, U., 2001. Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and new set of microsatellite markers. *Molecular Genetics and Genomics* 266, 353-362.
- Desvignes, J.F., Laroche, J., Durand, J.D., Bouvet, Y., 2001. Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites. *Aquaculture* 194, 291-301.
- Eberhard, W.G., 1996. *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice*. Princeton University Press, Princeton.
- Erzaz, M.T., Sayeed, S., McAndrew, B.J., Penman, D.J., 2004. Use of microsatellite loci and AFLP markers to verify gynogenesis and clonal lines in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research* 35(15), 1472-1481.
- Estoup, A., Gharbi, K., SanCristobal, M., Chevalet, C., Haffray, P., Guyomard, R., 1998. Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science* 55: 715-725.
- Gage, M.J.G., Macfarlane, Ch.P., Yeates, S., Ward, R.G., Searle, J.B., Parker, G.A., 2004. Spermatozoal Traits and Sperm Competition in Atlantic Salmon: Relative Sperm Velocity Is The Primary Determinant of Fertilization Success. *Current Biology* (14), 44-47.
- Gage, M.J.G., Stockley, P., and Parker, G.A. (1995). Effects of alternative male mating strategies on characteristics of sperm production in the Atlantic salmon (*Salmo salar*): theoretical and empirical investigations. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol.Sci.* 350, 391-399.
- Gage, M.J.G., Stockley, P., and Parker, G.A. (1998). Sperm morphometry in the Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 53, 835-840.
- Gerber, S, Mariette, S., Streiff, R., Bodénés, C., Kremer, A., 2000. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology* 9, 1037-1048.
- Goldstein, D.B., Pollock, D.D., 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity* 88, 335-342.
- Grobler, J.R., Kotze, A., Swart, H., Hallerman, E.M., 2005. The application of microsatellite DNA markers for forensic analysis of koi carp (*Cyprinus carpio*). *South African Journal of Science* 101 (1-2), 19-21.

- Gross, R., Kohlman, K., Kersten, P., 2002. PCR-RFLP analysis of the mitochondrial ND-3/4 and ND-5/6 gene polymorphism in the European and East Asian subspecies of common carp (*Cyprinus carpio*, L.). *Aquaculture* 204, 507-516.
- Hammond, R.L., Saccheri, I.J., Ciofi, C., Coote, T., Funk, S.M., McMillan, W.O., Bayes, M.K., Taylor, E., Bruford, M.W., 1998. Isolation of microsatellite markers in animals. In: *Molecular Tools for Screening Biodiversity*, Eds. Karp, A., Isaac, P.G., Ingram, D.S. Chapman & Hall, London.
- Hansen, M., Kenchington, E., Nielsen, E.E., 2001. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers. *Fish and Fisheries* 2, 93-112.
- Harris, H., Hopkinson, D., 1976. *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*. American Elsevier, New York.
- Hulata, G., 1995. A review of genetic improvement of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and other cyprinids by crossbreeding, hybridization and selection. *Aquaculture* 129, 143-155.
- Hutchinson, W.F., Carvalho, G.R., Rogers, S.I., 1999. A nondestructive technique for the recovery of DNA from dried fish otoliths for subsequent molecular genetic analysis. *Molecular Ecology* 8, 893-894.
- Cheverud, M.J., Routman, E., 1993. Quantitative trait loci: Individual gene effects on quantitative characters. *Journal of Evolutionary Biology* 6, 463-480.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., 1985a. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314, 67-73.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., 1985b. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316, 76-79.
- Jubb, R.A., 1967. *Freshwater fishes of Southern Africa*. Capetown, A.A. Balkema, 248 pp.
- Kirpichnikov, V.S., 1967. Homologous inherited variation and evolution of the wild carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genetica* 3,(2): 34-47. [Rusky].
- Kirpichnikov, V.S., 1999. *Genetic and Breeding of Common Carp*, INRA, Paris.
- Knapik, E.W. a kol., 1998. A microsatellite linkage map for zebrafish (*Danio reiro*). *Nature Genetics* 18 (4), 338-343.
- Kohlman, K., Kersten, P., 1999. Genetic variability of German and foreign common carp (*Cyprinus carpio*, L) populations. *Aquaculture* 173, 435-455.
- Kohlmann, K., Gross, R., Murakaeva, A., Kersten, P., 2003. Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Aquatic Living Resources* 16, 421-431.
- Kohlmann, K., Kersten, P., Flajšhans, M., 2005. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Aquaculture* 247 (1-4), 253-266.

