



Česká zemědělská univerzita v Praze

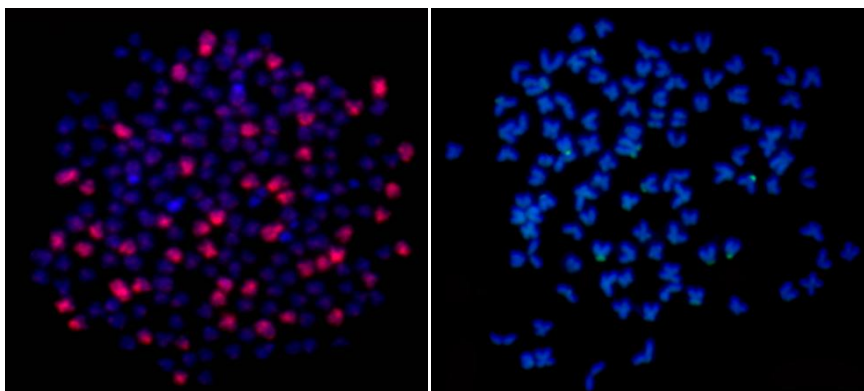
**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**



ČESKÁ
ZEMĚDĚLSKÁ
UNIVERZITA V PRAZE

Katedra zoologie a rybářství

Cytogenetika evropských zástupců rodu karas (*Carassius* Nilsson, 1832): analýza jedinců s různou ploidní úrovní



doktorská disertační práce
(soubor vědeckých prací s komentářem)



Autor: **Ing. Martin Knytl**

Školitel: **doc. Ing. Lukáš Kalous, Ph.D.**

Praha 2013

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou disertační práci "Cytogenetika evropských zástupců rodu karas (*Carassius* Nilsson, 1832): analýza jedinců s různou ploidní úrovní" jsem vypracoval samostatně pod vedením doc. Ing. Lukáše Kalouse Ph.D. a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené disertační práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.11.13

Poděkování

Považuji za milou povinnost na tomto místě poděkovat všem, kteří se jakýmkoli způsobem podíleli na zpracování této práce. Především bych chtěl poděkovat Lukášovi Kalousovi za vedení disertační práce, za cenné odpovědi na neustále kladené otázky, za čas, který mi věnoval a za trpělivou spolupráci na odborných článcích. Lukáš mě díky jeho profesionálnímu přístupu dokázal namířit správným směrem, za což mu jsem nesmírně vděčný. Další obrovský dík patří Petrovi Rábovi za poskytnutí spolupráce v Laboratoři genetiky ryb v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v. v. i., v Liběchově, jsem mu také vděčný za trpělivou spolupráci a korekturu našich odborných článků. Jeho cenné rady a nápady mi byly po celou dobu studia k dispozici. Za odbornou pomoc při zasvěcení do nových laboratorních technik děkuji Radce Symonové a Martinovi Flajšhansovi. V laboratoři mi také velmi pomohli: Zuzana Opoldusová, Marie Doležálková, Alexandr Sember, Kateřina Rylková, Zuzana Majtanová, Eva Kašparová, Jana Čechová, Šárka Pelikánová a Dmytro Bytyutskyy. Za pomoc při sestavování karyotypu děkuji Marii Rábové a Martině Pokorné. Za cenné vzorky děkuji Tomášovi Daňkovi, Jörgovi Bohlenovi a Štěpánovi Romočuskému. Můj dík zaslouží v neposlední řadě i Iva Langrová, Miloslav Petrtýl, Oldřich Kopecký a Luboš Brzobohatý, kteří mi byli ochotni pomoci se záležitostmi spojenými s touto prací. Za psychickou podporu děkuji svým rodičům. Velkou psychickou podporou pro mě také byla a stále je Zuzana Opoldusová, která mi svým trpělivým a ochotným přístupem napomohla k finalizaci disertační práce.

Obsah

1	Úvod	1
2	Seznam použitých termínů a zkratk	3
2.1	Slovníček pojmů	4
2.2	Zkratky rodových a druhových jmen	6
2.3	Použité zkratky	6
3	Přehled o současném stavu problematiky	8
3.1	Systematika rodu <i>Carassius</i>	8
3.2	Původ a rozšíření rodu <i>Carassius</i>	9
3.3	Reprodukční biologie	11
3.3.1	Asexuální rozmnožování	11
3.3.2	Hybridizace	16
3.4	Cytogenetika rodu <i>Carassius</i>	18
4	Vědecké hypotézy a cíle práce	23
5	Zvolené metody zpracování	24
5.1	Chromozómové analýzy	24
5.1.1	Přímá preparace chromozómů z ledvin	24
5.1.2	Preparace chromozómů z regenerátů ploutevní tkáně	24
5.2	Barvení chromozómů	24
5.2.1	Konvenční	24
5.2.2	Diferenciální	24
5.3	Genomická <i>in situ</i> hybridizace (GISH)	24
5.4	Mikroskopování a analýza karyotypu	25
6	Přehled prací zařazených do disertační práce	26
7	Výsledky a diskuse	27
8	Závěry a doporučení pro využití poznatků v praxi	34
9	Seznam odborné literatury	35
10	Přílohy	57
10.1	Příloha I	57
10.2	Příloha II	65
10.3	Příloha III	74
10.4	Příloha IV	86
10.5	Příloha V	96
10.6	Příloha VI	102

1 Úvod

Rod *Carassius* (Nilsson, 1832) je společně s rody *Cyprinus*, *Procypris* a *Carassioides* taxonomicky řazen do malého monofyletického paleotetraploidního kladu *Cyprinini sensu stricto* (Yang et al., 2010), podčeledě *Cyprininae*, čeledě *Cyprinidae* (Nelson, 2006). Do tohoto rodu patří jedenáct zástupců, kteří obývají převážně Palearktickou oblast, jejichž největší druhová diverzita je ve východní Asii. Největší zvláštností je jejich způsob rozmnožování. Jednak jsou karasi schopni rozmnožovat se pohlavně, s náhodnou segregací homologních chromozómů do gamet během meiózy a syngamií pohlavních buněk zajišťující velkou genetickou variabilitu a jednak jsou karasi schopni rozmnožovat se nepohlavně – gynogeneticky. Gynogenezi, neboli na spermii vzniklou partenogenezi, jejímž produktem je za normálních podmínek klonální potomstvo, u obratlovců poprvé prokázali Hubbs et Hubbs (1932). Znalosti o nepohlavním způsobu rozmnožování byly do té doby široce prostudovány a dobře známy například u rostlin nebo hmyzu. Představa, že jsou „dokonalejší“ formy života, jako jsou obratlovci, schopny rozmnožovat se určitou formou partenogeneze, vedla téměř okamžitě ke zpochybnění tohoto objevu (Howell 1932). Množství důkazů, že se jedná o jeden z nejpodivuhodnějších systémů rozmnožování obratlovců, jako je na spermii závislá partenogeneze, postupem času narůstalo a v roce 2011 bylo známo více než 80 komplexů obratlovců, které jsou schopny partenogeneze včetně jejich variant (Neaves et Baumann, 2011).

Nástroj, který přispívá k lepšímu porozumění druhově nejrozsáhlejší skupině obratlovců, rybí biodiverzité, je cytogenetika (Ráb et al., 2007). Cytogenetika ryb hraje klíčovou roli vedoucí k objasnění funkce pozoruhodných systémů, jako jsou například způsoby reprodukce asexuálních komplexů, pohlavně se množící samci rodu *Carassius*, různě ploidní a hybridní diverzita ryb, hybridizační procesy, evoluční procesy v rámci fylogenetické skupiny či taxonomický status. Cytogenetická metodologie je založena na preparaci chromozómů z živých, mitoticky aktivních buněk. Buněčné dělení je inhibováno pomocí mitostatických jedů ve stadiu metafáze buněčného dělení, kdy je DNA plně zreplikovaná. Fixované, konvenčně obarvené chromozómy nanesené na sklíčka bývají následně studovány pomocí mikroskopu a příslušného softwaru. Kvalitní metafázní chromozómy mohou být použity na diferenciální barvicí techniky nebo na nadstandardní molekulárně cytogenetické procedury, jako jsou například fluorescenční *in situ* hybridizace s různými typy sond.

Ve srovnání se savci včetně člověka mají některé druhy ryb velké množství malých chromozómů, jejichž buněčná aktivita je limitována sezónními cykly (v zimním období některé ryby vykazují velice nízkou pohybovou aktivitu a zpravidla nepřijímají potravu a mají tedy malou dělicí aktivitu buněk). Z tohoto důvodu se cytogenetika ryb jeví jako dosti náročná a poměrně málo laboratoří, zaměřených na výzkum ryb, využívá jako nástroj také cytogenetiku (Ráb et al., 2007).

Tato práce se zabývá cytogenetikou karase stříbřitého (*Carassius gibelio*, Bloch, 1782) a karase obecného (*C. carassius* Linnaeus, 1758). Na základě některých vlastností lze oba dva druhové taxony odlišit za použití různých znaků, včetně cytogenetických. Mezidruhová hybridizace, cytogenetickými márkry detekovatelná, je dobře známá u kaprovitých ryb. Dokazují to například hybridní komplexy jelců *Squalius „alburnoides“* Steindachner, 1866 (druhové jméno pochází z doby před objevem jejich hybridního charakteru) v jižní části Iberského poloostrova vzniklý poměrně starou hybridizací druhů jelců *S. pyrenaicus* (Günther, 1868) nebo (v jiné části areálu) *S. carolitertii* (Doadrio, 1988) s dnes již vymřelým druhem rodu *Anaocypris* (Collares-Pereira, 1983) nebo hybridní komplex střevlí rodu *Chrosomus* (Rafinesque, 1820) vyskytující se ve východní části Severní Ameriky. Podobně také u karasů, vzhledem k jejich blízké příbuznosti, dochází k časté hybridizaci (Ohara et al., 2000; Hänfling et al., 2005; Wouters et al., 2012; Knytl et al., 2013) a cytogeneticky lze zjistit například přesný poměr rodičovských genomů v hybridním genomu. Není jasné, jestli tyto gynogenetické biotypy vznikly mezidruhovou hybridizací nebo uvnitř jednoho jedince a které druhy / biotypy jsou parentální.

Touto disertační prací jsem se pokusil přispět k bližší cytogenetické charakterizaci karase stříbřitého a karase obecného.

2 Seznam použitých termínů a zkratek

Rod *Carassius* Nilsson, 1832 představuje obtížnou skupinu s dosud nejasnou systematikou a tomu odpovídající taxonomií (Kalous et al. 2012), kde navíc se kombinuje sexuální a asexuální rozmnožování, považuji proto za nutné přiřadit formálně platná latinská jména českým jménům a vysvětlit pojmy které budou v následujícím textu použity.

Latinské jméno *Carassius carassius* (CCA) Linnaeus, 1758 je v této práci přiřazeno názvu karas obecný. Jméno *Carassius gibelio* (CGI), Bloch, 1782 je přiřazeno názvu karas stříbřitý. Latinské jméno *Carassius auratus* (CAU) Linnaeus, 1758 je přiřazeno termínu karas zlatý neboli „zlaté rybce“. Název karas ginbuna je použit pro *Carassius langsdorfii* (CLA) Temminck et Schlegel, 1846 a karas gengorobuna pro *Carassius cuvieri* (CCU) Temminck et Schlegel, 1846. Označování ostatních japonských endemitů je v této práci ekvivalentní s nomenklaturou Hosoya (2000), ovšem bez druhového označení „*auratus*“. Karas nigorobuna je označován jako *Carassius grandoculis* (CGR) Temminck et Schlegel, 1846, karas okinbuna jako *Carassius buergeri* (CBU) Temminck et Schlegel, 1846, karas nagabuna jako *Carassius* sp. 1 a karas kinbuna jako *Carassius* sp. 2. Pokud budou jednotlivá jména v původní literatuře odlišná (například Hosoya (2000) vs. Nakamura (1982)), považuji za směrodatné formálně platné latinské pojmenování.

Některé termíny uvedené v této práci mohou být definovány různými způsoby z různých hledisek, proto je zde uveden slovníček pojmů, který poskytuje definice použité v této práci. Takto definované termíny jsou v textu zvýrazněny jiným stylem a velkými písmeny.

2.1 Slovníček pojmů

ALLOPOLYPLOID – ALLOPOLYPLOIDNÍ BIOTYP, jehož genomy jsou složeny z více druhových genomů následkem mezidruhové hybridizace.

APOMIXIE – způsob nepohlavního rozmnožování rostlin, kdy jsou nově vzniklá semena geneticky identická s „matkou“. Uplatňuje především v rostlinné genetice kapradorostů a jiných semenných rostlin. Ve starší literatuře je termín APOMIXIE uváděn v souvislosti s gametogenezí asexuálních obratlovců (Dawley, 1989), kteří se množí partenogeneticky či gynogeneticky a udržují si stupeň somatické ploidie v gametách.

AUTOPOLYPLOID – AUTOPOLYPLOIDNÍ BIOTYP, u něhož nastala polyploidizace (tzv. AUTOPOLYPLOIDIZACE) působením vnitřních biologických procesů, nebo vnějších fyzikálních či chemických faktorů, obsahuje násobné genomy stejného druhového původu.

BIOTYP – různě ploidní a různým způsobem se rozmnožující karasi, které lze na základě sekvenčních dat zařadit do jednotlivých mitochondriálních TAXONŮ. Každému BIOTYPU odpovídá určitá ploidní úroveň. Dělí se na diploidní nesoucí dvě kopie haploidního genomu a polyploidní nesoucí více jak dva haploidní genomy – triploidní BIOTYPY obsahují tři haploidní genomy, tetraploidní čtyři, pentaploidní pět atd.

DRUH – soubor populací se stejným vývojovým původem a historií (fylogenetické hledisko) zahrnující ryby odpovídající morfologií a jsou reprodukčně izolovány od ostatních DRUHŮ.

DRUHOVÝ TAXON – náhrada druhového jména, které je v této práci přiřazeno k samostatné mitochondriální linii rodu *Carassius*, zahrnující ryby odpovídající morfologií původního popisu TAXONU, pokud je takový popis k dispozici.

KOMPLEX – skupina blízce příbuzných TAXONŮ, všech jejich BIOTYPŮ, vzájemných hybridů i doposud nespecifikovaných genotypů, které jsou k nim vzhledem k podobné morfologii řazeny.

PREMEIOTICKÁ ENDOREPLIKACE (= PREMEOTICKÁ ENDOMITÓZA) – způsob gametogeneze u asexuálních obratlovců. Ještě před meiózou, ve stádiu rané oogeneze, když se oogonie mitoticky dělí, dojde k replikaci DNA a buňka nepodlehne cytokinezi ani karyokinezi. V meióze I se párují sesterské chromozómy (ne homologní) a probíhá rekombinace mezi geneticky identickými, sesterskými chromatidami. Potom následují obě meiotická dělení (v prvním dělení dochází k segregaci sesterských chromozómů) a výsledkem jsou geneticky identické pohlavní buňky o stejné ploidii, jako buňky somatické.

2.2 Zkratky rodových a druhových jmen

CCA	<i>Carassius carassius</i>
CGI	<i>Carassius gibelio</i>
CAU	<i>Carassius auratus</i>
CLA	<i>Carassius langsdorfii</i>
CCU	<i>Carassius cuvieri</i>
CBU	<i>Carassius buergeri</i>
CGR	<i>Carassius grandoculis</i>
CCY	<i>Cyprinus carpio</i>

2.3 Použité zkratky

1,5n	1,5 ploidní
1,6n	1,6 ploidní
2n	diploidní
3n	triploidní
4n	tetraploidní
a	akrocentrický chromozóm
Ba (OH) ₂	hydroxid barnatý
CGH	comparative genomic hybridization – komparativní genomová hybridizace
CoCl ₂	chlorid kobaltnatý (kobalt chlorid)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol – fluorescenční barvivo, které se pevně váže na AT bohaté oblasti v DNA

DNA	deoxyribonukleová kyselina
F1	první filiální generace
FISH	fluorescent <i>in situ</i> hybridization – fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GISH	genomic <i>in situ</i> hybridization – genomová <i>in situ</i> hybridizace
m	metacentrický chromozóm
NOR	nucleolus organizer region – organizátor jadérka
RAPD	random amplification of polymorphic DNA – polymorfismus délky restrikčních fragmentů
sm	submetacentrický chromozóm
st	subtelocentrický chromozóm
t	telocentrický chromozóm

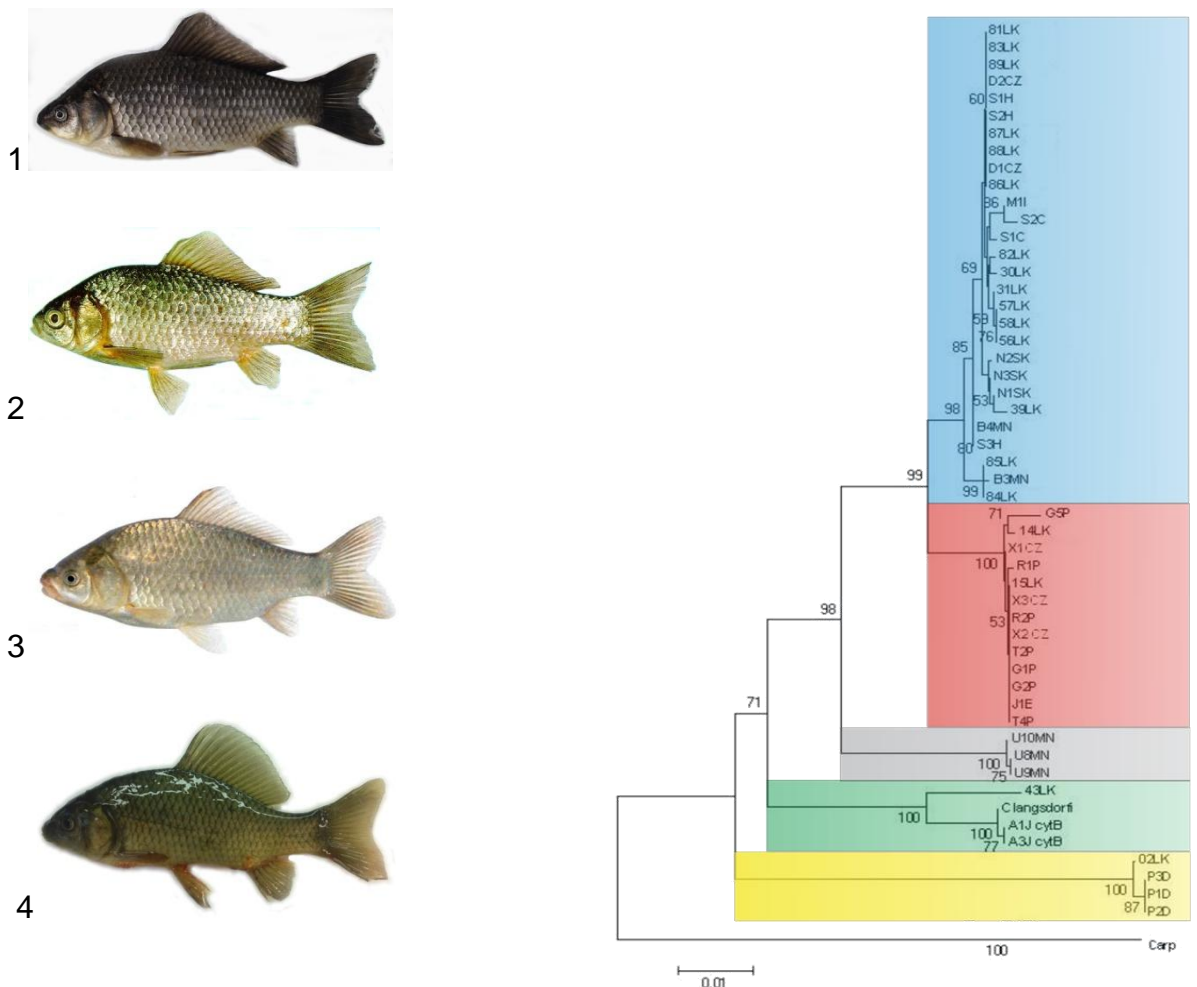
3 Přehled o současném stavu problematiky

3.1 Systematika rodu *Carassius*

Taxonomie rodu *Carassius* rozeznává dva přístupy: starší taxonomická konstrukce, kdy jsou zástupci rodu *Carassius* rozlišováni jako poddruhy KOMPLEXU *Carassius auratus* (například označení *C. auratus gibelio* (Baruš et Oliva, 1995)). Zastánci novější taxonomické konstrukce rozdělují karase na úrovni samostatných DRUHOVÝCH TAXONŮ (například označení *C. gibelio* (Kottelat, 1997; Kalous et al., 2004)).

C. carassius (CCA) je považován za samostatný DRUH, na kterém se autoři shodují (například Makino, 1939; Baruš et Oliva, 1995; Kottelat et Freyhof, 2007; Papoušek et al., 2008; Tarkan et al., 2009; Apalikova et al., 2011). *C. auratus* (CAU), *C. gibelio* (CGI), *C. langsdorfii* (CLA), *C. cuvieri* (CCU), *C. buergeri* (CBU) a *C. grandoculis* (CGR) byli považováni za poddruhy spadající do KOMPLEXU *C. auratus* a byli označováni latinskými jmény *C. auratus auratus*, *C. auratus gibelio*, *C. auratus langsdorfii*, *C. auratus cuvieri*, *C. auratus buergeri* a *C. auratus grandoculis* (Hensel, 1971; Ueda et Ojima, 1978; Ojima et Yamano, 1980; Nakamura, 1982; Baruš et Oliva, 1995; Luo et al., 1999; Iguchi et al., 2003). Dokonce některé novodobější studie je stále uznávají jako poddruhy KOMPLEXU *C. auratus* (Takada et al., 2010; Apalikova et al., 2011).

Kalous et al. (2004) ve své práci na základě dat získaných ze sekvence genu cytochrom *b* oddělili jednotlivé mitochondriální linie v Evropě se vyskytujícími populacemi CCA, CAU, CGI na úrovni DRUHOVÝCH TAXONŮ. Stejnou problematikou se také zabývali Rylková et al. (2010), kteří podle získaných dat mtDNA rozlišují eurasijské DRUHOVÉ TAXONY CCA, CAU, CGI, CLA a CCU. V následující studii Rylková et al. (2013) našli ještě jednu mitochondriální linii rodu karas v Mongolsku (*C. „M“* sp. 3). CCU byl i na základě morfologických odlišností oddělen od zmíněných poddruhů *C. auratus* KOMPLEXU žijících v Japonsku a je považován za samostatný DRUH (Hosoya, 2000; Murakami et al., 2001).



Kalous et al. (2007)

Obrázek 1: Fylogenetický strom sestavený na základě analýzy sekvence mitochondriálního genu cytochrom *b*. Každá barva znázorňuje jednu mitochondriální linii rodu *Carassius*. Modrá barva představuje mitochondriální linii CGI (1), červená barva představuje mitochondriální linii CAU (2), zelená barva představuje mitochondriální linii CLA (3) a žlutá mitochondriální linii CCA (4). Mitochondriálním liniím je pak přiřazen DRUHOVÝ TAXON, který morfologicky odpovídá původnímu popisu. V rámci jednotlivých DRUHOVÝCH TAXONŮ se vyskytují BIOTYPY určité ploidní úrovně. Skupiny příbuzných mitochondriálních linií, TAXONŮ a BIOTYPŮ vytváří KOMPLEXY.

3.2 Původ a rozšíření rodu *Carassius*

CCA je pro Evropu původní DRUH a jeho výskyt se v ČR stále snižuje (Lusk et al., 2010). Někteří autoři ho považují za ohrožený DRUH nejen v České republice, v povodí Moravy a Odry dokonce kriticky ohrožený (Lusková et al., 2008), ale i v Anglii (Copp et al.,

2008; Sayer et al., 2011), Rakousku (Schiemer et Spindler, 2006) či Řecku (Economidis, 1995). Jedním z důvodů úbytku CCA může být neúspěšný konkurenční boj s CGI nebo s CAU (Tarkan et al., 2009; Sayer et al., 2011; Tarkan et al., 2012). Degradace habitatů optimálních pro život CCA, jako jsou hustě zarostlé tůně, slepá a mrtvá ramena nížinných řek, inundační oblasti, způsobená člověkem (kanalizace toků, protipovodňová opatření, likvidace habitatu v inundačních územích, intenzivní zemědělské využívání zátopových území) i přirozeným vysycháním, je jedním z nejdůležitějších faktorů mizení CCA z přírodních vodních ekosystémů (Copp, 1991; Wheeler, 2000; Lusková et al., 2008). CCA se vyskytuje ve dvou morfortypech: rychle rostoucí – prekociální a morfortyp zakrslý – altriciální (Balon, 2004).

Celosvětově rozšířený CAU pochází z Asie (Szczerbowski, 2002; Komiyama et al., 2009; Rylková et al., 2013), odkud byl a stále je dovážen jako domestikovaná okrasná zlatá ryбка či závojnátka. Poprvé byl do Evropy dovezen do Portugalska jako domestikovaná zlatá ryбка v 17. století, potom následovala Anglie a Francie. Kromě domestikovaných a divokých populací CAU existují také populace ferální, to jsou ty, které se z chovu rozšířily do přírodních vodních ekosystémů (Balon, 2004). Rylková et al. (2010) potvrdili formování monofyletické linie domestikovaných forem CAU z Evropy a Asie. Současný výskyt CAU ve volných vodách ČR je omezený a nikde netvoří stabilní populace (Baruš et Oliva 1995).

V padesátých letech dvacátého století (poprvé v roce 1954) byl CGI dovážen a experimentálně využíván v rybnících na území Maďarska (Szarvas) a následně unikl do řeky Kriš (Körös) a Dunaje. Jeho areál výskytu se rozšířil z Maďarska do dalších zemí Evropy (Rumunsko, Bulharsko, Jugoslávie, Slovensko, Česká republika). V Bulharsku byl nalezen poblíž města Varna kolem roku 1950. Dokonce před rokem 1950 byl pozorován v deltě Dunaje (Holčík et Žitňan, 1978). První dokumentovaný nesporný nález CGI na území současné České republiky (řeka Morava a Dyje) z roku 1976 pochází od Lusk et al. (1977). Následně, v poměrně krátkém časovém horizontu (jednotky let), expandoval do dalších říčních systémů ČR – povodí Labe a Odry (Lusk, 1986). Nejpravděpodobnější způsoby invaze CGI jsou migrační aktivity a antropogenní faktor (úmyslné vypouštění nebo jako příměs při transportu hospodářských DRUHŮ ryb (Lusk, 1986; Halačka et al., 2003)). Migracemi CGI se zabývali ve svých pokusech např. autoři Slavík et Bartoš (2004) na řece Labi a předpokládají, že únik jedinců z akvakulturních chovů je primárně

zodpovědný za expanzi CGI. Původně se předpokládalo, že původ CGI, který v průběhu několika posledních desetiletí osídlil vody téměř všech částí Evropy, zahrnuje řeku Amur a další sibiřská povodí (Lusk et al., 1977; Lusk et al., 1998; Luo et al., 1999). Kalous et al. (2012) objevili za použití mitochondriálního genu pro cytochrom *b* dvě odlišné, a navíc nesesterské mitochondriální linie CGI. Jedna linie zahrnuje euroasijské jedince včetně východního Mongolska, druhá zahrnuje jedince ze západního Mongolska. CGI tedy nevytváří linie monofyletické. Diploidního CGI označili jako pro Evropu původního a byl designován jeho neotyp jako řešení nomenklatorické nejasnosti a použitelnosti jména *gibelio*. Neotyp byl přiřazen k Blochovu jménu *C. gibelio* (Kalous et al., 2012).

Výskyt CLA, CCU, CGR, CBU, *C. sp. 1* a *C. sp. 2* je potvrzen převážně v Japonsku, kde jsou považováni za nejběžnější ryby rybníků, jezer a vodních toků, odkud pravděpodobně i pocházejí (Hosoya, 2000). CCU se vyskytuje jako endemité DRUH v největším japonském jezeře Biwa (Iguchi et al., 2003). Zatím jediný z těchto „japonských karasů“, CLA byl nalezen v Evropě – v Bosně a Hercegovině, Německu, Řecku, Itálii i na Ukrajině (Kalous et al., 2013; Rylková et al., 2013) a v České republice na řece Chrudimka v povodí Labe (Kalous et al., 2007) a později také v jižních Čechách nedaleko Litvínovic (Rylková et al., 2013).

C. argenteaphthalmus byl popsán z oblasti v severním Vietnamu (Nguyen et Ngo, 2001), ale popis je tak nejasný, že není možné považovat ho za samostatný DRUH, či jej synonymizovat s některým z asijských karasů.

3.3 Reprodukční biologie

V přírodě existují dva základní typy reprodukce, pohlavní (syn. sexuální, bisexuální, gonochoristický) a různé typy nepohlavního (syn. asexuálního, nesexuálního, unisexuálního). S pohlavním i nepohlavním způsobem rozmnožování se můžeme setkat jak u rostlin či bezobratlých živočichů, tak i u studenokrevných obratlovců, jako jsou obojživelníci, plazi a ryby (Dawley, 1989; Vrijenhoek, 1989; 1998; Zhou et al., 2000b; Stöck et al., 2002; Schlupp, 2005; Neaves et Baumann, 2011).

3.3.1 Asexuální rozmnožování

V současnosti je známo více než 80 asexuálně se množících KOMPLEXŮ ryb, obojživelníků a plazů (Alves et al., 2001; Neaves et Baumann, 2011). Více než polovina

asexuálních obratlovců je polyploidních a většina je považována za přechodné stadium při tvorbě nového DRUHU, kde selekce může vybrat různé genové kombinace mezi stávajícími genomy, které do „tvorby“ nového DRUHU vstupují (Alves et al., 2001). Asexualita a polyploidie tedy spolu úzce souvisí a jsou spojovány s mezidruhovou hybridizací (Schultz, 1980; Beukeboom et Vrijenhoek, 1998; Choleva et al., 2012). Polyploidie může být definovaná různými způsoby a z hlediska cytogenetiky je v podstatě homonymem označujícím dvě různé věci – biologická a evoluční polyploidie. Meióza zahrnující dvě po sobě jdoucí jaderná dělení, jejímž výsledkem jsou haploidní gamety a mechanismus pohlavního rozmnožování za normálních okolností zachovávají stejnou úroveň ploidního stupně. Jinými slovy diploidní organizmy, u kterých se opakují diploidní / haploidní cykly (produkují haploidní pohlavní buňky a oplození opět navodí diploidní stav), jsou biologicky diploidní bez ohledu na počet chromozómů a množství DNA v jádře. Pokud dojde k multiplikaci (znásobení) chromozómové sady vlivem abiotických či biotických faktorů (mezidruhová hybridizace, mutace, teplotní změny, přestárnutí gamet), změny v genomu mohou být evolučně fixovány a takováto polyploidizační událost vede ke vzniku evolučně polyploidních TAXONŮ, přestože byly v minulosti biologicky diploidní (Flajšhans et al., 2013). Polyploidie tak může být následek mezidruhové hybridizace rodičovských DRUHŮ (množících se pohlavně), která vyvolává klonální dědičnost a asexuální způsob rozmnožování. Jinými slovy evoluční cesta asexuálních BIOTYPŮ křížících se s rodičovskými DRUHY probíhá od sexuality ke klonalitě a polyploidii (Choleva et al., 2012).

První objev nepohlavní reprodukce u obratlovců zaznamenali Hubbs et Hubbs (1932) v první polovině 20. století. Modelem byla živorodka křížená (*Poecilia formosa* Girard, 1859) přezdívaná jako „Amazonská Molly“ pocházející ze severovýchodního Mexika. Kromě zmíněné živorodky rodu *Poecilia* Bloch et Schneider, 1801 jsou známé hybridní asexuální KOMPLEXY ryb například rodu *Poeciliopsis* Regan, 1913, *Fundulus* Lacépède, 1803, *Carassius*, *Cobitis* Linnaeus, 1758, *Chrosomus* Rafinesque, 1820, *Squalius* Bonaparte, 1837 (Vrijenhoek et al., 1989; Beukeboom et Vrijenhoek, 1998; Alves et al., 2001; Ráb et al., 2007; Lamatsch et Stöck, 2009). Tyto asexuální KOMPLEXY mají společné to, že dochází k mezidruhové hybridizaci rodičovských DRUHŮ a nově vzniklí hybridi, kteří se mohou dále křížit s rodičovskými DRUHY (introgresivní hybridizace), se vyznačují určitou formou asexuálního rozmnožování (Lamatsch et Stöck., 2009).

Jsou známy čtyři základní formy rozmnožování asexuálních BIOTYPŮ: partenogeneze, hybridogeneze, kleptogeneze a gynogeneze (Obrázek 2).

