

Laboratorní ryby z vysychajících tůní 1. Úvod

Jen málo ryb dokáže přežít na suchu. Mezi ty, které to zvládnou, patří anuální halančici z čeledi Nothobranchiidae z Afriky a Rivulidae z Jižní Ameriky (řád halančíkovci – Cyprinodontiformes). Tyto drobné barevné rybky vyvinuly schopnost přestát vyschnutí svého habitatu – a to uvnitř jikry. Pravidelné vysychání domovských tůní anuálních halančíků pak souvisí i s jejich přirozeně krátkou dobou dožití. A halančík tyrkysový (*Nothobranchius furzeri*) se stal právě díky vrozené extrémní krátkověkosti modelovým druhem pro výzkum stárnutí. V sérii 6 kapitol bychom rádi ukázali možnost širšího uplatnění těchto neobvyklých ryb pro experimentální práci. V úvodním dílu představíme témata výzkumu vývoje, ekologie a evoluce anuálních halančíků, kterému se náš tým na Ústavu biologie obratlovců Akademie věd ČR (ÚBO) věnuje.



Pod označením laboratorní či pokusné zvíře si lze představit především modelové savce (myš *Mus musculus* a králík *Oryctolagus cuniculus*) nebo bezobratlé (octomilku *Drosophila melanogaster*, háďátka *Caenorhabditis elegans* a další). Škála modelových druhů, jejichž poznávání umožňuje pochopení obecných biologických dějů, je však nutně mnohem širší. Neexistuje jediný dokonalý modelový organismus a ani laboratorní myš se nehodí pro každou vědeckou otázku. Lze říct, že jednotlivé vědní disciplíny (např. molekulární biologie, neurovědy, srovnávací fyziologie i třeba vývojová biologie) mají své oblíbené „mazlíčky“. Těchto několik druhů ovšem neodráží rozmanitost otázek a směrů biologického výzkumu. A nejde jen o studovaný organismus, pokusy se zvířaty mohou probíhat i mimo laboratoř, a to jak v polopřirozených podmínkách, tak přímo ve volné přírodě. Cílem využití modelových organismů je rozšířit význam získaných poznatků daného druhu na rozsáhlejší skupinu a přispět k odhalení obecných zákonitostí platných pro různé organismy včetně člověka, fungování ekosystému a evolučních procesů. Anuální

1 Pár halančíka tyrkysového (*Nothobranchius furzeri*). Samci dorůstají větších rozměrů než samice a s nástupem dospělosti se výrazně vybarvují – na snímku červená forma podle barvy okraje ocasní ploutve. Foto R. Blažek

halančici, přestože jde o drobné ryby, plní v tomto ohledu čím dál významnější roli.

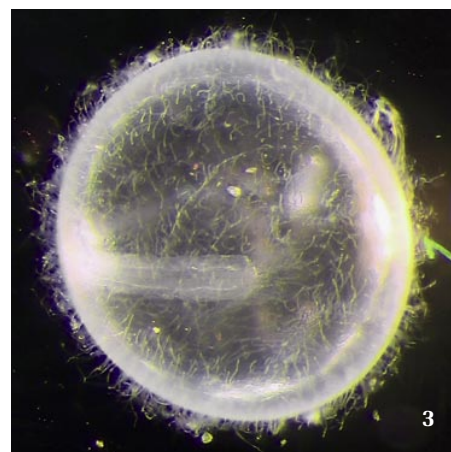
Naše výzkumná skupina založená na ÚBO Martinem Reichardem se zaměřuje na studium evoluční ekologie sladkovodních ryb. S přibývajícími členy se přirozeně tematicky rozrostla. Zajímají nás především evoluce životních strategií (od oplození přes rychlost růstu a dospívání, investic do rozmnožování až po stárnutí), vznik a vývoj diverzity (genetické rozmanitosti, strukturovanosti druhů a populací), ale i ekologické nároky a přizpůsobení jednotlivých druhů přírodním podmínkám a v neposlední řadě embryonální vývoj. Kombinujeme tak evoluční pohled (morfologické adaptace a genetické rozdíly) s ekologickým (studium podmínek prostředí a reakce na jeho změny) a vývojovým (rozmanitost a plasticita embryonálního vývoje). Nedílnou součástí našeho

výzkumu je zároveň optimalizace metod laboratorního chovu zahrnujících umělé oplození, podmínky embryonální inkubace, výživu a onemocnění ryb.

