



Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Využití alizarinové červeně (ARS) při hromadném značení juvenilů lososovitých ryb

J. Turek, M. Avramović, A. Bořík, P. Lepič,
T. Randák





Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Využití alizarinové červeně (ARS) při hromadném značení juvenilů lososovitých ryb

J. Turek, M. Avramović, A. Bořík, P. Lepič, T. Randák

Vodňany, 2024

Obsahová část publikace byla zpracována za finanční podpory následujících projektů:

Výsledky byly získány za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky – projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QK23020064

Zhodnocení hydrologické situace pstruhových toků ČR a stavu populací lososovitých ryb v souvislosti s klimatickou změnou – 90 % a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy – projektu CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/000 0869 Udržitelná produkce zdravých ryb v různých akvakulturních systémech (PROFISH) – 10 %.



č. 208

ISBN 978-80-7514-213-9

1.	CÍL METODIKY	7
2.	VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
2.1.	Úvod	8
2.2.	Materiál a metodický postup	9
2.2.1.	Ověření značení a identifikace ARS u pstruha duhového	9
2.2.2.	Ověření značení a identifikace ARS u pstruha obecného	12
2.2.3.	Ověření značení a identifikace ARS u lipana podhorního	13
2.2.4.	Statistické hodnocení	14
2.3.	Výsledky	15
2.3.1.	Identifikace značení u pstruha duhového	15
2.3.2.	Identifikace značení u pstruha obecného	17
2.3.3.	Identifikace značení u lipana podhorního	19
2.4.	Shrnutí a závěry	20
3.	SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	21
4.	POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	21
5.	EKONOMICKÉ ASPEKTY	22
6.	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	22
7.	SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	23

1. Cíl metodiky

Cílem metodiky je představení možnosti značení juvenilních lososovitých pomocí alizarinové červeně (Alizarin Red S, ARS, sodná sůl kyseliny alizarinsulfonové, alizarinkarmín, $C_{14}H_7NaO_7S$), aplikované ve formě koupele. Jde o způsob skupinového značení ryb menších rozměrů (stáří 0+). Vzhledem k tomu, že pro účinnost značení a následné identifikace je nutná osifikace kosterní tkáně, konkrétně ploutevních paprsků, je potřeba stanovit minimální velikost (věk) ryb umožňující jejich barvení. Je rovněž popsán způsob detekce značení, použitelný v terénních podmínkách, bez nutnosti použití nákladného vybavení a eliminující poškození či usmrcení jedince v důsledku odběru tkání. Na základě získaných výsledků bude možno stanovit minimální věk různých druhů lososovitých ryb pro efektivní označení koupelí ARS umožňující následnou spolehlivou neletální identifikaci označených ryb v terénních podmínkách. Výsledky pak bude možné využít při provádění mark-recapture experimentů (experimentů spočívajících ve vypuštění označených jedinců a jejich opětovném odlovu) s velkým počtem lososovitých ryb malé velikosti, které byly při použití dalších metod značení dosud obtížně realizovatelné nebo zcela neproveditelné. Možnost realizace těchto experimentů významně rozšíří možnosti hodnocení efektivity zarybňování pstruhových revírů.

2. Vlastní popis metodiky

Metodika popisuje použití ARS pro značení juvenilních lososovitých ryb včetně stanovení minimálního věku pro jejich značení, které umožňuje následnou úspěšnou neletální identifikaci v terénních podmínkách. Jako modelový druh byl vybrán pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) z důvodu jeho snadného odchovu v kontrolovaných podmínkách. Experimentálně byla možnost použití značení a identifikace ARS rovněž ověřena u pstruha obecného (*Salmo trutta* m. *fario*) a lipana podhorního (*Thymallus thymallus*). U těchto druhů bylo z důvodu vyšších nároků na kvalitu prostředí a obecně problematičtějšího odchovu v kontrolovaných podmínkách ověřeno značení ve fázi rozkrmeného plůdku různého věku v případě pstruha obecného a extenzivně odchovaného čtvrtročka v případě lipana podhorního.

2.1. Úvod

Značení je jedním z nejdůležitějších nástrojů využívaných v rámci vědeckého zkoumání ryb (Thorsteinsson, 2002), díky němuž je možné získat širokou škálu informací. Metody založené na vypuštění a opětovném odlovu označených ryb poskytují informace o složení populací na otevřených vodách a také o růstu a přežívání vysazených ryb v přírodních podmínkách.