Při partenogenetickém způsobu rozmnožování vzniká geneticky identické klonální potomstvo a není zapotřebí samčího pohlavního materiálu (Sinclair et al., 2009). Partenogeneze může probíhat dvěma způsoby: ameioticky (funkčně apomikticky) a meioticky. V případě funkčně apomiktické partenogeneze je zabráněno rekombinačním procesům a dochází k přenosu celých neporušených diploidních nebo polyploidních genomů samic do jejich vlastních vajíček. Při meiotické partenogenezi nastává meiotické dělení a diploidní stav je znovu obnoven splynutím haploidního vajíčka s polárním tělískem jiného vajíčka. Obě vajíčka mohou být geneticky identická (Vrijenhoek, 1998). Za určitých okolností může nastat PREMEIOTICKÁ ENDOREPLIKACE nebo fúze oogonií a meióza také probíhá (Dawley, 1989; Neaves et Baumann, 2011). Mezi partenogeneticky se množící obratlovce patří například ještěrky rodu *Cnemidophorus* Wagler, 1830 nebo *Darewskia* Arribas, 1999 (Dawley, 1989; Neaves et Baumann, 2011).

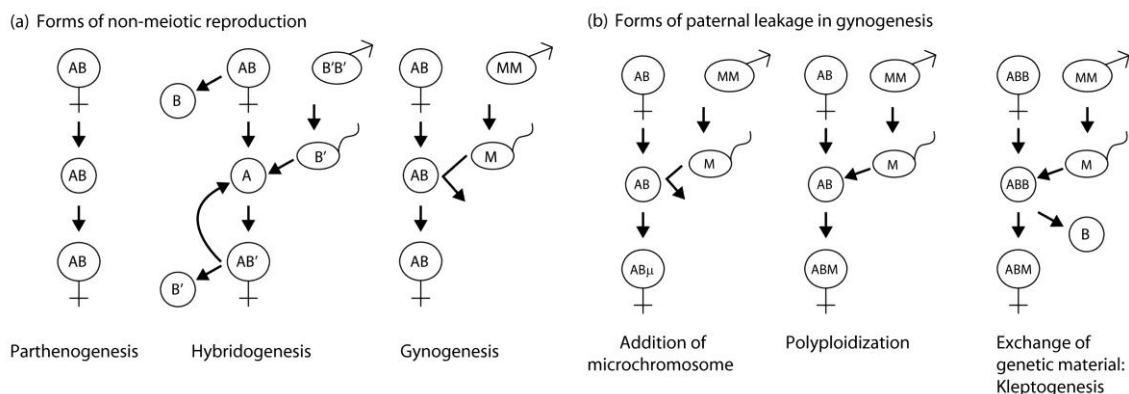
Hybridogeneze se vyznačuje určitými rysy pohlavního rozmnožování. U diploidních hybridogenů je genom jednoho rodičovského DRUHU klonálně přenesen do vajíčka. Genom druhého rodičovského DRUHU je inaktivován v rané oogenezi, když se zárodečné buňky (oogonie) mitoticky dělí (premeotická mitóza). Mikrotubuly tzv. unipolárního dělicího vřeténka se vážou na maternální chromozómy a paternální chromozómy zůstanou ležet na periférii cytoplazmy oogonie, kde jsou později resorbovány. Následně může a nemusí dojít k replikaci DNA. V meióze buď nedochází k rekombinačním procesům ani k náhodné segregaci chromozómů do gamet, nebo dochází (dojde-li k replikaci) k výměně geneticky identické DNA a následné segregaci sesterských chromozómů (Dawley, 1989). Haploidní vajíčko je potom oplozeno spermií druhého rodičovského DRUHU a hybridní stav je obnoven. Mateřský genom bývá předán klonálně a otcovský sexuálně. Vzniká potomstvo s hemiklonální dědičností (Dawley, 1989; Vrijenhoek, 1998; Neaves et Baumann, 2011). Různé ploidní úrovně způsobují různé varianty hybridogeneze. Diploidní hybridogeni jsou schopni produkovat haploidní i diploidní vajíčka (diploidní, když dojde k PREMEIOTICKÉ ENDOREPLIKACI nebo k fúzi oogonií). Po oplození tedy mohou vznikat jak diploidní, tak i triploidní BIOTYPY (Dawley, 1989). V případě meiotické hybridogeneze u triploidního hybridogena je jedna chromozómová sada eliminována v rané oogenezi a zbývající dvě chromozómové sady podléhají následné meióze. Dochází nejprve ke snížení ploidní

úrovně a po oplození opět ke zvýšení. Příkladem hybridogenetických obratlovců jsou živorodky rodu *Poeciliopsis* nebo jelci rodu *Squalius* (Lamatsch et Stöck, 2009).

Kleptogenetický způsob rozmnožování byl poprvé objeven u endemicky se vyskytujících, severoamerických, unisexuálních mloků *Ambystoma barbouri*, jejichž genom je složený ze dvou až čtyř haploidních genomů pohlavně se množících mloků rodu *Ambystoma*. Tito hybridy jsou výsledkem genomového „swappingu“ unisexuálů a jsou schopni „ukrást“ spermie sympatrických bisexuálních dárců v podobě spermatoforu (Bogart et al, 2007). Genetická informace bisexuálních dárců spermatu může a nemusí být zakomponována do genetické výbavy nově vzniklého potomstva. Ještě o rok dříve Bi et Bogart (2006) vyvrátili hypotézu klonální dědičnosti a detekovali rekombinace homologních chromozómů u populací těchto mloků. Homologní chromozómy dědí po dvojicích od jednoho rodiče, které jsou zároveň i homologní k chromozómům ancestrálních DRUHŮ. Mezidruhová hybridizace podporuje tetrasomickou dědičnost (čtyři chromozómy při meióze), tím pádem mohou způsobit (allo)polyploidizaci. Obrázek 2b znázorňuje kleptogenezi formou výměny samčího genetického materiálu za část samčího genetického materiálu.

Gynogeneze neboli na spermii závislá partenogeneze je častý způsob reprodukce polyploidních i diploidních BIOTYPŮ ryb (Peňáz et al., 1979; Arai et al., 1993; Yamashita et al., 1993; Goddard et al., 1998; Tóth et al., 2005; Itono et al., 2007; Ráb et al., 2007; Lamatsch et Stöck, 2009; Choleva et al., 2012), ve kterém allospecifická spermie samců příbuzných DRUHŮ spouští vývoj vajíček, ale samčí genom se za normálních podmínek nepodílí na genetické výbavě potomka. Vzniká tedy klonální potomstvo (Beukeboom et Vrijenhoek, 1998; Schlupp, 2005; Lamatsch et Stöck, 2009). Nedochozí k oplození vajíčka spermii ani k rekombinačním procesům (Lampert et Scharl, 2010). Příkladem gynogenetických BIOTYPŮ je živorodka křížená (Lampert et Scharl, 2008) a asexuální KOMPLEXY rodů *Carassius*, *Cobitis*, *Chrosomus* či *Fundulus* (Lamatsch et Stöck, 2009).

Obrázek 2: a) Schematické znázornění asexuálních způsobů reprodukce (partenogeneze, hybridogeneze, gynogeneze); b) schematické znázornění možností inkorporace otcovského genomu (adice mikrochromozómů, polyploidizace, výměna genetického materiálu formou kleptogeneze). Odlišné písmenné kódy označují odlišné DRUHY (A, B, M), horní indexy odlišují genomy odvozené od rekombinací (B'), dolní index signalizuje malou část samčího genetického materiálu přenesenou do potomstva vzniklou fúzí mikronukleí. Podobná schémata byla publikována a modifikována více autory, například Dawley (1989); Lamatsch et Stöck (2009); Choleva et al. (2012).



Lampert et Scharl (2010)

Během meiózy I při gynogenezi dochází ke vzniku tripolárního dělicího vřeténka, přičemž první pólové tělíčko není vyděleno. Místo prvního zracího, redukčního, meiotického dělení se oocyt dělí jako obyčejná somatická buňka (Yamashita et al., 1993; Xie et al. 2001), též mitoticky nebo apomikticky (na stejném principu jako APOMIXIE). APOMIXIE je nejobvyklejší cesta pro vyloučení genetické rekombinace a udržení somatické ploidie v gametách (Schlupp, 2005). V meióze II už k cytokinezi ani karyokinezi nedochází. U některých gynogenetických organismů může nastat, místo APOMIXIE, PREMEIOTICKÁ ENDOREPLIKACE (Dawley, 1989). Ovšem meióza II může být dokončena jedině v případě oplození či penetrace spermie k vajíčku (Yamashita et al., 1993; Beukeboom et Vrijenhoek, 1998).

Jediným zdrojem genetických změn při APOMIXII, PREMEIOTICKÉ ENDOREPLIKACI a partenogenezi jsou mutace. Procesy crossing-over, náhodná segregace homologních chromozómů do gamet a splynutí prvojader při oplození jsou potlačeny (Dawley, 1989).

DRUHY, které jsou schopné nastartovat gynogenetický vývoj polyploidních BIOTYPŮ CGI jsou například z čeledi kaprovitých (Cyprinidae), kam patří parma obecná, *Barbus barbus* Linnaeus, 1758; jelec tloušť, *Squalius cephalus* Linnaeus, 1758; cejn velký, *Abramis brama* Linnaeus, 1758; CCA (Peňáz et al., 1979); kapr obecný (CCY), *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (Halačka et al., 2003; Tóth et al., 2005); CAU (Tóth et al., 2005); cejnovec čínský, *Megalobrama amblycephala* Yih, 1955 (Yi et al., 2003).

I přesto, že by spermie příbuzných DRUHŮ, aktivující vajíčko a embryonální vývoj při gynogenezi, neměla předat svoji genetickou informaci další generaci, bylo zjištěno, že gynogenetické potomstvo CGI často vykazuje fenotypy zřejmě odvozené z heterologního spermatu dárce. Tato forma gynogeneze, kdy je paternální DNA částečně inkorporována do genetické výbavy potomstva (Obrázek 2b) byla nazvána allogynogeneze (Yi et al., 2003) nebo také „paternal leakage“ (Lamatsch et Stöck, 2009). Může dojít k částečné inkorporaci otcovského genomu formou adice mikrochromozómů, výměně samčí DNA za samičí (kleptogeneze) nebo k přidáním kompletní chromozómové sady vedoucí k polyploidii (Lampert et Schartl, 2010). Zou et al. (2001); Zhao et al. (2004) zjistili otcovský vliv u gynogenetického potomstva v růstu a stupni plodnosti, ačkoliv byli potomci z morfologického hlediska téměř stejní jako matka. Zou et al. (2001) sledovali růstové ukazatele CGI. Měli k dispozici dvě sady jiker. První sada byla stimulována mlíčím CGI a druhá sada byla stimulována mlíčím CCY. Potomstvo pocházelo ze stejné samice. Autoři dospěli k závěru, že i když měly obě skupiny stejný maternální původ, potomstvo iniciované CCY rostlo rychleji. Další prokazatelný vliv otcovského genomu na potomstvo přináší práce autorů Zhao et al. (2004). Výsledky naznačují, že genom tetraploidního allogynogenetického CGI, který měl ve svém karyotypu 206 chromozómů, se skládá z celku maternální chromozómové sady a z celku haploidní paternální chromozómové sady. 156 chromozómů bylo maternálního původu pocházející z CGI a zbylých 50 pocházelo z haploidního počtu chromozómů spermie kapra ostrohřbetého (*Cyprinus acutidorsalis* Wang, 1979), kterým bylo „oplození“ jiker iniciováno.

3.3.2 Hybridizace

Mezidruhová hybridizace a produkce životaschopného hybridního potomstva je nyní již dobře známá u obratlovců (Dawley, 1989; Vrijenhoek, 1998; Neaves et Baumann, 2011; Choleva et al., 2012). Relativně vysoká frekvence mezidruhových hybridů ryb je způsobena převahou vnějšího oplození ve vodním prostředí. Navíc mnoho kaprovitých DRUHŮ využívá shodná třecí místa ve stejném čase a tím se pochopitelně zvyšuje i pravděpodobnost vzniku hybridů (Wheeler et Easton, 1978).

Přes obrovské rozdíly v typu asexuálního rozmnožování obratlovců, je v naprosté většině spojuje jejich hybridní původ. Vznikli tedy mezidruhovou hybridizací, avšak nedají se označit za normální mezidruhové hybridy (Dawley, 1989; Vrijenhoek, 1989; Alves et al., 2001; Lamatsch et Stöck, 2009). Typickým příkladem je živoroška křížená, vzniklá

mezidruhovým křížením živorodky širokoploutvé, *Poecilia latipinna* (Lesueur, 1821) a živorodky mexické, *Poecilia mexicana* (Steindachner, 1863). Živorodka křížená byla velmi krátce, po určení gynogenetického způsobu reprodukce, označena jako morfologicky intermediární mezi výše uvedenými DRUHY (Hubbs et Hubbs, 1932). Jméno *Poecilia monacha-lucida* (hybridogen živorodky hnědé, *Poecilia monacha* Miller, 1960 a živorodky lesklé, *Poecilia lucida* Miller, 1960) napovídá, ze kterých DRUHŮ tento hybridní TAXON vznikl. Partenogenetická ještěrka *Cnemidophorus tessellatus* Say, 1823 vznikla hybridizací *C. marmoratus* Baird et Girard, 1852 x *C. septemvittatus* Cope, 1892 (Dawley, 1989). V opačném případě Sinclair et al. (2009) ve svých pokusech na základě stupně heterozygotnosti potvrdili nezávislý nehybridní původ diploidních unisexuálních populací partenogenetických ještěrek *Lepidophyma reticulatum* Taylor, 1955 a *L. flavimaculatum* Duméril, 1851. Interpretace fylogenetických výsledků tedy dokazuje dva nezávislé původy unisexuality: hybridní i nehybridní. Jedna z možností vzniku speciální události je přítomnost partenogenetické mutace, která se následně zafixovala a uchovala v dalších generacích (Dawley, 1989).

Vlastnosti většiny hybridů jsou charakterizovány sníženou plodností, přežitelností a stabilitou vývoje, navíc jsou pod větším selekčním tlakem (vlivem přirozené selekce dochází k eliminaci méně zdatných jedinců a ke zvýšení celkové fitness a spontánnímu heteróznímu efektu asexuálních hybridů (Dawley, 1989; Vrijenhoek, 1989; 1998)). Důsledkem mezidruhové hybridizace je přerušení meiotického dělení při oogenezi (nedochází k prvnímu meiotickému dělení a nenastává crossing – over), způsobené gametogenetickým mechanismem. Gametogenetický mechanismus inhibuje rekombinaci a způsobuje klonální dědičnost. Kombinace dvou odlišných genomů rodičů vychyluje poměr pohlaví u hybridů směrem k samičímu pohlaví a hybridní samice produkují diploidní oocyty bez rekombinace (Dawley, 1989; Vrijenhoek 1989; Neaves et Baumann, 2011). Vznik neredukovaných vajíček může navodit následující ALLOPOLYPLOIDIZACI, za předpokladu, že byla spermie samce včleněna do oocytu samice. Může také docházet k ovlivňování vlivem mutací a k následné AUTOPOLYPLOIDIZACI (Comai, 2005). Poruchy vedoucí ke spontánní polyploidizaci mohou být evolučně fixovány a vést k vývoji TAXONŮ evolučně polyploidního původu (Ráb et Collares-Pereira, 2004; Choleva et Janko, 2013). Zmíněné poruchy a mechanismy jejich stimulace jsou podrobně studovány a je jich celosvětově užíváno k produkci sterilních rychle rostoucích nebo fertálních

polyploidních ryb pro potřeby sladkovodní a mořské akvakultury (Flajšhans et al., 2006; Piferrer et al., 2009).

V rámci rodu karas vznikají mezidruhová a dokonce i mezirodová kříženci a to jak u evropských populací (Stráňai, 2000; Hänfling et al., 2005; Tóth et al., 2005; Smartt, 2007; Papoušek et al., 2008; Mezhzherin et al., 2012; Knytl et al., 2013), tak i u populací asijských (Ohara et al., 2000; Liu et al., 2001; Zhu et Gui, 2007; Liu, 2010).

Baruš et Oliva (1995) uvádějí, že výskyt hybridů CGI a jiných DRUHŮ kaprovitých ryb je vzhledem k jeho gynogenetickému způsobu problematický a u monosexních populací nepřipadá v úvahu. Naopak uvádějí větší pravděpodobnosti výskytu kříženců CCA a CCY. Jejich tvrzení se však ukázalo jako nepřesné a nyní se v Evropě objevují mezidruhová kříženci CGI a CCA (Papoušek et al., 2008; Knytl et al., 2013). Hybridi CGI a CAU či CGI a CCY byli nalezeni například v Anglii (Wheeler, 2000; Hänfling et al., 2005), na Ukrajině (Mezhzherin et al., 2012) či ve Švédsku (Wouters et al., 2012). Na Slovensku nedaleko Nitry identifikoval Stráňai (2000) mezidruhového hybrida CGI a CCY na základě morfologických ukazatelů. Japonští endemité vytváří křížence CBU a CCU (Ohara et al., 2000).

V laboratorních podmínkách jsou karasi schopní vytvářet životaschopné hybridní potomstvo například CGI a cejnka malého, *Blicca bjoerkna* Linnaeus, 1758 (Flajšhans et al., 2004), CAU a CCA (Smartt, 2007) nebo CAU a CCY (Liu et al., 2001), CAU a cejnovce čínského (Liu, 2010). Kasama et Kobayasi (1990) uměle vytvořili hybrida CCA a hrouzenky protáhlé (*Gnathopogon elongatus* Temminck et Schlegel, 1846). Parentální CCA byl odchycen v Nizozemsku a parentální *G. elongatus* pocházela z japonského jezera Biwa. Stejní autoři Kasama et Kobayasi (1989) provedli úspěšně také hybridizační experiment CCA a amura bílého (*Ctenopharyngodon idella* Valenciennes, 1844).

3.4 Cytogenetika rodu *Carassius*

Cytogenetické studie karasů mají dlouhou historii (Makino, 1939). Od té doby byla shromážděna řada údajů o chromozómech CCI a CGI z různých oblastí Evropy. Jejich přehled podává Tabulka 1. Je zřejmé, že se vyskytují diploidní BIOTYPY ($2n = 50$; $2n = 100$), triploidní, jejichž počet chromozómů je variabilní ($3n \sim 141-166$), ale vyskytují se také BIOTYPY tetraploidní s variabilním počtem chromozómů ($4n \sim 200$) (Zhao et al.,

2004; Tóth et al., 2005; Boroń et al., 2011). Většina autorů, například Luo et al. (1999); Zhou et Gui (2002); Kalous (2005); Tóth et al. (2005); Knytl (2009); Boroń et al. (2011); Kalous et Knytl (2011) uvádí, že jsou počty chromozómů variabilní, obzvláště u polyploidních BIOTYPŮ. Přitom ale není dosud zcela jasné, zda se jedná o preparační artefakt nebo skutečnou variabilitu. Řada údajů, včetně našich, však svědčí pro druhou možnost. Byly publikovány i práce, kde byla odhalena karyotypová diverzita diploidních CGI $2n = 102$; $2n = 104$ (Fišter et Soldatović, 1991) nebo diploidních CCA $2n = 50$ (Raicu et al., 1981).

Cytogenetická diverzita karasů na území České Republiky je dána výskytem KOMPLEXU diploidních a gynogeneticky se množících polyploidních BIOTYPŮ CGI (Kalous et al., 2006), dále přítomností bisexuálních CCA, případně ferálních CAU (baruš et Oliva, 1995). Úroveň ploidie a zároveň převaha samic v populaci byla a je dobrým indikátorem výskytu triploidních samic CGI. Vzhledem k značně morfologické podobnosti karasů a všech jejich BIOTYPŮ, je proto úroveň ploidie považována za pomocný diagnostický znak při determinaci DRUHŮ karasů vyskytujících se v ČR. Například Szczerbowski (2002) považoval také počet chromozómů jako pomocný diagnostický znak k rozlišení diploidního CAU od triploidního CGI.

Shrnutím ploidních úrovní lze konstatovat, že výlučně diploidní (doposud nebyly objeveny polyploidní BIOTYPY) jsou CCA (Hafez et al., 1978; Baruš et Oliva, 1995) a CGR (Kobayasi et al., 1973; Ueda et Ojima, 1978). Naopak diploidně – polyploidní jsou CGI (Kalous et Knytl, 2011), CAU (Rylková et al., 2013), CLA, CBU (Kobayasi et al., 1973) a CCU (Muramoto, 1975).

Řada autorů pozorovala v karyotypech, genomech triploidních BIOTYPŮ (CGI z řeky Dyje, Česká republika (Peňáz et al., 1979); CGI z povodí Labe, Česká republika (Knytl et al., 2013); CGI z povodí Visly, Polsko (Boroń et al., 2011), CGI ze severní a východní Číny (Zhou et Gui, 2002)) i 1 – 9 mikrochromozómů. Přítomnost těchto elementů byla vysvětlována různými způsoby. Zhou et Gui (2002) se domnívají, že mikrochromozómy hrají důležitou roli při funkční diploidizaci triploidního genomu CGI. Nepodávají však bližší vysvětlení. Scharl et al. (1995) objevili u živoročky křížené mikrochromozómy pocházející z hostitelských, sexuálně se množících DRUHŮ. Inkorporaci subgenomické DNA vysvětlují jako kompenzaci nevýhod asexuálů, jako je například mutační zátěž.

Zjištění, které přináší odlišný pohled na funkční ploidní úroveň CGI, podávají Fan et Shen (1990), kteří u ryb ze severní Číny (povodí Amuru) zjišťovali poměr obsahu DNA v jádrech erytrocytů a spermií metodou průtokové cytometrie. U ryb byl zjišťován i počet chromozómů jejich preparací z leukocytových kultur. Počet chromozómů u CGI z této lokality byl nejčastěji 156. Poměr obsahu DNA v erytrocytech vůči obsahu DNA ve spermiích byl 1,96 : 1, tedy téměř 2 : 1. Stejný poměr obsahu DNA v erytrocytech vůči obsahu DNA ve spermiích uvádějí Fan et Liu (1990) a Wei et al. (2003). Z výsledků autoři Fan et Shen (1990) vyvodili závěr, že samci CGI jsou z dané lokality funkční, sexuálně se rozmnožující BIOTYPY s diploidním počtem chromozómů $2n = 156$, jejichž spermie prochází normálním meiotickým dělením. U samic CGI nebyla prokázána funkční diploidie a nelze říci, že gametogeneze probíhá stejným způsobem jako u samců CGI se 156 chromozómy. Dále se autoři Fan et Shen (1990) a Fan et Liu (1990) domnívají, že původně byla gynogeneze hlavním mechanismem rozmnožování a populace měly status funkčně triploidní do té doby, než nastala funkční diploidizace triploidního genomu a CGI se začali reprodukovat pohlavně. Nastala tedy reverze asexuálního v pohlavní rozmnožování, mechanismus, který je předpokládán pro vznik DRUHOVÝCH TAXONŮ allopolyploidizací (Alves et al., 2001). V novějších studiích Flajšhans et al. (2004) a Flajšhans et al. (2008) byla odhalena haploidní chromozómová sada ve spermiích diploidního CGI, aneuploidní chromozómová sada ($1,5n$) ve spermiích triploidního CGI a aneuploidní až hyperdiploidní ($1,6n$) chromozómová sada u tetraploidního CGI. Je zřejmé, že fyziologické a další vlastnosti jedinců s vyšší ploidí se liší. Například u vyšších ploidních úrovních CGI byla zjištěna menší koncentrace a menší motilita spermií než u diploidů (Flajšhans et al., 2004; Flajšhans et al., 2008).

V populacích převážně tvořených samicemi tedy mohou současně probíhat pohlavní i nepohlavní způsoby reprodukce. Gynogenetičtí CGI se mohou rozmnožovat i gonochoristicky (Fan et Shen, 1990; Zhou et al., 2000a; 2000b; Xie et al., 2001; Li et Gui, 2003; Zhao et al., 2004; Kalous et al., 2006). Proto se diploidně – polyploidní KOMPLEX CGI také označuje jako gynogeneticko – sexuální KOMPLEX (Hakoyama et al., 2001).

Už v roce 1990 se Fan a Shen domnívali, že pokud jsou jikry „oplozeny“ mlíčem jiných DRUHŮ, než vlastním, vyvíjí se gynogeneticky. V případě oplodnění jiker mlíčem karase se mohou jikry vyvíjet také gynogeneticky, ale vznikají i samčí jedinci, což svědčí o tom, že došlo ke kombinaci samčího a samicího genomu a do jikry se dostaly samčí

determinující geny, tzv. allogynogeneze (Yi et al., 2003) či „paternal leakage“ (Lamatsch et Stöck 2009). Mohlo také dojít k syngamii diploidních či triploidních vajíček a haploidních spermií při gynogenezi, což by mohlo vést také k produkci jedinců samčího pohlaví. Pravděpodobnost tohoto jevu je však velmi nízká – 1 % (Dawley, 1989).

Gui et Zhou (2010) tuto hypotézu potvrdili a uvádí, že pokud dojde k iniciaci vajíčka heterologní spermií (v jejich experimentu spermie CCY), nově vzniklé potomstvo se bude vyvíjet gynogeneticky a vzniknou monosamičí populace CGI. Pokud dojde k oplození vajíčka homologní spermií (1,5n) triploidního CGI, dojde k fúzi samčího a samičího pronuclea a vznikne bisexuální potomstvo. Na základě sekvencí detekovali 26 rekombinačních událostí. V takovém případě nemůžeme hovořit o gynogenezi, ale o pohlavní reprodukci. Experimentem, který provedli Gui et Zhou (2010), byla vyvrácena hypotéza produkce dvou typů jiker: gynogenetických (G) a bisexuálních (B), původně navrženou Fanem et Shenem (1990).

Hakoyama et al. (2001) uvádějí, že gynogeneticko – sexuální KOMPLEXY CLA a CBU přežívají navzdory faktu, že gynogenetické BIOTYPY mají dvojnásobnou možnost produkce potomstva než populace sexuální, díky tomu, že neprodukují samce. V budoucnu by měla populace gynogenů vytlačit populace sexuální a nakonec obě dvě vyhynou, protože gynogenetické BIOTYPY potřebují k iniciaci oocyту samce ze sexuální populace. Proto, aby to tak nedopadlo, potřebuje pohlavní generace krátkodobé výhody, aby vyrovnala nevýhodu s produkcí samců. Výše uvedení autoři Hakoyama et al. (2001) zjišťovali, jestli je třetí preference samců vyšší v sexuálních populacích a jestli je odolnost rozdílná u gynogeneticko – sexuálního KOMPLEXU CLA a CBU. Třetí chování gynogenetických karasů je promiskuitní a nebyla zpozorována preference samců vůči určitým samicím, proto to nemůže být bráno jako jeden z důvodů, proč je udržován gynogeneticko – sexuální systém. Parazitární napadení gynogenů bylo prokazatelně vyšší než u pohlavně se množících samic. Nižší obranyschopnost a vyšší úmrtnost gynogenetických BIOTYPŮ se zřejmě podílí na vyvážení nevýhodnosti sexuálních BIOTYPŮ. Další patologické napadení gynogenetických, morfologicky a geneticky identických jedinců CGI bylo odhaleno při studii Daněk et al. (2013), kde byla úmrtnost zapříčiněna virem ze skupiny herpesvirů. Hakoyama et al. (2001) navrhují mechanismy, které mohou způsobit vyšší napadení parazitů u asexuálních jedinců: akumulace škodlivých mutací, heterózní efekt (klon může vykazovat různý stupeň heteroze, podle

keré může být fitness vyšší nebo nižší než u parentálních DRUHŮ) nebo zvětšení buněk díky polyploidizaci.

4 Vědecké hypotézy a cíle práce

Dosavadní údaje svědčí o tom, že i) v diploidně polyploidním KOMPLEXU CGI se vyskytují jedinci obou pohlaví s $2n = 100$ a stabilní karyotypovou strukturou, zatímco triploidní jsou většinou samice, které mají variabilní počet chromozómů od 141 do 166 a rovněž vzácně samice tetraploidní s více jak 200 chromozómy ii) v rámci populací CCA se vyskytují jedinci s $2n = 50$ a $2n = 100$. Pracovní hypotéza i) měla potvrdit předchozí pozorování o stabilitě vs. variabilitě diploidních oboupohlavních populací CGI, o variabilitě triploidních BIOTYPŮ CGI a pokusit se zjistit původ tetraploidních jedinců ii) potvrdit nebo vyvrátit existenci jedinců CCA s $2n = 50$.

Cíle:

- 1) potvrzení variability počtu chromozómů a analýza karyotypu potomstva vzniklého křížením různě ploidních jedinců CGI
- 2) potvrzení stability počtu chromozómů a analýza karyotypu CCA
- 3) charakteristika struktury genomu jedinců z diploidně – polyploidního KOMPLEXU rodu *Carassius* pomocí molekulárně cytogenetických metod

5 Zvolené metody zpracování

5.1 Chromozómové analýzy

5.1.1 Přímá preparace chromozómů z ledvin

Jeden den před vlastním vyšetřením byla mitotická aktivita stimulována intraperitoneální injekcí 0,1 % roztoku CoCl_2 v množství 1 ml na 100 g živé váhy. Pro zastavení procesu buněčného dělení v metafázi buněčného cyklu, šedesát minut před usmrcením, byly ryby injikovány opět intraperitoneálně 0,1 % roztokem kolchicinu v dávce 1ml na 100 g živé váhy. Standardní přímá metoda chromozómové preparace z proximální části ledvin byla provedena dle autorů Ráb et Roth (1988).

5.1.2 Preparace chromozómů z regenerátů ploutevní tkáně

Nedestruktivně byly chromozómy izolovány metodou preparace z regenerátů ploutevní tkáně původně dle autorů Völker et Kullmann (2006) později modifikovanou Kalousem et al. (2010) (příloha práce VI).

5.2 Barvení chromozómů

5.2.1 Konvenční

Chromozómy pro karyotypovou analýzu byly barveny 4 % roztokem barviva Giemsa – Romanowski v Sörrensenově fosfátovém pufru, pH = 6,8.

5.2.2 Diferenciální

Pro cytogenetickou analýzu byly použity proužkovací techniky dle autorů Rábová et al. (2013): C-pruhování pomocí $\text{Ba}(\text{OH})_2$, impregnace koloidním stříbrem (Ag-NOR), fluorescenční pruhování pomocí DAPI a Chromomycinu CMA_3 .

5.3 Genomická *in situ* hybridizace (GISH)

Sondy pro GISH byly vyrobeny standardní nick translační reakcí za pomoci nick translačního mixu podle instrukcí výrobce (Roche, Německo). Genomická DNA byla značena nepřímo pomocí haptenu i) Biotin-dUTP (Roche, Německo) detekovaný buď

protilátkou Streptavidin-CyTM3 (Invitrogen, Germany) nebo protilátkou Streptavidin-FITC (Invitrogen, Germany), ii) Digoxigenin-dUTP (Roche, Německo) detekovaný buď protilátkou anti-digoxigenin-fluorescein (Roche, Německo) nebo protilátkou anti-digoxigenin-rhodamin (Roche, Německo) řaděných podle instrukcí výrobce.

Hybridizace a následná detekce během GISH experimentu byly provedeny tak, jak popsali Cremer et al. (2008). Podrobnější postup metody viz příloha práce II.

5.4 Mikroskopování a analýza karyotypu

Mikroskopování a snímání metafází barvených Giemsovým barvivem bylo prováděno na mikroskopu Olympus BX41TF a vybaveného digitálním fotoaparátem Olympus SP-350. Počty Chromozómů byly stanoveny v programu QuickPHOTO MICRO (verze 2.3). Karyotyp byl sestaven pomocí programu Ikaros – karyotypovací systém (verze V 3.4.0) a Adobe Photoshop (verze CS7). Klasifikace chromozómů byla provedena na základě poměru velikosti ramen a polohy centromery podle autorů Levan et al. (1964). Sklíčka s vybranými metafázemi se zaznamenanými souřadnicemi byla odbarvena ve fixativu (methanol a kyselina octová; 3:1) a uskladněna v chladničce při teplotě 4 °C.

Mikroskopování a snímání chromozómů pro GISH analýzu bylo prováděno pomocí mikroskopu Olympus AX70 vybaveným sadou čtyř fluorescenčních filtrů a digitálního fotoaparátu Olympus DP30BW vybaveným CCD chipem Sony ICX285-AL. Fluorescenčně obarvené chromozómy byly zpracovány pomocí softwaru MicroImage a následně analyzovány pomocí softwaru Adobe Photoshop (verze CS7).

6 Přehled prací zařazených do disertační práce

Práce I: **Karyotype diversity of the offspring resulting from reproduction experiment between diploid male and triploid female of silver Prussian carp, *Carassius gibelio* (Cyprinidae, Actinopterygii)**

Kalous L, **Knytl M**. 2011. Folia Zoologica (IF = 0.357), 60 (2): 115-121.

Práce II: **Chromosome studies of European cyprinid fishes: cross-species painting reveals natural allotetraploid origin of *Carassius* female with 206 chromosomes**

Knytl M, Kalous L, Symonová R, Rylková K, Ráb P. 2013. Cytogenetic and Genome Research (IF = 1,533), 139 (4): 276-283.

