



Fakulta rybnářství  
a ochrany vod  
Faculty of Fisheries  
and Protection  
of Waters

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

# Hromadná indukce gynogeneze a androgeneze u kapra obecného (*Cyprinus carpio*)

V. Kašpar, M. Rodina, M. Flajšhans



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ





Fakulta rybnářství  
a ochrany vod  
Faculty of Fisheries  
and Protection  
of Waters

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

# **Hromadná indukce gynogeneze a androgeneze u kapra obecného (*Cyprinus carpio*)**

---

V. Kašpar, M. Rodina, M. Flajšhans

**Vodňany**

**Vydání a textová příprava publikace byly uskutečněny za finanční podpory projektu:**

***Posílení excelence vědeckých týmů na FROV JU***

*(CZ.1.07/2.3.00/20.0024)*



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

***Obsahová část publikace byla zpracována za finanční podpory následujících projektů:***

***Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz – CENAKVA***

*(CZ.1.05/2.1.00/01.0024) 30%*

***AQUAEXCEL – Aquaculture infrastructures for excellence in European fish research***

*(7. RP) – 50%*

***Výsledky projektu LO1205 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu***

***NPU I – 10%***

***Na financování obsahové části metodiky se příspěvkem z neveřejných zdrojů***

***financování podílel rovněž podnik: BaHa s.r.o. – divize Rybářství – 10%***

***Poděkování***

*Autoři děkují poskytovatelům výše zmíněných projektů a podniku BaHa s.r.o. – divize Rybářství za jejich finanční podporu. Autoři dále upřímně děkují zaměstnancům Genetického rybářského centra a dalšímu personálu z Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, bez jejichž pomoci by nebylo možné uskutečnit náročné experimenty, publikace předcházející vzniku této metodiky a pracovat na řešení výše uvedených projektů.*



č. 145

ISBN 978-80-87437-88-9

<b>1. CÍL METODIKY</b>	<b>6</b>
<b>2. METODIKA HROMADNÉ INDUKCE GYNOGENEZE A ANDROGENEZE U KAPRA OBECNÉHO (<i>CYPRINUS CARPIO</i>)</b>	<b>6</b>
2.1. Úvod	6
2.2. Uniparentální dědičnost	7
2.3. Využití indukce uniparentální dědičnosti	8
2.4. Umělá (indukovaná) gynogeneze	8
2.5. Androgeneze	10
2.6. Umělá reprodukce kapra a získávání pohlavních produktů	11
2.7. Inaktivace genetické informace	13
2.8. Ozařování spermatu pro mitotickou a meiotickou gynogenezi, optimalizace dávky záření	14
2.9. Ozařování jiker pro androgenezi, optimalizace dávky záření	16
2.10. Kontrola gynogeneze či androgeneze pomocí typu ošupení potomstva	18
2.11. Obnova diploidního stavu	20
2.12. Ověření úspěšnosti indukce uniparentální dědičnosti	23
<b>3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“</b>	<b>25</b>
<b>4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY</b>	<b>26</b>
<b>5. EKONOMICKÉ ASPEKTY</b>	<b>26</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY</b>	<b>26</b>
<b>7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE</b>	<b>29</b>

## 1. CÍL METODIKY

### Cílem této metodiky je:

- Poskytnout krátký úvod do problematiky uniparentální dědičnosti.
- Definovat kritické body indukce uniparentální dědičnosti – mitotické a meiotické gynogeneze a androgeneze u kapra obecného (*Cyprinus carpio*).
- Popsat způsoby indukce uniparentální dědičnosti – mitotické, meiotické gynogeneze a androgeneze u kapra obecného a dále popsat způsob jakým lze manipulovat s gametami kapra obecného a úspěšně zvládnout všechny kroky nutné k indukci uniparentální dědičnosti v hromadném měřítku.

## 2. METODIKA HROMADNÉ INDUKCE GYNOGENEZE A ANDROGENEZE U KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)

### 2.1. Úvod

Kapr obecný (*Cyprinus carpio*) tvoří v současné době více než 85 % produkce ryb v České republice (17 972 t v roce 2012, statistika Rybářského sdružení ČR). V České republice je v současné době chována celá řada plemen kapra obecného. Národní program uchovávání a využití genetických zdrojů má za cíl uchování čistých plemen a linií ryb pro potřeby udržitelného rozvoje vodního hospodaření. V chovu ryb se široce využívá umělá reprodukce, a to jak za účelem získání obsádek pro akvakulturní produkci ryb, tak k obnově hejn zařazených do Národního programu uchování a využití genetických zdrojů. Cílem umělé reprodukce prováděné za účelem obnovy generačních hejn a získání remontních ryb pro zařazení do programu uchování genetických zdrojů je zachování genetické variability. Za tímto účelem byl i vytvořen ucelený postup reprodukce vedoucí k maximálnímu možnému zachování genetické variability potomstva (Kocour a kol., 2012). Zachování genetické variability potomstva a zachování maximální možné variability genů znamená v tomto případě zachování adaptability potomstva či zachování potenciálu těchto genů pro další plemenářskou práci, neboť snížení genetické variability a inbreeding má většinou pak za následek snížení adaptability, životaschopnosti, odolnosti nebo fitness (Flajšhans a kol., 2013).

Cílem reprodukce však nemusí být vždy zachování širokého spektra genů v následující generaci, pro určité aplikace mohou být dokonce žádoucí populace s omezenou variabilitou genů – isogenní či klonální linie. Isogenní linie jsou vysoce inbrední linie vzniklé na základě genomových manipulací – např.

## HROMADNÁ INDUKCE GYNOGENEZE A ANDROGENEZE U KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)

několika generací reprodukováných pomocí meiotické gynogeneze, kdy cílem je omezit variabilitu vznikajícího potomstva. Klonální linie jsou pak kompletně homozygotní linie vzniklé na základě dvou generací reprodukováných pomocí mitotické gynogeneze či androgeneze.

Ryby jsou v současnosti třetí nejrozšířenější skupinou laboratorních zvířat a vedle produkčního významu je kapr obecný důležitým modelovým druhem využívaným v řadě studií. Direktivy EHS a OECD uvádějí kapra obecného jako jeden z možných druhů a nejčastěji je využíván pro embryologické testy toxicity. Kapr obecný je tak využíván jako modelový druh v celé řadě toxikologických studií, kde je zkoumán mechanismus účinku různých látek nebo jejich směsí. Zkoumána jsou i virová, bakteriální nebo parazitární onemocnění kapra nebo kaprovitých ryb, jejich průběh a intenzita průběhu těchto onemocnění v různých podmínkách a efekt onemocnění na organismus v rámci imunologických studií. Využíváním isogenních či klonálních linií ryb by stejně jako využíváním isogenních či klonálních linií dalších druhů laboratorních zvířat mělo být dosaženo vyšší opakovatelnosti a lepší reprodukovatelnosti různých experimentů a tím i redukce počtu jedinců nutných k dosažení reprodukovatelného výsledku. Ačkoliv je v případě ostatních laboratorních zvířat (bezobratlých i obratlovců) využívání standardizovaných linií běžnou praxí, ryby jsou doposud jistou výjimkou. Použití isogenních či klonálních linií může v tomto případě zajistit jistou standardizaci a zvládnutí meiotické a mitotické gynogeneze (příp. androgeneze) v měřítku větším než experimentálním, je předpokladem pro úspěšné zakládání takových linií ryb.

---

### 2.2. Uniparentální dědičnost

---

Uniparentální dědičnost je takovým typem dědičnosti, kdy potomstvo získá genetickou informaci – jadernou DNA – pouze jednoho z jedinců, jehož pohlavní produkty (gamety) se účastnily procesu oplození (Flajšhans a kol., 2013).

