

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD

Optimalizace šoku hydrostatickým tlakem u lososovitých ryb

Autoři

M. Flajšhans, V. Kašpar, M. Hubálek

č. 199

Vodňany 2023

ISBN 978-80-7514-184-2

Vydání a tisk metodiky je uskutečněno za finanční podpory projektu:

Obsahová část metodiky je výsledkem řešení výzkumných projektů:

Výsledky byly získány za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky – projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QK22020041 Aplikace nových poznatků genetiky a genomiky k produkci vysoce užitkových triploidních populací ryb ke zvýšení užitkovosti a kvality tržního produktu. – 100 %

Obsah

1. CÍL METODIKY	
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	
2.1 Úvod	
2.2 Typy triploidizačních šoků a jejich proměnné	
2.3 Stanovení rychlosti vývoje zygoty v závislosti na teplotě vody	
2.4 Příprava generačních ryb, vlastní výtěr, aktivace a oplození jiker	
2.4.1 Inkubace jiker od jejich promytí do začátku šoku	
2.5. Technologická sestava pro indukci triploidie šokem hydrostatickým tlakem	
2.5.1 Obecný metodický postup indukce triploidie šokem hydrostatickým tlakem	
2.5.2. Indukce triploidie šokem hydrostatickým tlakem u pstruha duhového	
2.5.3. Indukce triploidie šokem hydrostatickým tlakem u pstruha obecného	
2.5.4. Indukce triploidie šokem hydrostatickým tlakem u sivena amerického	
2.6. Opatření během inkubace jiker a odchovu plůdku	
2.7. Ověření triploidie rozplavaného plůdku	
2.7.1. Příprava vzorků z nativní tkáně	
2.7.1. Fixace a příprava vzorků z fixované tkáně	
2.8. Srovnání úspěšnosti triploidizace šokem hydrostatickým tlakem s jinými typy šoků	
3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY	
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	
7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	

1. CÍL METODIKY

Cílem předkládané metodiky je podat rybářské praxi návod na optimální postup k indukci triploidie u komerčně významných druhů lososovitých ryb pro akvakulturu tzv. tlakovým šokem, neboli působením zvýšeného hydrostatického tlaku na oplozené jikry v době potřebné k zadržení druhého pólóvého tělíska při nejvhodnějším nastavení všech tří proměnných tohoto šoku ve vztahu k teplotě vody, v níž jsou drženy generační ryby, a v níž probíhá oplození v podmínkách běžného provozu. Návrh takového energeticky nenáročného a mobilního zařízení k provádění šoku hydrostatickým tlakem u ryb byl registrován Úřadem průmyslového vlastnictví ČR již v roce 2012 (Flajšhans a kol., 2012) a od roku 2020 je tato technologie na Fakultě rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích pro chovatele po domluvě k dispozici.

Tato metodika vychází z výsledků a dat zveřejněných ve vědeckých publikacích a ověřených autorským kolektivem v praxi pro tři komerčně významné druhy lososovitých ryb, pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), pstruha obecného (*Salmo trutta* L.) a sivena amerického (*Salvelinus fontinalis* Mitchell, 1815).

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1 Úvod

Triploidizace (indukovaná triploidie) ryb blokováním oddělení druhého pólóvého tělíska během II. fáze meiózy krátce po oplození jiker je metodou používanou v rybářství a akvakultuře k inhibici vývoje pohlavních orgánů a k produkci substerilních/sterilních jedinců u hospodářsky významných druhů ryb nadřádu Teleostei (Piferrer a kol., 2009; Benfey, 2011; Fraser a kol., 2012; Arai a Fujimoto, 2019). Triploidní ryby mají ve svých buňkách tři sady chromozómů, které se nemohou na rozdíl od dvou sad chromozómů v buňkách diploidních ryb ve stadiu zygotene v profázi I správně párovat (Carrasco a kol., 1998; Cuñado a kol., 2002), což ovlivňuje meiotické dělení a brání rovnoměrné segregaci chromozómů do gamet triploidních ryb (Felip a kol., 2001). Tento jev bývá popisován jako „meiotická neshoda“, „meiotický mišmaš“, apod. Následkem meiotické neshody mohou být gonády triploidních ryb retardované, zůstávají po celý život v raných vývojových fázích (Benfey, 1999; Felip a kol., 2001) a ryby jsou sterilní. Tento jev se zpravidla projevuje silněji u samic, které si tak stále zachovávají juvenilní vzhled (Benfey, 2011). V některých případech mohou triploidní ryby produkovat gamety, které jsou vlivem meiotické neshody aneuploidní, tedy s neúplným počtem chromozómů a neschopné po oplození generovat životaschopné potomstvo (Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2010). Tento jev se zpravidla silněji projevuje u samců některých druhů ryb a takové ryby jsou považovány za substerilní/funkčně sterilní (Piferrer a kol., 2009; Benfey, 2011).

Metoda triploidizace se nejvíce používá v zahraniční akvakultuře lososovitých ryb (Chavanne a kol., 2016), a to především u pstruha duhového v USA, Kanadě, Francii, Japonsku, Velké Británii, Jižní Koreji, Íránu, Turecku, Polsku a Chile a u lososa obecného (*Salmo salar* L.) v Norsku, Kanadě a Chile. Podle Chavanna a kol. (2016) bylo také u pstruha duhového 7 z 10 evropských plemenářských programů zaměřeno na tržní produkci triploidů a na produkci monosexních populací. U lososa obecného byly podle týchž autorů na tržní produkci triploidů zaměřeny 2 ze 7 evropských plemenářských programů. Z dalších druhů lososovitých ryb se

triploidizace využívá u pstruha obecného ve Velké Británii a Francii, u sivena amerického v Kanadě, USA a Francii, u sivena severního (*Salvelinus alpinus* L.) ve Francii, Rakousku, na Islandu a v Kanadě. Z pacifických lososů rodu *Oncorhynchus* se triploidizace využívá například v Kanadě u lososa gorbůši (*O. gorbuscha* Walbaum, 1792), lososa kety (*O. keta* Walbaum, 1792), lososa kisuč (*O. kisutch* Walbaum, 1792) a lososa čavyči (*O. tshawytscha*, Walbaum, 1792) a v Japonsku u lososa masu (*O. masou* Brevoort, 1856).

Podle přehledové studie Piferrera a kol. (2009) triploidní ryby vykazují následující výhody: kontinuální růst (jelikož neinvestují energii do reprodukce a reprodukčního chování; rovněž se předpokládá změněná genomická heterozygotnost), sníženou agresivitu a mortalitu spojenou s obdobím reprodukce běžných diploidů, vyrovnanou kvalitu tržního produktu. U triploidů s vyšší genomickou heterozygotností, kdy triploidní trojití heterozygoti (*abc*) mají výhodu fitness proti diploidním heterozygotům (*ab*, *bc*), se očekává vyšší životaschopnost (Beaumont, 2000). V případě úniku farmově chovaných triploidů nebo jejich vysazování do sportovních revírů sterilita spojená s triploidním statutem brání křížení se zbytkovými divokými populacemi, tudíž i genetickému impaktu na tyto populace. V některých evropských státech tak jsou do volných vod a rybářských sportovních revírů vysazováni výhradně triploidi. Jejich další výhodou, kvůli níž se triploidní lososovití do sportovních revírů v Evropě i v Severní Americe vysazují, je růst do trofejních velikostí. V souvislosti s klimatickými změnami a oteplováním vody byla ve sportovních rybářských revírech států na západě USA v posledních desetiletích zaznamenávána protiproudová migrace pstruha duhového do výše položených lokalit, které mu dříve teplotně nevyhovovaly, a jeho přirozená hybridizace se zde žijícími endemickými pstruhy (např. pstruhem žlutohrdlým, *Oncorhynchus clarkii* a jeho poddruhy) chráněnými zákonem o ohrožených druzích (*Endangered Species Act, ESA*) za vzniků životaschopných hybridů. Americké státy Aljaška, Washington, Montana, Oregon, Idaho, Nevada, Utah a Kalifornie tak do těchto revírů v současnosti vysazují pouze sterilního triploidního pstruha duhového (Kofzky a kol., 2006).

Samostatnou kapitolou je záměrná produkce triploidních mezidruhových hybridů lososovitých ryb. Důvodem může být lepší přežití, růst a odolnost vůči nemocem u F_1 hybridu než u čistých rodičovských druhů nebo atraktivnější vzhled F_1 hybridu pro zákazníka. Výčet možných produkčních triploidních hybridů mezi druhy uvnitř rodů *Salmo*, *Salvelinus*, *Oncorhynchus* a mezi nimi se již dostává mimo zaměření této metodiky a zájemce lze odkázat na práce Chevassus a kol. (1983), Gray a kol. (1993), Bartley a kol. (2000), Arai (2001), Oke a kol. (2015), Fraser a kol. (2022) a další.

2.2 Typy triploidizačních šoků a jejich proměnné

Současné metody získávání triploidních populací ryb jsou založeny na aplikaci buď teplotního šoku nebo šoku hydrostatickým tlakem při zakládání každé generace. Obecně lze triploidii u ryb indukovat i s použitím mechanických a chemických šoků, nicméně mechanické šoky se ukázaly jako sporadicky účinné a působící vysokou mortalitu, zatímco použití chemických šoků není pro produkci ryb pro lidskou spotřebu v EU povoleno (Piferrer a kol., 2009). Jak shrnuli Flajshans a kol. (2013), uvažovaná alternativa křížení parentální tetraploidní generace s běžnými diploidy k produkci F_1 generace triploidů bez mortality působené šokem byla experimentálně ověřena (např. Chourrout a kol., 1986; Chourrout a Nakayama, 1987). Hörstgen-Schwark a kol. (1997) testovali rovněž užitkovost takto získaných triploidů u pstruha duhového a konstatovali podobnou výtěžnost jako u diploidních ryb. Problémem je však odchov tetraploidních rodičů pro jejich vysokou homozygotnost a citlivost vůči vnějším podmínkám, což spolu s nízkým přežitím tetraploidů limituje uplatnitelnost v rybářské praxi.

Recentně se této alternativě u pstruha duhového a sivena amerického věnovali Hershberger a Hostuttler (2005, 2007) a Weber a kol. (2015) s perspektivou budoucí selekce nejlepší tetraploidní linie pstruha duhového k následné produkci geneticky zlepšené triploidní tržní populace.

Teplotní šoky jsou buď chladové nebo teplé, založené na krátkodobém působení teploty o 15 °C až 18 °C nižší nebo vyšší, než je fyziologicky optimální teplota pro reprodukci daného druhu. Triploidizace teplotními šoky je považována za provozně a nákladově jednodušší, ale podle některých autorů (Benfey, 2009; Nagler, 2019; Flajšhans a kol., 2020) méně spolehlivou alternativu, která nevede spolehlivě k 100% masové indukci triploidie, protože cílové teploty není dosaženo synchronně u všech jiker.

Naproti tomu šoky hydrostatickým tlakem jsou považovány za šetrnější k ošetřeným jikrám a mohou vést k rutinní 100% triploidizaci, protože cílový tlak se v tlakové komoře šíří rovnoměrně (Benfey, 2011; Nagler, 2019). Z tohoto důvodu jsou tlakové jednotky s tlakovými komorami o vnitřním objemu od jednoho až do dvaceti litrů používány pro indukci triploidie u lososovitých ryb prakticky ve všech výše zmíněných zemích, přičemž technická řešení používaných jednotek se různí. V praxi se můžeme setkat s jednotkami, které vysokého hydrostatického tlaku dosahují pomocí kompresoru, hydraulického lisu nebo měniče tlaku anebo případně kombinací takových řešení. Liší se i způsob nalévání/vylévání jiker do/z tlakové komory otvorem s klasickým závitem nebo demontovatelným čelem s bajonetovým závitem, a liší se zpravidla i celková hmotnost tlakové jednotky a možnosti její mobility a nároky na další technické zázemí pro její použití.