Práce III: **Karyotype and chromosome banding of endangered crucian carp (*Carassius carassius*)**

Knytl M, Kalous L, Ráb P. Comparative Cytogenetics (IF = 0,595), 7 (3): 205–213.

Práce IV: **Massive mortality of Prussian carp (*Carassius gibelio*) in the upper Elbe basin associated with herpesviral hematopoietic necrosis (CyHV-2)**

Daněk T, Kalous L, Veselý T, Krásová E, Reschová S, Rylková K, Kulich P, Petrtýl M, Pokorová D, **Knytl M**. 2012. Diseases of Aquatic Organisms (IF = 2,201), 102 (2): 87-95.

Práce V: **Usage of non-destructive method of chromosome preparation applied on silver Prussian carp (*Carassius gibelio*)**

Kalous L, **Knytl M**, Krajáková L. 2010. In: Kubík Š, Barták M (Eds.). Workshop on animal biodiversity, Jevany, Czech Republic, July 7, 2010, p. 57-60, ISBN: 9788021321465.

Práce VI: **Mystery of chromosome number of silver Prussian carp (*Carassius gibelio*)**

Knytl M, Kalous L. 2009. In: Kubík Š, Barták M (Eds.). Workshop on animal biodiversity, Jevany, Czech Republic, July 8, 2009, p. 68-69, ISBN: 9788021320314.

7 Výsledky a diskuse

Disertační práce je složená z šesti původních prací, z nichž čtyři jsou publikované v časopisech indexovaných v databázi TR WoS a dvě jsou publikované ve sbornících.

Tato práce je pokračováním diplomové práce „Vybrané cytogenetické charakteristiky diploidně – polyploidních KOMPLEXŮ rodu *Carassius*“, kde byli použitým materiálem jedinci CGI, kteří vznikli křížením rodičů o různé ploidní úrovni. Po zkřížení triploidní samice se 159 chromozómy a diploidního samce se 100 chromozómy vzniklo potomstvo (práce I), u něhož byla nalezena triploidní chromozómová sada s různými počty chromozómů (150, 151, 156 a 159). V jednom případě měli potomci stejné počty chromozómů jako matka a v ostatních případech se počty chromozómů matky a potomstva lišily. Nejvyšší četnost jedinců vykazovalo potomstvo s 156 chromozómy. Z celkového počtu všech jedinců potomstva vzniklého křížením několika různě ploidních rodičů byl stanoven modální počet chromozómů 150 (práce VI). Z výsledků (práce I, VI) vyplynulo, že vzniklé polyploidní potomstvo obsahovalo variabilní počty chromozómů a nebyla prokázána téměř žádná závislost na počtu chromozómů rodičů i přesto že se jednalo o klon matky (kromě jednoho potomka s počtem chromozómů 159). Variabilita počtu chromozómů se v našem případě pohybovala v rozmezí devíti (150 – 159) chromozómů, což by mohlo být způsobeno inkorporací otcovského genomu do vajíčka formou adice mikrochromozómů, kterou vysvětlili Lampert et Scharl (2008) jako únik paternálních genů neboli „paternal leakage“. Jelikož mateřský genom obsahoval 159 chromozómů, jednalo by se spíše o eliminaci mikrochromozómů způsobenou paternálním genomem. Poznatky o chromozómové variabilitě polyploidních BIOTYPŮ jsou podpořeny mnoha dalšími studii (Fan et Shen, 1990; Zhou et Gui, 2002; Kalous, 2005; Tóth et al., 2005; Knytl, 2009; Liasko et al., 2010; Boroń et al., 2011). Existenci polyploidních BIOTYPŮ CGI, které mají variabilní počet chromozómů, s vysokou pravděpodobností již nelze vyvrátit.

Variabilita v počtu chromozómů byla dokonce odhalena u diploidních BIOTYPŮ CGI, viz Tabulka 1 (Raicu et al., 1981; Fišter et Soldatović, 1991). Vzhledem k velikosti a počtu chromozómů, je těžké rozhodnout, do jaké míry se v různých studiích jedná o preparační artefakty a do jaké míry o skutečnou variabilitu v počtu chromozómů.

Zhou et Gui (2002) prokázali souvislost mezi počtem chromozómů rodičů a potomstva CGI. Počet chromozómů potomstva se ukázal jako intermediární mezi počtem chromozómů obou rodičů. Rodiče měli 156 a 162 chromozómů a jejich nově vzniklé potomstvo mělo 159 chromozómů. Výsledky následně ukázaly, že se jednalo o pohlavní způsob reprodukce (Zhou et Gui, 2002). Experiment křížení (práce I) byl proveden mezi rodiči o různé ploidní úrovni (diploidní samec CGI a triploidní samice CGI) a Zhou et Gui (2002) provedli křížení rodičů o stejné ploidní úrovni (triploidní samec CGI a triploidní samice CGI). U obou experimentů došlo k aktivaci vajíčka homologní spermií. Spermie diploidních samců CGI nese haploidní chromozómovou sadu (Flajšhans et al., 2004; Flajšhans et al., 2008) a spermie triploidních samců CGI nese 1,5 chromozómovou sadu (Flajšhans et al., 2008; Fan et Shen, 1990). Pokud je vajíčko triploidních samic CGI inseminováno homologní haploidní spermií nebo heterologní spermií, nově vzniklé potomstvo se vyvíjí gynogeneticky (Tóth et al., 2005; Gui et Zhou, 2010) a pokud je vajíčko triploidních samic CGI oplodněno homologní 1,5n spermií triploidního samce, vzniká bisexuální, rekombinantní potomstvo (Zhou et Gui, 2002; Gui et Zhou, 2010).

Li et Gui (2003) zkoumali *in vitro* dekondezaci a formování pronuklea spermií v extraktech z jiker CCY a CGI. V případě, kdy byla do extraktu z jiker CGI vložena spermie CGI, byla pozorována její dekondezace a formování samčího pronuklea. Stejně tak byla pozorována dekondezace a formování pronuklea spermií CCY i CGI v extraktech z jiker z CCY. Při vložení spermie CCY do extraktu z jiker CGI zůstával chromatin v jádře spermie v kondenzovaném stavu a nedošlo k formování pronuklea.

Vliv heterologních spermií či homologních spermií s různou ploidní úrovní na způsob rozmnožování byl evidentně prokázán a v našem experimentu křížení (práce I) se tedy jednalo o gynogenezi. Ve vajíčku, kromě mechanismu, který je zodpovědný za inaktivaci genetické informace spermie při gynogenezi (Peňáz et al., 1979), existuje i mechanismus zodpovědný za rozpoznání heterologní/ homologní haploidní/ homologní 1,5 ploidní spermie. Li et Gui (2003) předpokládají, že mechanismus zodpovědný za rozpoznání heterologní a homologní spermie zřejmě souvisí s inaktivací některých faktorů potřebných pro uvolnění jaderné membrány spermie.

Materiál použitý v další části této práce (práce II, III, IV) zahrnuje různě ploidní BIOTYPY CGI a CCA, kteří byli odchyceni v lokalitě Byšičky, okres Lysá nad Labem (GPS: 50° 10' 45" N, 14° 47' 37" E). U všech nalezených jedinců byla provedena

karyologická studie – stanovení počtu chromozómů a u některých byl sestaven karyotyp. Jednalo se převážně o triploidní samice CGI se 156 chromozómy (práce II, IV) a pouze jednu triploidní samici se 150 chromozómy (práce IV), jednu tetraploidní samici s 206 chromozómy, kterou jsme z morfologického hlediska původně identifikovali jako CGI, ale následná molekulárně cytogenetická studie odhalila, že se jedná o allotetraploidního hybrida CGI a CCA (práce II). Dále byli v dané lokalitě nalezeni jedinci, které jsme identifikovali jako CCA. Všichni CCA měli stabilní počet chromozómů $2n = 100$ (práce II, III). Na základě uveřejněných výsledků lze konstatovat, že se jedná o triploidní, unisexuální, klonální populaci CGI (práce IV) a diploidní, bisexuální, pohlavně se množící populaci CCA, jejichž samci jsou schopni iniciovat vajíčko a nastartovat embryonální vývoj gynogeneticky se množících samic CGI, přičemž může v některých případech dojít k adici haploidního genomu CCA a tak nastat ALLOPOLYPLOIDIE (práce II). Genom námi nalezeného ALLOPOLYPLOIDNÍHO hybrida byl složený z 50 chromozómů CCA a 156 chromozómů CGI. Celogenomová DNA CCA byla použita jako sonda pro GISH experiment a tato druhově specifická, označená DNA identifikovala 50 chromozómů z 206, což koresponduje s haploidní sadou CCA. Zbýlých 156 chromozómů bylo mateřského původu, což odhalila sekvence haplotypu cytochrom *b* ve zkonstruovaném fylogenetickém stromě. Tento ALLOPOLYPLOIDNÍ genom vzniká mechanismem podporující spermatickou genomovou adici (genome addition) k neredukovanému mateřskému genomu. Lampert et Scharl (2008) popsali tento proces jako triploidizaci diploidního genomu formou „paternal leakage“, my jsme detekovali tetraploidizaci triploidního genomu. Stejným způsobem by mohly vznikat ještě vyšší ploidní úrovně. Tento nález můžeme zařadit mezi stále častější studie pojednávající o mezidruhových kříženích CGI a CCA (např. Papoušek et al., 2008; Wouters et al., 2012). Zhu et Gui (2007) inseminovali vajíčko triploidního CGI spermií CCY a vytvořili mezirodového allotetraploidního hybrida CGI a CCY. Poměr rodičovských genomu uvnitř hybridního genomu byl 3 CGI: 1 CCY, stejně jako v našem případě 3 CGI: 1 CCA. Reprodukční mechanismy by měly být při nejmenším podobné. Ukázalo se, že triploidní samice CGI má, kromě schopnosti produkovat neredukované, triploidní gamety (díky APOMIXII a PREMEIOTICKÉ ENDOREPLIKACI), ještě schopnost zvýšit úroveň ploidie prostřednictvím inkorporace spermatického genomu. Mechanismus ve vajíčku, který je zodpovědný za rozpoznání homologní a heterologní spermie byl pravděpodobně narušen a místo eliminace paternálního genomu došlo k fúzi samčího a samičího pronuklea a výsledkem se stal allotetraploidní hybrid. Nicméně u nalezených tetraploidních karasů v minulosti nebyla provedena molekulárně cytogenetická

analýza, která by se zabývala genomovou kompozicí (Halačka et Lusková, 2000; Halačka et al., 2003; Tóth et al., 2005; Liasko et al., 2010; Mezhzherin et al., 2012), proto není vyloučeno, že se jednalo o hybridy.

Vzhledem k tomu, že se CCA, původní DRUH našeho území, stává stále ohroženějším DRUHEM, informace o něm jsou limitovány malým množstvím publikací posledních let (tabulka 1). Karasovi obecnému byla věnována celá studie (práce III). CCA má stabilní počet chromozómů ($2n = 100$), což je v rozporu se studií Raicu et al. (1981), kteří našli počet chromozómů CCA z oblasti delty Dunaje ($2n = 50$). Mezi evropskými CCA nebyl doposud nalezen žádný další CCA, který by měl 50 chromozómů (vyjma Raicu et al., 1981), tudíž by se mohlo jednat o preparační artefakt. Nyní je těžké spekulovat o nalezených rozdílech v diploidním počtu chromozómů CCA, dokud nebudou populace tohoto DRUHU detailněji cytogeneticky prozkoumány. Podle počtu čtyř pozitivních signálů diferenciálního barvení (Chromomycin CMA₃, impregnace AgNO₃), které byly umístěny v místě sekundární konstriktce na krátkých ramenech 14. páru submetacentrických chromozómů a krátkých ramenech 32. páru subtelo až akrocentrických chromozómů, jsme dospěli k hypotéze, že genom CCA je paleoallotetraploidního původu. Fluorescenční barvivo DAPI rovnoměrně obarvilo všechny chromozómy v karyotypu CCA bez intenzivnějších barevných signálů (práce III), stejně jako DAPI na chromozómech allotetraploidního CGI (Zhu et Gui, 2007). C-pruhování odhalilo bloky konstitutivního heterochromatinu, umístěné na telomerických částech 7 chromozómových párů (práce III). Počet 14 signálů C-pruhování může být druhově specifický mákr, obzvláště u paleoallotetraploidních BIOTYPŮ. Sola et al. (1986); Larhammar et Risiger (1994); David et al. (2003); Zhang et al. (2008) podpořili hypotézu tetraploidního původu u CCY a to na základě počtu NOR nesoucích chromozómů, substitučních rychlostí a analýzy sekvencí a mikrosatelitů. Karyotyp CCY se skládá ze stejného počtu chromozómů jako karyotyp CCA (Hafez et al., 1978) a jsou si evolučně natolik příbuzní, že je řadíme do stejného kladu Cyprinini (Yang et al., 2010), proto je dosti pravděpodobné, že u těchto dvou příbuzných DRUHŮ došlo ke stejnému evolučnímu procesu – multiplikace chromozómové sady (pravděpodobně z 50 na 100 chromozómů) vlivem mezidruhové hybridizace, přičemž rodičovské DRUHY nejsou známi.

Teoreticky by mezidruhová hybridizace měla vést ke klonalitě, jejíž následek je polyploidie (Choleva et al., 2012). Polyploidní asexuální KOMPLEXY mohou být re-

diploidizovány a následkem je maskulinizace a vznik bisexuálních populací (Fan et Shen, 1990). Pokud tato evoluční trajektorie proběhla u CCA v minulosti, výsledkem by byl právě paleoallotetraploidní CCA, který se v minulosti rozmnožoval asexuálně – gynogeneticky, jako CGI v přítomnosti.

Při analýze karyotypu diploidního CGI jsme našli následující strukturu: 6 párů metacentrických (m) + 18 párů submetacentrických (sm) + 26 párů subtelo až akrocentrických (st-a) chromozómů (práce VI). Byly analyzovány dva karyotypy vybraných jedinců CGI se 150 chromozómy. První se skládal ze 42 m + 66 sm + 36 st-a chromozómů + 6 mikrochromozómů, druhý obsahoval 36 m + 45 sm + 66 st-a chromozómů + 6 mikrochromozómů (práce VI). Karyotyp CGI se 156 chromozómy se skládal z 30 m, 54 sm, 66 st-a chromozómů a 6 mikrochromozómů (práce II). Tetraploidní hybridní samice CGI x CCA měla 40 m, 72 sm, 88 st-a chromozómů a 6 mikrochromozómů (práce II). U CCA jsme našli karyotyp s 10 páry m, 18 páry sm a 22 páry st-a chromozómů (práce II, III). Výsledky karyologických studií jiných autorů jsou uvedeny v tabulce 1. Velikost a tvar chromozómů je závislý na stupni spiralizace, ve kterém se momentálně daný chromozóm vyskytuje (Ráb et Collares-Pereira, 1995), proto se počty metacentrických, submetacentrických, subtelocentrických a akrocentrických chromozómů daného DRUHOVÉHO TAXONU, uvedené různými autory, liší, obzvláště u polyploidních BIOTYPŮ.

Skutečnost, na které se autoři s našimi výsledky částečně shodují, je přítomnost šesti mikrochromozómů v karyotypu triploidních CGI (Peňáz et al., 1979; Zhou et Gui, 2002; Yi et al., 2003). Karyotyp triploidního CGI obsahoval 6 mikrochromozómů a karyotyp tetraploidního hybrida CGI a CCA obsahoval také 6 mikrochromozómů (práce II). Peňáz et al. (1979) identifikovali 6 mikrochromozómů v karyotypech triploidních CGI z řeky Dyje. Boroń et al. (2011) identifikovali 1 – 6 mikrochromozómů v karyotypech triploidních CGI vyskytujících se v povodí polské řeky Visla. Zhou et Gui (2002) a Yi et al. (2003) provedli křížící experiment CGI z Číny, kde jikry CGI inseminovali spermii cejnovce čínského. Rodičovští triploidní CGI měli 6 mikrochromozómů v karyotypu (Zhou et Gui, 2002; Yi et al., 2003), nově vzniklé triploidní potomstvo mělo 3 – 9 mikrochromozómů (Zhou et Gui, 2002) a 5 – 15 mikrochromozómů, z nichž 8 bylo paternálního původu (Yi et al., 2003). Zhou et Gui (2002) navíc provedli křížení triploidních CGI, jejichž karyotypy obsahovaly 6 mikrochromozómů a výsledné potomstvo mělo stejný počet mikrochromozómů, jako oba

rodiče. Dle uvedených výsledků lze konstatovat, že mikrochromozomy F1 potomstva nemusejí být maternálního původu, přestože jejich počet je totožný s počtem mikrochromozómů matky. Je zřejmé, že malé množství genetického materiálu pocházejícího z heterologní spermie, bylo inkorporováno do genomu allogynogenetického F1 potomstva (Yi et al., 2003), formou adice mikrochromozómů (Lampert et Scharl, 2008). Další paternální původ mikrochromozómů CGI pocházejících z hostitelských, pohlavně se množících DRUHŮ, ukázala RAPD analýza (Zhou et Gui, 2002). Naopak tetraploidní hybridní samice CGI a CCA (práce II) měla všech 6 mikrochromozómů maternálního původu (obrázek 3, práce II).

S ohledem na invazní charakter populací CGI, který je široce rozšířený, různě ploidní a s kombinovanou pohlavní a asexuální reprodukcí a v případě CCA jako kriticky ohroženého DRUHŮ a nejasnou distribucí možných diploidních / paleoallotetraploidních BIOTYPŮ v jeho celém areálu výskytu, další poznatky v této práci nemalou měrou přispívají k poznání reprodukční biologie a diverzity jednotlivých forem a BIOTYPŮ rodu *Carassius*.

DRUHOVÝ TAXON	počet chromozómů	karyotyp	lokalita	zdroj	
<i>C. gibelio</i>	94, 141	neuedeno	Bělorusko	Cherfas (1966)	
<i>C. gibelio</i>	166	46m+40sm+74st-a+6mch	Česká republika	Peňáz et al. (1979)	
<i>C. gibelio</i>	94-104	14m+18sm+66st-a	Rumunsko	Raicu et al. (1981)	
<i>C. gibelio</i>	160	16m+28sm+126st-a	bývalá Jugoslávie	Vujošević et al. (1983)	
<i>C. gibelio</i>	158	36m+54sm-st+68a	bývalá Jugoslávie	Fišter et Soldatović (1989)	
<i>C. gibelio</i>	102, 104	24m+36sm-st+42(44)a	bývalá Jugoslávie	Fišter et Soldatović (1991)	
<i>C. gibelio</i>	100	14m+24sm+62st-a	Polsko	Boroń (1994)	
<i>C. gibelio</i>	100, 148-156	26m+50sm+74st-a	neuedeno	Maďarsko	Tóth et al. (2005)
<i>C. gibelio</i>	156-162, 200-214	neuedeno	Řecko	Liasko et al. (2010)	
<i>C. gibelio</i>	100	26m+38sm+36st-a	Polsko	Boroń et al. (2011)	
<i>C. carassius</i>	104	33m+48sm+75st-a+4mch	neuedeno	Chiarelli et al. (1969)	
<i>C. carassius</i>	100	20m+72sm+12a	Nizozemsko	Kobayasi et al. (1970)	
<i>C. carassius</i>	100	20m+40sm+40a	Francie	Hafez et al. (1978)	
<i>C. carassius</i>	100	20m+44sm+36a	Bosna	Sofradžija et al. (1978)	
<i>C. carassius</i>	50	52m-sm + 48 st-a	Rumunsko	Raicu et al. (1981)	
<i>C. carassius</i>	100	20m+12sm+18st-a	Rusko	Vasiliev (1985)	
<i>C. carassius</i>	100	48ms-m+52st-a	Česká republika	Mayr et al. (1986)	
<i>C. carassius</i>	100	neuedeno	Polsko	Boroń et al. (2010)	

Tabulka 1: Karyotypová data týkající se evropských zástupců CGI a CCA. Chromozómová čísla zjištěná různými autory (v případě jednoho čísla je to modální počet u kterého byla prokázána největší četnost). Dále jsou v tabulce zobrazeny informace o lokalitách, ve kterých ryby byly chyceny a o karyotypech. Údaje jsou seřazeny podle DRUHOVÝCH TAXONŮ a vzestupně dle data publikace.

8 Závěry a doporučení pro využití poznatků v praxi

- ❖ po umělém křížení různě ploidních rodičů CGI vzniká potomstvo s převážně odlišnými chromozómovými počty, než měli jejich rodiče
- ❖ počty chromozómů polyploidních BIOTYPŮ CGI jsou variabilní
- ❖ CGI a CCA mohou vytvářet mezidruhové allotetraploidní hybridy, jejichž genom se skládá z mateřské triploidní chromozómové sady CGI a otcovské haploidní chromozómové sady CCA
- ❖ CCA má stabilní chromozómovou sadu $2n = 100$ a je paleoallotetraploidního původu

Cytogenetika a evoluční dynamika KOMPLEXU karasů rodu *Carassius* přes značné množství studií je stále ještě nepříliš dobře prostudovaná a k dalšímu rozvoji této problematiky by bylo zapotřebí rozšířit poznatky týkající se introgresivních hybridizací celého KOMPLEXU, zaměřit se na kompozici rodičovských genomů v hybridním genomu a její evoluci. Dále provést další experimentální křížení různě ploidních BIOTYPŮ / hybridů KOMPLEXU *Carassius* a analyzovat klonální dědičnost, popřípadě únik paternálních genů či polyploidizaci.

9 Seznam odborné literatury

Alves, M. J., Coelho, M. M., Collares-Pereira, M. J. 2001. Evolution in action through hybridisation and polyploidy in an Iberian freshwater fish: a genetic review. *Genetica*. 111 (1). 375-385.

Apalikova, O. V., Podlesnykh, A. V., Kukhlevsky, A. D., Guohua, S., Brykov, V. A. 2011. Phylogenetic relationships of silver crucian carp *Carassius auratus gibelio*, *C. auratus cuvieri*, crucian carp *Carassius carassius*, and common carp *Cyprinus carpio* as inferred from mitochondrial DNA variation. *Russian Journal of Genetics*. 47 (3). 322-331.

Arai, K., Matsubara, K., Suzuki, R. 1993. Production of polyploids and viable gynogens using spontaneously occurring tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture*. 117 (3). 227-235.

Balon, E. K. 2004. About the oldest domesticates among fishes. *Journal of fish Biology*. 65 (A). 1-27.

Baruš, V., Oliva, O. 1995. Fauna ČR a SR, Mihulovci a ryby 2. Díl. Academia. Praha. 698 s. ISBN: 8020002189.

Beukeboom, L. W., Vrijenhoek, R. C. 1998. Evolutionary genetics and ecology of sperm-dependent parthenogenesis. *Journal of Evolutionary Biology*. 11 (6). 755-782.

Bi, K., Bogart, J. P. 2006. Identification of intergenomic recombinations in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* by genomic in situ hybridization (GISH). *Cytogenetic and Genome Research*. 112 (3-4). 307-312.

Bloch, M.E. 1782. *Oekonomische Naturgeschichte der Fische Deutschlands*. v. 1. Berlin. p. 1-128.

Bogart, J. P., Bi, K., Fu, J., Noble, D. W. A., Niedzwiecki, J. 2007. Unisexual salamanders (genus *Ambystoma*) present a new reproductive mode for eukaryotes. *Genome*. 50 (2). 119-136.

Boroń, A. 1994. Karyotypes of diploid and triploid silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch). *Cytobios*. 80. 117-124.

Boroń, A., Kirtiklis, L., Porycka, K., Abe, S., Juchno, D., Grabowska, A., Duchnowska, K., Karolewska, M., Kuczevska, A., Miroslawska, U., Wierzbicki, P. 2010. Comparative cytogenetic analysis of two *Carassius* species (Pisces, Cyprinidae) using chromosome banding and FISH with rDNA. In: 19th ICACGM. Book of Abstracts: 137. *Chromosome Research*. 20 (10). 749.

Boroń, A., Szlachciak, J., Juchno, D., Grabowska, A., Jagusztyn, B., Porycka, K. 2011. Karyotype, morphology, and reproduction ability of the Prussian carp, *Carassius gibelio* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae), from unisexual and bisexual populations in Poland. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*. 41 (1). 19-28.

Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*. 6 (11). 836-846.

Copp, G. H. 1991. Typology of aquatic habitats in the Great Ouse, a small regulated lowland river. *Regulated Rivers: Research & Management*. 6 (2). 125-134.

Copp, G. H., Černý, J., Kováč, V. 2008. Growth and morphology of an endangered native freshwater fish, crucian carp *Carassius carassius*, in an English ornamental pond. *Aquatic Conservation: Marine & Freshwater Ecosystems*. 18 (1). 32-43.

Cremer, M., Grasser, F., Lanctôt, Ch., Müller, S., Neusser, M., Zinner, R., Solovei, I., Cremer, T. 2008. Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes. In: Hancock, R. (ed.). *The Nucleus*. Humana Press. *Methods in Molecular Biology*. 463. 205-239. ISBN: 9781597454063.

Daněk, T., Kalous, L., Veselý, T., Krásová, E., Reschová, S., Rylková, K., Kulich, P., Petrtýl, M., Pokorová, D., Knytl, M. 2012. Massive mortality of Prussian carp *Carassius gibelio* in the upper Elbe basin associated with herpesviral hematopoietic necrosis (CyHV-2). *Diseases of aquatic organisms*. 102 (2). 87-95.

David, L., Blum, S., Feldman, M. W., Lavi, U., Hillel, J. 2003. Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. *Molecular biology and evolution*. 20 (9). 1425-1434.

Dawley, R. M. 1989. An introduction to unisexual vertebrates. In: Dawley, R. M., Bogart, J. P. (eds.). *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*. University of the State of New York. State Education Department. New York State Museum. New York. p. 1-18.

Economidis, P. S. 1995. Endangered freshwater fishes of Greece. *Biological Conservation*. 72 (2). 201-211.

Fan, Z. T., Liu, G. 1990. The ploidy and the reproductive mechanism of crucian carp, *Carassius auratus gibelio*. *Journal of Fish Biology*. 36 (3). 415-419.

Fan, Z. T., Shen, J. B. 1990. Studies on the evolution of bisexual reproduction in crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch). *Aquaculture*. 84 (3). 235-244.

Fišter, S., Soldatović, B. 1989. Karyotype analysis of a gynogenetic population of *Carassius auratus gibelio* Bloch (Cyprinidae) from Pancevacki Rit [Yugoslavia]. *Acta Veterinaria*. 39 (5-6). 259-267.

Fišter, S., Soldatović, B. 1991. Karyotype analysis of male and diploid female *Carassius auratus gibelio*, Bloch (Pisces, Cyprinidae) caught in the Danube at Belgrade. Evidence for the existence of a bisexual population. *Acta Veterinaria*. 41 (2-3). 81-90.

Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Bohlen Šlechtová, V., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O. 2013. *Genetika a šlechtění ryb*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Fakulta rybářství a ochrany vod. Vodňany. 310 s. ISBN: 9788087437483.

Flajšhans, M., Lusková, V., Vetešník, L., Halačka, K., Rodina, M., Lusk, S., Gela, D. 2004. Diploidní, triploidní a tetraploidní karas stříbřitý *Carassius auratus* z dolního toku Dyje: první výsledky reprodukční charakteristiky a experimentální hybridizace. *Biodiverzita ichtyofauny ČR*. V. 35-43.

Flajšhans, M., Piačková, V., Ráb, P. 2006. Vyšší ploidní úrovně u ryb a některé problémy jejich analýzy (Rozšířený abstrakt práce Flajšhans, M., Piačková, V., Ráb, P. 2005. Higher ploidy levels in fish and some problems of their analysis, Analytická cytometrie III. 3. 50-51). Bulletin VÚRH Vodňany. 42. 74-76.

Flajšhans, M., Rodina, M., Halačka, K., Vetešník, L., Gela, D., Lusková, V., Lusk, S. 2008. Characteristic of sperm of polyploid Prussian carp *Carassius gibelio*. Journal of Fish Biology. 73 (1). 323-328.

Goddard, K. A., Megwinoff, O., Wessner, L. L., Giaimo, F. 1998. Confirmation of gynogenesis in *Phoxinus eos-neogaeus* (Pisces: Cyprinidae). Journal of Heredity. 89 (2). 151-157.

Gui, J., Zhou, L. 2010. Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio*. Science China Life Sciences. 53 (4). 409-415.

Hafez, R., Labat, R., Quillier, R. 1978. Etude cytogenetique chez quelques especes de cyprinides de la region Midi-Pyrenees. Extrait du Bulletin de la Société d'Histoire de Toulouse. 114 (1-2). 1-38.

Hakoyama, H., Nishimura, T., Matsubara, N., Iguchi, K. 2001. Difference in parasite load and nonspecific immune reaction between sexual and gynogenetic forms of *Carassius auratus*. Biological Journal of the Linnean Society. 72 (3). 401-407.

Halačka, K., Lusková, V. 2000. Polyploidie u karase stříbřitého (*Carassius auratus*) v dolním toku Dyje – determinace pomocí velikosti jader erytrocytu. In: Mikešová, J. (ed.). Sborník referátů z IV. České ichtyologické konference. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech. Vodňany. s. 110-113. ISBN: 8085887320.

Halačka, K., Lusková, V., Lusk, S. 2003. *Carassius „gibelio“* in fish communities of the Czech Republic. *Ecohydrology & Hydrobiology*. 3 (1). 133-138.

Hänfling, B., Bolton, P., Harley, M., Carvalho, G. R. 2005. A molecular approach to detect hybridisation between crucian carp (*Carassius carassius*) and non-indigenous carp species (*Carassius* spp. and *Cyprinus carpio*). *Freshwater Biology*. 50 (3). 403-417.

Hensel, K. 1971. Some notes on systematic status of *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1782) with further record of this fish from the Danube River in Czechoslovakia. *Věstník Československé Společnosti Zoologické*. Svazek XXXV (3). 186-198.

Holčík, J., Žitňan, R. 1978. On the Expansion and Origin of *Carassius auratus* in Czechoslovakia. *Folia Zoologica*. 27 (3). 279-288.

Hosoya, K. 2000. Cyprinidae. In: Nakabo, T. (ed.). *Fishes of Japan with pictorial keys to the species*. Tokai University Press. Tokyo. p. 253-254. ISBN: 4486015703. (in Japanese).

Howell, A. B. 1933. The involved genetics of fish. *Science*. 77 (1999). 389.

Hubbs, C. L., Hubbs, L. C. 1932. Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish of hybrid origin. *Science*. 76 (1983). 628-630.

Cherfas, N. B. 1966. Natural triploidy in females of the unisexual form of silver carp *Carassius auratus gibelio* Bloch. *Genetika*. 2 (5). 16-24. (in Russian).

Chiarelli, B., Ferrantelli, O., Cucchi, C. 1969. The karyotype of some teleostean fish obtained by tissue culture in vitro. *Experientia*. 25 (4). 426-427.

Choleva, L., Janko, K. 2013. Rise and persistence of animal polyploidy: evolutionary constraints and potential. *Cytogenetic and Genome Research*. 140 (2-4). 151-170.

Choleva, L., Janko, K., De Gelas, K., Bohlen, J., Šlechtová, V., Rábová, M., Ráb, P. 2012. Synthesis of clonality and polyploidy in vertebrate animals by hybridization between two sexual species. *Evolution*. 66 (7). 2191–2203.

Iguchi, K., Yamamoto, G., Matsubara, N., Nishida, M. 2003. Morphological and genetic analysis of fish of a *Carassius* complex (Cyprinidae) in Lake Kasumigaura with reference to the taxonomic status of two all-female triploid morphs. *Biological Journal of the Linnean Society*. 79 (2). 351-357.

Itono, M., Okabayashi, N., Morishima, K., Fujimoto, T., Yoshikawa, H., Yamaha, E., Arai, K. 2007. Cytological mechanisms of gynogenesis and sperm incorporation in unreduced diploid eggs of the clonal loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 307 (1). 35-50.

Kalous, L. 2005. Příspěvek k revizi komplexu *Carassius auratus* v České Republice. Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinářských a přírodních zdrojů. Praha. 109 s.

Kalous, L., Knytl, M. 2011. Karyotype diversity of the offspring resulting from reproduction experiment between diploid male and triploid female of silver Prussian carp, *Carassius gibelio* (Cyprinidae, Actinopterygii). *Folia Zoologica*. 60 (2). 115-121.

Kalous, L., Bohlen, J., Rylková, K., Petrtyl, M. 2012. Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for *Carassius gibelio* (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. 23 (1). 11-18.

Kalous, L., Knytl, M., Krajáková, L. 2010. Usage of non-destructive method of chromosome preparation applied on silver Prussian carp (*Carassius gibelio*). In: Kubík, Š., Barták, M. (Eds.). Workshop on animal biodiversity, Jevany. Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha. p. 57-60. ISBN: 9788021321465.

Kalous, L., Rylková, K., Bohlen, J., Šanda, R., Petrtyl, M. 2013. New mtDNA data reveal a wide distribution of the Japanese ginbuna *Carassius langsdorfii* in Europe. *Journal of Fish Biology*. 82. 703–707.

