

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**Fakulta rybářství a ochrany vod**

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

**Využití cytometrických metod k rozeznání mezidruhových  
hybridů jeseterů od jedinců čistého druhu**

**Autor:** Bc. Nikola Třešňáková

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

**Konzultant diplomové práce:** MSc. Sahana Shivaramu, MSc. Ievgen Lebeda, Ph.D.

**Studijní program a obor:** Zemědělská specializace, Rybářství a ochrana vod

**Forma studia:** Prezenční

**Ročník:** 4.

České Budějovice, 2020

## **Prohlášení**

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

V Českých Budějovicích 15. května 2020

.....

Bc. Nikola Třešňáková

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala a vyjádřila svůj velký dík vedoucímu diplomové práce, Prof. Ing. Martinovi Flajšhansovi, Dr. rer. agr., za odborné vedení, pomoc během experimentální části, cenné rady ohledně statistického vyhodnocení výsledků, ochotu, vstřícnost a trpělivost při jednání a při psaní této závěrečné práce. Z konzultantů bych ráda poděkovala především MSc. Ievgenovi Lebedovi, Ph.D., za pomoc během experimentální části a poskytnutí cenných rad. Dále bych ráda vyjádřila svůj velký dík paní Marii Pečené za velkou pomoc při odběrech a při práci v laboratořích a kolegovi Ing. Martinovi Hubálkovi, který mi byl vždy ochoten pomoci při práci s průtokovým cytometrem. V neposlední řadě bych ráda poděkovala prarodičům za zázemí a morální podporu.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
Fakulta rybářství a ochrany vod  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Nikola TŘEŠŇÁKOVÁ**  
Osobní číslo: **V16N014P**  
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**  
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**  
Název tématu: **Využití cytometrických metod k rozeznání mezidruhových hybridů jeseterů od jedinců čistého druhu**  
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

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

Cílem práce je zhodnotit možnost využití cytometrických metod k rozlišení mezidruhových hybridů jeseterů od čistých druhů na základě stanovení absolutního a relativního obsahu DNA. Studentka získá přehled o metodách odběru vzorků rybích tkání, metodách barvení DNA a měření jejího obsahu pomocí obrazové cytometrie a průtokové cytometrie. Výsledkem práce bude studie možnosti rozlišení mezidruhových F1 hybridů jeseterů jak o různé funkční úrovní ploidie, tak i v rámci stejné skupiny ploidie. Studentka se rovněž pokusí stanovit podíl AT- a GC-bohatých oblastí DNA u jednotlivých druhů a hybridů.

V experimentální části bude studentka pracovat s vybranými modelovými druhy ryb a jejich hybridy. K měření absolutního a relativního obsahu DNA použije jednak obrazovou analýzu založenou na měření integrované optické density v buněčných jádrech barvených Feulgenovou reakcí, jednak měření relativního a absolutního obsahu DNA průtokovou cytometrií v buněčných jádrech barvených vybranými fluoresceiny.

Studentka si tak prakticky osvojí manipulaci s rybami, postupy odběru vzorků, měření pomocí obou cytometrických metod a zpracování výsledků včetně statistického zhodnocení.

Rozsah grafických prací: **podle potřeby (do 20 stran)**

Rozsah pracovní zprávy: **50 - 70 stran**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Darzynkiewicz, Z., Robinson, J.P., Crissman, H.A., 1994. Flow cytometry, 2nd edition. Part A. In: Wilson, L., Matsudaira, P. (Eds.) Methods in Cell Biology Vol 41, Academic Press Inc. San Diego. 591 s.

Darzynkiewicz, Z., Robinson, J.P., Crissman, H.A., 1994. Flow cytometry, 2nd edition. Part B. In: Wilson, L., Matsudaira, P. (Eds.) Methods in Cell Biology Vol 42, Academic Press Inc. San Diego. 697 s.

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. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 305 s.

Hardie, D.C., Gregory, T.R., Hebert, P. Dn. N., 2002. From pixels to picograms: A beginner's guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. J. Histochem. Cytochem. 50 (6): 735-749.

a další podle zadání vedoucího

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

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant diplomové práce: **MSc. Sahana Shivaramu**

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Ostatní konzultanti: **MSc. Ievgen Lebeda, Ph.D.**

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání diplomové práce: **11. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **4. května 2018**

  
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
ČESKÉ BUDĚJOVICI  
Fakulta rybářství a ochrany vod  
Začíslí 728/II  
378 25 Vodňany (2)

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

Ve Vodňanech dne 11. listopadu 2016

# Obsah

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1       | Úvod .....  | 8  |
| 2       | Literární rešerše .....   | 10 |
| 2.1     | Stručný úvod do problematiky mezidruhové hybridizace jeseterovitých ryb ..... | 10 |
| 2.1.1   | Velikost genomu a obsah DNA.....  | 12 |
| 2.2     | Obecná charakteristika cytometrie a její význam .....                         | 13 |
| 2.3     | Průtoková cytometrie (Flow cytometry; FCM).....                               | 13 |
| 2.3.1   | Specifická barviva vázána na DNA pro průtokovou cytometrii.....               | 15 |
| 2.3.1.1 | 4-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) .....                                     | 15 |
| 2.3.1.2 | Propidium iodid (PI) .....  | 15 |
| 2.3.2   | Využití průtokové cytometrie.....   | 16 |
| 2.3.2.1 | Stanovení polyploidie a obsahu DNA.....                                       | 17 |
| 2.4     | Obrazová cytometrie.....  | 17 |
| 2.4.1   | Stručný úvod do optické (světelné) mikroskopie.....                           | 18 |
| 2.4.2   | Stanovení obsahu DNA pomocí Feulgenovy reakce.....                            | 19 |
| 2.4.2.1 | Denzitometrie (Mikrodenzitometrie/Feulgenova denzitometrie).....              | 20 |
| 2.4.2.2 | Feulgenova obrazová analýza (Feulgen Image analysis; FIA).....                | 21 |
| 2.4.2.3 | Tvorba krevního nátěru.....   | 22 |
| 2.4.2.4 | Barvení krevního nátěru.....  | 23 |
| 2.4.3   | Obecná charakteristika fluorescenční mikroskopie .....                        | 24 |
| 2.4.4   | Obecná charakteristika konfokální laserové skenovací mikroskopie .....        | 26 |
| 3       | Materiál a metodika.....  | 27 |
| 3.1     | Stanovení obsahu DNA průtokovou cytometrií (FCM).....                         | 27 |
| 3.1.1   | Odběr vzorků.....   | 27 |
| 3.1.2   | Příprava vzorků.....  | 28 |
| 3.1.2.1 | Přidávání standardu (j. malého).....  | 29 |
| 3.1.3   | Postup při měření a získání výsledků .....                                    | 29 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.2     | Stanovení obsahu DNA Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA).....  | 30 |
| 3.2.1   | Měření integrované optické denzity (IOD).....   | 30 |
| 3.2.1.1 | Výpočet absolutního obsahu DNA .....  | 30 |
| 3.3     | Statistické zpracování výsledků.....  | 30 |
| 4       | Výsledky .....  | 32 |
| 4.1     | Obsah DNA mezi testovanými skupinami .....  | 32 |
| 4.1.1   | Obsah DNA naměřený průtokovou cytometrií (FCM).....   | 32 |
| 4.1.2   | Obsah DNA naměřený metodou FIA.....   | 33 |
| 4.2     | Porovnání obsahu DNA uvnitř jednotlivých testovaných skupin.....  | 33 |
| 4.2.1   | Obsah DNA u jesetera malého ( <i>A. ruthenus</i> ) .....  | 33 |
| 4.2.2   | Obsah DNA u jesetera sibiřského ( <i>A. baerii</i> ) .....  | 34 |
| 4.2.3   | Obsah DNA u jesetera ruského ( <i>A. gueldenstaedtii</i> ).....   | 34 |
| 4.2.4   | Obsah DNA mezidruhového hybridu MxS ( <i>A. ruthenus</i> x <i>A. baerii</i> ) .....   | 34 |
| 4.2.5   | Obsah DNA mezidruhového hybridu SxM ( <i>A. baerii</i> x <i>A. ruthenus</i> ) .....   | 35 |
| 4.2.6   | Obsah DNA mezidruhového hybridu SxR ( <i>A. baerii</i> x <i>A. gueldenstaedtii</i> ).....                                   | 35 |
| 4.2.7   | Obsah DNA mezidruhového hybridu RxS ( <i>A. gueldenstaedtii</i> x <i>A. baerii</i> ).....                                   | 35 |
| 4.3     | Shrnutí výsledků .....  | 36 |
| 5       | Diskuse .....   | 37 |
| 5.1     | Obsah DNA u čistých druhů vs. mezidruhových hybridů naměřených průtokovou cytometrií a Feulgenovou obrazovou analýzou ..... | 37 |
| 5.2     | Průtoková cytometrie vs. Feulgenova obrazová analýza k rozeznání mezidruhových hybridů od jedinců čistého druhu .....       | 41 |
| 6       | Závěr.....  | 45 |
| 7       | Seznam použité literatury .....   | 47 |
| 8       | Seznam tabulek, grafů, a příloh .....   | 57 |
| 9       | Přílohy .....   | 62 |
| 10      | Abstrakt.....   | 73 |
| 11      | Abstract.....   | 75 |

# 1 Úvod

Stáří jeseterů (*Acipenseriformes*), patřící do nadřádu chrupavčitých (*Chondrostei*), se odhaduje přibližně okolo 250 miliónů let (Bemis a kol., 1997). Jejich fylogeneze a evoluce nebyla zcela ještě objasněna, a právě proto se mnoho autorů zabývá touto skupinou ryb. Veškeré nové poznatky o vývoji, morfologii a molekulární struktuře *Acipenseridae* – ať už fosilních či stále se vyskytujících v přírodě a/nebo v umělých chovech – jsou velmi žádané, a to především z hlediska konzervace, evoluční historie a biogeografie jeseterů. Nejen díky mezidruhové a mezirodové hybridizaci, ale také kvůli polyploidizačním událostem, je získávání těchto poznatků ztěžováno (Birsten a kol., 1997; Flajšhans a kol., 2013; Zhou a kol., 2013). Pro zachování čistých populací dosud žijících druhů jeseterovitých ryb, k rozeznání původu kaviáru či tvoření umělých užitkových hybridů je v dnešní době rozeznání hybridního jesetera od jesetera čistého druhu velmi důležité.

K rozeznání hybridů v populaci se využívají cytogenetické metody (např. komparativní genomová hybridizace (CGH), genomová in-situ hybridizace (GISH), analýza karyotypu, obsahu DNA či velikosti jádra) a molekulární metody (analýza mitochondriální DNA nebo mikrosatelitní DNA). Tato práce se zaměřuje na metody cytometrické, které se obecně rozdělují na průtokovou a obrazovou cytometrii. Většina studií zabývajících se určením ploidní úrovně ryb, velikostí genomu, studiem fylogeneze a měřením obsahu DNA využívá spíše metodu průtokové cytometrie než obrazové metody, a to především kvůli časové náročnosti mikroskopických analýz.

U průtokové cytometrie (FCM) záleží především na výkonnosti zdroje světla a sadě filtrů průtokového cytometru, a dále na zvoleném fluorescenčním barvivu. Zatímco k obarvení AT bohatých oblastí DNA se používá barvivo DAPI (4,6-diamidin-2-fenylin-dole), kterým lze získat pouze relativní obsah DNA buněk; barvivem propidium jodid (PI), které se váže na GC bohaté oblasti DNA, je možné získat absolutní obsah DNA buněk (Crissman a Hiron, 1994; Vinogradov, 1994). Feulgenova obrazová analýza (FIA; denzitometrie), která byla aplikována v této práci, se využívá k získání absolutního obsahu DNA jader rybích erytrocytů pomocí Feulgenovy reakce. Od roku 1924, kdy Feulgen a Rossenbeck poprvé pomocí histochemické reakce umožnili vizualizovat chromozomální materiál neboli DNA bakterie s použitím kyselé hydrolýzy s následným obarvením Schiffovým činidlem a světelného mikroskopu, byla



Feulgenova reakce několikrát modifikována mnoha autory nejen v rostlinné a živočišné biologii, ale také v lékařství. Právě díky rozvoji kamerové a počítačové techniky v posledních letech došlo k velkému vývoji denzitometrické metody a je tedy možné mnohem snadněji získat a porovnat rozdíly v obsahu DNA mezi denzitometrií a průtokovou cytometrií.

Proto původním účelem této práce bylo porovnání absolutního obsahu DNA naměřeného FCM s barvivem PI a FIA, a následně porovnat absolutní obsah DNA s relativním obsahem DNA naměřeného FCM pomocí DAPI. Avšak z důvodu poruchy průtokového cytometru vhodného k měření vzorků obarvených PI je cílem této práce statistické porovnání naměřených výsledků FCM s barvivem DAPI a FIA - vyhodnotit, zda by v praxi naměřené množství DNA pomocí FCM s fluorescenčním barvivem DAPI bylo dostačující ke stanovení absolutního obsahu DNA u ryb. Následně, je-li možné – s ohledem k náchylnosti jeseterovitých ryb k mezidruhovému hybridizaci a spontánní polyploidizaci – z naměřeného obsahu DNA rozeznat čisté druhy od mezidruhových hybridů jeseterů.

Výsledky této práce byly součástí výzkumných programů financovaných Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky – projektu CENAKVA (LM2018099), Biodiverzita (Reprodukční a genetické postupy pro uchování biodiverzity ryb a akvakulturu) (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_025/0007370) a Grantovou agenturou České republiky (18-09323S).

## 2 Literární rešerše

### 2.1 Stručný úvod do problematiky mezidruhové hybridizace jeseterovitých ryb

U jeseterů (*Acipenseriformes*) již byla provedena řada genetických studií prokazující charakteristický vysoký počet chromozomů i vysoký obsah DNA v porovnání s kostnatými rybami (například studie Mirsky a Riss, 1951; Ohno a kol., 1969; Arefjev a Nikolaev, 1991; Ludwig a kol., 2001; Hardie a Hebert, 2004) a jsou schopni hybridizace jak v přirozených podmínkách, tak v řízených (umělých) podmínkách (Havelka a kol., 2011). Hlavní příčinu, ať už mezidruhové či mezirodové hybridizace, Dudu a kol. (2011) uvádějí překrývající se výskyt rybích farem v přibližně stejné době v okolí řeky Dunaj, což mohlo zapříčinit snížení přirozených reprodukčních oblastí v této oblasti. Nejen rybí farmy, ale také ostatní antropogenní činnosti jako například intenzivní rybolov v minulosti, výstavba elektráren a přehrad, které znemožňují přirozenou migraci jeseterů či znečištění řek, zavlažovací a odvodňovací systémy negativně ovlivňují především rybí larvy a juvenilny (Bacalbasa-Dobrovici, 1997; Ruban, 1997; Zhou a kol., 2013; Yuan a kol., 2018), mohly zavdat důvod k hybridizaci těchto druhů ryb jako ochranu či vyrovnání struktury a velikosti genetické diverzity přírodních populací před rozdílností životního prostředí (Birstein a kol., 1997; Yuan a kol., 2018). Na druhou stranu přirozená schopnost polyploidie, podobné evoluční stáří a genetická variabilita či podobné nároky na rozmnožování a podmínky prostředí zvyšuje schopnost přirozené hybridizace i poskytnutí životaschopného potomstva (Birstein a kol., 1997; Flašhans a kol., 2013). Problémem také mohlo být samotné rozlišení hybridních jedinců od čistých druhů, kteří v minulých letech byly bráni za samotné druhy či jejich poddruhy (Dudu a kol. 2011). Příkladem může být publikace Ruban (1997), ve které se na základě morfologie a odlišného výskytu rozlišují 3 poddruhy jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*): (1) *A.b.baerii* v řece Ob; (2) *A.b.baicalensis* v Bajkalském jezeře; (3) *A.b.stenorhynchus* v Sibiřských řekách. Avšak dodnes nebyla provedena žádná genetická studie, která by tyto poddruhy potvrdila.

Přes všechny tyto důvody jsou hybridní v některých umělých chovech produkováni řízeně, a to hned z několika důvodů. Hlavním důvodem je komerční produkce těchto

druhů ryb, kdy je snaha využít heterozního efektu ke zlepšení užitkovosti. Jedná se však pouze o docílení souladu mezi rodičovskými geny - cílem tedy je využít „lepší“ vlastnosti a „potlačit“ nechtěné vlastnosti. Nevýhodou je pouze to, že heterozní efekt lze přenést pouze na první potomstvo ( $F_1$ ; Flajšhans a kol., 2013). U jeseterovitých ryb se řada hybridů může nadále rozmnožovat (Hochleitner, 2004; Flajšhans a kol., 2013).

Jeseteři nejsou významní pouze pro kaviár a maso bez kostí, ale také pro porozumění evoluční historie, mechanismu genomové duplikace a původu ploidie (Zhou a kol., 2013). Z karyologických dat a obsahu DNA se předpokládá, že druhy patřící do čeledi Acipenseridae pochází původně z tetraploidního předka pravděpodobně se 120 makro- a mikrochromozomy a obsahem DNA  $3,2 - 3,8 \text{ pgjád}^{-1}$ . Tetraploidizace předpokládaných 60-ti chromozomů předka nastala zřejmě v rané evoluci této skupiny (Birstein a kol., 1997). Obecně se jeseteři rozdělují do třech ploidních skupin dle počtu chromozomů a množství DNA v jádře erytrocytu: (1) druhy s počtem okolo 120 chromozomů a  $3,6 - 4,6 \text{ pgjád}^{-1}$ ; (2) druhy s 240 až 270 chromozomy (konvenčně charakterizováni s 250 chromozomy) a  $7 - 9,6 \text{ pgjád}^{-1}$  (Birstein a kol., 1993; Blacklidge a Bidwell, 1993; Vasil'ev, 2009); (3) druhy s 370 chromozomy (jeseter krátkorypý, *Acipenser brevirostrum*; Kim a kol., 2005; Vasil'ev, 2009) a  $13,1 \text{ pgjád}^{-1}$  (Blacklidge a Bidwell, 1993). Pro nejasný původ a zatím ne zcela objasněné příčiny ploidie (Madlung, 2013) je mezi vědci nejednotné označování ploidních úrovní. Zatímco jedna skupina využívá pro označení polyploidních jeseterů tzv. funkční úroveň ploidie, tzn. funkční diploidi, tetraploidi, hexaploidi atd. (například Ludwig a kol., 2001; Fontana, 2002; Havelka a kol., 2013); druhá skupina využívá označení evoluční tetraploid, oktaploid a dodekaploid, protože se domnívají, že evoluční diploidní předek již vyhynul (například Ohno a kol., 1969; Blacklidge a Bidwell, 1993; Birstein a Bemis, 1997; Symonová a kol., 2013).

Přestože jsou již v dnešní době využívány a aplikovány programy na reintrodukcii jeseterů zpět do volných vod, patří jeseteři stále do ohrožených druhů ryb. Nejen pro tento důvod, ale také pro zachování genetické variability, ochrany genofondu a vyřazování hybridů z čistých chovů je nutné využít cytogenetické a molekulární metody k rozeznání čistých druhů od hybridních jedinců. Například přímé počítání chromozomů, stanovení karyotypového obrazu, identifikace rodičovských chromozomů, měření obsahu DNA v buňce, měření geometrických charakteristik buněk nebo počítání buněk, či jiné metody v souvislosti s laboratorním vybavením je možné

aplikovat pro identifikaci mezidruhových hybridů jeseterů (Kim a kol., 2005; Flajšhans a kol., 2013; Symonová a kol., 2013; Zhou a kol., 2013; Yuan a kol., 2018).

### 2.1.1 Velikost genomu a obsah DNA

Poprvé v roce 1950 byl publikován pojem „C-value“ nebo-li také „C-hodnota“, který je definován jako haploidní množství DNA v buňce (Swift, 1950). Velikost genomu neboli obsah gametické jaderné DNA, se udává buď v jednotkách hmotnosti pikogram (kdy  $1 \text{ pg} = 10^{-12} \text{ g}$ ) nebo v počtu bazických párů (u eukaryot se nejčastěji uvádějí v megabázích, kdy  $1 \text{ Mb} = 10^6$  bází a  $1 \text{ pg} = 978 \text{ Mb}$ ; Doležel a kol., 2003). Ačkoli fluorometrická analýza objemu („bulk fluorometry“), elektroforetické metody, kvantitativní real-time PCR nebo kompletní genomové sekvence či různé studium chromozomů se stále využívají ke studiu velikosti genomu. Hlavními metodami v tomto studovaném oboru je Feulgenova denzitometrie (dnes již pomocí počítačové obrazové analýzy) a průtoková cytometrie (Gregory a kol., 2007).

V 50. letech 20. století Mirsky a Riss (1951) uvedli právě na základě obsahu jaderné DNA rozdílnosti v systematice napříč všemi skupinami živočichů; a jako první zaznamenali vyšší obsah DNA u zástupce chrupavčitých ryb jesetera velkého (*A. sturio*; 3,2 pg DNA v jádře erytrocytu) než u ostatních modelových kostnatých ryb. Na základě tohoto zjištění se staly zástupci chrupavčitých ryb atraktivními pro další studium velikosti genomu, počtu chromozomů, evoluce a jejich příbuznosti.

Již tehdy si tito vědečtí pracovníci všimli vztahu mezi počtem a velikostí buněk a množstvím DNA (Mirsky a Riss, 1951). Velikostně větší buňky (u ryb se jedná o jaderné erytrocyty) s vyšším množstvím jaderné DNA mohou ovlivňovat fyziologii ryb. Takto může velikost genomu ovlivňovat nejen samotného jedince s většími buňkami, ale také vývoj mezi skupinami/populacemi obratlovců (Gregory, 2001). Bytyutskyy a kol. (2012) prokázali u jeseterovitých druhů ryb, že s rostoucí velikostí genomu roste také velikost buněk. Tedy se zvyšujícím se obsahem DNA se zvětšuje jádro erytrocytu, a tudíž i celá buňka. Avšak tento růst je umožněn pouze do určité velikosti, a u jeseterů s vyšší ploidní úrovní je DNA v buněčných jádrech více kondenzována, přičemž velikost buňky se již tolik nezvětšuje. Zvětšuje-li se však velikost tělních buněk, počet buněk se snižuje. Tato regulace mezi množstvím DNA a velikostí buněk může mít negativní dopad na daného jedince – s nižším počtem erytrocytů například může dojít ke zhoršení rozvádění kyslíku v krvi a správného okysličení žaberního aparátu (Flajšhans a kol., 2013). Kromě ovlivnění fyziologie,

může docházet k ovlivnění stability genomu, exprese genů, evolučního vývoje či vzniku nových rodů a vztahů uvnitř i mezi populacemi (Otto, 2007). Předmětem studie již několik let je také vliv na reprodukci ryb (například Pšenička a kol., 2010; Havelka a kol., 2014). Přestože, již výhody i nevýhody polyploidních jeseterů (ale i ostatních druhů ryb, čistých i hybridních jedinců) byly mnohokrát zkoumány, stále chybí dostatečné informace k prohlášení, zda se jedná o pozitivní či negativní jev (Madlung, 2013).