Každý šok je charakterizován třemi proměnnými a kombinace jejich hodnot je zásadní k dosažení maximálního počtu triploidních jedinců v potomstvu a maximálního procenta přežití plůdku. Těmito proměnnými jsou a) čas začátku šoku jako doba uplynulá od okamžiku, kdy byly po oplození gamety aktivovány vodou nebo oplozovacím roztokem do okamžiku, kdy jsou oplozené jikry (zygoty) vystaveny šoku; b) intenzita šoku neboli teplota či úroveň hydrostatického tlaku; c) délka šoku jako doba vystavení jiker tomuto šoku. Optimalizace jednotlivých proměnných pro každý druh ryby zůstává stále nedořešenou otázkou, neboť jsou považovány za druhově specifické (Piferrer a kol., 2009; Benfey, 2009) nebo alespoň specifické pro vyšší taxony (rod, čeleď) s podobným fyziologickým rozpětím teplot pro reprodukci. Zatímco závislost expoziční doby a intenzity šoku je nepřímo úměrná (s vyšší intenzitou stačí kratší expoziční doba), začátek šoku většina autorů řeší standardizací inkubační teploty do této doby. U lososovitých ryb se obvykle počítá se standardní inkubační teplotou 10 °C, ale to v praktických podmínkách může být podle teplotního průběhu sezóny teplota příliš vysoká, protože generační ryby mohou být na farmách v době reprodukce drženy ve vodě o teplotě nižší, a to 2–8 °C. Ojedinelé práce (např. Preston et al., 2013) u pstruha obecného ukazují, že teplotní odchylka o 2–4 °C od standardu může vést až k 8% rozdílu v líhivosti i množství dosažených triploidů. Tato optimalizace je v metodice dále rozpracována pro pstruha duhového a sivena amerického právě pro technologii šoků hydrostatickým tlakem, která je v ČR dostupná teprve druhým rokem. Přehled dosud publikovaných proměnných u šoku hydrostatickým tlakem použitého k indukci triploidie u lososovitých ryb shrnuje tab. 1.

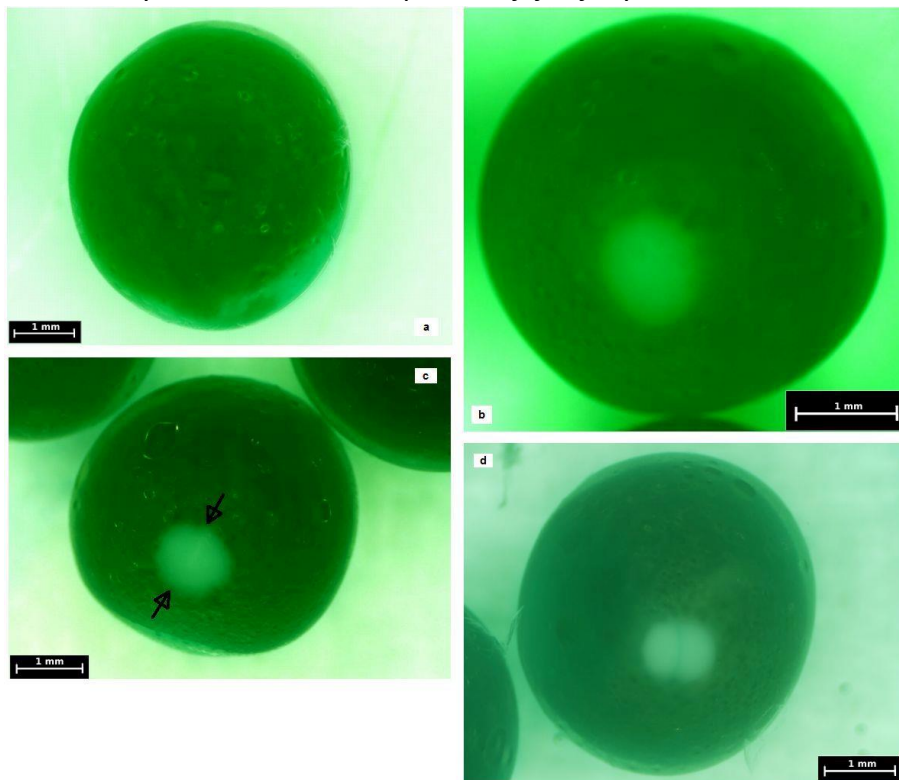
Tab. 1. Proměnné šoku hydrostatickým tlakem pro indukci triploidie u sladkovodních lososovitých ryb, inkubační podmínky, dosažená oplozenost, líhnivost a úspěšnost indukce triploidie, publikované jednotlivými autory. Jednotky PSI (pounds per square inch) jsou libry na čtvereční palec.

Druh	Tlak v orig. jednotkách	Přepočet na MPa	Teplota inkubace do šoku (°C)	Začátek šoku (°min)	Začátek šoku (min. s)	Délka šoku (min. s)	Teplota inkubace jiker (°C)	Oplozenost (%)	Líhnivost (%)	% 3n	Autoři
siven obrovský, <i>Salvelinus namaycush</i>	65500 kPa	65,5	11,5	300	26 min 52 s	5	10,6				Kofzkay a kol. (2005)
siven americký, <i>Salvelinus fontinalis</i>	62053 kPa	62,05		200		5				100	Benfey a kol. (1997)
	9500 PSI	65,5	7,5	300	40	5		59		100	Kofzkay a kol. (2006)
	9500 PSI	65,5	10	325	32,5	5			43	100	Wlasow a kol. (2014)
	9500 PSI	65,5	10	225	22,5	5			16,6	100	Wlasow a kol. (2014)
	646 atm	65,5	10	200	20	5		83,9	83,37	100	Havelka a kol. (2014)
	66000 kPa	66	9	315	35	5	9			100	Lahnsteiner a kol. (2020)
	9500 PSI	65,5	10	300	30	5	6 - 8	85,2	75,4	100	Jagiello a kol. (2021)
	65500 kPa	65,5	6,8	200,6	29,5	5					O'Donnell a kol. (2017)
siven severní, <i>Salvelinus alpinus</i>	65500 kPa	65,5		225						100	O'Keefe a Benfey (1995)
	65500 kPa	65,5		300						100	O'Keefe a Benfey (1995)
	65500 kPa	65,5		320		5		90 % kontroly		100	Gillet a kol. (2001)
siven umbla, <i>Salvelinus umbla</i>	66000 kPa	66	9	270	30	5		96	81	100	Lahnsteiner a Kletzl (2018)
pstruh obecný jezerní, <i>Salmo trutta lacustris</i>	66000 kPa	66	9	360	40	5		99	84	100	Lahnsteiner a Kletzl (2018)
pstruh obecný potoční, <i>Salmo trutta fario</i>	10000 PSI	68,9	6	300	50	8 min 20 s			72	97,8	Preston a kol. (2013)
	10000 PSI	68,9	8	300	37 min 30 s	6 min 15 s			79,1	96,7	Preston a kol. (2013)
	10000 PSI	68,9	10	300	30	5			80,1	100	Preston a kol. (2013)
lipan podhorní, <i>Thymallus thymallus</i>	9000 PSI	62,05	10	200	20	5	10		63,2	67	Hliwa a kol. (2021)
lipan sibiřský, <i>Thymallus arcticus</i>	8500 PSI	58,6	4	175	44	5	4		73,5 až 79,6	100	Loopstra a Hansen (2010)
	9500 PSI	65,5	4	175	44	5	4		73	100	
pstruh duhový, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	9500 PSI	65,5		400		5				100	O'Keefe a Benfey (1995)
	10000 PSI	68,9	11,1	300	27	5			59,45	100	Couture a kol. (2007)
	9500 PSI	65,5	11,4	376,2	33	5		90		100	Kofzkay a kol. (2006)
	9500 PSI	65,5		375		5			88,9	99	Loopstra a Hansen (2008)
	9500 PSI	65,5		400		5				100	Yesaki a kol. (1996)

2.3 Stanovení rychlosti vývoje zygoty v závislosti na teplotě vody

Rychlost raného vývoje zygoty se s teplotou vody mění nelineárně (Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013), přičemž tato změna má parabolický charakter. Zásadním okamžikem pro úspěšné načasování začátku šoku pro indukci triploidie je postižení 2. fáze meiotického dělení, kdy se depolymerací tubulinových vláken vřeténka zabrání oddělení 2. pólového tělíska, ale tuto fázi vývoje nejde na jikře jednoduše pozorovat. Proto, kromě výše uvedené standardizace inkubační teploty na dobu od aktivace gamet po začátek šoku, přišli izraelští autoři N. Cherfas, G. Hulata a B. Gomelsky s originálním postupem přepočtu optimálního času začátku šoku při nestandardní inkubační teplotě s pomocí údaje o délce mitotického cyklu τ_0 (*tau nula*; Detlaff a Detlaff, 1961) a tuto metodu s úspěchem použili u kaprovitých ryb (Gomelsky a kol., 1989; Cherfas a kol., 1990 a další).

Obdobou délky jednoho mitotického cyklu τ_0 je interval prvního rýhování (z angl. *the first cleavage interval*, FCI) jako doba od aktivace gamet do okamžiku, kdy 50 % jiker (zygot) ze vzorku dosáhne v daném čase při dané teplotě vody prvního rýhování, přičemž tuto fázi lze na jikrách lososovitých ryb snadno pozorovat. Kritérium navrhli Hershberger a Hostuttler (2005) na základě prací s populacemi pstruha duhového v USA původně ke zpřesnění začátku šoku pro indukci tetraploidie. Jikry beze známek zárodečného disku (blastodisku) (obr. 1a) se hodnotí jako neoplozené a nezapočítávají se ani mezi oplozené jikry, ani do hodnoty FCI ze vzorku. Stejně tak se do hodnoty FCI nezapočítávají jikry s vytvořeným blastodiskem bez známek dělení (obr. 1b), ale mezi oplozené jikry se započítávají. Mezi oplozené jikry a zároveň do hodnoty FCI ze vzorku se započítávají jak jikry, u nichž blastodisk vykazuje zřetelnou



Obr. 1. Jikry sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*) po oplození, fixované v Davidsonově fixativu: a) neoplozená jikra; b) oplozená jikra s vytvořeným blastodiskem ještě bez známek dělení; c) počátek prvního rýhování - blastodisk již vykazuje zřetelnou ekvatoriální rovinu dělení označenou šipkami; d) jikra s dokončeným prvním rýhováním. Měřítko 1 mm (Foto M. Flajšhans).

ekvatoriální rovinu dělení (obr. 1c), tak jikry již se zřetelnou rýhou dělí blastodisk na dvě stejné blastomery (obr. 1d) vůči všem oplozeným jikrám ze vzorku. Dobu od aktivace gamet do dosažení dané hodnoty FCI při dané teplotě vody lze vyjádřit jako součin teploty a času v minutových stupních ($^{\circ}\text{min}$). Příklad hodnocení FCI u pstruha duhového při 6, 8 a 10 $^{\circ}\text{C}$ je znázorněn na obr. 2.

