

## Laboratoř genetiky ryb Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v. v. i.

Laboratoř genetiky ryb ÚŽFG AV ČR, v. v. i., vznikla ve své současné podobě v r. 1993, tedy v době vzniku současné Akademie věd České republiky. Nebyla však samozřejmě založena na zelené louce. Studium ryb nemorfologickými metodami má na pracovišti dlouhou tradici. Vedle klasických „rybologických“ oborů pěstovaných v Praze, Brně, Bratislavě a ve Vodňanech vznikl na počátku 70. let minulého stol. také jiný nukleus – Miloslav Valenta (Československá akademie věd v Liběchově) spolu s Ladislavem Kálalem (Vysoká škola zemědělská v Praze) zahájili studium biochemické genetiky ryb a stali se tak u nás zakladateli genetických přístupů v poznání ryb. Je třeba říci, že metoda ověřování původu a genetické čistoty linií, plemen a druhů hospodářsky důležitých ryb na základě biochemických polymorfních znaků se užívá podle současné chovatelské a šlechtitelské legislativy dodnes. Byli též iniciátory použití i jiných genetických postupů. Záhy do spektra metod přibýlo studium chromozomů a jejich stavby u ryb – cytogenetika.

Spolu s kolegy z Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech rozvíjeli užití genomových manipulací ve šlechtění ryb (dnes jsou běžnou výbavou), zabývali se populační genetikou (začátek 80. let 20. stol.) a počátky „konzervační“ genetiky (kolem r. 1985), tedy použitím genetických metod v ochraně populací a druhů ryb; zkrátka byly učiněny první kroky v molekulární genetice. To vše byly obory v té době nové i v mezinárodním měřítku, a tak se nemohly u nás rozvíjet bez zahraničního kontextu, což v době relativních restrikcí vzájemných mezinárodních kontaktů nebylo vždy jednoduché. Situace však byla obdobná i u jiných „rybologických“ pracovišť v té době (i obecně). Na přelomu 90. let se cosi změ-

nilo a po dlouhých letech stagnace, kdy se podstatná část místní ichtyologické komunity vyžívala zejména v sepisování objemných učebnic (Fauna, Ichthyológia – včetně autora tohoto článku), ve frekventované adoraci Oty Olivy (stačí prolístat Živu nebo Akvárium terárium) a ve vzrušených diskuzích, zda je či není nutné rozlišovat v češtině rody ryb pomocí názvů typu tolstolobik a tolstolobec, případně sekavec a sekavčík; tedy po této době se začala objevovat nová generace našich „rybologů“. Otevřel se svět, zjistilo se, že ryby žijí i jinde než na Klíčavě, ve Slapské přehradní nádrži, v potoce Úpoř a v tůních kolem Čelákovic; bylo najednou zřejmé, že jich je daleko víc a jsou mnohem rozmanitější i na malém území České republiky. Krátce na to k nám „dorazila“ biodiverzita ryb se svým úporným lpěním na dodržování požadavků Mezinárodní komise pro zoologickou nomenklaturu. Objevuje se tak studium a ochrana i těch ryb, které nejsou určeny na pánev, a s tím rovněž „ochranářská“ genetika. Ve výstroji ichtyologů se vedle tenat, zátažové sítě, formolu, váhy a šuplery objevil mikroskop, sada eppendorfek s lihem na ústřížky ploutví, sekvenátor, elektroforéza, počítačové programy. A s tím rukou v ruce poznání, že pochopit formování, vývoj a evoluční vztahy naší malé, několika zaledněními ochuzené rybí bioty znamená cestovat a sbírat materiál nejen v glaciálních refugiích jihovýchodní Evropy, ale i na druhém konci palearktické oblasti. Nebo jinými slovy – metody dosud užívané u nás jen při studiu ryb užitkových se začaly intenzivně uplatňovat při zkoumání ryb obecně. Přibližně v tomto stadiu vývoje poznání ichtyofauny v České republice se nacházela i Laboratoř genetiky ryb.