## **2.2 Obecná charakteristika cytometrie a její význam**

Cytometrie se využívá pro měření geometrických, fyzikálních a chemických charakteristik jednotlivých buněk, ale i jiných biologických nebo nebiologických částic přibližně ve stejném velikostním rozpětí. Jejím cílem je zjištění přítomnosti daných buněk ve zkoumaném vzorku, o jaký druh buněk se jedná, jejich počet a jaká může být jejich funkce. Díky modernizaci a vývoji různých přístrojů, počítačových softwarů a metod, je tedy možné získat více informací o daném vzorku, které není možné zjistit prostým lidským okem (Shapiro, 2003).

Hlavní cytometrickou metodou je průtoková cytometrie. Aplikovat lze však také její alternativy, mezi které patří například mikrospektrofotometrie, konfokální mikroskopie, analýza obrazu či skenovací cytometrie (Shapiro, 2003).

## **2.3 Průtoková cytometrie (Flow cytometry; FCM)**

Principem průtokové cytometrie je průchod buněk nebo částic v unášejícím médiu procházející měřicím přístrojem – průtokovým cytometrem. Detektor buněk nebo tekutiny, je průtokový cytometr, který využívá elektrický a/nebo mechanický průměr k odklánění a shromažďování buněk (nebo jiných malých částic) s měřenými charakteristikami dle zvoleného specifického fluorescenčního barviva (Shapiro, 2003).

Průtokový cytometr se skládá ze 3 hlavních částí – fluidního systému, optického systému a elektronického systému (Pekarčíková a kol., 2014). Základem pro průtokovou cytometrii je vytvoření suspenze částic, která je vstříkována pomocí trysky do nosné tekutiny (destilovaná voda nebo roztok solí; Watson, 1991; Suda, 2005; Novák a kol., 2008; Hrušák, 2011). Dle Watsona (1991) je zajištění stabilního toku nosné kapaliny jedním z nejdůležitějších aspektů FCM. Ta je nasávána do průtokové komory s větším pod tlakem (Watson, 1991) než suspenze částic (Suda, 2005). Kvantitativní aspekty FCM jsou založeny na měření excitačního záření a emisního

záření (Watson, 1991; Hrušák, 2011; Pekarčíková a kol., 2014). Zdroj excitace obvykle bývá argonový laser, rtuťová výbojka, oblouková nebo LED lampa. Dále optický systém tvoří sestava čoček a hranolů (usměrňující světelný monochromatický paprsek), optická zrcadla a filtry (umožňující detekci světelných fotonů o určité vlnové délce příslušnými detektory; Novák a kol., 2008; Pekarčíková a kol., 2014). V průtokové komoře dochází k separaci buněk a k jejich jednotlivému měření. Díky světelnému signálu neboli analýze fotonů dopadajících na detektor v okamžiku, kdy každou jednotlivou buňkou projde laserový paprsek. Během interakce částice (buňky) se zářením dojde k detekci rozptylu a odrazu světelného paprsku nebo-li fluorescence procházející částicemi (Novák a kol., 2008; Šinkorová a Zárybnická, 2008), přičemž světlo excitačního zdroje má vždy nižší vlnovou délku, než byla detektory zaznamenána fluorescence emitovaného světla. Údaje o měření jsou tedy zaznamenány dvěma parametry rozptylu: pomocí přímého rozptylu (z anglického překladu „forward angle lights scatter“) pod úhlem 2-13°, charakterizující úměrnou velikost buňky; a pomocí bočního rozptylu (z anglického překladu „right angle lights scatter“ nebo „side scatter“) pod úhlem 90°, charakterizující vnitřní rozmanitost buněčné struktury. (Watson, 1991; Shapiro, 2003; Novák a kol., 2008; Šinkorová a Zárybnická, 2008; Branská a kol., 2011; Pekarčíková a kol., 2014). Nakonec pomocí elektronického systému je možné převést optický signál na elektrický a díky počítačového softwaru digitalizace výsledků. Získaná data tak mohou být zobrazena jako dvourozměrný graf (tzv. „dot plot“ nebo-li každá „tečka“ prezentuje jednu buňku) nebo ve formě histogramu (jednoparametrová analýza; Pekarčíková a kol., 2014).

Velká výhoda průtokové cytometrie je její přesnost a rychlost v přípravě vzorků i měření. V ideálním případě by se měla výsledná fluorescence shodovat se všemi analyzovanými částicemi (buňkami) vyskytující se ve stejné růstové fázi. Ve skutečnosti však dochází k mírným výchylkám (rozptylu hodnot), které mohou být způsobeny například nepatrnými rozdíly v podmínkách, rozdílnou obarveností částic či přístrojovou chybou (Suda, 2005). Přesnost měření se uvádí v procentech pomocí variačního koeficientu (CV; podíl mezi směrodatnou odchylkou a pozicí píku krát sto). Hodnota CV by obecně neměla přesahovat hranici 5 %. Pro vyhodnocení výsledků jakékoliv analýzy DNA je vhodnější, aby CV nepřesáhnul hranici 3 % (Shapiro; 2003; Suda, 2005).

### 2.3.1 Specifická barviva vázána na DNA pro průtokovou cytometrii

Od počátku vývoje metody průtokové cytometrie byla aplikována různá fluorescenční barviva nejen v souvislosti na zvoleném typu tkáně, částic, buněk či mikroorganismů, ale i během analýz zaměřených na studium jaderné DNA. Například studie z roku 1980, od autorů Taylor a Milthorpe, pojednává o vývoji fluorescenčních barviv, zahrnující například DAPI, PI, ethidium bromid, mithramycin, chromomycin, olivomycin a Hoechst 33342. O několik let později pojednává o fluorescenčních barvivech také Vinogradov (1994). Pro svůj experiment zvolil barvivo Hoechst 33258, které se váže na AT bohaté oblasti DNA a olivomycin, vázané na GC bohaté oblasti DNA pro studium velikosti genomu u vybraných obratlovců. V posledních letech se však nejčastěji využívá fluorescenční barvivo DAPI (viz. níže).

#### 2.3.1.1 4-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)

Specifické fluorescenční barvivo 4-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) je nejčastěji využíváno pro analýzu chromozomů a jader DNA, neboť se přednostně váže na AT bohaté oblasti DNA. Excitační maximum tohoto fluorochromu je při vlnové délce 359 nm a emisní maximum při vlnové délce 461 nm (Karg a Golic, 2018). Emituje modrou fluorescenci, je-li excitováno UV světlem okolo 350 nm vlnové délky. DAPI barvivo je velmi cytotoxické a může penetrovat membránami buněk (Crissman a Hirons, 1994). Velmi podobnému barvivu DAPI jsou také Hoechstova barviva – Hoechst 33258 a 33342 – mají podobný excitační i emisní maximum vážící se též na AT bohaté oblasti DNA (Crissman a Hirons, 1994; Karg a Golic, 2018). Pro průtokovou cytometrii bylo DAPI aplikováno pro obarvení vzorků například fibroblastů, leukocytů, tkání plic a jater, kostní dřeně, kožních buněk, tkán nádorů, erytrocytů kuřete a pstruha, aj. (Otto, 1994). Otto (1994) a Gregory (2005) doporučují DAPI využívat pro získání hodnot relativního obsahu DNA, nikoliv pro měření absolutního obsahu DNA či pro porovnání buněk s rozdílnými poměry AT oblastmi.

#### 2.3.1.2 Propidium iodid (PI)

Červený fluorescenční barvivo propidium jodid (PI) má podobnou chemickou strukturu jako dříve používaný ethidium bromid (EB). Obě barviva se přednostně vážou na GC bohaté oblasti DNA a je tedy vhodné pro měření absolutního obsahu DNA (Crissman a Hirons, 1994; Vinogradov, 1994; Gregory, 2005). Excitační maximum barviva PI uvádí Branská a kol. (2011) na vlnové délce 536 nm a emisní maximum

na vlnové délce 623 nm. Na rozdíl od DAPI, PI ani BE nemůže penetrovat membránami živých buněk, ale snadno proniká do buněk s poškozenými membrány (Crissman a Hirons, 1994). Průtoková cytometrie s fluorescenčním barvivem PI je přirovnávána k obrazové cytometrii s použitím Feulgenovy reakce, která se běžně využívá pro měření absolutního obsahu DNA (Krishan, 1975).

### 2.3.2 Využití průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie má významnou roli v moderní biologii a medicíně. Běžně se průtokové cytometry používají pro měření v oborech onkologie, patologie, hematologie, imunologie a buněčné biologii (Watson, 1991). Využití kvantitativních barviv pro analýzu buněčné DNA pomocí této metody zůstává nejrychlejší a velmi spolehlivou metodou (Crissman a Hirons, 1994) například k biochemickým měření DNA a proteinů v jednotlivých buňkách, umožňující následnou korelaci těchto metabolických parametrů ve studiích vztahu mezi růstem buněk a cyklem buněčného dělení. Simultánní měření množství DNA a proteinů také umožňuje posoudit jejich poměr, který slouží k vyhodnocení stavu vyváženého růstu buněk vyskytujících se v určitých fázích buněčného cyklu (Crissman a Steinkamp, 1994). Dále ke zhodnocení relativního, ale i absolutního obsahu DNA různých typů buněk či chromozomového profilu buněčných populací. S využitím příslušných fluorescenčních barviv je tedy možné provést monitoring dělení buněčného cyklu, lokalizovat S fázi (rozlišit brzkou, střední a pozdní S fázi cyklu), apoptózu buněk, zjistit abnormality v průběhu mitózy (například nondisjunkce nebo polyploidizace; Crissman a Hirons; 1994). Další využití má FCM například v oblasti studia jaderné DNA, genové exprese či třídění a počítání buněk (Suda, 2005), posouzení viability organismů/ buněk prostřednictvím měření esterasové aktivity, integrity cytoplazmatické membrány, intracelulární pH, respirace/ dehydrogenasové aktivity (Branská a kol., 2011), membránového potenciálu a mitochondriálních ROS (reaktivní formy kyslíku; Pekarčíková a kol., 2014). V neposlední řadě také v oblasti monitoringu planktonních organismů jako jsou bakterie, viry, fytoplankton (Li a Dickie, 2001), či studiích vzájemných interakcí mezi zooplanktonem, bakteriemi a fytoplanktonem (Gerritsen a kol., 1987; Tang a kol., 2010).



### 2.3.2.1 Stanovení polyploidie a obsahu DNA

Polyploidie u obratlovců není zcela běžný jev. Oproti tomu u ryb k tomuto jevu během jejich evolučního vývoje docházelo zcela běžně (Leggat a Iwama, 2003). V akvakultuře lze pozitivně využít tohoto experimentálně vyvolaného jevu, což jen potvrzuje, že polyploidie souvisí s evolucí velikostí genomů ryb (Flajšhans a kol., 2013). Již od 80. let 20. století je průtoková cytometrie využívána k hodnocení chromozomálních abnormalit a ke studiu (poly)ploidie (Ráb a kol., 2007). Jednou z nejčastější aplikací průtokové cytometrie u ryb je stanovení relativního a absolutního obsahu DNA, podle něhož je možné určení ploidní úrovně (Birstein a kol., 1993; Vinogradov, 1998; Zhou a kol., 2011; Bytyutskyy a kol., 2014).

Průtoková cytometrie lze také využít v modifikaci metody *in situ* hybridizace, která se standardně využívá v mikroskopii. Pomocí průtokové cytometrie mohou být chromozomy tříděny, a zobrazeny ve dvourozměrném grafu („dot plot“; Fisher a kol., 1994). Dále je také možné stanovit velikost genomu buněčného jádra, která patří mezi základní charakteristiky každého druhu (Vinogradov, 1998). Navíc patří k vhodným parametrům objasňující fylogenetické a evoluční studie (Vinogradov, 1998; Gregory, 2001; Cyudad a kol., 2002; Flajšhans a kol., 2013; Bytyutskyy a kol., 2014).

Klíčovým faktorem v aplikaci průtokové cytometrie je jako u většiny měřících metod, použití standardu. V tomto případě se jedná o standard, u kterého je obecně znám haploidní obsah jaderné DNA, např. erythrocyty lína obecného (*Tinca tinca*) obsahující  $1,02 \text{ pg.jádro}^{-1}$  DNA, erythrocyty pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) obsahující  $2,60 \text{ pg.jádro}^{-1}$  DNA či domestikovaného kuřete (*Gallus gallus domesticus*) obsahující  $1,25 \text{ pg.jádro}^{-1}$  DNA (Flajšhans a kol., 2013; Bytyutsky a Flajšhans, 2014).

## 2.4 Obrazová cytometrie

Obrazová analýza patří k cenným metodám umožňující studium jednotlivých živých a fixovaných buněk či buněčných struktur ve 2D či 3D obrazu (Pollard a Earnshaw, 2002; Bytyutskyy a kol., 2014) prostřednictvím optického mikroskopu a moderní počítačové techniky namísto pozorování prostým lidským okem (Mayall, 1988; Plášek, 1996). Pomocí obrazové mikroskopie je možné získat nejen informace o velikosti buňky, velikosti jádra, integrované optické hustoty, ale umožňuje také studium chromozomů (Del Campo a kol., 1989; Mello a de Campos Vidal, 2017), mechanismů

bunčných procesů (Pollard a Earnshaw, 2002) či průběhu vývoje embryí (Wolenski a Julich; 2014).

Jednou z nejstarších metod obrazové cytometrie je denzitometrie (mikrodenzitometrie) a později denzitometrická obrazová analýza, využívající stechiometrické barvení buněk pomocí Feulgenovy reakce (Feulgen a Rossenbeck, 1924; Hardie a kol., 2002). Poměrně novou metodou obrazové cytometrie u ryb je využití konfokální laserové skenovací mikroskopie (CLSM), díky níž je možné získat 3D obraz fixovaných či živých vzorků, případně 4D (x, y, z a čas; Bytyutskyy a kol., 2014; Wolenski a Julich, 2014). Fluorescenční mikroskopie se využívá pro analýzu karyotypu (Kim a kol., 2005), komparativní genomové hybridizace (CGH) a genomové in-situ hybridizace (GISH; Symonová a kol., 2013; Symonová a kol., 2015), které jsou modifikací metody fluorescence in situ hybridizace (FISH; Pollard a Earnshaw, 2002).

Při rozhodování o výběru jedné z uvedených metod k odhalení hybridních jedinců v dané populaci hraje důležitou roli použití vhodného a kvalitního mikroskopu. Stejně tak je důležité dbát na dodržování daného postupu při barvení vzorků, neboť i při menší nepozornosti může dojít k chybě, která může způsobit snížení kontrastu vizualizace a zvýšit nepřesnost získaných výsledků (Plášek, 2015).

#### **2.4.1 Stručný úvod do optické (světelné) mikroskopie**

Standardní optickou neboli světelnou mikroskopii lze charakterizovat anglickým termínem „wide-field microscopy“, které lze do českého jazyka přeložit jako celoplošné zobrazování, vyznačující se pozorováním všech bodů vizualizovaného vzorku současně (Plášek, 2015). Tato rozsáhlá metoda se využívá např. v biologii, medicíně, chemii, mineralogii, metalurgii či kriminalistice (Plášek, 1996).

Hlavní přínos optické mikroskopie spočívá především v pozorování zvětšených barevných i nebarevných struktur ve viditelné části spektra různých objektů až na úrovni 0,2  $\mu\text{m}$  (Karp, 2010; Bártová a kol., 2014), neboť rozlišovací schopnost zdravého lidského oka nám umožňuje pozorovat objekty maximálně o velikosti 70  $\mu\text{m}$  při vzdálenosti 250 mm od oka (Plášek, 2015).

Standardní optický (světelný) mikroskop se skládá ze tří částí: (1) světelná část – zdroj světla, kondenzor s lamelovou clonou a zrcátko; (2) mechanická část – podstavec, stativ, tubus, měnič objektivů a stolek se svorkami a křížovým posunem exemplářů; (3) optická část tvořena objektivy a okuláry (Bártová a kol., 2014). Princip klasické světelné mikroskopie spočívá v průchodu světelných paprsků skrz pozorovaný objekt

a optickou soustavu, která je tvořena dvěma čočkami či soustavou čoček. Pomocí kondenzátoru se světelné paprsky soustřeďují na preparát, a díky vhodné kombinaci čoček nám mikroskop umožňuje pozorovat obraz zdánlivě zvětšený a převrácený oční sítnicí nebo kamerovým softwarovým systémem (Pollard a Earnshaw, 2002; Karp, 2010; Bártová a kol., 2014).

Ještě před vývojem kamerových a počítačových systémů probíhalo měření geometrických charakteristik objektů v mikroskopickém preparátu, jako je šířka, délka, výška či objem, pomocí okulárového a objektivového mikrometru. K získání přesných údajů je nutná znalost matematických vzorců společně s indexem bodu lomu daného média. Okulárový mikrometr s vyrytou stupnicí 1 cm (1 dílek = 0,1 mm) se vkládá do okuláru a je vizualizován pomocí seřizování clony. Naproti tomu, objektivový mikrometr neboli etalon, je skleněná destička (podložní mikroskopické sklíčko) s vyrytým obdélníkem uprostřed a numerickou úsečkou o celkové délce 1 mm (1 dílek = 10  $\mu$ m; Tesař a Bednář, 2012; Löffelman a kol., 2017).

Inovaci v pozorování a měření různých velikostí a vlastností pozorovaných molekul, buněk, tkání či různých chemických reakcí apod. přinesl až vývoj digitálních a CCD kamer (z anglického jazyka „charge-coupled device“ lze přeložit tento výraz jako „vstupní skenovací zařízení“) a příslušných počítačových programů (Hardie a kol, 2002; Karp, 2010; Tesař a Bednář, 2012). Výhodou těchto kamer je světelná sensibilita (schopnost pozorování objektů za velmi nízkého osvětlení) vhodná především při pozorování živých preparátů, které se snadno poškodí teplem vznikajícím světelným zářením a fluorescenčně obarvených preparátů, u kterých mohou některé fluoresceiny - díky působení světla - rychle ztrácet barvu (Karp, 2010), tzv. „vysvítit se“. Velkým přínosem využívání kamery je možnost konvertovat pozorování daného objektu do elektronického digitálního obrazu a pomocí příslušného počítačového programu získávat více údajů (Karp a kol., 2010; Pollard a Earnshaw, 2002). Digitalizací obrazu získáme snímky, které jsou zobrazeny jako sled pixelů se specifickou intenzitou a barvou (Hardie a kol., 2002).

#### **2.4.2 Stanovení obsahu DNA pomocí Feulgenovy reakce**

Feulgenovu reakci, kterou vynalezli společně Feulgen a Rossenbeck a v roce 1924 publikovali, považují Crissman a kol. (1979) jako jednu z brzkých cytometrických metod, která je využívána ke kvantifikaci obsahu buněčné DNA. Avšak z důvodu časové náročnosti se tato metoda pro obarvení a následné stanovení obsahu DNA příliš

často nevyužívá. Dále je také zapotřebí dbát na bezpečnostní opatření při práci v laboratoři, neboť esenciálním krokem této metody je hydrolyza kyselinou chlorovodíkovou, dále probíhá depurinace DNA, odstranění RNA a histonů či dalších potenciálních buněčných organel včetně membrány (Crissman a kol., 1979). Přesto má ale tato cytometrická metoda, která se postupně vyvíjela díky *in vitro* a *in vivo* experimentů s rybami několik výhod (Phan a kol., 2015), a využívá se dodnes (např. studie Fontana, 1976; Hardie a kol., 2002; Bytyutskyy a kol., 2012; Bytyutskyy a Flajšhans, 2014; Phan a kol., 2015). Částečně je to proto, že erythrocyty ryb jsou jaderné, lze je poměrně snadno vizualizovat pod mikroskopem pomocí obarvení krevního nátěru a není nutné usmrtit zvíře k získání malého krevního vzorku (Phan a kol., 2015). Využívá se dále v botanice, zoologii i medicíně (například studie DeLamater a kol., 1950; Mayall, 1988; Greilhuber a Tensch, 2001; Symonová a kol., 2013; Mello a de Campos Vidal, 2017; a další). Preparáty obarvené touto reakcí se následně vyhodnocují pomocí světelného mikroskopu, digitalizací zobrazení a moderních počítačových softwarů (Hardie a kol., 2002; Mello a de Campos Vidal, 2017).

#### 2.4.2.1 *Denzitometrie (mikrodenzitometrie/Feulgenova denzitometrie)*

Denzitometrie nebo-li také mikrodenzitometrie či Feulgenova denzitometrie, je kvantitativní instrumentální metoda využívána především ke stanovení absolutního obsahu DNA v jádře rybiho erythrocytu obarveného Schiffovým činidlem (Hardie a kol., 2002; Faljšhans a kol., 2013). Tato technika vychází z předpokladu, že množství použitého barviva se přímo úměrně váže na množství DNA přítomné v erythrocytu. U takto obarvených buněk je dále měřeno absorbované světlo použitého barviva (Hardie a kol., 2002).

Nevýhodou této metody je především nemožnost měření absorbance přímo, a proto musí být hodnoty absorbance (optické denzity, OD) vypočteny nepřímo z měření množství světla procházejícího objektem (transmitance, T). Pro Feulgenovou denzitometrii se proto provádí měření přímo v jádru erythrocytu a mimo erythrocyt v tzv. „jasné (čisté)“ oblasti mikroskopického sklíčka. Rozdíl v intenzitě světla mezi těmito oblastmi mikroskopického sklíčka představuje součinitel transmitance. Výsledek měření lze pak vypočítat podle níže uvedeného vzorce (Hardie a kol., 2002):

$$OD = \log_{10} (1/T)$$

Heterogenní povaha DNA obarvené v jádře ztěžuje jak samotné měření, tak i prezentaci výsledků. Z tohoto důvodu je při měření denzity individuálního jádra nezbytné pořídit sérii několika měření v různých „bodech“ u každého obarveného jádra. Součet těchto individuálních optických denzit je obecně nazýváno integrovaná optická denzita (IOD) jádra. Průměrná hodnota nebo modál IOD jader neznámých vzorků jsou pak porovnány se standardy (Hardie a kol., 2002).

Jak již bylo zmíněno, první data o jaderném obsahu DNA u ryb publikovali v roce 1951 Mirsky a Riss. Jako zástupce jeseterovitých ryb zvolili jesetera velkého (*Acipenser sturio*), u kterého naměřili obsah jaderné DNA s hodnotou  $3,2 \text{ pg.jádro}^{-1}$ . Později, v roce 1969, Ohno a kol. pomocí integrovaného denzitometru naměřili obsah jaderné DNA u lopatonose amerického (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) s hodnotou  $3,6 \text{ pg.jádro}^{-1}$ . Integrovaný denzitometr ke změření obsahu DNA u vybraných zástupců chrupavčitých druhů ryb ve své studii využil také Fontana (1976) a uvádí hodnoty obsahu DNA u vyzy velké (*Huso huso*)  $3,6 \text{ pg.jádro}^{-1}$ , j. velkého (*A. sturio*)  $3,6 \text{ pg.jádro}^{-1}$ , j. jadranského (*A. nacarii*)  $5,69 \text{ pg.jádro}^{-1}$ .