Kalous, L., Šlechtová, V. jr., Bohlen, J., Doadrio, I. 2004. Původ a identifikace ryb rodu *carassius* v Evropě pomocí molekulárně-genetických dat. In: Vykusová, B. (ed.). Sborník referátů z VII. České ichtyologické konference. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech. Vodňany. s. 69-73. ISBN: 8085887509.

Kalous, L., Šlechtová, V. jr., Bohlen, J., Petrtýl, M., Švátora, M. 2007. First European record of *Carassius langsdorfii* from the Elbe basin. *Journal of Fish Biology*. 70 (A). 131-138.

Kalous, L., Šlechtová, V., Šlechta, V. 2006. Genetická diverzita karase stříbříteho (*Carassius 'gibelio'*) na území České republiky. In: Vykusová, B. (ed.). Sborník referátů z IX. České ichtyologické konference. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech. Vodňany. s. 33-36. ISBN: 8085887576.

Kasama, M., Kobayasi, H. 1989. Hybridization experiment between crucian carp *Carassius carassius* ♀ and grass carp *Ctenopharyngodon idellus* ♂. Hybridization experiments in Cyprinida (II). *Nippon Suisan Gakkaishi*. 55 (6). 1001-1006.

Kasama, M., Kobayasi, H. 1990. Hybridization experiment between *Carassius carassius* ♀ and *Gnathopogon elongatus elongatus* ♂. *Japanese Journal of Ichthyology*. 36 (4). 419-426.

Knytl, M. 2009. Vybrané cytogenetické charakteristiky diploidně – polyploidních komplexů rodu *Carassius*. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinářských a přírodních zdrojů. Praha. 65 s.

Knytl, M., Kalous, L. 2009. Mystery of chromosome number of silver Prussian carp (*Carassius gibelio*). In: Kubík, Š., Barták, M. (Eds.). Workshop on animal biodiversity, Jevany. Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha. p. 68-69. ISBN: 9788021320314.

Knytl, M., Kalous, L., Ráb, P. 2013. Karyotype and chromosome banding of endangered crucian carp, *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758) (Teleostei, Cyprinidae). *Comparative Cytogenetics*. 7 (3). 205-213.

Knytl, M., Kalous, L., Symonová, R., Rylková, K., Ráb, P. 2013. Chromosome studies of European cyprinid fishes: cross-species painting reveals natural allotetraploid origin of a *Carassius* female with 206 chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*. 139 (4). 276-283.

Kobayasi, H., Kawashima, Y., Takeuchi, N. 1970. Comparative chromosome studies in the genus *Carassius*, especially with a finding of polyploidy in the ginbuna (*C. auratus langsdorfii*). *Japanese Journal of Ichthyology*. 17 (4). 153-160.

Kobayasi, H., Ochi, H., Takeuchi, N. 1973. Chromosome studies in the genus *Carassius*: Comparison of *C. auratus grandoculis*, *C. auratus buergeri*, and *C. auratus langsdorfii*. *Japanese Journal of Ichthyology*. 20 (1). 7-12.

Komiyama, T., Kobayashi, H., Tateno, Y., Inoko, H., Gojobori, T., Ikeo, K. 2009. An evolutionary origin and selection process of goldfish. *Gene*. 430 (1). 5-11.

Kottelat, M. 1997. European freshwater fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation. Slovak Academy of Sciences. Bratislava. 52 (5). p. 271.

Kottelat, M., Freyhof, J. 2007. Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat. Berlin. p. 648. ISBN: 9782839902984.

Lamatsch, D. K., Stöck, M. 2009. Sperm-dependent parthenogenesis and hybridogenesis in teleost fishes. In: Schon, I., Martens, K., Dijk. P. V. (eds.). Lost sex: the evolutionary biology of parthenogenesis. Springer. Netherlands. p. 399-432. ISBN: 9789048127696.

Lampert, K. P., Scharl, M. 2008. The origin and evolution of a unisexual hybrid: *Poecilia formosa*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 363 (1505). 2901-2909.

Lampert, K. P., Scharl, M. 2010. A little bit is better than nothing: the incomplete parthenogenesis of salamanders, frogs and fish. BMC biology. 8 (1). 78.

Larhammar, D., Risinger, C. 1994. Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp *Cyprinus carpio*. Molecular Phylogenetics and Evolution. 3 (1). 59-68.

Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas. 52 (2). 201-220.

Li, Ch. J., Gui, J. F. 2003. Comparative studies on in vitro sperm decondensation and pronucleus formation in egg extracts between gynogenetic and bisexual fish. Cell Research. 13 (3). 159-169.

Liasko, R., Liouisa, V., Vrazeli, P., Papiggioti, O., Chortatou, R., Abatzopoulos, T. J., Leonardos, I. D. 2010. Biological traits of rare males in the population of *Carassius gibelio* (Actinopterygii: Cyprinidae) from Lake Pamvotis (north-west Greece). Journal of Fish Biology. 77 (3). 570-584.

Linnaeus, C. 1758. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata. Holmiae. Systema Nat. Ed. 10 (1): i-ii + 1-824. [Nantes and Pisces in Tom. 1, p. 230-338; a few species on later pages. Date fixed by ICZN, Code Article 3].

Liu, S. 2010. Distant hybridization leads to different ploidy fishes. Science China Life Sciences. 53 (4). 416-425.

Liu, S., Liu, Y., Zhou, G., Zhang, X., Luo, Ch., Feng, H., He, X., Zhu, G., Yang, H. 2001. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp x common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. Aquaculture. 192 (2). 171-186.

Luo, J., Zhang, Y. P., Zhu, C. L., Xiao W. H., Huang, S. Y. 1999. Genetic diversity in crucian carp (*Carassius auratus*). Biochemical Genetics. 37 (9-10). 267-277.

Lusk, S. 1986. Problematika karasa stříbřitého (*Carassius auratus*) v podmínkách Československa. Živočišná výroba. 31 (10). 945-951.

Lusk, S., Baruš, V., Veselý, V. 1977. On the question of the occurrence of *Carassius auratus* in the Morava River drainage area. Folia Zoologica. 26 (4). 377-381.

Lusk, S., Lusková, V., Halačka, K. 1998. Karas stříbřitý – 25 let od jeho přirozené introdukce. In: Mikešová, J. (ed.). Sborník referátů z III. České ichtyologické konference. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech. Vodňany. s. 135-140. ISBN: 8085887207.

Lusk, S., Lusková, V., Hanel, L. 2010. Alien fish species in the Czech Republic and their impact on the native fish fauna. *Folia Zoologica*. 59 (1). 57-72.

Lusková, V., Bartoňová, E., Lusk, S. 2008. Karas obecný *Carassius carassius* Linnaeus, 1758 v minulosti obecně rozšířený a v současnosti ohrožený druh v České republice. In: Lusk, S., Lusková, V. (Eds.). Biodiverzita ichtyofauny ČR (VII). Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i. Brno. s. 46-53. ISBN: 9788087189016.

Makino, S. 1939. The chromosomes of the carp, *Cyprinus carpio*, including those of some related species of Cyprinidae for comparison. *Cytologia*. 9 (4). 430-440.

Mayr, B., Ráb, P., Kalat, M. 1986. NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in Cyprinidae of different ploidy level. *Genetica*. 69 (2). 111-118.

Mezhzherin, S. V., Kokodii, S. V., Kulish, A. V., Verlatii, D. B., Fedorenko, L. V. 2012. Hybridization of crucian carp *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758) in Ukrainian reservoirs and the genetic structure of hybrids. *Cytology and Genetics*. 46 (1). 28-35.

Murakami, M., Matsuba, Ch., Fujitani, H. 2001. The maternal origins of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfi*): phylogenetic relationships within the *C. auratus* taxa by partial mitochondrial D-loop sequencing. *Genes & Genetic Systematics*. 76 (1). 25-32.

Muramoto, J. I. 1975. A note on triploidy of the funa. *Proceedings of the Japan Academy*. 51 (7). 583-587.

Nakamura, M. 1982. Keys to the freshwater fishes of Japan fully illustrated in colors. Hokuryukan. Tokyo. p. 140-142. (in Japanese).

Neaves, W. B., Baumann, P. 2011. Unisexual reproduction among vertebrates. *Trends in Genetics*. 27 (3). 81-88.

Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the world*. Wiley, J. & Sons, Inc. New Jersey. p. 601. ISBN: 471250317.

Nilsson, S. 1832. *Prodromus ichthyologiae Scandinavicae*. Lundae. i-iv + 1-124.

Nguyen, V. H, Ngo, S. V. 2001. Ca noc not Viet Nam. Tap I. Ho ca chep (*Cyprinidae*). [Freshwater fishes of Viet Nam. Volume I. Family *Cyprinidae*]. p. 622.

Ohara, K., Ariyoshi, T., Sumida, E., Sitizyo, K., Taniguchi, N. 2000. Natural hybridization between diploid crucian carp species and genetic independence of triploid crucian carp elucidated by DNA markers. *Zoological Science*. 17 (3). 357-364.

Ojima, Y., Yamano, T. 1980. The assignment of the nucleolar organizer in the chromosomes of the funa (*Carassius*, Cyprinidae, Pisces). *Proceedings of the Japan Academy*. 56 B (9). 551-556.

Papoušek, I., Vetešník, L., Halačka, K., Lusková, V., Humpl, M., Mendel, J. 2008. Identification of natural hybrids of gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) and crucian

carp *Carassius carassius* (L.) from lower Dyje River floodplain (Czech Republic). Journal of Fish Biology. 72 (5). 1230-1235.

Peňáz, M., Ráb, P., Prokeš, M. 1979. Cytological analysis gynogenesis and early development of *Carassius auratus gibelio*. Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae Brno. 13 (7). 1-33.

Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J. C., Flajšhans, M., Haffray, P., Colombo, L. 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture. 293 (3). 125-156.

Raicu, P., Taisescu, E., Banarescu, P. 1981. *Carassius carassius* and *C. auratus*, a pair of diploid and tetraploid representative species (Pisces, Cyprinidae). Cytologia. 46 (1/2). 233-240.

Ráb, P., Collares-Pereira, M. J. 1995. Chromosomes of European cyprinid fishes (Cyprinidae, Cypriniformes): a Review. Folia Zoologica. 44. 193-214.

Ráb, P., Collares-Pereira, M. J. 2004. Polyploidy in fishes. Distribution, origin and evolutionary significance. In: Saat, T. (Ed.). XI European Congress of Ichthyology ECI XI. Estonian Marine Institute. Tallin. p. 62-63. ISBN 9985403967.

Ráb, P., Roth, P. 1988. Metody analýzy chromozómů. In: Balíček, P., Forejt, J., Rubeš, J. (eds.). Metodologický sborník k XX. Výročnímu zasedání. Cytogenetická sekce Československé biologické společnosti při ČSAV. Brno. s. 115-124.

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*. Science Publishers. Enfield. p. 215-241. ISBN: 9781578083305.

Rábová, M., Völker, M., Pelikanová, Š., Ráb, P. 2013. Sequential chromosome bandings in fishes. In: Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Almeida Foresti, L., Pisano, E., Kapoor, B. G. (Eds.). *Techniques of Fish Cytogenetics*. Science Publishers. Enfield.

Rylková, K., Kalous, L. 2013. New finding of non-indigenous Japanese cyprinid fish in the Czech Republic. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 44 (2). 79-84.

Rylková, K., Kalous, L., Šlechtová, V., Bohlen, J. 2010. Many branches, one root: first evidence for a monophyly of the morphologically highly diverse goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture*. 302 (1). 36-41.

Rylková, K., Kalous, L., Bohlen, J., Lamatsch, D. K., Petrtyl, M. 2013. Phylogeny and biogeographic history of the cyprinid fish genus *Carassius* (Teleostei: Cyprinidae) with focus on natural and anthropogenic arrivals in Europe. *Aquaculture*. 380-383. 13-20.

Sayer, C. D., Copp, G. H., Emson, D., Godard, M. J., Zięba, G., Wesley, K. J. 2011. Towards the conservation of crucian carp *Carassius carassius*: understanding the extent and causes of decline within part of its native English range. *Journal of Fish Biology*. 79 (6). 1608-1624.

Schartl, M., Nanda, I., Schlupp, I., Wilde, B., Epplen, J. T., Schmid, M., Parzefall, J. 1995. Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature*. 373 (6509). 68-71.

Schiemer, F., Spindler, T. 2006. Endangered fish species of the Danube River in Austria. *Regulated Rivers: Research & Management*. 4 (4). 397-407.

Schlupp, I. 2005. The evolutionary ecology of gynogenesis. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*. 399-417.

Sinclair, E. A., Pramuk, J. B., Bezy, R. L., Crandall, K. A., Sites Jr., J. W. 2010. DNA evidence for nonhybrid origins of parthenogenesis in natural populations of vertebrates. *Evolution*. 64 (5). 1346-1357.

Schultz, R. J. 1980. Role of polyploidy in the evolution of fishes. In: Lewis, W. H. (ed.). *Polyploidy*. Plenum Press. New York. 13 (III). pp. 313-340. ISBN: 13: 9781461330714.

Slavík, O., Bartoš, L. 2004. What are the reasons for the Prussian carp expansion in the upper Elbe River, Czech Republic? *Journal of Fish Biology*. 65 (A). 240-253.

Smartt, J. 2007. A possible genetic basis for species replacement: preliminary results of interspecific hybridisation between native crucian carp *Carassius carassius* (L.) and introduced goldfish *Carassius auratus* (L.). *Aquatic Invasions*. 2 (1). 59-62.

Sofradžija, A., Berberović, L., Hadžiselimović, R. 1978. Hromosomske garniture karaša (*Carassius carassius*) i babuške (*Carassius auratus gibelio*). [Chromosome sets of *Carassius carassius* and *Carassius auratus gibelio*]. Ichthyologia. 10 (1). 135-148.

Sola, L., Arcangeli, R., Cataudella, S. 1986. Nucleolus organizer chromosomes in a teleostean species of tetraploid origin, *Cyprinus carpio*. Cytogenetic and Genome Research. 42 (4). 183-186.

Stöck, M., Lamatsch, D. K., Steinlein, C., Epplen, J. T., Grosse, W. R., Hock, R., Klapperstück, T., Lampert, K. P., Scheer, U., Schmid, M., Scharl, M. 2002. A bisexually reproducing all-triploid vertebrate. Nature Genetics. 30 (3). 325-328.

Stráňai, I. 2000. Karas striebřistý (*Carassius auratus gibelio*, Bloch 1782) z pohľadu ohrozenia genofondu pôvodných druhov rýb. In: Mikešová, J. (ed.). Sborník referátů z IV. České ichtyologické konference. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech. Vodňany. s. 41-45. ISBN: 8085887320.

Szczerbowski, J. A. 2002. *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758). In: Banarescu, P. M., Paepke, H-J. (eds). The Freshwater Fishes of Europe, Cyprinidae 2/III and Gasterosteidae, AULA-Verlag. Wiesbaden. p. 5-41 (III). ISBN: 3891046588.

Takada, M., Tachihara, K., Kon, T., Yamamoto, G., Iguchi, K. I., Miya, M., Nishida, M. 2010. Biogeography and evolution of the *Carassius auratus*-complex in East Asia. BMC evolutionary biology. 10 (1). 7. p. 18.

Tarkan, A. S., Copp, G. H., Zięba, G., Godard, M. J., Cucherousset, J. 2009. Growth and reproduction of threatened native crucian carp *Carassius carassius* in small ponds of

Epping Forest, south-east England. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 19 (7). 797-805.

Tarkan, A. S., Gaygusuz, Ö., Gürsoy Gaygusuz, Ç., Saç, G., Copp, G. H. 2012. Circumstantial evidence of gibel carp, *Carassius gibelio*, reproductive competition exerted on native fish species in a mesotrophic reservoir. *Fisheries Management and Ecology*. 19 (2). 167-177.

Temminck, C. J., Schlegel, G. 1842. Pisces. In: Siebold, P. F. *Fauna Japonica sive descriptio animalium, quae in itinere per Japoniam, jussu et auspiciis superiorum, qui summum in India Batava imperium tenent, suspecto annis 1823-1830 collegit, notis, observationibus et adumbrationibus illustravit*. Lugduni Batavorum Arnzt. p. 192-195.

Tóth, B., Várkonyi, E. P., Hidas, A., Meleg, E. E., Váradi, L. 2005. Genetic analysis of offspring from intra- and interspecific crosses of *Carassius auratus gibelio* by chromosome and RAPD analysis. *Journal of Fish Biology*. 66 (3). 784-797.

Ueda, T., Ojima, Y. 1978. Differential chromosomal characteristics in the funa subspecies (*Carassius*). *Proceedings of the Japan Academy: Physical and Biological Sciences*. 54 B (6). 283-288.

Vasiliev, V. P. 1985. *Evolutionary karyology of fishes*. Institute of Evolutionary Morphology and Ecology. USSR Academy of Sciences. Nauka. Moscow. p. 300. (in Russian).

Völker, M., Kullmann, H. 2006. Sequential chromosome banding from single acetic acid fixed embryos of *Chromaphyosemion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). *Cybium*. 30 (2). 171-176.

Vrijenhoek, R. C. 1989. Genetic and ecological constraints on the origins and establishments of unisexual vertebrate. In: Dawley, R. M., Bogart, J. P. (eds.). Evolution and ecology of unisexual vertebrates. University of the State of New York, State Education Department. New York State Museum. New York. p. 24-30.

Vrijenhoek, R. C. 1998. Animal clones and diversity. *Bioscience*. 48 (8). 617-628.

Vrijenhoek, R. C., Dawley, R. M., Cole, C. J., Bogart, J. P. 1989. A list of the known unisexual vertebrates. In: Dawley, R. M., Bogart, J. P. (eds.). Evolution and ecology of unisexual vertebrates. University of the State of New York. State Education Department. New York State Museum. New York. p. 19-23.

Vujošević, M., Živković, S., Rimša, D., Jurišić, S., Cakić, P. 1983. The chromosomes of nine fish species from the Dunav basin in Yugoslavia. *Acta Biologica Jugoslavica*. E 15 (2). 29-40.

Wei, W. H., Zhang, J., Zhang, Y. B., Zhou, L., Gui, J. F. 2003. Genetic heterogeneity and ploidy level analysis among different gynogenetic clones of the polyploid gibel carp. *Cytometry part A*. 56 (1). 46-52.

Wheeler, A. 2000. Status of the crucian carp, *Carassius carassius* (L.), in the UK. *Fisheries Management and Ecology*. 7 (4). 315-322.

Wheeler, A., Easton, K. 1978. Hybrids of chub and roach (*Leuciscus cephalus* and *Rutilus rutilus*) in English rivers. *Journal of Fish Biology*. 12 (2). 167-171.

Wouters, J., Janson, S., Lusková, V., Olsén, K. H. 2012. Molecular identification of hybrids of the invasive gibel carp *Carassius auratus gibelio* and crucian carp *Carassius carassius* in Swedish waters. *Journal of Fish Biology*. 80 (7). 2595–2604.

Xie, J., Wen, J. J., Chen, B., Gui, J. F. 2001. Differential gene expression in fully-grown oocytes between gynogenetic and gonochoristic crucian carps. *Gene*. 271 (1). 109-116.

Yamashita, M., Jiang, J., Onozato, H., Nakanishi, T., Nagahama, Y. 1993. A tripolar spindle formed at meiosis I assures the retention of the original ploidy in the gynogenetic triploid crucian carp, ginbuna *Carassius auratus langsdorfii*. *Development, Growth & Differentiation*. 35 (6). 631-636.

Yang, L., Mayden, R. L., Sado, T., He, S., Saitoh, K., Miya, M. 2010. Molecular phylogeny of the fishes traditionally referred to Cyprinini sensu stricto (Teleostei: Cypriniformes). *Zoologica Scripta*. 39. 527–550.

Yi, M. S., Li, Y. Q., Liu, J. D., Zhou, L., Yu, Q. X., Gui, J. F. 2003. Molecular cytogenetic detection of parental chromosome fragments in allogynogenetic gibel carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch. *Chromosome Research*. 11 (7). 665-671.

Zhang, Y., Liang, L., Jiang, P., Li, D., Lu, C., Sun, X. 2008. Genome evolution trend of common carp (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by the analysis of microsatellite loci in a gynogenetic family. *Journal of Genetics and Genomics*. 35 (2). 97-103.

Zhao, J., Liu, L. G., Chen, X. L., Qing, N., Dong, Ch. W. 2004. Karyotypic analysis of multiple teraploid allogynogenetic pengze crucian carp and its parents. *Aquaculture*. 237 (1). 117-129

Zhou, L., Gui, J. F. 2002. Karyotypic diverzity in polyploid gibel carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch. *Genetica*. 115 (2). 223-232.

Zhou, L., Wang, Y., Gui, J. F. 2000a. Analysis of genetic heterogeneity among five gynogenetic clones of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch, based on detection of RAPD molecular markers. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 88 (1-2). 133-139.

Zhou, L., Wang, Y., Gui, J. F. 2000b. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) as revealed by RAPD assays. *Journal of Molecular Evolution*. 51 (5). 498-506.

Zhu, H. P., Gui, J. F. 2007. Identification of genome organization in the unusual allotetraploid form of *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture*. 265 (1). 109-117.

Zou, Z., Cui, I., Gui, J., Yang, Y. 2001. Growth and feed utilization in two strains of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*: paternal effects in a gynogenetic fish. *Journal of Applied Ichthyology*. 17. 54-58.

10 Přílohy

10.1 Příloha I

práce I

Kalous, L., **Knytl, M.** 2011. Karyotype diversity of the offspring resulting from reproduction experiment between diploid male and triploid female of silver Prussian carp, *Carassius gibelio* (Cyprinidae, Actinopterygii). *Folia Zoologica*. 60 (2). 115-121.

Karyotype diversity of the offspring resulting from reproduction experiment between diploid male and triploid female of silver Prussian carp, *Carassius gibelio* (Cyprinidae, Actinopterygii)

Lukáš KALOUS^{1,2} and Martin KNYTL¹

¹Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Zoology and Fisheries, 165 21 Praha 6-Suchbátov, Czech Republic; e-mail: kalous @af.czu.cz

²Joint Laboratory of Genetics, Physiology and Reproduction of Fishes of Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., 277 21 Liběchov and University of South Bohemia in České Budějovice, Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, 389 25 Vodňany, Czech Republic

Received 8 June 2010; Accepted 25 November 2010

Abstract. Populations of silver Prussian carp (*Carassius gibelio*) are known to exhibit different ploidy levels among their individuals. No consistent information is available regarding chromosome number of triploid biotype. Generally diploids have 100 chromosomes while triploids have 150–160 chromosomes. The karyotype of the *C. gibelio* triploid biotype is characterized by a variable number of small chromosomal elements called supernumerary chromosomes. Here we report the results of a reproduction experiment between a diploid male and triploid female with respect to chromosome numbers of the parents and their offspring. Thirty metaphases of both parents and fifteen individuals of the offspring were investigated. We found variability in chromosome numbers among analysed offspring with a fluctuation from 150 to 159. In comparison, the chromosome numbers of male and female individuals were found to be 100 and 159 respectively. Our results show a high chromosomal plasticity of the *Carassius gibelio* triploid biotype.

Key words: cytogenetic, chromosome number, ploidy level, hybridization

Introduction

Silver Prussian carp (*Carassius gibelio*, Bloch, 1782) occurs in a vast territory of Eurasia in two main biotypes: diploid – evolutionary tetraploid with 100 chromosomes and triploid – evolutionary hexaploid with approximately 150 chromosomes (Kottelat & Freyhof 2007). The triploid biotype is also known for its gynogenetic form of reproduction – sperm dependent parthenogenesis (Golovinskaya et al. 1965, Peňáz et al. 1979). Some authors use the term allogynogenesis to describe a specific form of reproduction of silver Prussian carp wherein the male sperm partially contributes to the genome of offspring (Yi et al. 2003, Zhao et al. 2004).

The original distribution of silver Prussian carp throughout Europe is unclear due to a number of introductions, confusion with feral goldfish (*Carassius auratus*), as well as misinterpretation of the taxonomical status of *C. gibelio* in older literature (Kottelat 1997, Kalous et al. 2004). Although there are many ambiguities of the origin; the expansion of the triploid biotype of *C. gibelio* in Central Europe is well documented (Holčík & Žitňan 1978). Lusk et al. (1977) described the first occurrence of an all female population of *C. gibelio* in a lower stretch of the River Dyje in the territory of the Czech Republic. The study of Peňáz et al. (1979) and Lusk & Baruš (1978) revealed that the fish were all triploids and female,

and therefore should reproduce only gynogenetically. The carp aquaculture in the Czech Republic was then responsible for the expansion of the triploid biotype of *C. gibelio* to two other major European basins of the Elbe and Oder. This was caused by a number of reasons, e.g. the accidental introduction of silver Prussian carp into common carp stock or its use as baitfish by anglers, as well as its occasional escapes during the draining of ponds or due to floods (Lusk et al. 1980, Kubečka 1989, Slavík & Bartoš 2004). Surprisingly, at the beginning of the 1990's, males and diploids started to appear within the population of *C. gibelio* in the River Dyje alluvium (Halačka et al. 2003, Lusková et al. 2004). In a relatively short time, the once all female triploid population transformed to a diploid-polyploid complex with various percentages of males reaching 43 % (Vetešník 2005). Similar

and Hydrobiology in Vodňany, Czech Republic. Prior to any handling, the fish were anaesthetized with 0.6 ml.l⁻¹ 2-phenoxyethanol (Merck Co., Darmstadt, Germany). Hormonal stimulation and gamete collection followed the methodology of Linhart et al. (2003), while fertilization and egg incubation in experimental trays were carried out according to Linhart et al. (2006). Blood was sampled according to Svobodová et al. (1991). Ploidy levels of both specimens were determined as a relative DNA content in erythrocytes by means of flow cytometry (Partec CCA I; Partec GmbH, EU) using 4', 6-diamidino-2-phenylindol (DAPI). Samples were processed according to Flajšhans et al. (2008). Erythrocytes of a diploid male gave a relative DNA content of 2n as the diploid standard.

A number of the hatched offspring (approximately

Table 1. Chromosome numbers of *Carassius gibelio* reported from Europe.

Locality	Numbers of chromosomes	Reference
Belarus	94, 141	Cherfas (1966)
Former Yugoslavia	160	Vujosevic et al. (1983)
Czech Republic	160 (166)	Peňáz et al. (1979)
Romania	98	Raicu et al. (1981)
Former Yugoslavia	158	Fister & Soldatovic (1989)
Poland	100, 150	Boroń (1994)
Hungary	100, 148–156	Tóth et al. (2005)

complexes were also recorded from other places in Europe (Černý & Sommer 1994, Abramenko et al. 1998, Tóth et al. 2000). Few cytogenetic studies exist on the European population of *C. gibelio* and the results are quite variable especially in the triploid biotype – see Table 1. In any case, cytogenetics can be considered a crucial approach in explaining mechanisms of mysterious phenomena within former all female populations of *C. gibelio* such as a sudden appearance of males and a ploidy level reduction from 3n to 2n in a short period (Ráb et al. 2007). Here we present the results of a reproduction experiment between diploid male and triploid female originating from the locality where the population of silver Prussian carp was originally established within the Czech Republic.

Material and Methods

Parental fish were captured during the spring of 2006 in alluvium of the River Dyje close to its confluence with the River Morava, in South Moravia – Czech Republic. Fish were transported to the University of South Bohemia, Research Institute of Fish Culture

and 100 fish larvae) and both parental specimens were subsequently kept in aquaria until chromosome preparation was carried out.

Parental male and female were investigated using a standard direct procedure for chromosome preparation from the kidneys according to Ráb & Roth (1988). Both male and female nuclei suspensions were dropped on slides and air-dried.

Fifteen specimens of offspring were investigated from 2008 to 2010 using a non-destructive method of chromosome preparation from regenerated tissue of caudal fin; a slightly modified protocol of Völker & Kullmann (2006) was used. The result of a single preparation was, in most cases, composed of two slides with three nuclei rings per specimen. Staining was processed in a buffered 5 % solution of Giemsa-Romanowski for 10 minutes, and 30 best metaphase spreads per individual were examined each time using a system composed of a Microscope Olympus BX41TF (magnification 1000 ×), an Olympus SP-350 digital camera and a computer with QuickPHOTO MICRO version 2.3 software (PROMICRA, s.r.o., Praha, Czech Republic) running on Microsoft® Windows® XP.

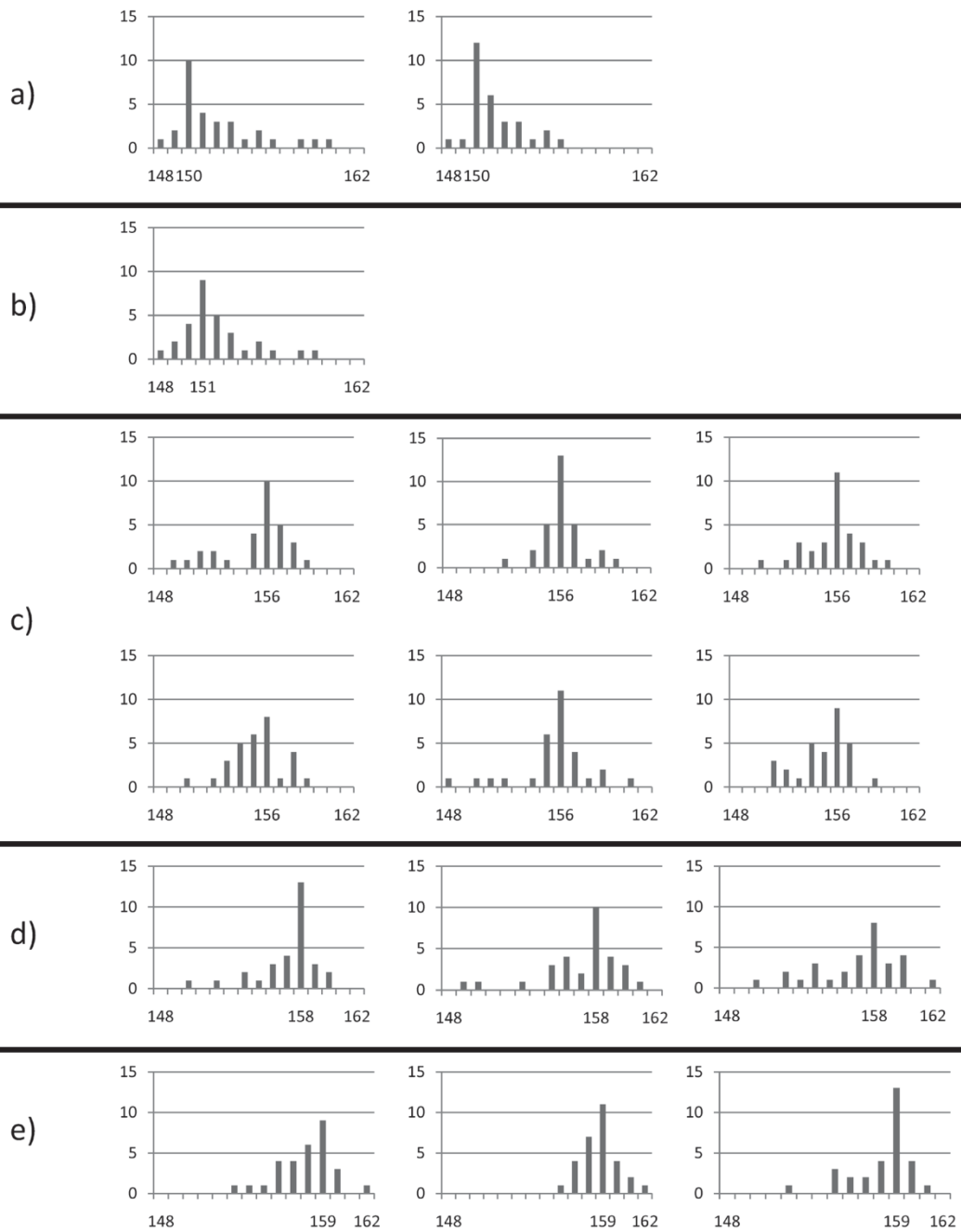


Fig. 1. Frequency distribution of chromosome numbers of individuals of offspring resulting from reproduction experiment. a) two individuals with modal number of chromosomes 150, b) one individual with modal number of chromosomes 151, c) six individuals with modal number of chromosomes 156, d) three individuals with modal number of chromosomes 158, e) three individuals with modal number of chromosomes 159.

Chromosome counting was carried out on a PC through the use of QuickPHOTO-MICRO version 2.3 software with a “Counting Points” function. We counted all chromosomes and chromosomal structures, and we did not separate microchromosomes due to their difficult definition and unclear size limits with respect to others chromosomes.

Results

Male and female were identified by flowing cytometry as diploid and triploid respectively. The modal chromosome number of diploid parental male was 100 (70.0 % of investigated metaphases) and the modal chromosome number of triploid female was 159 (46.6 % of investigated metaphases). Fifteen analysed individuals of offspring were divided into five groups with different chromosome numbers – see Fig. 1.