Využívání uměle odchovaných a vysazených ryb k různým cílům, včetně úsilí o zachování či podporu ohrožených populací je stále častější praxí. Monitoring efektivity používání uměle odchovaných ryb pro vysazování do volných vod však většinou není prováděn, zejména kvůli tomu, že vysazované ryby před vypuštěním nejsou označeny nebo je označena pouze část z nich (Warren-Myers a kol., 2018). Problematické je zejména účinné hromadné značení raných věkových kategorií ryb před jejich vysazením. Současné mezi vědci panuje široká shoda, že ryby obecně musí být vysazeny v raných fázích života, pokud je cílem vysazování podporovat přirozené populace (Järvi, 2002; Metcalfe a kol., 2003). Například u lososovitých ryb se při chovu v zajetí vyvinou související znaky, které je odlišují od volně žijících jedinců v potravním chování, reakci na predátory a využívání stanovišť (Einum a Fleming, 2001). Tento jev následně podstatně snižuje adaptabilitu a schopnost přežít vysazených uměle odchovaných ryb v přírodním prostředí (Fraser a kol., 2011).

Ačkoli použití přírodních nebo chemických značek (např. tetracyklinu, kalceinu či alizarinové červeně) nebo vystavení značených jedinců stabilním izotopům prostřednictvím koupele nebo vakcinace již od stadia jiker nevyžaduje složitou manipulaci s rybami či stresové působení, následná identifikace označení může vyžadovat usmrcení ryb po jejich ulovení (Thorsteinsson, 2002; Uglem a kol., 2020). V případě snah o obnovu a posílení oslabených populací zejména lososovitých ryb je nutnost usmrcování jedinců za účelem identifikace původu kontraproduktivní, protože zahrnuje i zabíjení potomků volně žijících ryb. Značení ryb koupelí v roztoku ARS spočívá ve využití schopnosti ARS vázat se na vápenaté struktury v organismech (kost, šupina, otolit) (Puchtler a kol., 1968) a je popsáno u různých druhů lososovitých ryb. Samotná látka je pro ryby málo toxická, Halačka a kol. (2018b) nezjistili při standardním testu toxicity na daniu pruhovaném (*Danio rerio*) úhyn ani v koncentraci 600 mg.l⁻¹. Publikované studie používaly identifikaci založenou na analýze otolitu (Baer a Rösch, 2008; Caudron a Champigneulle, 2009; Unfer a Pinter, 2013; Lejk a Martyniak, 2018; Lejk a Radtke, 2021). Pro tento způsob identifikace je nutné vyšetřované ryby usmrtit. Několik studií však zmiňuje možnost identifikace ARS značení pomocí analýzy ploutevnických paprsků u kaprovitých (Lü a kol., 2015, 2016). U štiky obecné (*Esox lucius*) je tento postup ověřen včetně možnosti

terénní identifikace (Halačka a kol., 2018a). Osifikace ploutevních paprsků je pro úspěch takového značení zásadní. Proto je nutné pro značení pomocí koupele v ARS ověřit minimální věk a velikost jedinců různých druhů ryb umožňující následnou jednoduchou a efektivní terénní identifikaci označených ryb.

2.2. Materiál a metodický postup

2.2.1. Ověření značení a identifikace ARS u pstruha duhového

2.2.1.1. Experimentální ryby a postup značení

Pro experiment bylo použito tisíc kusů plůdku pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) ve věku 30 dní po vylíhnutí o hmotnosti $0,45 \pm 0,13$ g (průměrná hmotnost $\pm$ směrodatná odchylka), zakoupených od lokálního chovatele (Vladimír Šefl, Bušanovice, ČR). Ryby byly od vylíhnutí chovány v recirkulačním systému (plastový žlab) s teplotou vody $11,0 \pm 0,1$ °C a krmeny komerčními peletami (INICIO Plus, 0,5 mm; Biomar). Po aklimatizaci byly ryby náhodně rozděleny a nasazeny do tří akvárií (objem 300 l) ve Vodňanech na Fakultě rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity (FROV JU). Akvária byla plněna pitnou (vodovodní) vodou filtrovanou přes filtr s aktivním uhlím. Každé akvárium bylo provzdušňováno a připojeno k individuálnímu externímu filtru (Eheim professional 4+, EHEIM GmbH, Německo). V průběhu odchovu byla zaznamenávána teplota vody pomocí záznamníkového teploměru (Minikin Tie, Environmental Measuring Systems, s.r.o., Brno) pro výpočet denních stupňů vývoje ryb. Exkrementy ryb a další sedimenty byly vypouštěny denně kolem poledne, včetně výměny cca 30 % vody. Každých 10 dní, ve 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 dnech věku ryb bylo náhodně vybráno 100 ryb, které byly rozděleny do dvou skupin a umístěny do menších akvárií s 10 l roztoku ARS (Alizarin red S, Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo) s koncentrací 150 mg.l^{-1} . Pro koupel byla použita voda sloužící k napájení chovných akvárií. U jedné skupiny byla doba trvání koupele jednu hodinu, druhá skupina byla koupána čtyři hodiny pro ověření, zda délka trvání koupele ovlivní následnou detekovatelnost značení. Experimentální skupiny byly označeny 40–100/1 nebo 40–100/4 podle věku ryb v době značení a doby trvání značící koupele. Během značící koupele byla akvária provzdušňována a byla zaznamenávána mortalita ryb. Po koupeli byly ryby individuálně změřeny (délka těla, DT a celková délka, CD; mm) a zváženy (tab. 1) a každá skupina byla umístěna do samostatné sekce provzdušňovaného akvária (objem vody 50 l) osazeného externím filtrem (viz výše). Následně byly ryby krmeny komerčními vyráběnými peletami přiměřené velikosti (INICIO Plus, 0,8 mm a 1,1 mm; Biomar) v množství 2 % hmotnosti