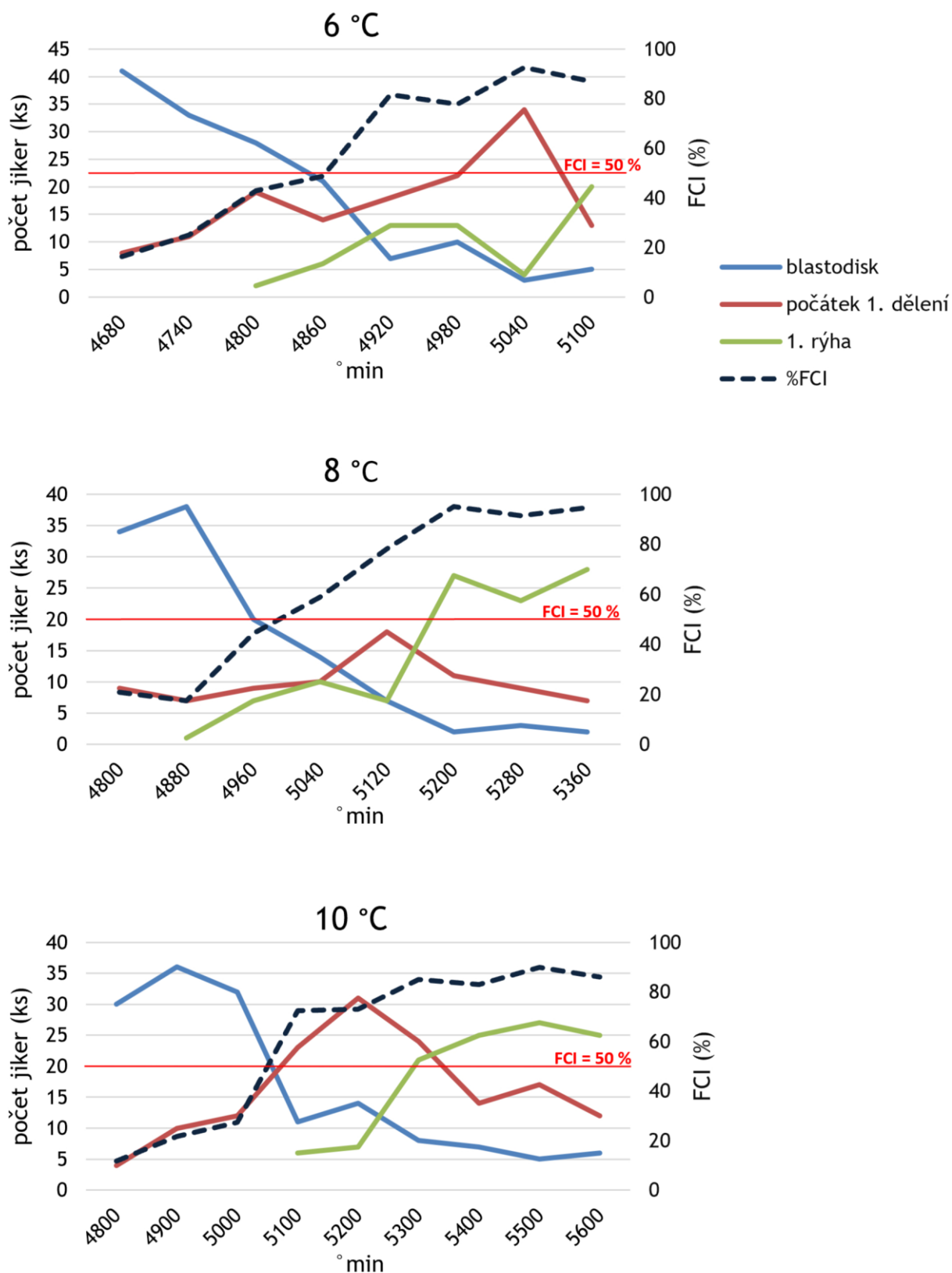
Postup hodnocení FCI u daného druhu, plemene nebo populace lososovité ryby může být následující:

- Připraví se rozvrh teplot a časové osy vzorkování (tab. 2), z něj se vypočte počet vzorků, spotřeba fixativa a délka pokusu. Jednotlivé vzorky se odebírají do uzavíratelných epruvet nebo zkumavek, např. do 15 ml falkonek lze odebírat cca. po 50 jikrách.
- Předem se připraví Davidsonovo modifikované fixativum podle Hershbergera a Hostuttlera (2005), sestávající na 1 l fixativa ze:
200 ml formaldehydu
100 ml glycerolu,
300 ml etanolu
100 ml kyseliny octové
300 ml destilované vody.
Ke zlepšení vizualizace rýhování jiker se podle Webera a kol. (2015) na 1 l fixativa dále přidává 150 mg metylénové modři.
- Skříňové inkubátory (např. modely řady Q-Cell; Pol-Lab, Polsko) se předem vytemperují na požadovanou teplotu, do nich se pak budou vkládat nádoby s oplozenými jikrami v inkubační vodě.
- V inkubátorech je zároveň temperována zásoba vody, která bude použita k aktivaci gamet a k inkubaci jiker.
- Po umělém výtěru a smísení gamet se provede jejich aktivace vodou nebo aktivačním roztokem o dané teplotě (čas 0). V čase 3 min po aktivaci se jikry promyjí vodou o dané teplotě a umístí v nádobě s vodou do inkubátoru.
- Měří se čas a v dobu danou časovou osou vzorkování (viz tab. 2) se v 10 min intervalech odebírá vzorek cca. 50 jiker, které se umístí do popsané epruvety nebo zkumavky a zalije Davidsonovým fixativem. Po uzavření se epruveta nebo zkumavka obrátí dnem vzhůru a zpět, aby se jikry neslepily a fixativum se dostalo ke všem jikrám. Uzavřené zkumavky lze skladovat ve stojánku při pokojové teplotě.
- V laboratoři se fixované jikry propláchnou vodovodní vodou od fixativa a barviva, přemístí na Petriho misku s čistou vodou. Pod binokulární lupou se hodnotí jednotlivé jikry podle vývojových stadií a jejich počet se zaznamenává.
- Hodnotí se oplozenost v % jako počet oplozených jiker [(jiker s blastodiskem + jiker na počátku prvního rýhování + jiker s dokončenou první rýhou) : celkovým počtem jiker] x 100
- Hodnotí se FCI v % jako [(počet jiker na počátku prvního rýhování + jiker s dokončenou první rýhou) : počtem oplozených jiker] x 100.
- Hledaná hodnota je $\text{FCI} \geq 50 \%$ při daném součinu teploty a času v $^{\circ}\text{min}$.

- Optimální čas začátku šoku se vyjádří jako podíl FCI. Při inkubační teplotě 10 °C byl 50% FCI pro pstruha duhového plemene PdD 75 shledán v 5050 °min. Čas začátku šoku 300 °min po aktivaci je $(300 : 5050) \times 100$, a tedy 5,94 % FCI.

Tab. 2. Příklad časové osy vzorkování ke stanovení FCI při raném vývoji jiker lososovitých ryb paralelně v 10, 8 a 6 °C.

čas aktivace gamet v 10 °C			čas aktivace gamet v 8 °C			čas aktivace gamet v 6 °C		
8:00			8:00			8:00		
10 °C			8 °C			6 °C		
kód na epruvetu	čas od aktivace gamet (h:min)	čas vzorkování (h:min)	kód na epruvetu	čas od aktivace gamet (h:min)	čas vzorkování (h:min)	kód na epruvetu	čas od aktivace gamet (h:min)	čas vzorkování (h:min)
10-630	6:30	14:30						
10-640	6:40	14:40						
10-650	6:50	14:50						
10-700	7:00	15:00						
10-710	7:10	15:10						
10-720	7:20	15:20						
10-730	7:30	15:30						
10-740	7:40	15:40						
10-750	7:50	15:50						
10-800	8:00	16:00						
10-810	8:10	16:10						
10-820	8:20	16:20						
10-830	8:30	16:30	8-830	8:30	16:30			
10-840	8:40	16:40	8-840	8:40	16:40			
10-850	8:50	16:50	8-850	8:50	16:50			
10-900	9:00	17:00	8-900	9:00	17:00			
10-910	9:10	17:10	8-910	9:10	17:10			
10-920	9:20	17:20	8-920	9:20	17:20			
10-930	9:30	17:30	8-930	9:30	17:30			
10-940	9:40	17:40	8-940	9:40	17:40			
10-950	9:50	17:50	8-950	9:50	17:50			
10-1000	10:00	18:00	8-1000	10:00	18:00			
10-1010	10:10	18:10	8-1010	10:10	18:10			
10-1020	10:20	18:20	8-1020	10:20	18:20			
10-1030	10:30	18:30	8-1030	10:30	18:30			
10-1040	10:40	18:40	8-1040	10:40	18:40			
10-1050	10:50	18:50	8-1050	10:50	18:50			
10-1100	11:00	19:00	8-1100	11:00	19:00			
			8-1110	11:10	19:10			
			8-1120	11:20	19:20			
			8-1130	11:30	19:30	6-1130	11:30	19:30
			8-1140	11:40	19:40	6-1140	11:40	19:40
			8-1150	11:50	19:50	6-1150	11:50	19:50
			8-1200	12:00	20:00	6-1200	12:00	20:00
			8-1210	12:10	20:10	6-1210	12:10	20:10
			8-1220	12:20	20:20	6-1220	12:20	20:20
			8-1230	12:30	20:30	6-1230	12:30	20:30
			8-1240	12:40	20:40	6-1240	12:40	20:40
			8-1250	12:50	20:50	6-1250	12:50	20:50
			8-1300	13:00	21:00	6-1300	13:00	21:00
						6-1310	13:10	21:10
						6-1320	13:20	21:20
						6-1330	13:30	21:30
						6-1340	13:40	21:40
						6-1350	13:50	21:50
						6-1400	14:00	22:00
						6-1410	14:10	22:10
						6-1420	14:20	22:20
						6-1430	14:30	22:30
						6-1440	14:40	22:40
						6-1450	14:50	22:50
						6-1500	15:00	23:00
						6-1510	15:10	23:10
						6-1520	15:20	23:20
						6-1530	15:30	23:30
						6-1540	15:40	23:40
						6-1550	15:50	23:50
						6-1600	16:00	0:00
						6-1610	16:10	0:10
						6-1620	16:20	0:20
						6-1630	16:30	0:30
						6-1640	16:40	0:40
						6-1650	16:50	0:50
						6-1700	17:00	1:00



Obr. 2. Hodnocení intervalu prvního rýhování (FCI, %) u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) plemene PdM s jarním výtěrem při 6, 8 a 10 °C. Legenda je shodná pro grafy při všech třech teplotách.

2.4 Příprava generačních ryb, vlastní výtěr, aktivace a oplození jiker

V této a dalších částech metodika navazuje na předchozí metodiky týkající se způsobů osemenění, oplození a provádění dalších kroků umělé reprodukce a konkrétními příklady a novějšími možnostmi na starší metodiky a technologie autorského kolektivu, týkající se indukce polyploidie u ryb.

V předvýtěrovém období jsou ryby sloveny a umístěny do venkovních manipulačních nádrží, průtočných kanálů nebo nádrží v líně, kde se pravidelně kontroluje jejich připravenost k výtěru. V době, kdy u samic (jikernaček) dochází k samovolnému uvolňování jiker při mírném tlaku na břicho, přistupuje se k umělému výtěru. Hormonální stimulace generačních pstruhů a sivenů se zpravidla neprovádí. Švinger a Kouřil (2012) hormonální stimulaci lososovitých doporučují jako alternativu k akceleraci nebo synchronizaci ovulace.

Anestezie generačních ryb před výtěrem se obvykle provádí preparáty MS 222, 2-phenoxyethanolem nebo hřebíčkovým olejem na základě metodických pokynů Kolářové a kol. (2012).