V dnešní době se tato metoda již nevyužívá, a to především kvůli vysoké časové náročnosti. Díky velkému rozvoji kamerových a počítačových systémů je upřednostňována Feulgenova obrazová analýza či průtoková cytometrie, případně jiné metody v souvislosti s vybaveností laboratoří.

#### 2.4.2.2 *Feulgenova obrazová analýza (Feulgen Image analysis; FIA)*

Stejně tak jako u klasické denzitometrie, Feulgenova obrazová analýza (FIA) využívá k obarvení krevního nátěru Feulgenovu reakci. Rozdílem mezi těmito dvěma metodami je pouze laboratorní vybavení k měření a výpočtu absolutního obsahu DNA. Zatímco u denzitometrie probíhá veškeré měření optické denzity a výpočet obsahu DNA manuálně (případně pomocí automatických denzitometrů), u FIA je možné stechiometricky obarvené buňky vizualizovat pomocí světelného mikroskopu a příslušné kamery pořizovat snímky, které lze díky moderních počítačových softwarů převést do elektronické podoby a vyhodnotit (Hardie a kol., 2002; Gregory, 2005; Flajšhans a kol., 2013).

Barevný obraz je převeden do požadovaného obrazu se stupněm šedé pomocí monochromatického světla (interferenční filtr je umístěn před zdroj světla) nebo analyzováním pouze jedním ze tří základních kanálů tzv. RGB (červený, zelený, modrý; tvořící barvu pixelu). Stejně tak jako u klasické denzitometrie, i u obrazové analýzy

je nutné změřit intenzitu světla v části krevního nátěru mimo jádra i dále pak přímo v jádre erytrocytu (Hardie a kol., 2002).

Přestože tato modernizovaná metoda klasické denzitometrie dosáhla v průběhu posledních let velkého pokroku a časová náročnost byla zlepšena, i v dnešní době je stále upřednostňována metoda průtokové cytometrie. Přesto tuto metodu ve své studii aplikoval například Hardie a Hebert (2004), kteří naměřili absolutní obsah DNA u j. krátkorypého (*A. brevirostrum*)  $13,8 \text{ pgjád}^{-1}$  a u j. ostrorypého (*A. oxyrhynchus*)  $4,4 \text{ pgjád}^{-1}$ . Dále ke studii jeseterovitých ryb využil tuto metodu ve své práci Bytyustkyy a kol. (2012). Ve své studii například publikoval absolutní obsah DNA j. malého (*A. ruthenus*)  $3,72 \text{ pgjád}^{-1}$ , j. sibiřského (*A. baerii*)  $8,29 \text{ pgjád}^{-1}$  a j. ruského (*A. gueldenstaedtii*)  $7,87 \text{ pgjád}^{-1}$ .

#### 2.4.2.3 *Tvorba krevního nátěru*

Příprava krevního nátěru pro vizualizaci jader erytrocytů ryb je, kromě kvality obarvení, nejdůležitějším krokem. Je-li nutné mikroskopická sklíčka nejprve vyčistit, lze je umýt v roztoku v alkoholu a směsi éteru nebo 10 % roztoku Triton X-100 v poměru 50:50. V případě pozorování velkých nečistot je potřeba sklíčka na 24 hodin ponořit do roztoku dichromanu, následně opláchnout pod tekoucí vodou, poté v destilované vodě a uchovávat v 95-100% alkoholu. Před použitím je vhodné sklíčko vyčistit jemnou tkaninou (Phan a kol., 2015).

Vzorek krve ryb se nejčastěji odebírá z ocasní žíly nebo ze srdce pomocí injekční stříkačky a jehly (Gold a kol., 1991; Phan a kol., 2015). Odběr krve lze provést u ryb delších více než 40 mm (Gold a kol., 1991). K zabránění srážlivosti krve se injekční stříkačky a zkumavky vyplachují proti srážecím činidlem, v případě ryb Na-heparinem (Gold a kol., 1991; Ozouf-Costaz a kol., 2015). Nabere se 0,5 - 2 ml krve a k předejití hemolýzy je doporučováno netřepat s injekční stříkačkou. Po odstranění jehly se krev převede do sterilních zkumavek. Takto získané krevní vzorky mohou být uskladněné ve 4 °C maximálně po dobu 24 hodin bez degenerace erytrocytů. Těsně před analýzou krve, je zapotřebí krev lehce protřepat (Phan a kol., 2015). Avšak Ozouf-Costaz a kol. (2015) doporučují krevní vzorek využít neprodleně po odběru.

Doprostřed konce řádně vyčištěného mikroskopického sklíčka se umístí malá kapka odebrané krve. Druhé sklíčko pomalu přiložíme pod úhlem 30° - 45° ke kapce krve, kterou necháme navzlínat mezi obě sklíčka, a rychlým pohybem rovnoměrně rozetřeme krev. Pro zaschnutí a zachování krevních buněk se pohybuje sklíčkem

s krevním nátěrem rychle v horizontálním směru po dobu 15 vteřin a následně se krevní nátěr uchovává v horizontální poloze do vysušení (Hardie a kol., 2002; Phan a kol., 2015). Poté proběhne fixace přelitím absolutním metanolem a usušením. (Phan a kol., 2015). Hardie a kol. (2002) však doporučují připravený a vysušený krevní nátěr fixovat po dobu 24 hodin roztokem MFA – 85 metanol : 10 formalin (37 %) : 5 kyselina octová. Vzduchem vysušený krevní nátěr (preparát) se až do obarvení uchovává při pokojové teplotě (Hardie a kol., 2002; Hardie a Hebert, 2004; Phan a kol., 2015).

#### **2.4.2.4 Barvení krevního nátěru**

Již bylo zmíněno, že v průběhu let byla denzitometrická analýza několikrát modifikována. To platí nejen pro technickou část, ale také pro postup při barvení krevního nátěru. V souvislosti typu buněk či tkání jako zkoumaného vzorku se postup barvení Feulgenovou reakcí mírně liší, avšak princip 2 základních histochemických reakcí (hydrolýza kyselinou chlorovodíkovou a barvení Schiffovým činidlem) je vždy stejný. Volba fixativa a doba jeho působení, doba průběhu hydrolýzy a doba působení barviva záleží na velikosti genomu, typu buněk, stáří preparátů (Hardie a kol., 2002), koncentraci silné kyseliny, teplotě kyselinové koupele (DeLamater a kol., 1950), aldehydové-pararosalinové reakci za přítomnosti SO<sub>2</sub>, pH (Mirsky a Riss, 1951). Je nezbytné dodržovat správný postup a podmínky během fixace i barvení, neboť jakákoliv menší výchylka (například teploty) může znehodnotit měření IOD a získané výsledky (Greilhuber a Temsch, 2001). Hlavní zásadou barvení je také barvení standardu společně s neznámými vzorky a stanovovat je společně (Mirsky a Riss, 1951; Hardie a kol., 2002; Srp, 2010). Pro studium evoluce genomu a stanovení absolutního obsahu DNA u ryb, shrnuli veškeré potřebné informace do v praxi aplikovatelného protokolu Hardie a kol. (2002).

Prvním krokem je hydrolýza DNA jejímž cílem je depurinace DNA a „odhalení“ aldehydových skupin na molekulách sacharidu (Feulgen a Rossenbeck, 1924). Nejdříve se připravené preparáty opláchnou pod tekoucí vodou a následně se ponoří na 120 minut do nádoby s 5M kyselinou chlorovodíkovou (HCl; Hardie a kol., 2002). Kolega Srp (2010) ve své bakalářské práci nechal 5M HCl působit pouze 50 minut. Po uplynutí této expoziční doby, je nutné preparáty opláchnout krátkými oplachy destilovanou vodou (Srp, 2010) nebo 0,1 M HCl (Hardie a kol., 2002).

Druhým krokem je chemická reakce „odhalených“ aldehydových skupin se specifickým Schiffovým činidlem, jejíž výsledkem je preparát v barvě magenty

(červeno-fialová barva). Základem Schiffova činidla je fuchsin, který je převážně tvořen červeným barvivem pararosanilin. Pro tuto reakci se využívá roztok fuchsinu odbarveného oxidem siřičitým, popřípadě hydrogensířičitanem (Feulgen a Rossenbeck, 1924; DeLamater a kol., 1950; Hardie a kol., 2002). Zatímco Hardie a kol. (2002) a Hardie a Hebert (2004) uvádějí dobu působení této reakce 120 minut, Srp (2010) nechal Schiffovo činidlo působit pouze 60 minut.

Po uplynutí expoziční doby Schiffova činidla, je následujícím krokem oplach pyrosířičitanem sodným ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ; Srp, 2010) nebo hydrogensířičitanem sodným (Hardie a kol., 2002). Pracujeme-li s pyrosířičitanem sodným, je důležité si ho vždy během doby působení Schiffova činidla připravit „čerstvý“ – 190 ml destilované vody, 10 ml zásobního roztoku pyrosířičitanu sodného a 2 ml M HCl. Proplach v takto připraveném roztoku se provádí 2x po dobu 3 minut (Srp, 2010). Druhou možností je použít hydrogensířičitan sodný, který lze připravit smícháním 150 ml 10 % disířičitanu sodného ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) nebo 10 % disířičitanu draselného ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) se 3 l destilované vody a 150 ml 1M HCl. Proplach s tímto roztokem se provádí 3x po dobu 5 minut. Po tomto proplachu je navíc nutné oplachovat obarvené preparáty 10 minut pod tekoucí vodou laboratorní (= pokojové) teploty (Hardie a kol., 2002).

Po těchto krocích se provádí 2-3 proplachy v destilované vodě po dobu 2 minut (Hardie a kol., 2002; Srp, 2010). Dále je možné nechat preparáty uschnout na vzdušném místě, a nakonec uskladnit v temných podmínkách (Hardie a kol., 2002). Druhou možností je provést fixaci řádně ošetřených preparátů v etanolových lázních s různou koncentrací, které se mění po 1 minutě: (1) 50 % ethanol; (2) 70 % ethanol; (3) 80 % ethanol; (4) 96 % ethanol. Závěrečným krokem je ošetření preparátů xylenem po dobu 1 minuty, dále usušení a uskladnění (Srp, 2010).

### **2.4.3 Obecná charakteristika fluorescenční mikroskopie**

Základem fluorescenční mikroskopie (FM) je mikroskopie optická. Avšak pro vizualizaci zkoumaného vzorku pomocí FM je nezbytné použít fluorescentní barvivo nebo fluoreskující protein (Pollard a Earnshaw, 2002). V dnešní době se tato metoda hojně využívá nejen kvůli možnosti vizualizovat různé struktury, orgány a molekuly v rostlinné a živočišné histologii a buněčné biologii; ale především díky její vysoké citlivosti, díky níž je možné zkoumat vzorky s nízkou koncentrací pomocí vhodného mikroskopu a počítačových softwarů (Soukup, 2004).



Fluorescenční mikroskop využívá jako zdroj světla vysokotlaké výbojky, obvykle rtuťové nebo xenonové (Soukup, 2004). Principem FM je fyzikální jev, při kterém nejprve probíhá absorpce světelného fotonu fluorescenční molekulou (foton je excitován do vyššího stavu) a následně během velmi krátkého časového úseku je foton emitován zpět do základního stavu (s vyšší vlnovou délkou a nižší energií; Pollard a Earnshaw, 2002; Soukup, 2004). Příkladem může být fluorescenční barvivo rhodamin, které absorbuje zelené světlo o krátké vlnové délce a emituje červené světlo o delší vlnové délce (Pollard a Earnshaw, 2002). Lidským okem či příslušným detekovacím zařízením mikroskopu (digitální či konvenční kamera) je tedy zaznamenána emise světla odraženého pouze od sledovaného objektu. Výsledné fluoreskující oblasti jsou pak viděny svítivou barvou (v závislosti na použitém fluorescenčním barvivo) oproti tmavému pozadí. Čím tmavší je tedy pozadí zkoumaného objektu, tím větší je kontrast barev a lépe se vyhodnocují výsledky. Tento jev je ovlivněn uvolněním tepla a rezonančním přenosem na ostatní přítomné částice ve vzorku, vlnové délce a podmínkami prostředí (jako je například pH, koncentrace přítomných iontů či interakce s ostatními molekulami; Soukup, 2004; Abramowitz a Davidson, 2012).

Fluorescenční mikroskopie se využívá k určení ploidní úrovně či velikosti genomu prostřednictvím karyotypového obrazu (Arefjev a Nikolaev, 1991; Kim a kol., 2005). Tvorba karyotypového obrazu probíhá pomocí krevního vzorku fixovaného na mikroskopickém sklíčku, díky následné vizualizaci krevního preparátu je možné vizualizovat chromozomové abnormality u sledovaných jedinců (Karp, 2010). Dále se poměrně frekventovaně využívá metoda fluorescence *in situ* hybridizace (FISH), během níž se fluorescenční barvivo váže na DNA nebo RNA (Karp, 2010). Tato metoda poskytuje umožňuje studium variability v chromozomálním umístění počtu ribozomálních úseků DNA (rDNA; Ksiazczyk a kol., 2010). Princip metody FISH je také využíván pro komparativní genomovou hybridizaci (CGH) a genomovou *in-situ* hybridizaci (GISH; Symonová a kol., 2013; Symonová a kol., 2015). Tyto metody jsou založeny na genomové DNA jednoho nebo obou rodičovských druhů obarvené specifickými fluorescenčními barvivy a templátu DNA v podobě metafázních chromozomů fixovaných na mikroskopickém sklíčku. Tím je umožněna vizualizace chromatinu rodičovských druhů na chromozomech hybrida (Schwarzacher a kol., 1989; Symonová a kol., 2013; Symonová a kol., 2015).

#### 2.4.4 Obecná charakteristika konfokální laserové skenovací mikroskopie

Využití kamer, elektronických obrazů a počítačových softwarů vedlo k vývoji celoplošného zobrazování. Významnou alternativou standardní optické mikroskopie je konfokální laserová skenovací mikroskopie (dále CLSM), využívající jako zdroj světla různé druhy laseru (například helium-kadmium, krypton-argon, helium-neon, rtuť, a další) a fluorescenční optiku (Beranová a kol., 2009; Karp, 2010; Herman a kol., 2012; Plášek, 2015). V biologii a medicíně je CLSM relativně nová, rychlá a poměrně neinvazivní metoda (Beranová a kol., 2009).

Hlavním přínosem CLSM je snímání fluorescenčně značeného vzorku v dílčích rovinách a pomocí počítačového softwaru vytvořit vysoce kvalitní 3D nebo 4D (x, y, z a čas - obraz nebo video) rekonstrukci fixovaných i živých buněk či tkání, a podrobněji studovat daný objekt (Fellers a Davidson, 2012; Wolenski a Julich, 2014). Dále je možné (jako u klasické světelné mikroskopie) měření délky, šířky, objemu, hloubky či jiných specifických parametrů zkoumaného objektu (Fellers a Davidson, 2012). To je umožněno světlem procházejícím dírkovou aperturou, které je zaostřeno do jednoho bodu fluorescenčně značeného vzorku. Dále emitované světlo, ze zaostřeného bodu objektivu, znovu prochází dírkovou aperturou a je zachycováno detektorem mikroskopu. Celý proces je řízen právě počítačovým softwarem, který shromažďuje takto získané informace (Fellers a Davidson, 2012; Karp 2010). Další výhodou CLSM je možnost eliminovat nebo redukovat šum obrazu. To je dáno tím, že emitované světlo pocházející z nezaostřených mimoohniskových rovin je soustředěno mimo dírkovou aperutu a není zachycováno detektorem (Fellers a Davidson, 2012; Karp, 2010; Wolenski a Julich, 2014).

Nevýhodou při pozorování živých objektů je však jejich možné poškození právě díky použití laserového paprsku jako zdroje světla (Fellers a Davidson, 2012). Další nevýhodou je problém s difrakcí rozptylu světla a absorpce, je-li vzorek příliš hustý. Přesto tato metoda přinesla významný pokrok například v objasnění mechanismů morfogeneze tkání u ryb a vývoje rybích embryí (Wolenski a Julich, 2014), struktury, objemu a obsahu DNA erytrocytů jeseterovitých ryb (Bytyutskyy a kol., 2014).

### 3 Materiál a metodika

V experimentální části této diplomové práce bylo provedeno 1) stanovení relativního obsahu DNA buněčných jader hodnocených vzorků na základě měření jejich fluorescence po obarvení 4,6-diamidin-2-phenylin-dolem (DAPI) průtokovou cytometrií (FCM) a 2) stanovení absolutního obsahu DNA buněčných jader hodnocených vzorků po barvení Feulgenovou reakcí, mikroskopickém digitálním snímkování a měření integrované optické hustoty, obojí u 3 čistých druhů jeseterů a uměle vytvořených mezidruhových F1 hybridů těchto druhů jeseterů (♀ x ♂):

- (1) M = jeseter malý (*Acipenser ruthenus*)
- (2) S = j. sibiřský (*A. baerii*)
- (3) R = j. ruský (*A. gueldenstaedtii*)
- (4) MxS = j. malý x j. sibiřský (*A. ruthenus* x *A. baerii*)
- (5) SxM = j. sibiřský x j. malý (*A. baerii* x *A. ruthenus*)
- (6) RxS = j. ruský x j. sibiřský (*A. gueldenstaedtii* x *A. baerii*)
- (7) SxR = j. sibiřský x j. ruský (*A. baerii* x *A. gueldenstaedtii*)

V každé skupině byl změřen obsah DNA vždy u 20 jedinců (viz. níže), pocházejících z uzavřeného chovu pokusného zařízení Genetického rybářského centra Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického (VÚRH) Fakulty rybářství a ochrany vod, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (FROV JU). Vzorky byly zpracovány pomocí obou vybraných metod v Laboratoři molekulární, biologické a kvantitativní genetiky VÚRH FROV JU.

#### 3.1 Stanovení obsahu DNA průtokovou cytometrií (FCM)

##### 3.1.1 Odběr vzorků

Odběr ploutevní tkáně jesetera malého, j. sibiřského a mezidruhových hybridů proběhl 19.října 2017 na Experimentálním rybochovném pracovišti a pokusnictví VÚRH ve Vodňanech (FROV JU; tab. č. 1). Ploutevní tkáň j. malého a j. ruského byla odebrána 13.prosince 2017 ve vnitřních prostorách Genetického rybářského centra VÚRH (FROV JU). Před samotným odběrem tkáně, byl u každého jedince ověřen identifikační čip, podle něhož byl jedinec zařazen do příslušné testované skupiny. Po zvážení jedince následovalo odebírání vzorků za použití chirurgických nůžek a pinzety. Vzorek tkáně o velikosti přibližně 0,5 cm<sup>2</sup> ze spodního laloku ocasní ploutve

byl odebrán do předem připravených zkumavek „eppendorf“ s 1 ml čerstvě připraveného fixačního roztoku (1% etanol ve fyziologického roztoku). Ihned po odběru tkáně byla každá ryba řádně ošetřena dezinfekcí (Příloha č. 1) a vrácena zpět do nádrže. Po ukončení odběru byly vzorky ihned přeneseny do laboratoře VÚRH a analyzovány.

Tabulka č. 1: Váha ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) a stáří skupin jeseterů využitých k odběru ploutevní tkáně pro průtokovou cytometrii (FCM).

| Datum / místo odběru  | skupina | Váha [kg]   | Stáří  |
|---|---------|-------------|--------|
| 19.10.2017<br>Experimentální rybochovné<br>pracoviště a pokusnictví<br>VÚRH FROV JU | M       | 0,67 ± 0,41 | 3 roky |
|   | S       | 1,15 ± 0,30 |        |
|   | MxS     | 1,25 ± 0,29 |        |
|   | SxM     | 1,03 ± 0,26 |        |
|   | RxS     | 1,19 ± 0,27 |        |
|   | SxR     | 1,23 ± 0,32 |        |
| 13.12.2017<br>Genetické rybářské centrum<br>VÚRH FROV JU                            | M       | -           | 1 rok  |
|   | R       | -           |        |

### 3.1.2 Příprava vzorků

Do připravených zkumavek „eppendorf“ s 200  $\mu$ l pufru pro extrakci buněčných jader (Nuclei Extraction Buffer + Extraction buffer reagent, Genetrac, ČR) byl vložen reprezentativní vzorek tkáně – přibližně 1mm<sup>2</sup> odebrané tkáně. Ihned poté byl zbytek tkáně vrácen zpět do fixačního roztoku a uschován v lednici až do ukončení analýzy. Pro efektivnější uvolnění buněk z tkáně do pufru byl každý vzorek homogenizován po dobu 5 s (ruční homogenizátor, Pellet pestles cordless motor, Kimble, USA; příloha č. 2). Zhomogenizovaný vzorek byl inkubován v laboratorních podmínkách po dobu 10 min. Po uplynutí inkubační doby byl do každého vzorku přidán 1ml barvicího pufru („Staining Buffer“ s fluorescenčním barvivem DAPI; 4,6-diamidin-2-fenylin-dole, Genetrac, ČR). Pomocí třepačky byl vzorek krátce promíchán a přefiltrován přes 30  $\mu$ m nylonový filtr do skleněné kyvety. V případě jesetera malého byl vzorek

připraven rovnou k měření na průtokovém cytometru (Partec CCA I; Partec GmbH, Münster, Germany, příloha č. 3) podle Linharta a kol. (2006). U ostatních testovaných skupin byl vzorek j. malého přidáván jako standard.

### **3.1.2.1 Přidávání standardu (j. malého)**

Vzhledem k tomu, že se od sebe jednotlivé vzorky v množství buněk lišily, bylo nutné pro každý vzorek optimalizovat množství standardu tak, aby bylo možné dobře rozeznat píky. Nejprve byly změřeny všechny vzorky j. malého pro zjištění ploidní úrovně na základě relativního obsahu DNA. Jako standard byl použit pouze vzorek j. malého, u kterého byla prokázána funkční diploidní úroveň. Postupným upravováním množství standardu bylo zjištěno optimální množství jako 200  $\mu$ l, které bylo následně přidáno k 600  $\mu$ l neznámého vzorku a před změřením na průtokovém cytometru promícháno na třepačce. Pokud však byly viditelné rozdíly v histogramu při detekování obou píků, bylo toto množství znovu upraveno.

### **3.1.3 Postup při měření a získání výsledků**

Měření připravených vzorků probíhalo na průtokovém cytometru Partec CCA I (Partec GmbH, Münster, Germany). Z důvodu snadnějšího výpočtu obsahu DNA neznámých vzorků bylo napětí na fotonásobiči (gain) nastaveno tak, aby se pík s hodnotou fluorescence obsahu DNA buněčných jader j. malého ukazoval v histogramu s průměrnou hodnotou přibližně na kanále 100. V této práci byl gain nastaven na 488,5.

Prvotní píky byly naměřeny vyšší rychlostí, přibližně 100 buněk/s, a několikrát smazány. Konečný pík byl detekován při rychlosti do 20 buněk/s a při analýze min. 1000 buněk. Výsledný histogram byl hodnocen podle variačního koeficientu (CV) píku. Uložen byl histogram, u něhož bylo dosaženo CV do 3 % (max. 4 %) a jeho hodnoty byly zapsány v programu Excel. V případě píku s vyšším CV bylo měření opakováno. Po každém změřeném vzorku, byl průtokový cytometr několikrát propláchnut destilovanou vodou, aby nedošlo ke kontaminaci následujícího neznámého vzorku.