obsádky denně, rozdělené do tří dávek. Mortalita ryb v každé skupině byla zaznamenávána denně. Každých 10 dní byla zjišťována celková hmotnost obsádky v každém akváriu/sekci kvůli úpravě krmené dávky. Během této části experimentu (stáří ryb 30–100 dní) byla střední teplota vody $14,3 \pm 1,2$ °C, obsah kyslíku $10,1 \pm 1$ mg.l⁻¹ a pH $7,2 \pm 0,7$.

Ve stáří 100 dnů byly jednotlivé pokusné skupiny ryb a kontrolní skupina (250 jedinců) odděleně vysazeny do průtočných kruhových nádrží o objemu 500 l napájených říční vodou (Blanice Vodňanská) v Experimentálním rybochovném a pokusném zařízení (ERP) FROV. Ryby byly chovány 100 dní a krmeny komerčními peletami přiměřené velikosti (INICIO Plus, 1,5 mm a 2,0 mm; EFICO Enviro 921, 3 mm; Biomar) v množství 2 % hmotnosti obsádky denně. Mortalita byla zaznamenána pro každou experimentální skupinu a pro kontrolní skupinu. Na základě získaných výsledků prvního hodnocení bylo vybráno šest skupin ryb s dobrou rozpoznatelností značení (označených ve věku 60, 80 a 100 dnů, v obou variantách délky koupele), které byly dále chovány pro hodnocení viditelnosti značek ve věku 300 dnů.

Tab. 1. Biometrické údaje experimentálních skupin pstruhů duhových (*Oncorhynchus mykiss*) ($n = 20$) v termínech značení: průměrná ($\pm$ Sm. odch.) délka těla (DT), celková délka (CD) a hmotnost (Hm).

Věk (dny)	ΣD° (°C)	DT (mm)	CD (mm)	Hm (g)
40	438	$33,9 \pm 1,2$	$38,8 \pm 1,6$	$0,57 \pm 0,06$
50	562	$37,2 \pm 2,4$	$43,1 \pm 2,9$	$0,81 \pm 0,08$
60	685	$40,1 \pm 3,1$	$48,1 \pm 3,6$	$1,08 \pm 0,12$
70	833	$45,1 \pm 3,6$	$54,2 \pm 4,3$	$1,55 \pm 0,18$
80	966	$50,4 \pm 6,5$	$60,3 \pm 7,1$	$2,04 \pm 0,32$
90	1 109	$57,6 \pm 8,6$	$67,6 \pm 9,2$	$3,03 \pm 0,53$
100	1 262	$61,3 \pm 8,9$	$72,1 \pm 9,6$	$4,14 \pm 0,89$

ΣD° = denní stupně, průměrná denní teplota vody násobená počtem dnů.

2.2.1.2. Hodnocení detekovatelnosti značení u pstruha duhového

Po 100 dnech skupinového odchovu (tj. ve stáří 200 dní), bylo 20 náhodně vybraných ryb z každé skupiny podrobeno analýze detekovatelnosti značení v ploutevních paprscích. Detekovatelnost značení byla hodnocena pomocí zeleného laserového ukazovátka (výkon 100 mW; Laser-shop.cz) emitujícího světlo o vlnové délce 532 nm. Hodnotitelé byli vybaveni ochrannými brýlemi (Laser-shop.cz) pro práci s laserem. Ty zabraňují průchodu světla o vlnové délce 190–540 nm a zároveň umožňují pozorovat světlo o vlnové délce 580 nm, které

VYUŽITÍ ALIZARINOVÉ ČERVENĚ (ARS) PŘI HROMADNÉM ZNAČENÍ JUVENILŮ LOSOSOVITÝCH RYB

je emitováno při excitaci ARS (obr. 1). V ploutevních paprscích označených ryb lze pozorovat indukovanou fluorescenci ohnivě červené tkáně. Při kontrole byly ryby umístěny na vlhkou, černou plastovou podložku, chráněnou před přímým slunečním zářením (hodnocení probíhalo ve stínu). Druhé hodnocení detekovatelnosti značení bylo provedeno ve věku 300 dnů u skupin ryb označených ve věku 60, 80 a 100 dnů stejným postupem.

