

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra zoologie a rybářství



Vztah ploidie a délky střeva u karase stříbřitého
(*Carassius gibelio*)

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Liliana Kanavalová

Vedoucí práce: doc. Ing. Lukáš Kalous, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Vztah ploidie a délky střeva u karase stříbřitého (*Carassius gibelio*)“ vypracovala samostatně s použitím pramenů, které jsou citovány a uvedeny v příloženém seznamu literatury na konci práce. Jako autorka diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

Souhlasím taktéž s tím, že s výsledky mé diplomové práce může být naloženo podle uvážení vedoucího diplomové práce a vedoucího katedry. V případě publikace budu uveden jako autor.

V Praze dne: 8. dubna 2016

Podpis autora práce

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Lukášovi Kalousovi, Ph.D. za odborné vedení, praktické rady a vstřícný přístup. Oceňuji nastínění dané problematiky a udělená doporučení ohledně správné koncepce práce.

Dále děkuji za pomoc katedře Zoologie a rybářství za poskytnutí laboratorních podmínek a biologického materiálu. Zvláštní díky patří také katedře Veterinárních disciplín za její trpělivost a spolupráci spočívající v umožnění práce se světelným mikroskopem Nikon, kterým byly získány pozorované struktury, jež byly po nasnímání vyhodnoceny systémem LUCIA pro obrazovou analýzu dat.

Zvláštní poděkování patří též katedře Genetiky a šlechtění, zejména doc. Dr. Ing. Pavlovi Vejlovi, doc. Ing. Luboši Vostrému, Ph.D. a Ing. Jakobovi Vaškovi. Uvedený kolektiv poskytoval v průběhu celého statistického hodnocení nesmírně cenné připomínky.

Další díky patří také zahraniční studentce Efsun, za její pomoc se zpracováním biologického materiálu. V neposlední řadě samozřejmě děkuji i rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Vztah ploidie a délky střeva u karase stříbřitého (*Carassius gibelio*, Bloch 1782)

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá problematikou vztahu ploidie a délky střeva u karase stříbřitého (*Carassius gibelio*, Bloch 1782). Jejím cílem je posouzení vlivu ploidie na délku střeva včetně otestování souvislosti mezi délkou střeva a původem. Předpokladem je, že ploidie má vliv na délku střeva.

Součástí práce jsou informace o rozsáhlé problematice karase stříbřitého, který představuje nesmírně zajímavý živočišný druh, jež se vymyká mnohým dosud uváděným biologickým dogmatům. Vedle toho se věnuje také jevu „polyploidie“, který v úvodní části zdůrazňuje z evolučního hlediska jako neopomenutelný proces. Shrnuje též vliv polyploidie na anatomii, morfologii a fyziologii ryb. Popisuje také metodu přímého stanovení plochy jader erytrocytů (Er) z připravených krevních nátěrů pomocí techniky počítačové analýzy obrazu. V závěru řešerše jsou uvedeny nejpoužívanější způsoby hodnocení střevní morfometrie. Současně jsou zmíněny dvě případové studie porovnávající vliv stupně ploidie na délku střeva u dvou akvakulturně významných druhů. V této části jsou též uvedeny možné dopady polyploidie a naznačeny její důsledky na trávicí trakt.

Biologický materiál pocházel ze tří říčních lokalit (VS) na území ČR, povodí Odry (13 ks), Labe (tůň Řehačka, 18 ks) a Dyje (15 ks). Do studie bylo zahrnuto celkem 46 ryb. Všem rybám byla odebrána krev a z ní byly připraveny jednotlivé krevní preparáty. Následně byly ryby změřeny a posléze jim bylo vyjmuto střevo. Na základě měření velikosti plochy 150 jader Er byla předběžně určena ploidie jednotlivých ryb v příslušných VS. Před statistickou analýzou byly z morfometrických dat vypočteny relativní střevní ukazatele (z poměru střeva a standardní délky = RGL, a z poměru střeva a délky těla = GL/BL). Všechny získané údaje byly statisticky vyhodnoceny.

Na základě testování plochy jader Er od sebe byly odlišeny jednotlivé diploidní a triploidní ryby s 99 % pravděpodobností. Uvnitř téměř plně diploidních VS bylo odhaleno celkem pět triploidních ryb s 99 % pravděpodobností. Mezi diploidními a triploidními jedinci byl na základě všech provedených analýz potvrzen statisticky významný rozdíl v délce střeva s 95 % (99 %) pravděpodobností. Ploidie má tedy vliv na délku střeva. Vliv původu na délku střeva nebyl u diploidního karase stříbřitého nalezen. Závěrem byl v této práci pro podobné studie navržen spolehlivější ukazatel než RGL, a to parametr GL/BL.

Klíčová slova: *Carassius gibelio*, plocha, erytrocyt, stupeň ploidie, střevo, morfologie, ryba, ichtyologie, invazivní druh

Relationship of Ploidy and Length of Intestine in Prussian Carp (*Carassius gibelio*, Bloch 1782)

Summary

This thesis deals with the relation between ploidy and length of intestine in Prussian carp (*Carassius gibelio*, Bloch 1782). Its aim is to assess the impact of ploidy on the length of the intestine, including testing the connection between the length of the intestine and origin. A prerequisite is that the ploidy affects the length of the intestine.

Part of the work is extensive information on the issue of Prussian carp, which is a very interesting species that defies many, yet claimed biological dogmas. In addition, also deals with the phenomenon of "polyploidy", which emphasizes in the introductory part of an evolutionary process as indispensable. Also summarizes the impact of polyploidy on anatomy, morphology and physiology of fish. It also describes the method for the direct determination of surface nuclei of erythrocytes (Er) from blood smears prepared using techniques of computer image analysis. In conclusion, research indicates most widely used methods for evaluation of intestinal morphometry. A mentions two case studies comparing the effect of ploidy levels on the length of intestine in two major aquaculture species. In this part, also referred to the possible effects of polyploidy and suggests its implications for digestive tract.

Biological material derived from three river locations (VS) in the Czech Republic Odra River Basin (13 pcs.), Labe (pool Řehacka, 18 pcs.) and the Thaya (15 pcs.). The study included a total of 46 fish. All fish were bled and it was prepared by the individual blood preparations. Subsequently fish were measured and then they were eviscerated. By measuring the nuclear surface area of 150 Er was preliminarily determined ploidy individual fish in the respective VS. Before statistical analysis, morphometric data were calculated relative intestinal indices (the ratio of guts and a standard length = RGL, and from the ratio of the intestine and body length = GL/BL). All the data were statistically analyzed.

Based on testing nuclear surface areas of Er were distinguished from each individual diploid and triploid fish with 99 % probability. Inside almost fully diploid VS was revealed five triploid fish with 99 % probability. Between diploid and triploid individuals was based on all performed analyzes confirmed statistically significant difference in the length of the intestine with 95 % (99 %) probability. Ploidy thus affects the length of the intestine. Influence of length of gut with origin at the diploid in prussian carp not found. Finally, for similar studies, this work was designed more reliable indicator than RGL, and this parameter GL/BL.

Keywords: *Carassius gibelio*, area, erythrocyte, ploidy level, intestine, morphology, fish, ichthyology, invasive species

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE	3
3.1	Fenomén polyploidie spojený s unisexuální formou reprodukce	3
3.2	Triploidie	9
3.2.1	Vlastnosti triploidů	9
3.2.2	Indukce polyploidie	13
3.2.3	Detekce polyploidie	15
3.3	Komplikovaná taxonomie r. karas (<i>Carassius</i>)	16
3.4	Historická a současná distribuce k. stříbřitého	18
3.5	Povaha populací v ČR, ploidní a sexuální status	21
3.6	Proměnlivý karyotyp k. stříbřitého	23
3.7	Unisexuální způsoby reprodukce u ryb	25
3.8	Unikátní dvojí režim reprodukce u k. stříbřitého	26
3.9	Počítačová analýza obrazu jader Er	30
3.10	Studie zabývající se vlivem ploidie na délku střeva	32
4	MATERIÁL A METODY	35
5	VÝSLEDKY	39
6	DISKUZE	64
7	ZÁVĚR	69
8	POUŽITÁ LITERATURA	70
9	SEZNAM POUŽITÝCH POJMŮ, ZKRATEK A SYMBOLŮ	74
10	SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY	75

1 ÚVOD

Je známo, že triploidní ryby vykazují jisté odlišnosti spojené se zvýšeným stupněm ploidie. Ač byly prokázány změny na úrovni téměř všech orgánových soustav, spočívající též ve sníženém počtu buněk kvůli jejich větší velikosti, fyziologie triploidních ryb je zřejmě v důsledku této kompenzace velmi podobná. Triploidie však výrazně ovlivňuje rozmnožovací soustavu, protože bývá spojena se sterilitou a produkcí aneuploidních gamet.

Tato skutečnost obecně nahrává rychlejšímu růstu triploidních jedinců oproti diploidům, proto je tento ploidní stav v akvakultuře cíleně indukován. Karas stříbřitý, ale vlastní unikátní dvojí způsob reprodukce. Tato vlastnost spolu s jeho značnou odolností a tolerancí hypoxie, má zásadní význam ve výsledné kompetici o potravu a prostor s dalšími druhy ryb. Bezesporu všichni karasi jsou asijského původu. Do Evropy byly sladkovodní ryby r. karas introdukovány z Asie hned několikrát. Právě tyto formy mají mít negativní vliv na evropské říční systémy.

Zavlečený triploidní biotyp k. stříbřitého, který se klonálně rychle namnožil a obsadil většinu vhodných stanovišť, tak představuje značnou hrozbu pro nativní ichtyofaunu. Během své působnosti na území ČR z našich vod vytlačil dříve běžné druhy kaprovitých ryb, lína a karase obecného. Negativní dopad má na rybniční chov kapra, se kterým úspěšně hybridizuje.

Diplomová práce ověřuje vliv ploidie na délku střev u k. stříbřitého. Obecným předpokladem je, že by se délka střev mezi jedinci různé ploidie měla lišit. To vyplývá z dvou nedávných studií zabývajících se touto oblastí. Je ale známo, že triploidní ryby vykazují v jednotlivých vlastnostech značné mezidruhové rozdíly. A to, jak v negativním, tak i v pozitivním slova smyslu.

2 VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE

- **Hypotéza H₀:** Ploidie má vliv na délku střeva. Mezi diploidními a triploidními jedinci bude nalezen statisticky významný rozdíl v délce střeva. Existuje vliv ploidie na délku střeva.
- **Hypotéza H_A:** Ploidie nemá vliv na délku střeva. Mezi diploidními a triploidními jedinci nebude nalezen statisticky významný rozdíl v délce střeva. Neexistuje vliv ploidie na délku střeva.

Cílem diplomové práce je posouzení vztahu mezi délkou střeva a ploidii u karase stříbřitého včetně zhodnocení souvislosti délky střeva s původem.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Fenomén polyploidie spojený s unisexuální formou reprodukce

Sexuální reprodukce, která vznikla zhruba před jednou miliardou let (Bytyutskyy et Flajšhans, 2011) je u živočichů univerzální způsob rozmnožování i přes dvojnásobné náklady vůči reprodukci unisexuální (produkce samců). Dochází při ní k tzv. genomové diluci (Zhang et al., 2015), a na vzniku každého nového jedince se geneticky rovnocenně podílejí oba rodiče v poměru 1:1 (Kalous, 2013). Tato kombinace parentálních genomů je uskutečněna mechanismem meiózy, který se evolučně vyvinul spolu s pohlavním způsobem rozmnožování (Flajšhans et Ráb, 2013). Tento proces je také označován jako redukční dělení či meiotické zrání.

Většina zvířat má duplikovanou sadu chromozomů, $2n$ a je označována za biologicky diploidní. Zmíněný proces meióza, zahrnující dvě po sobě jdoucí jaderná dělení, ale pouze jeden cyklus replikace DNA, zajišťuje vývoj snížených (haploidních) gamet s poloviční sadou chromozomů, tedy $1n$. Jinými slovy, od každého homologního chromozomu je v každé nové gametě přítomná pouze 1 kopie. Tímto způsobem, je po syngamii samčího a samičího pronukleu, spolu se vznikem diploidní zygoty, obnoven exaktní počet chromozomů a znovunastolen diploidní ($2n$) stav nového organismu v každé generaci (Flajšhans et Ráb, 2013; Zhang et al., 2015).

Důvodem úspěchu sexuální reprodukce je evoluční výhoda rekombinace genomů obou rodičů. Tím jsou poskytnuty nové genetické varianty a genotypové kombinace, které prostřednictvím specifických mechanismů usnadňují opravu poškozené DNA, odstraňují škodlivé mutace a přinášejí adaptivní potenciály pro proměnné prostředí. Zjednodušeně, sexuální reprodukce je efektivní způsob, jak zajistit stabilitu genomu a vytvořit genetickou diverzitu. Navíc v evolučním horizontu zaručuje sexuálně se množícím druhům dlouhou životnost (Zhang et al., 2015).

Naproti tomu, asexuální vývojové linie bez funkční meiózy, byly obecně považovány za ekologicky neúspěšné a v evolučním kontextu krátkodobé. A to, právě z důvodu absence genetické rekombinace a akumulace škodlivých mutací v důsledku tzv. Müllerovy rohatky, která byla zároveň navržena jako teorie vysvětlující vývoj sexu (Avise, 2015; Dawley, 1989; Gui et Zhou 2010; Zhang et al., 2015).

Nejisté evoluční postavení unisexuálních zvířat má podporovat i nezbytná potřeba dobrého demografického vývoje. Při němž nesmí vytlačit své sexuální příbuzné natolik, aby tím způsobili vlastní extinkci (Avisé, 2015). Přesto, u některých obratlovců bylo odhadem tempa mutací, odhaleno nečekané stáří přesahující více než jeden milion let. Nejstaršími unisexuálními obratlovci jsou mloci r. *Ambystoma*, kteří vznikli před 2,4 – 5 mil. let (Gui et Zhou, 2010). Proto byl tento paradox, i přes zpochybňování tohoto věku max. stářím 60 000 generací (Avisé, 2015), evolučními genetiky popřen (Zhang et al., 2015), a zdánlivý rozpor teprve čeká na „plné“ objasnění (Gui et Zhou, 2010).

Je však jisté, že klonální linie pravděpodobně vznikaly a zanikaly po celou dobu dlouhé evoluční historie šupinatých plazů a ryb. Ačkoli se zdá, že je klonalita u obratlovců biologickou aberací, asexuální jevy jsou u nich poměrně rozšířené a některé klony či hemiklony byly v evoluci přinejmenším mírně úspěšné. Též stojí za zmínění, že částečné klonální linie mohou vznikat v rámci smíšených systémů páření, a že některé unisexuální linie jsou ve skutečnosti kvazi-sexuální nebo hemiklonální, což naznačuje evoluční význam rekombinace i v asexuální říši (Zhang et al., 2015).

Atypická, asexuální reprodukce, stejně jako samotný asexuální druh, jsou často spojovány s fenoménem polyploidie (Gui et Zhou, 2010; Kalous, 2013). Polyploidie, jinak znásobení počtu chromozomových sad, též genomová multiplikace však v tomto ohledu, představuje neobyčejně důležitý, relativně vzácný, evoluční mechanismus. Nejenže zvyšuje genetickou diverzitu, ale významně přispívá k diverzifikaci a speciaci, u rostlin i zvířat (Flajšhans et Ráb, 2013; Suda, 2009; Van de Peer et al., 2003). Častěji se vyskytuje u rostlin, přesto lze poměrně velký počet polyploidů nalézt i u zvířat mezi bezobratlými, rybami, obojživelníky a plazy (Luo et al., 2014). Senzací byl nálezn polyploidních hlodavců, osmáka pouštního a slaništního, protože se soudilo, že u savců není tento jev slučitelný se životem (Suda, 2009).

Nicméně i zdravý jedinec obsahuje tkáň tvořenou polyploidními buňkami např. v játrech. S přihlédnutím na evolučně polyploidní původ velkého množství organismů, lze konstatovat, že je život z velké části polyploidní fenomén (Suda, 2009). V tomto ohledu je ovšem důležité mezi sebou nezaměňovat polyploidii evoluční a biologickou. Prvně jmenovanou je třeba chápat pouze ve fylogenetickém významu. Každý organismus, který vykazuje diploidně – haploidní cykly v každé generaci, je totiž biologicky diploidní. A to, bez ohledu na počet chromozomů a obsah DNA v jádře, tedy nehledě na evolučně ploidní stav genomu. O velkém

významu tohoto biologického jevu, svědčí i poměrně nenáročné experimentální vyvolání polyploidních stavů u ryb, které lze s úspěchem využívat v akvakultuře (Flajšhans et Ráb, 2013).

Tento jev vzniká jako vedlejší efekt biotických nebo abiotických procesů (Flajšhans et Ráb, 2013). Obecně znamená přítomnost více než dvou tj. tří a více chromozomových sad v buněčném jádře. A umožňuje výskyt určitých procesů, jako jsou chromozomové přestavby, uspávání genů, rekombinace aj. (Bytyutskyy et Flajšhans, 2011). Pokud jsou přítomny tři sady, jedná se o triploidii ($3n$), při čtyřech o tetraploidii ($4n$), při šesti o hexaploidii ($6n$) atd. (Suda, 2009). Rozlišujeme dva typy polyploidie: allopolyploidii, ke které dochází při mezidruhové či mezidruhové hybridizaci, kombinací dvou nebo více genomů (zmnožení celé heterospecifické sady chromozomů) a autopolyploidii, kdy nastává genomové zdvojení v rámci jednoho druhu nebo populace (multiplikace celé homospecifické sady chromozomů), a to jak v lichých, tak i v sudých násobcích (Flajšhans et Ráb, 2013; Luo et al., 2014; Suda, 2009).

Do polyploidního stavu se buněčné jádro, respektive organismus dostává procesem zvaným polyploidizace. Polyploidizace je dynamický proces, při němž mohou být starobylé polyploidizační události zkomplikovány další karyotypovou evolucí a novější události mohou vést k několika ploidním úrovním u jednoho druhu (Bytyutskyy et Flajšhans, 2011). Jestliže k mechanismům působícím polyploidní stavy dochází přirozeně, tj. bez zásahu člověka, jedná se o spontánní polyploidii. K autopolyploidii mohou vést některé poruchy gametogeneze, poruchy procesu oplození a stárnutí ovulovaných oocytů, ale u ryb je poměrně vzácná. Běžná je u nich allopolyploidie pocházející z mezidruhové hybridizace. Výsledky těchto spontánních polyploidizačních událostí se mohou fixovat v evoluci a vést ke vzniku nových taxonů (druhů, rodů, linií, čeledí atd.) evolučně polyploidního původu (Flajšhans et Ráb, 2013).

Následkem hybridizace mezi sexuálně se rozmnožujícími rodičovskými druhy jsou reprodukční odchylky, spočívající ve změně normálního bisexuálního typu rozmnožování na některý typ rozmnožování asexuálního (gynogeneze, hybridogeneze, kleptogeneze). Vlivem specifických kombinací genomů odlišných druhů, totiž u hybridů dochází ke změnám v meiotickém dělení a k posunu poměru pohlaví obvykle směrem k samičímu (Dawley, 1989). Takto vzniklé samice jsou v dospělosti schopny se dále rozmnožovat, avšak produkují neredukované diploidní gamety (Kalous, 2013). Část z nich vytvoří po stimulaci spermií klonálně se množící potomky (nerekombinují genom), ale u části dojde k začlenění genomu

spermie a tím ke vzniku triploidie (Flajšhans et Ráb, 2013). Takové hybridní polyploidní komplexy mohou skutečně představovat vývojově slepé uličky (Bytyutskyy et Flajšhans, 2011), ovšem po této polyploidizaci, následované asexualitou, může nastat opačný proces diploidizace. Tím je obnoveno bisexuální rozmnožování u nově vzniklého polyploidního druhu. Hybridní polyploidní forma pak představuje možné přechodné stádium adaptivní despeciace (Flajšhans et Ráb, 2013).

Klonální biotyp, je schopen se po naleznutí svého místa ve vhodném prostředí rychle namnožit, a tím převládne v populaci vůči jedincům se sexuální formou reprodukce. Prostřednictvím tzv. triploidního mostu může v hybridním asexuálně se množícím komplexu vzniknout nový tetraploidní druh se sexuální reprodukcí. Tito jedinci vznikají splynutím 3n hybridní jikry se spermií dalšího druhu tzv. přidáním genomu. Vzácným generováním tetraploidních sexuálně se množících jedinců pravděpodobně vzniká nový druh s evolučně tetraploidní úrovní, který si dále počíná jako diploidní, přičemž haploidní úroveň jeho gamet odpovídá diploidní úrovni předka (Flajšhans et Ráb, 2013).

Tento přechod od unisexuální reprodukce směrem k pohlavnímu rozmnožování se zvýšením stupně ploidie, lze pravděpodobně aplikovat i na situaci v rodě karas (*Carassius*). Přičemž opakováním tohoto procesu dochází k dalšímu zvýšení ploidie (až po dnes zatím nejvyšší známý triploidní derivát evolučně hexaploidní úrovně, osmana tibetského, kde $2n = 446$, který je dokladem tří takových cyklů). Tím pravděpodobně existuje kauzální vztah mezi hybridizací a zvýšením ploidní úrovně, k němuž dochází v rámci polyploidizace nejen v evoluci genomu ryb, ale též rostlin často (Flajšhans et Ráb, 2013; Suda, 2009).

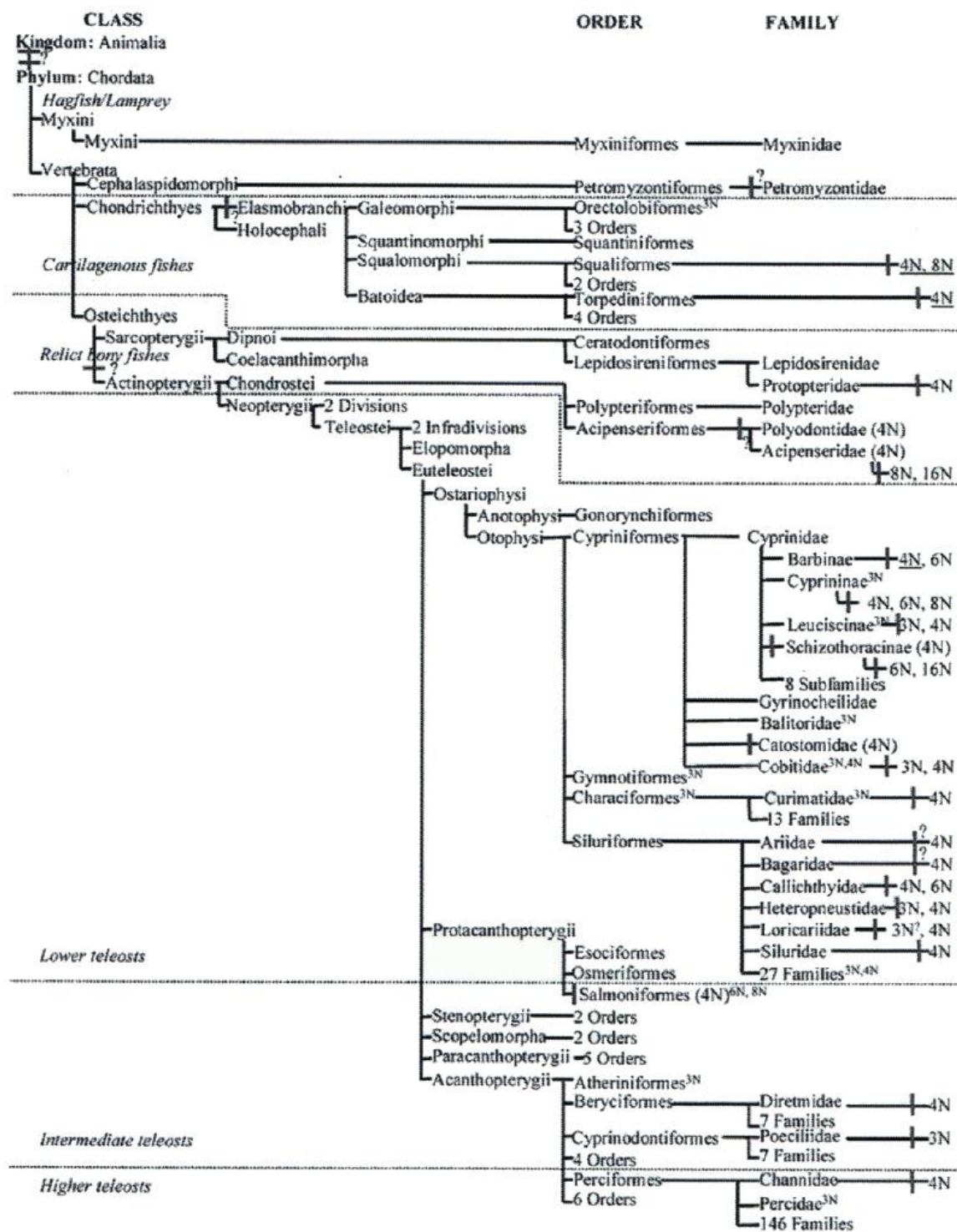
Jak již bylo naznačeno dříve, unisexuální druhy a polyploidie byli dlouho považováni za nedůležitou složku evoluce genomu obratlovců. S odkazem na Müllera, se usuzovalo, že vyvinutý mechanismus determinace pohlaví je překážkou pro vznik polyploidních druhů u bisexuálních zvířat, a vede akorát ke zrodu evolučně slepé uličky v podobě 3n jedinců (Bytyutskyy et Flajšhans, 2011). V tomto ohledu, polyploidizace u zvířat skutečně narušuje sexuální determinaci a rozvoj viz hybridizace. Opakující se polyploidizační události, ale bez debat přispěly k evolučnímu úspěchu obratlovců (Luo et al., 2014). Na počátku jejich evolučního vývoje byla odhalena tři kola celogenomové duplikace (Flajšhans et Ráb, 2013).

Tyto tři epizody jsou dnes známé jako tzv. 3R hypotéza (blíže Van de Peer et al., 2003). První z nich se odehrála při vzniku obratlovců, druhá při zrodu čelistnatců (Gnathostomata)

a poslední při vzniku kostnatých ryb (Teleostei), po jejich oddělení od předků dnešních jeseterů (*Acipenser*), veslonosů (*Polyodon*) a kostlínů (*Lepisosteus*, *Atractosteus*). Navíc, výzkum zabývající se genovými synteniemi stanovil pravděpodobný haploidní počet chromozomů u protokaryotypu obratlovců ($n = 11$), protokaryotypu čtvernožců ($n = 18$) a protokaryotypu kostnatých ryb ($n = 12$). Kromě toho, tyto hypotetické rekonstrukce odpovídají poměrům nalezeným ve skutečnosti a potvrzují 3R hypotézu (Flajšhans et Ráb, 2013).

Značná abundance Teleostei, se tak zdá být v příčinné souvislosti s těmito starobylými polyploidizačními událostmi (Flajšhans et Ráb, 2013). Duplikované geny totiž představují materiál nezbytný pro evoluční diverzifikaci (Van de Peer et al., 2003). Známé případy evoluční polyploidie u ryb se nepravidelně vyskytují u příčnoústých (Chondrichthyes), a u obou základních evolučních větví ryb, tedy násadcoploutvých (Sarcopterygii) a nejpočetnější dnes existující skupiny – paprskoploutvých (Actinopterygii). Blíže viz Flajšhans et Ráb (2013) a obrázek č. 1.

Obrázek č. 1. Výskyt polyploidie u ryb. Převzato od Leggatt et Iwama (2003).



3.2 Triploidie

3.2.1 Vlastnosti triploidů

Triploidie je stav, při kterém somatické buňky obsahují tři sady chromozomů (koneciferických nebo heterospecifických) místo běžných dvou sad u diploidů, jež vyplývá ze změny životního prostředí nebo hybridní stabilizace. Přirozený výskyt triploidů v rybích populacích, je způsoben příležitostnou retencí druhého polárního tělíska v oplodněné jikře (Maxime, 2008; Tiwary et al., 2004).

V důsledku vyššího obsahu DNA jsou jádra buněk u $3n$ jedinců větší než jádra buněk $2n$ jedinců (Kalous et Petrtýl, 2004). Kvůli udržení karyoplazmatického (cytonukleárního) poměru to znamená, že buňky většiny orgánů (mozku, sítnice, ledvin, jater, varlat, vaječnicků) a tkání (krev, chrupavky, svaly, epitel) jsou u triploidů větší než ty, u jejich diploidních protějšků (Maxime, 2008). Na druhé straně, pokud jsou porovnáváni dva stejně velcí jedinci, jeden diploidní a druhý triploidní, logickým závěrem je, že v těle triploidního jedince je buněk méně (Kalous et Petrtýl, 2004).

Snížený počet buněk orgánů a tkání ve srovnání s diploidy, nasvědčuje tomu, že velikost buněk zůstává prakticky stejná jako u diploidní ryby (Maxime, 2008). Tato redukce může mít ovšem vliv na různé fyziologické procesy. Například, nároky na kyslík jsou u triploidních jedinců vyšší (Kalous et Petrtýl, 2004). Pro polyploidní jedince se proto běžně uvádí, že se zvětšujícím se objemem buněčného jádra se zvětšuje i objem buňky, což je spojeno s redukcí počtu buněk v příslušné tkáni (Vetešník et al., 2004).