Z takto naměřených hodnot neznámých vzorků (nz) byl dále relativní obsah DNA přepočten na absolutní obsah DNA z píku standardu (st), píku neznámého vzorku (nz) a známého obsahu DNA jesetera malého (=standardu; 3,72 pg·DNA·jádro<sup>-1</sup>):

$$\text{obsah DNA}_{(nz)} = \text{obsah DNA}_{(st)} * (\text{pík}_{(nz)}/\text{pík}_{(st)})$$

## 3.2 Stanovení obsahu DNA Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA)

Obsah DNA Feulgenovou obrazovou analýzou neboli denzitometrickou analýzou, byl zjištěn z krevních nátěrů již předem připravených pracovníky VÚRH pro jiné účely. Integrovaná optická denzita (IOD) byla měřena světelným mikroskopem Olympus BX50 s kamerou Olympus DP72 (objektiv 100x; příloha č. 2). Z důvodu již předpřipravených vzorků pro tuto analýzu je postup při přípravě vzorků a jejich barvení podrobně popsán v kapitole 2.4.2.3-4.

### 3.2.1 Měření integrované optické denzity (IOD)

Na začátku dne každého měření bylo zkontrolováno nastavení světelného mikroskopu, čistoty pracovní plochy a změřeno standardu před neznámými vzorky. Po kalibraci intenzity světla a zvětšení na snímcích, které byly z RGB módu převedeny do monochromatického módu a splnily kritérium prahování („tresholding“; v rozmezí intenzity 170 – 190 pixelů) byl vždy první změřen standard. Jako standard byl v této práci zvolen diploidní lín o známém obsahu DNA (C-value 1,02 pgjádru<sup>-1</sup>), u kterého bylo vždy změřeno min. 50 jader erytrocytů. Následně bylo u každého neznámého vzorku změřeno min. 100 jader erytrocytů a vypočten absolutní obsah DNA. Samotné měření probíhalo v programu „ImagePro Plus“ a za klíčové parametry nastavení režimu byla zvolena plocha jádra (μm<sup>2</sup>) a integrovaná optická hustota (IOD).

#### 3.2.1.1 Výpočet absolutního obsahu DNA

Díky naměřené integrované optické denzity (IOD) jader erytrocytů standardu (st) a neznámých vzorků (nz) je možné vypočítat hodnotu C-value (CV) (pg DNA v jádře) dle níže uvedeného vzorce, a která se rovná haploidnímu množství absolutního obsahu DNA u dané testované ryby.

$$CV_{(nz)} = DNA_{(st)} * (\text{prům. IOD}_{(nz)})/(\text{prům. IOD}_{(st)})$$

## 3.3 Statistické zpracování výsledků

Základem pro statistické porovnání dat sloužily výsledky zpracovány v programu Microsoft Excel. Normalita dat byla testována Shapiro-Wilkův testem v programu Statistica 12. Data se nepodařila logaritmickou, odmocninovou ani Box-Cox transformací znormalizovat, a proto byla homogenita dat otestována Levenovým testem

a následně porovnání skupin Kruskal-Wallisovým testem. Pokud byly testovány pouze 2 skupiny k porovnání metod uvnitř jedné skupiny, byl použit neparametrický Man-Whitney test. Hladina významnosti všech testů byla nastavena na úrovni 0,05. Pro testování dat byla aplikována Bonferroniho korekce.

Pokud byli v dané skupině nalezeni pouze 1 jedinec s odlišným obsahem DNA, nebyl tento výsledek zahrnut do statistické analýzy.

## 4 Výsledky

Přestože jsme zvolili 7 skupin jeseterů podle jejich dostupnosti na FROV JU, na základě naměřených výsledků byli tyto skupiny dále rozděleny do více podskupin dle odpovídající úrovně ploidie (viz. kapitola 4.1.1 a 4.1.2), která je v této práci prezentována ve škále ploidních úrovní funkčních.

### 4.1 Obsah DNA mezi testovanými skupinami

#### 4.1.1 Obsah DNA naměřený průtokovou cytometrií (FCM)

Tabulka č. 2: Relativní obsah DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$  kanálu píku histogramů) s příslušnými variačními koeficienty CV (%) naměřený u jednotlivých skupin jeseterů (*Acipenser*) s různou funkční úrovní ploidie pomocí průtokové cytometrie (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI, přepočtený na absolutní obsah DNA [ $\text{pgjád}^{-1}$ ]; M: *A. ruthenus*, S: *A. baerii*, R: *A. gueldenstaedtii*, MxS: *A. ruthenus* x *A. baerii*, SxM: *A. baerii* x *A. ruthenus*, RxS: *A. gueldenstaedtii* x *A. baerii*, SxR: *A. baerii* x *A. gueldenstaedtii*; a, b, c, d = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

| Skupina | Ploidní úroveň | Počet jedinců | Relativní obsah DNA                | Cv %                   | Absolutní obsah DNA                            |
|---------|----------------|---------------|------------------------------------|------------------------|--|
|         |                |               | Rozsah píku ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) | ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) | ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] |
| M       | 2n             | 16            | 101,89 $\pm$ 2,14 <sup>a</sup>     | 2,04 $\pm$ 0,41        | 3,85 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>                   |
|         | 3n             | 4             | 147,46 $\pm$ 3,90 <sup>b</sup>     | 2,51 $\pm$ 0,35        | 5,29 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>                   |
| S       | 4n             | 20            | 191,56 $\pm$ 6,50 <sup>c</sup>     | 2,53 $\pm$ 0,31        | 8,18 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>                   |
| R       | 4n             | 20            | 204,25 $\pm$ 5,21 <sup>c</sup>     | 2,14 $\pm$ 0,47        | 8,12 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>                   |
| MxS     | 3n             | 19            | 139,91 $\pm$ 5,73 <sup>b</sup>     | 3,14 $\pm$ 0,16        | 5,82 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>                   |
|         | 4n             | 1             | 189,56                             | 2,16                   | 7,25   |
| SxM     | 3n             | 17            | 142,50 $\pm$ 8,42 <sup>b</sup>     | 2,63 $\pm$ 0,91        | 5,81 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>                   |
|         | 4n             | 2             | 190,03 $\pm$ 0,12 <sup>c</sup>     | 2,08 $\pm$ 0,11        | 8,07 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>                   |
|         | 6n             | 1             | 264,08                             | 2,37                   | 11,61  |
| SxR     | 4n             | 18            | 222,71 $\pm$ 8,05 <sup>b</sup>     | 2,76 $\pm$ 0,11        | 8,25 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>                   |
|         | 6n             | 2             | 332,15 $\pm$ 5,61 <sup>d</sup>     | 2,93 $\pm$ 0,03        | 12,27 $\pm$ 0,35 <sup>d</sup>                  |
| RxS     | 4n             | 20            | 220,59 $\pm$ 3,68 <sup>b</sup>     | 2,81 $\pm$ 0,27        | 8,23 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>                   |



#### 4.1.2 Obsah DNA naměřený metodou FIA

Tabulka č. 3: Absolutní obsah DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pg:jádro}^{-1}$ ] u jednotlivých skupin jeseterů (*Acipenser*) s různou funkční úrovní ploidie, stanovený pomocí Feulgenovy obrazové analýzy (FIA); M: *A. ruthenus*, S: *A.baerii*, R: *A. gueldenstaedtii*, MxS: *A. ruthenus* x *A. baerii*, SxM: *A. baerii* x *A. ruthenus*, RxS: *A. gueldenstaedtii* x *A. baerii*, SxR: *A. baerii* x *A. gueldenstaedtii*; a, b, c = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

| Skupina | Ploidní úroveň | Počet jedinců | Absolutní obsah DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pg:jádro}^{-1}$ ] |
|---------|----------------|---------------|---|
| M       | 2n             | 20            | $3,46 \pm 0,30^a$   |
| S       | 4n             | 20            | $8,28 \pm 0,13^b$   |
| R       | 4n             | 20            | $7,87 \pm 0,06^b$   |
| MxS     | 3n             | 19            | $5,79 \pm 0,57^c$   |
|         | 4n             | 1             | 7,13  |
| SxM     | 3n             | 20            | $5,92 \pm 0,52^c$   |
|         | 3n             | 10            | $6,77 \pm 0,18^c$   |
| SxR     | 4n             | 9             | $7,91 \pm 0,21^b$   |
|         | 6n             | 1             | 11,05   |
| RxS     | 3n             | 9             | $6,76 \pm 0,31^c$   |
|         | 4n             | 11            | $8,39 \pm 0,43^b$   |

## 4.2 Porovnání obsahu DNA uvnitř jednotlivých testovaných skupin

### 4.2.1 Obsah DNA u jesetera malého (*A. ruthenus*)

Tabulka č. 4: Rozdíl v absolutním obsahu DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pg:jádro}^{-1}$ ] stanoveného průtokovou cytometrií (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA) u jesetera malého (*A. ruthenus*; M); a, b = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

| ploidie | Obsah DNA [ $\text{pg:jádro}^{-1}$ ] |                   |
|---------|--------------------------------------|-------------------|
|         | FCM                                  | FIA               |
| 2n      | $3,85 \pm 0,12^a$                    | $3,46 \pm 0,30^a$ |
| 3n      | $5,29 \pm 0,19^b$                    | -                 |

#### 4.2.2 Obsah DNA u jesetera sibiřského (*A. baerii*)

Tabulka č. 5: Rozdíl v absolutním obsahu DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] stanoveného průtokovou cytometrií (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA) u jesetera sibiřského (*A. baerii*; S); a = statisticky nevýznamný rozdíl ( $p > 0,05$ ).

| ploidie | Obsah DNA [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] |                   |
|---------|-----------------------------------|-------------------|
|         | FCM                               | FIA               |
| 4n      | $8,18 \pm 0,11^a$                 | $8,28 \pm 0,13^a$ |

#### 4.2.3 Obsah DNA u jesetera ruského (*A. gueldenstaedtii*)

Tabulka č. 6: Rozdíl v absolutním obsahu DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] stanoveného průtokovou cytometrií (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA) u jesetera ruského (*A. gueldenstaedtii*; R); a = statisticky nevýznamný rozdíl ( $p > 0,05$ ).

| ploidie | Obsah DNA [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] |                   |
|---------|-----------------------------------|-------------------|
|         | FCM                               | FIA               |
| 4n      | $8,12 \pm 0,11^a$                 | $7,87 \pm 0,06^a$ |

#### 4.2.4 Obsah DNA mezidruhového hybridu MxS (*A. ruthenus* x *A. baerii*)

Tabulka č. 7: Rozdíl v absolutním obsahu DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] stanoveného průtokovou cytometrií (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA) u mezidruhového hybridu MxS (*A. ruthenus* x *A. baerii*); a = statisticky nevýznamný rozdíl ( $p > 0,05$ ).

| ploidie | Obsah DNA [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] |                   |
|---------|-----------------------------------|-------------------|
|         | FCM                               | FIA               |
| 3n      | $5,82 \pm 0,24^a$                 | $5,79 \pm 0,57^a$ |
| 4n      | 7,25                              | 7,13              |

#### 4.2.5 Obsah DNA mezidruhového hybridu SxM (*A. baerii* x *A. ruthenus*)

Tabulka č. 8: Rozdíl v absolutním obsahu DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pg} \cdot \text{jádro}^{-1}$ ] stanoveného průtokovou cytometrií (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA) u mezidruhového hybridu SxM (*A. baerii* x *A. ruthenus*); a, b = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

| ploidie | Obsah DNA [ $\text{pg} \cdot \text{jádro}^{-1}$ ] |                              |
|---------|---|------------------------------|
|         | DAPI  | FIA                          |
| 3n      | 5,81 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>                      | 5,92 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup> |
| 4n      | 8,07 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>                      | -                            |
| 6n      | 11,61   | -                            |

#### 4.2.6 Obsah DNA mezidruhového hybridu SxR (*A. baerii* x *A. gueldenstaedtii*)

Tabulka č. 10: Rozdíl v absolutním obsahu DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pg} \cdot \text{jádro}^{-1}$ ] stanoveného průtokovou cytometrií (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA) u mezidruhového hybridu SxR (*A. baerii* x *A. gueldenstaedtii*); a, b, c = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

| ploidie | Obsah DNA [ $\text{pg} \cdot \text{jádro}^{-1}$ ] |                              |
|---------|---|------------------------------|
|         | FCM   | FIA                          |
| 3n      | -   | 6,77 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup> |
| 4n      | 8,25 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>                      | 7,91 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup> |
| 6n      | 12,27 $\pm$ 0,35 <sup>c</sup>                     | 11,05                        |

#### 4.2.7 Obsah DNA mezidruhového hybridu RxS (*A. gueldenstaedtii* x *A. baerii*)

Tabulka č. 9: Rozdíl v absolutním obsahu DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pg} \cdot \text{jádro}^{-1}$ ] stanoveného průtokovou cytometrií (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA) u mezidruhového hybridu RxS (*A. gueldenstaedtii* x *A. baerii*); a, b = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ); a, b = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

| ploidie | Obsah DNA [ $\text{pg} \cdot \text{jádro}^{-1}$ ] |                              |
|---------|---|------------------------------|
|         | DAPI  | FIA                          |
| 3n      | -   | 6,76 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup> |
| 4n      | 8,23 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>                      | 8,39 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup> |

### 4.3 Shrnutí výsledků

Z naměřených výsledků a statistické analýzy dat vyplývá, že obsahy DNA odpovídající jedné ploidní úrovni příslušných skupin jeseterovitých ryb stanovené metodou FCM s fluorescenčním barvivem DAPI a metodou FIA se statisticky neliší ( $p > 0,05$ ). Oproti tomu, obsahy DNA odpovídající různým ploidním úrovním se statisticky významně liší ( $p < 0,05$ ) jak mezi skupinami, tak uvnitř skupin nezávisle na použití jedné z cytometrických metod aplikovaných v této diplomové práci. Tzn., že diploidní jedinci se statisticky významně liší ( $p < 0,05$ ) od triploidních, tetraploidních a hexaploidních jedinců; tetraploidní se statisticky významně liší ( $p < 0,05$ ) od triploidních a hexaploidních jedinců apod. (viz. tab. 2 – 9).

Příklady histogramů z měření obsahu DNA průtokovou cytometrií byly zpracovány v softwaru Cyto SW ver. 0.3 (Wolf & Danniell, ČR) a uvedeny v přílohách č. 5 – 12. Snímky buněk erytrocytů z měření obsahu DNA Feulgenovou obrazovou analýzou jsou uvedeny v přílohách č. 13 – 14.

## 5 Diskuse

Účelem této diplomové práce bylo porovnat výsledky obsahu DNA stanovené pomocí průtokové cytometrie za použití fluorescenčního barviva DAPI a obsahu DNA stanovené pomocí Feulgenovy obrazové cytometrie u vybraných čistých jeseterovitých druhů ryb a mezidruhových hybridů. Původně bylo zamýšleno porovnat výsledky také s pomocí průtokové cytometrie za použití fluorescenčního barviva PI (propidium jodid), avšak kvůli poruše cytometru CyFlow Cube 8, který by umožnil tuto analýzu, jsme byli nuceni tuto metodu z experimentu vyřadit. V tomto experimentu bylo testováno měření 20 postupně analyzovaných jedinců z každé skupiny/ populace, nešlo však o identické jedince testované oběma metodami současně. Proto je možné, že u některých skupin bylo zjištěno více ploidních úrovní metodou FCM než metodou FIA a naopak.

### 5.1 Obsah DNA u čistých druhů vs. mezidruhových hybridů naměřených průtokovou cytometrií a Feulgenovou obrazovou analýzou

Měřením obsahu DNA a ploidní úrovně jeseterovitých druhů ryb se již zabývalo několik autorů citovaných v této závěrečné práci. Většina autorů publikovala obsah DNA (velikost genomu) u čistých jedinců, které až na několik nepatrných odchylek odpovídají obsahům DNA naměřených u čistých druhů v této práci (tab. č. 11). Avšak jen zřídkakdy se provádělo měření i u hybridů, jejichž parentální druhy a ploidní úrovně byly totožné s našimi testovanými jedinci. Proto jsou stále některé údaje ne zcela objasněné a námi získané obsahy DNA především mezidruhových hybridů (tab. č. 11) v této práci nové:

- M: *A. ruthenus* (2n)
- S: *A. baerii* (4n)
- R: *A. gueldenstaedtii* (4n)
- MxS: *A. ruthenus* (2n) x *A. baerii* (4n)
- SxM: *A. baerii* (4n) x *A. ruthenus* (2n)
- RxS: *A. gueldenstaedtii* (4n) x *A. baerii* (4n)
- SxR: *A. baerii* (4n) x *A. gueldenstaedtii* (4n)

Tabulka č. 11: Porovnání naměřených hodnot obsahů DNA [pg/jádro<sup>-1</sup>] u čistých druhů jeseterů a mezidruhových hybridů – jeseter malý (*Acipenser ruthenus*), j. sibiřský (*A. baerii*), j. ruský (*A. gueldenstaedtii*), MxS: jeseter malý (*Acipenser ruthenus*; 2n) x j. sibiřský (*A. baerii*; 4n), SxM: j. sibiřský (*A. baerii*; 4n) x j. malý (*A. ruthenus*; 2n), RxS: j. ruský (*A. gueldenstaedtii*; 4n) x j. sibiřský (*A. baerii*; 4n), SxR: j. sibiřský (*A. baerii*; 4n) x j. ruský (*A. gueldenstaedtii*; 4n) – s již publikovanými hodnotami naměřených pomocí průtokové cytometrie (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI/PI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA); a, b, c = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ); <sup>1</sup> = FCM – DAPI; <sup>2</sup> = FCM – PI; <sup>3</sup> = FIA.

| Druh                             | Ploidní úroveň | Obsah DNA<br>( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [pg/jádro <sup>-1</sup> ] |                          | Publikovaný obsah DNA<br>[pg/jádro <sup>-1</sup> ] | Autor  |
|----------------------------------|----------------|---|--------------------------|--|--|
|                                  |                | FCM   | FIA                      |  |  |
| <b><i>A. ruthenus</i></b>        | 2n             | 3,85 ± 0,12 <sup>a</sup>                                      | 3,46 ± 0,30 <sup>a</sup> | 3,74   | Birstein a kol. (1993) <sup>2</sup>  |
|                                  |                |   |                          | 4,1  | Zhou a kol. (2011) <sup>1</sup>  |
|                                  |                |   |                          | 3,72   | Bytyutskyy a kol. (2012) <sup>3</sup>  |
| <b><i>A. baerii</i></b>          | 3n             | 5,29 ± 0,19 <sup>b</sup>                                      | 8,18 ± 0,11 <sup>c</sup> | 6,00   | Zhou a kol. (2011)   |
|                                  |                |   |                          | 5,90   | Bytyutskyy a kol. (2012) <sup>3</sup>  |
|                                  |                |   |                          | 8,30   | Birstein a kol. (1993) <sup>2</sup> ,<br>Bytyutskyy a kol. (2014) <sup>3</sup> |
| <b><i>A. gueldenstaedtii</i></b> | 4n             | 8,12 ± 0,11 <sup>c</sup>                                      | 7,87 ± 0,06 <sup>c</sup> | 8  | Zhou a kol. (2011) <sup>1</sup>  |
|                                  |                |   |                          | 8,29   | Bytyutskyy a kol. (2012) <sup>3</sup>  |
|                                  |                |   |                          | 7,86   | Birstein a kol. (1993) <sup>2</sup>  |
| <b><i>A. gueldenstaedtii</i></b> | 4n             | 8,12 ± 0,11 <sup>c</sup>                                      | 7,87 ± 0,06 <sup>c</sup> | 8,4  | Zhou a kol. (2011) <sup>1</sup>  |
|                                  |                |   |                          | 7,87   | Bytyutskyy a kol. (2012) <sup>3</sup>  |

| Mezidruhový hybrid             | Ploidní úroveň | Obsah DNA<br>( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\mu\text{g:jádro}^{-1}$ ] |                              | Publikovaný obsah DNA [ $\mu\text{g:jádro}^{-1}$ ] | Autor                                 |
|--------------------------------|----------------|--|------------------------------|--|---------------------------------------|
|                                |                | FCM (DAPI)   | FIA                          |  |                                       |
| <b>MxS</b><br><b>(2n x 4n)</b> | 3n             | 5,82 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>                                     | 5,79 $\pm$ 0,57 <sup>b</sup> | 6,04   | Bytyutskyy a kol. (2014) <sup>1</sup> |
|                                | 4n             | 7,25   | 7,13                         |  |                                       |
| <b>SxM</b><br><b>(4n x 2n)</b> | 3n             | 5,81 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>                                     | 5,92 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup> |  |                                       |
|                                | 4n             | 8,07 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>                                     |                              |  |                                       |
|                                | 6n             | 11,61  |                              |  |                                       |
| <b>SxR</b><br><b>(4n x 4n)</b> | 3n             |  | 6,77 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup> |  |                                       |
|                                | 4n             | 8,25 $\pm$ 0,21 <sup>c</sup>                                     | 7,91 $\pm$ 0,21 <sup>c</sup> |  |                                       |
|                                | 6n             | 12,27  | 11,05                        |  |                                       |
| <b>RxS</b><br><b>(4n x 4n)</b> | 3n             |  | 6,76 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup> |  |                                       |
|                                |                |  | 8,39 $\pm$ 0,43 <sup>c</sup> |  |                                       |
|                                | 4n             | 8,23 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>                                     |                              |  |                                       |

Námi naměřené obsahy DNA u čistých druhů j. ruského (*A. gueldenstaedtii*) a j. sibiřského (*A. baerii*) metodou FIA (tab. č. 11) se shodují s výslednými obsahy, jež publikovali Birstein a kol. (1993) a Bytyutskyy a kol. (2012, 2014). Zatím co Birstein a kol. (1993) ve své práci k obarvení erytrocytů aplikoval fluorescenční barvivo PI, Bytyutskyy a kol. (2012, 2014) využil Feulgenovy reakce. Výsledné hodnoty u těchto druhů jeseterů zjištěné metodou FCM s fluorescenčním barvivem DAPI jsou shodné s hodnotami, jež publikoval Zhou a kol. (2011; tab. č. 11), který ve své studii aplikoval stejné fluorescenční barvivo k obarvení buněk z krve, ale i buněk z tkáně spodního laloku ocasní ploutve. U j. malého (*A. ruthenus*) byly zjištěny menší odchylky (tab. č. 11) v porovnání s daty jež už byly publikovány. To mohlo být způsobeno např. precizností práce s chemikáliemi a jejich vlastnostmi, dodržáním řádného postupu při barvení vzorků, stavem pozorovaného preparátu, a především jeho skladováním (tmavé místo, vyvarovat se extrémním teplotám a neporušit povrch preparátu odřením) apod. (Hardie a kol., 2002). V neposlední řadě také začátečnickou nezkušeností s měřením těmito metodami.