K těmto procesům může v přírodě docházet spontánně (asexuální nebo také unisexuální rozmnožování) nebo je lze v chovu ryb vyvolávat cíleně a využívat ucelených metod a postupů k docílení uniparentální dědičnosti. Historie vzniku těchto metod sahá až do čtyřicátých let minulého století (Makino a Ozima, 1943) a většího zájmu se metody indukce uniparentální dědičnosti dočkaly zejména v 60. a 70. letech 20. století (Purdom, 1969; Cherfas, 1975; Nagy a kol., 1978), v případě androgeneze ještě o něco později (např. Grunina a kol., 1995; Bongers a kol., 1994). Indukce uniparentální dědičnosti a literatura věnující se indukci uniparentální dědičnosti u ryb byla v minulosti shrnuta v několika přehledových studiích (např. Komen a Thorgaard, 2007, Gomelsky, 2003; Flajšhans a kol., 2013).

---

### 2.3. Využití indukce uniparentální dědičnosti

---

Mitotickou gynogenezí a androgenezí lze produkovat homozygotní potomstvo nesoucí genetickou informaci matky nebo otce a opakovaným ošetřením pak získat mateřské nebo otcovské klonální linie, u nichž jsou eliminovány subletální a letální geny. Klonální linie mají velký význam například ve výzkumu přenosu genů nebo v imunologii a stejně tak je lze využívat ke vzájemnému křížení a vyhledávání specifické kombinační návaznosti, a tedy k produkci vysoce užitkových kříženců k chovu (např. Horváth a Orbán, 1995).

Praktické použití těchto metod je však limitováno nízkou efektivitou indukce uniparentální dědičnosti, která je samozřejmě především následkem nutnosti inaktivovat DNA druhé rodičovské gamety různými typy záření, a dále je limitováno vysokou embryonální mortalitou vzhledem k zásahům v období 1. mitózy, nutným k reduplikaci rodičovského genomu na diploidní úroveň v případě mitotické gynogeneze a androgeneze (podle Flajšhans a kol., 2013).

V případech druhů nebo linií, které jsou bezprostředně ohroženy vymizením, lze uvažovat použití gynogeneze k získání potomstva, máme-li k dispozici pouze jikernačky. Použitím kryokonzervovaného spermatu a následné androgeneze pak lze rekonstruovat mizející linie nebo mizející plemena ryb (Gwo a kol., 1999; Urbányi a kol., 2004; Yasui a kol., 2010).

---

### 2.4. Umělá (indukovaná) gynogeneze

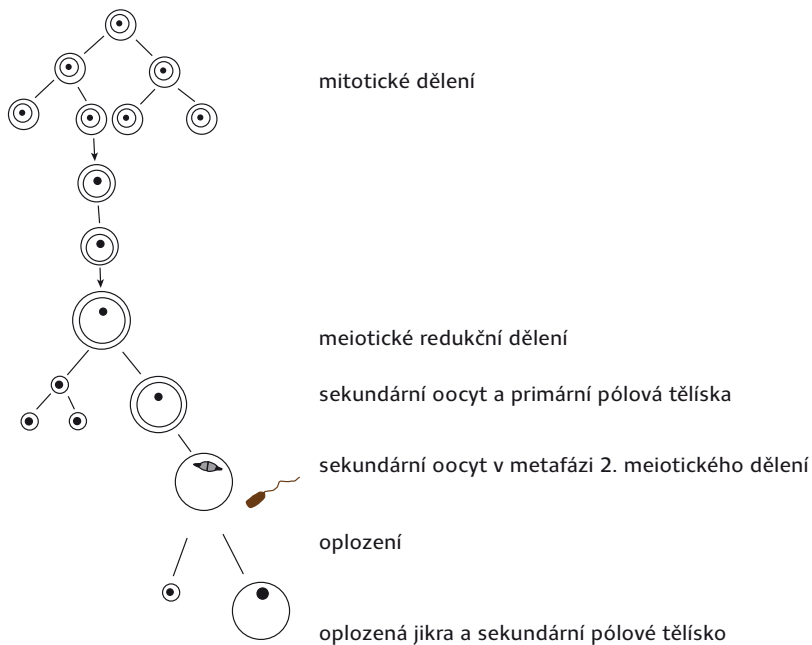
---

Indukovaná gynogeneze je založena na inaktivaci otcovské DNA ozářením spermií (gamma zářením, UV zářením), osemnění a aktivaci gamet a následném obnovení diploidního stavu aktivované buňky – jikry.

Za tímto účelem bývá použito sperma ozářené, a to buď sperma stejného druhu (homologní sperma) nebo druhu jiného – blízkce či vzdáleně příbuzného (heterologní). U rybích druhů s chromozomovým určením pohlaví typu *Drosophila* (XX/XY) tento typ reprodukce vede k získání celosamičí populace potomstva.



# HROMADNÁ INDUKCE GYNOGENEZE A ANDROGENEZE U KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)



**Obr. 1.** Schéma oogeneze.

## 2.4.1. Meiotická gynogeneze

Meiotická gynogeneze je založena na potlačení druhé fáze meiotického dělení ve vajíčku. Ovulované haploidní vajíčko je ve stadiu metafáze 2. meiotického dělení a aktivováno ozářenou spermií (inaktivovaný genom). Cílem tohoto typu gynogeneze je dosáhnout retence 2. pólóvého tělíska a obnovit tak diploidní stav. K tomu se využívá fyzikálních šoků obdobných parametrů a se stejným mechanismem působení jako při indukci triploidie.

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

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

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

#### 2.4.2. Mitotická gynogeneze

---

Mitotická gynogeneze je založena na potlačení prvního mitotického dělení haploidních embryí. Ovulovaná jikra je ve stadiu metafáze 2. meiotického dělení, její vývoj je aktivován ozářenou spermií. Původně haploidní jikra v rámci probíhajícího buněčného cyklu dojde do prvního mitotického dělení a je vystavena fyzikálnímu šoku odpovídajících parametrů, který má za následek zastavení prvního mitotického dělení a dosažení diploidního stavu rozvíjející se buňky.

Potomstvo vzniklé mitotickou gynogenezí nese pouze jadernou genetickou informaci matky a všichni jedinci jsou tedy plně homozygotní. Nejsou však klony, neboť při meiotickém cyklu v průběhu ovogeneze došlo k volné kombinovatelnosti alel a crossing-overům. Touto metodou lze vytvořit klonální linie za dvě následující generace (Naruse a kol., 1985; Komen a kol., 1988).

#### 2.5. Androgeneze

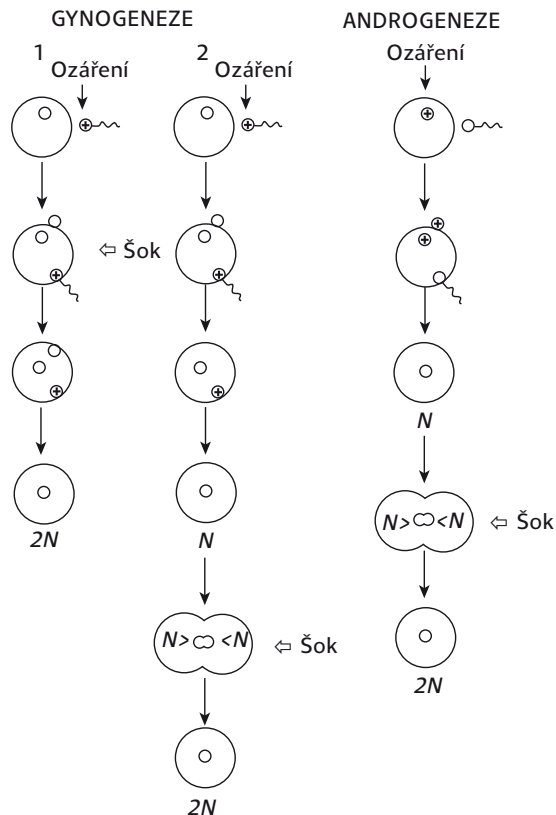
---

Při androgenezi se potomstvu předává pouze jaderná genetická informace spermie (jaderná DNA) a metoda je založena na inaktivaci genetické informace jiker a aplikaci stejného typu šoku jako v případě mitotické gynogeneze. Cílem je stejně jako v případě mitotické gynogeneze dosáhnout zastavení prvního mitotického dělení.