3.2.1.1 Hematologie

Buněčné a jaderné rozměry erytrocytů jsou s rostoucí hladinou ploidie výrazně navýšeny. Toto zvýšení buněčné velikosti, je však s rostoucí úrovní ploidie kompenzováno úměrným poklesem počtu Er, čímž se udržuje konstantní hodnota hematokritu pro určitý druh. Zvýšená velikost Er vlivem ploidie je následovaná vyšším obsahem hemoglobinu na buňku (Tiwary et al., 2004; Vetešník et al., 2004), ale celková hladina hemoglobinu ukázala u různých druhů triploidních ryb variabilní výsledky. Další rozdíly ve fyziologických parametrech krve nebyly významně odlišné. Pouze jednou byla řešena rychlost obnovy spotřebovaného kyslíku a osmolality po zátěži ve prospěch $3n$ (Tiwary et al., 2004). Občas uváděný nižší obsah Hg u triploidů souvisí pravděpodobně s umělou indukcí triploidie. Na základě hematologických parametrů může být pro triploidní jedince jiných druhů ryb

stanovena nižší oxygenační kapacita krve a nižší úroveň nespecifické imunity ve srovnání s diploidy. To však neplatí pro karase stříbřitého, který vyniká právě svou odolností a vysokou tolerancí k hypoxii (Vetešník et al., 2004).

3.2.1.2 Sterilita

Triploidi jsou obecně považováni za sterilní, kvůli nerovnoměrnému meiotickému dělení tří sad homologních chromozomů při gametogenezi. Triploidie vede též k nedostatečnému vývoji gonád, a pokud triploidi produkují gamety, jsou obvykle aneuploidní (Flajšhans et Ráb, 2013; Tiwary et al., 2004). Existují však reprodukční výjimky například v allopolyploidních hybridních komplexech, kam mimo jiné spadá i rod karas (Flajšhans et Ráb, 2013).

Z obecné hypotézy sterility triploidů vychází vysvětlení jejich lepšího růstu. Diploidi totiž spotřebují část přijaté energie z potravy na vývoj gamet, zatímco triploidi tuto energii použijí na tělesný růst, což se odráží i na lepší kvalitě masa (Flajšhans et Ráb, 2013; Tiwary et al., 2004). Lze tak říci, že sterilita chrání somatický růst, přežití a kvalitu masa (JUT) od negativních účinků pohlavního dospívání (Maxime, 2008). Výsledky užitkových vlastností triploidů (růst, přežití, jatečná výtěžnost, zbarvení svaloviny, % vody a tuku v mase, složení AK a MK atd.) jsou však velmi různorodé (Flajšhans et Ráb, 2013).

Z endokrinologického hlediska, související nízká aktivita GnRH u triploidních ryb může být důsledkem absence stimulace pozitivní zpětnou vazbou skrze pohlavní hormony a/nebo výsledkem snížené citlivosti senzorických buněk na environmentální podněty, zmíněné níže. Všeobecně, triploidní samice různých druhů ryb vykazují nízké hladiny gonadotropinu a pohlavních steroidů. Díky tomu mají nízkou biosyntézu vitellogeninu (Tiwary et al. 2004). Na rozdíl od samic, 3n samci většiny druhů vlastní normální hladiny pohlavních hormonů a obecně mají větší gonadální rozvoj varlat než samice, u kterých bývá vývoj ovárií obvykle více postižen. Přes poškozený mechanismus meiózy, se mohou varlata triploidních samců vyvinout do normální velikosti s plně funkčními steroidogenními buňkami (Flajšhans et Ráb, 2013; Tiwary et al., 2004).

U některých druhů, ale byly zaznamenány poruchy gonadálního vývoje nebo navzdory dobře vyvinutým varlatům u nich nebyly pozorovány žádné zralé spermie. Pokud ano, byly morfologicky abnormální (Tiwary et al., 2004). Tato úplná funkční sterilita – nulová produkce spermií se týká některých významných akvakulturních autotriploidů. Vzhledem ke zmíněné

potenciální plodnosti samců některých druhů ryb, ale triploidie neznamena 100 % sterilitu (Flajšhans et Ráb, 2013; Maxime, 2008). Za narušený vývoj oocytů může zřejmě meiotické selhání a nedostatečná syntéza vitellogeninu. Jinými slovy, u obou pohlaví lze pozorovat zhoršený vývoj gamet, přičemž triploidní ryby vlastní zvláštní hypotalamo-hypofýzogonádovou osu, která je triploidii afektována na každé úrovni endokrinní hierarchie (Tiwary et al., 2004).

3.2.1.3 Růst

Literatura o míře růstu triploidních ryb je neprůkazná, protože si výsledky často protiřečí. A to dokonce i mezi jedinci stejného druhu, chovanými za podobných podmínek. Růstový výkon je tedy velmi proměnlivým faktorem (Maxime, 2008; Tiwary et al., 2004). Obecným tvrzením je, že by triploidi měli růst rychleji než jejich diploidní protějšky, protože jsou jejich geny početnější (33 %), jejich jádra a buňky jsou větší a obvykle u nich není odkloněna žádná energie z růstu do produkce gamet (Maxime, 2008). Růstová schopnost triploidů je druhově specifická a jak bylo zmíněno, i v rámci druhu se může lišit. Záleží například na kvalitě jiker při indukci (Flajšhans et Ráb, 2013). Uvádí se, že dynamika růstu svalových vláken je triploidii kladně ovlivněna, vzhledem ke kompenzaci sníženého počtu buněk zvýšenou mírou hypertrofického růstu, který ovšem ve výsledném porovnání $2n$ s $3n$ může být často podobný (Maxime, 2008).

Ohledně podobného růstu, stojí za zmínku také postreprodukční kompenzační růst vlivem anabolického efektu steroidů u $2n$, což může růstovou výhodu $3n$ snížit. Faktem je, že i u $3n$ má do období pohlavní dospělosti docházet k 10 – 15 % růstové depresi, ale i přes zmíněný kompenzační růst $2n$ po dosažení pohlavní zralosti se uvádí, že $3n$ rostou o 10 – 30 % rychleji než jejich $2n$ protějšky. Kromě dospívání, mohou být dalšími faktory ovlivňující růst mezidruhov a vnitrodruhov kompetice, typ šoku použitý k indukci a vzhledem k níže zmíněnému chronickému stresu u triploidů také suboptimální podmínky chovu. Záleží tak na teplotě vody, jejím nasycení O_2 a hustotě obsádky (Flajšhans et Ráb, 2013).

Triploidní samice, mohou občas kromě lepší svalové pigmentace vykazovat vyšší ukládání viscerálního tuku (Tiwary et al., 2004), ačkoli větší množství jak svalových, tak útrobních lipidů bylo některými studiemi vyvráceno. Nicméně, s mezidruhovými rozdíly byla prokázána ploidní závislost složení MK (Maxime, 2008).

3.2.1.4 Chování

Zdá se, že chování triploidů je vlivem sníženého počtu buněk v CNS a snížené hladiny hormonů též ovlivněno. To způsobuje nižší schopnost reaktivity na stimuly životního prostředí, což může vést k expresi abnormálního chování u triploidních ryb, jako jsou snížená agresivita a omezené vnímání podnětů (Tiwary et al., 2004).

3.2.1.5 Vitalita a zdraví

Mezi vlastnostmi triploidů, nelze nezmínit také skutečnost, že je triploidie v negativním ohledu často spojována s předpokladem kosterních a anatomických abnormalit či malformací (např. syndrom deformace dolní čelisti, snížený počet obratlů aj.). Ačkoliv, se odolnost triploidů vůči nálezům, zdá být vyšší (mezidruhová hybridizace mává větší spektrum parazitů při menším pomnožení) či podobná $2n$, v některých případech byla vyslovena možnost větší náchylnosti $3n$ (Maxime, 2008). Každopádně u některých nálezů, triploidie představují nežádoucí riziko přenašečství.

Triploidní ryby mohou příležitostně vykazovat zvýšenou stresovou citlivost zejména na chronický stres (vysoká biomasa, špatná kvalita vody s nízkým O_2), pravděpodobně v důsledku nižší tolerance hypoxie. Navíc, při vysokých teplotách mají zřejmě narušenou schopnost uchýlit se k anaerobnímu metabolismu, ale konfliktní výsledky opět brání uzavření tématu citlivosti triploidů ke zvýšení teploty, stejně jako schopnosti osmoregulace především u smolifikčních druhů. Naopak v pozitivním slova smyslu, mají $3n$ ryby pravděpodobně sníženou karcinogenezi a triploidie u nich signifikantně koreluje se zvýšenou rychlostí regenerace ploutví (prokázáno u $3n$ obojživelníků), přičemž možná vykazují i relativně vyšší syntézu proteinů opět v důsledku sníženého počtu buněk (Maxime, 2008).

3.2.1.6 Shrnutí

Fyziologie triploidních ryb se zdá být, v mnoha aspektech velmi podobná té diploidní i přes základní biologické rozdíly v cytologii a reprodukci (Maxime, 2008). Vzhledem k tomu, že triploidní ryby mají některé abnormální fyziologické funkce, představují jedinečný potenciál pro objevení nových biochemických a molekulárních mechanismů, včetně nastínění jejich evoluce (Tiwary et al., 2004).

Funkční důsledky triploidie (sníženého počtu buněk), ale byly ještě kolem milénia špatně nebo nedostatečně studovány, a jsou omezeny pouze na vybrané oblasti (hematologii,

reprodukcí, růst a využití O_2). Fyziologické kapacity všech orgánových soustav, ovšem vychází právě z buněčné struktury a funkcí. V tomto ohledu, není zatím jasné, zda zvýšený buněčný objem může prostřednictvím prodloužených vnitřních vzdáleností ohrozit cesty signální transdukce, a zda snížení poměru povrchu k objemu, vyplývající ze zvýšeného objemu buněk, může narušit biomembránový transport. Proto, mají tyto ryby vysoký potenciál pro základní i lékařské výzkumy (Maxime, 2008).

3.2.2 Indukce polyploidie

Téměř současně s objevováním přírodních polyploidních forem ryb ve třicátých letech minulého století, se objevily první pokusy, které následně prokázaly, že lze polyploidii téměř u všech ryb navodit experimentálně, a to poměrně jednoduchým způsobem (Flajšhans et Ráb, 2013; Maxime, 2008; Tiwary et al., 2004). Swarupova indukce s prvním úspěšným odchovem triploidních ryb až do dospělosti, vedla k zobrazení jeho postupu a od 70. let 20. stol. odstartovala intenzivní studium technik, vedoucích k umělé indukci polyploidie (Maxime, 2008).

Umělá syntéza polyploidů, se poté stala nedílnou součástí celosvětové akvakulturní produkce nejen ryb, ale i měkkýšů. U ryb se cíleně vyvolává nejčastěji triploidní, méně často pak tetraploidní stav, a to pomocí zásahů do vývoje zygoty, zejména fyzikálních (Flajšhans et Ráb, 2013). Hlavními důvody indukce triploidie jsou následující potenciální projevy užitkových vlastností, vycházející z výše uvedeného: zvýšený růst $3n$ (pokud sterilita zabrání vyšší růstové depresi spojené u $2n$ s pohlavním dozráváním), snížení sexuálního a teritoriálního chování, které vede k nižšímu stresu a menšímu plýtvání energií, zvýšené přežití (pokud je sexuální reprodukce spojena s mortalitou $2n$), lepší kvalita masa (vybarvení svaloviny, % tuku, % vody v mase atd.) ve srovnání s pohlavně dospívajícími či dospělými $2n$, kontrola přemnožení a sterilita při vysazování nepůvodních druhů (Flajšhans et Ráb, 2013; Tiwary et al., 2004).

Ačkoli tato praktika někdy nemůže zaručit 100 % funkční sterilitu upravené populace, je obecně uznávána jako nejpraktičtější, ekonomický a účinný způsob produkce sterilních ryb ve velkém měřítku, s minimálními interakčními dopady na divoké populace (Maxime, 2008). Potenciál indukce tkví v nových možnostech komerčního využití dalších druhů ryb v akvakulturních chovech (Tiwary et al., 2004).

Nejběžnější indukční metody jsou založeny na supresi druhého meiotického dělení oplozených jiker, čímž jsou produkováni zmínění triploidi (Maxime, 2008). Při tomto potlačení dochází k depolymeraci tubulinových vláken vřeténka s následnou inhibicí extruze druhého polárního tělíska (Flajšhans et Ráb, 2013). Toho je dosaženo použitím fyzikálních (teplotní a tlakové šoky či jejich kombinace) nebo chemických (cytochalasin B, kolchicin, oxid dusný, freon, vysoké pH s Ca) induktorů během embryonálního vývoje s výsledným zadržením druhého pólového tělíska (Maxime, 2008).

Účinnost šoku je silně závislá nejen na době jeho trvání, ale také na době po oplodnění, ve které je aplikován. Načasování je důležité, protože použití v anafázi II nebo později zabrání průběhu druhého meiotického dělení. Přežití jiker či plůdků a procento triploidů zase závisí na povaze šoků. Proto by pro každý druh měly být identifikovány podmínky, vedoucí k nejvyšší produkci triploidů. U ryb se také ukázalo, že i když může být následný embryonální vývoj touto manipulací narušen, při běžně používané intenzitě a trvání šoků jsou škody způsobené indukcí triploidie velmi omezené (Maxime, 2008).

Aplikace chemických látek není používána často, protože vede k mosaicismu. Jistou alternativou byla aplikace interploidní techniky, která spočívala v produkci tetraploidně odvozených triploidů z křížení $2n$ s $4n$, která vedla k zisku 100 % $3n$ potomstva. U některých druhů, měli takoví triploidi lepší schopnost růstu a procento přežití než $3n$ indukovaní fyzikálními šoky (Flajšhans et Ráb, 2013), ale genomové změny při této indukci představovaly značnou abnormalitu a též vedly k mozaicismu. Spolu s relativně nízkou plodností ryb, byl komplikovaný i odchov $4n$ rodičů, proto se od této metody u ryb též ustoupilo (Flajšhans et Ráb, 2013; Maxime, 2008; Tiwary et al., 2004). Pro akvakulturní produkci triploidů nelze rovněž nezmínit i produkci mezidruhových hybridů, nejen pro jejich vzhled, ale i lepší přežitelnost, růst, a méně deformit ve srovnání s $2n$ hybridy (Flajšhans et Ráb, 2013).

Pokud se usiluje o indukci tetraploidie, šok musí zasáhnout cytokinezi prvního mitotického dělení a depolymerací tubulinových vláken vřeténka zabránit rozdělení duplikovaných sad chromozomů do dceřiných buněk (Flajšhans et Ráb, 2013).

3.2.3 Detekce polyploidie

Pro jakékoliv výzkumy prováděné nejen na karasích stříbřitých, ale i na dalších rybích druzích s výskytem různých úrovní ploidie, je nutné znát jejich ploidní úroveň (Kalous et Petrtýl, 2004).

První metody detekce vycházely z nepřesných technik extrakce objemu DNA (ne konstantní objem DNA ve všech tkáních, mezi jedinci stejného druhu) a odhadů obsahu DNA v buňce. Postupně byly nahrazeny spolehlivějšími technikami používanými dodnes. Metody využívané k přesnému určení ploidní úrovně ryb, je možné rozdělit na přímé a nepřímé (Bytyutskyy et Flajšhans, 2011).

Přímé metody jsou založeny na stanovení obsahu DNA, zahrnují počítání chromozomů a určení množství obsahu DNA. Karyotypizace (stanovení karyotypu analýzou chrom.) je mezi přímými metodami jedinou nevyvratitelnou technikou k určení ploidie, ale je též časově nejnáročnější, což snižuje její použitelnost v hromadném screeningu ryb. Alternativní metody se tedy sestávají z kvantifikace obsahu DNA pomocí mikrofotometrie, spektrofluorometrie, mikrodensitometrie, počítání jadérek v jádrech nebo průtokové cytometrie (Bytyutskyy et Flajšhans, 2011; Tiwary et al., 2004).

Z těchto metod byla FCM pro svou značnou rychlost a vysokou přesnost dlouho považována za bezpochyby nejlepší dostupnou techniku (Maxime, 2008), která představovala neinvazivní způsob určení obsahu DNA, pomocí kterého byl u ryb následně determinován stupeň ploidie. Jako vzorky pro tuto analýzu bylo možné využít ústřížky hřbetní ploutve, která se vyznačuje rychlou regenerací do 2 – 3 týdnů. Výhodou této metody je její aplikovatelnost na velmi malé ryby, které tak nemusejí být obětovány. A oproti ostatním metodám může být na jeden vzorek analyzováno několik tisíc buněk (Lamatsch et al., 2000). Příkladem použití této metody u r. karas pro větší množství vzorků (128 ks) může být nedávná studie Rylkové et al. (2013), kde rozdíl obsahů DNA mezi ploidiemi nabýval hodnot $4,38 \pm 0,49$ pg pro 2n a $6,74 \pm 0,49$ pg pro 3n.

Nepřímé metody jsou založeny především na ověření buněčné nebo jaderné velikosti (Maxime, 2008). Triploidní ryby byly identifikovány různými nepřímými metodami (Tiwary et al., 2004). Vzhledem k tomu, že jsou Er snadno získatelné, byly a jsou též nejpoužívanějšími modely (Maxime, 2008). V minulosti ale byly jakékoli hematologické

přístupy pro determinaci ploidie zpochybňovány, protože ji údajně vždy přesně neodrážely (Maxime, 2008; Tiwary et al., 2004).

Nicméně, měření jaderné a buněčné velikosti erytrocytů se ukázalo být nejvhodnější a široce používanou metodou pro identifikaci triploidních ryb (Tiwary et al., 2004). Měření těchto geometrických vlastností Er pomocí počítačové analýzy obrazu, je v současnosti uznávaná a zřejmě i nejvíce používaná metoda pro rychlou detekci ploidie u velkého množství vzorků. O jejím bezproblémovém použití u ryb včetně karasů, svědčí také celkem nedávné studie porovnávající tento přístup s běžně užívanými metodami (například Flajšhans, 1997; Halačka et Lusková, 2000; Kalous et Petrtýl, 2004; Lusková et al., 2010, Lusková et al., 2008; Vetešník et al., 2006; Vetešník et al., 2004).

Pro ucelený výčet nepřímých metod, lze jmenovat dříve vyvinuté alternativní techniky, jako jsou analýza Coulter Counter, elektroforéza proteinů, fluorescenční obarvení jádra nebo metoda blokové cytokineze. Za zmínku na závěr, stojí taktéž determinace ploidie pomocí morfologického vyšetření, které má ovšem svá omezení. Vizuálně lze totiž odlišit pouze několik málo případů, zejména triploidní mezidruhově hybridy. Nehybridní triploidi, obsahující tři sady konspecifických chromozomů jsou totiž obvykle považováni za morfologicky nerozeznatelné od diploidů. Potvrzení stupně ploidie z morfometrických znaků (srovnání poměrů tělesných rozměrů) je proto druhově specifickou otázkou, a tím zůstává i zobecnění této metody ošemetné. Každá technika má své výhody a nevýhody, a volba metody stanovení ploidie závisí na cílech a nákladech (Maxime, 2008).

3.3 Komplikovaná taxonomie r. karas (*Carassius*)

Podle nedávného odborného příspěvku Kalous (2013) současná taxonomie r. *Carassius* připouští celkem devět následujících druhů: karas obecný (*Carassius carassius*), k. zlatý (*C. auratus*), k. stříbřitý (*C. gibelio*), k. gengorobuna, též Cuvierův (*C. cuvieri*), k. ginbuna (*C. langsdorfii*), k. nagabuna (*C. buergeri*), k. nigorobuna (*C. grandoculis*) a k. stříbrnooký (*C. [auratus] argentheaphthalmus*). Nicméně, některé taxonomické databáze považují k. nagabunu, k. nigorobunu a k. stříbrnookého pouze za synonyma či poddruhy karase zlatého (Kalous, 2013).

Problematická taxonomie karasů na území Evropy, vychází mimo jiné i z minulosti, kdy nezřídka docházelo k záměnám mezi k. obecným (*Carassius carassius*) a k. stříbřitým (*Carassius gibelio*), dříve označovaných jako *Cyprinus carassius* a *Cyprinus gibelio*. Tyto

substituce pramenily z nesprávně definovaných rozdílů v tehdejší literatuře. Navíc díky velké morfologické podobnosti divoké a ferální formy k. zlatého s k. stříbřitým zřejmě nebylo výjimečné ani jejich vzájemné zaměňování (Kalous, 2013).

Zásluhou těchto zmatků, byl tenkrát například triploidní gynogenetický biotyp *C. gibelio* z dnešního druhového komplexu *C. auratus* (fylogeneticky tvořen jedinci *C. auratus* a *C. gibelio*) přiřazen k druhovému taxonu *C. auratus* a označen subspecií *C. a. gibelio*. Z důvodu neustále se měnící taxonomie, která používala pro k. stříbřitého více druhových i poddruhových jmen, tak vyplynul velký problém při srovnávání starších studií. Kromě toho, řada autorů může mít stále ještě zažitá starší označení. Situaci kolem názvosloví komplikuje také další skutečnost, při níž nemusí všichni karasi splňovat kritéria druhu. Tím je vedle přítomnosti klonálních biotypů, myšlena především existence různých genomových kombinací u hybridů (Kalous, 2013).

Obrázek 3. Neotyp samce karase stříbřitého původem ze Slezska (2n). Diploidní forma je v uvedeném severovýchodním cípu ČR, tedy v povodí Odry domácí. Převzato od Kalous (2013).



V dřívějších studiích, se proto museli potýkat s nejednoznačnou taxonomickou pozicí k. stříbřitého. Například v práci Lusková et al. (2008), pro něho tito autoři použili název *C. auratus* a trinomická označení byla chápána jako formy. Chytře spletitou taxonomii vyřešil

stejný kolektiv v novější práci (2010), v níž uvedl, že k. stříbřitý (postaru *C. auratus*) představuje komplex zahrnující několik forem různého taxonomického postavení.

Naopak, již před těmito pracemi byl v textu Kalous et al. (2004), na základě mtDNA sekvencí genu pro cyt b, vysloven požadavek na formální oddělení hybridního polyploidního komplexu k. stříbřitého (*C. gibelio*) od k. zlatého (*C. auratus*). A to, vzhledem k rozdílné druhové úrovni vyplývající z úzkých fylogenetických vztahů mezi asijskými a evropskými představiteli k. stříbřitého ve vztahu ke k. zlatému. U některých autorů, ale bylo možné setkat se s tímto druhovým rozlišením ještě před jejich odloučením, zatímco jiní tvůrci tehdy užívali tradiční pojetí poddruhů k. stříbřitého (*C. auratus*).

Obdobně byl *C. gibelio* jasně oddělen i novější studií Rylková et al. (2008), přičemž byla naznačena vyšší diverzita r. *Carassius* v Eurasii než se tehdy připouštělo. Což dokládá i navýšení genetické rozmanitosti r. karas o další linii *C. „M“*, která může představovat nový druh (Rylková et Kalous, 2013a).

3.4 Historická a současná distribuce k. stříbřitého

Dříve zmíněná taxonomická nepřehlednost spolu s obtížnou morfologickou identifikací zasahovala samozřejmě také do distribučních dat. Zejména nesprávné spojování k. stříbřitého s ferálním k. zlatým, vedlo v minulosti na některých místech zcela jistě k počátečnímu přehlížení agresivní expanze unisexuálního triploidního biotypu k. stříbřitého (Kalous, 2013). Na rozdíl od *C. auratus*, ale byla expanze *C. gibelio* v Evropě velmi úspěšná (Kalous et al., 2004).

K. stříbřitý může být považován za nejúspěšnější cizí rybu v Evropě, která v průběhu několika posledních desetiletí osídlila vody téměř všech evropských zemí. Proto, ho lze označit za nejrozšířenější rybu v celé Eurasii (Kalous et al., 2004; Lusková et al., 2010; Lusková et al., 2008). Podle Lusk (2010) se v ČR dominantní *C. gibelio* v současnosti vyskytuje téměř ve všech vodách s výjimkou typicky pstruhových vodních toků. Na území ČR se v současnosti můžeme setkat s druhy *C. carassius*, *C. gibelio*, *C. langsdorfii* a občasně s *C. auratus* (Kalous, 2013; Rylková et al., 2013; Rylková et Kalous, 2013a).

Nativní k. obecný byl v Evropě v minulosti hojný, ale jeho přirozené populace jsou nyní vzácné a neustále klesají. Důvodem jeho úbytku je vedle ztrát vhodných biotopů, především masivní šíření polyploidního komplexu k. stříbřitého (Rylková et Kalous, 2013a).

Jméno *C. auratus* bylo původně vztaženo jen k domestikované okrasné formě, později také k formě ferální, protože obě přes morfologickou různorodost tvoří jasně definovanou fylogenetickou větev (Kalous, 2013).

Tento druh se dostal do Evropy v 17. století v podobě domestikovaných zlatých rybek, a po prvních odchovech v zajetí (1728), následoval jeho průnik do otevřených vodních systémů nezáměrnými úniky, popř. úmyslnými vysazeními (Kalous, 2013; Rylková et al., 2013). V povodí Dunaje je výskyt feralizovaného k. zlatého datován před k. stříbřitým nejpozději počátkem 19. stol. Charakteristikou divokých populací je ztráta morfologických znaků domestikace. Mimo to, jsou tito jedinci schopni v místech sympatrického výskytu hybridizovat s k. obecným, stejně jako k. stříbřitý (Kalous, 2013). Tito mezidruhová hybridy představují velkou hrozbu pro původního k. obecného a diploidního k. stříbřitého, který je původní v povodí Odry. Pro ucelenost, japonský *C. langsdorfii* byl v ČR nalezen na dvou oddělených lokalitách (Rylková et Kalous, 2013a).

K. stříbřitému, stejně jako ostatním karasům, je připisován východoasijský původ (Rylková et al., 2013). Nicméně pro popsání jeho rozšíření, se jeví za vhodné rozlišovat distribuci diploidní a triploidní formy. Triploidní invazní biotyp vznikl nejspíše hybridizací neznámých rodičovským druhů pravděpodobně v povodí Amuru (Kalous, 2013). Původně byl *C. gibelio* popsán na severovýchodě Střední Evropy (2n, Rylková et Kalous, 2013a) a v Dněpru (3n), ale více na západ a v dunajském povodí byl jeho výskyt zpochybněn.

Od roku 1940 je již datována jeho přítomnost v říčním systému Dunaje, přičemž první záznamy pocházejí z Bulharska, Rumunska a Maďarska. Tyto země byly považovány za jeho originální rozsah. Po r. 1950, měl k. stříbřitý z tehdejšího Sovětského svazu začít postupně napadat vody nižšího a středního úseku povodí Dunaje. S touto invazí, dokumentovanou v 60. letech 20. stol., je možné spojit triploidní formu (Kalous, 2013; Lusková et al., 2010; Rylková et al., 2013). Ta po r. 1960 navýšila svou početnost a začala se šířit směrem na západ (Rylková et al., 2013). V současnosti má pruský kapr širokou geografickou distribuci. Zasahuje zejména střední a východní Evropu, a dále východní Asii. Byl tudíž nalezen v mnoha zemích eurasijského kontinentu včetně České republiky (Gui et Zhou, 2010; Rylková et al., 2013).

Do našich vod imigroval 3n k. stříbřitý v r. 1975 ze zmíněného Dunaje. Přesněji přes slovensko – rakouský úsek Moravy do výše ležícího segmentu na jejím soutoku s Dyjí a další

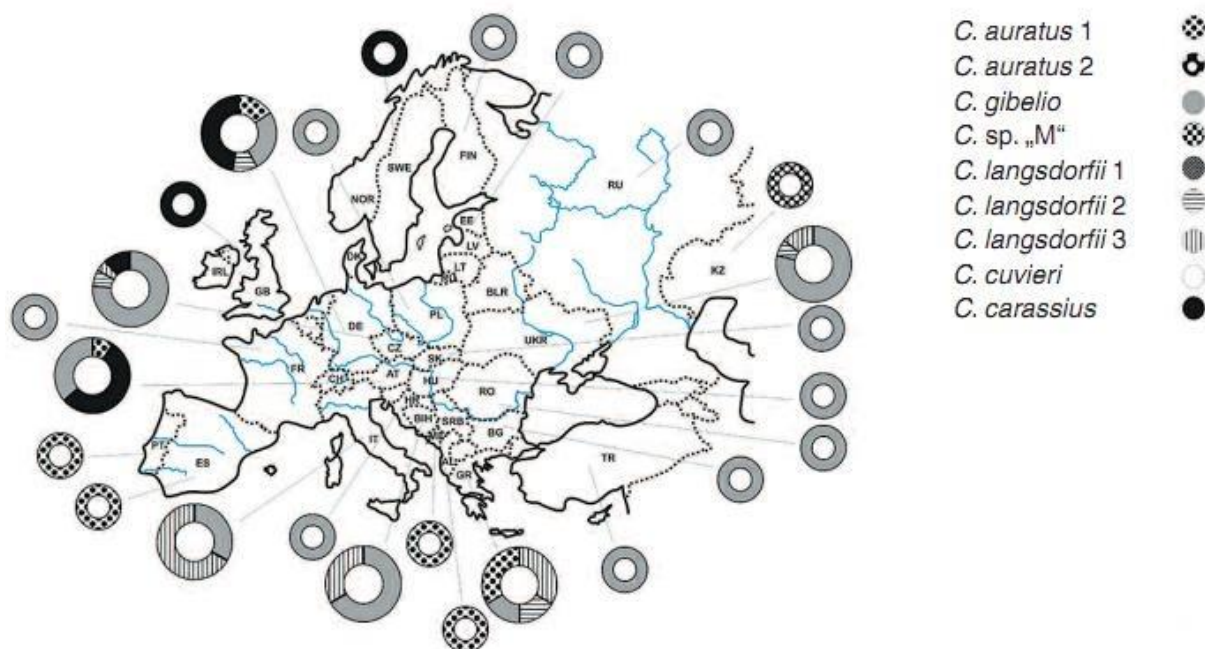
migrační aktivitou napadl toky v povodí (Lusk et al., 2010; Lusková et al., 2010; Lusková et al., 2008). V průběhu 15 – 20 let se rozšířil celou hydrografickou sítí ČR a osídlil většinu vhodných stanovišť. Kromě nebyvalé schopnosti migrační aktivity triploidního biotypu, za jeho masivním rozšířením stojí především umělé introdukce v kapřích násadách, díky nimž překonal hranice mezi jednotlivými povodími a úmořími v celé Evropě (Kalou et al., 2004; Kalous, 2013; Lusk et al., 2010; Lusková et al., 2010; Lusková et al., 2008).