Zabývání se rozeznáním mezidruhových jeseterů od čistých druhů je důležité nejen z hlediska evolučního vývoje a genetických studií, ale také pro zachování čistoty druhu, a v neposlední řadě udržení kvality masa a kaviáru. Již v roce 1997 Birstein a kol. uvedli, že interspecifická hybridizace mezi diploidem a tetraploidem u jeseterovitých druhů ryb je v akvakultuře zcela běžný jev. Stejně tak v přirozených podmínkách byl tento jev také několikrát zdokumentován (Birstein a kol., 1997; Ludwig a kol., 2009; Dudu a kol., 2011). Kromě interspecifické a intergenerické hybridizace mohou jeseteři s vyšší ploidní úrovní vznikat právě spontánní polyploidizací prakticky v každé generaci (Havelka a kol., 2013; Faljšhans a kol., 2013, Zhou a kol., 2013). Na základě naměřených výsledcích (tab. č. 11) a statistických analýz lze metodu FCM s fluorescenčním barvivem DAPI a metodu FIA jen stěží využívat k rozeznání mezidruhových hybridů od čistých druhů. Stěžejními důvody budou pravděpodobně právě spontánní polyploidizace jeseterovitých druhů ryb a interspecifická hybridizace. To prokazují i naše výsledky, kdy obsah DNA u triploidního (3n) j. malého ( $5,29 \pm 0,19 \text{ pgjád}^{-1}$ ) odpovídá obsahu DNA u mezidruhového triploidního (3n) hybrida MxS (FCM:  $5,82 \pm 0,24 \text{ pgjád}^{-1}$ ; FIA:  $5,79 \pm 0,57 \text{ pgjád}^{-1}$ ) a 3n hybrida SxM (FCM:  $5,81 \pm 0,12 \text{ pgjád}^{-1}$ ; FIA:  $5,92 \pm 0,52 \text{ pgjád}^{-1}$ ). Stejně tak se obsah DNA u čistých tetraploidních (4n) druhů j. ruského (FCM:  $8,18 \pm 0,11 \text{ pgjád}^{-1}$ ; FIA:  $8,28 \pm 0,13 \text{ pgjád}^{-1}$ ) a j. sibiřského



(FCM:  $8,12 \pm 0,11$  pgjádron<sup>-1</sup>; FIA:  $7,87 \pm 0,06$  pgjádron<sup>-1</sup>) shoduje s obsahem DNA 4n mezidruhových hybridů SxR (FCM:  $8,23 \pm 0,13$  pgjádron<sup>-1</sup>; FIA:  $8,39 \pm 0,43$  pgjádron<sup>-1</sup>) a RxS (FCM:  $8,25 \pm 0,21$  pgjádron<sup>-1</sup>; FIA:  $7,91 \pm 0,21$  pgjádron<sup>-1</sup>). V případě tetraploidních (4n) mezidruhových hybridů ve skupinách MxS (FCM:  $7,25$  pgjádron<sup>-1</sup>; FIA:  $7,13$  pgjádron<sup>-1</sup>) a SxM (FCM:  $8,07$  pgjádron<sup>-1</sup>) by se kromě spontánní polyploidizace mohlo jednat o zavlečení čistých druhů j. sibiřského. U hexaploidních (6n) mezidruhových jeseterů, kteří byli identifikováni ve skupinách SxM (FCM:  $11,61$  pgjádron<sup>-1</sup>) a SxR (FCM:  $12,27$  pgjádron<sup>-1</sup>; FIA:  $11,05$  pgjádron<sup>-1</sup>), lze přepokládat zdědění vyššího obsahu DNA a počtu chromozomů z mateřského genomu prostřednictvím produkce neredukovaných oocytů (Havelka a kol., 2017). Spontánní zdvojení mateřských chromozomů může být způsobeno apomixií, premeiotickou endomitózou nebo retencí druhého polárního tělíska v meióze II (Havelka a kol., 2016; 2017).

Nejen triploidní j. malý, ale i ostatní jeseteři s vyšší ploidní úrovní, mohly vzniknout díky některým polyploidizačním událostem, mezi které patří inhibice meiotického dělení (potlačení uvolnění polárního tělíska), přezránání gamet či polyspermiace (Ohno a kol., 1969; Zhou a kol., 2013). Ať už se jedná o čistý druh či mezidruhového hybrida se standardní ploidní úrovní či vyšší, vždy platí že potomek získá vždy haploidní sadu chromozomů od každého rodičovského druhu (Flajšhans a kol., 2013). Přesto však může při vzniku haploidních pohlavních buněk dojít k nestandardnímu dělení sad chromozomů s následným vznikem potomka s vyšší ploidní úrovní, než mají oba rodičovské druhy (Linhart, 2006).

## **5.2 Průtoková cytometrie vs. Feulgenova obrazová analýza k rozeznání mezidruhových hybridů od jedinců čistého druhu**

V minulých letech se pro průtokovou cytometrii využívaly různá fluorescenční barviva, v závislosti na typu tkáně či buněk a zvoleného principu metody. V dnešní době se však častěji pro průtokovou cytometrii k měření obsahu DNA využívá fluorescenční barvivo DAPI, PI anebo pro obrazovou cytometrii Feulgenova reakce. Vzhledem k rozdílné časové náročnosti během přípravy vzorků a měření těmito dvěma metodami – průtokovým cytometrem lze změřit tisíce částic (buněčných jader) za méně než 5 minut, příslušným mikroskopem a počítačovým softwarem vhodných pro metodu FIA měření stejného množství buněk (jader) trvá několik hodin (Hardie a kol., 2002) – se tato práce zabývá právě porovnáním průtokové cytometrie a Feulgenovy obrazové

analýzy. Neboť právě z důvodu časové náročnosti metody FIA, je častěji využívána metoda průtokové cytometrie. Stěžejním problémem může být použití vhodného barviva, která se váží na specifické oblasti DNA a následné prezentování výsledků (relativní vs. absolutní obsah DNA).

Gregory (2005) klade důraz na možnost, že fluorescenční barvivo DAPI (přednostně vázané na AT bohaté oblasti DNA) aplikovatelné pro průtokovou cytometrii k přepočtu na absolutní obsah DNA může do jisté míry podhodnocovat výsledné hodnoty. Oproti tomu, fluorescenční barvivo PI (přednostně vázané na GC bohaté oblasti DNA) aplikovatelné také pro průtokovou cytometrii je považováno za interkalátor, tj. barví celou DNA, stejně jako Feulgenova reakce používaná ve FIA. Přestože souvislosti se zastoupením AT/GC bohatých oblastí DNA a velikosti genomu (obsah DNA) je stále diskutabilní, již v roce 1994 byla zjištěna pozitivní korelace právě mezi GC bohatými oblastmi DNA a velikostí genomu u 20 druhů obratlovců (Vinogradov, 1994). To může být mimo jiné vysvětleno zjištěním vyšším počtem repeticí GC oblastí v genomu, které mohou napomáhat k odolávání poškození stability buněčného jádra. (Bureš a kol., 2007; Suda a kol., 2007; Vinogradov, 1994). I přes doporučení aplikovat přednostně barvivo PI k determinaci absolutního obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie, někteří autoři, například Zhou a kol. (2011), prezentují výsledky z průtokové cytometrie s fluorescenčním barvivem DAPI pouze pomocí přepočtu na absolutní obsah DNA. Tato hypotéza však námi stanovenými obsahy DNA nebyla potvrzena, neboť statisticky byla prokázána shoda pouze u skupin se stejnou ploidní úrovní, nezávisle na zvolené metodě (tab. č. 11).

Každá z uvedených metod má své výhody a nevýhody, které mohou způsobit podstatné chyby v měření či prezentování výsledků:

- Volba vhodného standardu je klíčovým faktorem především pro kalkulaci absolutního obsahu DNA ať už pro FIA nebo pro přepočet u FCM s fluorescenčním barvivem DAPI (Bytyutskyy a Flajšhans, 2014; Hardie a kol., 2002). Hardie a kol. (2002) uvádí, že rozdíl v charakteristikách standardu vs. neznámých buněk může prezentovat podstatný zdroj chyby, a proto doporučuje výběr standardu se stejným typem buněk jako mají neznámé vzorky. U průtokové cytometrie se doporučuje vytvořit tzv. směsný vzorek, který je tvořen standardem a neznámým vzorkem, následně homogenizován, barven a měřen (Suda, 2005). V našem případě byly u Feulgenovy obrazové

analýzy jako standard využity preparáty s erytrocyty lína obecného (*Tinca tinca*) a u průtokové cytometrie vzorky ploutevní tkáně jesetera malého (*A. ruthenus*).

- Nevýhodu průtokové cytometrie se považuje nemožnost vizualizace a měření individuálních buněk, což může za jistých okolností vést k přehlédnutí údajů, které by mohli být lépe objasnit výsledné hodnoty a hypotézy. Ve vzorku by se například mohly vyskytovat méně početné buněčné (sub)populace, které ale ve výsledném píku histogramu nemusí být zaznamenány, neboť mohl být jejich pík snížen k/pod hranici šumu (Del Campo a kol., 1989). Na druhou stranu u obrazové cytometrie mohou být výsledky do jisté míry ovlivněné právě předpojatostí vědeckého pracovníka, neboť nejdůležitějším krokem metody je výběr vhodných jader erytrocytů – měřit IOD pouze u dobře obarvených jader s koncentrovaným chromatinem a vyhnout se případným ostatním organelám. Avšak při prezentaci výsledků je možné brát ohled na možné deformace jader, výskyt buněčných shluků a jiných odlišností (Hardie a kol., 2002). Ukázka vhodných i nevhodných jader pro měření absolutního obsahu DNA Feulgenovou obrazovou analýzou jsou k nahlédnutí v přílohách č. 13 – 14.
- Velkou výhodou Feulgenovy obrazové analýzy je možnost měřit IOD jader i po mnoha měsících po uskutečnění odběrů vzorků krve (Hardie a kol. 2002). Samozřejmě pod podmínkou řádně obarvených, fixovaných a uložených preparátů. Tato výhoda byla uplatněna v této diplomové práci, kdy se měřilo IOD již předem předpřipravených cytologických preparátů. Oproti tomu u průtokové cytometrie je zcela nemožné opětovně změřit identický vzorek s jakýmkoliv odstupem času, neboť analyzované buňky se automaticky odvádějí do odpadu ihned po změření (Shapiro, 2003).

Závěrem lze poznamenat, že aplikace těchto metod závisí především na vybavení dané laboratoře a množství vzorků. Budeme-li chtít změřit obsah DNA u několika vzorků, bylo by vhodnější využít metodu obrazové analýzy. Naopak při velkém množství vzorků by z hlediska času bylo vhodnější aplikovat spíše průtokovou cytometrii. Bez ohledu na časovou náročnost provedení těchto metod, Hardie a kol. (2002) navrhuji vyšší využívání denzitometrické analýzy v příslušných laboratořích. Hlavním důvodem je možnost výzkumu velikosti a obsahu DNA jader erytrocytů, který může lépe objasnit problematiku evoluce genomu v oblasti molekulární i evoluční.

Avšak je-li naším cílem změření obsahu DNA, naše výsledky poukazují na možnost využít vzorec pro přepočet relativního obsahu na obsah absolutní pomocí rychlejší metody průtokové cytometrie.

## 6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo na základě stanovení obsahu DNA vybraných jeseterovitých druhů ryb porovnat cytometrické metody (FCM – DAPI vs. FIA) k rozeznání mezidruhových hybridů od jedinců čistého druhu, a je-li možné v praxi místo časově náročnější Feulgenovy obrazové analýzy využít více průtokovou cytometrii s fluorescenčním barvivem DAPI.

Přestože již několik citovaných autorů v této diplomové práci určilo charakteristický obsah DNA pro většinu čistých druhů jeseterů, z důvodu spontánní polyploidizace a hybridizace je obtížné stanovit charakteristický obsah DNA pro mezidruhové (ale i mezirodové) hybridy jeseterovitých druhů ryb. Tato hypotéza byla nejen citována několika autory v rámci této diplomové práce, ale také z určitého hlediska potvrzena výsledky našeho experimentu, kdy byl stanoven téměř identický obsah DNA u některých jedinců čistých druhů i u mezidruhových jedinců (tab. č. 11) se stejnou ploidní úrovní. Do jisté míry však lze říci, že u jeseterů z uzavřených chovů by se obě tyto metody daly využít k rozeznání mezidruhových jedinců od čistých druhů; neboť zaměstnanci rybích farem znají složení rybích obsádek. Oproti tomu u jeseterů vyskytujících se v přirozených podmínkách by využití pouze těchto metod mohlo být komplikovanější.

Přestože někteří autoři nedoporučují používat FCM s fluorescenčním barvivem DAPI pro přepočítání na absolutní obsah DNA, v této diplomové práci nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi oběma metodami – obsahy DNA naměřené metodou FIA se statisticky shodují s naměřenými výsledky metodou FCM – DAPI, jedná-li se o stejné ploidní úrovně. Přesto jsou mezi výslednými hodnotami obsahů DNA naměřených oběma metodami nepatrné rozdíly, které ale vycházejí jako statisticky neprůkazné. Tato hypotéza je v této problematice pozitivním přínosem, především z časové náročnosti – provádíme-li odběr například 50 vzorků, následně jejich barvení preparátů a měření metodou FIA, potrvá takový experiment několik dní, oproti tomu metodou FCM lze stejný počet vzorků odebrat, obarvit a změřit během jednoho dne.

Ověření této hypotézy by mohlo být předmětem budoucí studie s doporučením zahrnout do metodiky právě metodu průtokové cytometrie s fluorescenčním barvivem PI (díky níž je možné přímo stanovit absolutní obsah DNA), umožní-li to vybavení dané

laboratoře. Následně porovnat výsledky s Feulgenovou obrazovou cytometrií i průtokovou cytometrií s fluorescenčním barvivem DAPI.

## 7 Seznam použité literatury

- Abramowitz M., Davidson M.W. (2012). Introduction to Fluorescence [online]. Olympus America Inc. [cit. 15.12.2018]. dostupné na [www:olympus.magnet.fsu.edu/primer/lightandcolor/fluorointroduction.html](http://www.olympus.magnet.fsu.edu/primer/lightandcolor/fluorointroduction.html).
- Arefjev V.A., Nikolaev A.I. (1991). Cytological Analysis of the Reciprocal Hybrids between Low- and High-Chromosome Acipenserids, the Great Sturgeon, *Huso huso* (L.), and the Russian Sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt. *Cytologia*. 56: 495-502p.
- Bacalbasa-Dobrovici N. (1997). Endangered migratory sturgeons of the lower Danube River and its delta. In: Birstein V.J., Waldman J.R., Bemis W.E (eds). *Sturgeon Biodiversity and Conservation*. Boston: Kluwer: Developments in environmental biology of fishes. 17: 201-207p.
- Bártová E., Halová D., Papoušek I. (2014). *Biologie a Genetika - návody na cvičení*. Brno: Veterinární a Farmaceutická Univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie. 128p.
- Bemis W.E., Findeis E.K., Grande L. (1997). An overview of *Acipenseriformes*. In: Birstein V.J., Waldman J.R., Bemis W.E. (eds). *Sturgeon Biodiversity and Conservation*. Boston: Kluwer Academic Publishers: Developments in environmental biology of fishes. 17: 25-75p.
- Beranová L., Humpolíčková J., Hof M. (2009). Fluorescenční korelační spektroskopie. *Chemické Listy*. 103: 125-129p.
- Birstein V.J., Bemis W.E. (1997). How Many Species are There within the Genus *Acipenser*? In: Birstein V.J., Waldman J.R., Bemis W.E. (eds). *Sturgeon Biodiversity and Conservation*. Boston: Kluwer Academic Publishers: Developments in environmental biology of fishes. 17: 57–163p.
- Birstein V.J., Hanner R., DeSalle R. (1997). Phylogeny of the *Acipenseriformes*: cytogenetic and molecular approaches. In: Birstein V.J., Waldman J.R., Bemis W.E (eds). *Sturgeon Biodiversity and Conservation*. Boston: Kluwer Academic Publishers: Developments in environmental biology of fishes. 17: 127-155p.
- Birstein V.J., Poletaev A.I., Goncharov B.F. (1993). DNA content in Euroasian sturgeon species determined by flow cytometry. *Cytometry*. 14: 377-383p.

- Blackledge K.H., Bidwell C.A. (1993). Three Ploidy Levels Indicated by Genome Quantification in Acipenseriformes of North America. *Journal of Heredity*. 84: 427-430p.
- Branská B., Linhová M., Patáková P., Paulová L., Melzoch K. (2011). Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. *Chemické Listy*. 105: 586-593p.
- Bureš P., Šmarda P., Hralová I., Funes-Soriano S., Lysák M., Řepka R., Helánová K., Rotreklová O., Procházková J., Úradníček L., Kůrová J. (2007). GC Content in Plant Genomes. *Analytical Cytometry*. 4: 19-20p.
- Bytyutskyy D., Flajšhans M. (2014). Use of diploid and triploid tench (*Tinca tinca*) blood as standards for genome size measurements. *Journal of Applied Ichthyology*. 30: 12-14p.
- Bytyutskyy D., Kholodnyy V., Flajšhans M. (2014). 3-D structure, volume, and DNA content of erythrocyte nuclei of polyploid fish. *Cell Biology International*. 38: 708–715p.
- Bytyutskyy D., Srp J., Flajšhans M. (2012). Use of Feulgen image analysis densitometry to study the effect of genome size on nuclear size in polyploid sturgeons. *Journal of Applied Ichthyology*. 28: 704-708p.
- Crissman H.A., Hirons, G.T. (1994). Staining of DNA in Live and Fixed Cells. In: Darzynkiewicz Z., Robinson J.P., Crissman H.A. (eds). *Flow cytometry*, 2<sup>nd</sup> edn. Part A. In: Wilson L., Matsudaira P. (eds). *Methods in Cell Biology*. San Diego: Academic Press Inc. 41: 195–210p.
- Crissman H.A., Steinkamp J.A. (1994). Cellular protein content measurements. In: Darzynkiewicz Z., Robinson J.P., Crissman H.A. (eds). *Flow cytometry*, 2<sup>nd</sup> edn. Part A. In: Wilson L., Matsudaira P. (eds). *Methods in Cell Biology*. San Diego: Academic Press Inc. 41: 175–184p.
- Crissman H.A., Stevenson A.P., Kissane R.J., Tobey R.A. (1979). Techniques for quantitative staining of cellular DNA for flow cytometry analysis. In: Melamed M.R., Mullaney P.F., Mendelsohn M.L. (eds). *Flow cytometry and sorting*. New York: John Wiley & Sons. 243–261p.
- DeLamater E.D., Mescon H., Barger J.D. (1950). The chemistry of the Feulgen reaction and related histo- and cytochemical methods. *Journal of investigative dermatology*. 14: 133-152p.



- Del Campo M.V.M., Strang P., Stendahl U., Stenkvis B. (1989). DNA determination in endometrial carcinoma by flow and image cytometry. *Acta Oncologica*. 28: 607–609p.
- Doležel J., Bartoš J., Voglmayr H., Greilhuber J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry*. 51A: 127–128p.
- Dudu A., Suci R., Paraschiv M., Georgesca S.E., Costache M., Berrebi P. (2011). Nuclear Markers of Danube Sturgeons Hybridization. *International Journal of Molecular Sciences*. 12: 6796-6809p.
- Fellers T.J., Davidson M.W. (2012). Introduction to Confocal Microscopy [online]. Olympus America Inc. [cit. 28.11.2018]. dostupné na [www: http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/techniques/confocal/confocalintro.html](http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/techniques/confocal/confocalintro.html)
- Feulgen R, Rossenbeck H. (1924). Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleisäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*. 135: 203-248p.
- Flajšhans M., Ráb P., Linhart O. (2013). Polyplodie a genomové manipulace u ryb. In: Flajšhans M., Kocour M., Ráb P., Hulák M., Petr J., Bohlen Šlechtová V., Šlechta V., Havelka M., Kašpar V., Linhart O. (eds). *Genetika a šlechtění ryb*. 2. roz. vyd. Vodňany: Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích: Fakulta rybářství a ochrany vod. 151–195p.
- Fontana F. (1976). Nuclear DNA Content and Cytometry of Erythrocytes of *Huso Huso* L., *Acipenser Sturio* L. and *Acipenser Naccarii* Bonaparte. *Caryologia*, 29: 127-138p.
- Fontana F. (2002). A cytogenetic approach to the study of taxonomy and evolution in sturgeons. *Journal of Applied Ichthyology*. 18: 226-233p.
- Fontana F., Jankovic D., Zivkovic S. (1975). Somatic chromosome of *Acipenser ruthenus* L. *Archives of Biological Nauka, Beograd*. 27: 33-35p.
- Fisher H., Hindkjaer J., Pedersen S., Koch J., Brandt C., Kolvaraa S. (1994). Primed *in situ* labeling (PRINS) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). In: Darzynkiewicz Z., Robinson J.P., Crissman H.A. (1994). *Flow cytometry*, 2nd edition. Part B. In: Wilson, L., Matsudaira, P. (Eds.) *Methods in Cell Biology Vol 42*,. San Diego: Academic Press Inc. 71-93p.