Od r. 1993 bylo v rámci více než 35 národních a mezinárodních projektů základ-

ního i aplikovaného výzkumu otevřeno několik základních směrů. Petr Kotlík a poté jeho žáci, kolegové a následovníci rozvíjejí molekulární fylogeografii (což je přesná rekonstrukce historie populací a druhů v prostoru a čase pomocí molekulárních znaků) nejen reofilních druhů ryb (tedy vázaných na tekoucí vody; např. rody parma – *Barbus*, vranka – *Cottus*, mřenka – *Barbatula*, sekavčík – *Sabanejewia*, plotice – *Rutilus*, pstruh – *Salmo*), ale i druhů vod nížinných (jako např. hořavka – *Rhodeus*, sekavec – *Cobitis*, piskoř – *Misgurnus*, karas – *Carassius* nebo lín – *Tinca*). Molekulární fylogeografie ukázala příčinnou souvislost mezi změnami areálu těchto druhů v důsledku čtvrtohorních klimatických změn na jedné straně a množstvím genetické variability uvnitř populací a zároveň stupněm divergence mezi populacemi na straně druhé. Bylo zjištěno, že geografická složka mezipopulační genetické variability je často dána umístěním glaciálních refugií a kolonizačními cestami, které populace při svém šíření z těchto refugií využívaly. Na druhé straně jsou ale patrné výrazné rozdíly mezi detailními fylogeografickými vzory nalezenými u jednotlivých druhů, které pravděpodobně souvisejí s jejich rozdílnými nároky na prostředí a odlišnými schopnostmi šíření.

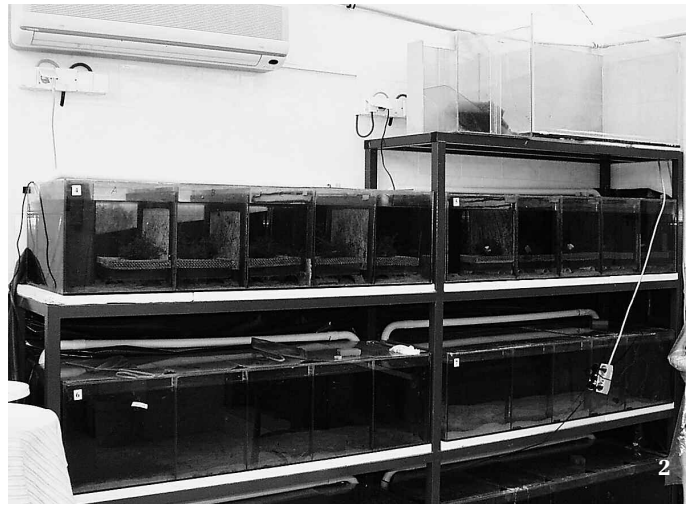
Molekulární fylogenie, tedy studium evolučních vztahů mezi různými druhovými taxony ryb v laboratoři, vznikla jako zcela vedlejší produkt v souvislosti s nálezem klonálních forem sekavců rodu *Cobitis* (viz také *Živa* 2003, 6: 271–274). Již v průkopnických dobách řešení příběhu asexuálních hybridních sekavců (na začátku 90. let 20. stol.) jsme si přestali být jisti, z kterých rodičovských druhů tyto hybridizující klonální formy vznikají. Byli jsme totiž poučeni příběhem sekavce písečného (*C. taenia*) – druhu, o němž se dosud bez ohledu na shromážděné poznatky píše, že obývá prakticky celou Eurasii a ve svém areálu má jakési „lokální formy“. Přiznám se, byli jsme zpočátku ovlivněni tímto názorem a teprve kritický přístup k vlastním i cizím datům nás poučil, že ani věhlasní profesori staletých univerzit nejsou prosti neochoty přijmout jiný pohled na věc. Dnes víme, že jen v Evropě žije více než 20 druhů sekavců. To vše nás vedlo k přesvědčení, že pochybovat je výhodná strategie. Totéž se týkalo i definice rodu *Cobitis* – je snad něco špatného s formální taxonomickou konstrukcí? Výsledek pochyb přetavili kolegové Jörg Bohlen a Vendula Bohlen Šlechtová a jejich žáci do zásadní revize nejen tohoto rodu a celé čeledi sekavcovití (*Cobitidae*), ale ve fylogenetickou strukturu celé nadčeledi *Cobitoidea* (kolem 100 rodů s více než 1 000 známých druhů). Byly popsány tři nové čeledě (dvě spíše tušené než dokázané, sekavkovití – *Botiidae* a *Vaillantellidae*, a jedna úplně nová *Ellopostomatidae*, což je malý zázrak – rod *Ellopostoma* je v historii ichtyologie daleko vzácnější než slavnější latimerie – *Latimeria*), mnoho nových rodů (*Microcobitis*, *Pteronemacheilus*) a pochopitelně řada zcela nových druhů.