Antropogenní zavlečení, bylo jednoznačně prokázáno v povodí Labe a Odry (Lusková et al., 2008). Pro představu, k r. 2008 byl jeho výskyt v ČR potvrzen v nadpolovičním množství mapovacích kvadrátů. Konkrétně v 387 z 675 čtverců na území ČR (Lusková et al., 2010). Karas stříbřitý, tak vytvořil ve vyhovujících podmínkách stabilní, často velmi početné naturalizované populace, a v poslední třetině minulého století se stal trvalou součástí ichtyofauny ČR (Lusk et al., 2010; Lusková et al., 2010; Vetešník et al., 2004).

V regionu kolem soutoku řek Moravy a Dyje dominuje místní ichtyofauně již od r. 1976 (Lusková et al., 2010). Na základě dlouhodobého výzkumu Lusková et al. (2008), trvajícího od první zaznamenané kolonizační vlny k. stříbřitého na území ČR, bylo těmito autory vymezeno několik časových období dle vývoje jeho populačního stavu, sexuálně – ploidní transformace a velikosti úlovků. Populační boom, lze znázornit na příkladu úlovků z r. 1985 – „pouze“ 7,4 tis. ks vs. r. 1990 – 63,9 tis. ks. Oproti tomu, v r. 2006 došlo k mírnému poklesu na 50,6 tis. ks, ale vzhledem k jeho stále vysoké početnosti nebyl zatím tento úbytek nijak zdůvodněn (Lusková et al., 2008).

Pokud se vrátíme k původu evropských populací k. stříbřitého, dosud se tuto otázku nepodařilo zcela objasnit (Kalous, 2013; Rylková et al., 2013). Nejpravděpodobnějšímu původu na dálném východě a dalšímu šíření v souvislosti s importy, někdy oponuje domněnka autochtonní originace (Kalous et al., 2004). Spolu s rozšířením k. stříbřitého, byla v Dunaji evidována i přítomnost nepůvodních východoasijských parazitů r. *Gyrodactylus* (*Monogenea*), která způsobila spekulace o jeho druhotném výskytu v Evropě (Kalous, 2013; Lusková et al., 2010). Na druhé straně, analogie s přirozeným postglacionálním šířením jiných východoasijských druhů jako jsou střevle bahenní (*Rhynchocypris percunurus*) a sekavec sibiřský (*Cobitis melanoleuca*), předpokládá, že je k. stříbřitý nativní ve východní a střední Evropě, přičemž by jeho distribuce mohla zasahovat přinejmenším stejně tak daleko jako v případech střevle bahenní, která s ním z velké části sdílí shodná stanoviště (Kalous, 2013).

Obrázek č. 3. Mapa Evropy zobrazující výskyt mitochondriálních linií karasů v jednotlivých státech se značnou převahou *C. gibelio*. Převzato od Kalous (2013).



Rozluštění tohoto problému komplikuje skutečnost že, původní přirozeně se vyskytující evropské populace k. stříbřitého, byly pravděpodobně na mnoha místech v SV Evropě vytlačeny introdukovanými populacemi triploidního biotypu, které znamenají exponenciální růst těchto klonálních populací z generace na generaci. Je tak pravděpodobné, že pokud v Evropě původní k. stříbřitý existuje, vlivem hybridizace se jeho genom mnohde stal součástí biotypů tvořících dnešní komplex *C. auratus* (Kalous, 2013), což dokládá i studie Rylková et Kalous (2013). K rozluštění kolonizační historie jednotlivých populací k. stříbřitého mohou přispět právě diploidní populace, protože se ukázalo, že mtDNA není kvůli nízkému polymorfismu vhodným markerem. Příležitostně je přijímána teorie dvou kolonizačních vln, prostřednictvím přirozené a umělé introdukce (Kalous, 2013).

3.5 Povaha populací v ČR, ploidní a sexuální status

Jak již bylo zmíněno výše, počáteční populace k. stříbřitého se pravděpodobně skládala výlučně z triploidních samic (Lusková et al., 2010; Vetešník et al., 2004), které reprodukovaly gynogeneticky s využitím samců jiných druhů kaprovitých ryb (Lusk et al., 2010; Lusková et al., 2008). Těmito samci byli v první řadě kapr a karas obecný, následovali například samci plotice obecné, cejna velkého, cejnka malého, jelce jesena a tak dále

(Lusková et al., 2010). Uvádí se, že v průběhu roku u tohoto biotypu docházelo i ke třem výtěrům (Lusk et al., 2010).

Po stabilizaci populací, se vedle triploidních samic objevili diploidní jedinci s klasickou reprodukcí (Lusk et al., 2010). Výskyt malého množství samců po r. 1990, kteří do r. 2000 nepřevyšovali 10 % (Lusková et al., 2010), odstartoval v populaci kolem soutoku Moravy a Dyje proces transformace původně unisexuálních populací na populace smíšené. Halačka et Lusková (2000), uvádí jako klíčový rok 1995. Přítomností samců se změnil nejen sexuální, ale i ploidní status těchto populací (Lusková et al., 2010; Lusková et al., 2008) na charakter diploidně – polyploidního či spíše polyploidně – hybridního komplexu s převahou 3n jedinců (Kalous et al., 2004; Vetešník et al., 2006). Podle Lusková et al. (2010) jsou samci převážně diploidní, s příležitostnými triploidy. Na základě Lusková et al. (2008) se k r. 2008 globální zastoupení samců pohybovalo okolo 30 %. U samic podle těchto autorů, které v populaci stále převažují, tvoří větší část triploidní (60 %), a menší část diploidní jedinci. Ojedíněle se u obou pohlaví mohou vyskytnout jedinci tetraploidní, ale ti jsou poměrně vzácní (Lusková et al., 2010; Lusková et al., 2008, Vetešník et al., 2004).

Výzkum ze „Soutoku“ z let 2001 až 2007, který analyzoval celkem 2092 vzorků, našel 60 % 3n jedinců, téměř 40 % 2n jedinců a méně než 1 % 4n jedinců. Z těchto jednotlivců bylo 79,25 % samic a 20,75 % samců. Triploidní samice tvořily 74,25 %, diploidní 24,79 % a tetraploidní 0,96 %. Zatímco triploidní samci představovali 5,53 %, diploidní 93,55 % a tetraploidní 0,92 %. Z toho diploidní jedinci měli vyrovnaný poměr pohlaví, samci 49,69 % a samice 51,31 % (Lusková et al., 2010). Triploidní samice, které představovali první okupační vlnu, tedy stále tvoří podstatnou část populací k. stříbřitého v ČR (Vetešník et al., 2004). Což naznačuje, že nepohlavní forma reprodukce má stále zásadní úlohu při udržování jeho metapopulace nejen v oblasti dolního toku Dyje. Populace na našem území se však v zastoupení pohlaví a ploidie, která je rozhodujícím faktorem pro způsob reprodukce, značně liší (Lusková et al., 2008).

Například, ve výše uvedeném „Soutoku“, který zahrnuje tok Dyje, krátký úsek Moravy a řadu soliterních biotopů v záplavovém území, má velký význam pro sexuální poměry období záplav, kdy dochází k propojení jednotlivých metapopulací. Navíc soustavné mísení populací z dolního úseku Moravy a případně i z Dunaje, umožňuje absence migračních bariér. Pro ilustraci rozdílů, lze v této oblasti uvést lokality se 100 % zastoupením samic (Pastvisko), lokality s velmi nízkým zastoupením samců (Včelínek) a lokality s téměř stejným

zastoupením pohlaví (zemník Bažina). Solitérní biotopy, jako jsou např. Chomoutov nebo Hrbáčkovy tůň v povodí Labe (Řehačka), mohou vykazovat metapopulace výhradně invazivního biotypu – 3n samíc (Lusková et al., 2008; Rylková et Kalous, 2013b). Naopak, 2n forma pruského kapra je domácí v severovýchodním cípu ČR (Slezsko), tedy v povodí Odry. Ta, se ale bohužel postupně začleňuje do diploidně – polyploidního hybridního komplexu k. stříbřitého (Rylková et Kalous, 2013a).

Výskyt a zvyšování podílu samců v populaci je připisováno vývoji a stabilizaci populace (Lusková et al., 2008). Ovšem je otázkou, jakým způsobem bude rozvoj smíšených populací pokračovat. Vysvětlení příčin transformace existuje v krátkodobém časovém horizontu celá řada (Lusková et al., 2010). V dlouhodobém hledisku se ovšem nabízí nová polyploidizační událost, kdy opakováním dochází k dalšímu zvýšení stupně ploidie. Současný karas stříbřitý, by tak mohl představovat pokročilé a zároveň rekurentní stádium tohoto procesu, přičemž současní 2n jsou v podstatě 4n, 3n evoluční hexaploidi a 4n evoluční oktaploidi (Flajšhans et Ráb, 2013; Gui et Zhou, 2010). Pro uskutečnění tohoto procesu je navíc nezbytný přechod ze sexuální reprodukce rodičů přes unisexuální způsob rozmnožování, zpět k reprodukci sexuální (Flajšhans et Ráb, 2013). Je známo, že stávající populace karasů, se rozmnožují jak gynogeneticky, tak i sexuálně (Lusková et al., 2010).

3.6 Proměnlivý karyotyp k. stříbřitého

Počet chromozómů a karyotyp jsou druhová specifika, která jsou u rodu karas použitelná pro druhovou determinaci, protože morfologické znaky nejsou patrné. Existuje řada studií o karyotypu a počtu chromozómů stříbrného pruského kapra, ale lze v nich nalézt mnoho neshod. V poslední době se usuzuje, že k. stříbřitý představuje proměnlivý počet chromozómů, který je nejpravděpodobněji důsledkem rozmanitých způsobů rozmnožování (Knytl et al., 2008).

Rod *Carassius* je evolučně tetraploidního původu, proto vlastní zhruba dvojnásobný počet chromozómů a tedy dvojnásobné množství DNA v buněčných jádrech, než většina kostnatých ryb včetně kaprovitých (Cyprinidae) s modálním počtem 48-50 chromozómů (Bytyutskyy et Flajšhans, 2011; Flajšhans et Ráb, 2013; Kalous, 2013). Vyšší počet je přisuzován starým polyploidizačním událostem (Bytyutskyy et Flajšhans, 2011). Všichni karasi tedy vlastní minimální počet chromozómů $2n = 100$. Protože prošli procesem diploidizace, i přes dvojnásobný počet chromozómů se biologicky projevují jako klasičtí

diploidů s bisexuální reprodukcí, a jsou tak i označováni (Kalous, 2013). Kromě nich, se u karase stříbříteho vyskytují také jedinci s přibližně 150 chromozómy. Ti jsou obvykle označováni jako „triploidní“ (Kalous et Petrtýl, 2004; Kalous et al., 2004; Kalous, 2013). U této formy je však situace poněkud složitější viz reprodukce (Kalous et Petrtýl, 2004).

Počet chromozómů mezi jedinci triploidního biotypu totiž kolísá v rozmezí 150 – 160, protože se tento biotyp vyznačuje přítomností párových i nepárových mikrochromozómů, a lze ho označit za „aneutriploida“ (Kalous, 2013). Tuto fluktuaci karyotypů potvrzuje i pozorování přírodních klonů se 156 nebo 162 chromozómy. Navíc u nich dochází k různému přeskupení genomu, chromozómu a inkorporaci chromozómového fragmentu při páření či manipulaci mezi rozdílnými klony (Gui et Zhou, 2010; Zhang et al., 2015). Gynogenetické rozmnožování tak umožňuje subgenomové nebo dokonce genomové začlenění (Gui et Zhou, 2010; Kalous, 2013). Tetraploidní jedinci vlastní kolem 200 chromozómů (Kalous et al., 2004). Umělým pokusem, byli gynogeneticky získáni $4n$ jedinci s 212 chromozómy (Gui et Zhou, 2010).

Počet chromozómů může být navíc ovlivněn také sexuální reprodukcí mezi stejnými triploidními klony, v důsledku produkce aneuploidních spermií u triploidních samců. Pokud taková nedokonalá gameta oplodní jikru, mohou se v potomstvu vyskytnout jedinci s odlišným počtem chromozómů, většina z nich kvůli tomu uhynie, ale ti z nich, kteří byli počati spermiemi s téměř úspěšným redukčním dělením, mohou normálně přežít (Kalous, 2013).

Jako další názorný příklad nestálého počtu chromozómů, lze uvést studii Knytl et al. (2008), kde byla testována hypotéza, zda bude mít potomstvo stejný počet chromozómů a karyotyp jako rodičovští jedinci. Autoři vybrali diploidní a triploidní samice, a jednoho diploidního samce. Diploidní samice měly 106 chromozómů, triploidní samice vlastnily 158 chromozómů a diploidní samci měli 100 chromozómů. V reprezentativním vzorku, měli potomci ze tření mezi diploidy 100 chromozómů, ale dva jedinci vykazovali karyotyp s více než 120 chromozómy. Potomci ze spojení mezi $3n$ samicemi a $2n$ samci měli méně než 150 chromozómů v devíti případech, 150 chromozómů ve čtyřech případech a více než 150 chromozómů taktéž ve čtyřech případech (Knytl et al., 2008). Při křížení jednotlivých klonů triploidních biotypů lišících se v počtu chromozómů, tedy potomstvo vykazuje odlišný počet chromozómů při srovnání s klony rodičovskými (Kalous, 2013).

3.7 Unisexuální způsoby reprodukce u ryb

Jakékoli reprodukční odchylky od procesu meiózy, který zajišťuje exaktní počet chromozomů v každé generaci prostřednictvím pohlavního způsobu rozmnožování, s sebou obecně nesou nutnost využívat jiný způsob reprodukce. U ryb se lze setkat s následujícími formami asexuální reprodukce, gynogenezí a hybridogenezí (Avisé, 2015; Kalous, 2013).

U první se v podstatě jedná o sexuální parazitismus heterospecifických samců, přičemž gynogenní samice z unisexuálních biotypů potřebují jejich spermie k aktivaci buněčných divizí v jikře. Tito samci, ale nemají žádný genetický podíl na svých mezidruhových „dcerách“, které jsou klony matky (Avisé, 2015).

Využití spermie však s sebou nese jistou pravděpodobnost „průsaku“ genetického materiálu samce do vajíčka gynogenetické samice. Pokud se otcovské geny dostanou do genomu potomstva gynogenetické matky, mohou být příčinou výskytu malého podílu samců v potomstvu (Kalous, 2013; Lusková et al., 2008). Tento typ gynogeneze s částečným začleněním genomu otce, který se podílí na fenotypu potomstva, se označuje jako allogynogeneze (Gui et Zhou, 2010). Jedná se vlastně o otcovskou introgresi při „selhání gynogeneze“ (Lamatsch et al., 2000). Stojí za zmínění, že allogynogeneticky se rozmnožující karasi stříbřítí jsou široce využíváni například v čínské akvakultuře (Gui et Zhou, 2010).

Při hybridogenezi dochází obecně k meiotickému snížení jiker a fertilizaci heterospecifickou spermií, čímž otcovské chromozómy napomáhají dočasně obnovit ploidní stupeň v potomstvu. Zárodečné buňky dcer, ale později podstoupí abnormální meiózu s odhozením paternálních chromozomů a výsledné gamety nenesou žádné otcovsky odvozené geny (Avisé, 2015).

U této formy reprodukce se hybridní taxon rozmnožuje zpětným křížením s rodičovským druhem (Kalous, 2013). V případě karasů stříbřítých, možná stojí za zvážení i termín kleptogeneze. Při ní unisexuální biotypy inkorporují kousky jaderné DNA od sympatrických kongenerů. Existence kleptogenetických biotypů nasvědčuje tomu, že by někteří známí unisexuální obratlovci nemuseli být striktně klonální nebo hemiklonální, ale získávají výhody rekombinace (Avisé, 2015).

3.8 Unikátní dvojitý režim reprodukce u k. stříbřitého

Jak již bylo naznačeno, karasi stříbřítí uplatňují dvě reprodukční strategie. Diploidní jedinci se rozmnožují klasickou sexuální reprodukcí a probíhá u nich standardní meióza, během níž chromozómy tvoří pravidelné bivalenty (Kalous, 2013). Pro triploidní jedince, bylo dříve navrženo obtížné dokončení meiózy, kvůli více než 2 sadám chromozómů (Zhang et al., 2015). Skutečnost, že 3 sady nejsou dělitelné 2, zdůrazňuje např. Nevoral (2012). Ukázalo se však, že to v případě pruského kapra není tak úplně pravda.

U triploidního biotypu karasů stříbřitých, byl prokázán poměr mezi obsahem DNA v jádrech Er a obsahem DNA ve spermích blízky poměru 2:1 (Kalous, 2013). Spermie „3n“ karase stříbřitého mohou projít normálním redukčním dělením s výslednými gametami na úrovni 1,5n, přičemž po oplození dochází k syngamii a následně k rekombinaci jejich genomů (Kalous et Petrtýl, 2004).

K obdobné situaci dochází i u redukčního dělení jiker 3n samic, alespoň některých klonů (Zhang et al., 2015). Takové dělení, tří sad chromozómů u nich mělo být nemožné, přesto existuje. Významným příspěvkem k této problematice, byla mimo jiné nedávná studie Zhanga et al. (2015), která zkoumala cytologické a vývojové mechanismy u klonu D. U tohoto polyploidního klonu k. stříbřitého prokázala koexistenci jak unisexuální, tak i sexuální reprodukce, včetně dokončení normálního průběhu meiózy s extruzí obou polárních tělísek bez ohledu na to od koho pocházela spermie. Mimo to, odhalila tři druhy jaderných událostí a vývojového chování u jiker oplodněných třemi typy spermii (stejný klon, jiný klon a kapr obecný).

Alespoň někteří kloni polyploidního pruského kapra, tedy mohou mít schopnost normálního dokončení meiózy, díky unikátním modifikacím redukčního zrání, což napovídá o sofistikovaném reprodukčním mechanismu (Nevoral, 2012; Zhang et al., 2015). Podle typu spermie, která se o jikru uchází, je vybrána příslušná možnost z dalšího vývojového chování jikry. Zralá jikra tudíž vlastní tři různé spermální odezvy pro pohlavní a nepohlavní způsob rozmnožování. Ve výsledku to vede ke střídání několika režimů reprodukce – sexuální, unisexuální gynogeneze a „hybridu – podobné“ reprodukce (Zhang et al., 2015).

Různá chování dynamického jádra s příslušnými časovými rozdíly jednotlivých jaderných událostí mezi třemi druhy spermii, jsou dána rozdílnou genomovou replikací. Mechanismy zodpovědné za specifické chování jádra a související vývojové změny

u oplodněných jiker jsou totiž dány replikačním stavem před štěpením genomu. Oproti zygotickému vývoji jiker bylo možné v případě „oplodnění“ jikry jiným klonem a jiným druhem pozorovat časné vývojové a embryonální alternace, které měly za následek zpoždění první mitotické metafáze (Zhang et al., 2015).

Podrobněji, zralý oocyt dokončí první meiózu a během svého zrání vytlačí první polární tělísko. Spolu se vstupem spermie, zralá jikra dokončí druhou meiózu vytlačením druhého polárního tělíška, a zahájí proměnlivou odezvu dle reprodukčního režimu (Zhang et al., 2015).

V reakci na spermie ♂ stejného klonu, se jedná o typický způsob pohlavního rozmnožování, ve kterém fúzí ♂ i ♀ prvojádra vzniká zygota, která podstupuje první mitózu. V rámci tohoto druhu reakce, autoři pozorovali klasické jaderné události sexuální reprodukce. Při níž replikaci genomu podstupují obě prvojádra. Vzniká jádro zygotické, dokončí se první mitóza a vytvoří se dvoubuněčné embryo (Zhang et al., 2015).

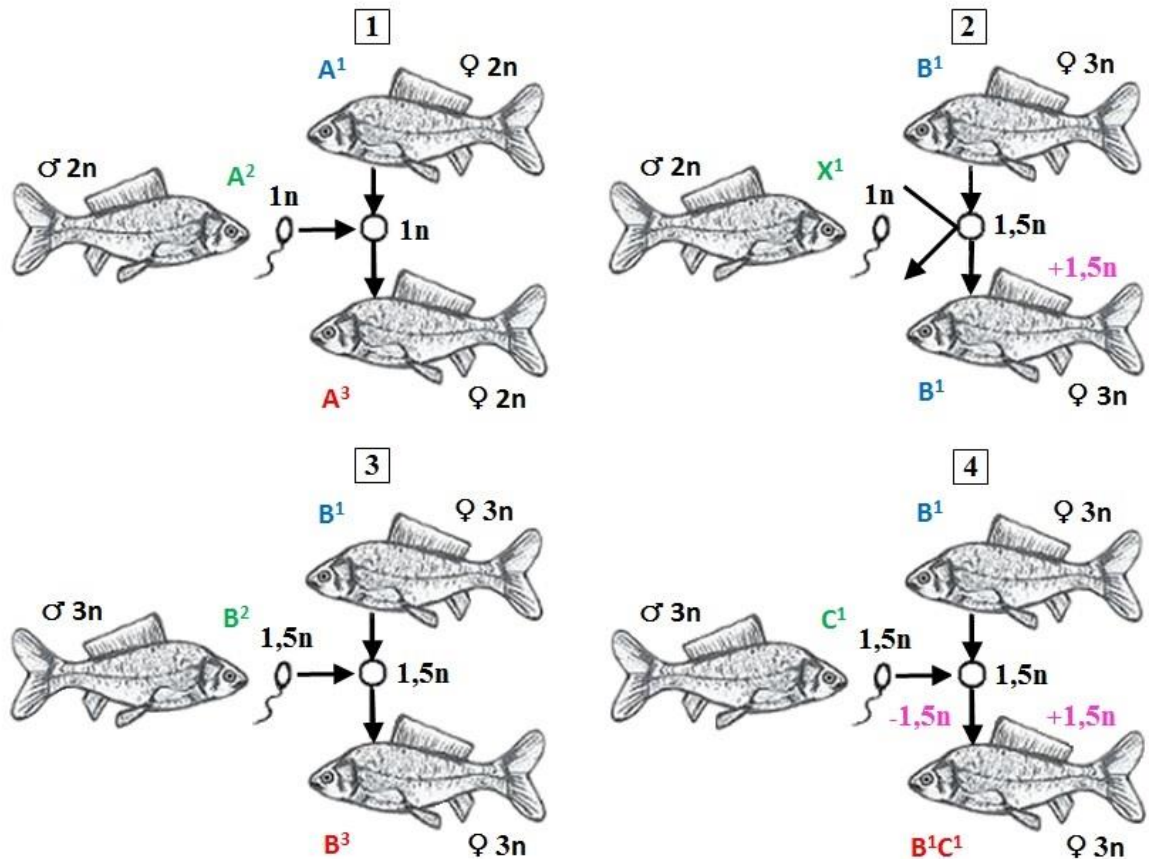
V odezvě na spermie ♂ jiného druhu, to byl příznačný způsob unisexuální reprodukce gynogenezí, ve kterém je jádro spermie zachované v kondenzovaném stavu až po 2BE a rozvíjí se pouze ♀ jádro, které dokončí všechny kroky první mitózy. Proto u této odezvy prochází genomovou replikací a dokončuje první mitózu pouze samičí prvojádru. Po celou dobu tohoto dělení není přítomen žádný replikační signál jádra spermie (Zhang et al., 2015).

V reakci na spermie ♂ odlišných klonů, bylo pozorováno neobvyklé chování chromozómů, zahrnující odloučení otcovského chromatinu, vedoucí k chromatinovému mostu. Děje se tak proto, že se chromozómům samčích pronukleí nepodaří integrovat do první mitózy. Odloučené samčí chromozómy, tak zřejmě zpozdí průběh mitózy. Po dokončení první mitózy nakonec tyto chromozómy formují klasický chromatinový most spojující dceřinné buňky v 2BE. Při této reakci podstupují replikaci obě prvojádra, ale replikovaná bublina samčího chromatinu je odvedena od samičích chromozómů, ten zaostává a nakonec tvoří zmíněný chromatinový most (Zhang et al., 2015).

Takové chování je velmi podobné tomu, které je popsáno u mezidruhových hybridů. Proto byl tento neobvyklý způsob vývoje jikry v odpovědi na spermie odlišného klonu označen jako „hybridu – podobný“. Na základě rozdílného chování jádra a zpožděném dokončení prvního štěpení, byl vysloven předpoklad, že v režimu gynogenní odezvy

a hybridu – podobné reakci může dojít k mimořádné endoreplikaci před vlastním štěpením (Zhang et al., 2015).

Obrázek č. 4. Vlastní interpretace způsobů reprodukce u k. stříbřitého podle nejnovějších poznatků Zhang et al., (2015).



Vysvětlivky: 1 – plná rekombinace s normálním rozmnožováním u diploidů; 2 – gynogeneze (jiný druh); 3 – rekombinantní rozmnožování triploidních biotypů podobné sexuální reprodukci (stejný klon); 4 – „hybridu-podobný“ typ reprodukce (jiný klon). Písmeno A = 2n C. g.; B, C = 3n biotyp C. g.; X = jiný druh. Číslo v horním indexu představují individuální genotypy. Ploidní úroveň gamet a jedinců jsou označeny jako 1n – haploidní, 2n – diploidní, 3n – triploidní a 1,5n redukovaná triploidní (aneuploidní). Růžové zvýraznění charakterizuje reprodukční modifikace.

Určité světlo do problematiky reprodukce k. stříbřitého, vnesla před touto studií v roce 2000 práce Zhouova kolektivu. Ta, u pruského kapra prvně uvedla koexistenci dvou režimů reprodukce. Při křížení stejných 3n hybridních klonů došlo ke klasické sexuální reprodukci

s rekombinací, při kontrolním křížení a oplodnění jiker spermii jiného rodičovského druhu, kapra obecného, nastal pouze iniciovaný klonální vývoj v rámci gynogeneze (Kalous, 2013).

Z výše uvedeného vyplývá, že jikry triploidních biotypů jsou schopny rozlišit homologní spermii a umožní tvorbu rekombinantního potomka, i když jsou rodiče hybridního původu, od té heterologní u jiného druhu, jež iniciuje gynogenezi. Obecně se uvádí, že v jikrách triploidních biotypů nedochází k vytvoření prvního polárního tělíska během zrání a formuje se tripolární dělicí vřeténko, které je odpovědné za přerozdělení chromozomů. Po spojení pólů se však mění ve vřeténko bipolární, které je normální u diploidů. To poukazuje na pravděpodobnou schopnost triploidních biotypů rozmnožovat se jak sexuálně, tak asexuálně, gynogenezí (Kalous, 2013).

Během gynogeneze, kdy je jikra „oplozena“ spermatem kongenera, pronikající spermie nedekondenzuje. Otcovský genom se tak nepodílí na vzniku genomu potomka vůbec nebo pouze subgenomickým množstvím DNA. To vede k tvorbě klonálních linií samic s minimálním množstvím samců. Při oplodnění jikry homologním spermatem, proniklá spermie dekondenzuje a dochází k syngamii obou pronukleí. V zygotě proběhne rekombinace a vytvoří se druhé polární tělísko (vyloučena $\frac{1}{2}$ mateřských chromozomů), v potomstvu je touto formou reprodukce, podobné sexuální, zajištěna genetická variabilita (Kalous, 2013).

Tím je objasněn význam samců, kteří tak přispívají k populacím (Gui et Zhou, 2010). Jak bylo uvedeno dříve, i při gynogenezi, ale může dojít k pravému oplození a k zabudování genomu spermie do genomu potomstva. Vzniklý jedinec je allotetraploidní hybrid z triploidní jikry triploidního biotypu karase a haploidní spermie iniciujícího samce jiného druhu (Kalous, 2013).