Jikry jsou vytírány separátně od každé samice do suché misky včetně ovariální tekutiny nebo do sítka, odkud jsou jikry po odkapání ovariální tekutiny převedeny do suché misky. V provozní praxi se používají oba způsoby, ale např. u pstruha duhového je potvrzeno, že přítomnost ovariální tekutiny (plazmy) během oplozování zlepšuje pohyblivost spermií (Kholodnyy a kol., 2021). V průběhu realizace našich experimentů se také potvrdilo, že přítomnost ovariální plazmy měla pozitivní vliv na pohyb spermií a podle subjektivního pozorování při provozním výtěru zvyšovala počet pohybujících se spermií a prodlužovala délku jejich pohybu. Kvalita jiker se kontroluje zrakem na přítomnost bílých nebo rozpadlých jiker, shluků jiker apod. V takovém případě jikry vyřadíme. Sperma každého samce (mlíčka) je odebíráno do suché připravené plastové kádinky a pohyblivost spermií může být kontrolována pod běžným světelným mikroskopem.

Oplození se provádí klasickou německou metodou. Pro provozní výtěry je vhodné provádět semi-heterospermické oplozování podle Kocoura a kol. (2012). V takovém případě se smíchají jikry všech samic při zachování adekvátních objemů jiker, a po opatrném promísení se směs jiker rozdělí do menších nádob na tolik dílů, aby na každý díl připadlo sperma maximálně pěti samců. Je-li tedy k dispozici sperma 25 samců, směs jiker se rozdělí na 5 dílů. Rovněž se doporučuje používat stejné objemy spermatu jednotlivých samců při podobných parametrech kvality spermatu. Tento postup sníží následky kompetice spermií a zároveň může zajistit vhodnější genetickou variabilitu takto založeného potomstva. Doporučuje se používat poměr 3 ml semi-heterospermatu na 100 ml jiker a gamety aktivovat vodou v maximálně dvojnásobku objemu jiker.

Pro tvorbu užitkových obsádek, kde chovatele zajímá především množství získaného potomstva, a to i na úkor jeho genetické variability, se používá heterospermické oplození (Kocour a kol., 2012), tj. osemenění směsí jiker spermatem všech samců. Výhodou tohoto postupu může být díky velkému množství použitého spermatu velmi dobrá oplozenost jiker, ale snížená genetická variabilita může za určitých podmínek vést i k vyšší mortalitě ryb. Při tomto postupu se směs jiker od různých samic oplozuje v dávce 3 ml heterospermatu na každých 100 ml jiker, s aktivací vodou v množství maximálně dvojnásobném vůči objemu jiker.

V obou případech se aktivace provádí okamžitě po osemenění vodou z líhně, ideálně o podobné teplotě jako voda, v níž byly drženy generační ryby až do výtěru. Pokud se teplota vody na generačních rybách blíží 6 °C, temperuje se na 6 °C voda k aktivaci gamet, promytí jiker a inkubaci zygot do začátku šoku. V této teplotě se oplozené jikry uchovávají na miskách do promytí. Pokud bude následovat umělá indukce triploidie, čas aktivace gamet je zaznamenán jako čas 0 min. Pokud se teplota vody na generačních rybách blíží 8 nebo 10 °C, temperuje se i voda k aktivaci gamet, promytí jiker a inkubaci zygot do začátku šoku na tuto teplotu.

V čase 2–3 min od aktivace gamet je nutné jikry promýt vodou z líhně, opět ideálně o teplotě 6, 8 nebo 10 °C, tedy hodnotě blízké teplotě vody, v níž byly drženy generační ryby do výtěru. Promytí se opakuje, aby byly jikry zbaveny veškerých zbytků spermatu a odstraněna jejich nepatrná lepkavost.

2.4.1 Inkubace jiker od jejich promytí do začátku šoku

K inkubaci jiker od jejich promytí do začátku šoku slouží inkubační žlab nebo vaničky s vodou, do nichž se vkládají inkubační vložky. Teplotu vody ve žlabech nebo vaničkách je třeba opět temperovat pomocí termostatů (např. 2 kW závěsných termostatů Julabo, JULABO GmbH, Německo) na hodnotu blízkou teplotě vody, v níž byly drženy generační ryby. Naopak, je-li teplota vyšší, než je žádoucí, lze vodu chladit přidáním šupinkového ledu. Při montáži závěsného termostatu je třeba dbát na to, aby směr proudění vody z čerpadla termostatu nebyl obrácen přímo na jikry, resp. na sítko v inkubační vložce (viz obr. 3). U citlivějších druhů ryb jako např. u sivena amerického by přímý proud vody na jikry přispíval ke zvýšení mortality oplozených jiker. Čas aktivace gamet je zaznamenán jako čas 0 a zapne se časoměřič (stopky), který odměřuje čas do začátku šoku podle druhu ryby a použité teploty vody. Po celou dobu chráníme jikry před přímým slunečním svitem, a to prací pod střechem, v zastíněném prostoru apod.



Obr. 3. Vanička s inkubační vložkou s oplozenými jikrami pstruha obecného potočního k jejich uchování do začátku šoku. Na bočním lemu vložky jsou položeny stopky odměřující čas od aktivace gamet do začátku šoku. Za vložkou je vidět montáž závěsného termostatu na bok vaničky. Modrá šipka naznačuje směr výtoku vody z termostatu (Foto M. Flajšhans).

2.5. Technologická sestava pro indukci triploidie šokem hydrostatickým tlakem

Technologická sestava pro indukci triploidie šokem hydrostatickým tlakem vychází z prototypu chráněného užitným vzorem Úřadu průmyslového vlastnictví ČR, č. 23378 (Flajšhans a kol., 2012), jehož plnou verzi popsali Flajšhans a kol. (2020). Výrobce je SZDT, s.r.o. (Servis záchranné a dýchací techniky) v Lišově, ČR. Jedná se o mobilní tlakovou jednotku, schopnou ošetřit najednou až 3,5 litru oplozených jiker hydrostatickým tlakem až 70 MPa (700 barů). K práci je potřeba přívod vody z vodovodu, přívod elektřiny 3 x 2 kW a pracovní plocha cca. 2 m², ať již pod střechou nebo ve venkovních prostorách (obr. 4).

Celá tlaková jednotka je připojena ke zdroji vody, která plní tlakovou komoru společně s tlakovým vzduchem. Samotná tlaková jednotka se skládá ze zdroje tlakového vzduchu (běžné potápěčské láhve s tlakem až 20-30 MPa (200-300 bar), ze kterých se tlakový vzduch přes redukční ventil dostává do vysokotlakého kompresoru (násobiče tlaku). Odtud je přes trojcestný ventil s přesným manometrem (až 100 MPa; 1 000 bar) stlačený atmosférický vzduch dodáván vysokotlakou hadicí do tlakové komory vyplněné vodou s ošetřovanými jikrami. Ovládání tlakové jednotky je buď manuální nebo v případě potřeby počítačem řízené.

Po rozebrání lze celou tlakovou jednotku převážet osobním vozidlem typu combi nebo pickup. V současné době disponuje tým Laboratoře molekulární, buněčné a kvantitativní genetiky FROV JU třemi velikostmi tlakových komor:

- silnostěnnou o vnitřním objemu 1 l pro experimentální (maloobjemové) indukce triploidie (obr. 5a)
- silnostěnnou o vnitřním objemu 3 l pro poloprovozní a provozní indukce triploidie
- tlakovou láhev o vnitřním objemu 7 l pro provozní indukce triploidie (obr. 5b).



Obr. 4. Ukázka technologické sestavy pro indukci triploidie šokem hydrostatickým tlakem pro práci v terénu. Vlevo mimo stan zásobní láhve se stlačeným vzduchem, na paletách vysokotlaký kompresor s pojistným ventilem, vysokotlakými hadicemi, redukčním ventilem a násobičem, uprostřed tlaková láhev (komora) v ochranném nerezovém plášti. Vzádu a vpravo inkubační vaničky s vložkami a termostaty pro řízenou inkubaci jiker do začátku šoku (Foto M. Flajšhans).



Obr. 5. a) silnostěnná tlaková komora o vnitřním objemu 1 l pro experimentální maloobjemové indukce triploidie; b) vlevo silnostěnná tlaková komora o vnitřním objemu 3 l pro poloprovozní a provozní indukce triploidie a vpravo v ochranném plášti z nerezové oceli tlaková láhev o vnitřním objemu 7 l pro provozní indukce triploidie. Všechny tři tlakové komory jsou umístěny v nerezových stojanech s aretací, které umožňují po provedeném šoku tlakovou komoru ve stojanu vyklonit a ošetřené jikry s vodou vylít (Foto M. Flajšhans).

Výhodou silnostěnných tlakových komor je téměř nulová roztažnost při vysokém tlaku, a tedy nízká spotřeba tlakového vzduchu. Další výhodou je pak kvalitní povrchová úprava, která umožňuje dokonalé vyprázdnění nádob a jejich dokonalé čištění. Široké víko nádoby s metrickým závitem lze v případě potřeby demontovat za účelem vyčištění vnitřního prostoru (obr. 6). Jejich nevýhodou je ale vysoká hmotnost při manipulaci a přenášení. Výhodou tlakové láhve je naopak nižší hmotnost a nevýhodou je vyšší roztažnost při vysokém tlaku s vyšší spotřebou tlakového vzduchu, koroze vnitřního povrchu lahve a životnost láhve normovaná na 20 použití (při expozici tlaku 60 – 68 MPa; 600-680 bar).



Obr. 6. Obě silnostěnné tlakové komory (s vnitřním objemem 3 l i 1 l) v průběhu výroby v SZDT, s.r.o. v Lišově. Vedle komor jsou demontovaná (vyšroubovaná) horní víka. Na maloobjemové tlakové komoře vpravo je i částečně vyšroubované dno. Tyto úpravy umožňují úplné vyčištění vnitřního prostoru komory v případě, že by v ní byly ošetřeny nedokonale odlepkované jikry (Foto M. Flajšhans).

2.5.1 Obecný metodický postup indukce triploidie šokem hydrostatickým tlakem

- Před umělým výtěrem generačních ryb se celá technologická sestava zkompletuje, připojí na vodovodní vodu z řádu, připojí na přívod elektřiny 220 V a tlakovou hadicí se přes redukční ventil připojí zásobní láhev stlačeného vzduchu. Celá sestava se odzkouší na těsnost a požadovaný tlak buď manuálním spínačem nebo přes připojený notebook pomocí softwarové aplikace. Tlak se poté jehlovým ventilem odpustí na 0 MPa (0 barů) a ventil se opět uzavře. Pak se odpojí vysokotlaková hadice od tlakové komory, komora se vylije, zaaretuje a je připravena k použití.
- Připraví se další nádoba (vanička) s vodou temperovanou na teplotu 6, 8 nebo 10 °C (dále jen stanovená teplota), tedy stejnou jako teplota vody použité k aktivaci gamet a inkubaci jiker do začátku šoku. Tato voda slouží k vytemperování tlakové komory, doplnění tlakové komory po naplnění jikrami a k jejímu proplachování.
- Po oplození se stopkami měří čas od aktivace gamet do začátku šoku (viz. část 2.4.1).
- Začátek šoku je dán druhem ryby a inkubační teplotou (viz části 2.5.2 až 2.5.4)
- Pět minut před plánovaným začátkem šoku se do tlakové komory odlije cca. 0,5 l vody (nebo méně, podle zvoleného typu komory) o stanovené teplotě.
- Jikry se přeplavením z inkubační vložky převedou do nádoby s vodou o stanovené teplotě a pomocí nálevky se přelijí do tlakové komory (obr. 7a).
- Komora se poté dolije vodou o stanovené teplotě a pomocí šroubení se připojí vysokotlaková hadice. Vzhledem k tomu, že šroubení jsou vybavena gumovými těsníci O-kroužky, není nutné spoje dotahovat velkou silou.
- V čase 15 s před začátkem šoku se jednotka začne tlakovat manuálním spínačem, případně pokynem v dodané softwarové aplikaci. Cílové intenzity hydrostatického tlaku se dosahuje během 15 s.
- Expoziční doba (délka šoku) je opět dána druhem ryby a inkubační teplotou (viz části 2.5.2 až 2.5.4).