- Gerritsen J., Sanders R.W., Bradley S.W., Porter K.G. (1987). Individual feeding variability of protozoan and crustacean zooplankton analyzed with flow cytometry. *Limnology and Oceanography*. 32: 691-699p.
- Gold J.R., Ragland C.J., Birkner M.C., Garrett G.P. (1991). Technical Notes: A Simple Procedure for Long-Term Storage and Preparation of Fish Cells for DNA Content Analysis Using Flow Cytometry. *The Progressive Fish-Culturist* 53: 108–110p.
- Gregory T.R. (2001). The Bigger the C-Value, the Larger the Cell: Genome Size and Red Blood Cell Size in Vertebrates [online]. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 27: 830-843 [cit. 26.3.2019]. DOI: 10.1006/bcmd.2001.0457. Dostupné na www: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079979601904577>.
- Gregory T.R. (2005). Genome size evolution in animals. In: Gregory T.R. (ed). *The evolution of the genome*. Burlington, MA: Elsevier Academic Press. 4-89p.
- Gregory T.R., Nicol J.A., Tamm H., Kullman B., Kullman K., Leitch I.J., Murray B.G., Kapraun D.F., Greilhuber J., Bennet M.D. (2007). Eukaryotic genome size databases [online]. *Nucleic Acids Research*. 35 (Database): D332-D338 [cit. 25.3.2019]. DOI: 10.1093/nar/gkl828. ISSN 0305-1048. Dostupné na www: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkl828>.
- Greilhuber J., Temsch E.M. (2001). Feulgen densitometry: some observation relevant to best practise in quantitative nuclear DNA content determination. *Acta Botanica Croatica*. 60: 285-298p.
- Hardie D.C., Gregory T.R., Hebert P.D.N. (2002). A Review: From Pixels to Picograms: A Beginners' Guide to Genome Quantification by Feulgen Image Analysis Densitometry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 50: 735-749p.
- Hardie D.C., Hebert P.D.N. (2004). Genome-size evolution in fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 61: 1636-1646p.
- Havelka M., Bytyutskyy D., Symonová R., Ráb P., Flajšhans M. (2016). The second highest chromosome count among vertebrates is observed in cultured sturgeon and is associated with genome plasticity. *Genetics Selection Evolution*. 48: 1-9p.
- Havelka M., Hulák M., Ráb P., Rábová M., Lieckfeldt D., Ludwig A., Rodina M., Gela D., Pšenička M., Bytyutskyy D., Flajšhans M. (2014). Fertility of a spontaneous

- hexaploid male Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* [online]. BioMed Central Genetics. 15: 1-10p. [cit. 4,4,2019]. Dostupné na www:  
<http://bmcgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2156-15-5>.
- Havelka M., Hulák M., Rodina M., Flajšhans M. (2013). First evidence of autotriploidization in starlet (*Acipenser ruthenus*). Journal of Applied Genetics. 54: 201-207p.
- Havelka M., Kašpar V., Hulák M., Flajšhans M. (2011). Sturgeon genetics and cytogenetics: a review related to ploidy levels and interspecific hybridization. Folia Zoologica. 60: 93-103p.
- Havelka M., Zhou H., Hagihara S., Ichimura M., Fujimoto T., Yamaha E., Adachi S., Arai K. (2017). Spontaneous polyploidization in critically endangered *Acipenser mikadoi*. Fisheries Science. 83: 587-595p.
- Herman B., Lakowicz J.R., Murphy D.B., Fellers T.J., Davidson M.W. (2012). Fluorophores for confocal microscopy [online]. Olympus America Inc. [cit. 15.2.2018]. dostupné na www:  
<http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/techniques/confocal/fluorophoresintro.html>.
- Hochleitner M. (2004). Störe – Biologie und Aquakultur. Norderstedt: AquaTech Publications. 222p.
- Hrušák O. (2011). Průtoková cytometrie. In: Bartůňková J., Paulík M. (Eds.). Vyšetřovací metody v imunologii. 2. vyd. Praha: Grada. 60–66p.
- Karp G. (2010). Cell biology: International student version. 6. vyd. Singapore: John Wiley & Sons (Asia). 765p.
- Karg T.J., Golic K.G. (2018). Photocconversion of DAPI and Hoechst dyes to green and red emitting forms after exposure to UV excitation. Chromosoma. 127: 235-245p.
- Kim D.S., Nam Y.K., Noh J.K., Park Ch. H., Chapman F.A. (2005). Karyotype of North American shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* with the highest chromosome number in the *Acipenseriformes*. Ichthyological Research. 52: 94-97p.
- Krishan A. (1975). Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. Journal of Cell Biology. 66: 188-193p.
- Ksiazczyk T., Taciak M., Zwierzykowski Z. (2010). Variability of ribosomal DNA sites in *Festuca pratensis*, *Lolium perenne*, and their intergeneric hybrids, revealed by FISH and GISH. Journal of Applied Genetics. 51: 449-460p.

- Leggat R.A., Iwama G.K. (2003). Occurrence of polyploidy in the fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 13: 237-246p.
- Li W.K.W., Diskie P.M. (2001). Monitoring phytoplankton, Bacterioplankton, and virioplankton in a coastal inlet (Bedford Basin) by flow cytometry. *Cytometry*. 44: 236-246p.
- Linhart O., Rodina M., Flajšhans M., Mavrodiev N., Nebesarova J., Gela D., Kocour M. (2006). Studies on sperm of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* (L.). *Aquaculture International*. 14: 9–25p.
- Löffelmann M., Gargulák M., Kizek R. (2017). Příloha č. 3: Okulární mikrometr – návod k použití. Závěrečná zpráva řešení projektu Modernizace a inovace praktických cvičení z Biologie/Biology na Farmaceutické fakultě VFU Brno (2017FaF/3140/73) [online]. Brno: Veterinární a Farmaceutická Univerzita Brno: Farmaceutická fakulta [cit. 10.10.2018]. Dostupné na [www: https://www.vfu.cz/files/3140\\_73\\_vystup\\_okularni-mikrometr.pdf](https://www.vfu.cz/files/3140_73_vystup_okularni-mikrometr.pdf).
- Ludwig A., Belfiore N.M., Pitra C., Svirsky V., Jenneckens I. (2001). Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics*. 158: 1203–1215p.
- Ludwig A., Lippold S., Debus L., Reinartz R. (2009). First evidence of hybridization between endangered sterlets (*Acipenser ruthenus*) and exotic Siberian sturgeons (*Acipenser baerii*) in the Danube River. *Biological Invasions*. 11: 753-760p.
- Madlung A. (2013). Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity*. 110: 99-104p.
- Mayall B.H. (1988). Current Capabilities and Clinical Applications of Image Cytometry. *Cytometry Supplement*. 3: 78-84p.
- Mello M.L.S., de Campos Vidal B. (2017). Review: The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives. *Acta Histochemica*. 119: 603–609p.
- Mirsky A.E., Riss H. (1951). The DNA content of animals cells and its evolutionary significance. *Journal of General Physiology*. 34: 451-462p.
- Novák J., Basařová G., Fiala J., Dostálek P. (2008). Průtoková cytometrie ve výzkumu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a její aplikace v praxi. *Chemické Listy*. 102: 183-187p.
- Ohno S., Muramoto J., Stenius C., Christian L., Kitterell W.A. (1969). Microchromosomes in holocephalian, chondrosteian and holosteian fishes. *Chromosoma*. 226: 35-40p.

- Otto F.J. (1994). High-resolution Analysis of nuclear DNA employing the fluorochrome DAPI. In: Darzynkiewicz Z., Robinson J.P., Crissman H.A. (eds). Flow cytometry, 2<sup>nd</sup> edn. Part A. In: Wilson L., Matsudaira P. (eds). Methods in Cell Biology. San Diego: Academic Press Inc. 41: 211-217p.
- Otto S.P. (2007). The Evolutionary Consequences of Polyploidy [online]. Cell. 131: 452-462p. [cit. 8.4.2019]. DOI: 10.1016/j.cell.2007.10.022. Dostupné na [www: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867407013402](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867407013402).
- Ozouf-Costaz C., Countanceau J.P., D'Hont A., Chassux D., Lecointre G. (2015). Extending DNA Fibers and Fiber-Fish. In: Ozouf-Costaz C., Pisano E., Foresti F., Foresti de Almeida Toledo L. (eds). Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. 165-175p.
- Pekarčíková L., Knopfová L., Ondroušková E., Šmarda J. (2014). Využití průtokové cytometrie pro analýzu mitochondriální buněčné smrti. Klinická Onkologie. 27: 15–21p.
- Phan V.N., Gomes V., Passos M.J.A.C.R., da Silva Rocha A.J. (2015). In vivo Micronuclei Test for Detecting Response of Teleost Fish to Environmental Genotoxic Exposure. In: Ozouf-Costaz C., Pisano E., Foresti F., Foresti de Almeida Toledo L. (eds). Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. 175-187p.
- Plášek J. (1996). Nové metody optické mikroskopie. Pokroky matematiky, fyziky a astronomie. 41: 1-24p.
- Plášek J. (2015). Optická mikroskopie od van Leeuwenhoekera k Nobelově ceně za chemii v roce 2014. Český časopis pro fyziku. 65: 365-369p.
- Pollard T.D., Earnshaw W.C. (2002). Cell biology. Philadelphia: Saunders, Elsevier Science. 805p.
- Pšenička M., Rodina M., Linhart O. (2010). Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (*Acipenser*), function of acrosome and prevention of polyspermy. Animal Reproduction Science. 117: 147-154p.
- Ráb P., Bohlen J., Rábová M., Flajšhans M., Kalous L. (2007). Cytogenetics as a tool in fish conservation: the present situation in Europe. In: Pisano E., Ozouf-Costaz C., Foresti F., Kapoor B.G. (Eds.). Fish Cytogenetics. Enfield: Science Publisher. 215–241p.

- Ruban G.I. (1997). Species structure, contemporary distribution and status of the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. In: Birstein V.J., Waldman J.R., Bemis W.E (eds). Sturgeon Biodiversity and Conservation. Boston: Kluwer: Developments in environmental biology of fishes. 17: 221-230p.
- Shapiro H.M., (2003). Practical flow cytometry. 4<sup>th</sup> edn., Hoboken: John Wiley & Sons. 681p.
- Soukup A. (2004). Fluorescenční mikroskopie [online]. In: Soukup, A. Botanická mikrotechnika. Praha: Karlova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, © Aleš Soukup 2004 [cit. 18.12.2018]. dostupné na www: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>.
- Srp J. (2010). Polyploidie u jeseterů. České Budějovice: Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. 108p.
- Suda J. (2005). Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. Živa 53: 46–48p.
- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P., Rosenbaumová R., Peckert T., Krahulec F. (2007). Genome size variation and species relationships in *Hieracium* sub-genus *Pilosella* (*Astraceae*) as inferred by flow cytometry. Annals of Botany. 100: 1323–1335p.
- Swarzacher T., Leitch A.R., Bennett M.D., Hesslop-Harrison J.S. (1989). *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. Annals of Botany. 64: 315-324p.
- Swift H. (1950). The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 36: 643– 654.
- Symonová R., Flajšhans M., Sember A., Havelka M., Gela D., Kořínková T., Rodina M., Rábová M., Ráb P. (2013). Molecular cytogenetics in artificial hybrid and highly polyploid sturgeons: An evolutionary story narrated by repetitive sequences [online]. Cytogenetic and Genome Research. 141: 153-162p. [cit. 8.4.2019]. DOI: 10.1159/000354882. Dostupné na www: <https://www.karger.com/Article/FullText/354882>.
- Symonová R., Sember A., Majtánová Z., Ráb P. (2015). Characterization of fish genomes by GISH and CGH. Pp. 118-131. In: Ozouf-Costaz C., Pisano E., Foresti F., Foresti de Almeida Toledo L. (eds). Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and Teleosts). Enfield: CRC Press, Inc. 118-131p.

- Šinkorová Z., Zárbybnická L. (2008). Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda. *Vojenské Zdravotnické Listy*. 3: 98-103p.
- Tang K.W., Turk V., Grossart H.P. (2010). Linkage between crustacean zooplankton and aquatic bacteria. *Aquatic microbial ecology*. 61: 261-277p.
- Taylor I.W., Milthorpe B.K. (1980). An evaluation of DNA fluorochromes, staining techniques, and analysis for flow cytometry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 11: 1224-1232p.
- Tesař J., Bednář V. (2012). Mikroskop včera a dnes a jeho využití ve fyzikálním praktiku. In: *Veletrh nápadů učitelů fyziky 17*. Sborník z konference. Praha: P3K s.r.o. 295-301p.
- Vasil'ev V.P. (1985). *Evolutionary karyology of fishes*. Moscow: Nauka. 300p.
- Vasil'ev V.P. (2009). Mechanisms of Polyploid Evolution in Fish: Polyploidy in Sturgeons. In: Carmona R., Domezain A., Gallego M.G., Hernando J.A., Rodríguez F., Ruiz-Rejón M., (eds). *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons: Fish and Fisheries Series*. Dordrecht: Springer. 29: 97–117p.
- Vasil'ev V.P., Sokolov L.I., Serebryakova E.V. (1980). Karyotype of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt from the Lena River and some questions of the acipenserid karyotypic evolution. *Voprosy Ikhtiologii*. 23: 814-822p.
- Vinogradov A.E. (1994). Measurements by flow cytometry of genomic AT/GC ratio and genome size. *Cytometry*. 16: 34–40p.
- Vinogradov A.E. (1998). Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: The triangular relationship. *Cytometry*. 31: 100–109p.
- Watson J.V. (1991). *Introduction to flow cytometry*. Cambridge: Cambridge University Press. 443p.
- Wolenski J.S., Julich D. (2014). Focus: Microscopy and Imaging: Fluorescence Microscopy Gets Faster and Clearer: Roles of Photochemistry and Selective Illumination. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 87: 21-32p.
- Yuan Z., Liu S., Zhou T., Tian C., Bao L., Dunham R., Liu Z. (2018). Comparative genome analysis of 52 fish species suggests differential associations of repetitive elements with their living aquatic environments [online]. *BioMed Central Genomic*. 19(141): 1-10p. [cit. 2.4.2019]. DOI: 10.1186/s12864-018-4516-1. dostupné na [www: https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-4516-1](https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-4516-1).

- Zhou H., Fujimoto T., Adachi S., Abe S., Yamaha E., Arai K. (2013). Molecular cytogenetic study on the ploidy status in *Acipenser mikadoi*. *Journal of Applied Ichthyology*. 29: 51-55p.
- Zhou H., Fujimoto T., Adachi S., Yamaha E., Arai K. (2011). Genome size variation estimated by flow cytometry in *Acipenser mikadoi*, *Huso dauricus* in relation to other species of Acipenseriformes. *Journal of Applied Ichthyology*. 27: 484-491p.



## 8 Seznam tabulek, grafů, a příloh

**Tabulka č. 1:** Váha ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) a stáří skupin jeseterů využitých k odběru ploutevní tkáně pro průtokovou cytometrii (FCM).

**Tabulka č. 2:** Relativní obsah DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$  kanálu píku histogramů) s příslušnými variačními koeficienty CV (%) naměřený u jednotlivých skupin jeseterů (*Acipenser*) s různou funkční úrovní ploidie pomocí průtokové cytometrie (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI, přepočtený na absolutní obsah DNA [ $\text{pgjád}^{-1}$ ]; M: *A. ruthenus*, S: *A. baerii*, R: *A. gueldenstaedtii*, MxS: *A. ruthenus* x *A. baerii*, SxM: *A. baerii* x *A. ruthenus*, RxS: *A. gueldenstaedtii* x *A. baerii*, SxR: *A. baerii* x *A. gueldenstaedtii*; a, b, c, d = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

**Tabulka č. 3:** Absolutní obsah DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] u jednotlivých skupin jeseterů (*Acipenser*) s různou funkční úrovní ploidie, stanovený pomocí Feulgenovy obrazové analýzy (FIA); M: *A. ruthenus*, S: *A. baerii*, R: *A. gueldenstaedtii*, MxS: *A. ruthenus* x *A. baerii*, SxM: *A. baerii* x *A. ruthenus*, RxS: *A. gueldenstaedtii* x *A. baerii*, SxR: *A. baerii* x *A. gueldenstaedtii*; a, b, c = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

**Tabulka č. 4:** Rozdíl v absolutním obsahu DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] stanoveného průtokovou cytometrií (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA) u jesetera malého (*A. ruthenus*; M); a, b = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

**Tabulka č. 5:** Rozdíl v absolutním obsahu DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] stanoveného průtokovou cytometrií (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA) u jesetera sibiřského (*A. baerii*; S); a = statisticky nevýznamný rozdíl ( $p > 0,05$ ).

**Tabulka č. 6:** Rozdíl v absolutním obsahu DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] stanoveného průtokovou cytometrií (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA) u jesetera ruského (*A. gueldenstaedtii*; R); a = statisticky nevýznamný rozdíl ( $p > 0,05$ ).

**Tabulka č. 7:** Rozdíl v absolutním obsahu DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] stanoveného průtokovou cytometrií (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA) u mezidruhového hybridu MxS (*A. ruthenus* x *A. baerii*); a = statisticky nevýznamný rozdíl ( $p > 0,05$ ).

**Tabulka č. 8:** Rozdíl v absolutním obsahu DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] stanoveného průtokovou cytometrií (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA) u mezidruhového hybridu SxM (*A. baerii* x *A. ruthenus*); a, b = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

**Tabulka č. 9:** Rozdíl v absolutním obsahu DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] stanoveného průtokovou cytometrií (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA) u mezidruhového hybridu SxR (*A. baerii* x *A. gueldenstaedtii*); a, b, c = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

**Tabulka č. 10:** Rozdíl v absolutním obsahu DNA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] stanoveného průtokovou cytometrií (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA) u mezidruhového hybridu RxS (*A. gueldenstaedtii* x *A. baerii*); a, b = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ); a, b = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

**Tabulka č. 11:** Tabulka č. 11: Porovnání naměřených hodnot obsahů DNA [ $\text{pgjád}^{-1}$ ] u čistých druhů jeseterů a mezidruhových hybridů – jeseter malý (*Acipenser ruthenus*), j. sibiřský (*A. baerii*), j. ruský (*A. gueldenstaedtii*), MxS: jeseter malý (*Acipenser ruthenus*; 2n) x j. sibiřský (*A. baerii*; 4n), SxM: j. sibiřský (*A. baerii*; 4n) x j. malý (*A. ruthenus*; 2n), RxS: j. ruský (*A. gueldenstaedtii*; 4n) x j. sibiřský (*A. baerii*; 4n), SxR: j. sibiřský (*A. baerii*; 4n) x j. ruský (*A. gueldenstaedtii*; 4n) – s již publikovanými hodnotami naměřených pomocí průtokové cytometrie (FCM) s fluorescenčním barvivem DAPI/PI a Feulgenovou obrazovou analýzou (FIA); a, b, c = statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ); <sup>1</sup> = FCM – DAPI; <sup>2</sup> = FCM – PI; <sup>3</sup> = FIA.

**Příloha č. 1:** Odběr ploutevní tkáně – připravené „ependorky“ s 1 ml roztoku (fyziologický roztok s 1 % ethanolom), lahvička s lihem a kahan (vlevo); oděr ploutevní tkáně spodního laloku jesetera (uprostřed); a ošetření dezinfekcí poraněné ploutve (vpravo; foto: autor práce).

**Příloha č. 2:** Příprava vzorků k měření relativního obsahu DNA pro průtokovou cytometrii – připravené „ependorky“ a kyvety s 30  $\mu\text{m}$  nylonovými filtry pro zpracování odebrané tkáně (vlevo); odběr reprezentačního vzorku ( $1\text{mm}^2$ ) z odebraného vzorku (uprostřed); a homogenizace reprezentačního vzorku (vpravo) (foto: autor práce, Marie Raušová).

**Příloha č. 3:** Průtokový cytometr Partec CCA I; Partec GmbH, Münster, Germany (foto: Marie Raušová).

**Příloha č. 4:** Světelný mikroskop Olympus BX50 s kamerou Olympus DP72 a PC (foto: autor práce).

**Příloha č. 5:** Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk jesetera ruského (*Acipenser gueldenstaedtii*, 4n) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 95 u j. malého a na kanále 208 u j. ruského. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku j. ruského byl přepočten na  $8,14 \text{ pgjád}^{-1}$ .

**Příloha č. 6:** Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*, 4n) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 94 u j. malého a na kanále 209 u j. sibiřského. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku j. sibiřského byl přepočten na  $8,21 \text{ pgjád}^{-1}$ .

**Příloha č. 7:** Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk mezidruhového triploidního hybridu jesetera malého x j. sibiřského (*Acipenser ruthenus*,  $2n \times A. baerii$ , 4n; MxS) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 88 u standardu a na kanále 137 u mezidruhového triploidního hybridu MxS. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku mezidruhového triploidního hybridu MxS byl přepočten na  $5,76 \text{ pgjád}^{-1}$ .

**Příloha č. 8:** Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk mezidruhového triploidního hybridu j. sibiřského x j. malého (*A. baerii* 4n x *A. ruthenus*, 2n; SxM) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 81 u standardu a na kanále 128 u mezidruhového triploidního hybridu SxM. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku mezidruhového triploidního hybridu SxM byl přepočten na 5,89 pg/jádro<sup>-1</sup>.

**Příloha č. 9:** Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk mezidruhového tetraploidního hybridu jesetera malého x j. sibiřského (*Acipenser ruthenus*, 2n x *A. baerii*, 4n; MxS) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 83 u standardu a na kanále 163 u mezidruhového tetraploidního hybridu MxS. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku mezidruhového tetraploidního hybridu MxS byl přepočten na 7,25 pg/jádro<sup>-1</sup>.

**Příloha č. 10:** Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk mezidruhového hexaploidního hybridu jesetera sibiřského x j. malého (*Acipenser baerii*, 4n x *A. ruthenus*, 2n; SxM) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 84 u standardu a na kanále 264 u mezidruhového triploidního hybridu SxM. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku mezidruhového hexaploidního hybridu SxM byl přepočten na 11,61 pg/jádro<sup>-1</sup>.

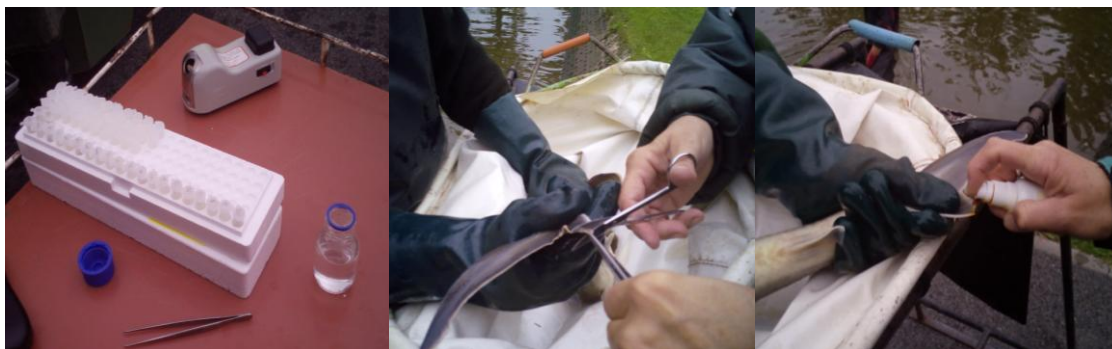
**Příloha č. 11:** Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk mezidruhového tetraploidního hybridu jesetera ruského x j. sibiřského (*Acipenser gueldenstaedtii*, 4n x *A. baerii*, 4n; RxS) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 98 u standardu a na kanále 221 u mezidruhového tetraploidního hybridu RxS. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku mezidruhového tetraploidního hybridu RxS byl přepočten na 8,36 pg/jádro<sup>-1</sup>.

**Příloha č. 12:** Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk mezidruhového triploidního hybridu jesetera sibiřského x j. ruského (*Acipenser baerii*, 4n x *A. gueldenstaedtii*, 4n; SxR) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 98 u standardu a na kanále 224 u mezidruhového tetraploidního hybridu SxR. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku mezidruhového tetraploidního hybridu SxR byl přepočten na 8,43 pg/jádro<sup>-1</sup>.

**Příloha č. 13:** Příloha č. 13: Vzorek vhodných jader erytrocytů pro měření Feugenovou obrazovou analýzu – vpravo krevní nátěr tetraploidního jesetera ruského (*Acipenser gueldenstaedtii*) a vlevo tetraploidního j. sibiřského (*A. baerii*).

**Přílohy č. 14:** Příloha č. 14: Nevhodná jádra erytrocytů diploidního lína obecného (*Tinca tinca*; vlevo), mezidruhového tetraploidního hybrida jesetera sibiřského x j. ruského (*Acipenser baerii* x *A. gueldenstaedtii*; uprostřed) a triploidního mezidruhového hybrida j. malého x j. sibiřského (*A. ruthenus* x *A. baerii*; vpravo) pro měření absolutního obsahu DNA pomocí Feulgenovy obrazové analýzy.

## 9 Přílohy



Příloha č. 1: Odběr ploutevní tkáně - připravené „ependorfky“ s 1 ml roztoku (fyziologický roztok s 1 % ethanolem), lahvička s lihem a kahan (vlevo); oděr ploutevní tkáně spodního laloku jesetera (uprostřed); a ošetření dezinfekcí poraněné ploutve (vpravo; foto: autor práce).