Discussion

Several decades after the appearance of the *C. gibelio* triploid biotype in the territory of the Czech Republic, a fascinating change of ploidy and the male female ratio within the population was observed. A cytogenetic study, conducted shortly after the appearance of all female triploid biotype of *C. gibelio* in South Moravia, recorded 160 chromosomes and six microchromosomes (Peňáz et al. 1979). Unfortunately, no other karyological data from the Czech Republic have been available since 1979.

Our analysis of *C. gibelio* caught in the same locality after almost 30 years revealed different chromosome numbers for male and female, 100 (Fig. 2) and 159 (Fig. 3) respectively. A reproduction experiment of the 2n male and 3n female shows a variability of chromosome numbers in 15 specimens of the offspring (sex undetermined). It is clear that the *C. gibelio* triploid biotype does not bear a defined number of chromosomes, although it does oscillate above 150. This is in agreement with Zhou & Gui (2002) and supports the hypothesis of close relations between East Asian and European populations of triploid biotypes of silver Prussian carp (Kalous & Šlechtová 2004, Kalous et al. 2007) in terms of karyology. The presented findings can also explain inequality in older literature regarding chromosome numbers of *C. gibelio* in Europe (see Table 1). In previous times, authors commonly investigated only few specimens from one locality caught at the same time, and therefore they came to the conclusion that the triploid biotype of *C. gibelio* possesses only one specific number of chromosomes. There is also always a high probability of error when the chromosomes in

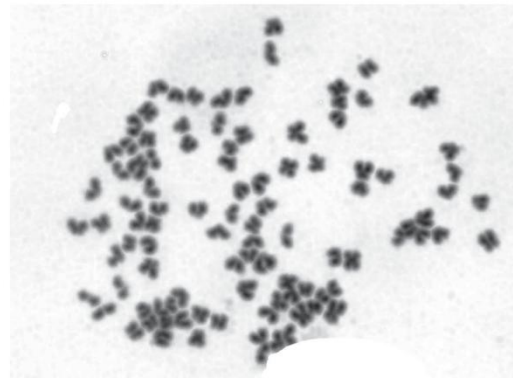


Fig. 2. Metaphase of diploid male parent of silver Prussian carp ($2n = 100$) ($\times 1000$).



Fig. 3. Metaphase of triploid female parent of silver Prussian carp ($3n = 159$) ($\times 1000$).

metaphases are counted; this is primarily due to their high numbers, small size, and the presence of small chromosomal elements called microchromosomes or supernumerary chromosomes (Boroń 1994). Although many authors published karyotypes of *C. gibelio*, they are generally in disagreement. Without additional staining or *in situ* hybridisation it is very complicated to be oriented in karyological structure. We therefore present only chromosome numbers gained from a sizable dataset. Fifteen analysed individuals of the offspring were divided into five groups according to

their modal chromosome numbers: 150, 151, 156, 158 and 159. This variability supports a process of interaction between male and female gametes after the fertilization of eggs from 3n individual with the sperm of 2n male. In any case, this interaction leads to a production of triploid offspring. Since a genetic analysis of progeny was not performed, we can not be sure whether these are recombinant offspring, or that

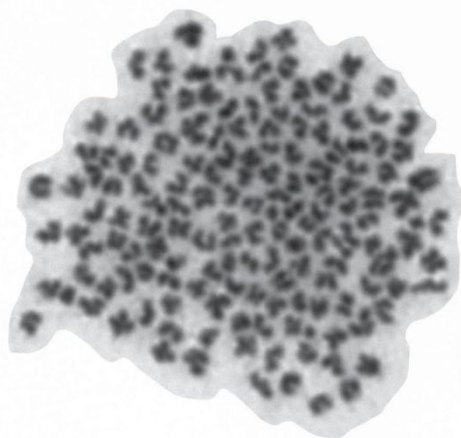


Fig. 4. Metaphase of triploid offspring specimens of silver Prussian carp with most common chromosome number ($3n = 156$) ($\times 1000$).

some/all of the individuals are of gynogenetic origin. The most common modal chromosome number of offspring was 156 (Fig. 4), which is also often recorded from other studies (Yi et al. 2003, Zhao et al. 2004). Tóth et al. (2005) found 148-156 chromosomes within the offspring of diploid male and triploid female. Unfortunately, the authors grouped together the chromosome numbers of analysed specimens resulting from the aforementioned reproduction experiment, and it is not clear if the variability was observed among the offspring or just within the metaphases.

The dual reproduction modes, including gynogenesis and sexual reproduction, have been demonstrated to coexist in the triploid silver Prussian carp (Gui & Zhou 2010). In other words, when the eggs are inseminated by heterologous sperm from other species, they produce a clonal lineage of all females by gynogenesis. However, when homologous sperm of triploid (evolutionary

hexaploid) male inseminate eggs of triploid (evolutionary hexaploid) female, the responding development mode is sexual reproduction, which produces recombinant offspring. This reproduction strategy requires production of sperm with a "haploid" chromosome number (in triploids this means a 1.5 ploidy level). The discovery of haploid sperm production of diploid *C. gibelio* males and aneuploid sperm production (close to 1.5n) in triploid *C. gibelio* males was proven by Flajšhans et al. (2008). The theoretical fertilization of eggs of 3n female by homologous sperm (1n) of diploid male should result in offspring with approximately 125 chromosomes. Our results do not support this hypothesis because all of the analysed specimens of the offspring were identified to be triploids with at least 151 chromosomes. It seems that silver Prussian carp with 125 chromosomes are rare, or the number of chromosomes is not in accordance with the viability of fertilized egg or even cannot be formed in ova.

The variability in karyological structure was found in the gynogenetic fish *Poecilia formosa*, which is of hybrid origin (Lamatsch et al. 2004). Hybridisation is considered a main evolutionary factor in the occurrence of gynogenetic polyploid animals (Dawley 1989, Vrijenhoek et al. 1989). In the case of triploid biotype of *C. gibelio*, it is not clear which species could have been the parental ones. However, recent findings of a much higher genetic variability of the genus *Carassius* in Eurasia presented by Takada et al. (2010) and Rylková et al. (2010) open new perspectives in finding a potential parental species.

Acknowledgements

We thank Martin Flajšhans and his colleagues from FROV, JČU in Vodňany for the reproduction of fish, flow cytometry analyses, and his valuable advices regarding the problems associated with ploidy levels of silver Prussian carp. We also thank Šárka Pelikánová and Jörg Bohlen for their meticulous care of the fish. We appreciate proof reading of the manuscript made by Brian Kavalir and finally, we are grateful to two anonymous referees for their comments and recommendations. This study was financially supported by grants: GACR 206/05/2159, IRP FAPPZ, CZU No. MSMT 604670901 and IRP IAPG No. AV0Z50450515.

Literature

Abramenko M.I., Poltavtseva T.G. & Vasetskii S.G. 1998: Discovery of triploid males in lower Don populations of the crucian carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1782). *Doklady akademii Nauk* 363 (3): 415–418. (in Russian)

- Boroň A. 1994: Karyotypes of diploid and triploid silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch). *Cytobios* 80: 117–124.
- Cherfas N.B. 1966: The natural triploidy in females of unisexual form of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*, Bloch). *Genetika* 5: 16–24. (in Russian)
- Černý J. & Sommer N. 1994: Age, growth and production of the silver crucian carp (*Carassius auratus* L.) in a former side-arm of the middle River Danube in 1985–1990. *Biológia (Bratislava)* 49: 247–254. (in Slovak)
- Dawley R.M. 1989: An introduction to unisexual vertebrates. In: Dawley R.M. & Bogart J.P. (eds.), Evolution and ecology of unisexual vertebrates. *Bulletin* 466, New York State Museum, Albany, New York: 1–18.
- Fister S. & Soldatovic B. 1989: Karyotype analysis of a gynogenetic population of *Carassius auratus gibelio*, Bloch (Cyprinidae) from Pancevacki Rit. *Acta Veterinaria-Beograd* 39 (5–6): 259–268.
- Flajšhans M., Rodina M., Halačka K., Vetešník L., Gela D., Lusková V. & Lusk S. 2008: Characteristics of sperm of polyploid Prussian carp, *Carassius gibelio* (Bloch). *J. Fish Biol.* 73: 323–328.
- Golovinskaya K.A., Romashov D.D. & Cherfas N.B. 1965: Unisexual and bisexual crucian carp (*Carassius auratus gibelio*, Bloch) forms. *Vopr. Ikhtiol.* 5: 614–629. (in Russian)
- Gui J.F. & Zhou L. 2010: Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio*. *Sci. China Life Sci.* 53: 409–415.
- Halačka K., Lusková V. & Lusk S. 2003: *Carassius* “gibelio” in fish communities of the Czech Republic. *Ecohydrology & Hydrobiology* 3 (1): 133–138.
- Holčík J. & Žitňan R. 1978: On the expansion and origin of *Carassius auratus* in Czechoslovakia. *Folia Zool.* 27: 279–288.
- Kalous L., Bohlen J. & Ráb P. 2004: What fish is *Carassius gibelio*: taxonomic and nomenclatoric notes. *ECI XI, Tallin 2004, Abstract Book*: 26–27.
- Kalous L. & Šlechtová V. 2004: *Carassius gibelio* autochthonous or exotic species in Europe: molecular phylogenetic evidence. *ECI XI, Tallin 2004, Abstract Book*: 122.
- Kalous L., Šlechtová V., Jr., Bohlen J., Petrýl M. & Švátora M. 2007: First European record of *Carassius langsdorffii* from the Elbe basin. *J. Fish Biol.* 70 (Suppl. A): 132–138.
- Kottelat M. 1997: European freshwater fishes. *Biologia Bratislava* 52 (Suppl. 5): 51–53.
- Kottelat M. & Freyhof J. 2007: Handbook of European freshwater fishes. 1st ed. *Publications Kottelat, Cornol, Switzerland*.
- Kubečka J. 1989: Spreading of the German Carp, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), in the middle course of the Elbe River. *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.* 3: 43–50. (in Czech)
- Lamatsch D.K., Nanda I., Schlupp I., Eppel J.T., Schmid M. & Scharl M. 2004: Distribution and stability of supernumerary microchromosomes on natural populations of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Cytogenet. Genome Res.* 106: 189–194.
- Linhart O., Rodina M., Gela D., Kocour M. & Rodriguez M. 2003: Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of eggs stickiness. *Aquat. Living Resour.* 16: 450–456.
- Linhart O., Rodina M., Flajšhans M., Mavrodiev N., Nebesařová J., Gela D. & Kocour M. 2006: Studies on sperm of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* (L.). *Aquacult. Int.* 14: 9–25.
- Lusk S., Baruš V. & Veselý V. 1977: On the occurrence of *Carassius auratus* in the Morava River drainage area. *Folia Zool.* 26: 377–381.
- Lusk S. & Baruš V. 1978: Morphometric features of *Carassius auratus* from the drainage area of the Morava River. *Folia Zool.* 27: 177–190.
- Lusk S., Baruš V. & Kirka A. 1980: Current spreading and importance of the gibel (*Carassius auratus gibelio*, Bloch) in Czechoslovakia. *Živočišná výroba* 25 (11): 871–878. (in Czech with English summary)
- Lusková V., Halačka K., Vetešník L. & Lusk S. 2004: Changes of ploidy and sexuality status of “*Carassius auratus*” populations in the drainage area of the River Dyje (Czech Republic). *Ecohydrology & Hydrobiology* 4 (2): 165–171.
- Peňáz M., Ráb P. & Prokeš M. 1979: Cytological analysis, gynogenesis and early development of *Carassius auratus gibelio*. *Acta Sc. Nat. Brno* 13 (7): 1–33.
- Ráb P. & Roth P. 1988: Cold-blooded vertebrates. In: Balíček P., Forejt J. & Rubeš J. (eds.), Methods of chromosome analysis. *Cytogenet. Biol. Soc. Brno*: 115–124. (in Czech)
- 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 2007. *Science Publishers, Enfield*: 215–241.
- Raicu P., Taisescu E. & Bănărescu P. 1981: *Carassius carassius* and *C. auratus*, a pair of diploid and tetraploid representative species (Pisces, Cyprinidae). *Cytologia* 46: 233–240.
- Rylková K., Kalous L., Šlechtová V. & Bohlen J. 2010: Many branches, one root: first evidence for a monophyly of the morphologically highly diverse goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture* 302: 36–41.
- Slavík O. & Bartoš L. 2004: What are the reasons for the Prussian carp expansion in the upper Elbe River, Czech Republic? *J. Fish Biol.* 65 (Suppl. A): 240–253.
- Svobodová Z., Pravda D. & Paláčková J. 1991: Unified methods of haematological examination of fish. *Manuals of Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodňany* 22: 31.
- Takada M., Tachihara K., Kon K., Yamamoto G., Iguchi K., Miya M. & Nishida M. 2010: Biogeography and evolution of the *Carassius auratus* – complex in East Asia. *BMC Evol. Biol.* 10: 7.
- Tóth B., Váradi L., Várkonyi E. & Hidas A. 2000: Silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*, Bloch) in the Danube river basin. *Tiscia monograph series* 42: 61–65.
- Tóth B., Várkonyi E., Hidas A., Edviné Meleg E. & Váradi L. 2005: Genetic analysis of offspring from intra- and interspecific crosses of *Carassius auratus gibelio* by chromosome and RAPD analysis. *J. Fish Biol.* 66: 784–797.
- Vetešník L. 2005: Biological characteristic of silver Prussian carp (*Carassius auratus*) under the aspect of different ploidy level between individuals. *Ph.D. thesis at Mendel University in Brno*.
- Völker M. & Kullmann H. 2006: Sequential chromosome banding from single acetic acid fixed embryos of *Chromaphyseion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). *Cybium* 30: 171–176.
- Vrijenhoek R.C., Dawley R.M., Cole C.J. & Bogart J.P. 1989: A list of known unisexual vertebrates. In: Dawley R. & Bogart J. (eds.), Evolution and ecology of unisexual vertebrates. *Bulletin* 466. Albany, New York State Museum: 19–23.
- Vujosevic M., Zivkovic S., Rimsa D., Jurisic S. & Cakic P. 1983: The chromosomes of 9 fish species from the Danube basin in Yugoslavia. *Acta. Biol. Jug.-Ichthyologia* 15: 29–40.
- Yi M.S., Li Y.Q., Liu J.D., Zhou L., Yu Q.X. & Gui J.F. 2003: Molecular cytogenetic detection of paternal chromosome fragments in allogynogenetic gibel carp, *Carassius auratus gibelio*, Bloch. *Chromosome Res.* 11: 665–671.
- Zhao J., Liu L.G. & Chen X.L. 2004: Karyotypic analysis of the multiple tetraploid allogynogenetic Pengze crucian carp and its parents. *Aquaculture* 237: 117–129.
- Zhou L. & Gui J.F. 2002: Karyotypic diversity in polyploid gibel carp, *Carassius auratus gibelio*, Bloch. *Genetica* 115: 223–232.

10.2 Příloha II

práce II

Knytl, M., Kalous, L., Symonová, R., Rylková, K., Ráb, P. 2013. Chromosome studies of European cyprinid fishes: cross-species painting reveals natural allotetraploid origin of a *Carassius* female with 206 chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*. 139 (4). 276-283.

Chromosome Studies of European Cyprinid Fishes: Cross-Species Painting Reveals Natural Allotetraploid Origin of a *Carassius* Female with 206 Chromosomes

M. Knytl^a L. Kalous^a R. Symonová^b K. Rylková^a P. Ráb^b^aDepartment of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, and ^bLaboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, AS CR v.v.i., Liběchov, Czech Republic

© Free Author Copy – for personal use only

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses required. Please contact permission@karger.ch

Key Words

Fish cytogenetics · Genome addition · GISH · Leaky gynogenetic reproduction · Polyploid cyprinids

Abstract

A single female with 206 chromosomes and another 26 females with 156 chromosomes identified as Prussian carp, *Carassius gibelio*, and 5 individuals with 100 chromosomes identified as crucian carp, *C. carassius*, were sampled during field survey in one locality in the upper Elbe River. To identify the origin of females with high chromosome numbers, comparative karyotype analysis, GISH, with whole *C. carassius* DNA as probe and phylogenetic positions of sampled individuals revealed by cytochrome *b* mitochondrial marker were performed. GISH showed consistently bright labeling of 50 chromosomal elements out of 206, corresponding to the haploid chromosome number of *C. carassius*. The position of these females with high chromosome numbers in a reconstructed phylogenetic tree was within the clade of *C. gibelio*, documenting its affiliation to *C. gibelio* mitochondrial, i.e. maternal lineage. Our findings indicated that the

mother of the female with high chromosome numbers was a gynogenetically reproducing 156-chromosome *C. gibelio* female and the father a bisexually reproducing *C. carassius* male. We, therefore, hypothesized that the *C. gibelio* × *C. carassius* allopolyploid female with 206 chromosomes arose by a mechanism of sperm genome addition to an unreduced egg of the mother.

Copyright © 2013 S. Karger AG, Basel

Interspecific hybridization and production of viable hybrid offspring is well known among lower vertebrates [Dawley and Bogart, 1989; Vrijenhoek, 1998; Neaves and Bauman, 2011]. The relatively higher frequency of cross-species breeding among fishes is caused by overall predominance of external fertilization in aquatic environment. Moreover, many cyprinid species share similar spawning grounds in the same time that indeed increases the probability of hybridization events [Wheeler and Easton, 1978]. Fishes of the genus *Carassius* are represented in Europe by 4 taxa: (1) native and highly endangered crucian carp (*C. carassius* L.) [Kottelat and

KARGER

© 2013 S. Karger AG, Basel
1424–8581/13/1394–0276\$38.00/0E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/cgrLukáš Kalous, Department of Zoology and Fisheries
Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources
Czech University of Life Sciences Prague
CZ–16521 Prague 6 (Czech Republic)
E-Mail kalous@af.czu.cz

Freyhof, 2007], (2) pan-globally distributed feral goldfish (*C. auratus* L.) [Szczerbowski, 2002], (3) recently found Japanese Ginbuna (*C. langsdorfii*, Temminck and Schlegel 1846) [Kalous et al., 2007], and (4) native Prussian carp (*C. gibelio*, Bloch 1782) [Lusková et al., 2010; Kalous et al., 2012]. Moreover, diploid-polyploid complexes within the genus *Carassius* exist throughout the vast territory of its occurrence including biotypes comprising individuals with approximately 150 chromosomes ('triploids') [Kalous and Knytl, 2011] that are often represented almost exclusively by females [Halačka et al., 2003]. These females are sperm dependent parthenogens (gynogens) that require sperm of another related species for their reproduction [Peňáz et al., 1979]. Interestingly, when the heterologous sperm enters the unreduced egg of a gynogenetic female, the biological function of a sperm is reduced to the triggering of egg development, and the resulting offspring is a clone of the mother with the same ploidy level [Golovinskaya and Romashov, 1947; Yamashita et al., 1993; Vrijenhoek, 1998; Gui and Zhou, 2010]. An appearance of a small amount of male genetic material in the genome of a gynogenetic offspring was described by Yi et al. [2003], and this phenomenon is known as paternal leakage [Tóth et al., 2005; Lamatsch and Stöck, 2009]. It was also hypothesized that such leakage can be the reason for sudden male appearance within the whole female gynogenetic populations, due to a possible interspecific transfer of sex-determining genes [Arai et al., 1995; Janko et al., 2007; Loewe and Lamatsch, 2008; Neaves and Bauman, 2011]. Hybridization between different *Carassius* species and biotypes with various ploidy levels appears to be quite common [Mezhzheryn et al., 2012]. Hybridization between *C. carassius* and *C. gibelio* in alluvium of the Thaya River, Danube River basin, was recently demonstrated by microsatellite analyses [Papoušek et al., 2008]. Similarly, a recent ongoing hybridization process between native crucian carp *C. carassius* and introduced goldfish *C. auratus* was described from the British Isles by Hänfling et al. [2005] and from Sweden by Wouters et al. [2012]. Even intergeneric hybridization between the fishes of the genera *Carassius* and *Cyprinus* were revealed by several studies [Hänfling et al., 2005; Zhu and Gui, 2006; Liu, 2010]. On the other hand, the morphological recognition and identification of such hybrids is very difficult, due to high external similarities. Here, we report a discovery and identification of a natural allotetraploid female resulting from hybridization of bisexually reproducing *C. carassius* and gynogenetically reproducing *C. gibelio*.

Materials and Methods

Fish Sampling

A single female with 206 chromosomes and another 26 females with 156 chromosomes identified morphologically as Prussian carp, *C. gibelio*, and 5 individuals with 100 chromosomes identified as crucian carp, *C. carassius*, were collected during a field survey of ichthyofauna in alluvial ponds and old oxbows of the Elbe River close to the city of Lysá nad Labem (recognized as Byšičky, GPS: 50°10'33,7" N, 14°46'25,4" E). The specimens examined were not deposited as vouchers.

Chromosome Analysis

Mitotic activity was stimulated by intraperitoneal injection of 0.1% CoCl₂ (1 ml CoCl₂/100 g body weight) 24 h before chromosome preparation. Standard direct procedures for chromosome preparation from cephalic kidney followed Ráb and Roth [1988]. To arrest cell division in metaphase, 0.1% colchicine (1 ml colchicine/100 g body weight) by intraperitoneal injection was used. Valid animal use protocols were in force at IAPG and CULS during this study.

Microscopy and Image Processing

Metaphase chromosomes stained in 4% Giemsa-Romanowski solution in phosphate buffer (pH = 7) were observed with a microscope BX41TF equipped with a digital camera Olympus SP-350, and chromosomes were counted by PC software QuickPhoto Micro. Karyotypes were constructed using PC software Ikaros (karyotyping system) version V 3.4.0 and Adobe Photoshop version CS5. Chromosome morphology was determined according to Levan et al. [1964]. Analyzed slides with recorded coordinates of selected metaphases were destained in fixative (methanol and acetic acid; 3:1, v/v) for 3 min and stored at +4°C until the GISH experiment.

Isolation of Genomic DNA

Total genomic DNA was isolated from ethanol preserved tissue using DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's protocol.

Genomic in situ Hybridization

Genomic DNA from *C. carassius* was indirectly labeled by a standard nick translation reaction using nick translation mix for in situ probes according to the manufacturer's instructions (Roche, Mannheim, Germany). Total 25 µl of hybridization mixture, containing nick translation mix, NT-dNTPs, labeled dUTPs, DNA template, and H₂O, was incubated for 90 min at 15°C. DNA was precipitated with salmon sperm (100 µg/ml), 3 M sodium acetate pH = 5.2 (25°C) and 96% ethanol. The biotin-dUTP labeled probes (Roche) were detected by either the Invitrogen (Karlsruhe, Germany) CyTM3-Streptavidin or by FITC-Streptavidin. The digoxigenin-dUTP labeled probes (Roche) were detected by either the Roche anti-digoxigenin-fluorescein or by anti-digoxigenin-rhodamine diluted according to manufacturer's instructions. Chromosome preparations were dehydrated through ethanol series (70, 80 and 96% for 3 min each) on ice and air-dried. Chromosome preparations were aged for 1 h at 37°C before and after pepsinization (3 min at 37°C 50 µl aliquot pepsin, 1 N HCl and distilled H₂O).

Hybridization and detection during GISH experiments were carried out as described by Cremer et al. [2008]. Slides were dehydrated through ethanol series, air dried and aged again for 45 min at 37°C. Chromosomal denaturation was carried out in 75% for-

Table 1. Material used in molecular analyses

Fish	n	Sex	Ploidy level	Chromosome number	Locality	GenBank number
<i>C. carassius</i>	5	–	2n	100	Byšičky, Elbe River, Czech Republic	JQ763597
<i>C. gibelio</i>	5	f	3n	156	Byšičky, Elbe River, Czech Republic	JQ763598
<i>C. gibelio</i> / <i>C. carassius</i>	1	f	4n	206	Byšičky	JQ763599
<i>C. gibelio</i> (neotype)	1	f	2n	–	Český Tešín, Olza River, Czech Republic	JN402305*
<i>C. auratus</i>	1	–	–	–	Nanking, Yangtze River, China	EU663598**
<i>Cyprinus sp.</i> (outgroup)	1	–	–	–	Mekong River, Thailand	HM008692*

* Sequences from Kalous et al. [2012]; ** sequence from Rylková et al. [2010]; cytochrome *b* haplotypes are deposited under the corresponding number in the GenBank.

mamid in 2× SSC (pH = 7) for 3 min at 74°C and quickly dehydrated through –20°C ethanol series and air dried. Hybridization mixture with Salmon sperm was denaturated at 86°C for 6 min and then cohybridized to target slide with the denaturated metaphases from the tetraploid *Carassius* female under a 24 × 50 mm coverslip. The slides were incubated for 48 h at 37°C in a dark room. After hybridization, slides were then washed for 2 × 10 min each in 50% formamid with 2× SSC, 3 × 7 min each in 1× SSC in water bath at 42°C and 1 × 20 s in 4× SSC at room temperature. After performing series of stringency washes, stop reaction was carried out with 2.5% BSA/4× SSC/Tween for 20 min at 37°C under a 24 × 50 mm coverslip. Chromosomes were counterstained with DAPI (4',6-diamino-2-phenylindol) combined with a mounting media (Starfish, Cambio, Cambridge, UK).

Microscopy and Image Processing

GISH images were captured with a cooled CCD camera Olympus DP30BW (equipped with a B&W CCD-Chip Sony ICX285-AL) coupled to an epifluorescence microscope Olympus AX70 equipped with a set of 3 narrowband fluorescent filters. Micrographs were captured with the Olympus Acquisition Software, and B&W images were processed with the software MicroImage. The pseudocolor images were analyzed using the Adobe Photoshop Version CS5. Altogether, 30 metaphases for each specimen were analyzed.

Molecular Analysis

Detailed information about material used for molecular analysis is listed in table 1. The cytochrome *b* gene was amplified using the methods described in Rylková et al. [2010], with the forward primer Kai_F 5'-GAAGAACCACCGTTGTATTTC-3' and reverse primer Kai_R 5'-ACCTCCRAYCTYCGGATTACA-3' [Šlechtová et al., 2006]. PCR products were purified and sequenced with Macrogen Incooperation (Seoul, Korea).

The raw chromatograms were manually assembled and checked by eye for potential mistakes using computer software BioEdit

5.0.9. [Hall, 1999]; the same program was used to align the sequences using the ClustalW algorithm. Dataset was created for cytochrome *b* analysis, and the phylogenetic relationships were estimated using the methods of maximum parsimony in PAUP* version 4.0b10 [Swofford, 2000] and Bayesian analysis using the program MrBayes version 3.0 [Huelsenbeck and Ronquist, 2001].

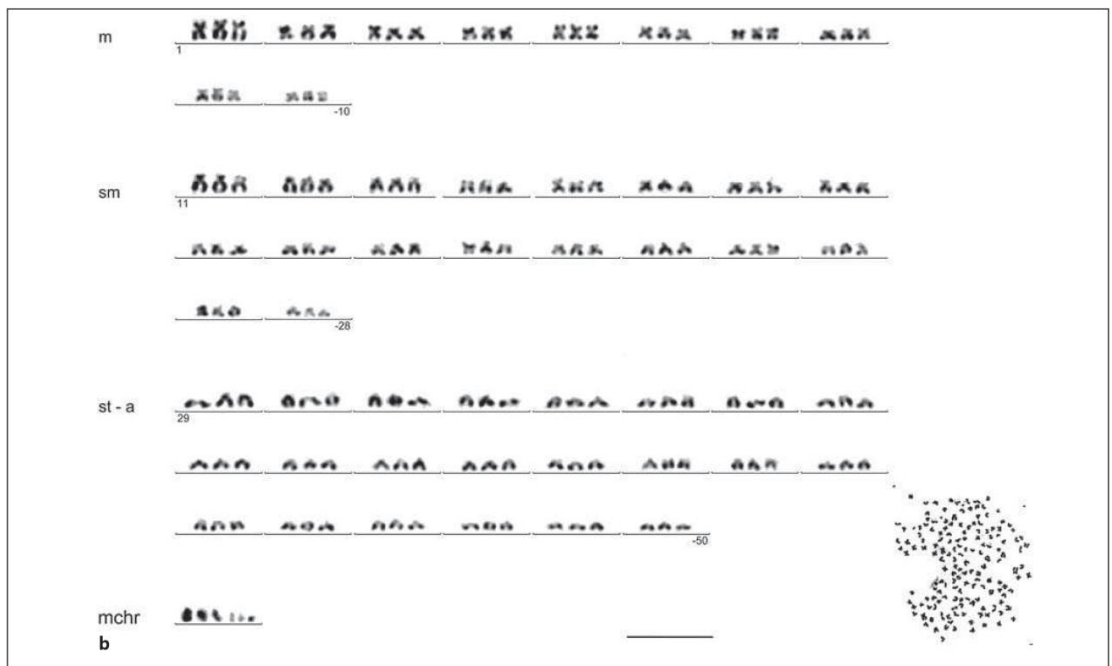
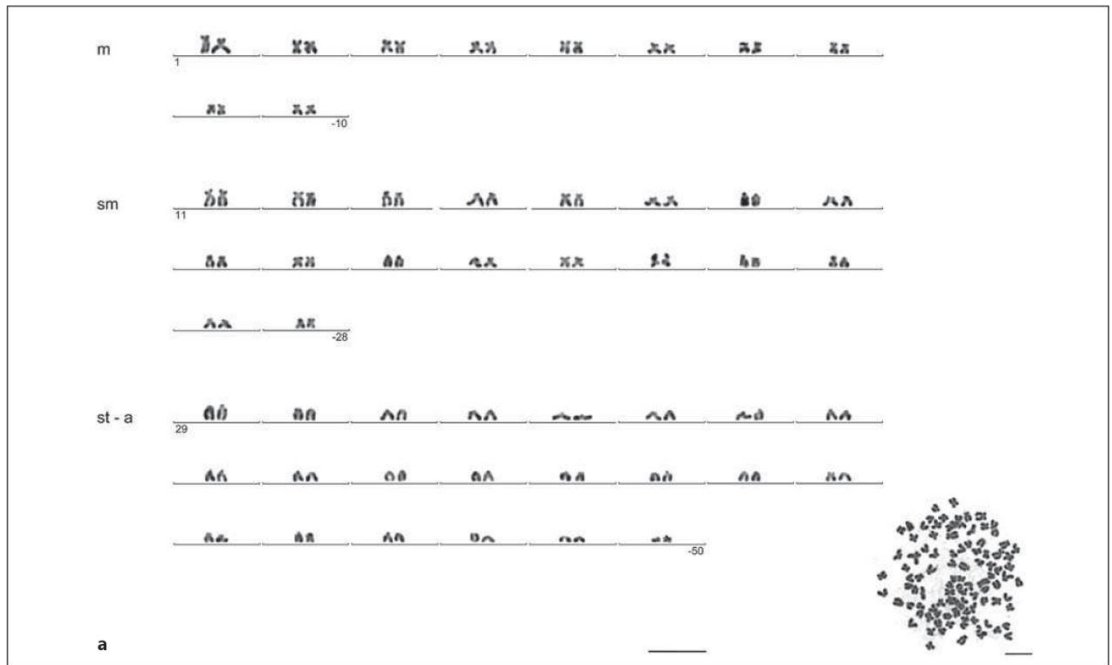
Results

Chromosome Analysis

The analyzed individuals included 3 different categories. Individuals with 2n = 100 chromosomes were unambiguously identified as *C. carassius*, and their karyotypes consisted of 10 pairs of metacentric (m), 18 pairs of submetacentric (sm) and 22 pairs of subtelo- (st) to acrocentric (a) chromosomes (fig. 1a). All other fishes were identified as females of *C. gibelio*, where 26 individuals possessed 3n = 156 chromosomes with a karyotype composed of 30 m, 54 sm, 66 st to a, and 6 microchromosomes (fig. 1b), while one female had 4n = 206 and a karyotype composed of 40 m, 72 sm, 88 st to a, and 6 microchromosomes (fig. 1c).

Genomic in situ Hybridization

Biotin-labeled *C. carassius* genomic DNA hybridized to the chromosomes of tetraploid female and provided consistently intensive fluorescent signals on 50 chromosomes (fig. 2b) with distinctly pink fluorescence well discriminated from other blue-stained chromosomes. The positively hybridized chromosomes were graphically sep-



(For legend see page 280.)