Spolu s výše uvedenými obory se nemohla nedostavit z popela znovu vstávající systematika, čili klasická ichtyologie za použití morfologických metod, takže jsme



NEOŠKÍBEJTE SE A ZVYKEJTE SI SKLENICE OPRÁVDU ČISTÉ VODY BUDE ČÍM DALŠÍ VZÁCNĚJŠÍ DAR.

Orig. Vladimír Renčín



popsali několik nových druhů ryb (parma karpatská – *B. carpathicus*, parma balkánská – *B. balcanicus*, sekavec krymský – *C. taurica*) nebo spolu s Lukášem Kalousem z ČZU v Praze jsme vyřešili druhovou identitu karase stříbritého (*C. gibelio*; blíže viz článek na str. 285–288). Svým způsobem šlo zdánlivě o krok zpět, ale nastala paradoxní situace – dokázali jsme preparovat chromozomy na špičkové úrovni, sekvenovat, používat příslušné programy atd., až jsme zjistili, že nejsme často schopni přesně identifikovat objekt svého studia.

Spektakulárním případem se stalo objevení fascinujícího světa asexuálních a polyploidních hybridních klonů sekavců, k němuž přispěl svým dílem prakticky každý člen laboratoře. Nyní je doménou Karla Janka a Lukáše Cholevy a jejich žáků. Příběh, který začal náhodným nálezem triploidní samice sekavce podunajského (*C. elongatoides*) v Pšovce pod hradem Kokořín a následnou analýzou množství populací v celé Evropě, vedl k mapování druhové a hybridní rozmanitosti a způsobu rozmnožování (tím je pohlavní parazitismus hybridních samic závislých rozmnožováním na spermiích rodičovského sexuálního druhu), k charakterizaci molekulárně fylogeografické a fylogenetické struktury těchto forem, jež vznikají reciprocně, polyfyleticky a opakovaně, včetně schopnosti měnit hostitelský druh, na kterém parazitují. Matematickým modelováním bylo též studováno soužití pohlavně a klonálně se množících forem, stejně jako jejich fyziologické odlišnosti. Po dlouholetém úsilí se podařilo v laboratoři experimentálně vytvořit klonální a polyploidní ryby prostým křížením, bez buněčné manipulace, prokázat jejich klonální rozmnožování a vysvětlit vznik polyploidie jako kauzální následek mezidruhového křížení a vyřazení konzervativního mechanismu meiózy. Byl to první takový úspěšný experiment syntézy klonálního hybridního obratlovce na světě po dlouhých 80 letech od objevu klonálních obratlovců. Za soubor těchto studií nazvaný Klonální obratlovci: objev, mechanismy, biodiverzita a rekonstrukce na modelu sekavcovitých ryb obdržela Laboratoř genetiky ryb v r. 2012 Cenu Akademie věd ČR. A když už jsem u cen – P. Kotlík, K. Janko, V. Bohlen Šlechťová a L. Choleva získali významné akademické ocenění – Prémii Otto Wichterleho. V současné době se dokončuje

sekvenování a popis transkriptomů čtyř rodičovských druhů těchto sekavců. Nedílnou součástí vědeckého zaměření laboratoře je rozvoj cytogenetiky, v novější době je též kombinováno s údaji genomickými (cytogenomika). Jde o obor, jemuž se na světě věnuje vzhledem k obtížnosti skutečně jen málo specializovaných pracovišť.