Příloha č. 2: Příprava vzorků k měření relativního obsahu DNA pro průtokovou cytometrii – připravené „ependorfky“ a kyvety s 30  $\mu\text{m}$  nylonovými filtry pro zpracování odebrané tkáně (vlevo); odběr reprezentačního vzorku ( $1\text{mm}^2$ ) z odebraného vzorku (uprostřed); a homogenizace reprezentačního vzorku (vpravo) (foto: autor práce, Marie Raušová).

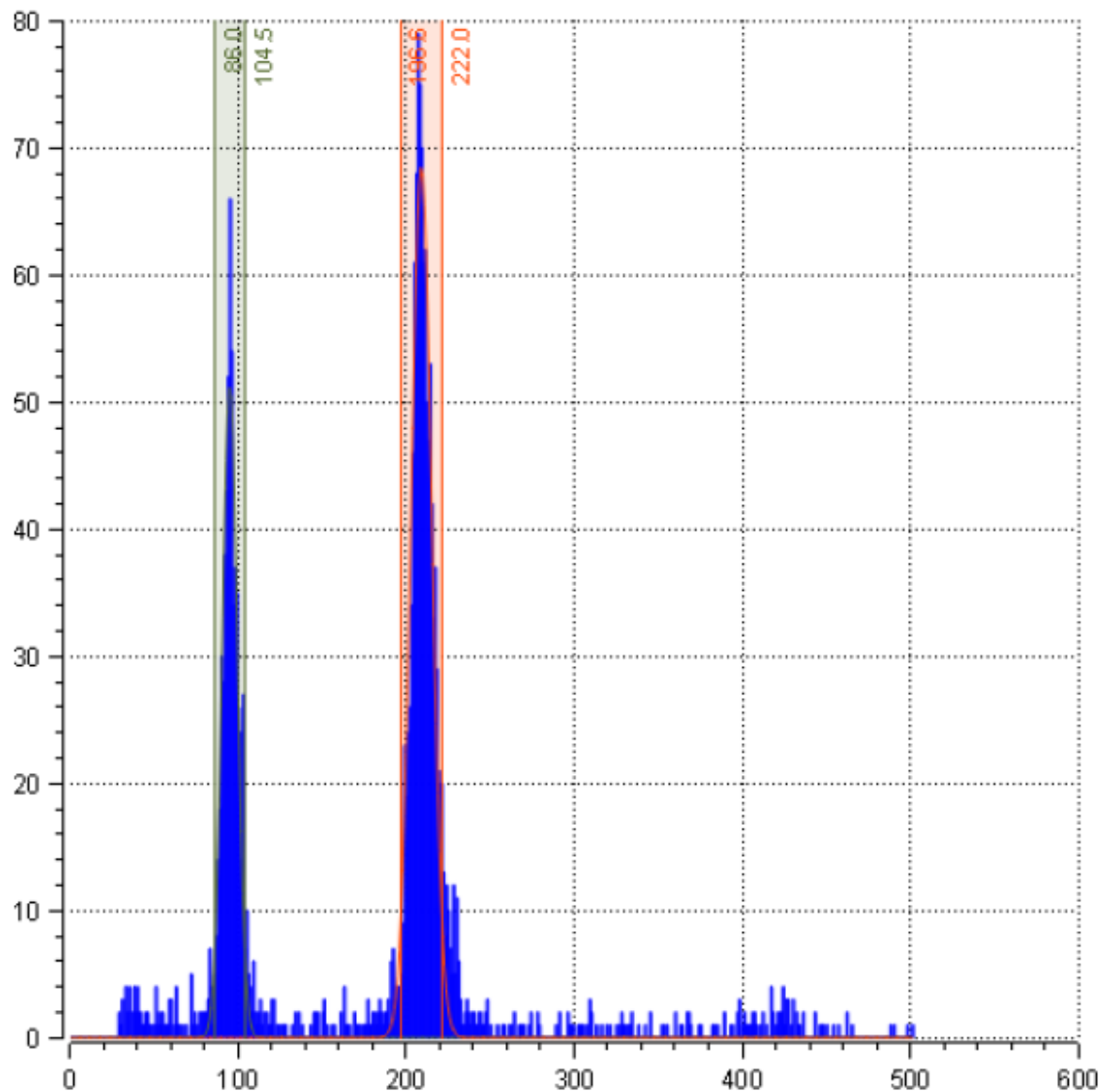


Příloha č. 3: Průtokový cytometr Partec CCA I; Partec GmbH, Münster, Germany (foto: Marie Raušová).



Příloha č. 4: Světelný mikroskop Olympus BX50 s kamerou Olympus DP72 a PC (foto: autor práce).

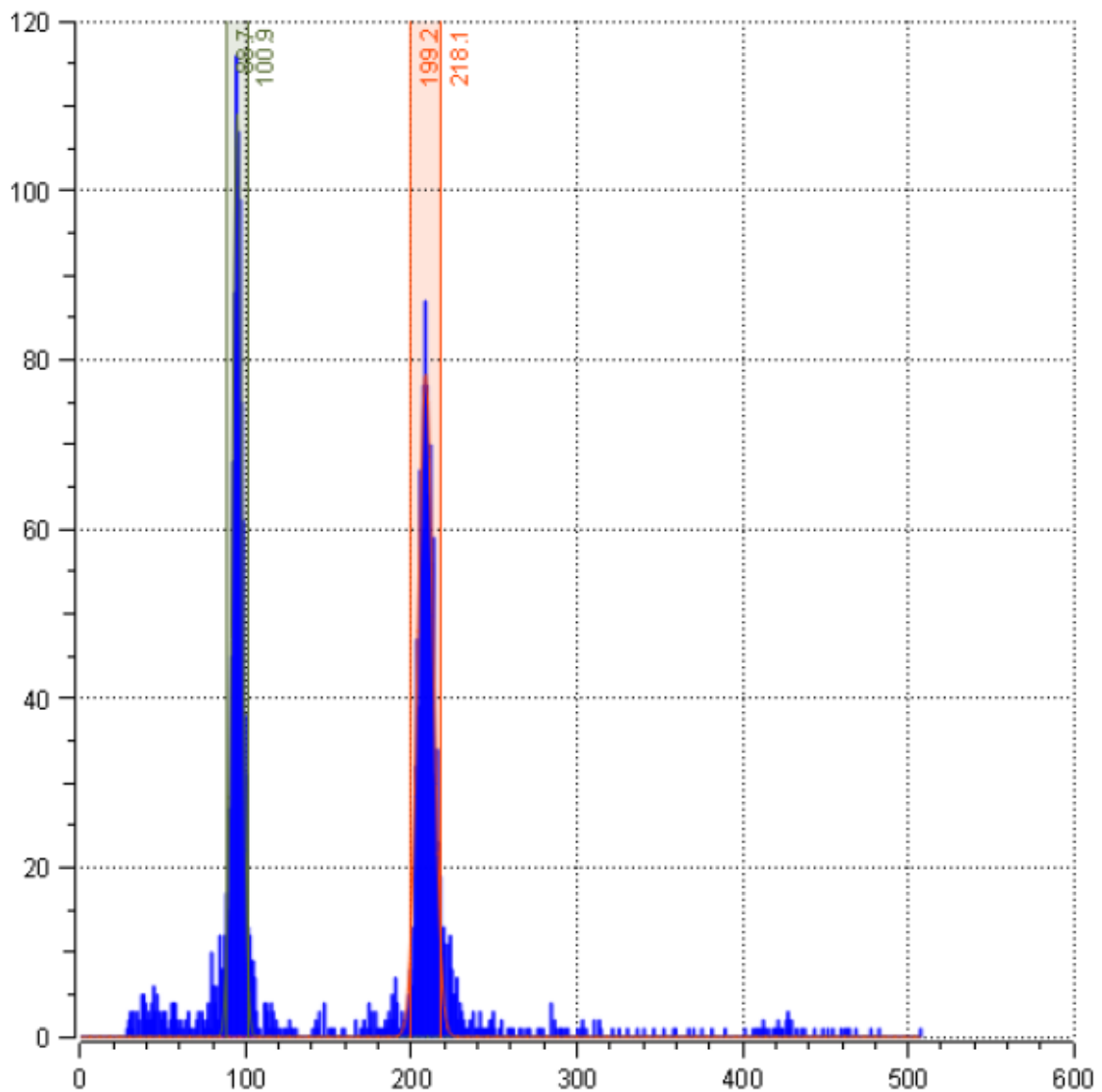
| Mean   | Index   | Id | Color | CV%  | Area%   | Area | Area gate | ChiSqu. |
|--------|---------|----|-------|------|---------|------|-----------|---------|
| 95,5   | 1       | 1  |       | 1,83 | 38,3743 | 609  | 560       | 6,52722 |
| 208,88 | 2,19745 | 2  |       | 2,27 | 71,7706 | 1139 | 1027      | 6,52722 |



Příloha č. 5: Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk jesetera ruského (*Acipenser gueldenstaedtii*, 4n) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 95 u j. malého a na kanále 208 u j. ruského. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku j. ruského byl přepočten na 8,14 pg/jádro<sup>-1</sup>.

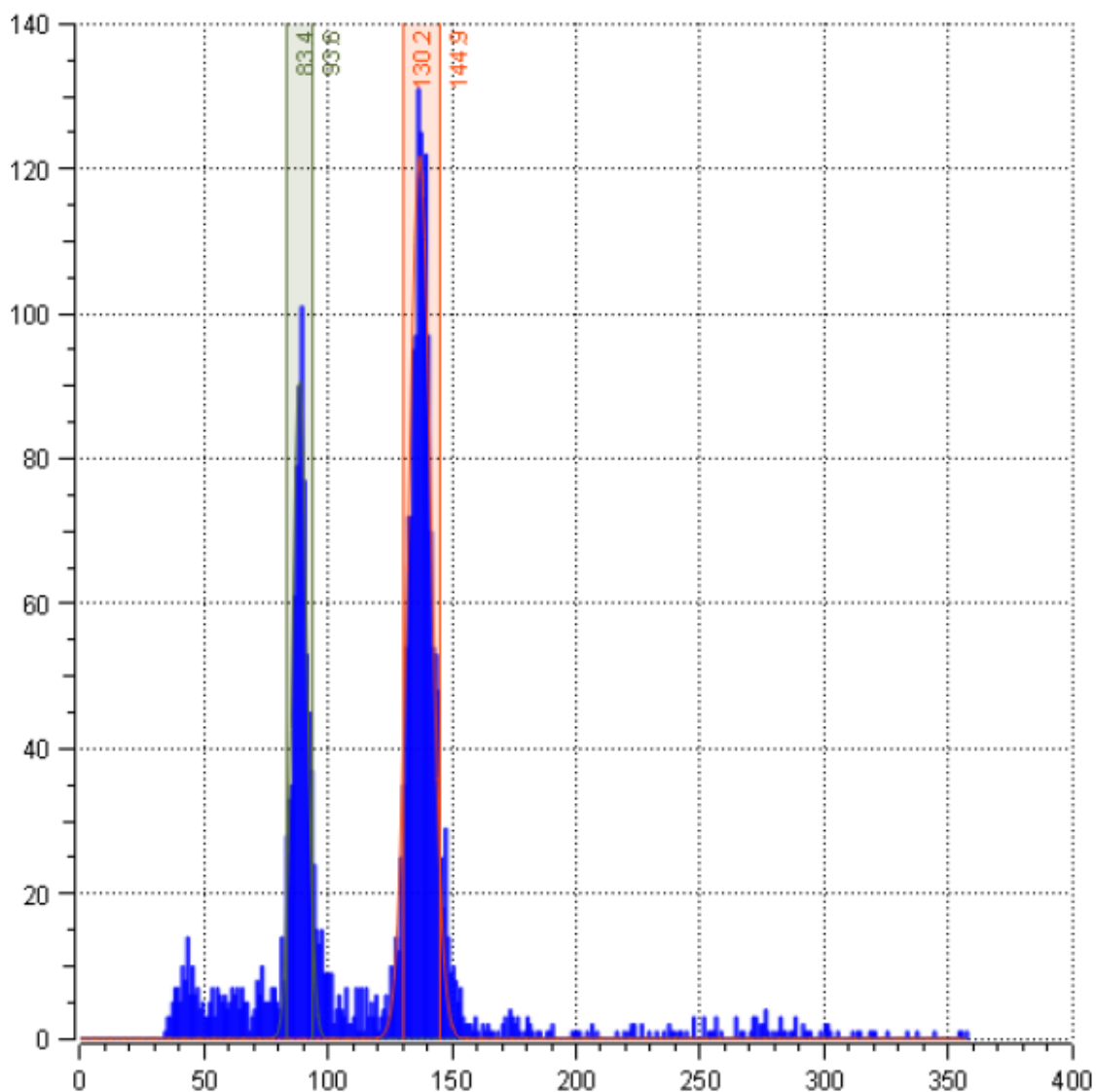


| Mean   | Index   | Id | Color | CV%  | Area%   | Area | Area gate | ChiSqu. |
|--------|---------|----|-------|------|---------|------|-----------|---------|
| 94,79  | 1       | 1  |       | 2,38 | 53,44   | 877  | 770       | 6,48782 |
| 209,14 | 2,20053 | 2  |       | 2,03 | 58,3181 | 957  | 871       | 6,48782 |



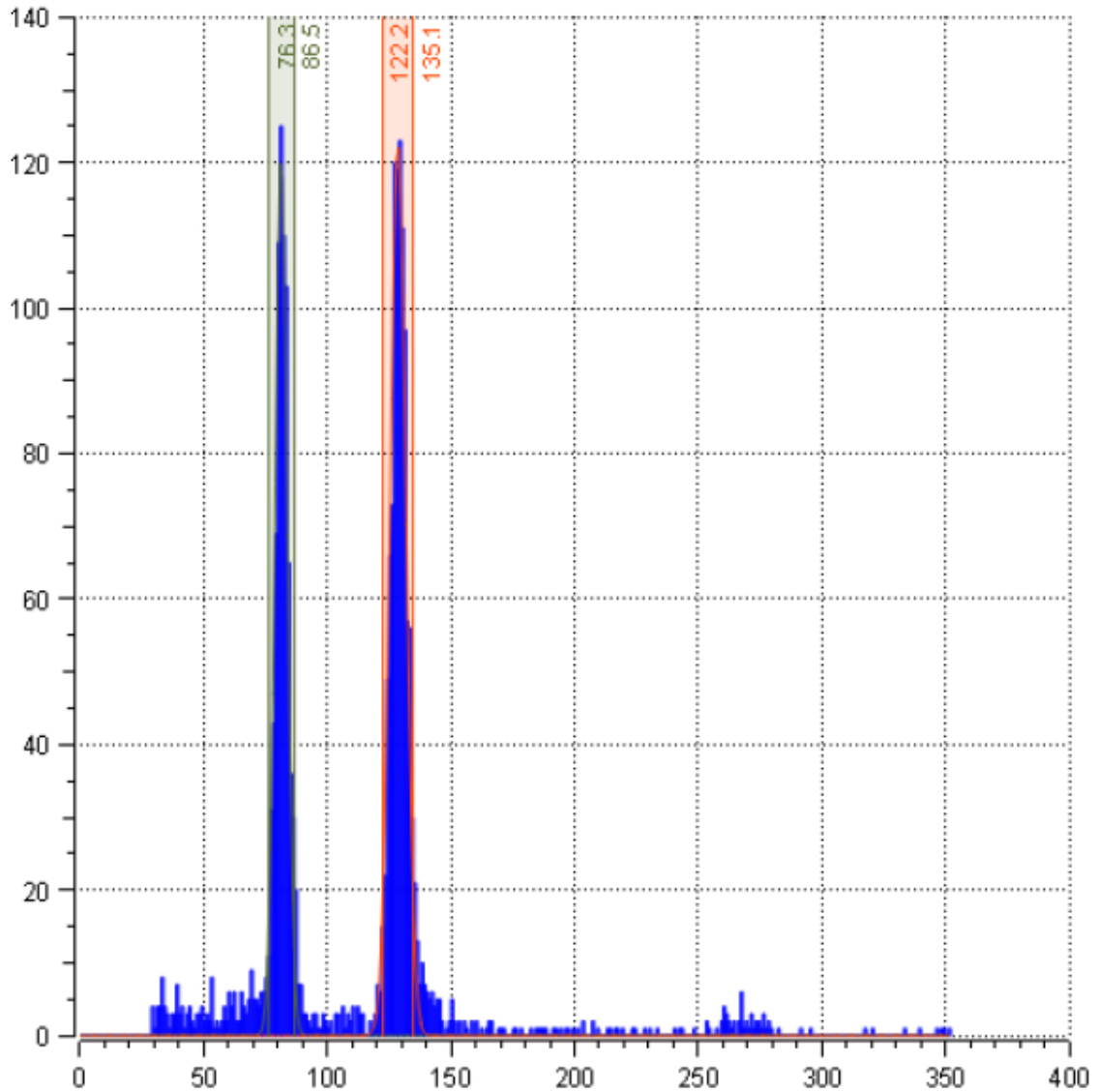
Příloha č. 6: Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*, 4n) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 94 u j. malého a na kanále 209 u j. sibiřského. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku j. sibiřského byl přepočten na 8,21 pg/jádro<sup>-1</sup>.

| Mean   | Index   | Id | Color | CV%  | Area%   | Area | Area gate | ChiSqu. |
|--------|---------|----|-------|------|---------|------|-----------|---------|
| 88,63  | 1       | 1  |       | 2,54 | 41,9373 | 762  | 611       | 16,0834 |
| 137,29 | 1,54724 | 2  |       | 2,37 | 79,8569 | 1451 | 1206      | 16,0834 |



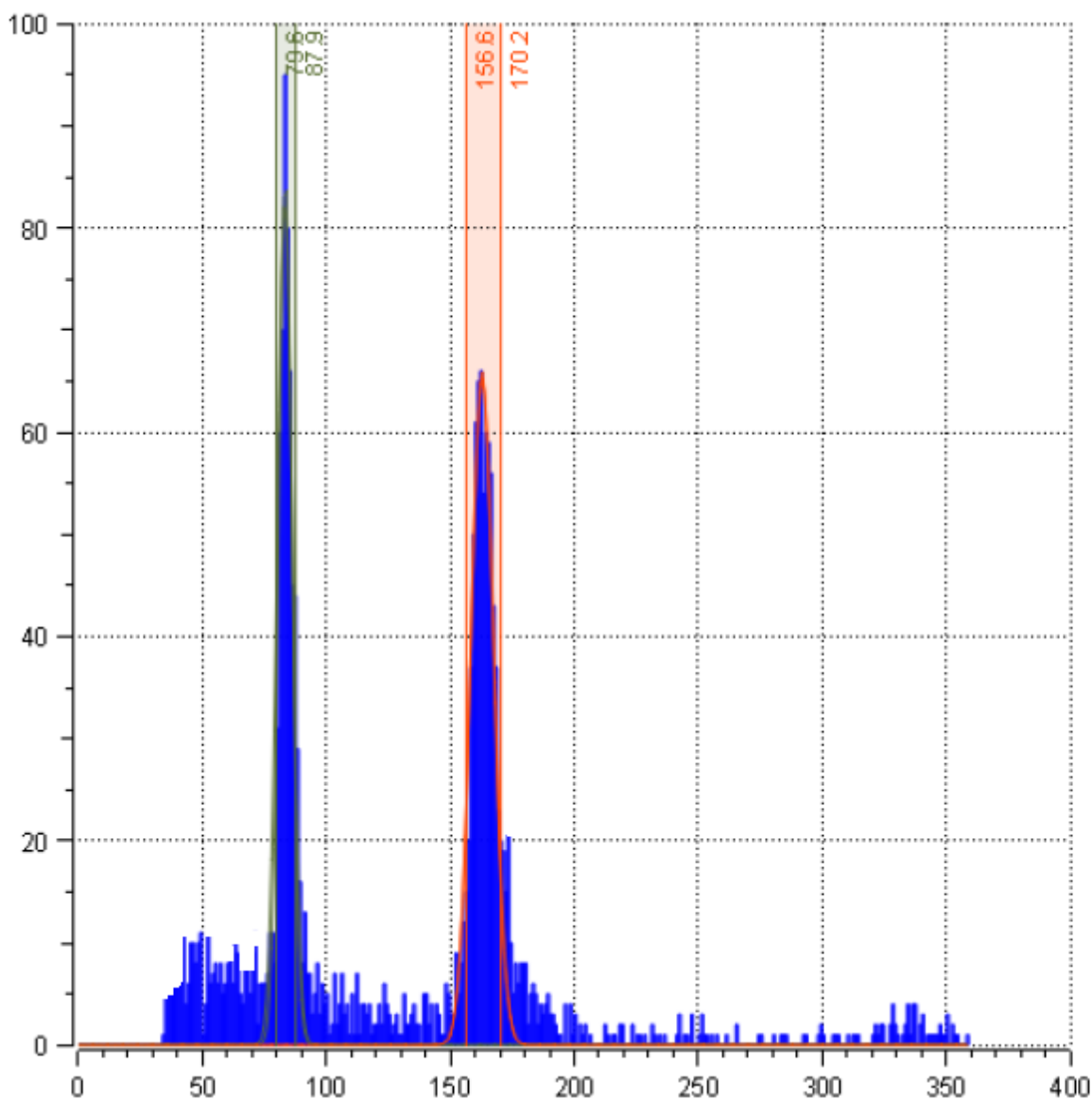
Příloha č. 7: Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk mezidruhového triploidního hybrida jesetera malého x j. sibiřského (*Acipenser ruthenus*, 2n x *A. baerii*, 4n; MxS) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 88 u standardu a na kanále 137 u mezidruhového triploidního hybrida MxS. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku mezidruhového triploidního hybrida MxS byl přepočten na 5,76 pg/jádro<sup>-1</sup>.

| Mean   | Index  | Id | Color      | CV%  | Area%   | Area | Area gate | ChiSqu. |
|--------|--------|----|------------|------|---------|------|-----------|---------|
| 81,41  | 1      | 1  | Dark Green | 2,15 | 47,3874 | 789  | 721       | 7,84458 |
| 128,85 | 1,5806 | 2  | Red        | 1,75 | 61,3213 | 1021 | 944       | 7,84458 |