- Komen, J., 1990. Clones of common carp, *Cyprinus carpio*. New perspectives in fish research. Wageningen, The Netherlands. 169 pp.
- Kortet, R., Vainikka, A., Rantala, M.J., Taskinen, J., 2004. Sperm quality, secondary sexual characters and parasitism in roach (*Rutilus rutilus* L.) *Biological Journal of The Linnean Society* 81 (1), 117-117.
- Landry, C., Garant, D., Duchesne, P., Bernatchez, L., 2001. Good genes as heterozygosity: the major histocompatibility complex and mate choice in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Proc. R. Soc. Lond. B.* 268, 1279-1285.
- Lansman, R.A., Shade, R.O., Shapiro, J.F., Avise, J.C., 1981. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations III. Techniques and potential applications. *Journal of Molecular Evolution* 17, 214-226.
- Leach, B., Montgomerie, R., 2001. Sperm characteristics associated with different male reproductive tactics in bluegills (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 49, 31-37.
- Lehoczky, I., Jeney, Z., Magyary, I., Hancz, C., Kohlmann, K., 2005b. Preliminary data on genetic variability and purity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains kept at the live gene bank at Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation (HAKI) Szarvas, Hungary. *Aquaculture* 247, 45-49.
- Lehoczky, I., Magyary, I., Hancz, C., Weiss, S., 2005a. Preliminary studies on the genetic variability of six Hungarian common carp strains using microsatellite DNA markers. *Hydrobiologia* 533, 223-228.
- Linhart, O., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Rodriguez, M., 2003. Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of eggs stickiness. *Aquatic Living Resources* 16, 450-456.
- Linhart, O., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Vandeputte, M., 2005. Spermatozoal competition in common carp (*Cyprinus carpio*): what is the primary determinant of competition success? *Reproduction* 130, 1-8.
- Litt, M., Luty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44, 397-401.
- Liu, Z.J., 2001. Gene mapping, marker-assisted selection, gene cloning, genetic engineering and integrated genetic improvement programs at Auburn University, p.109-118. In V.V. Gupta and B.O. Acosta (eds.) *Fish genetics research in member countries and institutions of the International Network on Genetics in Aquaculture*. ICLARM Conf.Proc. 64, 179 p.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1-37.