V případě kombinace gynogenní spermálně závislé reprodukce se sexuálním rozmnožováním těchto jedinců, je proto označení $3n$ diskutabilní (Kalous et Petrtýl, 2004). Kromě výskytu jedinců s různou úrovní ploidie v populaci, klade řadu otázek i posunutý poměr pohlaví (Knytl et al., 2008). U gynogenetického potomstva jedné mutantní rodiny k. stříbříteho byla objevena tendence k produkci samců. Poměr pohlaví byl přitom výrazně posunutý ve prospěch samců (97,2 %), což svědčí o dosud neznámém sexuálně – determinacním mechanismu (Gui et Zhou, 2010). K reprodukci se také váže nejasné složení genomu tohoto hybridního komplexu, u kterého zatím nejsou známy rodičovské druhy (Kalous et Petrtýl, 2004). Tento předpoklad hybridogenního původu

k. stříbřitého, vychází ze skutečnosti, že bez výjimky všechny unisexuální biotypy obratlovců vznikly mezidruhovou hybridizací (Avisé, 2015; Dawley, 1989).

Pro shrnutí, tedy k. stříbřítý vlastní celkem 4 formy reprodukce viz obrázek č. 4, normální rozmnožování s plnou rekombinací, klasickou gynogenezi a reprodukci velmi podobnou sexuální, k níž dochází u triploidních biotypů. Posledně jmenovaná se ještě dělí na 2 typy: rekombinační a hybridu – podobné rozmnožování (Kalous, 2013; Zhang et al., 2015).

Závěrem lze říci, že diverzita způsobů reprodukce zřejmě hraje roli při zesílení populace, vytváření genetické rozmanitosti a adekvátních genotypů, zatímco unisexuální gynogeneze je může rychle namnožit. Přizpůsobení meiózy během procesu diploidizace je nezbytný krok k tomu stát se úspěšným polyploidem. Její dokončení má význam pro reprodukční úspěch a evoluční potenciál jakýchkoli polyploidů. Koexistence obou režimů reprodukce u k. stříbřitého naznačuje změnu od unisexuálního způsobu rozmnožování směrem k sexuálnímu (Zhang et al., 2015), a poskytuje unikátní případ k prozkoumání sexuálního původu a determinačního mechanismu (Gui et Zhou, 2010).

3.9 Počítačová analýza obrazu jader Er

První rozdíly rozměrů Er dané stupněm ploidie byly zaznamenány Swarupem v roce 1959 (Flajšhans, 1997). Jaderné a buněčné velikosti erytrocytů jsou totiž s každým stupněm ploidie navýšené, kvůli jejich přizpůsobení se zvýšenému množství nukleární DNA, při zachování normálního poměru jaderného a cytoplazmatického objemu (Tiwary et al., 2004). Tento poznatek vedl k hledání vhodných erytrocytárních rozměrů, které by umožnily spolehlivě určit ploidní stav genomu. Vliv ploidní úrovně na jednotlivé rozměry jader Er, byl potvrzen například ve studii Flajšhans et al. (1997).

Obvykle jsou pro všechny veličiny jader Er nalezeny statisticky významné rozdíly (Flajšhans, 1997; Kalous et Petrtýl, 2004). Pro determinaci stupně ploidie, však mohou být některé z nich méně vhodným ukazatelem. Obecně je za tuto nedostatečnou vlastnost považována krátká osa jádra (Flajšhans, 1997; Halačka et Lusková, 2000). Pro detekci ploidie byly ve studii Kalous et Petrtýl (2004) shledány nejprůkaznějšími následující veličiny: plocha, maximální feret (dlouhá osa) a délka jádra. Naproti tomu, hodnoty zjištěné u minimálního feretu (krátké osy) a šířky vykazovaly vyšší variabilitu i uvnitř obou studovaných skupin (Kalous et Petrtýl, 2004) Jako nejvýhodnější parametr je běžně považována plocha jader

erytrocytů, která plně postačuje k určení ploidní úrovně (Halačka et Lusková, 2000; Kalous et Petrtýl, 2004; Vetešník et al., 2006; Vetešník et al., 2004).

Dříve bylo ovšem navrženo nepřímé stanovení plochy jádra. Při něm byla hodnota získána výpočtem z jiných jaderných parametrů. Těmi byla krátká (a) a dlouhá (b) osa jádra, též označované jako minimální a maximální Feret, příslušně (Flajšhans, 1997). Vzorec pro výpočet plochy jádra, $P = \pi * a * b / 4$, označovaný také jako výpočet z průměrů Fereta, se ale ukázal být ne zcela vhodným pro determinaci stupně ploidie. Tvar jádra Er totiž neodpovídá ideální elipse pro níž je určen vzorec (Halačka et Lusková, 2000), a není pouze jeden standardizovaný. Toto zjištění mělo za následek změnu ve stanovování plochy jader Er. Oproti méně přesnému výpočtu, který určoval stejné podmínky pro všechna jádra, bylo přímé stanovení této plochy pomocí obrazové analýzy vhodnějším způsobem. Měřením každé buňky pod obrazem jsou registrovány právě tyto odchylky od ideálního tvaru (Flajšhans, 1997).

Počítačová analýza obrazu pro přímé stanovení jaderných rozměrů a nenáročné odlišení 2n a 3n ryb z krevních nátěrů, byla poprvé použita ve Flajšhansově studii (1997). Jeho práce se proto stala předlohou pro všechny další kauzistiky. Tato nepřímá metoda zjištění ploidní úrovně je někdy označována též jako obrazová cytometrie, ICM (Vetešník et al., 2006). Technika je založená na měření kvantitativních parametrů pod mikroskopem a digitální analýze obrazu. Její spolehlivost při identifikaci stupně ploidie, jak již bylo dříve zmíněno, byla v poslední době intenzivně testována porovnáním s přímými technikami detekce. Tedy karyotypovou analýzou nebo průtokovou cytometrií (FCM). I přes specifickou nevýhodu, která spočívá v menším počtu analyzovaných buněk oproti FCM (Lamatsch et al., 2000), byl tento inovativní přístup shledán za velmi rychlý, jednoduchý, dostatečně spolehlivý a přesný způsob determinace ploidie u karase stříbřitého (Halačka et Lusková, 2000; Kalous et Petrtýl, 2004; Lusková et al., 2010; Lusková et al., 2008; Vetešník et al., 2006; Vetešník et al., 2004).

Výhodou obrazové analýzy je měření plochy jádra ve specifickém poli po pixelech a výsledná hodnota plochy je pak kalibrována absolutními jednotkami, nejčastěji μm^2 . I když se mohou maxima plochy u 2n lehce překrývat s minimy 3n, tak se tyto hodnoty významně liší a tato vlastnost může být spolehlivě použita pro identifikaci stupně ploidie (Flajšhans, 1997). Jisté omezení spojené s měřením plochy jader Er může představovat stáří ryby. Pro odběr krve je totiž vyžadována určitá velikost ryb a uvádí se, že je nutné počkat na Er jednoleté ryby (Lamatsch et al., 2000).

Nezbytným předpokladem pro úspěšnost PAO jsou tenké kvalitní jednovrstevné, nepřekrývající se a nepoškozené krevní nátěry jak pro vlastní barvení, tak i pro samotnou analýzu. To je důležité zejména v případě automatizovaného měření. Kvůli nastavení správné prahové hodnoty pokrývající pouze kontrastní objekty je nutné, aby byly zhotovené preparáty dobře diferencované Giemsovo barvením (Flajšhans, 1997). Uvedené nedostatky mohou způsobit nepřesné prahování, které může ovlivnit preciznost a přesnost měření. Z toho důvodu, představuje naprahování barevného rozlišení v programovém prostředí softwaru pro analýzu obrazu největší problém této metody. Vzhledem k obvykle nestejnému barevnému rozložení obarvených sklíček s krevními nátěry je tento problém prakticky neřešitelný (Kalous et Petrtýl, 2004). Lze ho však částečně obejít manuálním měřením.

Při vlastním měření je někdy zapotřebí z obrazu vyloučit artefakty v podobě dalších stejně obarvených krvinek (erytroblasty, monocyty a trombocyty). Jako další výhodu lze uvést trvalost krevních nátěrů, které je možné použít opakovaně (Flajšhans, 1997; Kalous et Petrtýl, 2004).

Jako vhodná, se přinejmenším u většího množství analyzovaných vzorků jeví skutečnost, aby manuální měření bylo prováděno ideálně pouze 1 osobou, kvůli subjektivní ovlivnitelnosti rozměrů měřitelem. Jistá chyba vzniká také při zpracování binárního obrazu, jež zachycuje objekty, které jsou ve skutečnosti trojrozměrné. Přesto, je tato metoda plně akceptovatelná pro třídění rybích vzorků (nejen karasů stříbřitých) podle jejich ploidní úrovně, především přímým měřením plochy jader erytrocytů (Kalous et Petrtýl, 2004).

3.10 Studie zabývající se vlivem ploidie na délku střeva

Pro morfometrické hodnocení střev se u ryb obecně využívá několik ukazatelů. Nejčastěji používaným je zřejmě index střeva – tělní velikosti (RGL či RIL), který vychází ze střevní délky (GL či IL). Dalším z nich je index střeva – tělní hmotnosti (RGM), jež vychází z hmotnosti střeva (GM). Komplexnější propojení délky a váhy střeva umožňuje tzv. ILW index, jinak též Zihlerův index (Karachle et al., 2010).

Mezi morfologickými výzkumy, zabývajícími se konkrétně dopadem ploidie na délku střeva, lze jako příklad uvést dvě nedávné studie Peruzziho kolektivu. Tito autoři zkoumaly účinky ploidie u dvou hospodářsky významných druhů, a to mezi sourozenci akvakulturního atlantského lososa, a mezi sourozeneckým potomstvem divoké a chovné tresky (Peruzzi et al., 2015; Peruzzi et al., 2013).

Pro hodnocení vlivu ploidie byly použity následující parametry: RGL (relativní délka střeva), počet (v rámci dřívějšího příkladu též hmotnost) pylorických přívěsků, a v později uvedeném byla provedena i histologie těchto přívěsků a stanoven počet hlenových buněk. Jako vstupní údaj posloužila standardní délka (SL), navíc byly ryby zváženy (s přesností 0,1 g). Po vyjmutí střeva, byla změřena jeho délka od konce pylorické oblasti po konečník v uvolněné nenapnuté poloze s přesností 0,1 cm. Dále byla vyříznuta oblast pylorických přívěsků, a následovalo stanovení počtu a hmotnosti těchto výběžků. Relativní délka střeva byla vypočtena ze změřené délky střeva (GL) a standardní délky (SL) jako $RGL = GL [cm] / SL [cm]$. Pro histologické vzorky bylo u 30 – ti jedinců (15 x 3n a 15 x 2n) vyčleněno několik pylorických přívěsků (3 – 5), z nichž bylo vyhotoveno 5 – 6 histologických řezů ze střední části každého z nich (Peruzzi et al., 2015; Peruzzi et al., 2013).

Mezi 2n a 3n nebyly zjištěny rozdíly v tělesné hmotnosti ani ve standardní délce, taktéž nebyly odhaleny rozdíly mezi pohlavími. U druhů, které vlastní pylorické přívěsky, je tento znak významným parametrem pro porovnání mezi ploidie. Zmíněná slepá rozšíření, umístěná mezi žaludkem a přední částí střeva, zajišťují sekreci trávicích enzymů a zvyšují absorpční plochu pro vstřebávání živin. Jejich odlišnosti mezi ploidie, proto mohou ovlivnit využití živin. Navíc je počet PP polygenní vlastnost, která zřejmě koreluje s konverzí krmiva a může nést potenciál pro genetickou selekci v akvakulturních chovech (Peruzzi et al., 2015; Peruzzi et al., 2013). Nicméně, u kaprovitých ryb tato postpylorická část se slepými pylorickými přívěsky chybí.

Nálezy obou studií se v podstatě shodují. Byly odhaleny statisticky významné rozdíly v morfologii střeva mezi 2n a 3n jedinci. Triploidní ryby měly v obou případech zhruba o 20 % nižší počet pylorických přívěsků než diploidní. U lososa, měly 3n o 25 % nižší hmotnost PP, a o 15% kratší RGL. Počet PP, se navíc u farmového 2n překrýval s počtem u volně žijících lososů (50 – 62 a 55 – 75). Triploidní potomstvo divoké tresky vykazovalo také, o 23 % kratší RGL než 2n sourozenci, ale 3n potomstvo farmových tresek mělo podobnou RGL jako 2n. Průměrný počet mukózních buněk epitelu PP byl významně vyšší u 3n než 2n (Peruzzi et al., 2015; Peruzzi et al., 2013).

Zdá se tedy, že má ploidie výrazný vliv na několik aspektů střevní morfologie. Vývoj střev může být u 3n narušen, ale je potřeba si uvědomit mezidruhové odlišnosti viz podkapitola Vlastnosti triploidů. Nalezené morfologické rozdíly mohou vést ke snížené kapacitě trávicího traktu a nižší absorpční ploše u 3n. Diploidní a triploidní ryby se tak mohou

lišit ve své schopnosti absorbovat, metabolizovat a udržet živiny. Podle druhu mohou akvakulturní 3n vyžadovat odlišné složení diety či dietní doplňky. Dále se 2n a 3n mohou lišit střevní mikroflórou, s potenciálními důsledky na užitkovost a zdraví. Ploidní stupeň, tedy může měnit nejen morfologii a fyziologii střeva, ale i bakteriální flóru. Další roli ve výsledné kolonizaci a složení mikroflóry mezi ploidie mi mohou navíc hrát různé nutriční a environmentální faktory. V důsledku mohou anatomicko – morfologické a fyziologické rozdíly ve střevech mít zásadní význam na efektivitu zažívání a následný růst nebo welfare ryb odlišné ploidie (Peruzzi et al., 2015; Peruzzi et al., 2013).

Znalost morfologických rozdílů trávicího traktu mezi ploidie mi a identifikování funkčních a dalších důsledků ploidního stupně, jsou proto důležité nejen pro komerční účely (chov), ale například i pro posouzení potenciální kompetiční výhody invazních druhů jako je k. stříbřitý v domácí ichtyofauně (Šimková et al., 2015).

4 MATERIÁL A METODY

Materiál karase stříbřitého (46 ks) pocházel ze tří říčních lokalit ČR, kde byl odchycen na začátku roku 2014. Jednalo se o říční systém Dyje, Odry a solitérní tůň Řehačku, která je součástí Hrbáčových tůní (Labe). Do zahájení tohoto experimentu byly ryby zajištěny v akváriích na demonstračním a experimentálním pracovišti FAPPZ ČZU v Praze.

Ryby byly vzhledem k invazivnosti pokusu již před odběrem krve usmrceny stanovenou dávkou rybiho anestetika MS – 222 (vodný roztok trikain – methan – sulfonátu). Navíc se ukázalo, že pro manipulaci s rybou během odběru krve je plné znehybnění lepší. Vzhledem k tomu, že by ryby musely být kvůli získání vzorků tkáně pro izolaci DNA a resekci střeva stejně usmrceny, přistoupilo se k jejich usmrcení hned v prvním kroku. Tento přístup umožňuje skutečnost, že krev lze použít ještě zhruba do 10 – ti minut po usmrcení. Po usnutí jim byl odebrán malý vzorek krve ze srdce (zleva) do 5 ml injekční stříkačky heparinizovanou injekční jehlou. Použita byla sodná sůl Heparinu (Heparin sodium 25 000 IU/5 ml) pod komerčním názvem Henalip. Krev byla ihned přenesena na podložní skříčka krevním roztěrem. Po zaschnutí krevního nátěru byly Er fixovány 97 % ethanolem.

Obrázek č. 5. Fotodokumentace a měření ryb. Vybraní zástupci skupiny R – Řehačka, O – Odra, M – Dyje.



Ryby byly po odběru krve zdokumentovány a změřeny (TL = SL a BL). Poté následovalo vyjmutí střev. Břišní dutina byla otevřena z pravé strany přes řitní otvor, obloukem kolem plynového měchýře až po první žebra. Otevřením břišní dutiny bylo umožněno vyjmutí celého obsahu včetně střev. Trávicí trakt byl oddělen v oblasti jícnu. Po odstranění ostatních orgánů a po opatrném rozpletení střev (nepřerušenost) bylo možné změřit jejich délku. Délka střev byla v tomto případě měřena včetně pyloru, od konce jícnu až po anus. Vzhledem k elasticitě střev (typická vlastnost biolog. materiálu) byla jejich délka určena ihned po rozpletení bez možnosti smrštění tak, že došlo k jejich přirozenému natažení podél měřítka. Pohlaví usmrčených jedinců bylo zjištěno makroskopickým vyšetřením pohlavních produktů.

Obrázek č. 6. Pracovní postup. Anestezie ryb, odběr krve ze srdce, otevření břišní dutiny a vyjmutí obsahu, oddělení, rozpletení a změření střev, pomůcky a vzorky na izolaci DNA (zleva).

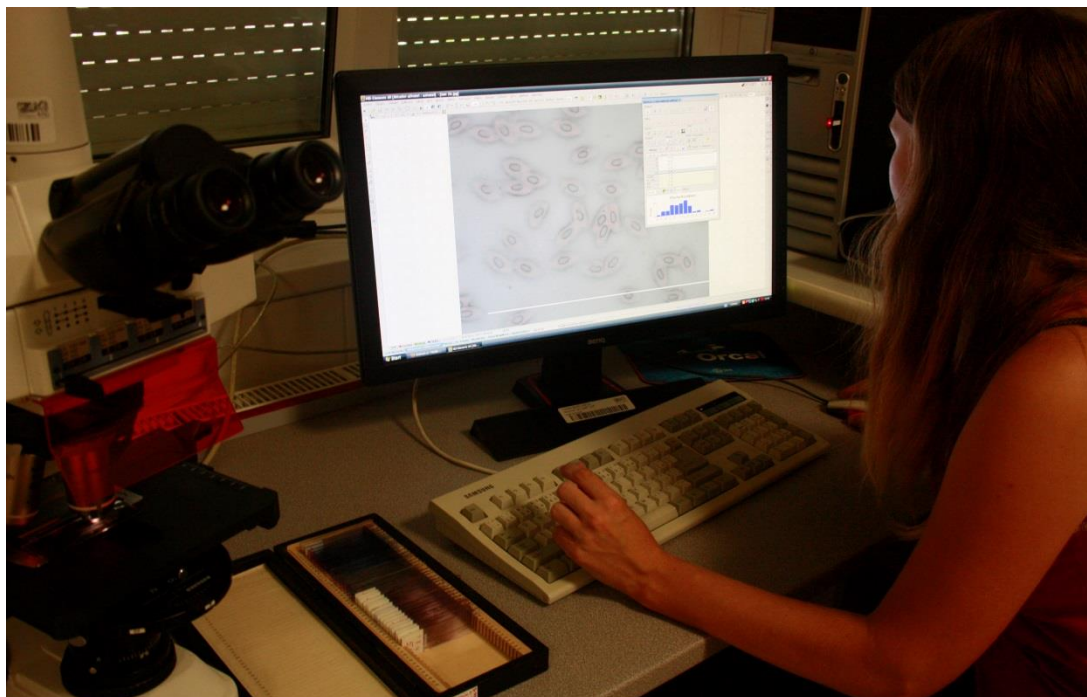


Dále byly rybám odebrány vzorky tkáně pro možnost pozdější izolace DNA (svalová tkáň ze hřbetu a ústřížek pravé břišní ploutve) a samotné ryby byly obaleny ochrannou textilií a naloženy do 4 – 5 % formaldehydu (tj. ředění 1:10).

Skříčka byla po jejich zkompletování obarvena roztokem připraveným ze 3 ml Giemsy – Romanovského barviva a ze 75 ml připraveného pufru PBS ($28,56 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4 / 2 \text{ l}$ destilované vody).

Po standartním obarvení Giemsou během 10 – ti minut a následném oschnutí, byly krevní vzorky snímány pomocí imerzního objektivu kamerou Nikon pomocí optického mikroskopu Nikon ECLIPSE E600 (s episkopickým fluorescenčním nástavcem Y – FL) pro obvyčejné mikroskopování ve světelném poli. Poté byl stav ploidie hodnocen na zařízení od firmy HP a monitoru BenQ, pomocí softwaru NIS – Elements AR verze 4.30.01 a 4.20.01 pro počítačovou analýzu obrazu, dříve známého pod názvem LUCIA. Jakožto dostatečně spolehlivá vlastnost byla měřena pouze plocha jader erytrocytů manuálním měřením pro 150 jader Er u každé ryby. Všechny údaje naměřené v programu NIS – Elements byly spolu s nadefinovanými výstupními údaji pro každou rybu exportovány do souborů Microsoft Excel. Jednalo se o průměr, směrodatnou odchylku, minimum a maximum.

Obrázek č. 7. Vyhodnocování stavu ploidie z krevních nátěrů pomocí počítačové analýzy obrazu.



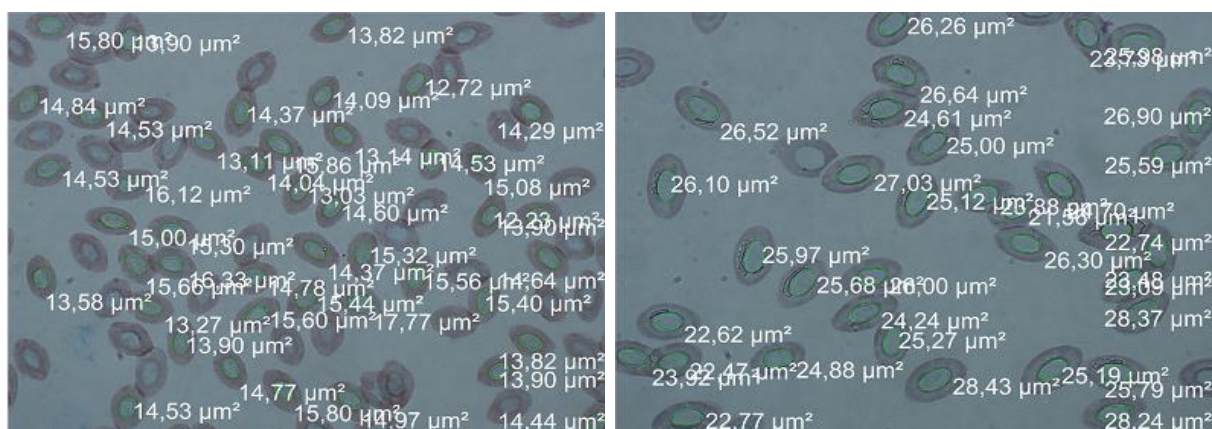
Určení ploidie v této práci vycházelo z používaných postupů a ze známých průměrných hodnot velikosti jader Er pro diploidní a triploidní jedince karase stříbřitého. Metodiku shrnují níže uvedené předchozí studie zabývající se nejen stupněm ploidie, ale i spolehlivostí této techniky při determinaci ploidie vůči ostatním metodám (Halačka et Lusková, 2000; Kalous et Petrtýl, 2004; Lusková et al., 2010; Lusková et al., 2008; Vetešník et al., 2006; Vetešník et al., 2004).

V průběhu analýzy byla snaha odstranit z obrazu další stejně obarvené krvinky. Nepravidelnost tvaru jádra byla částečně eliminována manuálním měřením jednotlivých jader. Do měření byla zahrnuta jádra spíše střední nebo menší velikosti a eliptického vzhledu.

Všechny naměřené morfometrické údaje, stejně jako všechna data z počítačové analýzy obrazu, byly zpracovány v programu STATISTICA verze 10 a 12 CZ. Případné korekce dat (zprůměrování) jsou uvedeny v sekci Výsledky. U obou typů údajů byla před zahájením testování zhodnocena normalita dat a posouzena homogenita rozptylů. V rámci statistického hodnocení plochy jader Er byly provedeny základní popisné statistiky, t – test „každý s každým“, dvouvýběrový t – test a neparametrická ANOVA.

Ze vstupních morfometrických dat (délky střeva, standartní délky a délky těla) byly před vlastním testováním pro každou rybu vypočítány relativní ukazatele tj. RGL a GL/BL. Pro tyto údaje byly využity téměř shodné analýzy jako v případě hodnocení jader Er. S rozdílem parametrické ANOVy a Obecného lineárního modelu (MNC). V rámci práce byly provedeny také regrese a korelace mezi ploidii a plochou jader Er a mezi výše zmíněnými střevními ukazateli a plochou jader.

Obrázek č. 8. Vybrané snímky z mikroskopu hodnocené metodou LUCIA. Rozdíl velikostí plochy jader Er mezi diploidy a triploidy je patrný již pouhým okem.



5 VÝSLEDKY

Pomocí PAO byla u skupiny R změřena plocha 2550 jader Er. U skupiny O byla změřena plocha 1952 jader Er a u skupiny M byla získána plocha 2113 jader Er. Celkem tedy byla stanovena tato vlastnost pro 6615 jader erytrocytů. Rybu pod označením R18 nebylo možné touto analýzou vyhodnotit, protože pro ni byl chybně připraven krevní nátěr. Proto ve všech statistických hodnoceních plochy jader Er chybí. I přes chybějící data je ale pro další hodnocení vlivu ploidie na délku střeva posuzována jako 3n vzhledem ke svému původu ze solitérního biotopu typického pro triploidní biotyp. U ryby označené M9 bylo změřeno pouze 12 jader Er.

Na samém začátku bylo provedeno šetření, zda existuje statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými vzorky, protože již při měření pod obrazem vzniklo důvodné podezření na přítomnost triploidních jedinců uvnitř skupin, které měly být původně ryze diploidní. Z toho důvodu byl porovnáván každý triploidní jedinec (skupina R) s každým jedincem diploidním (skupiny O a M). Pozn. Takové statistické hodnocení ovšem není statisticky korektní (Vejl et Vašek, 2015, pers. comm.). Karas R18 nebyl do tohoto šetření zahrnut.

Celkem bylo posouzeno 476 kombinací. Testování proběhlo na hladině významnosti $\alpha = 0,01$. Pomocí tohoto t – testu „každý s každým“ a hodnoty p, která představuje bezrozměrné číslo, porovnávané s hladinou významnosti alfa, byl odhalen statisticky významný rozdíl s 99 % pravděpodobností mezi většinou 3n (R) a 2n (O a M) jedinců ($p < 0,01$). V několika případech ovšem byla hodnota p větší než 0,01. Tím bylo v diploidních výběrových souborech odhaleno celkem pět 3n jedinců, tři u skupiny O a dva u skupiny M. Podrobně viz tabulka č. 1. Uvedený nález a jednotlivé ploidní úrovně všech 45 jedinců (bez R18) jsou dobře patrné z grafu č. 1.

Pro úplné ověření odlišnosti uvedených 5 – ti ryb od zbylých 2n karasů stříbřitých bylo provedeno obdobné hodnocení. A to pouze v rámci skupiny O a M, přičemž byli domnělí triploidní jednotlivci postaveni do 3n pozice. Ve všech 115 srovnáních se lišili od 2n a vykazovali statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$). Proto byli tyto karasi stříbřítí označeni jako triploidi. A jelikož těchto pět jedinců nepředstavovalo dostatečně velký triploidní vzorek pro lokality O a M, byli z dalších statistických analýz vyloučeni.

Tabulka 1. Výsledky t-testu při hodnocení rozdílu plochy jader erytrocytů mezi 3n (R) a 2n (O, M) jedinci.