U rybích druhů s chromozomovým určením pohlaví typu *Drosophila* (XX/XY) tento typ reprodukce vede k produkci 50% jedinců XX a 50% jedinců YY (nadsamec, supersamec). Indukovaná androgeneze je založena na inaktivaci samičí (mateřské) DNA ozářením jikry, osemněním a aktivací gamet a obnovení diploidního stavu vyvíjející se jikry.

Inaktivace mateřské DNA se stejně jako u gynogeneze provádí pomocí ionizujícího nebo UV záření. Ionizující záření s vysokou schopností penetrovat do buněčné tkáně je považováno za vhodné pro ozařování oocytů o velkém průměru, zatímco pro ozařování oocytů menšího průměru (< 2mm) stačí UV záření (Komen a Thorgaard, 2007). Diploidní stav se obnovuje potlačením prvního mitotického dělení haploidních embryí a využívá se k tomu šok stejných parametrů jako při indukci mitotické gynogeneze.

## HROMADNÁ INDUKCE GYNOGENEZE A ANDROGENEZE U KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)



**Obr. 2.** Schéma meiotické gynogeneze (1), mitotické gynogeneze (2) a androgeneze.

### 2.6. Umělá reprodukce kapra a získávání pohlavních produktů

Umělá reprodukce kapra obecného byla již v minulosti dostatečně detailně popsána (Gela a kol., 2009). Generační ryby kapra obecného jsou v předvýtěrovém období odděleny podle pohlaví v manipulačních rybnících a do líhně jsou přemístěny ryby v dobré kondici selektované pro umělou reprodukci. Ryby jsou před samotnou reprodukcí nebo v jejím průběhu přechovávány na žlabech nebo v bazénech (cca 50 kg živé hmotnosti ryb na 1 m<sup>3</sup>) s teplotou vody cca 20 °C, mírné zvyšování teploty v době před samotným výtěrem napomáhá ovulaci jikernaček. K usnadnění veškeré manipulace je využíváno anestetie – nejčastěji je využíván 2-phenoxyethanol (3 ml/100l vody) nebo hřebíčkový olej (4 ml/100l vody).

Pro indukci spermiace nebo ovulace je v praxi nejčastěji využíváno suspenze kapří hypofýzy rozpuštěné a rozetřené ve fyziologickém roztoku (0,9% vodný roztok chloridu sodného – NaCl). Mlíčákům kapra je injikována intramuskulárně nebo intraperitoneálně dávka kapří hypofýzy 0,7–1 mg.kg<sup>-1</sup> hmotnosti 24 hodin před samotným výtěrem. Jikernačky jsou pak stimulovány k výtěru injekcí kapří hypofýzy ve dvou dávkách – první dávka 0,3 mg.kg<sup>-1</sup> hmotnosti ryby 24 hodin před výtěrem a druhá dávka 2,7 mg.kg<sup>-1</sup> hmotnosti následuje 12 hodin před samotným výtěrem. Další z možností je využít přípravku Ovopel.

Jikry jsou získávány tlakem na břišní partie generačních ryb do suchých polypropylenových misek (obr. 3). Spermia je vhodné odebírat do injekčních stříkaček nebo jímat podtlakem (například s využitím vodní vývěvy) do zkumavek nebo vhodných nádob (např. nádoby na uchovávání mikrobiálních kultur; obr. 4). Jikry je možné po nezbytně nutnou dobu uchovávat při teplotě okolního prostředí přikryté navlhčeným hadrem a získané spermia uchovávat na drceném ledu. V obou případech je nutné důkladně zamezit vniknutí vody do uchovávaných gamet.



**Obr. 3 a 4.** Výtěr jikernaček a odběr spermatu mlíčáků kapra obecného (foto Vojtěch Kašpar).

# HROMADNÁ INDUKCE GYNOGENEZE A ANDROGENEZE U KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)

## 2.7. Inaktivace genetické informace

K inaktivaci genetické informace spermie může být využito ionizujícího záření (gama nebo rentgenové záření) nebo UV záření. Ionizující záření proniká hluboko do buněčné tkáně nebo do objemu ozařovaného roztoku a účinně fragmentuje DNA (Komen a Thorgaard, 2007), a proto je považováno za vhodnější typ záření pro ozařování většího objemu spermatu (sperma nemusí být nutně rozprostřeno do tenké vrstvy, ozařuje se roztok ve vhodné nádobě). Stejně tak je tento typ záření považován za vhodný způsob ozařování jiker (oocytů) pro androgenezi.

Limitním faktorem pro praktickou aplikaci tohoto typu záření je však mnohdy dostupnost vhodného zdroje ionizujícího záření a s tím spojená nutnost přepravy pohlavních produktů ryb do zařízení nebo instituce disponující vhodným zářičem, nutnost přesného načasování všech kroků od samotného výtěru ryb až po začátek samotné inkubace jiker, nutnost uvažovat délku přepravy jako faktor ovlivňující úspěšnost, nutnost dokonale zvládnout manipulaci s gametami a jejich uchovávání před a po ozáření, jejich použitelnost a omezené možnosti průběžné kontroly kvality gamet a většinou i omezené možnosti experiment nebo praktickou aplikaci zopakovat v rámci výtěrové sezóny. Proto je pro praktické aplikace vhodnější uvažovat UV záření a dokonale zvládnout manipulaci s ozařovanými gametami tak, aby bylo možné aplikovat UV záření a dosáhnout požadovaného výsledku. Dalším důvodem pro využití UV záření může být i efekt gamma záření spočívající ve fragmentaci chromozomů, kdy může dojít k částečnému přenosu genů z fragmentovaných chromozomů ozařovaných spermií či jiker (Thorgaard, 1983).



**Obr. 5.** UV illuminátor – crosslinker UVP CL-1000 (foto Bram Rohaan).

## 2.8. Ozařování spermatu pro mitotickou a meiotickou gynogenezí, optimalizace dávky záření

Pro úspěšnou indukci uniparentální dědičnosti – mitotickou a meiotickou gynogenezí je nutné vhodným způsobem zabezpečit inaktivaci genetické informace obsažené ve spermii, a to takovým způsobem, aby byla co nejvíce zachována motilita spermií.

Pro samotnou práci je proto nutné nejprve posoudit kvalitu spermií před samotným ošetřením – motilitu a rychlost pohybu spermií mikroskopicky (klasická mikroskopie nebo mikroskopie v tmavém poli za použití stroboskopického osvětlení) a pro další práci vybrat pouze sperma nejvyšší možné kvality. Sperma kapra obecného vykazuje poměrně značnou hustotu ( $15\text{--}20 \times 10^9$ ) a viskozitu. Pro zajištění transmise UV záření ke všem ozařovaným spermii je nutné sperma kaprovitých ryb naředit vhodným médiem a rozprostřít roztok ozařovaných spermií do tenké vrstvy. V případě využití UV crosslinkeru je vhodné využít skleněných misek nebo nádob odpovídající velikosti crosslinkeru (pro Crosslinker UVP CL-1000 jako v našem případě rozměr 27 x 25 cm). Před prvním použitím skleněných nádob je vhodné povrch skleněné misky nebo nádoby podřít smirkovým nebo ještě lépe lapovacím papírem. To má za následek eliminaci povrchového napětí při nanášení roztoku spermií a lepší rozptýlení nanášeného roztoku po ploše skleněné misky.