- Po uplynutí expoziční doby se tlak jehlovým ventilem odpustí na 0 MPa (0 bar), vysokotlaková hadice se odpojí od tlakové komory, komora se odaretuje, nakloní ve stojanu, jikry se vypustí do nádoby s vodou (obr. 7b) a opět převedou do vložek na inkubačních žlabech nebo na inkubační aparáty v líhni.
- Po vylití jiker je vhodné do tlakové komory nalít 1–2 l vody a vypláchnout ji přes sítko pro kontrolu, zda v tlakové komoře nezbyly nějaké jikry.



Obr. 7. a) tlaková komora opatřená nálevkou k naplnění jikrami; b) vylévání ošetřených jiker z tlakové komory po skončeném šoku. Operátoři jsou maskováni ochrannými prostředky dýchacích cest (pandemie Covid-19) (Foto M. Flajšhans (vlevo) a M. Pumpr (vpravo)).

2.5.2. Indukce triploidie šokem hydrostatickým tlakem u pstruha duhového

Autorské zkušenosti s optimálními parametry šoku, dosaženou oplozeností, líhnivostí a úspěšností indukce triploidie u pstruha duhového shrnuje tab. 3. Podle výsledků provozní indukce triploidie jsou vysoké hodnoty % oplozenosti, % líhnivosti a % indukovaných triploidů dosahovány, jestliže šok začíná v 375 až 400 °min po aktivaci gamet, tedy po 37,5 až 40 min při teplotě inkubace jiker 10 °C.

Tab. 3. Hodnoty teplot vody, parametry šoku hydrostatickým tlakem (začátek, intenzita a expoziční doba), zjištěná % oplozenosti a líhnivosti kontrolních a triploidizovaných skupin, a efektivita indukce triploidie u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), zjištěná autory v poloprovozních podmínkách pstruhařství. Jikry byly inkubovány v modifikovaných Zugských lahvích s bočním spodním přívodem vody přes difuzér.

Skupina	kontrola	tlak 1	tlak 2
Kategorie triploidizace	provoz	provoz	provoz
T vody u ryb (°C)	10	10	10
T inkubace do šoku (°C)	10	10	10
Objem ošetřených jiker (l)	2,5	2,5	2,5
Doba do začátku šoku (min)	-	37,5	40
Doba do začátku šoku (°min)	-	375	400
Hydrostatický tlak (MPa)	-	65	65
Expoziční doba (min)	-	5	5
Oplozenost (%)	99,62	96,75 ± 1,73	97,80 ± 0,21

Líhivost (%)	88,74	81,84 ± 0,38	82,84 ± 2,25
Vzorek plůdku na analýzu ploidie(ks)	40	40	40
Efektivita indukce 3n (%)	-	100	100

2.5.3. Indukce triploidie šokem hydrostatickým tlakem u pstruha obecného

Optimální parametry šoku, dosaženou oplozenost, líhivost a úspěšnost indukce triploidie u pstruha obecného f. potoční shrnuje tab. 4. Podle výsledků poloprovozní a provozní indukce triploidie jsou vysoké hodnoty % oplozenosti, % líhivosti a 100 % indukovaných triploidů dosahovány, jestliže šok začíná v 300 °min po aktivaci gamet a hydrostatický tlak je v rozmezí 68,8–69,5 MPa (688–695 barů).

Tab. 4. Hodnoty teplot vody, parametry šoku hydrostatickým tlakem (začátek, intenzita a expoziční doba), zjištěná % oplozenosti a líhivosti kontrolních a triploidizovaných skupin, a efektivita indukce triploidie u pstruha obecného f. potoční (*Salmo trutta* L.), zjištěná autory v poloprovozních a provozních podmínkách pstruhařství. Jikry byly inkubovány na Rückel-Vackových aparátech.

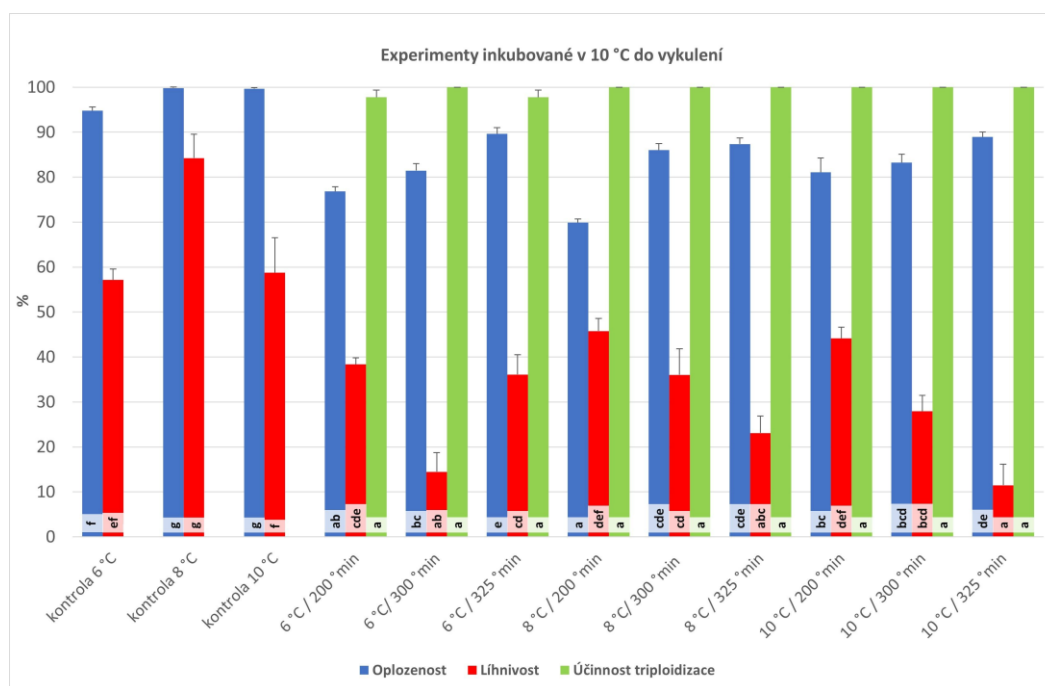
Skupina	Kontrola 1, 2	Tlak 1	Tlak 2–6	Kontrola 1–4	Tlak 1–4
Kategorie triploidizace	provoz	provoz	provoz	poloprovoz	poloprovoz
T vody u ryb (°C)	6,3	6,3	6,3	5,8	5,8
T inkubace do šoku (°C)	8	8	8	8	8
Objem ošetřených jiker (l)	2 x 2,5	2,5	5 x 2,5	4 x 1,5	4 x 1,5
Doba do začátku šoku (min)	-	37,5	37,5	-	37,5
Doba do začátku šoku (°min)	-	300	300	-	300
Hydrostatický tlak (MPa)	-	68,7	68,8 – 69,5	-	69,2 – 69,5
Expoziční doba (min)	-	6,25	6,25	-	6,25
Prům. oplozenost (%)	99,8	77,9	88,98	96,53	90,28
Prům. líhivost (%)	89,2	60	76,09	91,83	86,12
Vzorek plůdku na analýzu ploidie (ks)	60	30	150	30	90
Efektivita indukce 3n (%)	-	96,7	100	-	100

2.5.4. Indukce triploidie šokem hydrostatickým tlakem u sivena amerického

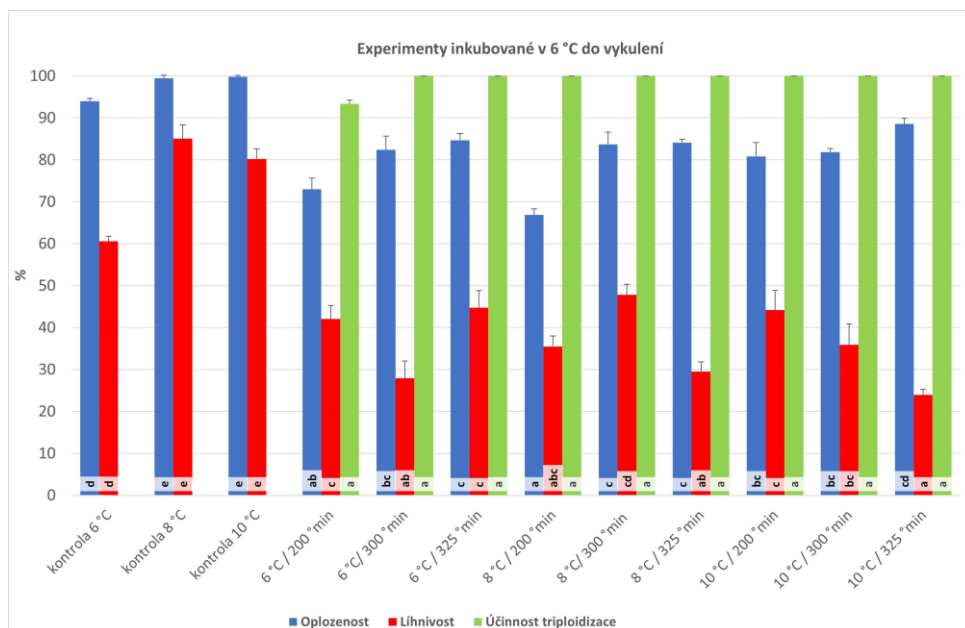
Jednotlivé parametry šoku, zejména jeho začátek v °min v závislosti na výchozí teplotě pro inkubaci jiker od oplození do začátku šoku byly autorským týmem podrobně zkoumány v sérii experimentů, stejně jako další možný vliv teploty inkubace jiker po šoku až do vykulení plůdku. Tyto výsledky ilustrují grafy na obr. 8 a 9. Především lze konstatovat, že všechny použité parametry přinesly jen zanedbatelné rozdíly v účinnosti (efektivitě) triploidizace, která byla vysoká a pohybovala se mezi 96,7 a 100 %. Z výsledků dále vyplývá, že nejvyšší % oplozenosti při inkubaci jiker do vykulení v 10 °C bylo dosaženo při šocích po 325 °min ve všech třech testovaných teplotách inkubace jiker od oplození do začátku šoku (6, 8 a 10 °C), ale nejvyšší % líhivosti bylo dosaženo při šocích po 200 °min ve všech třech testovaných teplotách inkubace

jiker od oplození do začátku šoku, viz obr. 8, zatímco při inkubaci jiker do vykulení v 6 °C bylo podobné % líhnivosti ve všech třech testovaných teplotách inkubace jiker od oplození do začátku šoku také dosaženo při šocích po 200 °min (obr. 9).

Optimální parametry šoku, dosaženou oplozenost, líhnivost a úspěšnost indukce triploidie u sivena amerického podle poloprovozních a provozních výsledků shrnuje tab. 5. Ve shodě s výše uvedenými experimentálními výsledky jsou uspokojivé hodnoty % oplozenosti, % líhnivosti a 100 % indukovaných triploidů poloprovozně a provozně dosahovány při začátku šoku v 200 °min.



Obr. 8. Výsledky experimentu s kombinací výchozí teploty vody pro inkubaci jiker od oplození do začátku šoku a začátku šoku v °min, hodnoty % oplozenosti a líhnivosti, a účinnost triploidizace (% triploidů). Experimentální kombinace byly inkubovány do vykulení v 10 °C. Hodnoty s abecedně odlišnými indexy (při základně grafu) se statisticky významně lišily na hladině pravděpodobnosti $P < 0,05$.