Anuální halančici mají řadu vlastností, které je činí velice užitečnými modelovými organismy. Tou nejzásadnější je, možná překvapivě, krátká doba dožití. Halančík tyrkysový je s doloženou maximální dobou dožití v zajetí pouhých 12 týdnů příkladem extrémně krátkověkého obratlovce (Cellerino a Valdesalici 2003). Prakticky až do naší první terénní expedice do jihoafrického Mosambiku v únoru 2008 byly ale rozšíření a přirozené životní podmínky tohoto pozoruhodného druhu neznámé. Původní italská studie byla zaměřena na populaci pocházející pravděpodobně z typové lokality druhu v národním parku Gonarezhou v Zimbabwe, dovezenou již v 70. letech minulého století. Mohla by být extrémní krátkověkost důsledkem dlouhodobého příbuzenského křížení (inbreedingu) nebo historických podmínek panujících na původní lokalitě, jako např. velmi slabého každoročního období dešťů? Ukázalo se mimo jiné, že v savanových tůních jižního Mosambiku je halančík tyrkysový poměrně běžným a hojným druhem. Naše navazující expedice pak již detailněji cílily na ekologii halančíka tyrkysového včetně jeho soužití s dalšími dvěma sympatrickými druhy anuálních halančíků. Ze základních zjištění v přírodě průběžně vyvstávaly zásadní otázky, které bylo potřeba pokusně otestovat v kontrolovaných podmínkách – tou byla např. síla mezidruhových reprodukčních bariér nebo právě evoluce krátkověkosti. Populace řady druhů anuálních halančíků bylo už v té době možné získat od českých a zahraničních akvaristů. Velice brzy se nám ale podařilo dovést a založit chov ryb z konkrétních populací a s detailní znalostí podmínek na původní lokalitě. Můžeme tedy kombinovat výzkum volně žijících ryb s pokusy v akváriích. Přemostění poznatků z laboratoře a přírody je zásadní pro zasazení výsledků získaných v zajetí do širších souvislostí. Ekologii přírodních populací anuálních halančíků se podrobně věnoval v Živě už M. Reichard (2013, 6: 289–293). V následujících dílech tohoto seriálu se proto soustředíme na náš výzkum v laboratorních podmínkách během posledních přibližně 15 let.

Chování a reprodukční bariéry mezi druhy

Anuální halančici, především ti afričtí (Nothobranchiidae), se na první pohled vyznačují velkým množstvím pastelových barev. Týká se to hlavně samců, samice bývají barevně nevýrazné (obr. 1). Rozdíly ve zbarvení samců se tak stávají základním vodítkem pro popis nových druhů a slouží pak k jejich rozlišení. Zatím se nám ale stále nedaří zcela pochopit roli výrazného zbarvení v přírodě. U řady druhů zvířat představuje pohlavní dimorfismus výsledek partnerského výběru, který v důsledku může směřovat k hromadění genetických rozdílů mezi barevnými liniemi a ke vzniku nových druhů. Periodické tůně, v nichž se halančici přirozeně vyskytují, bývají ovšem často mléčné zakalené. Navíc mohou tyto tůně doslova hostit rybožravé



ptáky. Výrazně zbarvení samci halančíků tak představují snadnou kořist.

V tůních obývaných více druhy může teoreticky docházet k mezidruhovému křížení. Zjevně zde ale fungují reprodukční bariéry, protože jinak bychom časem nebyli schopni jednotlivé druhy rozlišit. Studium partnerského chování ukazuje, že samice halančíka tyrkysového si vybírají partnera svého druhu spolehlivěji na základě čichu než zraku, který je pro ně spíš zavádějící. Rozhodujícím momentem pro pohlavní výběr je akt rozmnožování, tedy tření. Sílu mezidruhových bariér lze vysledovat na základě počtu a oplozenosti nakladených jiker, jejich následného přežívání, líhnutí, životaschopnosti a plodnosti potomstva. U anuálních halančíků můžeme v zajetí získat mezidruhovým křížením plodné potomstvo. Dříve nebo později se ale začínají objevovat morfologické a fyziologické odchylky, které přispívají k tomu, že hybridní jedinci i jejich populace nemají dlouhého trvání (více v příštím dílu Chování a mezidruhové reprodukční bariéry).

Zbarvení samců anuálních halančíků může vyvolávat agresivitu ostatních samců (obr. 2), a to nejen vlastního druhu. Mezi samci se v akváriu vytváří hierarchická struktura založená především na dominanci větších jedinců. Vyhocení jejich soubojů se může dokonce podílet na vychylování poměru pohlaví v zajetí i v přírodních populacích směrem k početnějším samicím. Rybožraví ptáci v tomto ohledu bezpochyby také hrají roli. Velmi zajímavou souvislostí mezi predací ptáky a chováním ryb je přirozená parazitace motolicí rodu *Apatemon* (řád Diplostomida). Tato motolice napadá lebeční dutinu meziphostitelské ryby a zvyšuje šanci na její ulovení. Infikovaný halančík se vystavuje u hladiny, případně nad ni vyskakuje. Umožní tak motolici dokončit její vývojový cyklus.