Pro účely naředění získaného spermatu je možné jako ředící roztok využít roztok podle Kurokury a sperma mlíčeků je vhodné naředit v poměru min. 1 : 4 nebo ještě lépe 1 : 9. Poměr ředění je vhodné volit podle množství jiker, které budou aktivovány ozařovaným spermatem, počtu ozařovacích cyklů nutných k ozáření spermií pro aktivaci jedné porce jiker atd.

Způsob inaktivace DNA a dávku UV záření použitou k inaktivaci DNA spermie lze ověřit kontrolním křížením, při němž se jako markeru využívá recesivně dědičného zbarvení například u koi kapra. Pro ověření způsobu inaktivace a kontrolu ozáření konkrétním zdrojem UV záření tak bude využito spermatu normálně, divoce zbarvených ryb (dominantních homozygotů nebo heterozygotů) a sperma bude ozařováno různými dávkami UV záření. Různou intenzitou záření ošetřené sperma pak bude použito k aktivaci jiker koi kapra (recesivního homozygota). V rámci testování intenzity záření pak budou malé porce jiker koi kapra oplozovány ozářeným spermatem normálních jedinců kapra obecného a následně inkubovány na označených Petriho miskách v akváriu nebo experimentálním inkubátoru. Není nutné aplikovat žádný typ šoku k obnově diploidního stavu. V případě oplození jiker nedokonale ozářeným spermatem vzniká jedinec normálního zbarvení a diploidní úrovně a v případě aktivace dostatečně ozářenou spermii pak vzniká haploidní jedinec zbarvení

## HROMADNÁ INDUKCE GYNOGENEZE A ANDROGENEZE U KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)

koi – poměr zastoupení obou typů potomstva lze určit na Petriho miskách podle zbarvení před očekávaným vykulením. Haploidi mají charakteristický rohlíčkovitě zakřivený tvar, nemívají dostatečně vyvinuté vnitřní orgány a hynou nejpozději při přechodu na exogenní výživu, jak již bylo zmíněno výše – pro potřeby určení optimální dávky záření není nutné obnovovat diploidní stav buňky. Obnova diploidního stavu pomocí šoku by měla za následek snížení životaschopnosti jiker a proces obnovy diploidního stavu pomocí šoku by mohl eliminovat efekty rozdílné intenzity UV záření, a snížit tak vypovídací schopnost experimentů vedoucích k určení optimální dávky ozáření.

Literatura uvádí i jiný typ určení intenzity záření, založené na sledování pohyblivosti spermií po samotném ozáření pod světelným mikroskopem nebo s použitím mikroskopie v tmavém poli. Sperma je ozařováno a intenzita ozáření je zvyšována až do té doby, dokud nedojde k poškození spermií takovým způsobem, že bude sperma po ozáření vykazovat pouze minimální motilitu – pro praktickou aplikaci a inaktivaci spermií pro meiotickou či mitotickou gynogenezi se pak doporučuje použít poloviční intenzitu záření (Komen a kol., 1988).

### **Doporučovaný praktický postup**

*Pro inaktivaci DNA spermií pomocí UV doporučujeme sperma ředit 1 : 9 – 1,5ml spermatu a 13,5ml ředícího roztoku podle Kurokura (128,4 mmol NaCl; 2,7 mmol KCl; 1,4 mmol CaCl<sub>2</sub>; 2,4 mmol NaHCO<sub>3</sub>) a takto naředěné sperma pak pipetou nanášet na skleněné misky – pro Crosslinker UVP CL-1000 optimálně o rozměru 25 x 27 cm). Naředěné sperma (5ml) je pak nutné důkladně rozprostřít po skleněném povrchu a poté ozařovat pomocí Crosslinkeru UVP CL-1000 umístěného na laboratorní třepačce (viz obr. 5) dávkou záření 300 000  $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Tenkou vrstvu spermatu je možné po ozáření pomocí stěrky sbírat do připravené nádoby a skladovat po nezbytně dlouhou dobu na ledu (manipulace a ozáření 1 dávky by měly trvat cca 3 minuty). Po ozáření všech dávek spermatu je možné přejít k oplození až 300g jiker, kdy jsou gamety aktivovány množstvím vody odpovídajícím objemu gamet (300 ml) a inkubovány při teplotě odpovídající způsobu prováděného teplotního šoku (z technických důvodů to nemusí být teplota odpovídající běžné inkubaci jiker – může být žádoucí o něco vyšší teplota pro urychlení vývoje jiker, dřívější načasování šoku a lepší zvládnutí práce s několika dávkami jiker – viz kap. 2.11.).*





**Obr. 6.** Nanášení ředěného spermatu na ozařování (vlevo, foto Bram Rohaan).



**Obr. 7.** Kontrola motility ozářeného spermatu (vpravo, foto Bram Rohaan).

## 2.9. Ozařování jiker pro androgenezi, optimalizace dávky záření

Pro úspěšnou androgenezi je nutné vhodným způsobem zabezpečit inaktivaci genetické informace jiker, a to takovým způsobem, aby byla co nejvíce zachována životaschopnost samotných jiker. Je nutné objektivně posoudit kvalitu získaných jiker a pro další práci zvolit pouze jikry nejvyšší kvality, bez známek kontaminace nebo přezrání.

Pro zajištění transmise UV záření ke všem ozařovaným jikrák je bezpodmínečně nutné jikry kapra naředit vhodným médiem, které pomůže rozprostřít jikry pro ozáření UV zářením do jedné tenké vrstvy. Literatura pro tento účel uvádí jako nejvhodnější roztok s názvem OF (*ovarian fluid*) o složení 3,8 mmol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 118,0 mmol NaCl, 12,7 mmol KCl, 0,7 mmol  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2,7 mmol  $\text{CaCl}_2$ , 5,5 mmol tyrosinu a 5,5 mmol glycinu, pH 8,14 a osmolarita 262 mOsm (Plouidy a Billard, 1982).

V rámci našich experimentů byly testovány roztoky pro uchovávání jiker po dobu nutnou k samotnému ozáření. Testováno bylo uchovávání jiker v umělé



## HROMADNÁ INDUKCE GYNOGENEZE A ANDROGENEZE U KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)

ovariální plazmě (Plouidy a Billard, 1982), fyziologickém roztoku (0,9% NaCl) a Ringerově roztoku (0,86% NaCl, 0,03% KCl, 0,033% CaCl<sub>2</sub>) a následně byly jikry oplozovány. Jako oplozenischnopné se ukázaly jikry uchovávané v Ringerově roztoku, zatímco roztok umělé ovariální plazmy (Plouidy a Billard, 1982) se ukázal jako naprosto nevhodný. Při použití tohoto roztoku se sperma sráželo bezprostředně po přidání, nedošlo tak k osemenění a oplozenost byla nulová.

Pro ozařování jiker v UV crosslinkeru je vhodné využít skleněných misek nebo nádob odpovídající velikosti crosslinkeru (v našem případě 25 x 27cm) a z důvodu eliminace lepivosti jiker ke skleněnému (případně polypropylenovému) povrchu nádoby je nutné předem na skleněný povrch nanést tenkou vrstvu agarosu (2–3% agarosa nebo pouhý agar).