T-test pro nezávislé vzorky (3n vs. 2n)			
3n vs. 2n	Průměr R	Průměr O a M	p
R01 vs. O01	24,36	19,70	0,00
R01 vs. O02	24,36	15,38	0,00
R01 vs. O03	24,36	13,97	0,00
R01 vs. O04	24,36	15,06	0,00
R01 vs. O05	24,36	23,69	0,06
R01 vs. O06	24,36	15,64	0,00
R01 vs. O07	24,36	15,79	0,00
R01 vs. O08	24,36	13,65	0,00
R01 vs. O09	24,36	14,83	0,00
R01 vs. O10	24,36	26,28	0,00
R01 vs. O11	24,36	14,56	0,00
R01 vs. O12	24,36	15,09	0,00
R01 vs. O13	24,36	15,61	0,00
R01 vs. M01	24,36	15,47	0,00
R01 vs. M02	24,36	14,83	0,00
R01 vs. M03	24,36	15,78	0,00
R01 vs. M04	24,36	14,62	0,00
R01 vs. M05	24,36	15,10	0,00
R01 vs. M06	24,36	16,12	0,00
R01 vs. M07	24,36	15,15	0,00
R01 vs. M08	24,36	14,75	0,00
R01 vs. M09	24,36	14,50	0,00
R01 vs. M10	24,36	20,93	0,00
R01 vs. M11	24,36	15,49	0,00
R01 vs. M12	24,36	15,61	0,00
R01 vs. M13	24,36	15,51	0,00
R01 vs. M14	24,36	23,33	0,00
R01 vs. M15	24,36	15,56	0,00
R02 vs. O01	27,54	19,70	0,00
R02 vs. O02	27,54	15,38	0,00
R02 vs. O03	27,54	13,97	0,00
R02 vs. O04	27,54	15,06	0,00
R02 vs. O05	27,54	23,69	0,00
R02 vs. O06	27,54	15,64	0,00
R02 vs. O07	27,54	15,79	0,00
R02 vs. O08	27,54	13,65	0,00
R02 vs. O09	27,54	14,83	0,00
R02 vs. O10	27,54	26,28	0,00
R02 vs. O11	27,54	14,56	0,00
R02 vs. O12	27,54	15,09	0,00
R02 vs. O13	27,54	15,61	0,00
R02 vs. M01	27,54	15,47	0,00

T-test pro nezávislé vzorky (3n vs. 2n)			
3n vs. 2n	Průměr R	Průměr O a M	p
R02 vs. M02	27,54	14,83	0,00
R02 vs. M03	27,54	15,78	0,00
R02 vs. M04	27,54	14,62	0,00
R02 vs. M05	27,54	15,10	0,00
R02 vs. M06	27,54	16,12	0,00
R02 vs. M07	27,54	15,15	0,00
R02 vs. M08	27,54	14,75	0,00
R02 vs. M09	27,54	14,50	0,00
R02 vs. M10	27,54	20,93	0,00
R02 vs. M11	27,54	15,49	0,00
R02 vs. M12	27,54	15,61	0,00
R02 vs. M13	27,54	15,51	0,00
R02 vs. M14	27,54	23,33	0,00
R02 vs. M15	27,54	15,56	0,00
R03 vs. O01	27,46	19,70	0,00
R03 vs. O02	27,46	15,38	0,00
R03 vs. O03	27,46	13,97	0,00
R03 vs. O04	27,46	15,06	0,00
R03 vs. O05	27,46	23,69	0,00
R03 vs. O06	27,46	15,64	0,00
R03 vs. O07	27,46	15,79	0,00
R03 vs. O08	27,46	13,65	0,00
R03 vs. O09	27,46	14,83	0,00
R03 vs. O10	27,46	26,28	0,00
R03 vs. O11	27,46	14,56	0,00
R03 vs. O12	27,46	15,09	0,00
R03 vs. O13	27,46	15,61	0,00
R03 vs. M01	27,46	15,47	0,00
R03 vs. M02	27,46	14,83	0,00
R03 vs. M03	27,46	15,78	0,00
R03 vs. M04	27,46	14,62	0,00
R03 vs. M05	27,46	15,10	0,00
R03 vs. M06	27,46	16,12	0,00
R03 vs. M07	27,46	15,15	0,00
R03 vs. M08	27,46	14,75	0,00
R03 vs. M09	27,46	14,50	0,00
R03 vs. M10	27,46	20,93	0,00
R03 vs. M11	27,46	15,49	0,00
R03 vs. M12	27,46	15,61	0,00
R03 vs. M13	27,46	15,51	0,00
R03 vs. M14	27,46	23,33	0,00
R03 vs. M15	27,46	15,56	0,00

T-test pro nezávislé vzorky (3n vs. 2n)			
3n vs. 2n	Průměr R	Průměr O a M	p
R04 vs. O01	23,76	19,70	0,00
R04 vs. O02	23,76	15,38	0,00
R04 vs. O03	23,76	13,97	0,00
R04 vs. O04	23,76	15,06	0,00
R04 vs. O05	23,76	23,69	0,82
R04 vs. O06	23,76	15,64	0,00
R04 vs. O07	23,76	15,79	0,00
R04 vs. O08	23,76	13,65	0,00
R04 vs. O09	23,76	14,83	0,00
R04 vs. O10	23,76	26,28	0,00
R04 vs. O11	23,76	14,56	0,00
R04 vs. O12	23,76	15,09	0,00
R04 vs. O13	23,76	15,61	0,00
R04 vs. M01	23,76	15,47	0,00
R04 vs. M02	23,76	14,83	0,00
R04 vs. M03	23,76	15,78	0,00
R04 vs. M04	23,76	14,62	0,00
R04 vs. M05	23,76	15,10	0,00
R04 vs. M06	23,76	16,12	0,00
R04 vs. M07	23,76	15,15	0,00
R04 vs. M08	23,76	14,75	0,00
R04 vs. M09	23,76	14,50	0,00
R04 vs. M10	23,76	20,93	0,00
R04 vs. M11	23,76	15,49	0,00
R04 vs. M12	23,76	15,61	0,00
R04 vs. M13	23,76	15,51	0,00
R04 vs. M14	23,76	23,33	0,09
R04 vs. M15	23,76	15,56	0,00
R05 vs. O01	27,43	19,70	0,00
R05 vs. O02	27,43	15,38	0,00
R05 vs. O03	27,43	13,97	0,00
R05 vs. O04	27,43	15,06	0,00
R05 vs. O05	27,43	23,69	0,00
R05 vs. O06	27,43	15,64	0,00
R05 vs. O07	27,43	15,79	0,00
R05 vs. O08	27,43	13,65	0,00
R05 vs. O09	27,43	14,83	0,00
R05 vs. O10	27,43	26,28	0,00
R05 vs. O11	27,43	14,56	0,00
R05 vs. O12	27,43	15,09	0,00
R05 vs. O13	27,43	15,61	0,00
R05 vs. M01	27,43	15,47	0,00
R05 vs. M02	27,43	14,83	0,00
R05 vs. M03	27,43	15,78	0,00

T-test pro nezávislé vzorky (3n vs. 2n)			
3n vs. 2n	Průměr R	Průměr O a M	p
R05 vs. M04	27,43	14,62	0,00
R05 vs. M05	27,43	15,10	0,00
R05 vs. M06	27,43	16,12	0,00
R05 vs. M07	27,43	15,15	0,00
R05 vs. M08	27,43	14,75	0,00
R05 vs. M09	27,43	14,50	0,00
R05 vs. M10	27,43	20,93	0,00
R05 vs. M11	27,43	15,49	0,00
R05 vs. M12	27,43	15,61	0,00
R05 vs. M13	27,43	15,51	0,00
R05 vs. M14	27,43	23,33	0,00
R05 vs. M15	27,43	15,56	0,00
R06 vs. O01	27,69	19,70	0,00
R06 vs. O02	27,69	15,38	0,00
R06 vs. O03	27,69	13,97	0,00
R06 vs. O04	27,69	15,06	0,00
R06 vs. O05	27,69	23,69	0,00
R06 vs. O06	27,69	15,64	0,00
R06 vs. O07	27,69	15,79	0,00
R06 vs. O08	27,69	13,65	0,00
R06 vs. O09	27,69	14,83	0,00
R06 vs. O10	27,69	26,28	0,00
R06 vs. O11	27,69	14,56	0,00
R06 vs. O12	27,69	15,09	0,00
R06 vs. O13	27,69	15,61	0,00
R06 vs. M01	27,69	15,47	0,00
R06 vs. M02	27,69	14,83	0,00
R06 vs. M03	27,69	15,78	0,00
R06 vs. M04	27,69	14,62	0,00
R06 vs. M05	27,69	15,10	0,00
R06 vs. M06	27,69	16,12	0,00
R06 vs. M07	27,69	15,15	0,00
R06 vs. M08	27,69	14,75	0,00
R06 vs. M09	27,69	14,50	0,00
R06 vs. M10	27,69	20,93	0,00
R06 vs. M11	27,69	15,49	0,00
R06 vs. M12	27,69	15,61	0,00
R06 vs. M13	27,69	15,51	0,00
R06 vs. M14	27,69	23,33	0,00
R06 vs. M15	27,69	15,56	0,00
R07 vs. O01	21,99	19,70	0,00
R07 vs. O02	21,99	15,38	0,00
R07 vs. O03	21,99	13,97	0,00
R07 vs. O04	21,99	15,06	0,00

T-test pro nezávislé vzorky (3n vs. 2n)			
3n vs. 2n	Průměr R	Průměr O a M	p
R07 vs. O05	21,99	23,69	0,00
R07 vs. O06	21,99	15,64	0,00
R07 vs. O07	21,99	15,79	0,00
R07 vs. O08	21,99	13,65	0,00
R07 vs. O09	21,99	14,83	0,00
R07 vs. O10	21,99	26,28	0,00
R07 vs. O11	21,99	14,56	0,00
R07 vs. O12	21,99	15,09	0,00
R07 vs. O13	21,99	15,61	0,00
R07 vs. M01	21,99	15,47	0,00
R07 vs. M02	21,99	14,83	0,00
R07 vs. M03	21,99	15,78	0,00
R07 vs. M04	21,99	14,62	0,00
R07 vs. M05	21,99	15,10	0,00
R07 vs. M06	21,99	16,12	0,00
R07 vs. M07	21,99	15,15	0,00
R07 vs. M08	21,99	14,75	0,00
R07 vs. M09	21,99	14,50	0,00
R07 vs. M10	21,99	20,93	0,00
R07 vs. M11	21,99	15,49	0,00
R07 vs. M12	21,99	15,61	0,00
R07 vs. M13	21,99	15,51	0,00
R07 vs. M14	21,99	23,33	0,00
R07 vs. M15	21,99	15,56	0,00
R08 vs. O01	22,72	19,70	0,00
R08 vs. O02	22,72	15,38	0,00
R08 vs. O03	22,72	13,97	0,00
R08 vs. O04	22,72	15,06	0,00
R08 vs. O05	22,72	23,69	0,00
R08 vs. O06	22,72	15,64	0,00
R08 vs. O07	22,72	15,79	0,00
R08 vs. O08	22,72	13,65	0,00
R08 vs. O09	22,72	14,83	0,00
R08 vs. O10	22,72	26,28	0,00
R08 vs. O11	22,72	14,56	0,00
R08 vs. O12	22,72	15,09	0,00
R08 vs. O13	22,72	15,61	0,00
R08 vs. M01	22,72	15,47	0,00
R08 vs. M02	22,72	14,83	0,00
R08 vs. M03	22,72	15,78	0,00
R08 vs. M04	22,72	14,62	0,00
R08 vs. M05	22,72	15,10	0,00
R08 vs. M06	22,72	16,12	0,00
R08 vs. M07	22,72	15,15	0,00

T-test pro nezávislé vzorky (3n vs. 2n)			
3n vs. 2n	Průměr R	Průměr O a M	p
R08 vs. M08	22,72	14,75	0,00
R08 vs. M09	22,72	14,50	0,00
R08 vs. M10	22,72	20,93	0,00
R08 vs. M11	22,72	15,49	0,00
R08 vs. M12	22,72	15,61	0,00
R08 vs. M13	22,72	15,51	0,00
R08 vs. M14	22,72	23,33	0,02
R08 vs. M15	22,72	15,56	0,00
R09 vs. O01	26,39	19,70	0,00
R09 vs. O02	26,39	15,38	0,00
R09 vs. O03	26,39	13,97	0,00
R09 vs. O04	26,39	15,06	0,00
R09 vs. O05	26,39	23,69	0,00
R09 vs. O06	26,39	15,64	0,00
R09 vs. O07	26,39	15,79	0,00
R09 vs. O08	26,39	13,65	0,00
R09 vs. O09	26,39	14,83	0,00
R09 vs. O10	26,39	26,28	0,69
R09 vs. O11	26,39	14,56	0,00
R09 vs. O12	26,39	15,09	0,00
R09 vs. O13	26,39	15,61	0,00
R09 vs. M01	26,39	15,47	0,00
R09 vs. M02	26,39	14,83	0,00
R09 vs. M03	26,39	15,78	0,00
R09 vs. M04	26,39	14,62	0,00
R09 vs. M05	26,39	15,10	0,00
R09 vs. M06	26,39	16,12	0,00
R09 vs. M07	26,39	15,15	0,00
R09 vs. M08	26,39	14,75	0,00
R09 vs. M09	26,39	14,50	0,00
R09 vs. M10	26,39	20,93	0,00
R09 vs. M11	26,39	15,49	0,00
R09 vs. M12	26,39	15,61	0,00
R09 vs. M13	26,39	15,51	0,00
R09 vs. M14	26,39	23,33	0,00
R09 vs. M15	26,39	15,56	0,00
R10 vs. O01	22,82	19,70	0,00
R10 vs. O02	22,82	15,38	0,00
R10 vs. O03	22,82	13,97	0,00
R10 vs. O04	22,82	15,06	0,00
R10 vs. O05	22,82	23,69	0,00
R10 vs. O06	22,82	15,64	0,00
R10 vs. O07	22,82	15,79	0,00
R10 vs. O08	22,82	13,65	0,00

T-test pro nezávislé vzorky (3n vs. 2n)			
3n vs. 2n	Průměr R	Průměr O a M	p
R10 vs. O09	22,82	14,83	0,00
R10 vs. O10	22,82	26,28	0,00
R10 vs. O11	22,82	14,56	0,00
R10 vs. O12	22,82	15,09	0,00
R10 vs. O13	22,82	15,61	0,00
R10 vs. M01	22,82	15,47	0,00
R10 vs. M02	22,82	14,83	0,00
R10 vs. M03	22,82	15,78	0,00
R10 vs. M04	22,82	14,62	0,00
R10 vs. M05	22,82	15,10	0,00
R10 vs. M06	22,82	16,12	0,00
R10 vs. M07	22,82	15,15	0,00
R10 vs. M08	22,82	14,75	0,00
R10 vs. M09	22,82	14,50	0,00
R10 vs. M10	22,82	20,93	0,00
R10 vs. M11	22,82	15,49	0,00
R10 vs. M12	22,82	15,61	0,00
R10 vs. M13	22,82	15,51	0,00
R10 vs. M14	22,82	23,33	0,04
R10 vs. M15	22,82	15,56	0,00
R11 vs. O01	27,64	19,70	0,00
R11 vs. O02	27,64	15,38	0,00
R11 vs. O03	27,64	13,97	0,00
R11 vs. O04	27,64	15,06	0,00
R11 vs. O05	27,64	23,69	0,00
R11 vs. O06	27,64	15,64	0,00
R11 vs. O07	27,64	15,79	0,00
R11 vs. O08	27,64	13,65	0,00
R11 vs. O09	27,64	14,83	0,00
R11 vs. O10	27,64	26,28	0,00
R11 vs. O11	27,64	14,56	0,00
R11 vs. O12	27,64	15,09	0,00
R11 vs. O13	27,64	15,61	0,00
R11 vs. M01	27,64	15,47	0,00
R11 vs. M02	27,64	14,83	0,00
R11 vs. M03	27,64	15,78	0,00
R11 vs. M04	27,64	14,62	0,00
R11 vs. M05	27,64	15,10	0,00
R11 vs. M06	27,64	16,12	0,00
R11 vs. M07	27,64	15,15	0,00
R11 vs. M08	27,64	14,75	0,00
R11 vs. M09	27,64	14,50	0,00
R11 vs. M10	27,64	20,93	0,00
R11 vs. M11	27,64	15,49	0,00

T-test pro nezávislé vzorky (3n vs. 2n)			
3n vs. 2n	Průměr R	Průměr O a M	p
R11 vs. M12	27,64	15,61	0,00
R11 vs. M13	27,64	15,51	0,00
R11 vs. M14	27,64	23,33	0,00
R11 vs. M15	27,64	15,56	0,00
R12 vs. O01	27,08	19,70	0,00
R12 vs. O02	27,08	15,38	0,00
R12 vs. O03	27,08	13,97	0,00
R12 vs. O04	27,08	15,06	0,00
R12 vs. O05	27,08	23,69	0,00
R12 vs. O06	27,08	15,64	0,00
R12 vs. O07	27,08	15,79	0,00
R12 vs. O08	27,08	13,65	0,00
R12 vs. O09	27,08	14,83	0,00
R12 vs. O10	27,08	26,28	0,01
R12 vs. O11	27,08	14,56	0,00
R12 vs. O12	27,08	15,09	0,00
R12 vs. O13	27,08	15,61	0,00
R12 vs. M01	27,08	15,47	0,00
R12 vs. M02	27,08	14,83	0,00
R12 vs. M03	27,08	15,78	0,00
R12 vs. M04	27,08	14,62	0,00
R12 vs. M05	27,08	15,10	0,00
R12 vs. M06	27,08	16,12	0,00
R12 vs. M07	27,08	15,15	0,00
R12 vs. M08	27,08	14,75	0,00
R12 vs. M09	27,08	14,50	0,00
R12 vs. M10	27,08	20,93	0,00
R12 vs. M11	27,08	15,49	0,00
R12 vs. M12	27,08	15,61	0,00
R12 vs. M13	27,08	15,51	0,00
R12 vs. M14	27,08	23,33	0,00
R12 vs. M15	27,08	15,56	0,00
R13 vs. O01	19,67	19,70	0,93
R13 vs. O02	19,67	15,38	0,00
R13 vs. O03	19,67	13,97	0,00
R13 vs. O04	19,67	15,06	0,00
R13 vs. O05	19,67	23,69	0,00
R13 vs. O06	19,67	15,64	0,00
R13 vs. O07	19,67	15,79	0,00
R13 vs. O08	19,67	13,65	0,00
R13 vs. O09	19,67	14,83	0,00
R13 vs. O10	19,67	26,28	0,00
R13 vs. O11	19,67	14,56	0,00
R13 vs. O12	19,67	15,09	0,00

T-test pro nezávislé vzorky (3n vs. 2n)			
3n vs. 2n	Průměr R	Průměr O a M	p
R13 vs. O13	19,67	15,61	0,00
R13 vs. M01	19,67	15,47	0,00
R13 vs. M02	19,67	14,83	0,00
R13 vs. M03	19,67	15,78	0,00
R13 vs. M04	19,67	14,62	0,00
R13 vs. M05	19,67	15,10	0,00
R13 vs. M06	19,67	16,12	0,00
R13 vs. M07	19,67	15,15	0,00
R13 vs. M08	19,67	14,75	0,00
R13 vs. M09	19,67	14,50	0,00
R13 vs. M10	19,67	20,93	0,00
R13 vs. M11	19,67	15,49	0,00
R13 vs. M12	19,67	15,61	0,00
R13 vs. M13	19,67	15,51	0,00
R13 vs. M14	19,67	23,33	0,00
R13 vs. M15	19,67	15,56	0,00
R14 vs. O01	20,92	19,70	0,00
R14 vs. O02	20,92	15,38	0,00
R14 vs. O03	20,92	13,97	0,00
R14 vs. O04	20,92	15,06	0,00
R14 vs. O05	20,92	23,69	0,00
R14 vs. O06	20,92	15,64	0,00
R14 vs. O07	20,92	15,79	0,00
R14 vs. O08	20,92	13,65	0,00
R14 vs. O09	20,92	14,83	0,00
R14 vs. O10	20,92	26,28	0,00
R14 vs. O11	20,92	14,56	0,00
R14 vs. O12	20,92	15,09	0,00
R14 vs. O13	20,92	15,61	0,00
R14 vs. M01	20,92	15,47	0,00
R14 vs. M02	20,92	14,83	0,00
R14 vs. M03	20,92	15,78	0,00
R14 vs. M04	20,92	14,62	0,00
R14 vs. M05	20,92	15,10	0,00
R14 vs. M06	20,92	16,12	0,00
R14 vs. M07	20,92	15,15	0,00
R14 vs. M08	20,92	14,75	0,00
R14 vs. M09	20,92	14,50	0,00
R14 vs. M10	20,92	20,93	0,98
R14 vs. M11	20,92	15,49	0,00
R14 vs. M12	20,92	15,61	0,00
R14 vs. M13	20,92	15,51	0,00
R14 vs. M14	20,92	23,33	0,00
R14 vs. M15	20,92	15,56	0,00

T-test pro nezávislé vzorky (3n vs. 2n)			
3n vs. 2n	Průměr R	Průměr O a M	p
R15 vs. O01	25,77	19,70	0,00
R15 vs. O02	25,77	15,38	0,00
R15 vs. O03	25,77	13,97	0,00
R15 vs. O04	25,77	15,06	0,00
R15 vs. O05	25,77	23,69	0,00
R15 vs. O06	25,77	15,64	0,00
R15 vs. O07	25,77	15,79	0,00
R15 vs. O08	25,77	13,65	0,00
R15 vs. O09	25,77	14,83	0,00
R15 vs. O10	25,77	26,28	0,06
R15 vs. O11	25,77	14,56	0,00
R15 vs. O12	25,77	15,09	0,00
R15 vs. O13	25,77	15,61	0,00
R15 vs. M01	25,77	15,47	0,00
R15 vs. M02	25,77	14,83	0,00
R15 vs. M03	25,77	15,78	0,00
R15 vs. M04	25,77	14,62	0,00
R15 vs. M05	25,77	15,10	0,00
R15 vs. M06	25,77	16,12	0,00
R15 vs. M07	25,77	15,15	0,00
R15 vs. M08	25,77	14,75	0,00
R15 vs. M09	25,77	14,50	0,00
R15 vs. M10	25,77	20,93	0,00
R15 vs. M11	25,77	15,49	0,00
R15 vs. M12	25,77	15,61	0,00
R15 vs. M13	25,77	15,51	0,00
R15 vs. M14	25,77	23,33	0,00
R15 vs. M15	25,77	15,56	0,00
R16 vs. O01	24,87	19,70	0,00
R16 vs. O02	24,87	15,38	0,00
R16 vs. O03	24,87	13,97	0,00
R16 vs. O04	24,87	15,06	0,00
R16 vs. O05	24,87	23,69	0,00
R16 vs. O06	24,87	15,64	0,00
R16 vs. O07	24,87	15,79	0,00
R16 vs. O08	24,87	13,65	0,00
R16 vs. O09	24,87	14,83	0,00
R16 vs. O10	24,87	26,28	0,00
R16 vs. O11	24,87	14,56	0,00
R16 vs. O12	24,87	15,09	0,00
R16 vs. O13	24,87	15,61	0,00
R16 vs. M01	24,87	15,47	0,00
R16 vs. M02	24,87	14,83	0,00
R16 vs. M03	24,87	15,78	0,00

T-test pro nezávislé vzorky (3n vs. 2n)			
3n vs. 2n	Průměr R	Průměr O a M	p
R16 vs. M04	24,87	14,62	0,00
R16 vs. M05	24,87	15,10	0,00
R16 vs. M06	24,87	16,12	0,00
R16 vs. M07	24,87	15,15	0,00
R16 vs. M08	24,87	14,75	0,00
R16 vs. M09	24,87	14,50	0,00
R16 vs. M10	24,87	20,93	0,00
R16 vs. M11	24,87	15,49	0,00
R16 vs. M12	24,87	15,61	0,00
R16 vs. M13	24,87	15,51	0,00
R16 vs. M14	24,87	23,33	0,00
R16 vs. M15	24,87	15,56	0,00
R17 vs. O01	24,93	19,70	0,00
R17 vs. O02	24,93	15,38	0,00
R17 vs. O03	24,93	13,97	0,00
R17 vs. O04	24,93	15,06	0,00
R17 vs. O05	24,93	23,69	0,00
R17 vs. O06	24,93	15,64	0,00
R17 vs. O07	24,93	15,79	0,00
R17 vs. O08	24,93	13,65	0,00

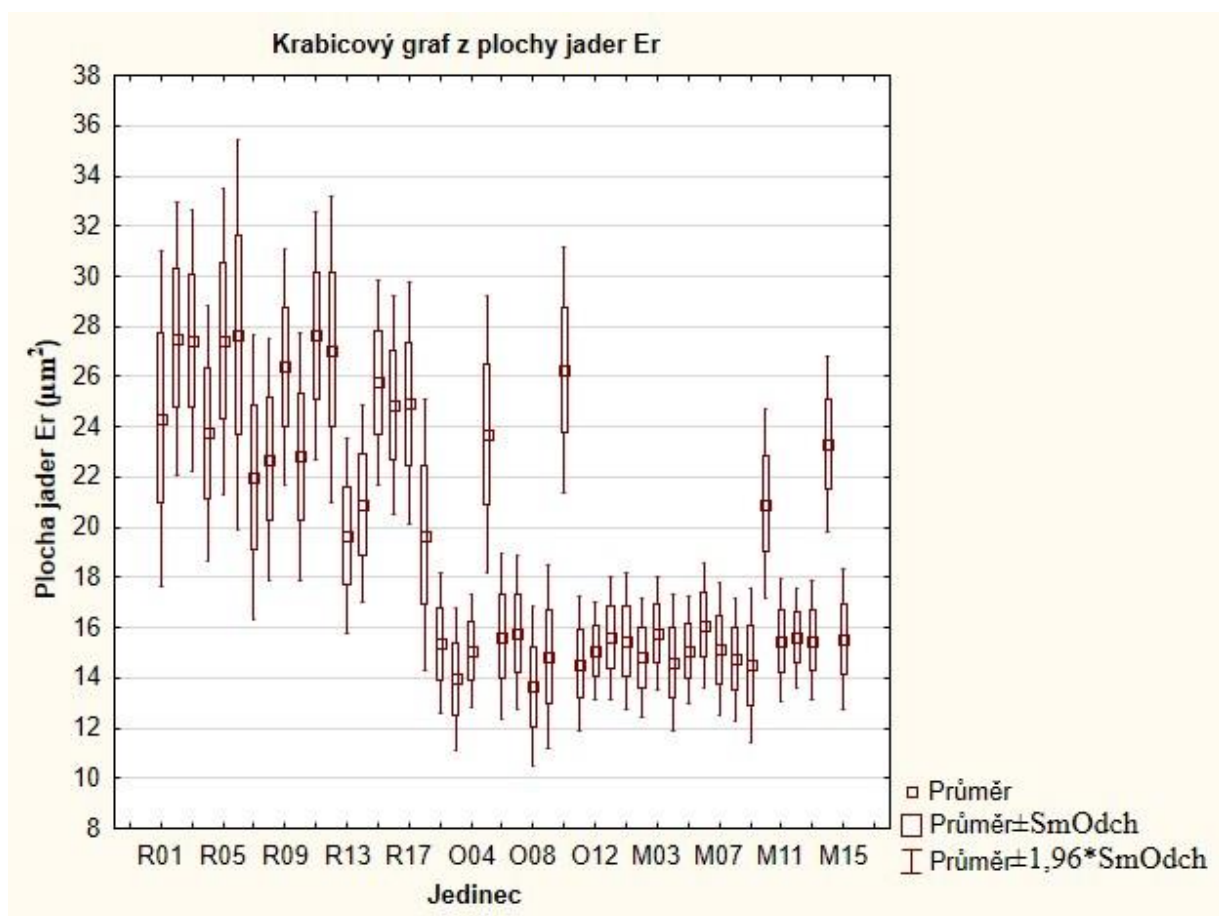
T-test pro nezávislé vzorky (3n vs. 2n)			
3n vs. 2n	Průměr R	Průměr O a M	p
R17 vs. O09	24,93	14,83	0,00
R17 vs. O10	24,93	26,28	0,00
R17 vs. O11	24,93	14,56	0,00
R17 vs. O12	24,93	15,09	0,00
R17 vs. O13	24,93	15,61	0,00
R17 vs. M01	24,93	15,47	0,00
R17 vs. M02	24,93	14,83	0,00
R17 vs. M03	24,93	15,78	0,00
R17 vs. M04	24,93	14,62	0,00
R17 vs. M05	24,93	15,10	0,00
R17 vs. M06	24,93	16,12	0,00
R17 vs. M07	24,93	15,15	0,00
R17 vs. M08	24,93	14,75	0,00
R17 vs. M09	24,93	14,50	0,00
R17 vs. M10	24,93	20,93	0,00
R17 vs. M11	24,93	15,49	0,00
R17 vs. M12	24,93	15,61	0,00
R17 vs. M13	24,93	15,51	0,00
R17 vs. M14	24,93	23,33	0,00
R17 vs. M15	24,93	15,56	0,00

Byly identifikovány dva stupně ploidie a pro uvedené lokality bylo zjištěno následující složení skupiny: R – Řehačka z 18 ks bylo 100 % triploidních samic; M – Dyje z 15 ks zřejmě převaha samců (problém s determinací), bylo nalezeno 13 diploidů a 2 triploidi (z toho spolehlivě 1 x 3n ♂, druhý triploid zřejmě také samec); O – Odra z 13 ks převaha samic (problém s determinací), nalezeno 10 diploidů a 3 triploidi (2♀ a 1♂). Problém s určením pohlaví byl způsoben prázdnými gonádami, protože většina ryb byla po vytření. Přehled v tabulce č. 2.

Následně byly u výběrových souborů testovány naměřené plochy jader Er [μm^2] na normalitu dat a homogenitu rozptylů. Do analýzy bylo zahrnuto celkem 5865 jader Er (minus jádra 5 – ti vyloučených ryb). Konkrétně se jednalo o 2550 jader u skupiny R (3n), 1502 jader u skupiny O (2n) a 1813 jader u skupiny M (2n). Součet jader Er pro diploidní skupiny O a M odpovídal celkem 3315 ks. Na základě Shapiro – Wilkova W testu a K – S & Lillieforsova testu normality bylo zjištěno, že distribuce četností výše zmíněné vlastnosti neodpovídá na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ normálnímu rozložení. Taktéž pro všechny tři výběrové soubory nebyla potvrzena ani homogenita rozptylů. Pro tento účel byly využity

Cochran – Hartley – Bartlettův a Levenův test. Z toho důvodu byla pro testování rozdílů v ploše jader Er [μm^2] mezi jednotlivými výběrovými soubory použita neparametrická varianta jednorozměrné ANOVy s Kruskal – Wallisovým testem viz tabulka č. 5 a graf č. 3.