Přežití sucha a diapauza

Období sucha může představovat pro anuální halančíky velmi dlouhou etapu života. Lépe řečeno pro jejich embrya, protože dospělci s vyschnutím tůně hynou. Embrya čelí během svého vývoje extrémním podmínkám. Postupem evoluce se s nimi tato halančíci vypořádali přizpůsobením jikerných obalů (filamenty na obalu jikry a modifikovaný chorion, obr. 3). Přežití několikaměsíčního období vyžaduje také značnou úsporu energie. Po celou

dobu sucha, trvajícího někdy i více než rok, závisí embrya na limitovaném zdroji energie – žloutku. Toto omezení vyústilo v jejich schopnost výrazně zpomalit metabolismus a vstoupit do dormance, přesněji diapauzy. Laboratorní výzkumy ze 70. let odhalily u anuálních halančíků systém tří diapauz, naše nedávné poznatky však ukazují, že jejich vývoj může být ještě o něco složitější (více v třetím dílu Přežití sucha a diapauza).

I přes výše zmíněná přizpůsobení dochází během období sucha k významné mortalitě embryí. Každodenní produkce jiker je vzhledem k velikosti těla samic halančíků 3–4 cm ohromná – denně nakladou desítky jiker velkých 1 mm. Z našich terénních výzkumů ale víme, že množství jiker v substrátu a následně juvenilů v tůni nebývá nijak závratné. Do napršené tůně se vylíhnou pouze ti nejlépe přizpůsobení, a ještě musejí mít notnou dávku štěstí. Odhadnout nejhodnější chvíli k ukončení diapauzy je totiž pro embrya i s příchodem dešťů poměrně těžké. Může se stát, že i když se tůň vodou naplní, zanedlouho při nedostatku srážek zase vyschne, a nedospělí halančíci tak hynou. Právě s nepředvídatelností doby trvání tůně by mohl souviset vývojový bet-hedging (česky asi nejlépe rozložení sázek nebo nesázet vše na jednu kartu). V rámci jediné snůšky můžeme totiž v laboratorních podmínkách pozorovat rozrůznění délky vývoje embryí s ohledem na vstup do diapauzy nebo její přeskočení (přímý vývoj). Podle dosavadních poznatků vstup nebo přeskočení diapauzy do určité míry ovlivňuje samice už před nakladením jiker. Zajistí si tím, že aspoň část jejich potomků přežije a rozmnoží se. Na druhou stranu se diapauza (vstup, její délka, výstup) ukazuje být plastickou a odráží okolní podmínky (o regulaci diapauzy více v třetí části seriálu). Význam embryonálního „rozložení sázek“ v přirozeném prostředí anuálních halančíků je však stále nejasný. Velmi zajímavé je, že vstup nebo přeskočení diapauzy může mít dopad v dospělosti konkrétní ryby a souviset třeba i s rychlostí stárnutí.

Zrychlená životní historie a stárnutí

Časová vymezenost aktivní fáze života anuálních halančíků od vylíhnutí po vyschnutí představuje mezi obratlovci poměrně unikátní evoluční aspekt (u suchozemských obratlovců patří k podobně neobvyklým krátkověkým rekordmanům anuální madagaskarský chameleon *Furci-*

fer labordi s délkou života 4–5 měsíců). Během několika měsíců mezi naplněním a vyschnutím tůně se musejí ryby stihnout vylíhnout, dospět a rozmnožit (obr. 5–8). Před vyschnutím nemají sice možnost nikam uniknout, ale vyhnuly se alespoň konkurenci jiných druhů ryb. Životní strategie anuálních halančíků je plně nastavena na efektivní využití krátkodobých zdrojů. Vždyť halančík tyrkysový z jižního Mosambiku může v přírodě dospět a rozmnožit se po pouhých 14 dnech od vylíhnutí a podobnou rychlost lze pozorovat i v podmínkách akvariálních chovů (podrobněji ve čtvrtém dílu Zrychlená životní historie a stárnutí).

Jak jsme již uvedli, jde o jednoho z nejdříve umírajících obratlovců vůbec. Mezi jednotlivými populacemi existují rozdíly v přirozené době dožití, které jsou do velké míry vrozené. Doba dožití mimo jiné závisí na tom, zda populace pochází z oblasti s nižším nebo vyšším úhrnem srážek. Je ale zároveň modulována dalšími životními podmínkami, např. teplotou. Stihnou anuální halančíci vůbec zestárnout? Evoluce stárnutí představuje jeden z našich stěžejních výzkumných směrů.





2 Výstražný postoj dvou samců halančíka tyrkysového (červené a žluté formy), kdy se snaží zastrašit protivníka roztažením nepárových ploutví a kožní řasy na skřelích. Při souboji může docházet ke zraněním, nebo dokonce i smrti jednoho ze soupeřů.