### **Doporučovaný praktický postup**

*Poměr ředění jiker ředicím mediem a množství nanášených jiker je nutné určit na základě ozařované plochy a počet ozařovacích cyklů je nutno kalkulovat podle množství jiker k jedné aktivaci. Na plochu misky 25 x 27 je možné nanášet cca 100g jiker ve 200ml Ringerova roztoku. Pro inaktivaci DNA jiker pomocí UV záření je nutné jikry ředit Ringerovým roztokem v poměru 1 : 2 a takto naředěné jikry opatrně nanášet na skleněné misky o rozměru 25 x 27cm – viz obr. 8 a 9) potažené 3% agarosou. Naředěné jikry je nutné důkladně rozprostřít po skleněném povrchu a poté ozařovat v Crosslinkeru UVP CL-1000 dávkou ÚV záření 600 000  $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Pro ozařování jiker je vhodné zajistit neustálé míchání ozařovaných jiker a umístit jikry pod UV zářič na laboratorní třepačku nebo jako v našem případě umístit celý UV crosslinker s ozařovanými jikrami na laboratorní třepačku. Ozářené jikry je nutné sebrat z misky a po ozáření všech dávek (pro 300g jiker ozařování ve 3 dávkách, doba ozařování a manipulace s jednou dávkou cca 3–5 minut) odstranit Ringerův roztok a jikry oplodnit 2ml spermatu ryb, jejichž androgenetické klony chceme vytvořit. Dále aktivovat množstvím vody odpovídajícím množstvím jiker (300ml) a inkubovat při teplotě odpovídající způsobu prováděného teplotního šoku (z technických důvodů to nemusí být teplota odpovídající běžné inkubaci jiker – může být žádoucí o něco vyšší teplota pro urychlení vývoje jiker, dřívější načasování šoku a lepší zvládnutí práce s několika dávkami jiker – viz kap. 2.11.).*



**Obr. 8 a 9.** Nanášení jiker v Ringerově roztoku na misky potažené agarosou (obr. 8) a sbírání jiker pro aktivaci (obr. 9) (foto Bram Rohaan).

## 2.10. Kontrola gynogeneze či androgeneze pomocí typu ošupení potomstva





Kontrola inaktivace genetické informace sledovaná pomocí barvy potomstva je zmíněna v kap. 2.8., kde je kontrola pomocí recesivního založení genů pro zbarvení zmíněna v souvislosti s určováním dávky záření.

Prováděná kontrola gynogeneze či androgeneze tímto způsobem má využití pouze v případě experimentálního ověřování metod nebo jejich částí a také v případě, že je snahou získat uniparentální potomstvo nebo klonální či isogenní linii koi. V případě snahy vytvořit gynogenetické či androgenetické potomstvo normálně zbarvených ryb nemá žádného využití, a proto je nutné přeorientovat se na kontrolu indukce uniparentální dědičnosti pomocí typu ošupení potomstva. Ošupení kapra je řízeno dvěma geny, *S* (*squamatus*) a *N* (*nudus*), přičemž *N* je epistatický. Gen *N* také vykazuje neúplnou dominanci a v dominantní homozygotní konstituci je letální. Gen *S* řídí šupinatost a gen *N* modifikuje typ ošupení. Alela *S* je úplně dominantní nad alelou *s*. Dominantní fenotyp řízený alelou *S* je šupinatý, recesivní fenotyp řízený alelou *s* se projevuje

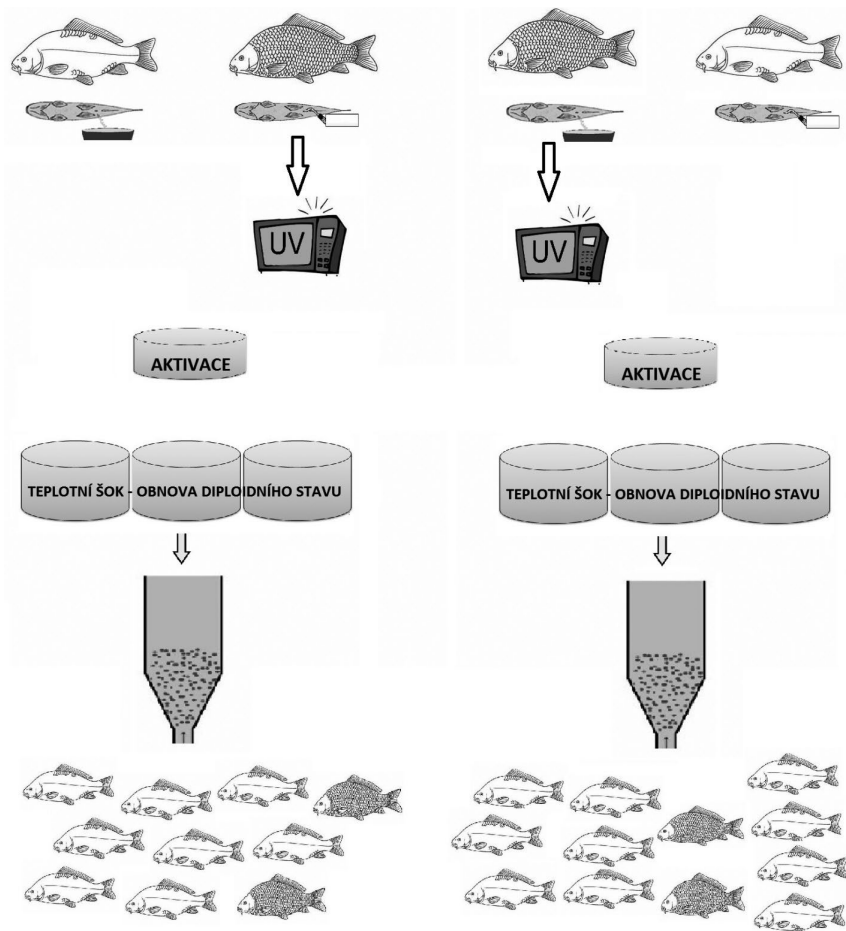
## HROMADNÁ INDUKCE GYNOGENEZE A ANDROGENEZE U KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)

redukcí počtu šupin a zvětšením zbylých šupin (lysec). Přítomnost alely *N* mění šupinatého kapra na řádkového lysce a lysého kapra na hladkého. Alela *n* nemá vliv na typ ošupení (Kirpichnikov, 1981).

Této dědičnosti ošupení u kapra obecného lze využít v případě snahy získat gynogenetické nebo androgenetické potomstvo lysého fenotypu. V tomto případě jsou pro gynogenezi jikry lysého plemene (genotyp *ssnn*) kapra obecného aktivovány ozářeným spermatem mlíčáků některého ze šupinatých plemen (ROP, AS – ověřený homozygotní genotyp *SSnn*). V případě, že je snahou získat androgenetické potomstvo některého z lysých plemen, jsou ozařovány jikry šupinatých ryb (ROP, AS – ověřený homozygotní genotyp *SSnn*) a oplozovány spermatem mlíčáků lysého plemene (genotyp *ssnn*). V případě neúspěšné inaktivace genetické informace jednoho z rodičů vzniká šupinaté potomstvo, které lze jednoduše vyselektovat. I v případě lysého fenotypu potomstva je však nutné uniparentální původ potomstva ověřit dalšími genetickými markery. Obdobným způsobem lze využít i dědičnosti genu *N* (Gomelsky a kol., 1992).