Graf č. 1. Statistické zpracování velikosti plochy jader erytrocytů u jednotlivých karasů stříbřitých (45 ks) vyneseno do grafu. Vlevo skupina R (R1 až R17, 3n jedinci), uprostřed skupina O (O1 až O13, 2n jedinci + tři 3n), vpravo skupina M (M1 až M15, 2n jedinci + dva 3n). Bez R18.



Do dalšího statistického hodnocení byl zahrnut výše zmíněný počet jaderných ploch Er – 5865. Byly provedeny základní popisné statistiky charakterizující polohu a variabilitu. Výsledky průměrné plochy jader ze všech naměřených dat se podobaly hodnotám uvedeným v dalším odstavci. Průměr skupiny R = $24,89 \pm 3,67 \mu\text{m}^2$. Průměr skupiny O = $14,96 \pm 1,60 \mu\text{m}^2$. Průměr skupiny M = $15,33 \pm 1,33 \mu\text{m}^2$. Při sloučení skupiny O a M byla vypočtena hodnota $15,16 \pm 1,47 \mu\text{m}^2$. Směrodatná odchylka (SD) a koeficient variance (CV) nabývaly v tomto případě vyšších hodnot, kvůli větší proměnlivosti dat. Ovšem CV byl u všech skupin stále nízký (R – 14,73; O – 10,72; M – 8,67).

Proto byly jaderné plochy Er zprůměrovány. Tato eliminace odlehlých hodnot však není statisticky zcela korektní. Průměrná plocha skupiny byla získána z dílčích průměrů každé ryby. U skupiny R (3n) byla zjištěna průměrná hodnota plochy jader Er $24,89 \pm 2,56 \mu\text{m}^2$. A u skupiny O a M (2n) byly získány průměry $14,96 \pm 0,71 \mu\text{m}^2$ a $15,27 \pm 0,49 \mu\text{m}^2$ v příslušném pořadí. Blíže tabulka č. 3. Při sloučení skupin O a M byla získána hodnota $15,14 \pm 0,60 \mu\text{m}^2$. Variační koeficient byl u všech skupin nízký. Pozn. Z popisných statistik bylo vyloučeno 5 ryb + R18.

Tabulka 2. Přehled stupně ploidie a pohlaví u jednotlivých ryb. Nejisté údaje obsahují otazník. Žlutě jsou označeni nalezení triploidů. U R18 je předpoklad triploidie.

Označení ryby	Stupeň ploidie	Pohlaví
R01	3n	♀
R02	3n	♀
R03	3n	♀
R04	3n	♀
R05	3n	♀
R06	3n	♀
R07	3n	♀
R08	3n	♀
R09	3n	♀
R10	3n	♀
R11	3n	♀
R12	3n	♀
R13	3n	♀
R14	3n	♀
R15	3n	♀
R16	3n	♀
R17	3n	♀
R18	(3n)	♀
O01	3n	♂
O02	2n	♀
O03	2n	♂
O04	2n	♂
O05	3n	♀

Označení ryby	Stupeň ploidie	Pohlaví
O06	2n	?♀
O07	2n	♀
O08	2n	?♀
O09	2n	♂
O10	3n	♀
O11	2n	?♀
O12	2n	?♂
O13	2n	?♀
M01	2n	?
M02	2n	?♂
M03	2n	?♂
M04	2n	?♂
M05	2n	?♀
M06	2n	?♀
M07	2n	?
M08	2n	?♀
M09	2n	?♀
M10	3n	♂
M11	2n	?♂
M12	2n	?♂
M13	2n	?♂
M14	3n	?♂
M15	2n	♂

Při dvouvýběrovém t – testu, kterým byla porovnáována triploidní (R) a diploidní (O a M) skupina, byl u jaderné plochy s 99 % pravděpodobností prokázán statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami ($p < 0,01$).

Stejně tak dopadla i neparametrická ANOVA (založená na mediánech) při předložení všech tří skupin. Podrobnosti viz tabulky č. 4 a č. 5. Rozdíly mezi diploidními a triploidními jedinci jsou dobře patrné také z grafů č. 2 a č. 3. Pozn. Bylo vyloučeno 5 ryb + R18.

Tabulka č. 3. Základní popisné statistiky z průměrných hodnot plochy jádra Er [μm^2]. Bez R18.

Skupina	Popisné statistiky z průměrných ploch pro jednotlivé skupiny.					
	Počet ryb	Průměr	Minimum	Maximum	SD	CV
R 3n	17	24,89	19,67	27,69	2,56	10,30
O 2n	10	14,96	13,70	15,79	0,71	4,74
M 2n	13	15,27	14,50	16,12	0,49	3,19

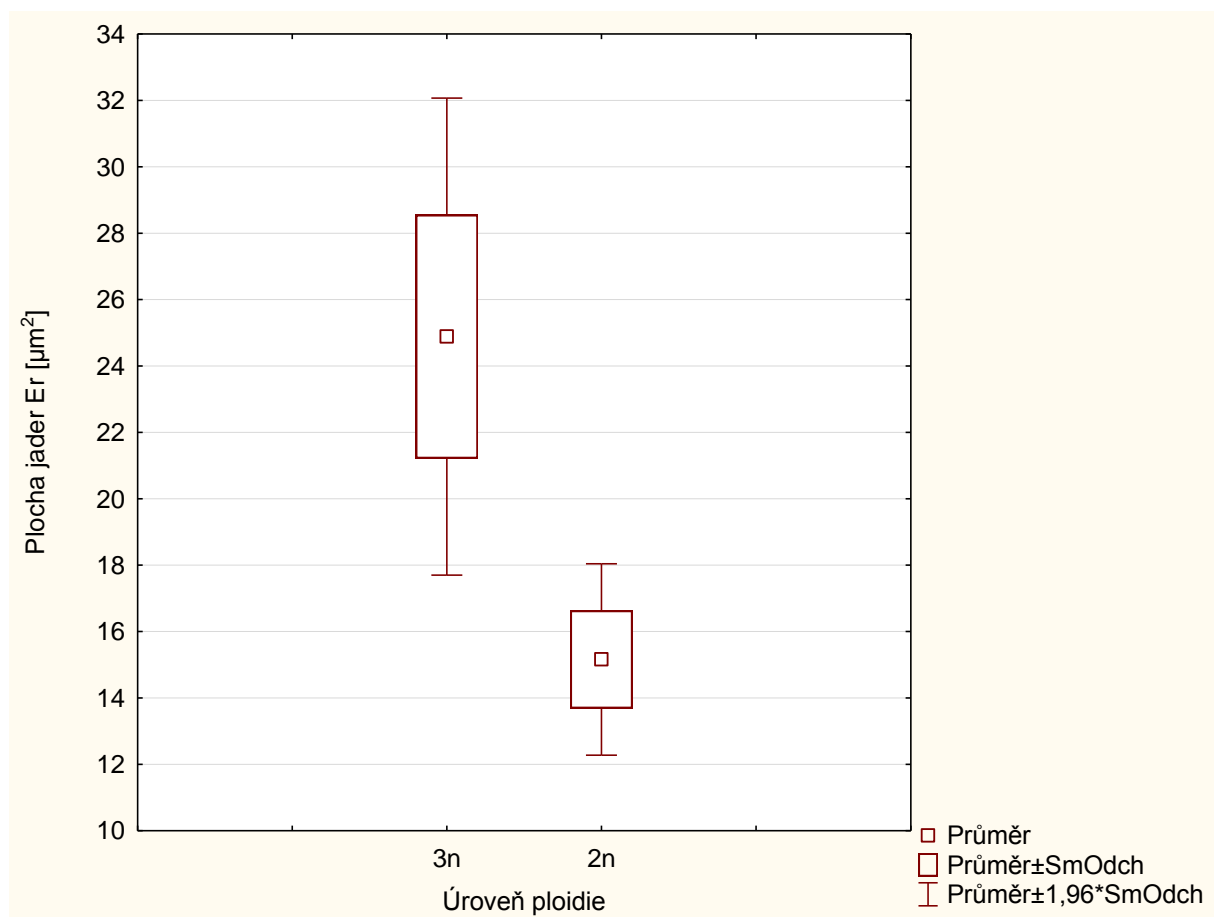
Tabulka č. 4. Výsledek dvouvýběrového t – testu při hodnocení všech naměřených ploch jader Er [μm^2] u 3n (R) a 2n (O a M) jedinců. Bez R18.

3n vs. 2n	T – test pro nezávislé vzorky.				
	Průměr 3n	Průměr 2n	Hodnota p	Počet ryb u 3n	Počet ryb u 2n
Plocha jader Er	24,89	15,16	0,00	17	23

Tabulka č. 5. Zjednodušený výsledek neparametrické Kruskal – Wallis ANOVy z průměrných ploch jader Er [μm^2] pro jednotlivé skupiny (R, O a M). Bez R18.

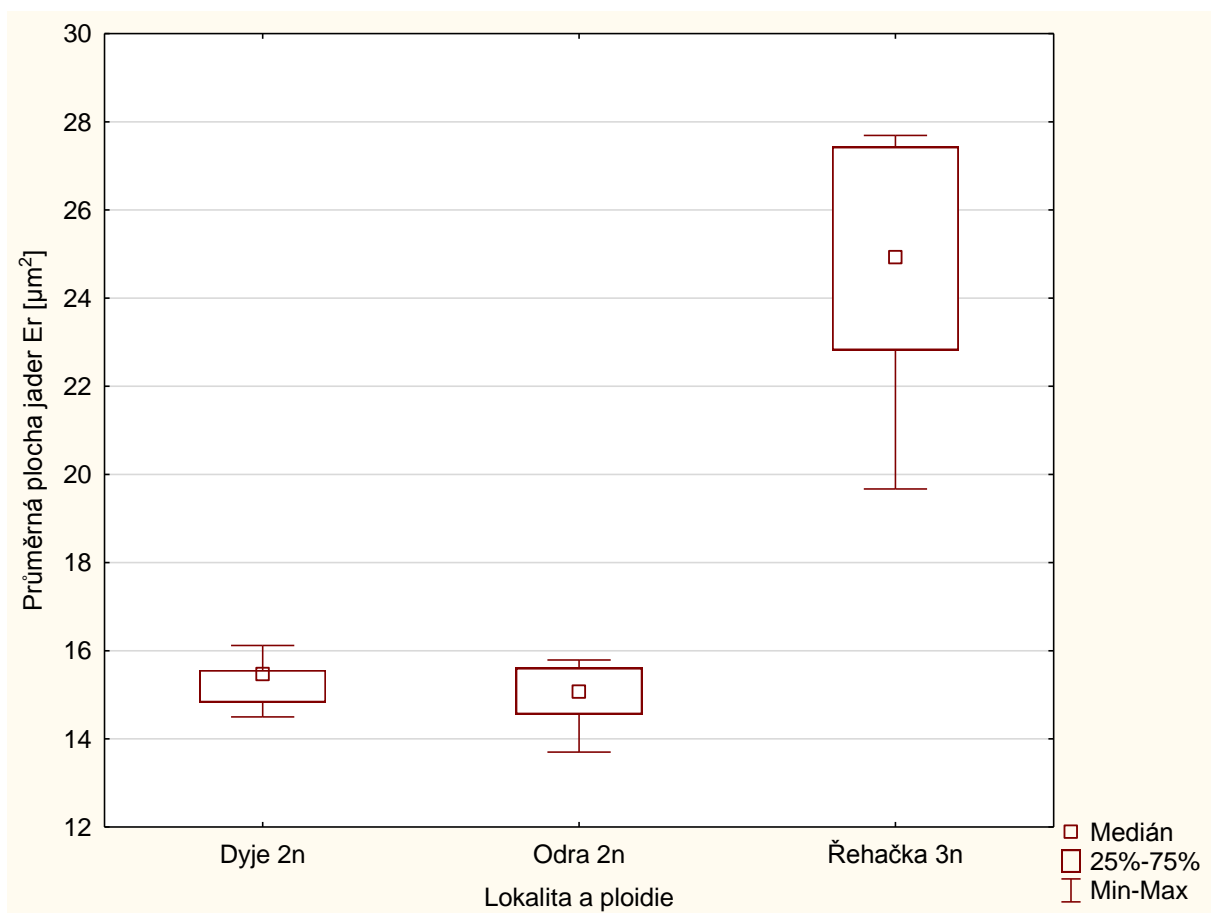
Číslo buňky	Kruskal-Wallis ANOVA pro průměrnou plochu jader Er (N = 40).			
	Lokalita a ploidie	{1}	{2}	{3}
1	Dyje 2n		1,00	0,00
2	Odra 3n	1,00		0,00
3	Řehačka 3n	0,00	0,00	

Graf č. 2. Výsledek t – testu pro všechny naměřené plochy jader Er [μm^2] u 3n (R) a 2n (O a M) jedinců. Bez R18.



Pro naměřené morfometrické údaje (standartní délku – SL, délku těla – BL a délku střeva – GL) byly v rámci tří výběrových souborů (R, O a M) provedeny základní popisné statistiky, charakterizující polohu a variabilitu. U triploidních karasů z Řehačky byly pro SL, BL a GL stanoveny následující průměry: 16,57 cm; 12,99 cm a 43,72 cm v daném pořadí. Obdobně byly vypočteny průměry stejných vlastností pro diploidní karasy z Odry a diploidní karasy z Dyje, a to následovně: SL = 17,71 cm; BL = 13,83 cm; GL = 42,14 cm a SL = 14,26 cm; BL = 11,43 cm; GL = 34,72 cm příslušně. Při sloučení 2n (O a M) byly stanoveny tyto průměry: SL = 15,76 cm; BL = 12,47 cm a GL = 37,94 cm. Větší proměnlivost byla nalezena uvnitř skupiny O. Ta byla u této skupiny způsobena většími jedinci, kteří byli zahrnuti do pokusu v porovnání se dvěma dalšími skupinami. Podrobně tabulka č. 6. Pozn. Ze statistiky bylo vyloučeno 5 ryb. Karas R18 byl do tohoto hodnocení zahrnut.

Graf č. 3. Výsledek Kruskal – Wallis ANOVy pro průměrnou plochu jader Er [μm^2] u jednotlivých skupin (R, O a M). Bez R18.



Tabulka č. 6. Základní popisné statistiky pro naměřené morfometrické údaje, SL, BL a GL u jednotlivých skupin (R, O a M).

Proměnná	Popisné statistiky pro údaj SL, BL a GL.					
	Počet ryb	Průměr	Minimum	Maximum	SD	CV
R_SL	18	16,57	15,30	20,50	1,32	7,98
O_SL	10	17,71	14,00	26,40	4,23	23,90
M_SL	13	14,26	12,40	15,90	1,21	8,52
R_BL	18	12,99	11,80	15,90	1,06	8,13
O_BL	10	13,83	11,40	19,50	3,09	22,31
M_BL	13	11,43	10,00	12,80	0,97	8,52
R_GL	18	43,72	32,70	58,20	7,36	16,83
O_GL	10	42,14	28,50	70,50	13,39	31,77
M_GL	13	34,72	23,50	47,00	5,96	17,16

Přepočtem údajů délky střeva (GL) a délky těla (SL) do relativní délky střeva ($RGL = GL/SL$) byla tato proměnlivost výrazně omezena. RGL průměr pro skupinu R = $2,63 \pm 0,28$; pro O = $2,36 \pm 0,34$ a pro M = $2,43 \pm 0,31$. Interval spolehlivosti (IS) při hladině významnosti 99 % odpovídá následujícímu rozmezí: pro R = 2,44 – 2,82; pro O = 2,01 – 2,71 a pro M = 2,17 – 2,69. Minimum a maximum, pro R = 2,11 a 3,10; pro O = 1,71 a 2,68; pro M = 1,67 a 2,96. Variační koeficient pro R = 10,56 %; pro O = 14,50 % a pro M = 12,68 %. Při sloučení 2n (O a M) $RGL = 2,40 \pm 0,32$. Blíže tabulka č. 7. Pozn. Ze statistiky bylo vyloučeno 5 ryb. Karas R18 byl do tohoto hodnocení zahrnut.

Tabulka č. 7. Základní popisné statistiky pro údaj RGL u jednotlivých skupin (R, O a M).

Proměnná	Popisné statistiky pro RGL.							
	Počet ryb	Průměr	IS -99,00 %	IS 99,00 %	Min.	Max.	SD	CV
R_RGL	18	2,63	2,44	2,82	2,11	3,10	0,28	10,56
O_RGL	10	2,36	2,01	2,71	1,71	2,68	0,34	14,50
M_RGL	13	2,43	2,17	2,69	1,67	2,96	0,31	12,68

Obdobným výpočtem, záměnou BL za SL, byl stanoven druhý pomocný relativní údaj GL/BL. Průměr pro skupinu R = $3,35 \pm 0,36$; pro O = $3,01 \pm 0,38$ a pro M = $3,03 \pm 0,39$. Interval spolehlivosti při hladině významnosti 99 % odpovídá následujícímu rozmezí: pro R = 3,11 – 3,59; pro O = 2,62 – 3,40 a pro M = 2,70 – 3,36. Minimum a maximum, pro R = 2,66 a 3,97; pro O = 2,36 a 3,62; pro M = 2,10 a 3,67. Variační koeficient pro R = 10,63 %; pro O = 12,71 % a pro M = 12,72 %. Při sloučení 2n (O a M) $GL/BL = 3,02 \pm 0,38$. Blíže tabulka č. 8. Pozn. Ze statistiky bylo vyloučeno 5 ryb. Karas R18 byl do tohoto hodnocení zahrnut.

Tabulka č. 8. Základní popisné statistiky pro údaj GL/BL u jednotlivých skupin (R, O a M).

Proměnná	Popisné statistiky pro GL/BL.							
	Počet ryb	Průměr	IS -99,00 %	IS 99,00 %	Min.	Max.	SD	CV
R_GL/BL	18	3,35	3,11	3,59	2,66	3,97	0,36	10,63
O_GL/BL	10	3,01	2,62	3,40	2,36	3,62	0,38	12,71
M_GL/BL	13	3,03	2,70	3,36	2,10	3,67	0,39	12,72

Poté byly u jednotlivých výběrových souborů vyšetřeny parametry RGL a GL/BL na normalitu dat a homogenitu rozptylů stejně jako plochy jader E_r [μm^2]. Na základě Shapiro – Wilkova W testu a K – S & Lillieforsova testu normality bylo zjištěno, že distribuce četností výše uvedených vlastností odpovídá na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ normálnímu rozložení. Navíc pro všechny tři výběrové soubory byla pomocí Cochran – Hartley – Bartlettova a Levenova testu potvrzena důležitější vlastnost nežli normální distribuce dat, a to homogenita rozptylů. Proto bylo možné pro tyto údaje použít klasickou jednorozměrnou ANOVu viz dále.

Vliv ploidie na délku střeva byl posuzován nejprve pomocí RGL. Výsledek dvouvýběrového t – testu pro tuto vlastnost potvrdil statisticky významný rozdíl mezi 3n a 2n jedinci s 95 % pravděpodobností ($p < 0,05$). Při vyloučení R18 byla prokázána odlišnost mezi 3n a 2n dokonce s 99 % pravděpodobností ($p < 0,01$). Obě varianty viz tabulky č. 9 a č. 10. Grafické zpracování první varianty při zahrnutí R18 viz graf č. 4. Počínaje touto analýzou, bylo zjištěno, že má tento karas s nejkratší délkou střeva schopnost poměrně významně ovlivnit jednotlivé výsledky. Proto byla jeho odlehlá hodnota testována pomocí Grubbsova testu pro vylučování extrémních hodnot. Závěrem tohoto testu bylo, že hodnota jeho střeva není odlehlá a patří tedy do výběrového souboru. Pozn. Ze statistiky bylo vyloučeno 5 ryb.

Tabulka č. 9. Výsledek t – testu pro RGL mezi 3n (R) a 2n (O a M) jedinci.

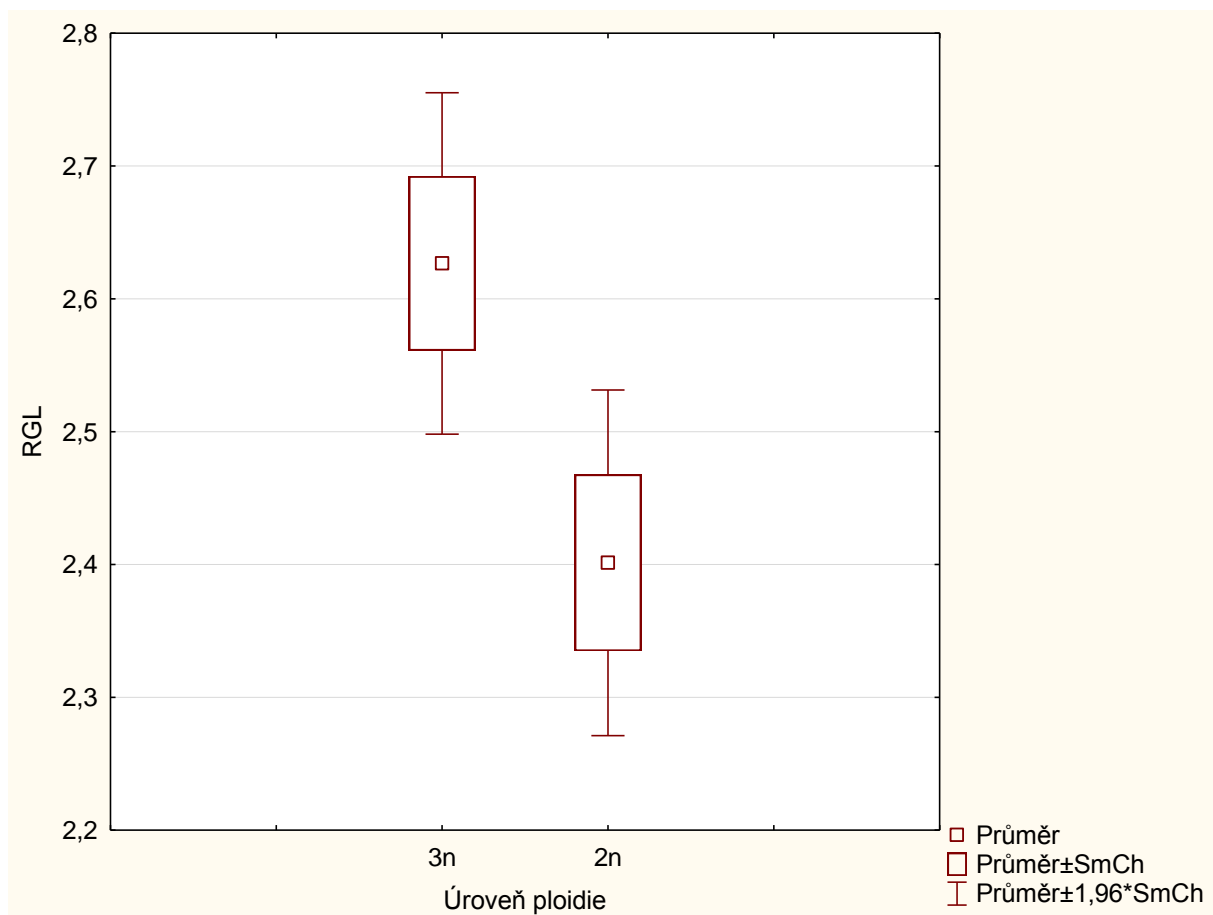
3n vs. 2n	T-test pro nezávislé vzorky (RGL).				
	Průměr 3n	Průměr 2n	Hodnota p	Počet ryb u 3n	Počet ryb u 2n
R_RGL vs. O+M_RGL	2,63	2,40	0,02	18	23

Tabulka č. 10. Výsledek t – testu pro RGL mezi 3n (R) a 2n (O a M) jedinci. Bez R18.

3n vs. 2n	T-test pro nezávislé vzorky (RGL).				
	Průměr 3n	Průměr 2n	Hodnota p	Počet ryb u 3n	Počet ryb u 2n
R_RGL vs. O+M_RGL	2,66	2,40	0,009	17	23

Šetření údaje RGL pomocí ANOVy při zahrnutí karase R18 bylo ukončeno již F – testem, protože mezi výběrovými soubory v souladu s H_0 nebyla nalezena odlišnost. Z toho důvodu nemělo smysl provádět podrobnější ANOVu. Viz tabulka č. 11.

Graf č. 4. Výsledek t – testu pro parametr RGL mezi 3n (R) a 2n (O a M) jedinci.



Nicméně, neadekvátním způsobem, při použití mírnějšího testu – Fisherova, byl s 95 % pravděpodobností prokázán statisticky významný rozdíl mezi 3n rybami z Řehačky a 2n rybami z Odry ($p = 0,03$). Mezi Řehačkou a Dyjí nebyla prokázána odlišnost ($p = 0,08$). Viz tabulka č. 12 a graf č. 5. Pozn. Ze statistiky bylo vyloučeno 5 ryb.

Tabulka č. 11. Výsledek F – testu u ANOVy pro RGL mezi třemi skupinami (R, O a M).

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro RGL. Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	Součet čtverců	Stupně volnosti	Počet čtverců	F	p
Abs. člen	236,71	1	236,71	2568,78	0,00
Lokalita	0,54	2	0,27	2,95	0,06
Chyba	3,50	38	0,09		

Tabulka č. 12. Výsledek ANOVy pro RGL mezi třemi skupinami (R, O a M).

Číslo buňky	Fisherovo test; proměnná RGL Pravděpodobnosti pro Post Hoc Testy Chyba: meziskup PČ = ,09215, sv = 38,000			
	Lokalita a ploidy	{1} 2,43	{2} 2,36	{3} 2,63
1	Dyje 2n		0,61	0,08
2	Odra 3n	0,61		0,03
3	Řehačka 3n	0,08	0,03	

Šetření údaje RGL pomocí ANOVy při vyloučení karase R18, přineslo podobný výsledek. V tomto případě byla u F-testu zamítnuta H_0 , která tvrdí, že mezi výběrovými soubory není rozdíl. Testování pomocí Scheffeho testu přesto neprokázalo statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami (R, O a M). Viz tabulka č. 13 a č. 14. Nejméně přísný Fisherův test ovšem s 95 % pravděpodobností potvrdil statisticky významný rozdíl mezi 3n rybami z Řehačky a 2n rybami z Odry i Dyje. Viz tabulka č. 15. Graf č. 6.

Pozn. Ze statistiky bylo vyloučeno 5 ryb.

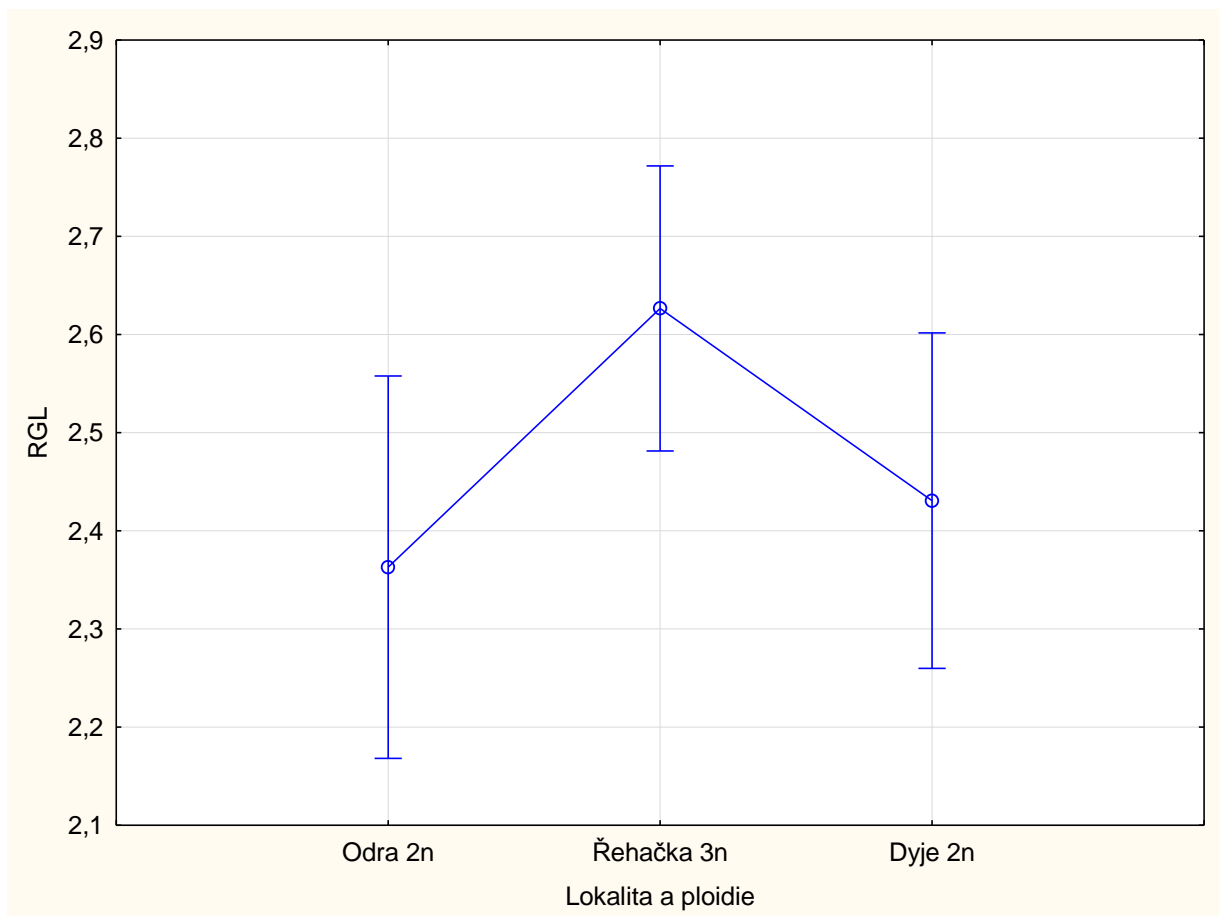
Tabulka č. 13. Výsledek F – testu u ANOVy pro RGL mezi třemi skupinami (R, O a M). Bez R18.