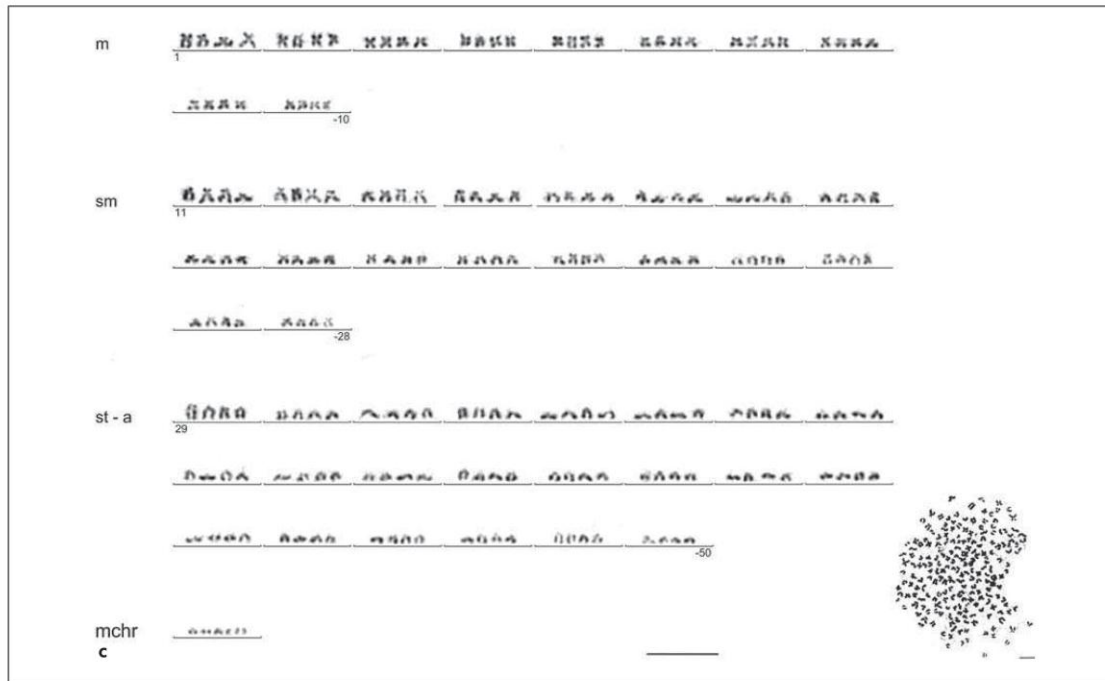


Fig. 1. Karyotype of male *C. carassius* (a), of female *C. gibelio* (b) and of female allotetraploid hybrid of *Carassius* (c), arranged from Giemsa-stained chromosomes (shown as inset). m = Metacentric; sm = submetacentric; st = subtelocentric; a = acrocentric chromosomes; mchr = microchromosomes. Scale bar = 10 μ m.

arranged in the karyotype of tetraploid individual (fig. 3) and very likely corresponded to haploid chromosomes of *C. carassius* (fig. 1a).

Molecular Analyses

The final matrix of the cytochrome *b* sequences consisted of 1,110 bp containing 152 variable characters with 45 parsimony informative sites. Both employed methods have recovered topologies with high statistical supports. All 5 sequences of *C. carassius* from Byšičky showed one haplotype (GenBank accession number JQ763597); in case of *C. gibelio* from Byšičky one haplotype was found (GenBank accession number JQ763598). The position of *C. gibelio* \times *C. carassius* hybrid (GenBank accession number JQ763599) in reconstructed phylogenetic tree (fig. 4) is within the clade of *C. gibelio* mitochondrial lineage indicating that the mother of the allotetraploid specimen was *C. gibelio*. Moreover, the hybrid and 5 individuals of *C. gibelio* from Byšičky shared the same haplotype.

Discussion

Our finding and subsequent genetic analyses of a natural allotetraploid female of the genus *Carassius* revealed its interspecific origin and combination of 3 chromosome sets of *C. gibelio* and a haploid one of *C. carassius* within one individual genome.

It was clearly demonstrated that the paternal chromosome haploid set detected by GISH analysis originated from *C. carassius*, while the maternal triploid set could be assigned by mtDNA markers to *C. gibelio*, but final confirmation must explore nuclear markers. This conclusion confirmed the previous assumptions because the males of *C. gibelio* were not found at the locality, and the local Prussian carp population consisted of triploid gynogenetic females only [Daněk et al., 2012].

Such occasional sperm genome additions in otherwise gynogenetically reproducing *Carassius* fishes are likely more common. Zhu and Gui [2006] reported on an inter-

Fig. 2. Genomic in situ hybridization experiment using biotin-labeled *C. carassius* genomic DNA to the chromosomes of a tetraploid individual. Metaphase counterstained by DAPI shows all 206 chromosomes (**a**), metaphase image stained by biotin with Cy3 filter shows 50 chromosomes originating from *C. carassius* (**b**). Scale bar = 10 μ m.

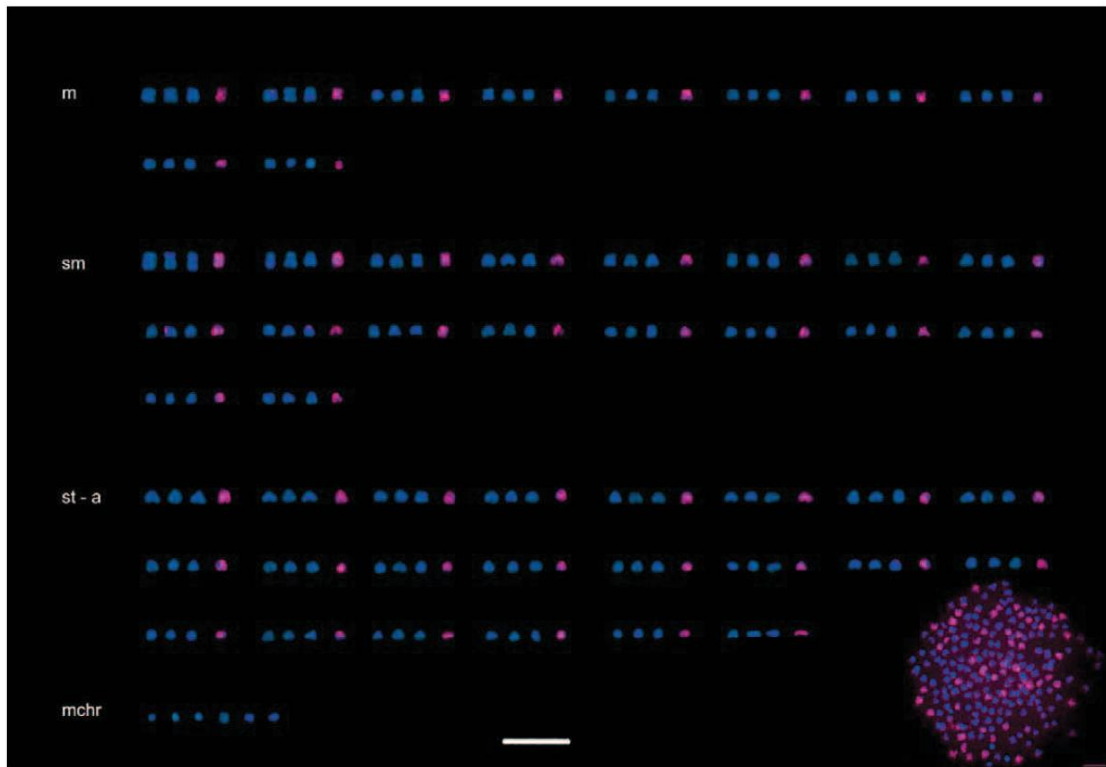
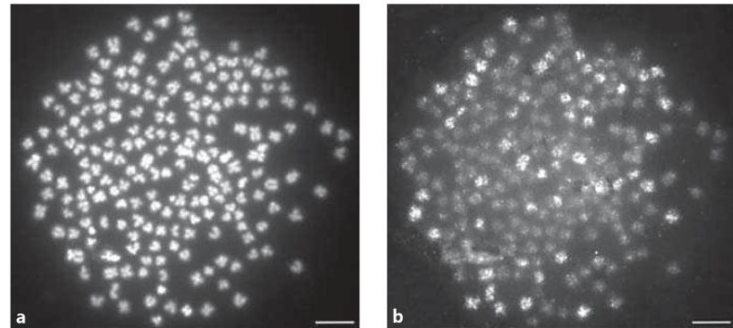


Fig. 3. Karyotype of an allotetraploid hybrid *Carassius* female with 206 pseudocolored chromosomes, DAPI (blue) and Cy3 filter (red). Scale bar = 10 μ m.

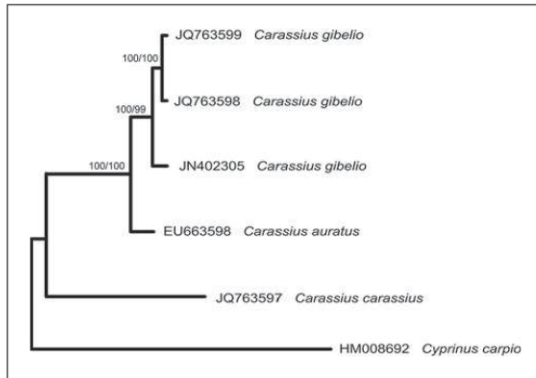


Fig. 4. Phylotree: reconstructed phylogeny of the cytochrome *b* haplotype sequences. The numbers at the nodes represent statistical supports for Bayesian and maximum parsimony analyses, respectively. As outgroup, the sequence of *Cyprinus carpio* was used.

generic hybrid from China and the cytogenetic analysis clearly showed the ratio 3 *Carassius*:1 *Cyprinus* genomes combination in the tetraploid fish. The ratio of representative genomes (*C. gibelio*:*C. carpio*) in genome of allotetraploid hybrids is the same as in our study (*C. gibelio*:*C. carassius*), thus reproducing mechanism should be at least similar in both cases.

Besides the report of Zhu and Gui [2006], our finding proved that gynogenetic triploid females of *C. gibelio* have not only the capability to maintain all chromosomes, but also the ability to elevate ploidy level via sperm incorporation.

The molecular evidence for an occurrence of natural hybrids between *C. gibelio* and *C. carassius* was already described by Papoušek et al. [2008], but all of them were considered as diploids (i.e. with 100 chromosomes) with the assumption that only diploid biotypes of *C. gibelio* could have hybridized with *C. carassius* following the model of *C. auratus* and *C. carassius* hybrids in Great Britain [Hänfling et al., 2005].

The explanation of allopolyploidization in gynogenetic Prussian carp can be attributed to the dual reproduction modes, i.e. gynogenesis and sexual reproduction as it has been described in Chinese population of polyploid biotypes of the genus *Carassius*. These 2 modes are based on recognition of homologous and heterologous sperm by ovum. When heterologous sperm enters the egg, the gynogenesis takes place; the entered sperm does not decondense until the first cleavage and triggers embryogen-

esis. Contrary, when a homologous sperm enters the egg, the responding development mode is sexual reproduction; the entered sperm decondenses and forms a male pronucleus that fuses with the female pronucleus. The established zygote undergoes recombination and removes approximately half of the maternal chromosomes from the egg or dissolves them in cytoplasm [Zhou et al., 2000; Gui and Zhou, 2010].

It seems that the ability of sperm recognition and sperm genome elimination is not flawless, and possible mistakes can result in the presence of a certain number of tetraploid individuals within the triploid and diploid biotypes of the genus *Carassius*. Although the tetraploids are rare in the natural population, they are regularly recorded from various sites in Europe, e.g. Abramenko and Kravchenko [1998], Halačka and Lusková [2000], Halačka et al. [2003], Toth et al. [2005], Liasko et al. [2010], and Mezhzheryn et al. [2012]. This raises the question of what percentage of tetraploid Prussian carps can be of allopolyploid origin, since the genome composition is not usually investigated, and fish with different ploidy levels are morphologically indistinguishable [Vasileva, 1990].

It remains unknown whether such a genome addition mechanism is associated with phylogenetically closely related *Carassius* and *Cyprinus* genomes, or another mechanism is involved, for example that a certain amount of asexual females are available for genome addition as it was described by Choleva et al. [2012], following the idea that polyploidy is not a trigger of clonality, but rather a consequence.

Acknowledgements

We thank M. Rábová and M. Pokorná for their help with the preparation of karyotypes, and we are grateful to Tomáš Daněk for the valuable information about the locality. This study was supported by the S-grant MŠMT and the project No. P506/11/P596 of the Grant Agency of the Czech Republic.

References

- Abramenko MI, Kravchenko OV: Chromosome mosaicism in somatic cells of fish from genus *Carassius* (Pisces: Cyprinidae). *Cytogenet Cell Genet* 81:123 (1998).
- Arai K, Ikeno M, Suzuki R: Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* using spermatozoa of natural tetraploids. *Aquaculture* 137:131–138 (1995).
- Choleva L, Janko K, De Gelas KD, Bohlen J, Šlechtová V, et al: Synthesis of clonality and polyploidy in vertebrate animals by hybridization between two sexual species. *Evolution* 66:2191–2203 (2012).

- Cremer M, Grasser F, Lanctôt Ch, Müller S, Neusser M, et al: Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes. *Methods Mol Biol* 463:205–239 (2008).
- Daněk T, Kalous L, Veselý T, Krásová E, Reschová S, et al: Massive mortality of Prussian carp *Carassius gibelio* in the upper Elbe basin associated with herpesviral hematopoietic necrosis (CyHV-2). *Dis Aquat Organ* 102:87–95 (2012).
- Dawley RM: An introduction to unisexual vertebrates, in Dawley RM, Bogart JP (eds): *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*, Bulletin 466, pp 1–28 (New York State Museum, Albany 1989).
- Golovinskaya KA, Romashov DD: Investigations of the gynogenesis in *Carassius auratus gibelio*, Tr. Vsesoyuz. NII prud. ryb. khoz-va 4:73–113 (1947).
- Gui JF, Zhou L: Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio*. *Sci China Life Sci* 53:409–415 (2010).
- Halačka K, Lusková V: Polyploidy in silver crucian carp (*Carassius auratus*) in lower reaches of Dyje river – determination according to erythrocyte nuclear sizes, in Mikešová J (ed): *Sborník referátů IV. Česká ichthyologická konference*, pp 110–113 (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářská a hydrobiologický, Vodňany 2000).
- Halačka K, Lusková V, Lusk S: *Carassius gibelio* in fish communities of the Czech Republic. *Ecology Hydrobiol* 3:133–138 (2003).
- Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98 (1999).
- Hänfling B, Bolton P, Harley M, Carvalho GR: A molecular approach to detect hybridisation between crucian carp (*Carassius carassius*) and non-indigenous carp species (*Carassius* spp. and *Cyprinus carpio*). *Freshwater Biol* 50:403–417 (2005).
- Huelsensbeck JP, Ronquist F: MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754–755 (2001).
- Janko K, Bohlen J, Lamatsch DK, Flajšhans M, Epplen JT, et al: The gynogenetic reproduction of diploid and triploid hybrid spined loaches (Cobitidae: Teleostei), and their ability to establish successful clonal lineages—on the evolution of polyploidy in asexual vertebrates. *Genetica* 131:185–194 (2007).
- Kalous L, Knytl M: Karyotype diversity of the offspring resulting from reproduction experiment between diploid male and triploid female of silver Prussian carp, *Carassius gibelio* (Cyprinidae, Actinopterygii). *Folia Zool* 60:115–121 (2011).
- Kalous L, Šlechtová V jr, Bohlen J, Petrtyl M, Švátora M: First European record of *Carassius langsdorffii* from the Elbe basin. *J Fish Biol* 70:132–138 (2007).
- Kalous L, Bohlen J, Rylková K, Petrtyl M: Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for *Carassius gibelio* (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyol Explor Freshwaters* 23:11–18 (2012).
- Kottelat M, Freyhof J: *Handbook of European Freshwater Fishes* (Publications Kottelat, Cornol, Freyhof, Berlin 2007).
- Lamatsch DK, Stöck M: Sperm-dependent parthenogenesis and hybridogenesis in teleost fishes, in Schön I, Martens K, van Dijk P (eds): *Lost Sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis*, pp 399–432 (Springer, Dordrecht 2009).
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201–220 (1964).
- Liasko R, Liousia V, Vrazeli P, Papiggioti O, Chortatou R, et al: Biological traits of rare males in the population of *Carassius gibelio* (Actinopterygii: Cyprinidae) from Lake Pamvotis (north-west Greece). *J Fish Biol* 77:570–584 (2010).
- Liu SJ: Distant hybridization leads to different ploidy fishes. *Sci China Life Sci* 53:416–425 (2010).
- Loewe L, Lamatsch DK: Quantifying the threat of extinction from Muller's ratchet in the diploid Amazon molly (Poecilia formosa). *BMC Evol Biol* 8:88 (2008).
- Lusková V, Lusk S, Halačka K, Vetešník L: *Carassius auratus gibelio* – the most successful invasive fish in waters of the Czech Republic. *Russian Journal of Biol Invasions* 1:176–180 (2010).
- Mezhzheryn SV, Kokodyi SV, Kulysh AV, Verlat'iii DB, Fedorenko LV: Hybridization of crucian carp *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758) in Ukrainian reservoirs and genetic structure of hybrids. *Tsitol Genet* 46:37–46 (2012).
- Neaves WB, Bauman P: Unisexual reproduction among vertebrates. *Trends Genet* 27:81–88 (2011).
- Papoušek I, Vetešník L, Halačka K, Lusková V, Humpl M, Mendel J: Identification of natural hybrids of gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) and crucian carp *Carassius carassius* (L.) from lower Dyje River floodplain (Czech Republic). *J Fish Biol* 72:1230–1235 (2008).
- Peňáz M, Ráb P, Prokeš M: Cytological analysis, gynogenesis and early development of *Carassius auratus gibelio*. *Acta Sci Nat* 13:1–33 (1979).
- Ráb P, Roth P: Cold-blooded vertebrates, in Balíček P, Forejt J, Rubeš J (eds): *Methods of Chromosome Analysis*, pp 115–124. (Czechoslovak Biological Society Publishers, Brno 1988).
- Rylková K, Kalous L, Šlechtová V, Bohlen J: Many branches, one root: first evidence for a monophyly of the morphologically highly diverse goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture* 302:36–41 (2010).
- Šlechtová V, Bohlen J, Freyhof J, Ráb P: Molecular phylogeny of the Southeast Asian freshwater fish family Botiidae (Teleostei: Cobitoidea) and the origin of polyploidy in their evolution. *Mol Phylogenet Evol* 39:529–541 (2006).
- Swofford DL: PAUP: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), Version 4 (Sinauer Associates, Sunderland 2000).
- Szczerbowski JA: *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) 5–41(III), in: Banareescu PM, Paepke H-J (eds): *The Freshwater Fishes of Europe, Cyprinidae 2/III and Gasterosteidae*, pp 1–305 (AULA-Verlag, Wiesbaden 2002).
- Tóth B, Várkonyi E, Hidas A, Meleg EE, Váradi L: Genetic analysis of offspring from intra- and interspecific crosses of *Carassius auratus gibelio* by chromosome and RAPD analysis. *J Fish Biol* 66:784–797 (2005).
- Vasileva ED: On morphological divergence of gynogenetical and bisexual forms of *Carassius auratus* (Cyprinidae, Pisces). *Zool Zh* 69:97–110 (1990).
- Vrijenhoek RC: Animal clones and diversity. Are natural clones generalists or specialists? *BioScience* 48:617–628 (1998).
- Wheeler A, Easton K: Hybrids of chub and roach (*Leuciscus cephalus* and *Rutilus rutilus*) in English rivers. *J Fish Biol* 12:167–171 (1978).
- Wouters J, Janson S, Lusková V, Olsén KH: Molecular identification of hybrids of the invasive gibel carp *Carassius auratus gibelio* and crucian carp *Carassius carassius* in Swedish waters. *J Fish Biol* 80:2595–2604 (2012).
- Yamashita M, Jiang J, Onozato H, Nakanishi T, Nagahama Y: A tripolar spindle formed at meiosis I assures the retention on the original ploidy in the gynogenetic triploid crucian carp, *Ginbuna Carassius auratus langsdorffii*. *Develop Growth Differ* 35:631–636 (1993).
- Yi MS, Li YQ, Liu JD, Zhou L, Yu QX, Gui JF: Molecular cytogenetic detection of paternal chromosome fragments in allogynogenetic gibel carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch. *Chromosome Res* 11:665–671 (2003).
- Zhou L, Wang Y, Gui JF: Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) as revealed by RAPD assays. *J Mol Evol* 51:498–506 (2000).
- Zhu H-P, Gui JF: Identification of genome organization in the unusual allotetraploid form of *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture* 265:109–117 (2006).

10.3 Příloha III

práce III

Knytl, M., Kalous, L., Ráb, P. 2013. Karyotype and chromosome banding of endangered crucian carp, *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758) (Teleostei, Cyprinidae). *Comparative Cytogenetics*. 7 (3). 205-213.

Karyotype and chromosome banding of endangered crucian carp, *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758) (Teleostei, Cyprinidae)

Martin Knytl¹, Lukáš Kalous¹, Petr Ráb²

1 Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, 16521 Praha 6 - Suchbát, Czech Republic **2** Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, AS CR v.v.i., 277 21 Liběchov, Czech Republic

Corresponding author: Lukáš Kalous (kalous@af.czu.cz)

Academic editor: V. Gokhman | Received 26 April 2013 | Accepted 31 July 2013 | Published 23 August 2013

Citation: Knytl M, Kalous L, Ráb P (2013) Karyotype and chromosome banding of endangered crucian carp, *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758) (Teleostei, Cyprinidae). *Comparative Cytogenetics* 7(3): 205–215. doi: 10.3897/CompCytogen.v7i3.5411

Abstract

The karyotype and other chromosomal characteristics the crucian carp (*Carassius carassius* (Linnaeus, 1758)) were revealed by means of conventional banding protocols (C, CMA₃, AgNOR). The diploid chromosome number (2n) in this species was 100. Its karyotype was composed of 10 pairs of metacentric, 18 pairs of submetacentric and 22 pairs of subtelo- to acrocentric chromosomes without any microchromosomes. C-banding identified blocks of telomeric heterochromatin on seven chromosome pairs. The NORs were situated on the p arms of the 14th pair of submetacentric chromosomes and on the p arms of the 32nd pair of subtelo-acrocentric chromosomes; AgNOR-positive signals corresponded to the CMA₃-positive signals. These chromosome characteristics may suggest a paleo-allotetraploid origin of *C. carassius* genome.

Keywords

Fish cytogenetics, paleotetraploid, heterochromatin, metaphase chromosomes

Introduction

The crucian carp, *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758), is a cyprinid fish that inhabits densely vegetated backwaters and oxbows of lowland rivers, shallow lakes and ponds. It is a native species to Europe with a distribution extending eastwards from the River Rhine to the River Kolyma in Siberia (Szczerbowski 2002, Kottelat and Freyhof 2007). Despite its ability of “tissue breathing” (Blažka 1958) which helps it to survive in unfavourable conditions, the crucian carp has undergone a substantial decline in many localities during the last decades (Navodaru et al. 2002, Kottelat and Freyhof 2007, Sayer et al. 2011). Indisputable disappearance from nature resulted in the inclusion of the crucian carp in the list of endangered species by authorities of several EU countries (Economidis 1995, Schiemer and Spindler 2006, Copp et al. 2008, Sayer et al. 2011).

There is a number of factors that may have contributed to the disappearance of *C. carassius*, including habitat loss and degradation (Copp 1991, Holopainen and Ikari 1992, Wheeler 2000), displacement via competition with introduced species such as the polyploid biotype of the Prussian carp *Carassius gibelio* (Bloch, 1782), the Amur sleeper *Perccottus glenii* (Dybowski, 1877), feral goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) and the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) (Tarkan et al. 2012, Litvinov and O’Gorman 1996, Copp et al. 2005, Lusk et al. 2010). Moreover, all species of *Carassius* Nilsson, 1832 present in Europe (Rylková et al. 2013), including the crucian carp (*C. carassius*), Prussian carp (*C. gibelio*), ginbuna (*Carassius langsdorfii* Temminck & Schlegel, 1846) and goldfish (*C. auratus*) are often confused due to their morphological similarity (Hensel 1971, Kalous et al. 2007). Such confusion may lead to inappropriate stocking of wrong species instead of intended support of a local endangered population of crucian carp with negative consequences (Sayer et al. 2011).

Genetic contamination seems to be a very important but hidden threat to *C. carassius* that has been recently discovered. Hybridization occurs between *C. carassius* and *C. gibelio* (Prokeš and Baruš 1996). This type of hybridization was later confirmed using molecular (Papoušek et al. 2008, Wouters et al. 2012) and cytogenetic techniques (Knytl et al. 2013) in Sweden and the Czech Republic. Hybrids between *C. carassius* and *C. auratus* (Hänfling et al. 2005, Smartt 2007) and intergeneric hybrids between *C. carassius* and *Cyprinus carpio* (Hänfling et al. 2005) were discovered in England also by using microsatellite analysis. We believe that these processes also take place in other localities where *C. carassius*, *C. auratus* and/or *C. gibelio* co-occur. Moreover, molecular data suggest that these hybrids are able to reproduce and form filial generations by backcrossing (Hänfling et al. 2005, Wouters et al. 2012).

The cytogenetics of *C. carassius* is still poorly understood, since only a few studies of this species based on Giemsa-stained chromosomes are known (Table 1). Interestingly, two different diploid chromosome numbers $2n = 50$ and $2n = 100$ were reported.

Such an unclear situation encourages us to present cytogenetic analyses of *C. carassius* with respect to ongoing hybridization processes and threats in European waters. The present study deals with chromosomal characteristics of crucian carp (*C. carassius*)

Table 1. Chromosome numbers and karyotypes of *Carassius carassius* reported from Europe; NA= not available.

2n	Diploid karyotype	Locality	Source
104	20m+72sm+12a	NA	Chiarelli et al. 1969
100	20m+44sm+36a	France	Hafez et al. 1978
100	52m-sm+48 st-a	Drina R., Ukrinski Lug (Bosnia)	Sofradžija et al. 1978
100	20m+40sm+40a	the Netherlands	Kobayasi et al. 1970
50	20m+12sm+18s-ta	lower Danube R. (Romania)	Raicu et al. 1981
100	48m-sm+52st-a	Russia	Vasilev and Vasileva 1985
100	NA	Elbe R. System (Czech Republic)	Mayr et al. 1986
100	NA	Vistula R. System (Poland)	Boroń et al. 2010
100	20m+36sm+44st-a	Elbe R. System (Czech Republic)	This study

from the locality Byšičky in vicinity of the Elbe River (Czech Republic). Prussian carp (*C. gibelio*) and crucian carp co-occur in this place and the a hybrid allopolyploid female with 206 chromosomes was recently discovered there (Knytl et al. 2013). In this paper, we have used Giemsa staining as well as banding techniques like C, CMA₃, AgNOR and DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole) banding.

Material and methods

Fish sampling

Four females and one male were collected during a field survey of ichthyofauna in alluvial ponds and old oxbows of the Elbe River close to the city of Lysá nad Labem (GPS: 50°10.75' N, 14°47.62' E). All five individuals were identified morphologically as common *Carassius carassius* (not the dwarf form) according to Szczerbowski (2002) and Kottelat and Freyhof (2007). This material is deposited as voucher specimens in the collection of the Department of Zoology and Fisheries, Czech University of Life Sciences Prague under number KZR141083Cc.

Chromosome preparation and staining

All collected fish were subjected to a non-destructive procedure for chromosome preparation from fin clips developed by Völker and Kullmann (2006) and modified by Kalous et al. (2010); 50 metaphases from each individual were analyzed. Metaphase chromosomes stained in 4% Giemsa-Romanowski solution in phosphate buffer (pH = 7) were counted with PC software QuickPhoto Micro. Karyotypes were arranged using PC software Ikaros (karyotyping system), version V 3.4.0 and Adobe Photoshop, version CS7. Chromosome morphology was determined according to Levan et al. (1964). Analyzed slides with recorded co-ordinates of selected metaphases were cleaned in xy-

lene for 2 minutes, then in benzoin for 2 minutes and finally destained in fixative (methanol: acetic acid; 3:1, v/v) for 3 minutes. Chromosome slides were then stored at +4°C for 12 hours before banding experiments. Chromosome banding (CMA₃, DAPI, C and AgNOR) was carried out according to Rábová et al. (2013). Different slides were used for each banding method (non-sequential chromosome banding), except for the sequential DAPI + CMA₃. Valid Animal Use Protocols were in force at the Institute of Animal Physiology and Genetics and Czech University of Life Sciences Prague during this study.

Microscopy and image processing

CMA₃, DAPI, C-banding and AgNOR images were captured with a cooled CCD camera Olympus DP30BW (equipped with a black-and-white (B&W) CCD-Chip Sony ICX285-AL) coupled to an epifluorescence microscope Olympus AX70 equipped with a set of 3 narrowband fluorescent filters. Micrographs were captured with the Olympus Acquisition Software and B&W images were processed with the software Micro Image. Altogether 200 images (metaphases), i.e. 50 images for each banding type (CMA₃, DAPI, C and AgNOR) were taken and analyzed.

Results

Karyotype

The diploid chromosome number of the examined individuals was invariably $2n = 100$ (75 % investigated metaphases). The karyotype consisted of 10 pairs of metacentric (m), 18 pairs of submetacentric (sm) and 22 pairs of subtelo- (st) to acrocentric (a) chromosomes without any microchromosomes (Fig. 1).

Chromosome banding and AgNOR staining

Sequential banding (DAPI + CMA₃) revealed four CMA₃-positive bands situated at the sites of the secondary constrictions on the p arms of the 14th pair of sm chromosomes and on the p arms of the 32nd pair of st-a chromosomes (Figs 2b, c, e, f). DAPI uniformly stained all chromosomes (Figs 2a, d). AgNOR analysis revealed four positive signals (Figs 3a, b) which corresponded to four CMA₃ positive signals. C-banding detected blocks of constitutive heterochromatin at the telomeric and pericentromeric chromosome regions (Figs 4a, b). Telomeric signals were more intensive than pericentromeric ones. C-banded chromosomes were arranged in a karyotype (Fig. 5). Seven chromosome pairs had conspicuous C-banded arms.

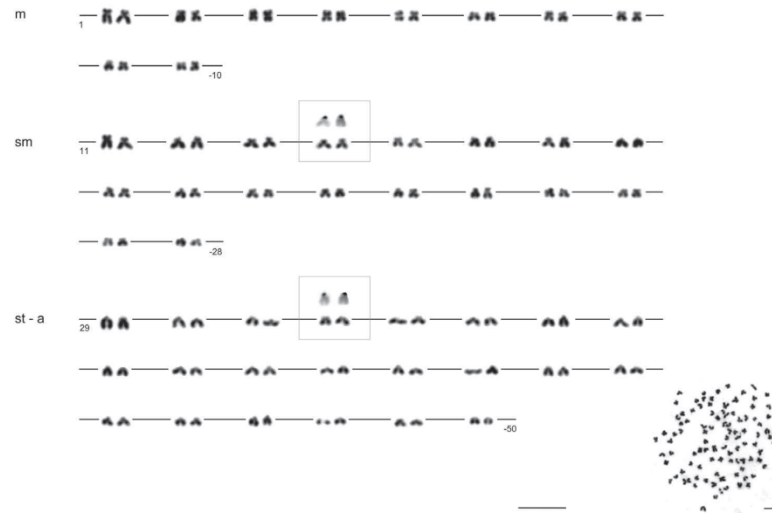


Figure 1. Karyotype of *C. carassius* female arranged from Giemsa-stained chromosomes (shown as inlay); m – metacentric, s – submetacentric, st – subtelocentric, a – acrocentric chromosomes. Four CMA₃-positive (color-inverted) chromosomes (14th pair of sm chromosomes and 32nd pair of st-a chromosomes) are additionally shown in the frames. Bar = 10 μm.

Discussion

The karyotype of all the five individuals of crucian carp from Byšičky ox-bow had the same diploid chromosome number $2n = 100$. This number equalled the value reported in other previous studies (Table 1) except those by Raicu et al. (1981) and Chiarelli et al. (1969). Interestingly, Raicu et al. (1981) found the diploid chromosome number $2n = 50$ in individuals from the Danube Delta. Although this report might be a result of a laboratory-generated error (slide mix-up), our closer inspection of the published karyotype did not provide any obvious answer. Vasilev and Vasileva (1985) discussed the finding of Raicu et al. (1981) and suggested that the presented karyotype belonged to a member of the genus *Gobio* Cuvier, 1816. At present, it is difficult to speculate more about the observed difference between the reported chromosome numbers unless detailed population screening of this species will be available. In contrast to the results obtained by Raicu et al. (1981), the diploid number of 104 chromosomes presented by Chiarelli et al. (1969) could be most likely attributed to preparation artifact.