Fenotyp		Genotyp
šupinatý		<i>SSnn</i> , <i>SSnn</i>
lysý		<i>ssnn</i>
řádkový		<i>SSNn</i> , <i>SsNn</i>
hladký		<i>ssNn</i>

**Obr. 10.** Dědičnost ošupení (převzato z Flajšhans a kol., 2013 – upraveno dle Kirpičnikova, 1981).



**Obr. 11.** Schéma kontrol pomocí typu ošupení potomstva v případě snahy vytvořit gynogenetické či androgenetické potomstvo lysé linie kapra. Jedinci šupinatého fenotypu v potomstvu jsou důsledkem neúspěšné inaktivace genomu gamet a v průběhu odchovu je možné tyto jedince odstranit.

## 2.11. Obnova diploidního stavu

Obnovou diploidního stavu se rozumí takový zásah do vývoje aktivovaných gamet, který má za cíl z původně haploidní zygoty (haploidní z toho důvodu, že je jeden z genomů byl inaktivován) vytvořit znovu diploidní buňku schopnou

## HROMADNÁ INDUKCE GYNOGENEZE A ANDROGENEZE U KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)

dalšího vývoje. K obnově diploidního stavu buňky obvykle dochází po aplikaci fyzikálního šoku (teplotní, tlakový) a podle doby načasování má tento šok dosáhnout buď retence 2. pólového tělíska nebo zastavení prvního mitotického dělení aktivované buňky. Retence 2. pólového tělíska je cílem v případě meiotické gynogeneze, zastavení mitotického dělení je nutné dosáhnout pro mitotickou gynogenezi a androgenezi. V případě prvně zmíněného typu uniparentální dědičnosti je možné uvažovat s poměrně vysokou efektivitou indukce, oproti tomu mitotická gynogeneze i androgeneze je spojena s nízkou efektivitou (nižší než 1%) a vysokou mortalitou jiker v průběhu jejich inkubace.

Mechanické šoky (otřesy, napichování jiker) byly experimentálně testovány u kapra obecného ve 30. letech 20. století, mají však malou účinnost a vyvolávají vysokou mortalitu. Chemické šoky jsou založené na působení vřetenkových jedů (mitostatik – kolchicinu, kolcemidu, cytochalazinu B aj.) a inertních plynů ( $N_2O$ ) na dělicí aparát buňky a jejich uplatnění je minimální (i v experimentálních podmínkách). Nejčastěji jsou pro svou účinnost používány jiné typy fyzikálních šoků – teplotní nebo tlakové (Flajšhans a kol., 2013).

Načasování šoku závisí na druhu ryby a teplotě vody při inkubaci jiker. Za standardní teplotu vody k inkubaci jiker kapra obecného se považuje 20 °C, kdy u kapra obecného začátek šoku v 5. min po aktivaci gamet postihne 2. fázi meiotického dělení a využívá se pro indukci meiotické gynogeneze, počátek šoku 43,5 min po aktivaci gamet postihne cytokinezi 1. mitotického dělení a využívá se pro indukci mitotické gynogeneze nebo androgeneze. Šokem je vystavení jiker teplotě 40 °C po dobu 2 minut a následně pak zchlazení zpět na normální teplotu inkubace.

### **Doporučovaný praktický postup**

*Pro inkubaci jiker a následné provádění teplotních šoků je nutné připravit 3 nádoby o objemu 40–50l. Dvě z těchto nádob naplnit roztokem mléka, které je běžně používáno pro odlepkování jiker pro umělou reprodukci (plnotučné mléko a voda v poměru 1 : 9). Jeden z těchto roztoků je nutné nahřát pomocí termostatu na teplotu normální inkubace a další z roztoků pak na teplotu šoku. Třetí nádoba pak obsahuje vodu o normální (inkubační) teplotě (obr. 12).*

*Jikry je po jejich aktivaci nutné přenést do nádoby s perforovaným nebo ještě lépe síťovaným dnem a tu pak umístit do velké nádoby s roztokem mléka pro odlepkování a inkubaci a ručním mícháním odlepkovávat, po určité době jsou pak jikry přenášeny do nádoby s mlékem o teplotě nutné k dosažení šoku. Poté jsou jikry přenášeny zpět do mléka a je dokončováno odlepkování, v poslední z nádob pak po dokončení procesu odlepkování dojde k odmytí zbytků roztoku mléka.*

### **Mitotická gynogeneze a androgeneze**

*Po smísení a aktivaci gamet je nutné jikry přenést do nádoby s perforovaným dnem a odlepkovávat v roztoku mléka. Po dosažení doby, kdy by mělo dojít k šoku (při 20 °C 40 min. po aktivaci gamet, při 24 °C pak 30 min. po aktivaci gamet) je pak nádoba s jikrami jednoduše přenesena do nádoby vedlejší, která obsahuje roztok mléka o teplotě nutné pro šok mající za následek reduplikaci genomu (40 °C, aplikovat po dobu 2 min). Po uplynutí doby šoku je pak nutné nádobu přenést zpět do roztoku mléka pro počáteční inkubaci a odlepkování. Po uplynutí celkové doby nutné pro důkladné odlepkování (60 minut) pak přeneseme stejným způsobem do třetí z nádob, která obsahuje vodu nahřátou na teplotu inkubace (20 nebo 24 °C) a necháme odplavit zbytky mléka tak, aby bylo možné jikry nasadit k inkubaci do Zugských lahví.*

### **Meiotická gynogeneze**

*Po smísení a aktivaci gamet je nutné jikry přenést do nádoby s perforovaným dnem a odlepkovávat v roztoku mléka. Po dosažení doby, kdy by mělo dojít k šoku (při 20 °C pro inkubaci po 5 min od aktivace gamet, při 24 °C pro inkubaci pak po 3 min) je pak nádoba s jikrami přenesena do nádoby vedlejší, která obsahuje roztok mléka o teplotě nutné pro šok, jenž má za následek reduplikaci genomu (40 °C, aplikovat po dobu 2 min). Po uplynutí doby šoku je pak nutné nádobu přenést do roztoku mléka pro počáteční inkubaci a odlepkování. Po uplynutí celkové doby nutné pro důkladné odlepkování (60 minut) pak přeneseme stejným způsobem do třetí z nádob, která obsahuje vodu nahřátou na teplotu inkubace, a necháme odplavit zbytky mléka tak, aby bylo možné jikry nasadit k inkubaci do Zugských lahví.*

*Pro zvýšení efektivity při práci s více dávkami jiker doporučujeme zvýšit teplotu pro počáteční inkubaci z 20 °C na 24 °C. Tím dojde ke zkrácení doby počáteční inkubace (před samotným šokem), zkrácení intervalů mezi teplotními šoky jednotlivých dávek jiker významně zkrátí celkovou dobu nutnou k indukci mitotické gynogeneze nebo androgeneze u více zpracovávaných dávek jiker.*

# HROMADNÁ INDUKCE GYNOGENEZE A ANDROGENEZE U KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)



**Obr. 12.** *Obnova diploidního stavu pomocí teplotního šoku (foto Vojtěch Kašpar).*

## 2.12. Ověření úspěšnosti indukce uniparentální dědičnosti

Při ověřování úspěšnosti indukce uniparentální dědičnosti nebo v případě ověřování dílčích částí metodiky je nutné zaměřit se na všechny tři kroky a kontrolovat, **zda byla důkladně inaktivována DNA druhé rodičovské gamety, ověřit homozygotnost potomstva a případně i ověřit diploidní úroveň vznikajících embryí.**