- Love, J.M., Knight, A.M., McAleer, M.A., Todd, J., 1990. Towards construction of a high-resolution map of the mouse genome using PCR-analyzed microsatellites. *Nucleic Acid Research* 18 (14), 4123-4130.
- McCrimmon, H.R., 1968. Carp in Canada, Bulletin of Fisheries Research Board of Canada 165, 94 pp.
- Murakaeva, A., Kohlmann, K., Kersten, P., Kamilov, B., Khabibullin, D., 2003. Genetic characterization of wild and domesticated common carp (*Cyprinus carpio*, L.) populations from Uzbekistan, *Aquaculture* 218, 153-166.
- Neff, B.D., Fu, P., Gross, M.R., 2003. Sperm investment and alternative mating tactics in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology* 14 (5), 634-641.
- Nei, M., Tajima, R., Tateno, Y., 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19, 153-170.
- Nelson, J., 1994. Fishes of the World. Wiley, New York, USA.
- Nielsen, E.E., Hansen, M.M., Loeschke, V., 1999. Analysis of DNA from old scale samples: Technical aspects, applications and perspectives for conservation. *Hereditas* 130, 265-276.
- O'Reilly, P.T., Hamilton, L.C., McConnell, S.K., Wright, J.M., 1996. Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 2292-2298.
- Ohara, K., Dong, S., Taniguchi, N., 1999. High proportion of heterozygotes in microsatellite DNA loci of wild clonal silver crucian carp, *Carassius langsdorfii*. *Zoological Science* 16(6), 909-913.
- Parker, G.A., 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Review* (45), 525-567.
- Parker, G.A., 1982. Why are there so many tiny sperm? Sperm competition and the maintenance of two sexes. *Journal of Theoretical Biology* 96, 281-294.
- Parker, G.A., 1998. Sperm competition and evolution of ejaculates: towards a tudory base. Sperm Competition and Sexual Selection, 3-54. Eds. Birkhead, T.R., Møller, London, Academic Press.
- Parker, G.A., Ball, M.A., Stockley, P., Gage, M.G.J., 1996. Sperm competition games: Individual assessment of sperm competition intensity by group spawners. Proceedings of the Royal Society of London: Academic Press, London.
- Parker, G.A., Simmons, L.W., Kirk, H., 1990. Analysing sperm competition data: Simple models for predicting mechanisms. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 27, 55-65.
- Penn., D.J., Potts., W.K., 1999. The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes. *American Naturalist* 153, 145-164.

- Petersen, C.W., Warner, R.R., 1998. Sperm competition in fishes. *Sperm Competition and Sexual Selection*, 435-164. Eds. Birkhead, T.R., Moller, A.P., Academic Press. London.
- Piertney, S.B., Oliver, M.K., 2006. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity* 96, 7-21.
- Reichard, M, Smith, C., Jordan, W.C., 2004b. Genetic evidence reveals density dependent mediated success of alternative mating behaviours in the European bitterling (*Rhodeus sericeus*). *Molecular Ecology* 13, 1569-1578.
- Reichard, M., Jurajda, P., Smith, C., 2004a. Male-male interference competition decreases spawning rate in the European bitterling (*Rhodeus sericeus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 56, 34-41.
- Reusch, T.B.H., Haberli, M.A., Aeschlimann, P.B., Milinski, M., 2001. Female sticklebacks count alleles in a strategy of sexual selection explaining MHC polymorphism. *Nature* 414., 300-302.
- Ruzzante, D.E., 1998. A comparison of several measures of genetic distance and population structure with microsatellite data: bias and sampling variance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55(1), 1-14.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Manitis, T., 1989. *Molecular Cloning*. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schuler, G.D., Boguski, M.S., Stewart, E.A. and kol., 1996. A gene map of the human genome. *Science* 274, 540-546.
- Sick, K., 1961. Haemoglobin polymorphism in fishes. *Nature* 192, 894-896.
- Slettan, A., Olsaker, I., Lie, O., 1995. Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311, SSOSL417 loci. *Animal Genetics* 13, 1625-1643.
- Smith, 1982. *Evolution and Theory of Games*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Smith, C., Reichard, M, Jurajda, M., 2003. Assessment of sperm competition by European bitterling, *Rhodeus sericeus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 53, 206-213.
- Smith, R., 1984. *Sperm Competition and its Evolution of Animal Mating Systems*. Academic Press, London.
- Stockley, P., Gage, M.J.G., Parker, G.A., Møller, A.P., 1997. Sperm competition in fish: the evolution of testis size and ejaculate characteristics. *American Naturalist* 149, 933-954.
- Stoltz, J.A., Neff, B.D., Olden, J.D., 2005. Allometric growth and sperm competition in fishes. *Journal of Fish Biology* 67, 470-480.
- Sun, X., Liang, L., 2004. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio*, L.) and mapping of a locus associated with cold tolerance. *Aquaculture* 238, 165-172.
- Šlechtová, V., Šlechtá, V., Flajšhans, M., Gela, D., 2002. Protein variability in common carp (*Cyprinus carpio*) breeds in the Czech Republic. *Aquaculture* 204, 241-242.
- Taborsky, M., 1994. Sneakers, Satellites and Helpers - Parasitic and Cooperative Behavior In Fish Reproduction. *Advances In The Study of Behavior* 23, 1-100.