The present study demonstrated that karyotype of individuals of *C. carassius* under study possessed 10 pairs of metacentric, 18 pairs of submetacentric and 22 pairs of subtelocentric to acrocentric chromosomes, already reported by Knytl et al. (2013) as a haploid

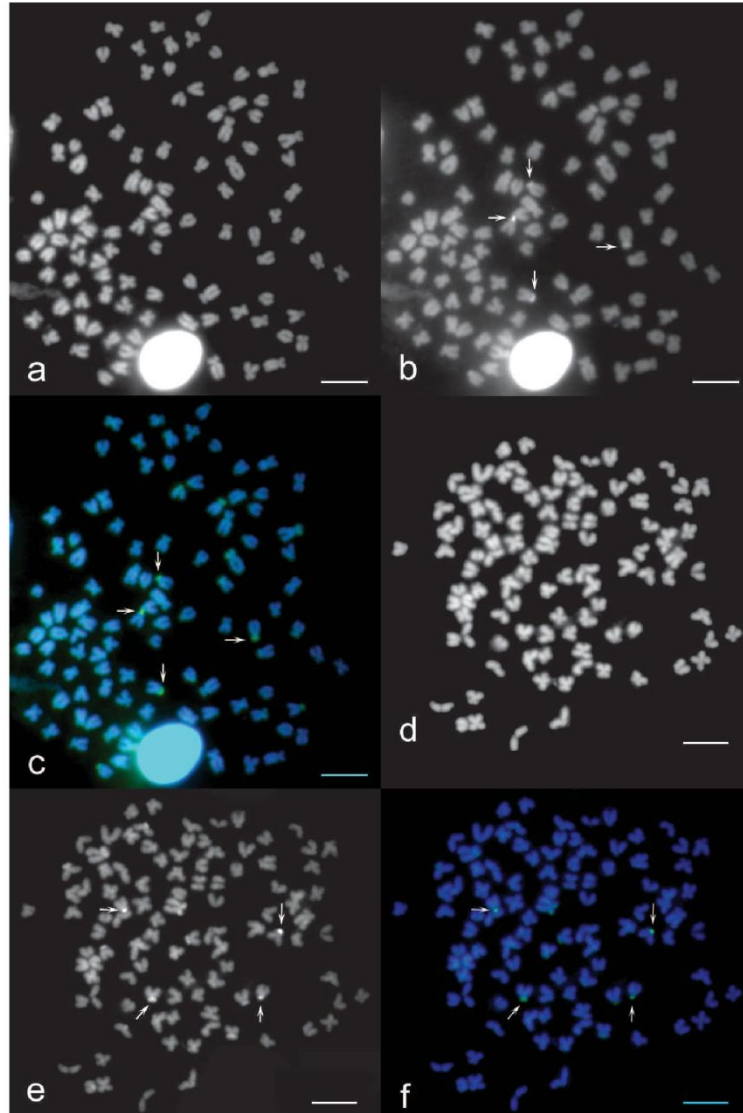


Figure 2. a-f Sequential chromosome banding of *C. carassius* female chromosomes. Metaphases counterstained by DAPI show all 100 chromosomes (**a, d**), metaphases stained by CMA₃ show 4 NORs (**b, e** white arrows) and the combination of these bandings show 4 identical NORs (**c, f** white arrows; green signals). Bar = 10 μm.

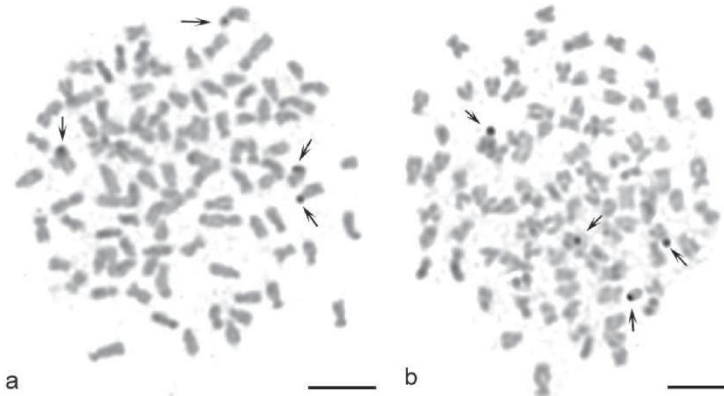


Figure 3. a-b AgNOR staining metaphases of *C. carassius* female (**a, b** black arrows) indicate 4 NOR-positive sites. Bar = 10 μ m.

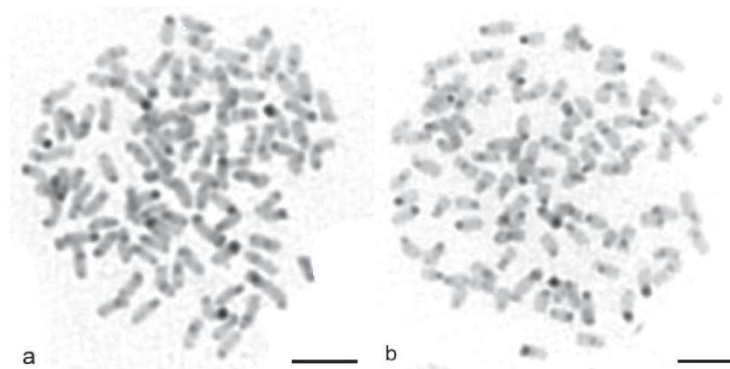


Figure 4. a-b C-banded metaphases of *C. carassius* female (**a, b**) show signals localized in the telomeric and pericentromeric chromosome regions. Bar = 10 μ m.



Figure 5. karyotype of *C. carassius* female arranged from C-banded chromosomes. Seven pairs of chromosomes show significant signals (black arrows). Bar = 10 μ m.

component of the genome of the allopolyploid female of *C. gibelio*. Arrangement of chromosomes within the karyotype was different compared with other findings (i.e. Hafez et al. 1978, Sofradžija et al. 1978), probably due to a different level of chromosome spiralization (Ráb and Collares-Pereira 1995). Two other available studies dealing with the number, location and chromosomal characteristics of the major rDNA sites (Mayr et al. 1986, Boroń et al. 2010) showed four chromosomal sites on two different sm pairs of chromosomes. We also observed this pattern, i.e. four mutually corresponding CMA₃ and AgNOR signals respectively, on the secondary constrictions on the short arms of a single pair of sm chromosomes and another pair of st-a chromosomes. Though this chromosomal pattern is very common, it represents an additional evidence in favor of paleotetraploidy of the crucian carp genome as suggested by Vasilev and Vasileva (1985). This hypothesis must be examined using other techniques, since it was proven in other similar cases when common carp *Cyprinus carpio* (Larhammar and Risinger 1994, David et al. 2003, Zhang et al. 2008) as well as various species of *Barbus* Cuvier, 1816 (*sensu lato*) (Chenuil et al. 1999) were also revealed as evolutionary tetraploids based on sequences and substitutions analyses, as well as microsatellite analyses respectively.

DAPI-counterstained chromosomes did not provide any useful information since the observed signals were uniform throughout the chromosomes. Similar results were reported for *C. gibelio* by Zhu and Gui (2007).

We have performed C-banding on chromosomes of *C. carassius* for the first time. Constitutive heterochromatin blocks detected by C-banding method were located in telomeric regions of 7 pairs of chromosomes. Number of these signals can be a species-specific marker, especially in paleotetraploid forms.

Although there is no information about sex differences between *C. carassius* karyotypes, we have to point out that only one male specimen was included in this study.

In respect to its status of a highly endangered fish species and unclear distribution of possible diploid and/or paleotetraploid forms as well as ongoing hybridization process with other species of this genus across its range of distribution, the present study is a moderate but important contribution to the cytogenetics and cytotaxonomy of *C. carassius*.

Acknowledgements

We thank M. Rábová and M. Pokorná for their help with the preparation of karyotypes, and we are grateful to Tomáš Daněk for the valuable information about the locality. The editor and two anonymous referees notably helped us to improve this text. The present study was supported by the S-grant MŠMT ČR and project No. P506/11/P596 of the Czech Science Foundation.

References

- Blažka P (1958) The anaerobic metabolism of fish. *Physiological Zoology* 31(2): 117–128.

- Boroń A, Kirtiklis L, Porycka K, Abe S, Juchno D, Grabowska A, Duchnowska K, Karolewska M, Kuczevska A, Mirosławska U, Wierzbicki P (2010) Comparative cytogenetic analysis of two *Carassius* species (Pisces, Cyprinidae) using chromosome banding and FISH with rDNA. In: 19th ICACGM, Balice-Kraków, Poland, June 6–9, 2010, Book of Abstracts: 137. *Chromosome Research* 20(10): 749.
- Chenuil A, Galtier N, Berrebi P (1999) A test of the hypothesis of an autopolyploid vs. allopolyploid origin for a tetraploid lineage: application to the genus *Barbus* (Cyprinidae). *Heredity* 82(4): 373–380. doi: 10.1038/sj.hdy.6884890
- Chiarelli B, Ferrantelli O, Cucchi C (1969) The karyotype of some teleostean fish obtained by tissues culture in vitro. *Experientia* 25(4): 426–427. doi: 10.1007/BF01899963
- Copp GH (1991) Typology of aquatic habitats in the Great Ouse, a small regulated lowland river. *Regulated Rivers: Research & Management* 6(2): 125–134. doi: 10.1002/rrr.3450060208
- Copp GH, Černý J, Kováč V (2008) Growth and morphology of an endangered native freshwater fish, crucian carp *Carassius carassius*, in an English ornamental pond. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 18(1): 32–43. doi: 10.1002/aqc.820
- Copp GH, Wesley KJ, Vilizzi L (2005) Pathways of ornamental and aquarium fish introductions into urban ponds of Epping Forest (London, England): the human vector. *Journal of Applied Ichthyology* 21: 263–274. doi: 10.1111/j.1439-0426.2005.00673.x
- David L, Blum S, Feldman MW, Lavi U, Hillel J (2003) Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution* 20: 1425–1434. doi: 10.1093/molbev/msg173
- Economidis PS (1995) Endangered freshwater fishes of Greece. *Biological Conservation* 72(2): 201–211. doi: 10.1016/0006-3207(94)00083-3
- Hafez R, Labat R, Quiller R (1978) Etude cytogenetique chez quelques especes de cyprinides de la region Midi-Pyrenees. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse* 114(1–2): 122–159.
- Hänfling B, Bolton P, Harley M, Carvalho GR (2005) A molecular approach to detect hybridisation between crucian carp (*Carassius carassius*) and non-indigenous carp species (*Carassius* spp. and *Cyprinus carpio*). *Freshwater Biology* 50(3): 403–417. doi: 10.1111/j.1365-2427.2004.01330.x
- Hensel K (1971) Some notes on the systematic status of *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1782) with further record of this fish from the Danube River in Czechoslovakia. *Věstník Československé Společnosti Zoologické* 3: 186–198. doi: 10.1159/000350689
- Holopainen IJ, Ikari A (1992) Ecophysiological effects of temporary acidification on crucian carp, *Carassius carassius* (L.): a case history of a forest pond in eastern Finland. *Annales Zoologici Fennici* 29: 29–38.
- Kalous L, Knytl M, Krajáková L (2010) Usage of non-destructive method of chromosome preparation applied on silver Prussian carp (*Carassius gibelio*). In: Kubík S, Barták M (Eds) *Proceedings of the Workshop on Animal Biodiversity*. Jevany, July 7, 2010, 57–60.
- Kalous L, Šlechtová V, Bohlen J, Pettrýl M, Švátora M (2007) First European record of *Carassius langsdorffi* from the Elbe basin. *Journal of Fish Biology* 70(A): 132–138.

- Knytl M, Kalous L, Symonová R, Rylková K, Ráb P (2013) Chromosome studies of European cyprinid fishes: cross-species painting reveals natural allotetraploid origin of *Carassius* female with 206 chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 139: 276–283.
- Kobayasi H, Kawashima Y, Takeuchi N (1970) Comparative chromosome studies in the genus *Carassius*, especially with a finding of polyploidy in the ginbuna (*C. auratus langsdorffii*) (Teleostei: Cyprinidae). *Japanese Journal of Ichthyology* 17: 153–160.
- Kottelat M, Freyhof J (2007) *Handbook of European Freshwater Fishes*. Berlin, Germany, 648 pp.
- Larhammar D, Risinger C (1994) Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp *Cyprinus carpio*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3(1): 59–68. doi: 10.1006/mpev.1994.1007
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220. doi: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x
- Litvinov AG, O’Gorman R (1996) Biology of Amur sleeper (*Perccottus glehni*) in the delta of the Selenga River, Buryatia, Russia. *Journal of Great Lakes Research* 22(2): 370–378. doi: 10.1016/S0380-1330(96)70962-0
- Lusk S, Lusková V, Hanel L (2010) Alien fish species in the Czech Republic and their impact on the native fish fauna. *Folia Zoologica* 59(1): 57–72.
- Mayr B, Ráb P, Kalat M (1986) NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in Cyprinidae of different ploidy level. *Genetica* 69(2): 111–118. doi: 10.1007/BF00115130
- Navodaru I, Buijse AD, Staras M (2002) Effects of hydrology and water quality on the fish community in Danube delta lakes. *International Review of Hydrobiology* 87: 329–348. doi: 10.1002/1522-2632(200205)87:2/3<329::AID-IROH329>3.0.CO;2-J
- Papoušek I, Vetešník L, Halačka K, Lusková V, Humpl M, Mendel J (2008) Identification of natural hybrids of gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) and crucian carp *Carassius carassius* (L.) from lower Dyje River floodplain (Czech Republic). *Journal of Fish Biology* 72(5): 1230–1235. doi: 10.1111/j.1095-8649.2007.01783.x
- Prokeš M, Baruš V (1996) On the natural hybrid between common carp (*Cyprinus carpio*) and Prussian carp (*Carassius auratus gibelio*) in the Czech Republic. *Folia Zoologica* 45: 277–282.
- Ráb P, Collares-Pereira MJ (1995) Chromosomes of European cyprinid fishes (Cyprinidae, Cypriniformes) (Review). *Folia Zoologica* 44: 193–214.
- Rábová M, Volker M, Pelikánová Š, Ráb P (2013) Sequential chromosome bandings in fishes. In: Ozouf-Costaz C, Foresti F, Almeida Foresti L, Pisano E, Kapoor BG (Eds) *Techniques of Fish Cytogenetics*. Science Publisher Inc., Enfield NH, USA.
- Raicu P, Taisescu E, Banarescu P (1981) *Carassius carassius* and *C. auratus*, a pair of diploid and tetraploid representative species (Pisces, Cyprinidae). *Genetica* 46: 233–240.
- Rylková K, Kalous L, Bohlen J, Lamatsch DK, Petrtýl M (2013) Phylogeny and biogeographic history of the cyprinid fish genus *Carassius* (Teleostei: Cyprinidae) with focus on natural and anthropogenic arrivals in Europe. *Aquaculture* 380–383: 13–20. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.11.027
- Sayer CD, Copp GH, Emson D, Godard MJ, Zięba G, Wesley KJ (2011) Towards the conservation of crucian carp *Carassius carassius*: understanding the extent and causes of decline within parts of its native English range. *Journal of Fish Biology* 79: 1608–1624. doi: 10.1111/j.1095-8649.2011.03059.x

- Schiemer F, Spindler T (2006) Endangered fish species of the Danube River in Austria. *Regulated Rivers: Research & Management* 4(4): 397–407. doi: 10.1002/rrr.3450040407
- Smarrt J (2007) A possible genetic basis for species replacement: preliminary results of interspecific hybridisation between native crucian carp *Carassius carassius* (L.) and introduced goldfish *Carassius auratus* (L.). *Aquatic Invasions* 2: 59–62. doi: 10.3391/ai.2007.2.1.7
- Sofradžija A, Berberović L, Hadžiselimović R (1978) [Hromosomske garniture karaša (*Carassius carassius*) i babuške (*Carassius auratus gibelio*)] Chromosome sets of *Carassius carassius* and *Carassius auratus gibelio*. *Ichthyologia* 10(1): 135–148.
- Szczerbowski JA (2002) *Carassius*. In: Banareescu PM, Paepke HJ (Eds) *The Freshwater Fishes of Europe*, Aula-Verlag, Wiesbaden, 5–41.
- Tarkan AS, Gaygusuz Ö, Gürsoy Gaygusuz Ç, Saç G, Copp GH (2012) Circumstantial evidence of gibel carp, *Carassius gibelio*, reproductive competition exerted on native fish species in a mesotrophic reservoir. *Fisheries Management and Ecology* 19(2): 167–177. doi: 10.1111/j.1365-2400.2011.00839.x
- Völker M, Kullmann H (2006) Sequential chromosome banding from single acetic acid fixed embryos of *Chromaphysemon* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). *Cy-bium* 30(2): 171–176.
- Vasilev VP, Vasileva ED (1985) [Золотой карась, *Carassius carassius* - диплоидный или тетраплоидный вид?] Does *Carassius carassius* belong to the diploid or tetraploid species? *Doklady Akademii nauk SSSR* 283(1): 228–230.
- Vasilev VP (1985) *Evolutionary karyology of fishes*. Moscow, 300 pp.
- Wheeler AC (2000) Status of the crucian carp, *Carassius carassius* (L.) in the UK. *Fisheries Management and Ecology* 7: 315–322.
- Wouters J, Janson S, Lusková V, Olsén KH (2012) Molecular identification of hybrids of the invasive gibel carp *Carassius auratus gibelio* and crucian carp *Carassius carassius* in Swedish waters. *Journal of Fish Biology* 80(7): 2595–2604. doi: 10.1111/j.1095-8649.2012.03312.x
- Zhang Y, Liang L, Jiang P, Li D, Lu C, Sun X (2008) Genome evolution trend of common carp (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by the analysis of microsatellite loci in a gynogenetic family. *Journal of Genetics and Genomics* 35(2): 97–103. doi: 10.1016/S1673-8527(08)60015-6
- Zhu HP, Gui JF (2007) Identification of genome organization in the unusual allotetraploid form of *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture* 265(1): 109–117. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.10.026

10.4 Příloha IV

práce IV

Daněk, T., Kalous, L., Veselý, T., Krásová, E., Reschová, S., Rylková, K., Kulich, P., Petrtýl, M., Pokorová, D., **Knytl, M.** 2012. Massive mortality of Prussian carp *Carassius gibelio* in the upper Elbe basin associated with herpesviral hematopoietic necrosis (CyHV-2). Diseases of aquatic organisms. 102 (2). 87-95.

Massive mortality of Prussian carp *Carassius gibelio* in the upper Elbe basin associated with herpesviral hematopoietic necrosis (CyHV-2)

Tomáš Daněk¹, Lukáš Kalous^{1*}, Tomáš Veselý², Eva Krásová¹, Stanislava Reschová², Kateřina Rylková¹, Pavel Kulich², Miloslav Petrtyl¹, Dagmar Pokorová², Martin Knytl¹

¹Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, 165 21 Praha 6 – Suchbátka, Czech Republic

²Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic

ABSTRACT: From 22 May to 10 June 2011 massive mortality of Prussian carp *Carassius gibelio* was observed in alluvial Lake Řehačka close to the Elbe River in the Czech Republic. More than 1400 kg of dead fish were collected and no other fish species were affected. Further molecular and cytogenetic investigation of fish (n = 232) revealed that the Řehačka population of Prussian carp consisted exclusively of gynogenetic triploid females. The causative agent was identified by means of molecular and electron microscopy as a herpesviral hematopoietic necrosis virus (*Cyprinid herpesvirus 2*, CyHV-2). This is the first report of CyHV-2 from the Czech Republic and the second finding worldwide of CyHV-2 causing mass mortality of *C. gibelio*. Some other localities in the upper Elbe River basin where *C. gibelio* was affected are also noted. We assume that the massive wave of deaths of all female gynogenetic Prussian carp can be attributed to limited genetic variation and the favourable conditions for development of viral disease.

KEY WORDS: Cypriniformes · Herpesvirus · Triploid · Gynogenetic · Mortality

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

The triploid biotype of Prussian carp *Carassius gibelio* Bloch 1782 is considered the most successful non-native fish in Europe. It easily becomes one of the dominant species in newly inhabited areas, and it has a severe impact on the environment and aquaculture (Economidis et al. 2000, Varadi et al. 2000, Özcan 2007, Lusková et al. 2010, Savini et al. 2010). The type of reproduction significantly facilitates spreading of all-female populations due to rapid multiplication realized through sperm-dependent parthenogenesis.

When the eggs of *Carassius gibelio* are inseminated by males of other species, the heterologous sperm triggers development but does not contribute significantly to the formation of the zygote (Gui & Zhou 2010). This is known as gynogenesis and it

leads to all-female offspring, each of which is considered a clone of the mother (Lamatsch & Stöck 2009).

The first record of the invasive triploid form of *Carassius gibelio* in the Czech Republic was in the lower stretches of the Dyje River (Lusk et al. 1977). The population was derived from a Danubian invasion (Holčík & Žitňan 1978) and consisted exclusively of triploid gynogenetic females (Peňáz et al. 1979). Triploid Prussian carp subsequently invaded all 3 main hydrological systems of the Czech Republic (Lusk et al. 1980, 1998, Lusk 1986), and aquaculture activities were considered the key factor accounting for its spread (Slavík & Bartoš 2004). In the Elbe River basin, an all-female population of *C. gibelio* was recorded for the first time in 1989 (Kubečka 1989) and later became a natural component of all suitable habitats (Halačka et al. 2003). In the early 1990s, the

*Corresponding author. Email: kalous@af.czu.cz

first males and diploids within the population of *C. gibelio* in the Dyje River alluvium (Danube basin) were found (Halačka et al. 2003, Lusková et al. 2004). In a relatively short time the former all-female triploid population changed to a diploid–polyploid complex with up to 43 % males (Vetešník 2005). Similar situations were described in other European localities (Černý & Sommer 1992, Abramenko et al. 1998, 2004, Tóth et al. 2005).

Certain localities are now represented either by all-female gynogenetic populations or by the concurrent occurrence of fish with different ploidy and various proportions of males. However, low genetic variability in introduced all-female populations of Prussian carp is expected due to the low number of initial founders combined with the gynogenetic type of reproduction (Hänfling 2007). The all-female clonal populations could also be classified as vulnerable, since antigen recognition and killing by T-cells is genetically restricted by the major histocompatibility complex (MHC) (Somamoto et al. 2009). Lower tolerance to parasites has been reported in gynogens (Lively et al. 1990, Moritz et al. 1991, Poulin et al. 2000, Hakoyama et al. 2001).

In the present paper we report the rapid, massive and selective mortality of thousands of morphologically and genetically identified Prussian carp from Lake Řehačka with further investigation of ploidy level and sex ratio of the Prussian carp and identification of the causative agent. The concurrent occurrence of a massive kill of Prussian carp at several other localities in the upper Elbe River basin is also noted.

MATERIALS AND METHODS

Locality

Řehačka alluvial lake (50° 10' 39" N, 14° 48' 27" E) is situated close to the Elbe River. The lake covers 12.4 ha and represents an old oxbow of the River Elbe connected with an old flooded sand pit that is linked with the river by a pipeline connection. The water body is administered by the Czech Anglers Union, Local Organization Čelákovice, as a part of fishing district 'Labe 19 A' and includes common fish stock. According to local fishing statistics and an ichthyological survey (T. Daněk unpubl. data), the fish stock consists of: *Cyprinus carpio*, *Esox lucius*, *Sander lucioperca*, *Blicca bjoerkna*, *Tinca tinca*, *Anguilla anguilla*, *Silurus glanis*, *Abramis brama*, *Ctenopharyngodon idella*, *Aspius aspius*, *Perca fluviatilis*, *Gymnocephalus cernuus*, *Hypophthalmichthys*

molitrix, *Hypophthalmichthys nobilis*, *Alburnus alburnus*, *Scardinius erythrophthalmus*, *Rutilus rutilus*, *Leuciscus idus*, *Rhodeus amarus*, *Ameiurus nebulosus* and *Carassius gibelio*.

Mortality evaluation

Dead fish were collected from the lake by members of the local organization of the Czech Anglers Union, and quantities were recorded with information on water temperature. Additionally, a survey was conducted of representatives of other local organizations by the Czech Anglers Union along the Elbe River, and the authors of this study personally carried out inspections of localities reporting mass mortalities of *Carassius gibelio*.

Fish identification and sex determination

Moribund and dead fish were identified morphologically according to Kottelat & Freyhof (2007) and additionally by sequencing of mitochondrial DNA of 8 specimens. The cytochrome *b* gene was amplified by the methods described in Rylková et al. (2010), using forward primer Kai_F (GAA GAA CCA CCG TTG TTA TTC) and reverse primer Kai_R (ACC TCC RAY CTY CGG ATT ACA) (Šlechtová et al. 2006). PCR products were subsequently sequenced in both directions (Macrogen) and aligned. Sequences were compared with the Genetic sequence database (GenBank) at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the basic local alignment search tool (BLASTn) program.

The sex of fish was determined by inspection of gonads at autopsy of 200 dead fish and in specimens used in ploidy level determination.

Determination of ploidy level

Thirty-two moribund Prussian carp were used for ploidy level determination. The ploidy level was determined by computer-assisted image analyses using the measurements of mean erythrocyte nuclei area (MENA) as was proposed by Flajšhans (1997). The blood was obtained with a heparinised syringe from the fish heart, and blood smears were prepared as for conventional haematological examination, then air-dried, fixed in 90 % ethanol, and stained with 4 % Giemsa-Romanowski. Blood smears were then processed on a system consisting of microscope

(Nikon Eclipse 600, immersion objective 100×), analogue video camera (Hitachi HVC 20) and software (L.U.C.I.A version 4.71, Laboratory Imaging spol. s r. o.). The mean area of the nuclei was calculated from 200 erythrocytes for each specimen.

Moreover, the chromosome preparation according to Ráb & Roth (1988) was performed on 3 of 32 diseased fish. Nuclear suspensions were dropped on slides, stained with 4% Giemsa-Romanovski, and examined microscopically. The chromosome counts were realized on the 10 best metaphase plates per specimen. The ploidy levels of 3 specimens obtained by chromosomes counts were used as a reference for the ploidy level determination by MENA and possible differences were tested by *t*-tests using the program Statistica version 9.1. (StatSoft).

Identification of causative agent

Five moribund fish originating from 3 separate samplings (sample no. 1736/1 contained 1 fish collected on 27 May 2011; sample no. 1736/2 contained 3 fish collected on 30 May 2011; sample no. 1736/3 contained 1 fish collected on 5 June 2011) were frozen (−20°C) and transported to the laboratory. Standard pathological and parasitological examinations (Ergens & Lom 1970) were carried out, and an ELISA test for spring viremia of carp virus (SVCV) formerly known as *Rhabdovirus carpio* (RVC) was undertaken (Test-Line). Virological examination consisted of isolation on tissue culture and identification of the pathogen by electron microscopy and PCR.

Preparation of tissue homogenates

Pooled fish tissues were homogenized in a mortar with sterile sea sand, supplemented with Eagle's medium Tris MEM (minimal essential medium, Sigma), pH 7.6, enriched with 10% FBS (foetal bovine serum, GIBCO) and centrifuged (4°C, 1500 × *g*, 15 min). The supernatant was incubated overnight at 4°C with the addition of antibiotics (100 IU ml^{−1} of penicillin and 100 µg ml^{−1} of streptomycin) and afterwards used for cell line virological testing and for DNA extraction.

Isolation of viruses on tissue cultures

Monolayers (24 h) of bluegill fibroblast (BF-2), epithelioma papulosum cyprini (EPC), rainbow trout

gonad (RTG-2) and fathead minnow (FHM) cell lines in 24-well plates (NUNC) were used for viral isolation. Cultures were inoculated with 3 serial tenfold dilutions of the examined samples and incubated at 15 and 23°C for 7 d. The cell lines were monitored by microscope every day for the development of cytopathic effect (CPE). If no CPE was observed, the cultures were frozen, thawed and subcultured for an additional 7 d. If CPE was not observed after the subculture, the samples were considered negative. Cell cultures exhibiting CPE were used for identification of viruses.

Electron microscopy

Supernatant from cell cultures displaying CPE were studied by electron microscopy. Subcultured samples were negatively stained with ammonium molybdate and examined using a Philips 208 transmission electron microscope (TEM) at 18000× magnification and an accelerating voltage of 90 kV.

DNA extraction

Tissue cultures with CPE were used for DNA isolation. The nucleic acid extraction was performed with a QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

PCR and sequencing

Four primer pairs were used in this study; 2 pairs were used for a nested PCR on the thymidine kinase of CyHV-3 and 2 other pairs for a nested PCR on the DNA polymerase of cyprinid herpesviruses (Table 1). PCR products were subsequently sequenced in both directions using the ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Sequences were aligned using BioEdit version 5.0.9 and compared with GenBank using the BLASTn program.

RESULTS

Mortality evaluation

More than 1400 kg of dead fish were removed from Lake Řehačka within the period 22 May to 10 June 2011. On 22 May only 30 kg were collected,

Table 1. Primer pairs used for identification of the virus. Nested PCRs targeted the thymidine kinase gene of herpesviral hematopoietic necrosis virus (CyHV-3) and the DNA polymerase gene of CyHV. One of 2 possible cycling conditions was used: (A) 40 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 55°C, 1 min at 72°C, and the reaction was preceded by 94°C for 5 min and finished at 72°C for 10 min, or (B) 30 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 55°C, 1 min at 72°C, and the reaction was preceded by 94°C for 5 min and finished at 72°C for 10 min. Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (CEFAS) protocol can be obtained at www.cefas.defra.gov.uk

Primer sequences (5'–3')	Cycle conditions	Size (bp)	Source
CyHV-3 thymidine kinase			
Outer forward: GGG TTA CCT GTA CGA G	A	409	Bercovier et al. (2005)
Outer reverse: CAC CCA GTA GAT TAT GC			
Inner forward: CGT CTG GAG GAA TAC GAC G	B	348	CEFAS protocol
Inner reverse: ACC GTA CAG CTC GTA CTG G			
DNA polymerase gene of cyprinid herpesviruses			
Outer forward: CCC AGC AAC ATG TGC GAC GG	A	362	Jeffery et al. (2007)
Outer reverse: CCG TAR TGA GAG TTG GCG CA			
Inner forward: CGA CGG AGG CAT CAG CCC	B	339	Jeffery et al. (2007)
Inner reverse: GAG TTG GCG CAY ACY TTC ATC			

with the remaining fish collected on 27 May (700 kg), 30 May (300 kg), 1 June (300 kg), 5 June (100 kg), and the last dead specimens occurring on 10 June. Water temperature at the locality during this period was between 16.1 and 20.5°C. To our knowledge, no other fish species were affected besides *Carassius gibelio* and no newly dead fish were observed after 10 June.

The survey among representatives of the local organization of the Czech Anglers Union also revealed the occurrence of a selective kill of Prussian carp in 4 other localities within the upper Elbe Basin (Fig. 1, numbers 2 to 5; Table 2).

Identification and sex determination of fish from the Řehačka mortality event

All 232 investigated fish (200 examined grossly and a further 32 for ploidy determination) were females and were morphologically identified as *Carassius*

gibelio sensu Kottelat & Freyhof (2007). Eight fish that were also investigated genetically shared 1 haplotype of Cyt *b* mt DNA (final length of sequences consisted of 1027 characters). Sequence of the haplotype was compared in the program BLASTn that evaluates the percentage of sequence similarity (%S) and the percentage of sequence overlap (%O) with the reference sequence of *C. gibelio* from GenBank (Table 3).

Determination of ploidy level

Chromosome preparation of 3 of the 8 specimens (Table 3) revealed they were triploids with modal chromosome numbers of 156 (60% of investigated metaphases), 156 (50% of investigated metaphases), and 150 (60% of investigated metaphases). Ploidy level determination by MENA showed that all 32 investigated specimens were triploids with values of the nuclei area mean (\pm SD) ranging from 20.7 ± 2.2

Table 2. *Carassius gibelio*. Selective mortalities of Prussian carp in the upper Elbe Basin. Biomass: biomass of dead fish, which were removed from the locality by local organisations of the Czech Anglers Union during 2011. See Fig. 1 for locations of localities. nd: no data

Locality number	Locality name	Period	GPS position	Biomass (kg)	% mortality
1	Řehačka	22 May–10 June	50° 10' 37.956" N, 14° 48' 22.419" E	>1400	>95
2	Přívov	30 June–5 July	50° 5' 36.024" N, 15° 9' 11.413" E	>700	nd
3	Nová Ves	30 June–25 July	50° 3' 24.666" N, 15° 9' 35.738" E	>5600	>95
4	Trnávka	1 June–11 June	50° 1' 56.253" N, 15° 27' 48.229" E	150	nd
5	Hrobice	5 June–19 June	50° 6' 28.754" N, 15° 47' 23.408" E	100	nd



Fig. 1. Localities with selective Prussian carp *Carassius gibelio* mortalities. Cases (numbers 1 to 5 in main map) are described in Table 2

Table 3. *Carassius gibelio*. Genetic and cytogenetic identification of 8 specimens of Prussian carp from Lake Řehačka (CgTL006, CgTL008, CgTL013, CgTL046, CgTL078, CgTL114, CgTL144 and CgTL113). Basic local alignment search tool (BLASTn) comparisons used reference sequence from *Carassius gibelio* DQ399929 (Kalous et al. 2007). %S: percentage of overlap sequence similarity; %O: percentage of sequence overlap; MENA: mean erythrocyte nuclei area; Chro: modal chromosome number

Specimen	Morphological identification	Ploidy level	GenBank	%S	%O
		MENA	Accession No.		
CgTL006	<i>Carassius gibelio</i>	3n	JN546055	100	98
CgTL008	<i>Carassius gibelio</i>	3n	JN546056	100	98
CgTL013	<i>Carassius gibelio</i>	3n	JN546057	100	98
CgTL046	<i>Carassius gibelio</i>	3n	JN546058	100	98
CgTL078	<i>Carassius gibelio</i>	3n	JN546043	100	98
CgTL114	<i>Carassius gibelio</i>	3n	JN546041	100	98
CgTL144	<i>Carassius gibelio</i>	3n	JN546040	100	98
CgTL113	<i>Carassius gibelio</i>	3n	JN546034	100	98

to $23.2 \pm 2.5 \mu\text{m}^2$. Comparison of values using a *t*-test confirmed no statistically significant difference ($p > 0.05$) between the 3 reference specimens and the remaining specimens (Fig. 2). All values are in agreement with those for triploid *Carassius gibelio* (Kalous & Petřítl 2004).