### a) Inaktivace DNA druhé rodičovské gamety

V rámci ověřování dílčích kroků metodiky nebo v rámci ověřování účinnosti různých zdrojů záření (UV zářiče – crosslinkery) lze využít experimentálních křížení s využitím pohlavních produktů normálně zbarvených ryb a pohlavních produktů koi kaprů (viz strana 19). Stejně tak lze pro potřeby experimentálního ověření různých dávek UV záření nebo ověření účinnosti konkrétního zdroje UV záření realizovat experimentální křížení, kde jedny z gamet budou ošetřeny UV zářením a nebude aplikován žádný typ šoku. V případě dokonalého ošetření gamet UV zářením bude vznikat malformovaný haploidní plůdek a v případě nedostatečného ošetření se vykulí plůdek normálního vzhledu i chování. V případě, že bude cílem ověřovat inaktivaci spermií ale mohou být výsledky částečně zkresleny – může docházet i ke spontánní



meiotické gynogenezi u části jiker a vznikne plůdek normálního vzhledu. V literatuře lze dohledat, že zejména u androgeneze vznesli někteří autoři (Carter a kol., 1991; Masaoka a kol., 1995) pochybnosti o úplné eliminaci mateřské genetické informace (mtDNA a mRNA) u ozařovaných jiker. Přehledová studie Pandiana a Koteeswarana (1998) uvádí, že většina autorů, kteří produkovali živé diploidní androgeny, nepoužila více než jeden genetický marker k potvrzení úplné eliminace mateřského genomu. K tomu aby bylo možné dělat relevantní hodnocení, je nutné sledovat více lokusů.

#### **b) Ověření diploidní úrovně**

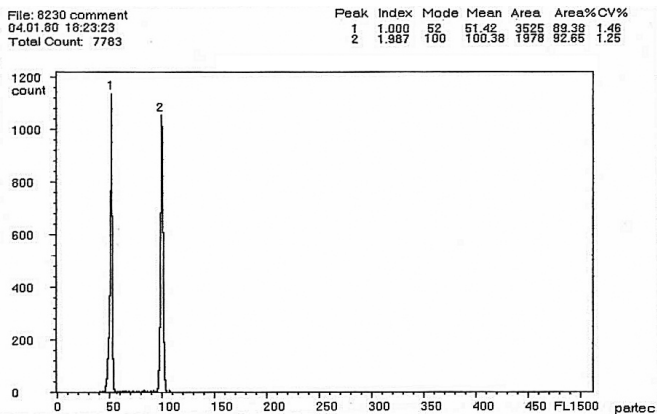
Ploidní úroveň plůdku nejrychleji přesně zjistíme stanovením relativního obsahu DNA průtokovou cytometrií (Flajšhans a kol., 2013) ze suspenze buněk preparované z váčkového nebo vykuleného plůdku. Relativní obsah DNA u vzorku normálního, diploidního plůdku bude dvojnásobný (pík histogramu bude ležet na kanálu o dvojnásobné hodnotě) vůči obsahu DNA ze vzorku haploidního plůdku (obr. 13).

#### **c) Ověření homozygotnosti**

Homozygotnost se určuje pomocí molekulárně genetických metod a markerů, v minulosti však na základě důkladného předvýběru rodičovských ryb mohly k tomuto účelu sloužit i markery biochemické využívající polymorfní proteinové systémy. V současné době k tomuto účelu slouží zejména mikrosatelitní markery. Pro kapra obecného byla v minulosti popsána celá řada mikrosatelitních markerů (Crooijmans a kol., 1997) a je možné použít jejich široké spektrum. Pro usnadnění identifikace plně homozygotních jedinců je však pro experimentální křížení vhodné vybírat kombinace jedinců na základě jejich genotypu v několika mikrosatelitních lokusech.



# HROMADNÁ INDUKCE GYNOGENEZE A ANDROGENEZE U KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)



**Obr. 13.** Histogram relativního obsahu DNA změřený průtokovou cytometrií ze suspenze buněk haploidního (1n; vrchol 1 na kanálu 51) a diploidního (2n; vrchol 2 na kanálu 100) rozplaveného plůdku kapra obecného, *Cyprinus carpio* (snímek pořídil Dmytro Bytyutskyy).

## Závěr

Aplikací výše popsaných postupů lze získat řádově tisíce kusů vykulleného plůdku v případě meiotické a mitotické gynogeneze (10–30 tis. ks plůdku – tj. oplozenost 5–15%) a řádově stovky kusů životaschopného plůdku androgenetického původu (cca 200–400 ks získáváno v rámci našich experimentů, oplozenost výrazně nižší než 1%).

V případě gynogeneze či androgeneze u lysých linií a s využitím kontroly homozygotními šupináci lze po počátečním odchovu vyselektovat potomstvo vzniklé normálním oplozením (nedokonalá inaktivace gamet). U ponechaného potomstva lysého fenotypu je i přes kontrolu pomocí typu ošupení nutné ověřit dosažení žádaného typu uniparentální dědičnosti pomocí dostatečného počtu molekulárně genetických markerů, zejména pokud by tito jedinci měli být využiti pro zakládání isogenních linií ryb.

## 3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Tato metodika je originální a první svého druhu a vychází z experimentů autorského kolektivu. Metody indukce meiotické gynogeneze, mitotické gynogeneze nebo androgeneze byly v minulosti popsány, počítaly však s indukcí uniparentální dědičnosti v experimentálních podmínkách a v malém měřítku. Tato metodika představuje ucelený soubor postupů vedoucích k hromadné indukcii gynogeneze a androgeneze u kapra obecného.

#### 4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

V případě využití postupů zmiňovaných v této metodice lze efektivně dosáhnout meiotické gynogeneze, mitotické gynogeneze nebo androgeneze u kapra obecného. Metodika popisuje postupy nutné pro úspěšnou indukci těchto typů uniparentální dědičnosti v měřítku dovolujícím v případě úspěšného odchovu vznik početnějších populací, které mohou sloužit k určitému specifickému účelu. Meiotickou i mitotickou gynogenezí lze efektivně vytvářet inbrední linie – meiotickou gynogenezí můžeme za několik generací vytvořit isogenní linie ryb (nikoliv kompletně klonální) a mitotickou gynogenezí pak i klonální linie ryb. Androgenezi pak lze považovat za uplatnitelnou pro rekonstrukci mizející linie nebo mizející plemena ryb v případě, že je k dispozici kryokonzervované sperma těchto ryb.

#### 5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Metodika popisuje postupy nutné pro úspěšnou indukci těchto typů uniparentální dědičnosti v měřítku dovolujícím v případě úspěšného odchovu vznik početnějších populací. Takto vzniklé populace meiotických či mitotických gynogenů mohou být využívány k založení isogenních linií. Isogenní či klonální linie mají velký význam ve výzkumu přenosu genů nebo v imunologii a stejně tak je lze využívat ke vzájemnému křížení a vyhledávání specifické kombinační návaznosti a následně k produkci vysoce užitkových kříženců.

V případě druhů nebo linií, které jsou bezprostředně ohroženy vymizením, lze uvažovat použití gynogeneze k získání potomstva, máme-li k dispozici pouze jikernačky a použití androgeneze s využitím kryokonzervovaného spermatu může pomoci rekonstruovat mizející linie nebo mizející plemena ryb.

#### 6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Bongers, A.B.J., in't Veld, E.P.C., Aboh-Hashema, K., Bremmer, I.M., Eding, E.H., Komen, J., Richter, C.J.J., 1994. Androgenesis in common carp (*Cyprinus carpio*) using UV irradiation in a synthetic ovarian fluid and heat shocks. *Aquaculture* 122: 119–132.
- Carter, R.E., Mair, G.C., Skibinski, D.O.F., Parkin, D.T., Beardmore, J.A., 1991. The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia. *Aquaculture* 95: 41–52.
- Crooijmans, R.P.M.A., Van der Poel, J.J., Groenen, A.M., Bierbooms, V.A.F., Komen, J., 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio*). *Animal Genetics* 28: 129–134.