Foto R. Blažek

3 Referenční morfologické stadium s patrnou tělní osou, kdy embrya anuálních halančíků vstupují do klidového stadia – diapauzy. Na povrchu jikerných obalů si lze povšimnout filamentů, bránících těsnému přilnutí bahna k jikře.

4 Pro potřeby experimentů často chováme halančíky individuálně. Nemusíme tak ryby značit a poskytneme jim standardizované podmínky, kterých při chovu ve skupině nelze dosáhnout. Podmínky zajetí se v mnoha ohledech liší od jejich přirozeného prostředí vysychajících savanových tůň (srovnejte s následujícími snímky 5–8). Na fotografii je průtočný systém se 70 nádržemi, s jednotkou udržující stálou teplotu vody, s filtrací a UV lampou, která napomáhá čištění vody.

5 až 8 Průběh vysychání tůně obývané halančíky v subtropické savaně jižního Mosambiku může být velmi rychlý. První snímek (obr. 5) byl pořízen týden po naplnění tůně sezonními dešti (průměr dosahoval okolo 3 m). Po dvou týdnech od zaplavení jsme zde již lovili dospívající plně vybarvené samce halančíka tyrkysového (6). O další týden později ale byla tůň již prakticky bez vody (7). Ve vyschlém bahně do příští sezony dešťů přežívají už pouze embrya anuálních halančíků (8). Snímky: M. Vrtílek, pokud není uvedeno jinak

Jedním z parametrů stárnutí je délka a kvalita rozmnožování. A anuální halančíci i přes úvodní nárůst plodnosti po dospívání, který je pro ryby typický, dosáhnou chvíle, kdy počet jiker a jejich kvalita klesá. Nabízí se proto otázka možného dopadu stárnutí na další generaci, a tedy něco jako vliv rodičovského stárnutí na potomstvo (blíže čtvrtý díl).

Standardizace a manipulace podmínek laboratorního chovu

Kontrolované podmínky chovu v zajetí jsou základním kamenem pro úspěšnost a výpovědní hodnotu studií. Chov anuálních halančíků není úplně jednoduchý a v řadě ohledů se výrazně odlišuje od nejčastěji studovaného rybího modelu – dánia pruhovaného (*Danio rerio*, čeleď Cyprinidae, řád máloostní – Cypriniformes). Standardizované stabilní podmínky přinášejí obecně pro chov zvířat z volné přírody mnoho výzev. Vypořádat se s nimi často musejí přímo výzkumníci. V tomto ohledu lze řadu poznatků o anuálních halančících čerpat od komunity akvaristů. Optimalizace laboratorních chovů ale i tak vyžaduje velkou dávku úsilí věnovaného standardizaci při větším množství ryb, např. sanitace, potravy, léčebných postupů nebo vedení záznamů o zdravotním stavu, případně udržování genetických linií. Je třeba si také uvědomit, že dlouhodobé držení přírodních populací v zajetí s sebou nese určitou formu domestikace a nezáměrné selekce. Přece jen jsou laboratorní podmínky v mnoha ohledech dramaticky odlišné od prostředí vysychající tůně (obr. 4). Anuální halančíci tolerují velké rozpětí kvality a teploty vody. Ukazuje se ale např., že stabilní teplota nemusí být pro jejich přežívání tím nejlepším. Potravní

nároky těchto rychle rostoucích ryb je poměrně obtížné v umělé dietě vhodně vyvážit (blíže v pátém dílu). I přes tato specifika se halančík tyrkysový postupně šíří napříč laboratořemi celého světa. Anuální halančíci představují velmi přitažlivou skupinu díky možnosti sledovat a ovlivňovat stárnutí v řádu měsíců. Embryonální diapauza zároveň usnadňuje plánování experimentů a jejich takřka „instantní“ použití.

Cílem našeho seriálu je seznámit širší odbornou veřejnost s anuálními halančíky, především halančíkem tyrkysovým, a jejich uplatněním v laboratorních podmínkách. Chceme poukázat na obrovský potenciál při zkoumání pestré škály biologických fenoménů. Rádi bychom nabídli i menší výhled do budoucna v laboratorním výzkumu této skupiny ryb – např. na pokračující studium mezidruhových bariér, možnosti cíleného umělého výběru, regulace diapauzy a na její dopad na život anuálních halančíků nebo význam negenetické dědičnosti (více v závěrečné části Shrnutí a výhled). Získané poznatky mohou být významné nejen pro biomedicínu, ale i ochranu těchto pozoruhodných obratlovců. V přírodě jižního Mosambiku a dalších rozvíjejících se zemí (např. Nagy a Watters 2022) je osud řady populací anuálních halančíků ohrožen urbanizací a také intenzifikací zemědělství.

Tento článek vznikl za podpory Grantové agentury ČR (projekt 22–21198S).

Seznam použité a doporučené literatury uvádíme na webové stránce Živý.