Obr. 9. Výsledky experimentu s kombinací výchozí teploty vody pro inkubaci jiker od oplození do začátku šoku a začátku šoku v °min, hodnoty % oplozenosti a líhivosti, a účinnost triploidizace (% triploidů). Experimentální kombinace byly inkubovány do vykvení v 6 °C. Hodnoty s abecedně odlišnými indexy (při základně grafu) se statisticky významně lišily na hladině pravděpodobnosti $P < 0,05$.

Tab. 5. Hodnoty teplot vody, parametry šoku hydrostatickým tlakem (začátek, intenzita a expoziční doba), zjištěná % oplozenosti a líhivosti kontrolních a triploidizovaných skupin, a efektivita indukce triploidie u sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*), zjištěná autory v poloprovozních a provozních podmínkách pstruhařství. Jikry byly inkubovány v desetilitrových Kannengieterových lahvích do očních bodů, po vyřídění mrtvých jiker dolíhnuty na inkubačních aparátech.

Skupina	Kontrola 1-5	Tlak 1-5	Kontrola 1-4	Tlak 1-4
Kategorie triploidizace	provoz	provoz	poloprovoz	poloprovoz
T vody u ryb (°C)	6,2	6,2	7	7
T inkubace do šoku (°C)	10	10	8	8
Objem ošetřených jiker (l)	4 x 3	5 x 3	4 x 1,5	4 x 1,5
Doba do začátku šoku (min)	-	20	-	37,5
Doba do začátku šoku (°min)	-	200	-	300
Hydrostatický tlak (MPa)	-	65,5 – 66,0	-	65,0 – 65,6
Expoziční doba (min)	-	5	-	5
Prům. oplozenost (%)	93,98	80,42	97,56	80,47
Prům. líhivost (%)	89	66,7	50,53	43,16
Vzorek plůdku na analýzu ploidie (ks)	50	150	120	120
Efektivita indukce 3n (%)	-	100	-	100

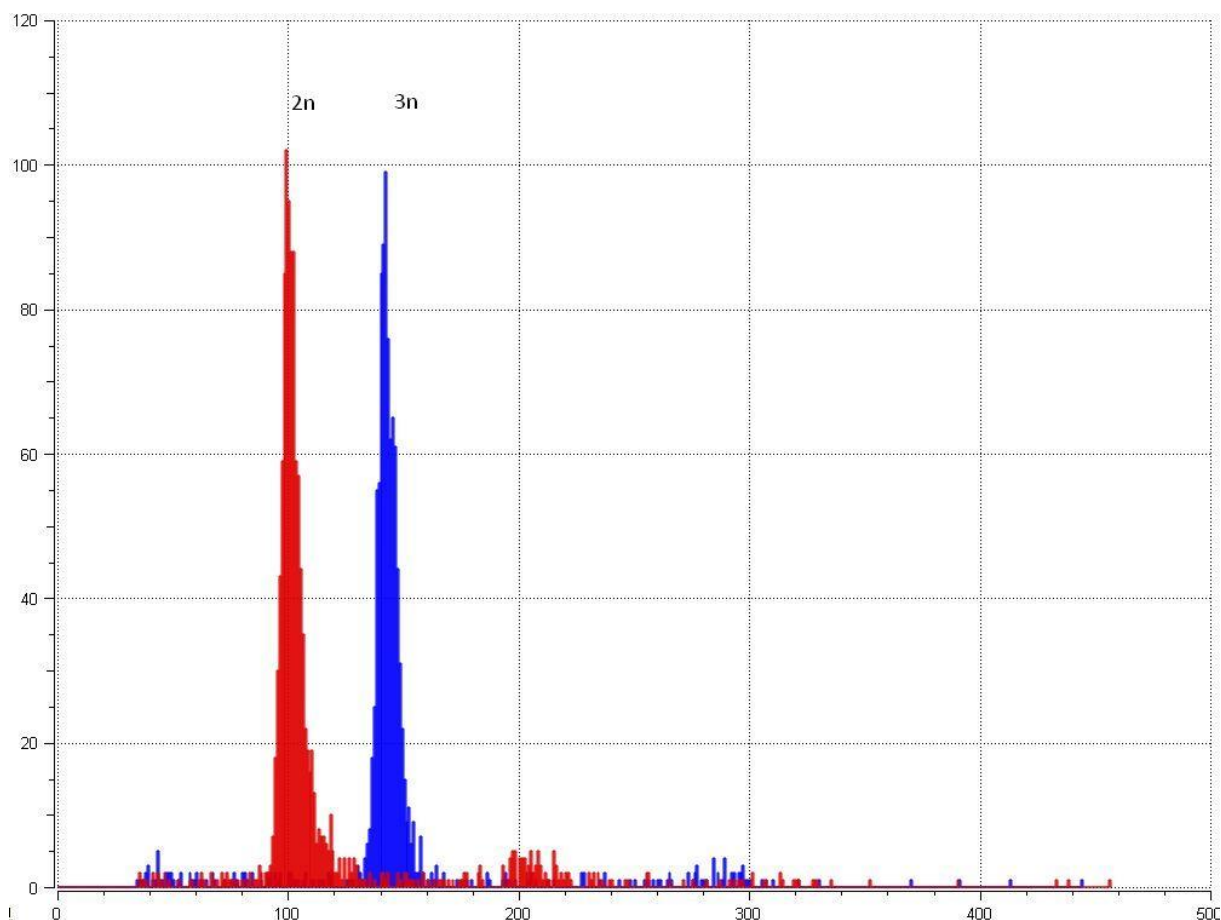
2.6. Opatření během inkubace jiker a odchovu plůdku

Jikry se inkubují podle místních zvyklostí na Rückel-Vackových inkubačních aparátech, v McDonaldových nebo Kannengieterových lahvích, v upravených Zugských lahvích s bočním spodním přívodem vody přes difuzér, ve vertikálních inkubátorech apod.

V prvních týdnech po oplození je třeba počítat s extrémní citlivostí vyvíjejících se jiker na otřesy a silné světlo. Při inkubaci jiker v lahvích je proto třeba upravit spodní přívod vody, aby mezi jikrami pouze vzlínala a jikrami nepohybovala. Desinfekce a protiplísňové koupele se provádějí podle místních zvyklostí. V různých typech lahví se jikry inkubují do stadia očních bodů a poté se převádějí na inkubační vložky ve žlabech. Zjišťována je: a) mortalita jiker do stadia očních bodů, b) relativní oplozenost ve stadiu očních bodů (%), c) počet vykuleného plůdku a relativní líhnivost (%), a d) účinnost triploidizace podle % triploidního plůdku ve vzorku.

2.7. Ověření triploidie rozplavaného plůdku

K ověření triploidní konstituce rozplavaného plůdku, a tedy k vyhodnocení účinnosti provedené triploidizace lze použít vzorek minimálně 30 ks plůdku jak z kontrolní skupiny, tak ze skupin(y) po indukci triploidie. Podle Flajšhanse a kol. (2013) k nejvhodnějším metodám ověření triploidie patří stanovení relativního obsahu DNA průtokovou cytometrií, tj. metodou založenou na uvolnění jednotlivých buněk plůdku z tkáně, permeabilizaci buněčné membrány, obarvení jaderné DNA specifickým fluorescenčním barvivem, které se na DNA váže, a na měření fluorescence emitované komplexem obarvené DNA. Výsledky jsou zobrazeny formou histogramu intenzity fluorescence v jádrech analyzované suspenze. Pro kontrolního diploidního jedince, který má dvě sady chromozómů, můžeme na průtokovém cytometru nastavit napětí na fotonásobiči (*Gain*) v lineárním režimu tak, aby se pík histogramu intenzity fluorescence zobrazil například na kanále 100. U triploidního jedince, který má tři sady chromozómů a tedy 1,5× více DNA než diploidní jedinec, se potom pík histogramu intenzity fluorescence zobrazí na kanále 150 (obr. 10).



Obr. 10. Překryté histogramy intenzity fluorescence buněčných jader ze suspenze tkání diploidního ($2n$, červený pik) a triploidního ($3n$, modrý pik) plůdku pstruha obecného f. potoční (*Salmo trutta* L.), obarvených 4', 6-diamidino-2-fenylindolem (DAPI) ke stanovení relativního obsahu DNA na průtokovém cytometru Partec CCA. Překrytí, tzv. histogram overlay bylo provedeno v software CYTO v.3 fy Wolf a Daniel, ČR.

Podle typu průtokového cytometru, který je k dispozici, se volí vhodné fluorescenční barvivo, jež se váže na jadernou DNA [např. 4', 6-diamidino-2-fenylindol (DAPI), propidium jodid (PI), SYBR Green, Hoechst aj.] (Hubálek, 2018). Další postup se bude lišit podle dostupného typu cytometru, vhodného fluoresceinu a příslušné sestavy reagensů. Uvádíme proto jen obecné zásady přípravy vzorků z nativní nebo fixované tkáně.

2.7.1. Příprava vzorků z nativní tkáně

U plůdku usmrčeného předávkováním CO_2 a přeneseného na hodinové sklo se odebere celá část trupu a ocasu odříznutím za žlutkovým váčkem a opláchne fyziologickým roztokem. Tkáň se přenesse do mikrozkušavky, do níž je předem napipetován pufr pro extrakci buněčných jader. Efektivního uvolňování buněk do pufru lze dosáhnout zpracováním připravovaného vzorku v mikrozkušavce pomocí ručního homogenizátoru (Pellet pestles cordless motor, Kimble, USA) po dobu přibližně 5 s. Výsledná suspenze je 10 min inkubována při pokojové teplotě a poté se do mikrozkušavky mikropipetou přidá fluorescein (např. 1 ml roztoku DAPI). Po promíchání za použití minitřepačky se suspenze buněk přefiltruje přes $30\mu\text{m}$ filtr nebo

uhelon o podobném rozměru ok do zkumavky nebo kyvety pro průtokovou cytometrii. Připravené vzorky se při pokojové teplotě analyzují na relativní obsah DNA průtokovým cytometrem. Rychlost průtoku buněčné suspenze komůrkou cytometru lze podle koncentrace částic v suspenzi doporučit na úrovni 0,2 až 0,4 $\mu\text{l.s}^{-1}$. Vzorky z normálního, kontrolního oplození (bez použití šoku) slouží jako diploidní kontrola.

U starších ryb lze ploidní úroveň stanovit toutéž metodou individuálně ze vzorku krevních buněk nebo ploutevní tkáně.

2.7.2. Fixace a příprava vzorků z fixované tkáně

Uskutečnit cytometrickou analýzu neprodleně po odběru vzorků plůdku nemusí být vždy možné, například pokud vzorkování probíhá v terénních podmínkách daleko od laboratorního zázemí, či v případě nutnosti analyzovat velké množství jedinců v identickém vývojovém stádiu. Na základě několikaletých zkušeností autorů této metodiky lze ve zmiňovaných případech doporučit modifikovanou podobu protokolu původně publikovaného Vindelovem a kol. (1983) k prodloužení uchovatelnosti biologických tkání jejich zmrazením v dimethylsulfoxid-citrátovém pufru podle Hubálka a Flajšhanse (2021). Jeden l pufru se připraví rozpuštěním 85,5 g sacharózy a 11,8 g citronanu sodného v 800 ml destilované vody, následným přidáním 50 ml dimethylsulfoxidu a doředěním destilovanou vodou do 1 l. Pufr se použije k naplnění 1,5 ml nebo 2 ml zkumavek (např. typu Eppendorf), do nichž je plůdek po usmrcení předávkováním CO_2 a osušení suchým ubrouskem jednotlivě přenášen. Plůdek lze vzorkovat rovněž skupinově, například s použitím 5 ml zkumavek pro 10 ks plůdku. Neprodleně po přenesení plůdku do pufru se zkumavky uzavřou a umístí na suchý led do předem připraveného termoboxu. Po dokonalém zmrazení jejich obsahu lze zkumavky přesunout do mrazáku udržujícího teplotu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, při dostatku suchého ledu je však vzorky v termoboxu možno ponechat až do uskutečnění analýzy. Dle zkušeností autorského kolektivu lze vzorky skladovat minimálně 6 měsíců, aniž by došlo k poklesu jejich měřitelnosti při následné analýze. Před samotným měřením na průtokovém cytometru se vzorky rozmrazí ve vodní lázni o teplotě $35\text{--}38\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rozmražený plůdek je poté přenášen na hodinové sklo a další postup se již nikterak neliší od přípravy vzorků z nativní tkáně, popsané v kapitole 2.7.1.