Identification of causative agent of mortality

Diseased Prussian carp had pinpoint red foci at the base of their fins, red foci in the eyes, haemorrhaging of the gills, and some specimens showed pink-colored skin in the abdominal region and fins (Fig. 3). Internal organs were soft and reddened. Standard pathological and parasitological examina-

tion failed to detect parasites or evidence of spring viremia of carp. Given that the massive mortality was selective for *Carassius gibelio*, toxicosis was also excluded.

Isolation of viruses on tissue cultures and electron microscopy

Three separate fish samples (1736/1, 1736/2 and 1736/3) produced CPE on first passage in all 4 cell lines incubated at 23°C and in BF-2, FHM and RTG 2 cell lines incubated at 15°C. Cell cultures with clear CPE were examined by TEM, and viral particles morphologically similar to a herpesvirus were observed (Fig. 4). These samples were tested by PCR.

PCR and sequencing

Samples with CPE and herpesviral particles observed in TEM were investigated by nested PCR using primers specific for koi herpesvirus (CyHV-3) (Table 1). Negative results were obtained. Subsequently generic primers for the DNA polymerase gene of cyprinid herpesviruses were used (Table 1) and a primary product of 362 bp was obtained in 2 of 3 separate samples. The nested PCR resulted in a specific product of 339 bp in all 3 samples (Fig. 5). Products were sequenced and the sequences were deposited in GenBank (accession nos. JQ740764, JQ740765 and JQ740766). Nucleotide sequences were compared with GenBank using the BLASTn program and exhibited 100% identity with cyprinid herpesvirus 2 DNA polymerase gene (GenBank accession no. DQ085628.1) (Goodwin et al. 2006a).

DISCUSSION

The causative agent of a massive kill of Prussian carp was identified as CyHV-2, family *Alloherpesviridae*, genus *Cyprinivirus* (Davison et al. 2009). This virus shares morphological similarities with carp pox herpesvirus (CyHV-1) and koi herpesvirus

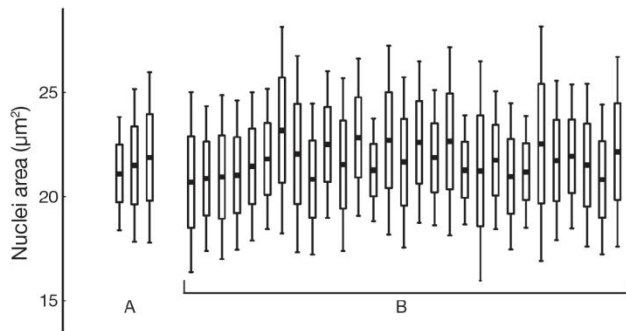


Fig. 2. *Carassius gibelio*. Obtained erythrocyte nuclei area of triploid reference specimens (A) and the remaining 29 specimens (B) from Lake Řehačka. Thick black line: mean; box: SD; whiskers: $1.96 \times SD$



Fig. 3. *Carassius gibelio*. Freshly dead fish from Lake Řehačka affected by CyHV-2 showing pinpoint foci at the base of fins and in the eyes

(CyHV-3), but it differs in the clinical manifestation, host range, antigenic properties, and growth characteristics (Waltzek et al. 2005). (CyHV-2) is a pathogen of goldfish *Carassius auratus* (Goodwin et al. 2006b, Jeffery et al. 2007), but recently it was also identified in *C. gibelio* in Hungary (Dospoly et al. 2011). In the case of Lake Řehačka, all affected fish were *C. gibelio*. CyHV-2 is associated with mortality in at least 2 species of the genus *Carassius*—*C. auratus* and *C. gibelio*—but it seems not to be pathogenic for *C. carassius* (Jeffery et al. 2006) or for common carp *Cyprinus carpio* (Jung & Miyazaki 1995).

CyHV-2 was originally described in Japan (Jung & Miyazaki 1995) but it probably has a global distribution (Waltzek et al. 2009), with mortality reported in the United Kingdom (Jeffery et al. 2007), USA, Taiwan (Goodwin et al. 2006a) and Australia (Stephens et al. 2004).

The high mortality within goldfish can be attributed to their low genetic diversity (Rylková et al. 2010) since this species has experienced intensive selection during its breeding history (Balon 2004). We presume that some of the differences in the manifestation of the disease at Lake Řehačka in comparison to previously described symptoms (Jung & Miyazaki 1995, Stephens et al. 2004, Jeffery et al. 2007) could be influenced by the heterogeneity of affected species within the genus *Carassius*.

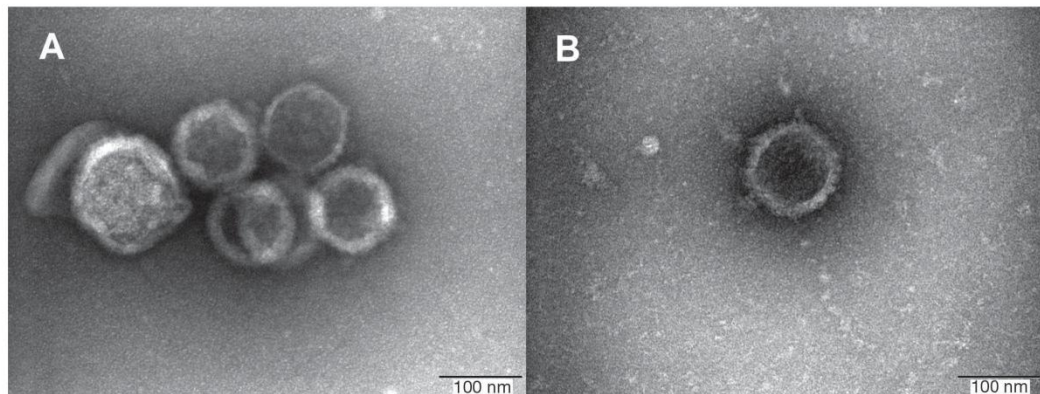


Fig. 4. Viral particles with a herpesviral morphology isolated in different cell lines and temperatures. (A) Rainbow trout gonad cell line, 15°C. (B) Epithelioma papulosum cyprini cell line, 23°C. Transmission electron microscopy; negative staining

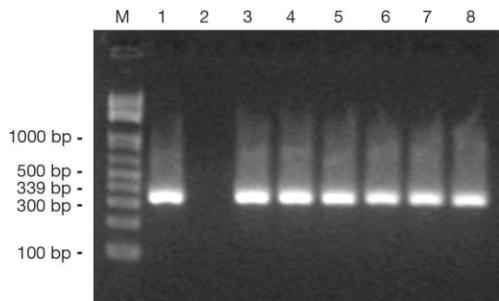


Fig. 5. Nested generic PCR of the DNA polymerase gene of CyHV. Lane M: mass ladder (TrackIt 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen); Lane 1: positive control; Lane 2: negative control; Lane 3: Sample 1736/1; Lane 4: Sample 1736/2; Lane 5: Sample 1736/3; Lanes 6 to 8: Same samples after virus multiplication in cell line RTG-2, 23°C

The natural populations of *Carassius gibelio* consist of clonal lineages with the sympatric occurrence of sexually reproducing individuals (Gui & Zhou 2010). In contrast, in newly inhabited areas the populations are characterized by the dominance of females that take advantage of rapid multiplication due to sperm-dependent parthenogenetic reproduction (Hänfling 2007). Our data suggest that the *C. gibelio* population from Lake Řehačka is gynogenetic since not a single male was found. Moreover, all investigated specimens were shown to be triploids, and only 1 haplotype of Cyt *b* mtDNA was shared among 8 sequenced fish.

Populations of asexually reproducing vertebrates are often considered to be less resistant to pathogens due to reduced genetic variability of the host (Neiman & Koskella 2009). In natural populations that reproduce sexually, usually only a fraction of individuals infected by viruses show symptoms of disease, and a significant part of the clinical variability observed within populations is explained by the host genetic background that plays an important role in the susceptibility to infections (Verrier et al. 2012). This phenomenon changes in a genetically uniform population caused by artificial selection. Within the common carp *Cyprinus carpio*, strains more or less susceptible to CyHV-3 have been identified (Shapira et al. 2005, Ødegård et al. 2010). High stock densities and low genetic variability can result in mass mortalities from virus, e.g. in koi carp (Hedrick et al. 2000), or even in introduced common carp in a natural environment (Garver et al. 2010). Animals that reproduce clonally face the same pop-

ulation breakdown possibility when infected by highly pathogenic viruses due to their obvious genetic similarity. Although we did not completely define the genotype diversity of Prussian carp in Lake Řehačka, only a few clonal lineages are likely to be present due to the bottle-neck effect associated with introduction and the gynogenetic type of reproduction. Our cytogenetic data showed 2 different modal chromosome numbers. The triploid biotype of *Carassius gibelio* is known to bear various numbers of chromosomes from 150 to 162 (Kalous & Knytl 2011). Particular clones are then usually characterized by a specific chromosome number (Zhou & Gui 2002). In the case of Lake Řehačka, there are at least 2 clones, although the cytogenetic data in the study are very restricted.

After the first dead fish appeared on 22 May, numbers rapidly increased within 5 d. One week after the peak of mortality, only a few newly dead specimens were found. Estimating mortality in natural waterbodies is very difficult. However, based on information from the local organization of the Czech Anglers Union and the complete lack of Prussian carp caught at the locality by anglers in the period 10 June 2011 to July 2012, we assume that all or nearly all of the *Carassius gibelio* in Lake Řehačka were eliminated by the pathogen during this short period.

The rapid progress of the pathogen was also reported in controlled conditions when fish began to die at 3 to 6 d post-inoculation and cumulative mortality ranged from 60 to 100 %, depending on viral titre, within 13 d at 20°C (Jung & Miyazaki 1995). CyHV-2 is often present as an inapparent infection and could be widespread in nature (Goodwin et al. 2009). However, when infected fish are subjected to stress such as a temperature change, there is a greater probability of disease outbreaks.

We believe the stress/temperature hypothesis may explain the initiation of the disease outbreak at Lake Řehačka and other locations in the upper Elbe River because a sharp drop in water temperature occurred from 13 May to 16 May 2011. Additionally our data showed that the virus replicated well in the temperature range 15 to 23°C, which is in agreement with Jung & Miyazaki (1995) who noted the optimum for virus propagation ranging between 15 and 25°C.

We conclude that the massive wave of deaths of Prussian carp at Lake Řehačka and at other localities in the upper Elbe River basin can be attributed to limited genetic variation of Prussian carp and the favourable conditions for propagation of CyHV-2.

Acknowledgements. The authors thank the representatives of the local organizations of the Czech Anglers Union for their assistance during fieldwork (especially P. Jindřich from the Local Organization Čelákovice). Additionally we are grateful to the anonymous referees for their valuable suggestions. This work was financially supported by MZE0002716202 from the Ministry of Agriculture of the Czech Republic and TAČR TD010045 from the Technology Agency of the Czech Republic.

LITERATURE CITED

- Abramenko MI, Poltavtseva TG, Vasetskii SG (1998) Discovery of triploid males in lower Don populations of the crucian carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1782). Dokl Akad Nauk 363:415–418 (in Russian)
- Abramenko MI, Nadtoka EV, Makhotkin MA, Kravchenko OV, Poltavtseva TG (2004) Distribution and cytogenetic features of triploid males of crucian carp in Azov Basin. Russ J Dev Biol 35:305–315
- Balon EK (2004) About the oldest domesticates among fishes. J Fish Biol 65(Suppl 1):1–27
- Bercovier H, Fishman Y, Nahary R, Sinai S and others (2005) Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. BMC Microbiol 5:13
- Černý J, Sommer N (1992) Vek, rast a produkcia karasa striebrištieho *Carassius auratus* v ramene Dunaja r. km. 1825 v r. 1985–1990. Sborník z konferencie ichtyologickej sekcie. SZS, Bratislava, p 46–58
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS and others (2009) The order *Herpesvirales*. Arch Virol 154:171–177
- Doszpoly A, Benk M, Csaba G, Dán Á, Láng M, Harrach B (2011) Introduction of the family *Alloherpesviridae*: the first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary. Magyar Allatorvosok Lapja 133:174–181
- Economidis PS, Dimitriou E, Pagoni R, Michaloudi E, Natsis L (2000) Introduced and translocated fish species in the inland waters of Greece. Fish Manag Ecol 7:239–250
- Ergens R, Lom J (1970) Causative agents of parasitic fish diseases. Academia, Prague (in Czech)
- Flajšhans M (1997) A model approach to distinguish diploid and triploid fish by means of computer-assisted image analysis. Acta Vet 66:101–110
- Garver KA, Al-Hussiney L, Hawley LM, Schroeder T and others (2010) Mass mortality associated with koi herpesvirus in wild common carp in Canada. J Wildl Dis 46:1242–1251
- Goodwin AE, Khoo L, LaPatra SE, Bonar C and others (2006a) Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus (cyprinid herpesvirus 2) in the USA: molecular confirmation of isolates from diseased fish. J Aquat Anim Health 18:11–18
- Goodwin AE, Merry GE, Sadler J (2006b) Detection of the herpesviral hematopoietic necrosis disease agent (*Cyprinid herpesvirus 2*) in moribund and healthy goldfish: validation of a quantitative PCR diagnostic method. Dis Aquat Org 69:137–143
- Goodwin AE, Sadler J, Merry GE, Marecaux EN (2009) Herpesviral haematopoietic necrosis virus (CyHV-2) infection: case studies from commercial goldfish farms. J Fish Dis 32:271–278
- Gui JF, Zhou L (2010) Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio*. Sci China Life Sci 53:409–415
- Hakoyama H, Nishimura T, Matsubara N, Iguchi K (2001) Difference in parasite load and nonspecific immune reaction between sexual and gynogenetic forms of *Carassius auratus*. Biol J Linn Soc 72:401–407
- Halačka K, Lusková V, Lusk S (2003) *Carassius gibelio* in fish communities of the Czech Republic. Ecohydrol Hydrobiol 3:133–138
- Hänfling B (2007) Understanding the establishment success of non-indigenous fishes: lessons from population genetics. J Fish Biol 71:115–135
- Hedrick RP, Gilad O, Yun S, Spangenberg JV and others (2000) A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. J Aquat Anim Health 12:44–57
- Holčík J, Žitňan R (1978) On the expansion and origin of *Carassius auratus* in Czechoslovakia. Folia Zool 27:279–288
- Jeffery KR, Hulland J, Longshaw CB, Bateman K and others (2006) (poster) Emergence of a cyprinid herpesvirus (CyHV-2) in goldfish *Carassius auratus* in the UK. Inst Fish Manag (IFM) Annu Conf, 7 Nov 2006. CEFAS, Lowestoft
- Jeffery KR, Bateman K, Bayley A, Feist SW and others (2007) Isolation of a cyprinid herpesvirus (CyHV-2) from goldfish *Carassius auratus* (L.), in the UK. J Fish Dis 30:649–656
- Jung SJ, Miyazaki T (1995) Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). J Fish Dis 18:211–220
- Kalous L, Knytl M (2011) Karyotype diversity of the offspring resulting from reproduction experiment between diploid male and triploid female of silver Prussian carp, *Carassius gibelio* (Cyprinidae, Actinopterygii). Folia Zool 60:115–121
- Kalous L, Petrtyl M (2004) Contribution to the ploidy of silver Prussian carp (*Carassius gibelio*). Proc VII Czech Ichthyol Conf, p 64–68 (in Czech)
- Kalous L, Šlechtová V Jr, Bohlen J, Petrtyl M, Švátora M (2007) First European record of *Carassius langsdorffii* from the Elbe basin. J Fish Biol 70:132–138
- Kottelat M, Freyhof J (2007) Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat, Cornol
- Kubečka J (1989) Šíření karasa stříbritého, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) ve středním Polabí. Muzeum a souasnost, Roztoky, ser. Natur 3:43–50
- Lamatsch DK, Stöck M (2009) Sperm-dependent parthenogenesis and hybridogenesis in teleost fishes. In: Schön I, Martens K, van Dijk P (eds) Lost sex: the evolutionary biology of parthenogenesis. Springer, Dordrecht, p 399–432
- Lively CM, Craddock C, Vrijenhoek RC (1990) Red Queen hypothesis supported by parasitism in sexual and clonal fish. Nature 344:864–866
- Lusk S (1986) The areas of occurrence of gibel carp (*Carassius auratus*) under Czechoslovak conditions. Živočišná výroba 31:945–951
- Lusk S, Baruš V, Veselý V (1977) On the question of the occurrence of *Carassius auratus* L. in the Morava River watershed. Folia Zool 26:377–381
- Lusk S, Baruš V, Kirka A (1980) Current spreading and importance of the Gibel (*Carassius auratus gibelio* Bloch) in Czechoslovakia. Živočišná výroba 25:871–878

- Lusk S, Lusková V, Halačka K (1998) Karas stříbrný—25 let od jeho přirozené introdukce. [Prussian carp—25 years since its natural introduction]. Proc III Czech Ichthyol Conf, 6–7 May 1998. VURH, Vodňany, p 135–140 (in Czech)
- Lusková V, Halačka K, Vetešník L, Lusk S (2004) Changes of ploidy and sexuality status of *Carassius auratus* populations in the drainage area of the River Dyje (Czech Republic). Ecohydrol Hydrobiol 4:165–171
- Lusková V, Lusk S, Halačka K, Vetešník L (2010) *Carassius auratus gibelio*—the most successful invasive fish in waters of the Czech Republic. Russ J Biol Invasions 2:24–28
- Moritz C, McCallum H, Donnellan S, Roberts JD (1991) Parasite loads in parthenogenetic and sexual lizards (*Heteronotia binoei*): support for the Red Queen hypothesis. Proc R Soc Lond B Biol Sci 244:145–149
- Neiman M, Koskella B (2009) Sex and the Red Queen. In: Schön I, Martens K, van Dijk P (eds) Lost sex: the evolutionary biology of parthenogenesis. Springer, Dordrecht, p 133–159
- Ødegård J, Olesen I, Dixon P, Zsigmond J and others (2010) Genetic analysis of common carp (*Cyprinus carpio*) strains. II: Resistance to koi herpesvirus and *Aeromonas hydrophila* and their relationship with pond survival. Aquaculture 304:7–13
- Özcan G (2007) Distribution of non-indigenous fish species, Prussian carp *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) in the Turkish freshwater systems. Pak J Biol Sci 10:4241–4245
- Peňáz M, Ráb P, Prokeš M (1979) Cytological analysis, gynogenesis and early development of *Carassius auratus gibelio*. Acta Sci Naturalis 13:1–33
- Poulin R, Marshall LJ, Spencer HG (2000) Metazoan parasite species richness and genetic variation among freshwater fish species: cause or consequence? Int J Parasitol 30:697–703
- Ráb P, Roth P (1988) Cold-blooded vertebrates. In: Baliček P, Forejt J, Rubeš J (eds) Methods of chromosome analysis. Cytogenetická sekce Československé biologické společnosti při ČSAV, Brno, p 115–124
- Rylková K, Kalous L, Šlechtová V, Bohlen J (2010) Many branches, one root: first evidence for a monophyly of the morphologically highly diverse goldfish (*Carassius auratus*). Aquaculture 302:36–41
- Savini D, Occhipinti-Ambrogi A, Marchini A, Tricarico E, Gherardi F, Olenin S, Gollasch S (2010) The top 27 animal alien species introduced into Europe for aquaculture and related activities. J Appl Ichthyology 26:1–7
- Shapira Y, Magen Y, Zak T, Kotler M, Hulata G, Levavi-Sivan B (2005) Differential resistance to koi herpes virus (KHV)/carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains and crossbreds. Aquaculture 245:1–11
- Slavík O, Bartoš L (2004) What are the reasons for the Prussian carp expansion in the upper Elbe River, Czech Republic? J Fish Biol 65(Suppl A):240–253
- Šlechtová V, Bohlen J, Freyhof J, Ráb P (2006) Molecular phylogeny of the Southeast Asian freshwater fish family Botiidae (Teleostei: Cobitoidea) and the origin of polyploidy in their evolution. Mol Phylogenet Evol 39:529–541
- Somamoto T, Okamoto N, Nakanishi T, Ootake M, Nakao M (2009) *In vitro* generation of viral-antigen dependent cytotoxic T-cells from ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorffii*. Virology 389:26–33
- Stephens FJ, Raidal SR, Jones B (2004) Haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) associated with an agent morphologically similar to herpesvirus. Aust Vet J 82:167–169
- Tóth B, Várkonyi E, Hidas A, Edviné Meleg E, Váradi L (2005) Genetic analysis of offspring from intra- and interspecific crosses of *Carassius auratus gibelio* by chromosome and RAPD analysis. J Fish Biol 66:784–797
- Varadi L, Harka A, Sallai Z, Jozsa V, Toth B (2000) The silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1863) in Hungary. Fish Dev Hungary 24:71–81
- Verrier ER, Langevin C, Tohy C, Houel A and others (2012) Genetic resistance to rhabdovirus infection in teleost fish is paralleled to the derived cell resistance status. PLoS ONE 7:e33935
- Vetešník L (2005) Biological characteristic of silver prussian carp (*Carassius auratus*) under the aspect of different ploidy level between individuals. PhD thesis, Mendel University in Brno
- Waltzek TB, Kelley GO, Stone DM, Way K, and others (2005) Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family *Herpesviridae*. J Gen Virol 86:1659–1667
- Waltzek TB, Kurobe T, Goodwin AE, Hedrick RP (2009) Development of a polymerase chain reaction assay to detect cyprinid herpesvirus 2 in goldfish. J Aquat Anim Health 21:60–67
- Zhou L, Gui JF (2002) Karyotypic diversity in polyploid gibel carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch. Genetica 115:223–232

Editorial responsibility: Mark Crane,
Geelong, Victoria, Australia

Submitted: June 25, 2012; Accepted: September 17, 2012
Proofs received from author(s): December 3, 2012

10.5 Příloha V

práce V

Kalous, L., **Knytl, M.**, Krajáková, L. 2010. Usage of non-destructive method of chromosome preparation applied on silver Prussian carp (*Carassius gibelio*). In: Kubík, Š., Barták, M. (Eds.). Workshop on animal biodiversity, Jevany. Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha. p. 57-60. ISBN: 9788021321465.

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH A
PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

Workshop on animal biodiversity, Jevany

Štěpán Kubík and Miroslav Barták (editors)

2010

Usage of non-destructive method of chromosome preparation applied on silver Prussian carp (*Carassius gibelio*)

Lukáš Kalous^{1,2}, Martin Knytl¹ & Lucie Krajáková¹

¹Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Department of Zoology and Fisheries, 165 21 Praha 6 - Suchbátka, Czech Republic

²Joint Laboratory of Genetics, Physiology and Reproduction of Fish Institute of Animal Physiology and Genetics CAS v.v.i. and Research Institute of Fishery and Hydrobiology, University of South Bohemia, Vodňany, Czech Republic

*Corresponding author: Lukáš Kalous: E-mail address: kalous@af.czu.cz

Abstract

Here we report on successful preparation of chromosomes using non – destructive method applied on silver Prussian carp (*Carassius gibelio*).

Key words: cytogenetics, fish, method, chromosome

1. Introduction

Although a number of methods exist how to obtain chromosomes from fish, many of them face some methodological constrains for wider use. Preparation from blood (Hartley & Horne 1985) or from fibroblast culture (Rodrigues & Collares-Pereira 1996) requires advanced laboratory equipment. When direct procedure of chromosome preparation from kidneys (Ráb & Roth 1988) is used fish is sacrificed and does not survive the analyses. Easy non-destructive chromosome preparation that ensures fish surviving is required in some research approaches e.g. reproduction experiments, study of unique or rare material etc. Moreover in species or complexes that are characterized by high chromosome number (Ohno et al. 1967, Peñáz et al., 1979; Wei et al., 2003) non – destructive method using fin regenerates allows us to repeat the analyses and to gain more precise results. The employed method was described by Völker & Kullmann (2006) on fish embryos of the genus *Chromaphyosemion* (Cyprinodontiformes).

Here we present the test of applicability of this non-destructive method of chromosome preparation from fin regenerates applied on polyploid complex of silver Prussian carp (*C. gibelio*).

2. Material and Methods

Five specimens of *C. gibelio* of weight about 50 g were obtained from various localities in the Czech Republic and included into the experimental trial.

Fish were kept in common aquaria and fed by commercial feed before the procedure of chromosome preparation. Temperature of water was kept around 20 °C.

Three days before analysis the caudal fin tissue of each fish was cut (up to 10 % of the whole fin) and stock solution (SS) was prepared composed of: 7.48 g NaCl + 0.18 g KCl + 0.2 g CaCl₂ + 0.016 g NaHCO₃ all diluted in 1 litre of H₂O.

After three days the regenerated tissue of fin from each individual was cut and put into a small Petri dish with approximately 5 -10 ml of cultivation solution (CS) (CS composed of: 14.3 ml SS + 85.7 ml H₂O + 0.025 g colchicine). A small piece of regenerated fin was exposed in CS for 2 hours in room temperature. When time ran out a few drops of fixative (methanol + acetic acid in ration 3:1) were added and the fin was left in this solution for additional 30 min in cold place (6 °C). After 30 minutes CS with few drops of fixative was replaced by pure fixative (5 – 10 ml) and placed for additional 30 min to a cold place. After 30 min fixative was replaced by a new one and the last step was repeated once again.

Then the piece of processed regenerated fin was placed from fixative into a drop of 50 – 25 % acetic acid on a fine sifter and gently mashed for 10-20 seconds. Drops with nuclei suspension were suck up using micropipette from the opposite side of a sifter and suspension obtained was placed into an Eppendorf tube and kept in a cold place.

One drop of suspension was placed on a clean slide warmed up to 45 °C. After 20 seconds the drop of suspension was suck up from the slide by micropipette and dropped to a different place.

Obtained slides with nuclei were stained by Giemsa and investigated using microscope BX41TF.

3. Results and discussion

We obtained metaphases of good quality from all investigated individuals (Fig. 1). Three drops were applied on each slide and each drop contained at least 10 metaphases. Metaphases were situated mainly on the

margin of the nuclei rings. The above mentioned method did not require sophisticated equipment neither sterile environment nor expensive chemicals. The method ensures the survival of investigated fish. Moreover fish tolerate well amputation of a small part of their caudal fin and the regeneration is very fast. We proved that non-destructive chromosome preparation from regenerated fin can be used routinely in laboratory.

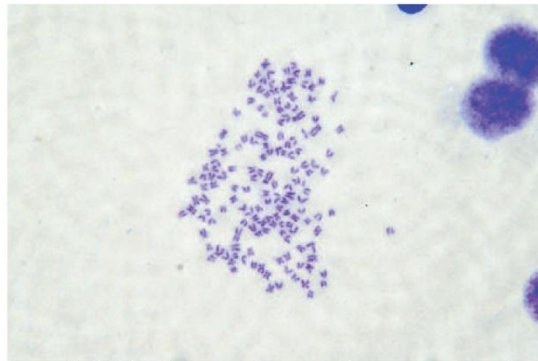


Fig.1. Metaphase of triploid silver Prussian carp (*Carassius gibelio*) isolated by non-destructive method from regenerate of caudal fin (magnification 1000 x).

5. Acknowledgements

This paper was supported by IRP MSM 6046070901. We are grateful to Dr. Martin Völker (University of Kent, UK) for explanation of the method and help in laboratory.

6. References

- Hartley, S. E., Horne, M. T. 1985. Cytogenetic techniques in fish genetics, *Journal of Fish Biology*, 26, 575-582
- Ohno, S., Muramoto, J., Christian, L., Atkin, N. B. 1967. Diploid – tetraploid relationship among old – world members of the fish family Cyprinidae, *Chromosoma*, 23, 1-9
- Peňáz M., Ráb P. & Prokeš M. 1979: Cytological analysis, gynogenesis and early development of *Carassius auratus gibelio*. *Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemoslovacae* 13 (7): 1-33.

- Ráb, P., Roth, P. 1988. Metody analýzy chromozomů. Cytogenetická sekce Československé biologické společnosti při ČSAV v Brně, 115-124
- Rodrigues, E., Collares-Pereira, M. J. 1996. NOR polymorphism in the Iberian species *Chondrostoma lusitanicum* (Pisces: Cyprinidae), *Genetica* 98, 59-63
- Völker, M., Kullmann, H. 2006. Sequential chromosome banding from single acetic acid fixed embryos of Chromaphyosemion killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae), *Cybium*, 30, 2, 171-176
- Wei, W. H., Zhang, J., Zhang, Y. B., Zhou, L., Gui, J. F. 2003. Genetic heterogeneity and ploidy level analysis among different gynogenetic clones of the polyploid gibel carp, *Cytometry part A*, 56A, 46-52

10.6 Příloha VI

práce VI

Knytl, M., Kalous, L. 2009. Mystery of chromosome number of silver Prussian carp (*Carassius gibelio*). In: Kubík, Š., Barták, M. (Eds.). Workshop on animal biodiversity, Jevany. Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha. p. 68-69. ISBN: 9788021320314.

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH A
PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

Workshop on animal biodiversity, Jevany

Štěpán Kubík and Miroslav Barták (editors)

2009

Mystery of chromosome number of silver Prussian carp (*Carassius gibelio*)

Martin Knytl¹ & Lukáš Kalous^{1,2}

¹Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, 16521 Praha 6- Suchbát, Czech Republic; e-mail: knytl@af.czu.cz, kalous@af.czu.cz

²Laboratory of fish genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR v.v.i. 277 21 Liběchov

Key words: *Carassius gibelio*; Cyprinidae; chromosome number; karyotype

The genus *Carassius* is represented by five species: crucian carp (*Carassius carassius*), the cosmopolitan gold fish (*Carassius auratus*) well known for its colourful varieties and bizarre shapes of body. Widely distributed silver Prussian carp (*Carassius gibelio*) that originated in East Asia and introduced into Europe in last centuries; the last two distinguishable species are „Ginbuna“ (*Carassius langsdorffii*) and “Gengorobuna“ (*Carassius cuvieri*) that occur mainly in Japan.

Our work deals with the cytogenetic characteristics of diploid – polyploid complex of Silver Prussia carp especially with chromosome numbers and its karyotypes.

The complex is called diploid – polyploid due to occurrence of diploid and polyploid individuals within populations. Chromosomes of diploid individuals occur in pairs (homologous chromosomes) one homologous chromosome has maternal origin and the second is of parental origin. Both parents contribute genetically to the (diploid) offspring. Diploid individuals of Silver Prussian carp are characterized by higher number of chromosomes and DNA amount in their nuclei in relation to the other members of the family Cyprinidae. This is due to fact that whole subfamily Cyprininae has evolutionary tetraploid origin.

Diploid forms of silver Prussian carp reproduce usually bisexually and they have 100 chromosomes. Polyploid forms of genus *Carassius* have about 150 chromosomes and are called triploids. Individuals with circa 200 chromosomes are then called tetraploids. Triploids are considered to be evolutionary hexaploids and tetraploids evolutionary oktaploids. Moreover in the karyotype of triploid *Carassius gibelio* we can find microchromosomes and small elements of chromosomes but their function remains mystery.

Silver Prussian carp can reproduce by gynogenesis - unisexual mode of reproduction. In gynogenesis, sperm from related species of the family Cyprinidae or even others activates egg and consequent embryonic

development. New progeny is genetically identical to the mother and is called clone.

Natural populations of silver Prussian carp consist usually of females (more than 80 %) and minor portion of males (up to 20 %). The origin of males is unknown.

In our study we have analysed diploid males and diploid and triploid females that form parental generation for crossbreeding experiments. The offspring of the crossbreeding experiments obtained were analysed as well. We have used two methods of chromosome preparation from the progeny: 1) Martin Völker non-destructive method of cytogenetic analyses that allows us to prepare nuclei suspension repeatedly from the same specimen, 2) invasive method in which nuclei suspension for cytogenetic analyses is prepared from kidney by direct procedure.

Suspensions obtained of nuclei were then dropped on slides, stained by Giemsa-Romanowski and analysed under microscope. Chromosome numbers of parental generation were determined as well as of their offspring.

Karyotype of diploid silver Prussian carp contained 100 chromosomes with 12 metacentric, 36 submetacentric and 52 subtelocentric/ telocentric chromosomes.

As result we can state that variability of chromosome numbers within individuals of triploid silver Prussian carp exists. Chromosome numbers fluctuated from 150 to 156. Modal chromosome number was 150. Two karyotypes of triploid silver Prussian carp were prepared, one from the individual with 150 chromosomes were consisted of 42 metacentric, 66 submetacentric 36 subtelocentric/telocentric chromosomes and 6 extra chromosomes. Second karyotype contained 36 metacentric, 45 submetacentric, 66 subtelocentric or telocentric chromosomes and 6 extrachromosomes.