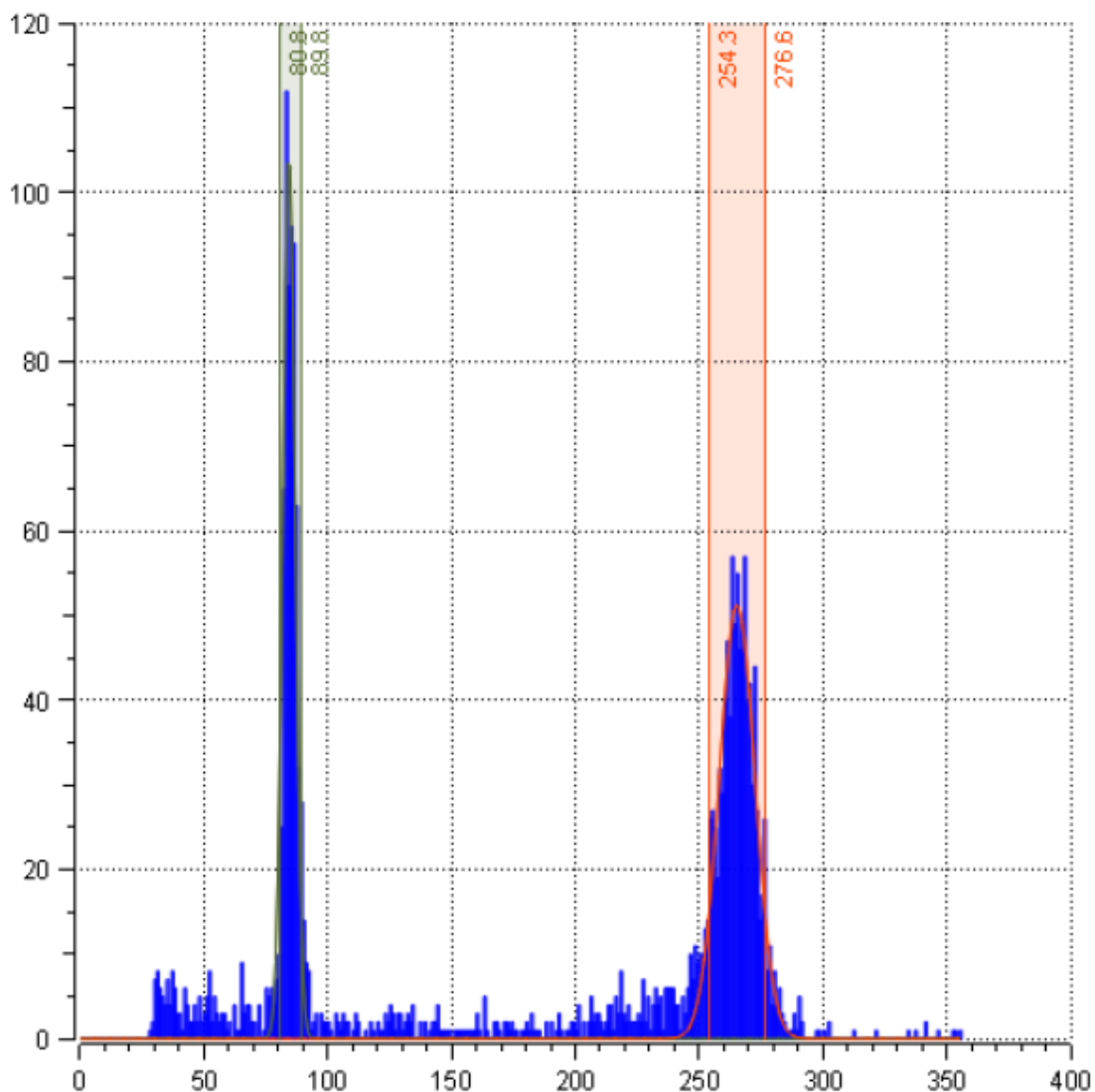
Příloha č. 8: Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk mezidruhového triploidního hybridu j. sibiřského x j. malého (*A. baerii*, 4n x *A. ruthenus*, 2n; SxM) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 81 u standardu a na kanále 128 u mezidruhového triploidního hybridu SxM. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku mezidruhového triploidního hybridu SxM byl přepočten na 5,89 pgjádrol<sup>-1</sup>.

| Mean   | Index   | Id | Color | CV%  | Area%   | Area | Area gate | ChiSqu. |
|--------|---------|----|-------|------|---------|------|-----------|---------|
| 83,65  | 1       | 1  |       | 2,05 | 49,0506 | 620  | 544       | 18,9451 |
| 163,06 | 1,95063 | 2  |       | 2,61 | 64,8734 | 820  | 720       | 18,9451 |



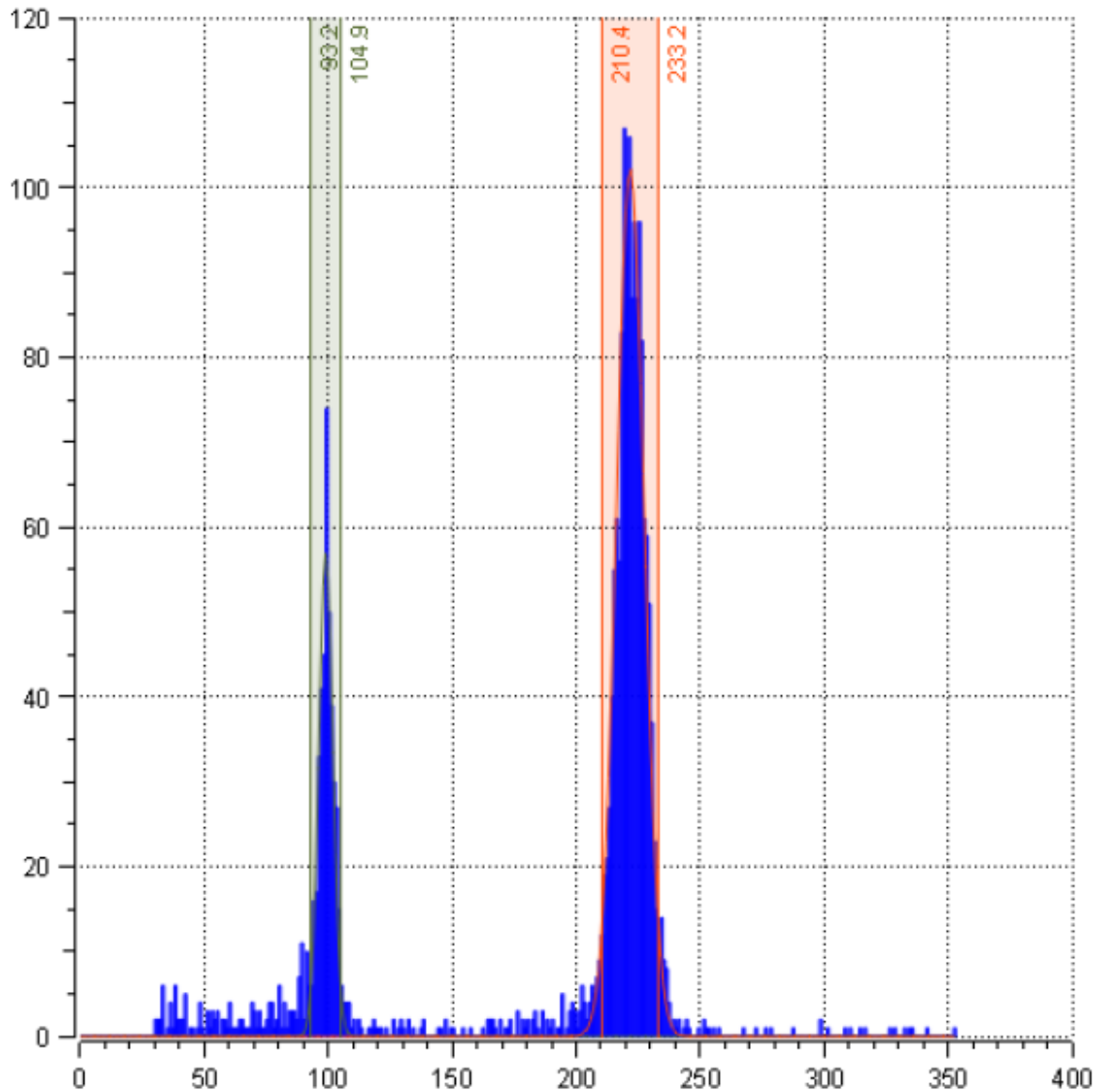
Příloha č. 9: Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk mezidruhového tetraploidního hybridu jesetera malého x j. sibiřského (*Acipenser ruthenus*, 2n x *A. baerii*, 4n; MxS) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 83 u standardu a na kanále 163 u mezidruhového tetraploidního hybridu MxS. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku mezidruhového tetraploidního hybridu MxS byl přepočten na 7,25 pg/jádro<sup>-1</sup>.

| Mean   | Index   | Id | Color      | CV%  | Area%   | Area | Area gate | ChiSqu. |
|--------|---------|----|------------|------|---------|------|-----------|---------|
| 84,61  | 1       | 1  | Dark Green | 2,07 | 47,2419 | 668  | 604       | 13,0067 |
| 264,08 | 3,13991 | 2  | Red        | 2,37 | 70,7921 | 1001 | 810       | 13,0067 |



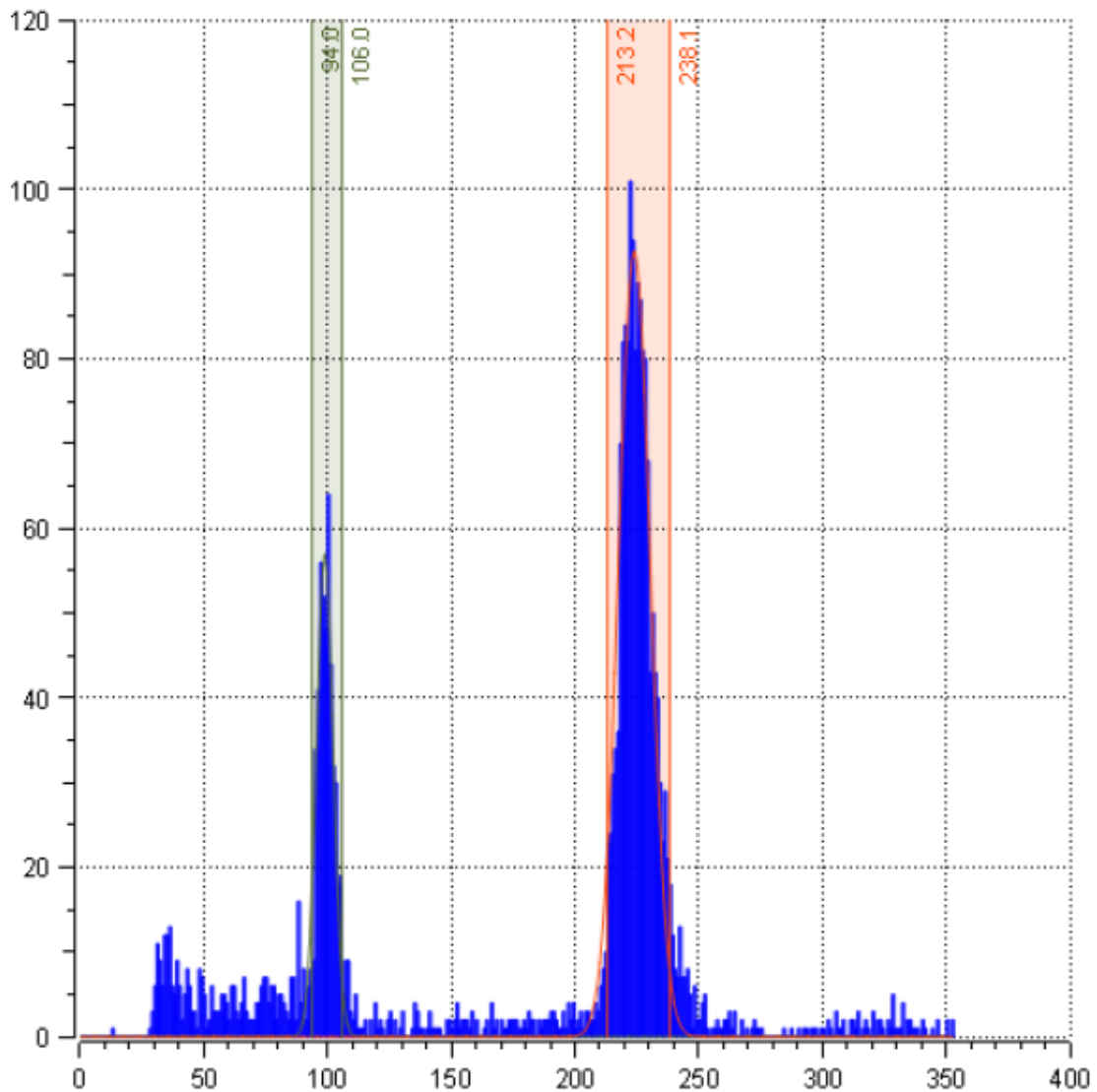
Příloha č. 10: Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk mezidruhového hexaploidního hybridu jesetera sibiřského x j. malého (*Acipenser baerii*, 4n x *A. ruthenus*, 2n; SxM) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 84 u standardu a na kanále 264 u mezidruhového triploidního hybridu SxM. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku mezidruhového hexaploidního hybridu SxM byl přepočten na 11,61 pgjád<sup>-1</sup>.

| Mean   | Index   | Id | Color | CV%  | Area%   | Area | Area gate | ChiSqu. |
|--------|---------|----|-------|------|---------|------|-----------|---------|
| 98,57  | 1       | 1  |       | 1,27 | 24,9717 | 441  | 387       | 7,54367 |
| 221,55 | 2,23836 | 2  |       | 1,92 | 83,692  | 1478 | 1379      | 7,54367 |

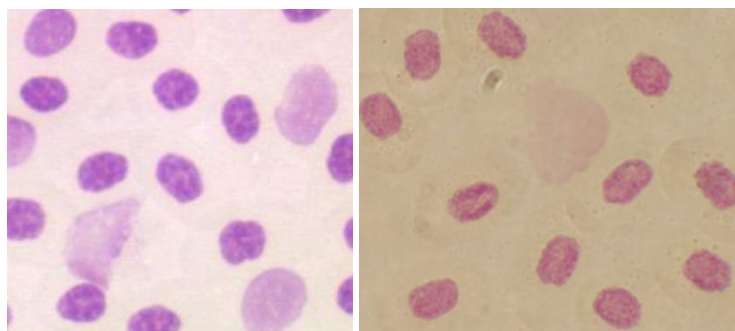


Příloha č. 11: Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk mezidruhového tetraploidního hybrida jesetera ruského x j. sibiřského (*Acipenser gueldenstaedtii*, 4n x *A. baerii*, 4n; RxS) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*, 2n). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 98 u standardu a na kanále 221 u mezidruhového tetraploidního hybrida RxS. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku mezidruhového tetraploidního hybrida RxS byl přepočten na 8,36 pg/jádro<sup>-1</sup>.

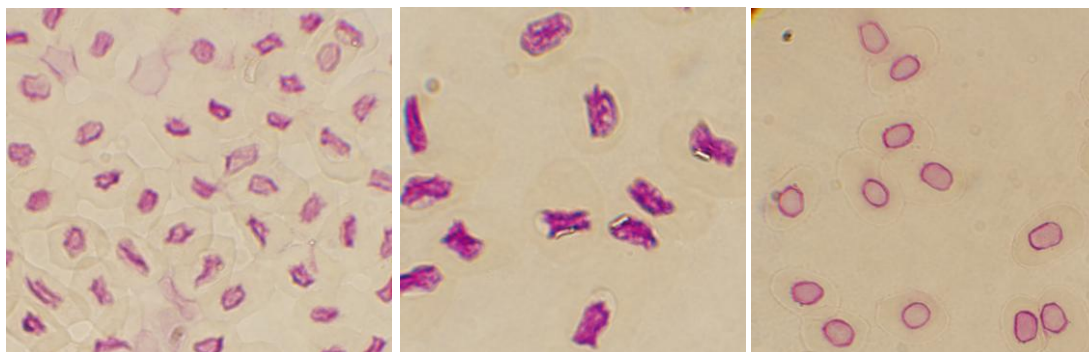
| Mean  | Index  | Id | Color | CV%  | Area%   | Area | Area gate | ChiSqu. |
|-------|--------|----|-------|------|---------|------|-----------|---------|
| 98,97 | 1      | 1  |       | 2,78 | 28,0833 | 526  | 452       | 15,8122 |
| 224,4 | 2,2642 | 2  |       | 2,56 | 83,6092 | 1566 | 1421      | 15,8122 |



Příloha č. 12: Příklad histogramu z měření relativního obsahu DNA jader buněk mezidruhového triploidního hybridu jesetera sibiřského x j. ruského (*Acipenser baerii*,  $4n$  x *A. gueldenstaedtii*,  $4n$ ; SxR) a příslušného standardu j. malého (*A. ruthenus*,  $2n$ ). Relativní obsahy se nacházejí přibližně na kanále 98 u standardu a na kanále 224 u mezidruhového tetraploidního hybridu SxR. Absolutní obsah DNA tohoto vzorku mezidruhového tetraploidního hybridu SxR byl přepočten na  $8,43 \text{ pg jadro}^{-1}$ .



Příloha č. 13: Vzorek vhodných jader erytrocytů pro měření Feugenovou obrazovou analýzu – vpravo krevní nátěr tetraploidního jesetera ruského (*Acipenser gueldenstaedtii*) a vlevo tetraploidního j. sibiřského (*A. baerii*).



Příloha č. 14: Nevhodná jádra erytrocytů diploidního lína obecného (*Tinca tinca*; vlevo), mezidruhového tetraploidního hybrida jesetera sibiřského x j. ruského (*Acipenser baerii* x *A. gueldenstaedtii*; uprostřed) a triploidního mezidruhového hybrida j. malého x j. sibiřského (*A. ruthenus* x *A. baerii*; vpravo) pro měření absolutního obsahu DNA pomocí Feulgenovy obrazové analýzy.



## 10 Abstrakt

### Využití cytometrických metod k rozeznání mezidruhových hybridů jeseterů od jedinců čistého druhu

Cílem této diplomové práce je porovnání obsahů DNA naměřených průtokovou a obrazovou cytometrií k rozeznání čistých jeseterovitých druhů ryb (*Acipenser ruthenus*, *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*) a uměle vytvořených mezidruhových F1 hybridů (*A. ruthenus* x *A. baerii*, *A. baerii* x *A. ruthenus*, *A. baerii* x *A. gueldenstaedtii*, *A. gueldenstaedtii* x *A. baerii*) pocházející z uzavřeného chovu Genetického rybářského centra VÚRH ve Vodňanech (FROV JU).

K měření relativního obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie (FCM) byly vzorky ploutevní tkáně barveny fluorescenčním barvivem DAPI (4,6-diamidin-2-fenylin-dolem). Výsledné hodnoty relativních obsahů DNA byly přepočítány na absolutní obsah DNA. Pro obrazovou cytometrii byla zvolena metoda Feulgenovy obrazové analýzy (FIA). Stanovení absolutního obsahu DNA touto analýzou proběhlo měřením IOD (integrované optické denzity) jader erytrocytů na připravených, uložených a dosud nezpracovaných krevních nátěrech.

V tomto experimentu bylo testováno měření 20 postupně analyzovaných jedinců z každé skupiny/ populace, nešlo však o identické jedince testované oběma metodami současně. Proto je možné, že u některých skupin bylo zjištěno více ploidních úrovní metodou FCM než metodou FIA a naopak.

Na základě získaných výsledků měření lze říci, že využití těchto cytometrických metod k rozeznání mezidruhových F1 hybridů jeseterů od jeseterů čistého druhu pouze na základě stanovení obsahu DNA, lze jen stěží. To bylo prokázáno statistickou analýzou, díky níž byl zjištěn průkazný rozdíl ( $p < 0,05$ ) pouze mezi obsahy DNA odpovídající odlišné ploidní úrovni. Z toho vyplývá, že skupina, ať už mezidruhového hybrida nebo čistého druhu s relativně stejnou hodnotou obsahu DNA odpovídající stejné ploidní úrovni se od sebe navzájem statisticky neliší ( $p > 0,05$ ), nezávisle na zvolené metodě měření. Stěžejním problémem bude pravděpodobně spontánní polyploidizace či mezidruhová hybridizace.

Mezi metodami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $p > 0,05$ ), a proto lze do jisté míry odmítnout hypotézu s podhodnocováním výsledků naměřených

metodou FCM s fluorescenčním barvivem DAPI a následného přepočtu. Avšak je-li možné pro měření obsahů DNA v praxi metodu FCM – DAPI upřednostnit před časově náročnější metodu FIA, si žádá další výzkum. Především by bylo vhodné podobný experiment zopakovat, s doporučením zařadit do metodiky také průtokovou cytometrii s fluorescenčním barvivem propidium jodid, díky níž je možné přímo měřit absolutní obsah DNA. Následně pak tyto tři cytometrické metody podrobit statistické analýze.

**Klíčová slova:** jeseter, mezidruhový hybrid, funkční ploidie, relativní obsah DNA, absolutní obsah DNA, průtoková cytometrie, obrazová cytometrie, propidium jodid (PI), 4,6-diamidin-2-fenylin-dolem (DAPI), Feulgenova reakce

## 11 Abstract

### Using of cytometric methods to distinguish interspecific hybrids of sturgeons from clear sturgeon species

The purpose of this master thesis is comparison of DNA content measured by flow cytometry and image cytometry to distinguish pure sturgeon species (*Acipenser ruthenus*, *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*) from artificial interspecific F1 hybrids (*A. ruthenus* x *A. baerii*, *A. baerii* x *A. ruthenus*, *A. baerii* x *A. gueldenstaedtii*, *A. gueldenstaedtii* x *A. baerii*) originating from Genetic Fisheries Centre, RIFCH in Vodnany (FFPW USB).

The relative DNA content was measured by flow cytometry (FCM) with using fluorescent dye DAPI (4,6-diamidin-2-phenylindole). Fin tissue was used as a sample for this method. Consequently, results of measuring relative DNA content were converted to absolute DNA content. The representative method of image cytometry was a Feulgen image analysis (FIA). Blood samples were already prepared, stored but still unprocessed. Absolute DNA content was gained by measuring of IOD (integrated optical density) of erythrocyte nuclei.

In this experiment, 20 individuals were consequently analysed from each group/population. These individuals were not identical and not tested by both methods at the same time. Therefore, it is possible that more ploidy levels were detected by FCM method than by FIA method and vice versa.

Based on the obtained results, it can be said that the use of these cytometric methods to distinguish interspecific hybrids from clear sturgeons species only based on measurement of DNA content is complicated. Due to statistical analysis, a significant difference ( $p < 0,05$ ) was found only between DNA contents corresponding to different ploidy levels. It means, that groups with interspecific hybrids or group with pure species with the same or very similar DNA content corresponding the same ploidy level were not statistically different ( $p > 0,05$ ) from each other, and it does not matter which cytometric method was used. The crucial factor will be probably spontaneous polyploidy or interspecific hybridization.

Between methods, not any statistically significant difference ( $p > 0,05$ ) was found. Therefore, on the one hand, the hypothesis of underestimating the results measured by the FCM method with the fluorescent dye DAPI and the subsequent recalculation

can be to some extent rejected. On the other hand, if the FCM – DAPI method can be preferred to the more time-consuming FIA method for measuring DNA content in practice, further investigation is required. It is recommended to provide similar experiment again. Also flow cytometry with fluorescent dye propidium iodide (PI) will be applied because with this method is possible to measure directly absolute DNA content, and finally compare these three methods by statistical analysis.

Key words: sterlet, interspecific hybrid, functional ploidy, relative DNA content, absolute DNA content, flow cytometry, image cytometry, propidium iodide (PI), 4,6-diamidin-2-phenylin-dole (DAPI), Feulgen reaction