## HROMADNÁ INDUKCE GYNOGENEZE A ANDROGENEZE U KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)

- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Bohlen Šlechtová, V., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2013. Genetika a šlechtění ryb. Druhé rozšíření a upravené vydání. FROV JU, Vodňany, 305 s.
- Gela, D., Kocour, M., Rodina, M., Flajšhans, M., Beránková, P., Linhart, O., 2009. Technologie řízení reprodukce kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). Edice Metodik (technologická řada), FROV JU, Vodňany, č. 99, 43 s.
- Gomelsky, B., 2003. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review. *Aquatic Living Resources* 16: 408–415.
- Gomelsky, B.I., Emelyanova, O.V., Recoubratsky, A.V., 1992. Application of the scale cover gene (N) to identification of type of gynogenesis and determination of ploidy in common carp. *Aquaculture* 106: 233–237.
- Grunina, A.S., Recoubratsky, A.V., Emelyanova, O.V., Neyfakh, A.A., 1995. Induced androgenesis in fish: production of viable androgenetic diploid hybrids. *Aquaculture* 137: 149.
- Gwo, J.C., Ohta, H., Okuzawa, K., Wu, H.-C., 1999. Cryopreservation of sperm from the endangered Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). *Theriogenology* 51: 569–582.
- Horváth, L., Orbán, L., 1995. Genome and gene manipulation in the common carp. *Aquaculture* 129: 157–181.
- Cherfas, N.B., 1975. Study of radiation induced diploid gynogenesis in the carp 1: experiments on the mass production of diploid gynogenetic progeny. *Genetika* 11: 78–86.
- Kirpichnikov, V.S., 1981. Genetic bases of fish selection. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 410 pp.
- Kocour, M., Kašpar, V., Gela, D., Flajšhans, M., 2012. Způsoby osemeňování jiker při umělé reprodukci ryb z hlediska následného využití potomstva. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 133, 38 s.
- Komen, H., Thorgaard, G.H., 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. *Aquaculture* 269: 150–173.
- Komen, J., Duynhouwere, J., Richter, C.J.J., Huismann, E.A., 1988. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). I. effects of genetic manipulation of sexual products and incubation condition of eggs. *Aquaculture* 69: 227–239.
- Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M., Iwahashi, M., 1984. Cryopresevation of carp sperm. *Aquaculture Research* 31: 245–258.

- Makino, S., Ozima, Y., 1943. Formation of the diploid egg nucleus due to suppression of the second maturation division, induced by refrigeration of fertilized eggs of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Cytologia* 13: 55–60.
- Masaoka, T., Arai, K., Suzuki, R., 1995. Production of androgenetic diploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus* from UV irradiated eggs by suppression of the first cleavage. *Fisheries Science* 61: 716–717.
- Nagy, A., Csanyi, V., 1984. A new breeding system using gynogenesis and sex reversal for fast inbreeding in carp. *Theoretical and Applied Genetics* 67: 485–490.
- Nagy, A., Rajki, K., Horvath, L., Csanyi, V., 1978. Investigation on carp *Cyprinus carpio* gynogenesis. *Journal of Fish Biology* 13: 215–224.
- Naruse, K., Ujity, K., Shima, A., Egami, N., 1985. The production of cloned fish in Medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Experimental Zoology* 236: 335–341.
- Purdom, C.E., 1969. Radiation induced gynogenesis and androgenesis in fish. *Heredity* 24: 431–444.
- Pandian, T.J., Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384: 167–243.
- Plouidy, M.G., Billard, R., 1982. The chemical composition of the companion fluids of the gametes in the common carp (*Cyprinus carpio*). In: Richter, C.J.J., Goos, H.J.Th. (Eds), *Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, Wageningen, the Netherlands, 2–6 August, 1982. PUDOC, Wageningen, the Netherlands, p. 134.
- Tave, D., 1986. *Genetics for fish hatchery managers*. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, USA, 299 pp.
- Thorgaard, G.H., 1983. Chromosome Set Manipulation and Sex Control in Fish. *Fish Physiology* 9 (PART B): 405–434.
- Urbányi, B., Horváth, A., Kovács, B., 2004. Successful hybridization of *Acipenser* species using cryopreserved sperm. *Aquaculture International* 12: 47–56.
- Yasui, G.S., Fujimoto, T., Arai, K., 2010. Restoration of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis. *Aquaculture* 304: S140–S144.

# HROMADNÁ INDUKCE GYNOGENEZE A ANDROGENEZE U KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)

## 7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Bohlen Šlechtová, V., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2013. Genetika a šlechtění ryb. Druhé rozšířené a upravené vydání. FROV JU, Vodňany, 305 s. (dedikace: OP VaVpl, CZ.1.05/2.1.00/01.0024; GAJU 046/2010/Z; GAJU 047/2010/Z; GAČR 523/08/0824; NAZV QH82118)
- Gela, D., Kocour, M., Rodina, M., Flajšhans, M., Beránková, P., Linhart, O., 2009. Technologie řízené reprodukce kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). The artificial reproduction of common carp (*Cyprinus carpio* L.) Edice Metodik (technologická řada), FROV JU, Vodňany, č. 99, 43 s. (dedikace: QH82118, MSM6007665809)
- Kocour, M., Kašpar, V., Gela, D., Flajšhans, M., 2012. Způsoby osemeňování jiker při umělé reprodukci ryb z hlediska následného využití potomstva. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 133, 38 s. (dedikace: CZ.2.1.00/01.0024; QH82118)

**Externí odborný oponent**

*doc. Ing. Lukáš Kalous, Ph.D.*

*Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů, katedra zoologie a rybářství,  
Kamýcká 129, 16521 Praha 6 – Suchbátka, [www.af.czu.cz](http://www.af.czu.cz)*

**Interní odborný oponent**

*prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.*

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, [www.frov.jcu.cz](http://www.frov.jcu.cz)*

**Oponent za státní správu**

*Ing. Vladimír Gall*

*MZe Praha*

*Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství (16230)*

*Těšnov 17*

*117 05 Praha 1*

**Adresa autorů**

*Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D. ([vkaspar@frov.jcu.cz](mailto:vkaspar@frov.jcu.cz)) – 50%*

*Ing. Marek Rodina, Ph.D. ([rodina@frov.jcu.cz](mailto:rodina@frov.jcu.cz)) – 25%*

*prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr.rer.agr. ([flajsh@frov.jcu.cz](mailto:flajsh@frov.jcu.cz)) – 25%*

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,  
Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz,  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech,  
Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, [www.frov.jcu.cz](http://www.frov.jcu.cz)*

**Autoři fotografií**

*Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D. ([vkaspar@frov.jcu.cz](mailto:vkaspar@frov.jcu.cz)),*

*M.Sc. Bram Rohaan*

*Koi Question – <http://www.koiquestion.com/>*

*Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. 145/2013 – 16230/Nmet -  
CERTIFIKOVANÁ METODIKA ze dne 30. 12. 2013*

*Vydalo: Ministerstvo zemědělství, úsek lesního hospodářství, Sekce lesního  
hospodářství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství  
Těšnov 17, 117 05 Praha 1.*

*V edici Metodik (Technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých  
Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany,  
redakce: RNDr. Bořek Drozd, Ph.D., Ing. Blanka Vykusová, CSc., Zuzana Dvořáková,  
náklad: 200 ks, 1. vydání, vytištěno v roce 2014,  
grafický design a technická realizace: Jesenícké nakladatelství Jena Šumperk.*





Fakulta rybnářství  
a ochrany vod  
Faculty of Fisheries  
and Protection  
of Waters

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



ISBN 978-80-87437-88-9



evropský  
sociální  
fond v ČR



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