Stejně jako v případě nativních tkání, u starších ryb lze ploidní úroveň stanovit toutéž metodou individuálně ze vzorku fixovaných krevních buněk nebo ploutevní tkáně.

2.8. Srovnání úspěšnosti triploidizace šokem hydrostatickým tlakem s jinými typy šoků

Jak již bylo řečeno úvodem, triploidizaci teplým šokem lze považovat za méně spolehlivou, protože cílové teploty není dosaženo synchronně u všech jiker díky jisté teplotní setrvačnosti masy ponořených jiker a jejich odlišné měrné tepelné kapacitě, a úspěšnost triploidizace nevede rutinně k 100% masové indukci triploidie. Předchozí autorské práce s teplým šokem u pstruha duhového (Havelka a kol., 2012) a sivena amerického (Havelka a kol., 2014) shodně

konstatovaly, že použití teplého šoku vedlo k nižšímu % oplozenosti a líhnivosti, a k získání cca. 80 % triploidů z ošetřených jiker. U pstruha obecného konstatoval Vandeputte (2008), že oproti méně úspěšným předchozím experimentům různých autorů teprve práce Quillet a kol. (1991) přinesla úspěšnost triploidizace kolem 90 % a % líhnivosti srovnatelné s diploidní kontrolou. Nutno konstatovat, že rybářská praxe neřeší tepelnou výměnu mezi jikrami a vodou výpočtem kalorimetrické rovnice, nýbrž použitím nadbytku teplé vody k rychlému ohřevu jiker při šoku.

Šoky hydrostatickým tlakem jsou obecně považovány za šetrnější k ošetřeným jikrám, což vyplývá ze zákonů hydrauliky. Pascalův zákon říká, jestliže na kapalinu v uzavřené nádobě působí vnější tlaková síla, pak tlak v každém místě kapaliny vzroste o stejnou hodnotu. To platí i pro vodu v tlakové komoře a ošetření zvýšeným hydrostatickým tlakem může vést k rutinní 100 % triploidizaci, a autorský tým to ověřil pro všechny tři studované druhy lososovitých ryb. Lze tedy konstatovat ve shodě s předchozími pracemi Havelky a kol. (2012, 2014), že při dodržení stanovených parametrů je šok hydrostatickým tlakem s relativně krátkou expoziční dobou šetrnější k oplozeným jikrám a účinnější v indukci triploidie u těchto druhů než provozně jednodušší teplý šok.

3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Tlakový šok, čili šok zvýšením hydrostatického tlaku se na základě dosavadních výsledků jeví jako velmi perspektivní metoda k produkci triploidních ryb. Tato metodika poskytuje nejnovější přehled o možnostech využití moderní mobilní tlakové jednotky pro indukci triploidie u lososovitých ryb v podmínkách pstruhařské praxe pro zefektivnění produkce triploidů k dalšímu využití jak v produkci tržních ryb, tak i pro vysazování do rybářských revírů tam, kde sterilita nebo substerilita triploidů zabránila genetickým dopadům na zbytkové původní populace nebo alespoň tyto dopady omezí.

Metodika navazuje konkrétními příklady a novějšími možnostmi na předchozí metodiky věnující se problematice a metodickému postupu při srovnání teplého šoku a šoku hydrostatickým tlakem u pstruha duhového a sivena amerického (Havelka a kol., 2012 a 2014) s použitím původního prototypu tlakové jednotky (Flajšhans a kol., 2012). Předkládaná metodika vychází z dosud nepublikovaných výsledků poloprovozních a provozních ověření úspěšnosti triploidizace šokem hydrostatickým tlakem v různých pstruhařských provozech ČR (pstruhařství Annín, Klatovské rybářství a.s.; pstruží líheň Vazovec, MO ČRS Turnov; rybí farma Bušanovice; rybí farma Jelenka, Janovice nad Úhlavou). Metodika se rovněž opírá o poznatky několikaletého výzkumu meiotických poruch gametogeneze a biologie takto vzniklých polyploidních ryb, optimalizace biotechnologických reprodukčních postupů v rámci projektu projektu MŠMT ČR č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007370 Biodiverzita. Většina z těchto poznatků byla publikována v odborných vědeckých časopisech.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Výsledky zpracované formou certifikované metodiky budou dostupné odborné veřejnosti. Mají potenciál zvýšit diversifikaci akvakulturní produkce a zefektivnit produkci lososovitých ryb v provozních podmínkách české akvakultury. Předpokládá se zvýšení konkurenceschopnosti českých producentů lososovitých ryb vůči dovozům ze zahraničí a snížení jejich závislosti na dovozu triploidních jiker ze zahraničí, zefektivnění produkce, snížení nákladů, uplatnění místních populací a plemen lososovitých ryb. Perspektivou je rovněž rozšíření nabídky trhu o nový typ produktu s přidanou hodnotou (triploidní pstruh o velké tržní hmotnosti, tzv. lososového typu). Nabízí se i potenciál pro vysazování sterilních ryb pro management sportovních revírů a volných vod.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Metodika je zaměřena na zavádění provozně efektivní a k oplozeným jikrám šetrnější triploidizace lososovitých ryb, poloprovozní ověřování tohoto postupu v ČR ve spolupráci s rybářskými podniky a zavádění tohoto postupu v provozním měřítku s využitím lokálních populací a domácích plemen a linií namísto dosavadní praxe importu triploidních jiker v očních bodech ze zahraničí. V současné době vlivem importu stagnuje využívání místních populací lososovitých, podniky se stávají závislými na dovozu a minimalizují vlastní hejna a využívání už adaptovaných populací. Cena triploidních jiker v očních bodech je přitom 1,5x až 2x vyšší než cena běžných jiker. S ohledem na trvalou udržitelnost, minimalizaci možnosti transferu různých infekčních onemocnění ryb, zlepšení welfare chovaných ryb a kvalitu produktu je nutné u těchto postupů dále ověřit skutečnou užitkovost triploidů a ekonomickou efektivitu jejich chovu.

Podle Situační a výhledové zprávy RYBY za rok 2021 (www.eagri.cz) české rybářství dosáhlo produkce tržních ryb v roce předchozím na úrovni 20 401 tun, z toho ze speciálních zařízení (převážně ze pstruhařství) 1 120 tun. Produkce lososovitých ryb tak činila zhruba 5,49 % z celkové roční produkce. Pozitivní je, že jestliže produkce lososovitých ryb v r. 2015 činila 611 t, pak do r. 2020 se zvýšila zhruba o třetinu na 923 t živé hmotnosti, což dokládá zlepšující se potenciál této komodity. Z toho pstruh duhový tvořil 767 t, tedy cca. 83 %, a siven tvořil 230 t, tedy 24,9 %. Pokud se zaměříme na pstruha duhového jako komoditu, kde cena živé ryby kolísala za poslední období měsíčně od 101 po 121 Kč/kg, pak například 5% zvýšením produkce pstruha zavedením chovu triploidů by došlo ke zvýšení produkce o 38,35 t, což by jen při započtení té nejnižší ceny přineslo akvakultuře tržby vyšší o 3,87 mil. Kč ročně.

Testováním užitkovosti triploidních lososovitých ryb a vyšším genetickým potenciálem triploidů se autorský tým FROV JU v současné době intenzivně zabývá. Na základě získaných výsledků bude možné zpřesnit odhady ekonomických dopadů indukované triploidie prezentované v této metodice.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Arai, K., Fujimoto, T., 2019. Chromosome manipulation techniques and applications to aquaculture. In: Wang, H.P., Piferrer, F., Chen, S.L. (Eds.), *Sex Control in Aquaculture*, Vol II. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, pp. 137–162.
- Arai, K., 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture* 197(1–4): 205–228.
- Bartley, D., Rana, K., Immink, A., 2000. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 325–337.
- Beaumont, A.R., 2000. Genetic considerations in hatchery culture of bivalve shellfish. In: Fingerma, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology*, Vol IV, Aquaculture, Part A. Science Publishers Inc., New Hampshire, USA, pp. 87–109.
- Benfey, T.J., McCabe, L.E., Pepin, P., 1997. Critical thermal maxima of diploid and triploid brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Environmental Biology of Fishes* 49: 259–264.
- Benfey, T.J., 1999. The physiology and behaviour of triploid fishes. *Reviews in Fisheries Science* 7: 39–67.
- Benfey, T.J., 2009. Producing sterile and single-sex populations of fish for aquaculture. In: Burnell, G., Allan, G. (Eds.), *New Technologies in Aquaculture*. CRC Press, Cambridge, UK, pp. 143–164.
- Benfey, T.J., 2011. Physiology of triploid fish. In: A.P. Farrell (Ed.) *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, Vol III. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 2009–2015.
- Carrasco, L., Doroshov, S., Penman, D.J., Bromage, N., 1998. Long-term, quantitative analysis of gametogenesis in autotriploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Reproduction and Fertility* 113: 197–210.
- Chavanne, H., Janssen, K., Hofherr, J., Contini, F., Haffray, P., Komen, H., Nielsen, E.E., Bargelloni, L., 2016. A comprehensive survey on selective breeding programs and seed market in the European aquaculture fish industry. *Aquaculture International* 24: 1287–1307.
- Cherfas, N.B., Kozinsky, O., Rothbard, S., Hulata, G., 1990. Induced diploid gynogenesis and triploidy in ornamental (koi) carp, *Cyprinus carpio* L. I. Experiments on the timing of temperature shock. *Israeli Journal of Aquaculture* 42(1): 3–9.
- Chevassus, B., Guyomard, R., Chourrout, D., E. Quillet, E., 1983. Production of viable hybrids in salmonids by triploidisation. *Genetique Selection Evolution* 15(4): 519–532.
- Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G., Renard, P., 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females-potential of tetraploid fish. *Theoretical and Applied Genetics* 72: 193–206.
- Chourrout, D., Nakayama, I., 1987. Chromosome studies of progenies of tetraploid females rainbow trout. *Theoretical and Applied Genetics* 74: 687–692.