Další významnou aktivitou se ve spolupráci s kolegy z Fakulty rybářství a ochrany vod (FROV) Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (fakulta však sídlí ve Vodňanech) stalo studium hybridní a ploidní diverzity jeseterů pomocí genetických metod. Byla zrekonstruována ploidní řada jedinců jeseterů od úrovně 120 po 420 chromozomů a v této souvislosti jsme se začali intenzivně zabývat průzkumem genomu archaických forem ryb (kostlínů – *Lepisosteiformes*, dvojdyšňů – *Dipnoi*). Tradičně rozvíjené je také cytogenetické studium holarktických čeledí sladkovodních ryb (kaprovití – *Cyprinidae*, sekavcovití, lososovití – *Salmonidae*). Vedle základního cytotoxonomického průzkumu karyologicky nedostatečně probádaných skupin probíhá intenzivní studium vlastností ribozomální DNA (rDNA) genů a jejich asociace s mobilními elementy. Ukázalo se, že charakteristická asociace heterochromatinu bohatého na páry nukleotidů guanin-cytosin s rDNA genovým shlukem je evolučně konzervována od úrovně mnohokostnatí (*Neopterygii*). Na základě těchto studií byly formulovány představy o karyotypové evoluci některých skupin ryb (lososotvární – *Salmoniformes*, štikotvární – *Esociformes*). Nově se laboratoř zaměřuje na problematiku transpozonů v genomech ryb a jejich úlohu při speciálních událostech (sekavci, lososovití) nebo složení replikační stavby chromozomů u starobylých a pokročilých evolučních linií. Metodu srovnávací genomové hybridizace (Comparative Genomic Hybridization – CGH) zavedla Radka Symonová a její žáci a spolupracovníci do rutinní laboratorní praxe pro účely identifikace rodičovských chromozomů v hybridních genomech sekavců a karasů. Naše laboratoř je první a prakticky jediná, která tuto metodu užívá při zkoumání genomu ryb a přináší velmi důležité výsledky. Pomocí CGH byly mimo jiné demonstrovány genomické následky ekologické speciace nezjistitelné na molekulární ani karyotypové úrovni u dvou sympatrických druhů síňů rodu *Coregonus*. Laboratoř využívá řadu

1 „Rybí domek“ je chovné zařízení s nádržemi pro temperátní ryby. Průhledná střecha umožňuje kopírovat světelný režim v různých obdobích roku, což je pro rozmnožování našich modelových druhů klíčové.

2 Vnitřní zařízení ukazující nádrže pro párové odchovy přesně identifikovaných rodičů. Snímky: J. Bohlen

molekulárně genetických metod – např. nejružnější typy sekvenování DNA, biochemické genetiky, laserové mikrodisekce chromozomů, přípravu malovacích sond a zmíněnou CGH. Má rozsáhlé a dobře katalogizované sbírky ryb a také vzorky DNA mnoha druhů, především z palearktické oblasti, ale rovněž sbírku DNA prakticky všech linií, plemen a druhů hospodářsky významných ryb v ČR.

Vedle vlastní vědecké činnosti je Laboratoř genetiky ryb ÚŽFG podle zákona č. 154/2000 Sb. ve znění pozdějších předpisů oprávněnou institucí k ověřování původu u ryb. Ve spolupráci s FROV JU Vodňany provádí genetické analýzy pro chovatele ryb, které jsou nedílnou součástí programu udržování genových zdrojů ryb. Patří k ní také velké chovatelské zázemí ve speciálním „rybím domečku“ a akvarijní místnosti s recirkulací vody, a tedy možnosti provádět dlouhodobé, zejména hybridizační experimenty. Rovněž udržuje rozsáhlou kolekci živých hybridních biotypů sekavců. Laboratoř je součástí následujících společných pracovišť: Laboratoř evoluční genetiky živočichů (s Ústavem biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., v Brně a PřF UK v Praze), Společné pracoviště genetiky, fyziologie a reprodukce ryb (s FROV JU ve Vodňanech) a Společné pracoviště fylogenetiky, fylogeografie a populační genetiky volně žijících a modelových organismů (s Ostravskou univerzitou v Ostravě). Pracují zde studenti doktorských programů zoologie a genetiky PřF UK v Praze a PřF JU v Českých Budějovicích, v oboru molekulární cytogenetiky se zde školí doktorandi a vědci z Polska, Německa, Portugalska, Mexika a Kanady. Laboratoř udržuje mnohostranné a čilé mezinárodní styky s více než 20 pracovišti na světě. Od r. 1993 publikovali její členové na 200 prací s tzv. impakt faktorem mezinárodní vědecké databáze Web of Science (WoS), kapitoly v knihách a sbornících nepočítaje.