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro RGL. Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	Součet čtverců	Stupně volnosti	Počet čtverců	F	p
Abs. člen	235,35	1	235,35	2705,46	0,00
Lokalita	0,67	2	0,34	3,90	0,03
Chyba	3,22	37	0,09		

Tabulka č. 14. Výsledek Scheffeho testu u ANOVy pro RGL mezi třemi skupinami (R, O a M). Bez R18.

Číslo buňky	Scheffeho test; proměnná RGL Pravděpodobnosti pro Post Hoc Testy Chyba: meziskup PČ = ,08699, sv = 37,000			
	Lokalita a ploidy	{1} 2,43	{2} 2,36	{3} 2,66
1	Dyje 2n		0,87	0,12
2	Odra 3n	0,87		0,06
3	Řehačka 3n	0,12	0,06	

Graf č. 5. Výsledek ANOVy pro údaj RGL u jednotlivých skupin (R, O a M), hodnota $p = 0,06$. Statisticky významný rozdíl byl nalezen neadekvátním způsobem pouze mezi 3n rybami z Řehačky a 2n rybami z Odry ($p = 0,03$).



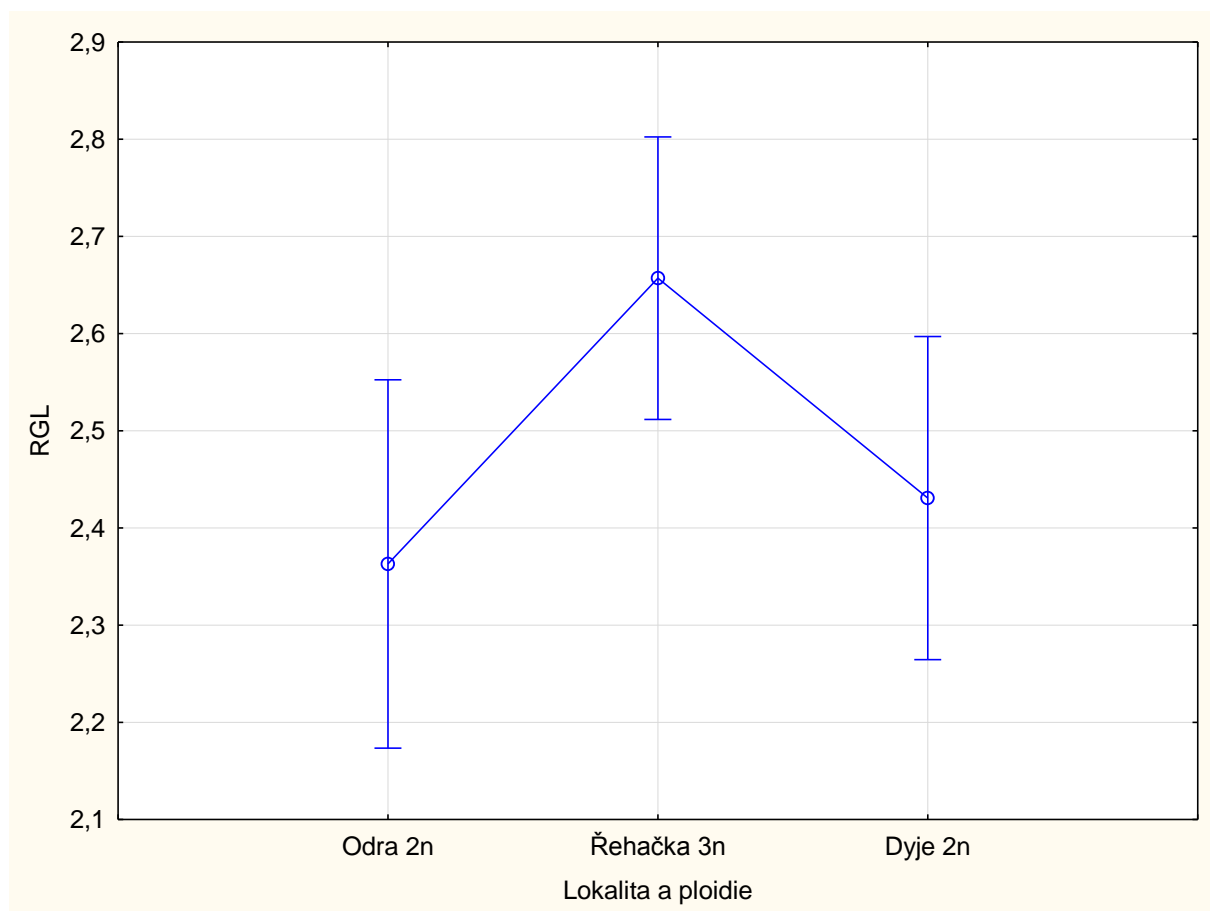
Tabulka č. 15. Výsledek Fisherova testu u ANOVy pro RGL mezi třemi skupinami (R, O a M). Bez R18.

Fisherovo test; proměnná RGL Pravděpodobnosti pro Post Hoc Testy Chyba: meziskup PČ = ,08699, sv = 37,000				
Číslo buňky	Lokalita a ploidie	{1} 2,43	{2} 2,36	{3} 2,66
1	Dyje 2n		0,60	0,04
2	Odra 3n	0,60		0,02
3	Řehačka 3n	0,04	0,02	

Jako další byl testován parametr GL/BL. Výsledek dvouvýběrového t-testu pro tuto vlastnost potvrdil statisticky významný rozdíl mezi 3n a 2n jedinci s 99 % pravděpodobností ($p < 0,01$). Viz tabulka č. 16 a graf č. 7.

Šetření údaje GL/BL pomocí ANOVy při zahrnutí karase R18, prošlo v tomto případě úspěšně F-testem již na začátku, protože mezi výběrovými soubory byl v souladu s H_0 nalezen rozdíl. Při použití Scheffeho testu, však tato odlišnost mezi jednotlivými skupinami (R, O a M) nebyla dokázána. Viz tabulka č. 17 a č. 18. Ovšem při mírnějším testování – Fisherův test, byl s 95 % pravděpodobností prokázán statisticky významný rozdíl mezi 3n rybami z Řehačky a 2n rybami z Odry i Dyje ($p < 0,05$). Viz tabulka č. 19 a graf č. 8. Pozn. Ze statistiky bylo vyloučeno 5 ryb.

Graf č. 6. Výsledek ANOVy pro vlastnost RGL u jednotlivých skupin (R, O a M), hodnota $p = 0,03$. Bez R18. Byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi 3n rybami z Řehačky a 2n rybami z Odry i Dyje.

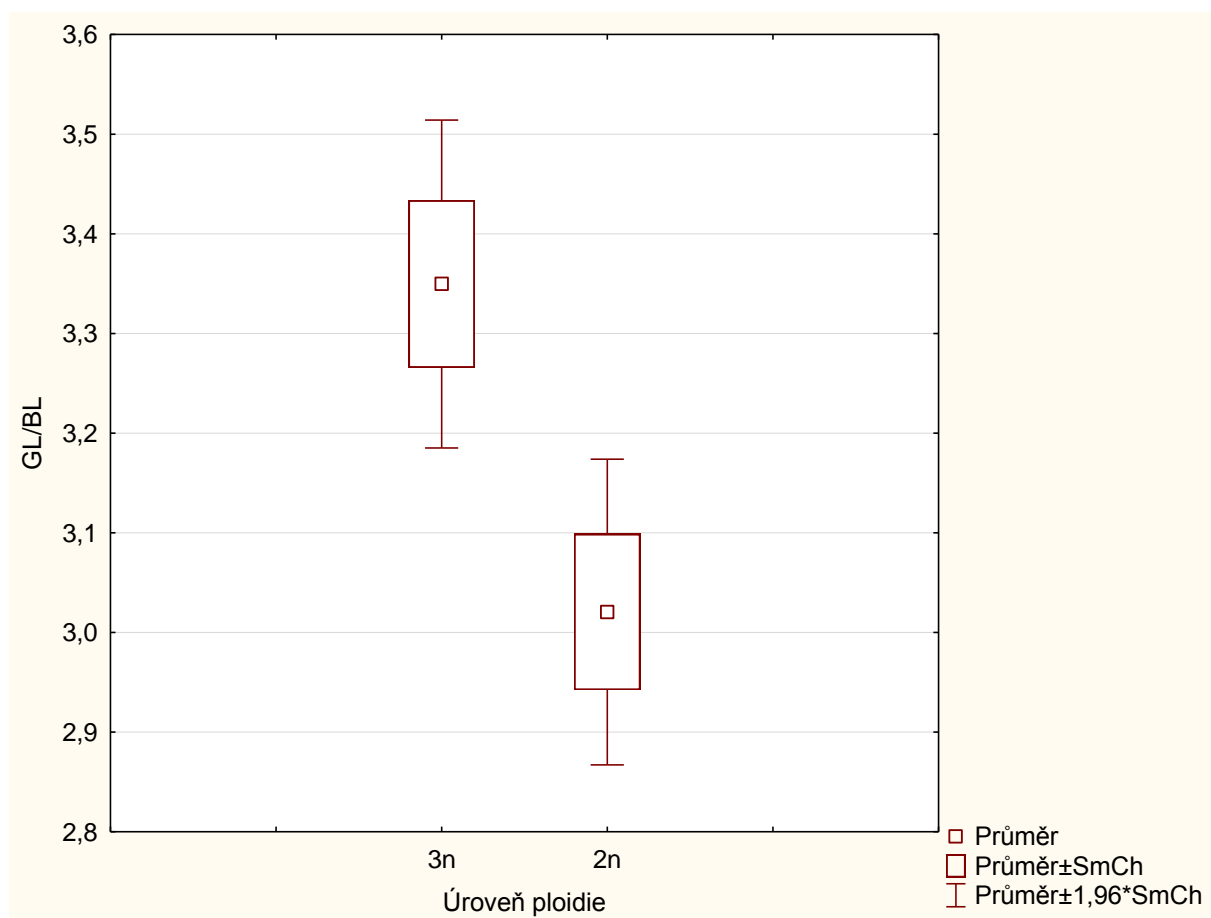


Tabulka č. 16. Výsledek t – testu pro GL/BL mezi 3n (R) a 2n (O a M) jedinci.

3n vs. 2n	T-test pro nezávislé vzorky (GL/BL).				
	Průměr 3n	Průměr 2n	Hodnota p	Počet ryb u 3n	Počet ryb u 2n
R_GL/BL vs. O+M_GL/BL	3,35	3,02	0,007	18	23

Při vyřazení karase R18 z této analýzy, byl s 95 % pravděpodobností prokázán statisticky významný rozdíl mezi uvedenými skupinami i při použití přísnějšího Scheffeho testu ($p < 0,05$). Navíc pomocí Fisherova testu byl mezi karasy z Řehačky a Dyje dokázán statisticky významný rozdíl dokonce s 99 % pravděpodobností ($p = 0,009$). Viz tabulky č. 21 a č. 22.

Graf č. 7. Výsledek t – testu pro parametr GL/BL mezi 3n (R) a 2n (O a M) jedinci.



Tabulka č. 17. Výsledek F – testu u ANOVy pro GL/BL u jednotlivých skupin (R, O a M).

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro GL/BL. Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	Součet čtverců	Stupně volnosti	Počet čtverců	F	p
Abs. člen	279,09	1	279,09	2742,02	0,00
Lokalita	1,10	2	0,55	3,97	0,03
Chyba	5,25	38	0,14		

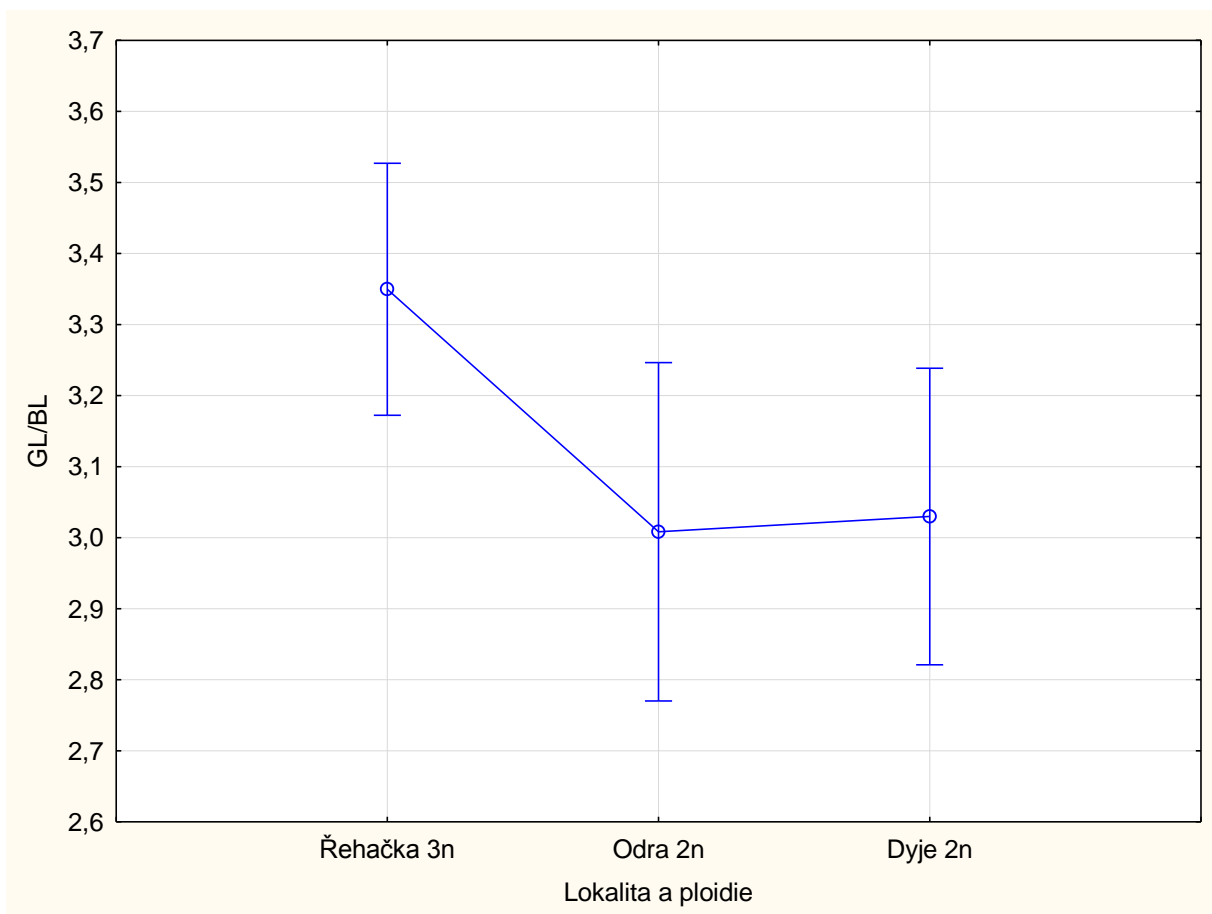
Tabulka č. 18. Výsledek Scheffeho testu u ANOVy pro GL/BL u jednotlivých skupin (R, O a M).

Číslo buňky	Scheffeho test; proměnná GL/BL Pravděpodobnosti pro Post Hoc Testy Chyba: meziskup PČ = ,13825, sv = 38,000			
	Lokalita a ploidie	{1} 3,03	{2} 3,01	{3} 3,35
1	Dyje 2n		0,99	0,07
2	Odra 3n	0,99		0,08
3	Řehačka 3n	0,07	0,08	

Tabulka č. 19. Výsledek Fisherova testu u ANOVy pro GL/BL u jednotlivých skupin (R, O a M).

Číslo buňky	Fisherovo test; proměnná GL/BL Pravděpodobnosti pro Post Hoc Testy Chyba: meziskup PČ = ,13825, sv = 38,000			
	Lokalita a ploidie	{1} 3,03	{2} 3,01	{3} 3,35
1	Dyje 2n		0,89	0,02
2	Odra 3n	0,89		0,03
3	Řehačka 3n	0,02	0,03	

Graf č. 8. Výsledek ANOVy pro údaj GL/BL u jednotlivých skupin (R, O a M), hodnota $p = 0,03$. Byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi 3n rybami z Řehačky a 2n rybami z Odry i Dyje.



Tabulka č. 20. Výsledek F – testu u ANOVy pro GL/BL u jednotlivých skupin (R, O a M). Bez R18.

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro GL/BL. Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	Součet čtverců	Stupně volnosti	Počet čtverců	F	p
Abs. člen	277,08	1	277,08	2938,57	0,00
Lokalita	1,34	2	0,67	5,22	0,01
Chyba	4,75	37	0,13		

Tabulka č. 21. Výsledek Scheffeho testu u ANOVy pro GL/BL u jednotlivých skupin (R, O a M). Bez R18.

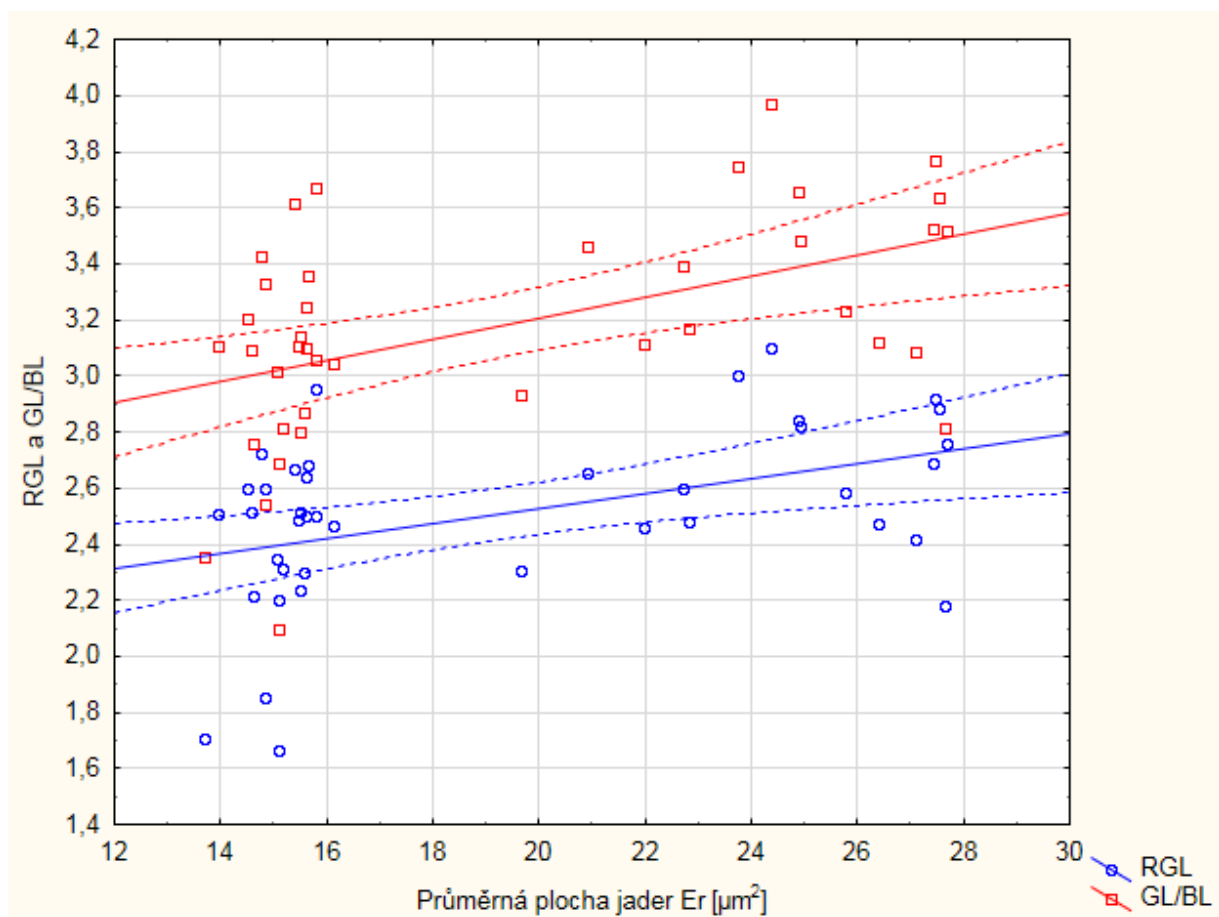
Číslo buňky	Scheffeho test; proměnná GL/BL Pravděpodobnosti pro Post Hoc Testy Chyba: meziskup PČ = ,12832, sv = 37,000			
	Lokalita a ploidie	{1} 3,03	{2} 3,01	{3} 3,39
1	Dyje 2n		0,99	0,03
2	Odra 3n	0,99		0,04
3	Řehačka 3n	0,03	0,04	

Součástí statistického šetření bylo také posouzení regrese a korelace mezi jednotlivými proměnnými. V rámci modelu jednoduché regrese byla odhalena těsná oboustranná závislost mezi stupněm ploidie a plochou jader Er ($r = 0,9442$, $r^2 = 0,8915$, $p = 0,0000$). Po dosazení konstanty a a regresního koeficientu b do obecného tvaru ($y = a + b \cdot x$), byly získány následovné lineární rovnice: $y = 0,6622 + 0,0914 \cdot x$, kde x = plocha jader Er, y = úroveň ploidie a druhá rovnice: $y = -4,3648 + 9,7502 \cdot x$, přičemž x = úroveň ploidie, y = plocha jader. Díky velmi silné závislosti, bylo možné v další regresní analýze úroveň ploidie, která v této studii nabývá pouze dvou konstantních hodnot (2n a 3n), nahradit číselnými údaji z průměrné plochy jader.

V dalším kroku tak byla posuzována závislost parametrů RGL a GL/BL na průměrné ploše jader Er viz graf č. 9. Prostřednictvím jednoduché regrese byla potvrzena střední závislost těchto dvou vlastností na ploše jader, respektive ploidii. Pro údaj RGL byla vypočtena následující lineární rovnice: $y = 1,9933 + 0,0268 \cdot x$, kde x = plocha jader Er. Koeficient korelace $r = 0,4382$; koeficient determinace $r^2 = 0,1920$ a hodnota $p = 0,0047$. Pro veličinu GL/BL byla získána rovnice $y = 2,4554 + 0,0357 \cdot x$, kde x = plocha jader Er. Koeficient korelace $r = 0,4902$; koeficient determinace $r^2 = 0,2403$ a hodnota $p = 0,0013$.

Jako poslední statistická analýza pro posouzení vlivu ploidie na délku střeva, byl použit obecný lineární model. Ten, podobně jako vícenásobná regrese, umožňuje zhodnotit více nezávislých proměnných. Jeho podstatou je stanovení stejných podmínek pro všechny jedince (výpočetem jednotného průměru). V případě tohoto výzkumu, ve kterém byly výběrové soubory tvořeny jedinci odlišné velikosti, určil totožné podmínky uvnitř i vně souborů pro dvě vedlejší spojitě proměnné (SL a BL).

Graf č. 9. Závislost RGL a GL/BL na průměrné ploše jader Er [μm^2]. Vlevo 2n, vpravo 3n. Vyloučeno 5 ryb a R18.



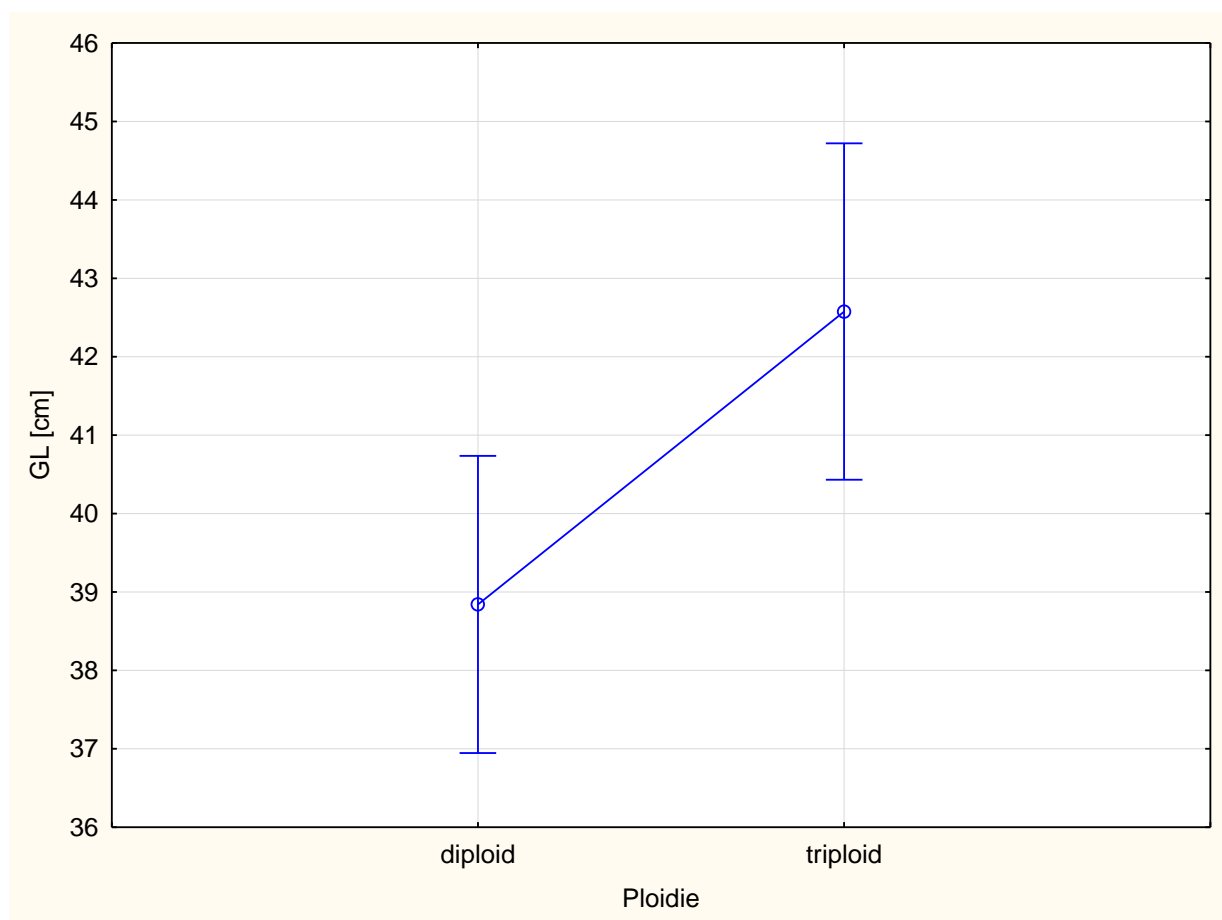
Tím došlo ke zjednodušení celého šetření. U všech ryb totiž byla sjednocena velikost, jako kdyby byli od počátku testováni stejně velcí jedinci rozdílné ploidie. A proto při porovnávání vlivu ploidie na délku střeva mezi 3n a 2n karasy, mohly být oproti dvouvýběrovému t – testu a ANOVě současně zohledněny i zbylé morfometrické vlastnosti.

Standartní délka (SL) pro všechny jednotlivce odpovídala 16,11 cm. Délka těla (BL) nabývala u všech ryb hodnoty 12,70 cm. Při samostatném zohlednění TL byl mezi 3n a 2n jedinci prokázán statisticky významný rozdíl v délce střeva s 95 % pravděpodobností ($p = 0,03211$). Při oddělené úvaze BL byl mezi 3n a 2n rybami prokázán stat. významný rozdíl též s 95 % pravděpodobností ($p = 0,01362$). Při jejich kombinaci byla získána hodnota $p = 0,01253$ viz tabulka č. 22 a graf č. 10.

Tabulka č. 22. Obecný lineární model (MNČ). Zohlednění SL a BL [cm] při vlivu ploidie na délku střeva. Hodnota $p < 0,05$ ($p = 0,01253$). Vyloučeno 5 ryb.

Číslo buňky	Ploidie, Průměry MNČ Současný efekt: $F(1,37)=6,8897$, $p=,01253$ (Vypočteno pro průměry spoj. nezáv. prom.)					
	Ploidie	GL [cm] Průměr	GL [cm] Sm.Ch.	GL [cm] -95,00 %	GL [cm] +95,00 %	Počet ryb
1	diploid	38,84	0,93	36,95	40,73	23
2	triploid	42,58	1,06	40,43	44,72	18

Graf č. 10. Výsledek obecného lineárního modelu při současném zohlednění SL i BL [cm]. Byl prokázán statisticky významný rozdíl v délce střeva mezi diploidy a triploidy. Hodnota $p < 0,05$ ($p = 0,01253$). Vyloučeno 5 ryb.