- Taborsky, M., 1998. Sperm competition in fish: "bourgeois" males and parasitic spawning. *Trends in Ecology & Evolution* 13, 222-227.
- Taggart, J., Hynes, R.A., Prodöhl, P.A. and Ferguson, A. 1992. A simplified method for routine total DNA extraction from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology* 40, 963-965.
- Takezaki, N., Nei, M., 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144, 389-399.
- Tanck, M.W.T., Baars, H.C.A., Kohlmann, K., Van der Poel, J.J., Komen, J., 2000. Genetic characterization of wild Dutch common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Research* 31, 779-783.
- Tanck, M.W.T., Palastra, A.P., van de Weerd, M., Leffering, C.P., van der Poel, J.J., Bovenhuis, H., Komen, J., 2001. Segregation of microsatellite alleles and residual heterozygosity at single loci in homozygous androgenetic common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Genome* 44, 743-751.
- Tautz, D., Renz, M., 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12, 4127-4138.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17, 6463-6471.
- Tautz, D., Renz, M., 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12, 4127-4138.
- Tong, J., Wang, Z., Yu, X., Wu, Q., Chu, K.H., 2002. Cross-species amplification in silver carp and bighead carp with microsatellite primers of common carp. *Molecular Ecology Notes* 2(3), 245-247.
- Turner, E., Montgomerie, R., 2002. Ovarian fluid enhance sperm movement in Arctic charr. *Journal of Fish Biology* 60, 1570-1579.
- Utter, F.M., 1991. Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. *Journal of Fish Biology* 39, 1-20.
- Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S. a kol., 2004. Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Aquaculture* 235 (1-4), 223-236.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M. et al. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414.
- Ward, R.D., Grewe, P., 1994. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4, 300-325.
- Weber, J.L., May, P.E., 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* 44, 388-396.
- Weber, J.L., Wong, C., 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2, 1123-1128.

- Wedekind, C., 2002. Sexual Selection and Life-History Decisions: Implications for Supportive Breeding and the Management of Captive Populations, *Conservation Biology* 16(5), 1204-1211.
- Wedekind, C., Walker, M., Portmann, J., Cenni, B., Müller, R., Binz, T., 2004. MHC-linker susceptibility to a bacteria infection, but no MHC-linked cryptic female choice in whitefish. *Journal of Evolutional Biology* 17, 11-18.
- Wigby, S., Chapman, T., 2004. Sperm competition. *Current Biology* 14(3), R100-R103.
- Williams, G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleid Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Wright, J.M., 1993. DNA fingerprinting in fishes. Eds. Hochachka, P.W., Mommsen, . Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Elsevier, Amsterdam, 58-91.
- Wright, J.M., Benzen, P., 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4, 384-388.
- Yan, J., Liu, S., Sun, Y., Zhang, Ch., Luo, K., Liu, Y., 2005. RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) x common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 243, 49-60.
- Yue, G.H., Ho, M.Y., Orban, L., Komen, J., 2004. Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp. *Aquaculture* 234, 85-98.
- Yue, G.H., Orban, L., 2002. Polymorphic microsatellites from silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*, Bloch) and cross-amplification in common carp (*Cyprinus carpio*). *Molecular Ecology Notes* 2, 534-536.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1-16.
- Zheng, W, Stacey, N.E., Coffin, J., Strobeck. C., 1995. Isolation and characterization of microsatellite loci in the goldfish *Carassius auratus*. *Molecular Ecology* 4, 791-792.
- Zhou, J., Wu, Q., Wang, Z., Ye, Y., 2004. Genetic variation analysis within and among six varieties of common carp (*Cyprinus carpio*, L.) in China using microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics* 10, 1144-1148.

ČESKÁ UNIVERZITA
 PRAHA
 FAKULTA
 ZEMĚDĚLSKÁ
 Studijní středisko
 Studentská 13
 165 00 Praha 6