- Couture, R., Schamber, T., Firmenich, A., Banner, C., 2007. Pressure shock induction of triploid rainbow trout. Oregon Department of Fish and Wildlife (ODFW) report, Oregon Hatchery Research Center, Alsea, OR, USA, 6 s.
- Cuñado, N., Terrones, J., Sánchez, L., Martínez, P., Santos, J.L., 2002. Sex-dependent synaptic behaviour in triploid turbot, *Scophthalmus maximus* (Pisces, Scophthalmidae). *Heredity* 89: 460–464.
- Bartley, D.M., Rana, K., Immink, A.J., 2001 The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 325–337.
- Detlaff, T.A., Detlaff, A.A., 1961. On relative dimensionless characteristics of the development duration in embryology. *Archives of Biology* 72: 1–16.
- Quillet, E., Foisil, L., Chevassus, B., Chourrout, D., Liu, F.G., 1991. Production of all-triploid and all-female brown trout for aquaculture. *Aquatic Living Resources* 4(1): 27–32.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F., 2001. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica* 111: 175–195.
- Flajšhans, M., Gela, D., Kocour, M., Buchtová, H., Rodina, M., Pšenička, M., Kašpar, V., Piačková, V., Sudová, E., Linhart, O., 2010. A review on the potential of triploid tench for aquaculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 20: 317–329.
- Flajšhans, M., Havelka, M., Kříž, M., Toncar, J., Veselý, L., 2012. Tlaková jednotka pro indukci polyploidie u ryb. Užité vzor č. 23378. Úřad průmyslového vlastnictví ČR.
- Flajšhans, M., Havelka, M., Lebeda, I., Rodina, M., Gela, D., Hubálek, M., 2020. Application of hydrostatic pressure shock for retention of the second polar body in sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Aquaculture* 520: 734947.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Bohlen Šlechtová, V., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2013. Genetika a šlechtění ryb. Druhé rozšířené a upravené vydání. FROV JU, Vodňany, 305 s.
- Fraser, T.W.K., Fjellidal, P.G., Hansen, T., Mayer, I. 2012. Welfare considerations of triploid fish. *Reviews in Fisheries Science* 20(4): 192–211.
- Gillet, C., Vauchez, C., Haffray, P., 2001. Triploidy induced by pressure shock in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): growth, survival and maturation until the third year. *Aquatic Living Resources* 14: 327–334.
- Gomelsky, B.I., Rekoubratsky, A.V., Emelyanova, O.V., Pankratyeva, E.V., Lekontzeva, T.I., 1989. Obtaining the carp diploid gynogenetic offspring by heat shock on developed eggs. *Voprosy Ichtiology* 28: 168–178. (in Russian)
- Gray, A.K., Evans, M.A., Thorgaard, G.H., 1993. Viability and development of diploid and triploid salmonid hybrids. *Aquaculture* 112(2–3): 125–142.
- Havelka, M., Kříž, M., Flajšhans, M., 2012. Ověřená technologie hromadné indukce triploidie u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) v provozních podmínkách. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 121, 21 s.

- Havelka, M., Kříž, M., Flajšhans, M., 2014. Ověřená technologie hromadné indukce triploidie u sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*) v provozních podmínkách. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 139, 17 s.
- Hershberger, W.K., Hostuttler, M.A., 2005. Variation in time to first cleavage in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* embryos: a major factor in induction of tetraploids. Journal of the World Aquaculture Society 36: 96–102.
- Hershberger, W.K., Hostuttler, M.A., 2007. Protocols for more effective induction of tetraploid rainbow trout. North American Journal of Aquaculture 69: 367–372.
- Hliwa, P., Panasiak, L., Ziomek, E., Rożyński, R., Leonowicz, L., Grudniewska, J., Dobosz, S., Ocalewicz, K., 2022. Application of High Hydrostatic Pressure (HHP) shock to induce triploid development in the European grayling (*Thymallus thymallus* L.). Animal Reproduction Science 237: 106929.
- Hörstgen-Schwark, G., Meyer, J.N., Wedekind, H., Langholz, H.J., 1997. Carcass and meat quality of heat-shocked and tetraploid-derived triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Proc. VI. Int. Symposium on Genetics in Aquaculture, Stirling, Scotland, June 23–27, 1997.
- Hubálek, M., 2018. Možnosti fixace vzorků pro měření obsahu DNA u ryb průtokovou cytometrií. Diplomová práce, FROV JU, 127 s.
- Hubálek, M., Flajšhans, M., 2021. Simple field storage of fish samples for measurement of DNA content by flow cytometry. Cytometry Part A 99(7): 743–752.
- Jagiełło, K., Polonis, M., Panasiak, L., Dobosz, S., Ocalewicz, K., 2021. Production of triploid, doubled haploid (DH) and meiogynogenetic brook trout (*Salvelinus fontinalis*) – efficiency and development of body deformities. Annals of Animal Science 21(1): 141–157.
- Kholodnyy V, Dzyuba B, Rodina M, Bloomfield-Gadélha H, Yoshida M, Cosson J, Boryshpolets S., 2021. Does the rainbow trout ovarian fluid promote the spermatozoon on its way to the egg? International Journal of Molecular Sciences 22(17): 9519.
- Kocour, M., Kašpar, V., Gela, D., Flajšhans, M., 2012. Způsoby osemeňování jiker při umělé reprodukci ryb z hlediska následného využití potomstva. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 133, 38 s.
- Kolářová, J., Velíšek, J., Nepejchalová, L., Svobodová, Z., Kouřil, J., Hamáčková, J., Máchová, J., Piačková, V., Hajšlová, J., Holadová, K., Kocourek, V., Klimánková, E., Modrá, H., Dobšíková, R., Groch, L., Novotný, L., 2012. Anestetika pro ryby (aktualizované vydání z roku 2007). Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 77, 25 s.
- Kozfkay, J.R., Dillon, J.C., Schill, D.J., 2006. Routine use of sterile fish in salmonid sport fisheries: are we there yet? Fisheries 31(8): 392–401
- Lahnsteiner, F., Kletzl, M., 2018. Pressure shock triploidization of *Salmo trutta* f. *lacustris* and *Salvelinus umbla* eggs and its impact on fish development. Theriogenology 115: 65–76.
- Lahnsteiner, F., Lahnsteiner, E., Kletzl, M., 2020. Age and species related differences in gonad development of triploid Salmonidae. Journal of Applied Aquaculture 33(3): 183–208.
- Loopstra, D.P., Hansen, A.P., 2008. Induction of triploidy in rainbow trout *Oncorhynchus mikiss* using hydrostatic pressure. Alaska Department of Fish and Game, Kodiak. Fishery Data Series No. 08–22.

- Nagler, J.J., 2019. Polyploidy production in salmonidae. In: Wang, H.-P., Piferrer, F., Chen, S.-L. (Eds.), Sex Control in Aquaculture, Vol II. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, pp. 297–304.
- O'Donnell, K.M., MacRae, K.L., Verhille, C.E., Sacobie, C.F.D., Benfey, T.J., 2017. Standard metabolic rate of juvenile triploid brook charr, *Salvelinus fontinalis*. Aquaculture 479: 85–90.
- Oke, K.B., Westley, P.A.H., Moreau, D.T.R., Fleming, I.A., 2013. Hybridization between genetically modified Atlantic salmon and wild brown trout reveals novel ecological interactions. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 280: 20131047.
- O'Keefe, R., Benfey, T., 1995. The production of triploid and sex-reversed arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Aquaculture 137(1–4): 157.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguiere, J.C., Flajšhans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture 239: 125–156.
- Preston, A.C., Taylor, J.F., Craig, B., Bozzolla, P., Penman, D.J., Migaud, H., 2013. Optimisation of triploidy induction in brown trout (*Salmo trutta* L.). Aquaculture 414–415: 160–166.
- Situační a výhledová zpráva Ryby, 2021. Ministerstvo zemědělství ČR, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství Mze, www.eagri.cz, 42 s.
- Švinger, V.W., Kouřil, J., 2012. Hormonálně řízená reprodukce lososovitých ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 123, 55 s.
- Vandeputte, M., 2008. Brown trout (*Salmo trutta*). Report of AquaBreeding project FP6 SSP 044424, Review on Breeding and Reproduction of European aquaculture species, 10 s.
- Vindelov, L.L., Christensen, I. J., Keiding, N., Spang-Thomsen, M., Nissen, N.I., 1983. Long-term storage of samples for flow cytometric DNA analysis. Cytometry 3(5): 317–322.
- Weber, G.M., Hostuttler, M.A., Semmens, K.J., Beers, B.A., 2015. Induction and viability of tetraploids in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 72: 1443–1449.
- Wlasow, T., Kuzminski, H., Kowalska, A., Wiśniewska, A., Fopp-Bayat, D., Korzuch, J., 2014. Morphological characteristics of blood cells in brook trout triploids induced by hydrostatic pressure shock applied at different times after fertilisation. Caryologia 67(1): 45–48.
- Yesaki, T.Y., Scheer, K.W., Greiner, D.L., 1996. Production-scale pressure shocking of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in British Columbia. Proceedings of the 47th Annual Northwest Fish Conference, 170–173.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Flajšhans, M., Gela, D., Kocour, M., Buchtová, H., Rodina, M., Pšenička, M., Kašpar, V., Piačková, V., Sudová, E., Linhart, O., 2010. A review on the potential of triploid tench for aquaculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 20: 317–329.
- Flajšhans, M., Havelka, M., Kříž, M., Toncar, J., Veselý, L., 2012. Tlaková jednotka pro indukci polyploidie u ryb. Užitný vzor č. 23378. Úřad průmyslového vlastnictví ČR.
- Flajšhans, M., Havelka, M., Lebeda, I., Rodina, M., Gela, D., Hubálek, M., 2020. Application of hydrostatic pressure shock for retention of the second polar body in sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Aquaculture* 520: 734947.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Bohlen Šlechtová, V., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2013. Genetika a šlechtění ryb. Druhé rozšířené a upravené vydání. FROV JU, Vodňany, 305 s.
- Havelka, M., Kříž, M., Flajšhans, M., 2012. Ověřená technologie hromadné indukce triploidie u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) v provozních podmínkách. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 121, 21 s.
- Havelka, M., Kříž, M., Flajšhans, M., 2014. Ověřená technologie hromadné indukce triploidie u sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*) v provozních podmínkách. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 139, 17 s.
- Hubálek, M., Flajšhans, M., 2021. Simple field storage of fish samples for measurement of DNA content by flow cytometry. *Cytometry Part A* 99(7): 743–752.
- Kocour, M., Kašpar, V., Gela, D., Flajšhans, M., 2012. Způsoby osemeňování jiker při umělé reprodukci ryb z hlediska následného využití potomstva. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 133, 38 s.
- Kolářová, J., Velíšek, J., Nepejchalová, L., Svobodová, Z., Kouřil, J., Hamáčková, J., Máchová, J., Piačková, V., Hajšlová, J., Holadová, K., Kocourek, V., Klimánková, E., Modrá, H., Dobšíková, R., Groch, L., Novotný, L., 2012. Anestetika pro ryby (aktualizované vydání z roku 2007). Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 77, 25 s.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguiere, J.C., Flajšhans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 239: 125–156.
- Švinger, V.W., Kouřil, J., 2012. Hormonálně řízená reprodukce lososovitých ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 123, 55 s.

Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QK22020041 Aplikace nových poznatků genetiky a genomiky k produkci vysoce užitkových triploidních populací ryb ke zvýšení užitkovosti a kvality tržního produktu. – 100 %

Externí odborný oponent

prof. Ing. Lukáš Kalous, Ph.D.

Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha- Suchbátka

Interní odborný oponent

Ing. David Gela, Ph.D.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany

Oponent za státní správu

Ing. Ondřej Tomášek

Ministerstvo zemědělství ČR, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Oddělení rybářství a včelařství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. ze dne

Adresa autorského kolektivu

prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr. rer. agr. 70 %

Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D. 15 %

Ing. Martin Hubálek, Ph.D. 15 %

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz

V edici Metodik (technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, www.frov.jcu.cz;
přidělený editor: dr. hab Ing. Josef Velíšek, Ph.D. ; redakce: Zuzana Dvořáková;
náklad: 200 ks, 1. vydání; metodika uplatněna v roce 2023; vytištěna v roce 2023;
grafický design a technická realizace:.