U 4 až 5 ryb ze skupiny diploidních jedinců bylo nalezeno velmi krátké střevo se zesílenou zdrsňelou střevní stěnou. Současně měli tito jedinci tmavý žlučník (černo-hnědo-modrý) a patologickou barvu jater (nahnědlá, vybledlá). Toto pozorování se nepodařilo zaznamenat u všech těchto jedinců, protože bylo v průběhu pokusu považováno za nedůležité. Z toho důvodu, nebylo bohužel ani zdokumentováno. Nebylo tedy možné ho přiřadit ve všech případech ke konkrétním rybám. S jistotou je známo pouze u dvou jedinců, a to ryby č. 8 z Odry a ryby č. 5 z Dyje. Zároveň u těchto dvou ryb byla nalezena i nízká hodnota RGL: 1,71 a 1,67, příslušně. Pokud se pokusíme dohledat zbylé 2 – 3 jedince pomocí tohoto údaje, mohlo by se jednat o následující ryby: č. 1 z Odry s RGL = 1,96; č. 9 z Odry s RGL = 1,85, popř. č. 14 z Dyje s RGL = 2,13.

6 DISKUZE

V této práci byl prostřednictvím nepřímé metody počítačové analýzy obrazu spolu se statistickým vyhodnocením získaných ploch jader Er [μm^2] identifikován stupeň ploidie pro jednotlivé karasy stříbřité náležící do tří skupin (R, O a M), přičemž v diploidních skupinách bylo nalezeno pět $3n$ jedinců. Nález potvrdil existenci smíšených populací (viz tabulky č. 1, č. 2 a graf č. 1).

Ve srovnání s dostupnými referenčními hodnotami byly ve všech níže zmíněných případech nalezeny vyšší průměry jaderných ploch. Konkrétně u triploidů zde byla zjištěna průměrná hodnota plochy jader Er $24,89 \pm 2,56 \mu\text{m}^2$. U diploidních skupin O a M, byly získány průměry $14,96 \pm 0,71 \mu\text{m}^2$ a $15,27 \pm 0,49 \mu\text{m}^2$, v příslušném pořadí. Při sloučení diploidů bylo dosaženo hodnoty $15,14 \pm 0,60 \mu\text{m}^2$ (viz tabulka č. 3).

Například ve studii Halačka et. al. (2000), byly pro plochu jader stanoveny tyto průměry: pro $2n - 10,9 \mu\text{m}^2$ a $3n - 14,4 \mu\text{m}^2$. V tomto případě se ovšem může jednat o rozdílný přístup determinace stupně ploidie, protože bylo využito jiného programu (MICROIMAGE). Značnou proměnlivost jednotlivých rozměrů erytrocytů v závislosti na celé řadě faktorů ve své práci připustil mimo jiné Flajšhans (1997). Ačkoliv ze studie analýzy obrazu vyloučil vývojová stádia Er, pozoroval uvnitř skupin rozdíly v konkrétních rozměrech krevních vzorků ryb.

V souladu s těmito publikovanými hodnotami, byla též práce dalších autorů. Vetešník et al. (2006) uvádí pro jaderné plochy Er následující průměrné hodnoty z let 2003 a 2004: u $2n$ $10,89 \pm 0,45 \mu\text{m}^2$ a $11,01 \pm 0,48 \mu\text{m}^2$, zatímco u $3n$ $14,83 \pm 0,41 \mu\text{m}^2$ a $15,52 \pm 0,35 \mu\text{m}^2$. Navíc v r. 2003 tento kolektiv zmiňuje průměrnou plochu jader Er pro tetraploidní jedince a to $17,76 \mu\text{m}^2$. Ovšem, v této době se mnoho výsledků neopíralo o kontrolní určení stupně ploidie buď pomocí průtokové cytometrie nebo karyotypizace. Díky tomu byly často ryby s prům. plochou jader Er okolo $17 - 20 \mu\text{m}^2$ považovány nesprávně za tetraploidní.

Proto je vhodné nejen výsledky této práce porovnávat s takto ověřenými údaji. I přes vyšší průměrnou hodnotu u triploidů, se naměřené plochy jader podobají hodnotám, které uvedli Kalous et Petrtýl (2004). Tito autoři stanovili průměrnou plochu jader Er pro $2n$ $14,03 \pm 1,45 \mu\text{m}^2$ a pro $3n$ $20,71 \pm 1,76 \mu\text{m}^2$. A skutečně, téměř shodné údaje s tímto kolektivem zveřejnil i Lácha (2014). Jím naměřené hodnoty pro $2n$ odpovídaly hodnotám $14,76 \pm 1,21 \mu\text{m}^2$ a $20,26 \pm 1,97 \mu\text{m}^2$.

Jak již bylo naznačeno, rozdíly v jednotlivých výsledcích mohou být způsobeny velkým množstvím okolností včetně jiných metodických postupů, různého proměření mikroskopu, odlišného způsobu měření (automatické x manuální se subjektivitou), užití jiného programu pro obrazovou analýzu či nesprávné kalibrace mikroskopu. Poslední jmenovaná byla navíc v průběhu pokusu řešena.

Nesmírně důležitou skutečností je existence aneutriploidních jedinců. Proto by pozorované rozdíly v ploše jader erytrocytů uvnitř $3n$ skupiny, mohly souviset také s proměnlivým počtem chromozomů (Kalous, 2014). V uvedeném výběrovém souboru totiž byli nalezeni příslušníci s přibližně $20 \mu\text{m}^2$, další jedinci dosahovali přibližně průměru celé skupiny tj. prům. plocha jader do $25 \mu\text{m}^2$ a téměř polovinu souboru (8 ks) tvořili jednotlivci vlastníci větší rozměry (až $27,69 \mu\text{m}^2$). Podobná proměnlivost velikosti plochy jader byla nalezena i mezi domnělými triploidními jedinci, kteří byli zjištěni v rámci diploidních skupin (viz graf č. 1). Což je možné, protože větší intervaly ploch jader u triploidů byly zaznamenány minimálně u dvou ryb publikovaných ve studii Kalous et Petrtyl (2004).

I když je u této nepřímé metody determinace ploidie velmi pravděpodobné zahrnutí dalších stejně obarvených krvinek, bylo vynaloženo úsilí tento jev při manuálním měření eliminovat (Flajšhans, 1997; Kalous et Petrtyl, 2004). Přesto napříč krevními nátěry nebyly, a pokud tak velmi stěží, u zmíněných extrémních jedinců nalezeny oblasti s menšími buněčnými rozměry.

Posuzované veličiny triploidů obecně vykazovali větší rozsahy hodnot než uniformnější diploidi. Tato skutečnost je patrná z jednotlivých grafů (grafy č. 2, č. 3). I z tohoto důvodu není v této práci zvolena jednotná úprava grafů. U některých z nich byla kvůli značné varianci upřednostněna střední chyba před směrodatnou odchylkou pro lepší grafické znázornění odlišností mezi rybami.

Byly nalezeny statisticky významné rozdíly v ploše jader Er mezi $3n$ a $2n$ rybami s 99 % pravděpodobností (viz tabulka č. 4). Tato odlišnost byla s 99 % pravděpodobností potvrzena rovněž v rámci neparametrické ANOVy (viz tabulka č. 5).

Protože triploidní karasi mají ve svých jádrech 1,5 x více chromozomů, je obecným předpokladem, že by tito jedinci měli vlastnit zhruba 1,5 x větší jaderné plochy než ryby diploidní (Kalous et Petrtyl, 2004). Tento fakt byl v podstatě potvrzen lineární rovnicí uvedenou ve výsledcích. Navíc byla mezi plochou jader Er a stupněm ploidie doložena velmi

těsná oboustranná závislost. S rostoucí plochou jader, se zvyšuje úroveň ploidie a naopak s rostoucím stupněm ploidie se zvyšuje i plocha jader.

Pro vlastní měření střev se ukázalo jako nesmírně důležité přesné stanovení způsobu měření. Tím lze totiž zabránit nepřesnostem i vzhledem k pozdějšímu srovnávání jednotlivých prací. Jako biologický materiál má trávicí trakt značnou schopnost elasticity, a proto je nutné zohlednit tento jev při samotném měření. Ze zkušenosti může tato diference představovat rozdíl mezi délkami „před relaxací“ a „po relaxaci“ větší jak 1,5 cm. Přesto byla měření zřejmě zatížena určitou chybou, protože zvláště ze začátku se v souboru opakují celočíselné hodnoty, zatímco později zase určitá desetinná místa.

Ze statistických analýz vyplývá, že se parametr GL/BL jeví jako spolehlivější ukazatel pro posuzování vlivu ploidie na délku střeva u polyploidních ryb než dosud preferované RGL (viz graf č. 9). To je doloženo rovněž silnější hodnotou p pro údaj GL/BL (viz tabulky č. 16, č. 21). A to minimálně v případě karase stříbřitého. Toto zjištění není překvapivé. Protože celkem logicky nemá celková délka těla (ocasní ploutev) vliv na délku střeva. Proto tato práce pro další podobné studie navrhuje favorizování tohoto údaje před RGL. Ve srovnání s velmi silnou závislostí mezi ploidii a plochy jader E_r , byla pro oba střevní indexy nalezena pouze střední korelace s plochou jader, respektive se stupněm ploidie. Procentuální míra ovlivnění plochy jader E_r (ploidie) oběma střevními parametry nedosahovala více než 24,03 %. Větší rozptýlení hodnot v pravé části grafu č. 9 je způsobeno především proměnlivou plochou jader u triploidů. V levé dolní části tohoto grafu je možné si všimnout tří odlehlejších bodů, které by pravděpodobně mohly představovat domnělé jedince s morfo – anatomickými (degenerativními) změnami orgánů, v tomto případě střev.

Nicméně, s 95 % (99 %) pravděpodobností byl s využitím parametrů RGL a GL/BL odhalen statisticky významný rozdíl mezi $3n$ a $2n$ rybami na základě dvouvýběrového t – testu (viz tabulky č. 9, č. 10, č. 16 a grafy č. 4, č. 7), ANOVy (viz tabulky č. 15, č. 19, č. 21 a grafy č. 6, č. 8) a pro tuto práci pravděpodobně nejvhodnějšího obecného lineárního modelu, který vyhodnocoval zdrojová data (viz tabulka č. 22 a graf č. 10). Přímá souvislost mezi délkou střeva a původem ryb nebyla mezi Odrou a Dyjí nalezena. Vliv původu na délku střeva byl zjištěn jednak mezi rybami z lokalit Řehačky a Odry, a také mezi rybami z lokalit Řehačky a Dyje. Je nutné připomenout, že původ ryb je ovlivněn právě stupněm ploidie. Vzhledem k malému množství lokalit, není možné toto ovlivnění objektivně posoudit.

Za účelem posouzení této závislosti by bylo vhodné do výběrového souboru zahrnout podstatně větší počet lokalit se zastoupením ryb obou ploidních úrovní.

V případě posuzování jakékoliv regrese a korelace u polyploidních ryb by bylo vhodné nahradit konstantní hodnoty označení ploidie (v této práci $2n = 2$ a $3n = 3$) více vypovídajícími údaji, tedy konkrétním obsahem DNA (nebo počtem chromozómů), který lze určit pomocí průtokové cytometrie (nebo karyotypizace). Jinak by muselo být využito tzv. logistické funkce, nikoliv lineární regrese a korelace (Vejl et Vašek, 2015).

Závěrem těchto analýz je, že stupeň ploidie má vliv na délku střeva, přičemž oproti studiím uvedeným v rešerši, bylo u $3n$ karasů nalezeno delší střevo než u jejich diploidních protějšků. Tento paradox, lze zdůvodnit existencí mezidruhových rozdílů. Jak bylo uvedeno dříve, delší střevo může určitým způsobem zvýhodňovat triploidní karasy stříbřité například v potravní kompetici. Naproti tomu, mezi diploidními jedinci z Odry a Dyje nebyl nalezen žádný rozdíl. Proto původ ryb sám o sobě zřejmě nemá vliv na délku střeva minimálně v rámci říčních lokalit. A je zde vázán na ploidní stav ryb. Pokud by byly porovnávány různé vodní plochy, mohly by však tyto odlišnosti existovat. Navíc v lokalitách se zastoupením $2n$ i $3n$ ryb, by bylo vhodné mezi sebou hodnotit obě ploidní úrovně.

Morfo – anatomické změny, které byly zmíněny ve výsledcích, by mohly souviset s mezidruhovou hybridizací u $2n$, jelikož takové $2n$ hybridy mají více deformit ve srovnání s $3n$ hybridy (Flajšhans a Ráb, 2013). Pokud by se tento jev vyskytoval u tří jedinců z Odry, mohla by být tato práce dalším důkazem křížení $2n$ formy k. stříbřitých, kteří mají být v povodí Odry domácí. S odkazem na studii Rylková et Kalous (2013a) je jejich genom pravděpodobně začleněn do invazního diploidně – polyploidního komplexu k. stříbřitého. Navíc ryby č. 8 a 9 z Odry vykazují spolu s č. 2 též z Odry znaky ferálního *C. auratus*.

Zajímavé je, že pokud je ryba č. 2 z Odry také hybrid, jeho délka střeva vykazuje normální hodnotu. Dále je pozoruhodné, že ryba č. 1 z Odry a ryba č. 14 z Dyje, které vykazují též nižší RGL (1,96 a 2,13), byly při sortování ryb pomocí PAO determinovány jako triploidní. Alternativním vysvětlením pozorovaných anomálií, by proto mohla být také atrofie střev z inaktivity. V jejím důsledku by zřejmě mohly být atrofované i další orgány podílející se na trávení (zejména játra, žlučník, slinivka) a uvedené změny by spolu mohly souviset. Tento degenerativní proces pochází z omezené činnosti orgánu např. při hladovění (ryby hladověly).

U normálního orgánu při ní dochází k úbytku tkáně, a tím se zvyšuje vazivové stroma a orgán je tužší. Vedle této atrofie z inaktivity, existuje i tzv. hnědá atrofie. Takto atrofovaný orgán je hnědě zbarvený následkem ukládání pigmentu z opotřebení – lipofuscinu. Cílovým orgánem jsou především játra. U střev a jater byly pravděpodobně pozorovány právě tyto patologické změny. Ovšem u ryb barva žluči, a tím i žlučníku, přechází v návaznosti na předchozí potravu přes žluté, zelené zbarvení až do tmavě modré barvy a je vyráběna kontinuálně. Proto může být tmavý žlučník fyziologicky normální, ale může se též jednat o dietní či jiné problémy (Robb, 1992). Jiná možná vysvětlení nejsou známa. Jelikož by tyto změny mohly postihovat 2n i 3n jedince stejně, jedná se pravděpodobně o náhodné pozorování, které nejspíše plyne z nevhodných chovných podmínek než stupně ploidie či hybridizace. Nelze však vyloučit větší citlivost 2n jedinců oproti 3n rybám, ta by však musela být podložena příslušnou studií (Chmelíková, 2015, pers. comm.).

7 ZÁVĚR

V diplomové práci jsou shrnuty informace o karasovi stříbřitém. Cílem práce bylo posoudit vztah ploidie a délky střeva.

Na základě provedených analýz dle předem stanovené metodiky experimentu byla potvrzena nulová hypotéza (H_0), že ploidie má vliv na délku střeva. U triploidních jedinců karase stříbřitého bylo s 95 % (99 %) pravděpodobností nalezeno delší střevo ve srovnání s diploidními protějšky. Výsledky této práce ovšem nepotvrdily vliv původu na délku střeva u diploidních ryb. To ovšem neznamená, že tento vztah neexistuje. Za tímto účelem by bylo vhodné provést další šetření.

Ze statistických analýz vyplynulo, že se parametr GL/BL jeví jako spolehlivější ukazatel pro posuzování vlivu ploidie na délku střeva u polyploidních ryb než dosud preferované RGL.

V případě posuzování jakékoliv regrese a korelace u polyploidních ryb by bylo v budoucnu vhodné nahradit konstantní hodnoty označení ploidie (v této práci $2n = 2$ a $3n = 3$) více vypovídajícími údaji, tedy konkrétním obsahem DNA (nebo počtem chromozómů), který lze určit pomocí průtokové cytometrie (nebo karyotypizace).

U několika jedinců byly objeveny degenerativní změny orgánů, zejména střev, které zřejmě mohly být způsobeny nevhodnými podmínkami chovu (hladovění ryb). V tomto ohledu by bylo zajímavé provést srovnávací studie mezi ploidiemi v závislosti na množství dostupné potravy.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- Avise J. C. 2015. Evolutionary perspectives on clonal reproduction in vertebrate animals. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 112 (29). p. 8867–8873. ISSN 1091-6490.
- Bytyutskyy, D., Flajšhans, M. 2011. Vzájemný vztah mezi ploidní úrovní, velikostí genomu a velikostí buněk v sérii modelů ryb s ploidní úrovní od 2n do 12n (Přehled). *Bulletin VÚRH Vodňany*. 47 (2), s. 27–39. ISSN 0007-389X.
- Dawley, R. M. 1989. An introduction to unisexual vertebrates. Evolution and ecology of unisexual vertebrates. *Bulletin 466. New York State Museum*. p. 1–18.
- Flajšhans, M. 1997. A model approach to distinguish diploid and triploid fish by means of computer – assisted image analysis. *Acta Veterinaria Brno*. 66. p. 101–110. ISSN 0001-7213.
- Flajšhans, M., Ráb, P. 2013. Polyploidie u ryb. *Živa 06/2013*. Praha. s. 261–264. ISSN 0044-4812.
- Gui, J. F., 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). p. 409–415. ISSN 1674-7305.
- Halačka, K., Lusková, V. 2000. Polyploidie u karasa stříbřitého (*Carassius auratus*) v dolním toku Dyje-determinace pomocí velikostí jader erytrocytů. *Sborník referátů IV. České ichtyologické konference*. Vodňany. 10. p. 110–113. ISBN 80-85887-32-0.
- Chmelíková, E. 18. března 2015. pers. comm.
- Kalous, L., Petrtýl, M. 2004. Příspěvek k ploidii karase stříbřitého (*Carassius 'gibelio'*). *Sborník VII. České ichtyologické konference*. p. 64–68. ISBN 80-85887-50-9.
- Kalous, L., Šlechtová, V. Jr., Bohlen, J., Doadrio, I. 2004. Původ a identifikace ryb rodu *Carassius* v Evropě pomocí molekulárně – genetických dat. *Sborník VII. České ichtyologické konference*. p. 69–73. ISBN 80-85887-50-9.
- Kalous, L. 2013. Karas stříbřitý a jeho příbuzní. *Živa 06/2013*. Praha. s. 285–288. ISSN 0044-4812.

Karachle, P. K., Stergiou, K. I. 2010. Intestine morphometrics of fishes: a compilation and analysis of bibliographic data. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*. 40 (1). p. 45–54. ISSN 0137-1592.

Knytl, M., L. Kalous, M. Petrtyl. Chromosome number of Silver Prussian carp (*Carassius gibelio*). 2008. Sborník XI. České ichtyologické konference. p. 252. ISBN 978-80-7375-246-0.

Lácha, J. 2014. Charakteristika naměřených hodnot velikosti erytrocytů triploidních karasů stříbřitých. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta přírodních a potravinových zdrojů. Praha. 45 s.

Lamatsch, D. K., Steinlein, C., Schmid, M., Scharl, M. 2000. Noninvasive Determination of Genome Size and Ploidy Level in Fishes by Flow Cytometry: Detection of Triploid *Poecilia formosa*. *Cytometry*. 39. p. 91–95. ISSN 1552-4922.

Luo, J., Gao, Y., Ma, W., Bi, X., Wang, S., Wang, J., Wang, Y., Chai, J., Du, R., Wu, S., Meyer, A., Zan, R., Xiao, H., Murphy, R. W., Zhang, Y. 2014. Tempo and mode of recurrent polyploidization in the *Carassius auratus* species complex (Cypriniformes, Cyprinidae). *Heredity*. 112 (4), p. 415–427. ISSN 0018-067X.

Lusk, S., Lusková, V., Hanel, L. 2010. The list of alien species in the ichthyofauna of the Czech Republic. *Russian Journal of Biological Invasions*. 1 (3), p. 172–175. ISSN 2075-1117.

Lusková, V., Lusk, S., Halačka, K., Vetešník, L., Papoušek, I. 2008. Ploidní a sexuální status komplexu „*Carassius auratus*“ ve vodách České Republiky. Sborník XI. České ichtyologické konference. s. 150–155. ISBN 978-80-7375-246-0.

Lusková, V., Lusk, S., Halačka, K., Vetešník, L. 2010. *Carassius auratus gibelio* – The most successful invasive fish in waters of the Czech Republic. *Russian Journal of Biological Invasions*. 1 (3). p. 176–180. ISSN 2075-1117.

Maxime, V. 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish and Fisheries*. 9 (1). p. 67–78. ISSN 1467-2960.

- Nevoral, J. 2012. Karas stříbrný: pro reprodukční biologii zvíře z jiné dimenze. Dostupné z: <http://www.scienceweek.cz/karas-stribrny-pro-reprodukni-biologii-zvire-z-jine-dimenze-iid-87357>.
- Peruzzi, S., Jobling, M., Falk-Petersen, I. B., Lein, I., Puvanendran, V. 2013. Gut morphology of diploid and triploid Atlantic cod, *Gadus morhua*. Journal of Applied Ichthyology. 29 (5). p. 1104–1108. ISSN 0175-8659.
- Peruzzi, S., Hagen, Ø., Jobling, M. 2015. Gut morphology of diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture International. 23 (4). p. 1105–1108. ISSN 0967-6120.
- Robb, A. P. 1992. Changes in the gall bladder of whiting (*Merlangius merlangus*) in relation to recent feeding history. ICES Journal of Marine Science. 49 (4). p. 431–436. ISSN 1054-3139.
- Rylková, K., Kalous, L. 2013a. Genetic diversity in the genus *Carassius* (Teleostei: Cyprinidae) in the Czech Republic. Acta Societatis Zoologicae Bohemicae. 77 (6). p. 73–79. ISSN 1211-376X.
- Rylková, K., Kalous, L. 2013b. Proměna karasí populace v oblasti přírodní rezervace Kárané – Hrbáčkovy tůně. In Kubík S. & Barták M. (eds): Workshop on biodiversity, Jevany, Česká zemědělská univerzita v Praze, s. 348–353.
- Rylková, K., Kalous, L., Bohlen, J., Lamatsch, D. K., Petrýl, M. 2013. Phylogeny and biogeographic history of the cyprinid fish genus *Carassius* (Teleostei: Cyprinidae) with focus on natural and anthropogenic arrivals in Europe. Aquaculture. p. 380–383. ISSN 0044-8486.
- Rylková, K., Kalous, L., Šlechtová, V., Bohlen, J., Petrýl, M. 2008. New findings in genetic diversity of the genus *Carassius*. Sborník XI. České ichtyologické konference. p. 259. ISBN 978-80-7375-246-0.
- Suda, J. 2009. Darwinova „odporná záhada“ po 130 letech aneb souvisí polyploidie s rozmanitostí krytosemenných rostlin? Živa 5/2009. s. 204–208. ISSN 0044-4812.
- Šimková, A., Vojtek, L., Halačka, K., Hyršl, P., Vetešník, L. 2015. The effect of hybridization on fish physiology, immunity and blood biochemistry: A case study in hybridizing *Cyprinus carpio* and *Carassius gibelio* (Cyprinidae). Aquaculture. 435. 381–389. ISSN 0044-8486.

Tiwary, B., Kirubakaran, R., Ray, A. 2004. The biology of triploid fish. *Reviews in Fish Biology*. 14 (4). p. 391–402. ISSN 0960-3166.

Vejl, P., Vašek, J. 24. března 2015. pers. comm.

Vetešník, L., Halačka, K., Lusková, V., Lusk, S. 2006. Erythrocyte profile of diploid and triploid silver crucian carp (*Carassius auratus*). *Acta Veterinaria Brno*. 75 (2). p. 203–207. ISSN 0001-7213.

Vetešník, L., Halačka, K., Lusková V., Lusk S. 2004. Vliv ploidie na červený krevní obraz u karasa stříbřitého (*Carassius auratus*). *Sborník VII. České ichtyologické konference*. s. 61–63. ISBN 80-85887-50-9.

Van de Peer, Y., Taylor, J. S., Meyer, A. 2003. Are all fishes ancient polyploids? *Journal of Structural and Functional Genomics*. 2. p. 65–73. ISSN: 1345-711X

Zhang, J., Sun, M., Zhou, L., Li, Z., Liu, Z., Li, X. Y., Liu, X.-L., Liu, W., Gui, J. F. 2015. Meiosis completion and various sperm responses lead to unisexual and sexual reproduction modes in one clone of polyploid *Carassius gibelio*. *Scientific Reports*. 5. 10898. ISSN 20452322.

9 SEZNAM POUŽITÝCH POJMŮ, ZKRATEK A SYMBOLŮ

2BE – dvoubuněčné embryo

AK – aminokyselina

biotyp – skupina organismů, která vlastní stejný genotyp, reprodukuje klonálně

Coulter Counter – zařízení, též metoda pro počítání a měření velikosti částic

Er – uznávaná zkratka pro erytrocyt

FCM – flow cytometry, průtoková cytometrie

Giemsa – roztok methylenové modři, azuru a eozinu v methanolu a glycerolu, typický pro barvení krevních nátěrů.

GnRH – hormon uvolňující gonadotropin

Hg – hemoglobin

JUT – jatečně opracované tělo

kongener – příbuzný druh

MK – mastná kyselina

mtDNA – mitochondriální DNA

PAO – vlastní zkratka pro počítačovou analýzu obrazu.

PBS – phosphate buffer solution, tlumivý roztok fosforečnanový o pH 2,0.

PP – pylorické přívěsky

10 SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY

Příloha č. 1. Tabulka vstupních dat.

Označení ryby	$\bar{x} \text{ } \emptyset \text{ jader Er } [\mu\text{m}^2]$	SL [cm]	BL [cm]	GL [cm]	RGL	GL/BL
R01	24,37	18,7	14,6	58	3,10	3,97
R02	27,54	17,4	13,8	50,2	2,89	3,64
R03	27,46	16,8	13	49	2,92	3,77
R04	23,76	17	13,6	51	3,00	3,75
R05	27,43	16	12,2	43	2,69	3,52
R06	27,69	16,3	12,8	45	2,76	3,52
R07	21,99	16,6	13,1	40,8	2,46	3,11
R08	22,73	15,4	11,8	40	2,60	3,39
R09	26,39	15,4	12,2	38,1	2,47	3,12
R10	22,82	15,3	12	38	2,48	3,17
R11	27,64	16,5	12,8	36	2,18	2,81
R12	27,08	15,3	12	37	2,42	3,08
R13	19,67	15,8	12,4	36,4	2,30	2,94
R14	20,92	15,9	12,2	42,2	2,65	3,46
R15	25,77	17	13,6	44	2,59	3,24
R16	24,87	20,5	15,9	58,2	2,84	3,66
R17	24,93	16,8	13,6	47,4	2,82	3,49
R18	-	15,5	12,3	32,7	2,11	2,66
O01	19,7	22,2	18,3	43,5	1,96	2,38
O02	15,38	26,4	19,5	70,5	2,67	3,62
O03	13,97	23,4	18,9	58,7	2,51	3,11
O04	15,06	20,3	15,8	47,7	2,35	3,02
O05	23,69	20	16,4	48,2	2,41	2,94
O06	15,64	15,3	12,2	41	2,68	3,36
O07	15,79	14,9	12,2	37,3	2,50	3,06
O08	13,7	16,7	12,1	28,5	1,71	2,36
O09	14,83	16,2	11,8	30	1,85	2,54
O10	26,28	14,2	11,6	34	2,39	2,93
O11	14,56	15,5	12,6	39	2,52	3,10
O12	15,09	14,4	11,8	31,7	2,20	2,69
O13	15,61	14	11,4	37	2,64	3,25
M01	15,47	15,9	12,7	39,5	2,48	3,11
M02	14,83	15,4	12	40	2,60	3,33
M03	15,78	15,9	12,8	47	2,96	3,67
M04	14,62	14,6	11,7	32,3	2,21	2,76
M05	15,1	14,1	11,2	23,5	1,67	2,10

Označení ryby	\bar{x} Ø jader Er [μm^2]	SL [cm]	BL [cm]	GL [cm]	RGL	GL/BL
M06	16,12	15,7	12,7	38,7	2,46	3,05
M07	15,15	14,5	11,9	33,5	2,31	2,82
M08	14,75	13,2	10,5	36	2,73	3,43
M09	14,5	13,7	11,1	35,6	2,60	3,21
M10	20,93	14,5	11,6	36	2,48	3,10
M11	15,49	14,1	11,3	35,5	2,52	3,14
M12	15,61	12,4	10	31	2,50	3,10
M13	15,51	13,4	10,7	30	2,24	2,80
M14	23,33	13,7	10,8	29,2	2,13	2,70
M15	15,56	12,5	10	28,7	2,30	2,87