Přítomnost značení byla ověřena na ploutevních paprscích ocasní a/nebo řitní ploutve. Náhodně vybrané označené a kontrolní ryby byly anestetizovány hřebíčkovým olejem ($0,03 \text{ ml.l}^{-1}$) a předány dvěma proškoleným hodnotitelům k posouzení detekovatelnosti značení. Oba hodnotitelé předem absolvovali nácvik, při kterém jim byly předkládány předem identifikované označené ryby ze skupiny 100/4 a kontrolní ryby pro osvojení správného postupu rozpoznání značení. Všechny ryby byly před vyhodnocením individuálně změřeny (CD a DT, mm) a zváženy (g). Oba hodnotitelé zkontrolovali 10 ryb z každé označené skupiny náhodně střídaných celkem 80 neoznačenými kontrolními rybami bez předchozí informace o příslušnosti posuzované ryby k jedné ze skupin. Detekovatelnost značení byla definována jako „označená“ nebo „neoznačená“ ryba. Po vyhodnocení známkování a zotavení z narkózy byly ryby vráceny do příslušných nádrží.



Obr. 1. Vybavení pro identifikaci značení ARS v ploutevních paprscích (532 nm laserové ukazovátko, ochranné brýle, černá plastová podložka). (Foto: M. Avramović).

2.2.2. Ověření značení a identifikace ARS u pstruha obecného

2.2.2.1. Experimentální ryby a postup značení

Pro experiment byli využiti pstruzi obecní z vlastního chovu. Inkubace jiker proběhla v plovoucích inkubačních aparátech v nátokovém objektu rybníka Hulák v Prachaticích, napájeném Fefrovským potokem od 2. 11. do 20. 2. 2023. Ve věku 35 dnů po vykulení byly ryby převezeny na Experimentální rybochovné pracoviště FROV JU, kde byly umístěny do žlabu napojeného na recirkulační systém. V průběhu inkubace v plovoucím aparátu a odchovu ve žlabu byla zaznamenávána teplota vody pomocí záznamníkového teploměru pro výpočet denních stupňů vývoje ryb. Pro rozkrm ryb bylo použito startérové krmivo (INICIO Plus, 0,5 mm, Biomar). Koupele v ARS byly provedeny ve věku 70, 90 a 110 dní od vykulení. Před provedením koupele bylo u 20 ks ryb provedeno individuální biometrické měření (tab. 2). Během koupele bylo 80 ks ryb umístěno v desetilitrových plastových nádobách se vzduchováním. Byla použita koncentrace ARS 150 mg.l⁻¹ a doba koupele byla 4 hodiny. Po koupeli byla zaznamenána mortalita značených ryb. Ryby všech značených skupin a neoznačené ryby sloužící jako kontrolní skupina byly následně umístěny do oddělených průtočných kruhových nádrží v prostorách FROV JU napájených vodou z náhonu řeky Blanice Vodňanské. V nich byly ryby chovány až do hodnocení detekovatelnosti značek ve věku 200 dní, které proběhlo 8. 9. 2023. Během odchovu byly ryby krmeny peletami vhodné velikosti (INICIO Plus; 0,5–1,1 mm; Biomar). Vzhledem k nevyhovující kvalitě vody pro sledovaný druh v průběhu odchovu, zejména v letním období, byl růst ryb velmi pomalý a docházelo k častým úhynům označených i kontrolních ryb. V rámci tohoto experimentu tedy nebylo možné vyhodnotit růst a mortalitu v jednotlivých skupinách.

Na základě získaných poznatků byl v roce 2024 proveden doplňující experiment, při kterém byl plůdek pstruha obecného získaný a odchovný stejným způsobem jako v roce 2023 označen dne 2. 5. 2024 ve věku 80 dní (790 D°) od vylíhnutí čtyřhodinovou koupelí v roztoku ARS o koncentraci ARS 150 mg.l⁻¹. V době koupele měly ryby celkovou délku $35,8 \pm 2,3$ mm, délku těla $31,0 \pm 1,9$ mm a hmotnost $0,37 \pm 0,08$ g. Další odchov probíhal od 3. 5. v chovném rybníce (Kandlův rybník, Prachalice) napájeném vodou z Živného potoka. Ryby zde přijímaly přirozenou potravu. Rybník byl sloven 17. 7. 2024. Zároveň byli v Živném potoce (součást účelového rybářského revíru FROV JU Blanice Vodňanská 4B) nad nejbližším jezem (vyloučení možnosti migrace označených jedinců uniklých z chovného rybníka) nalozeni pomocí elektrického agregátu kontrolní pstruzi obecní odpovídající velikosti. Hodnocení detekovatelnosti značení proběhlo již popsáním způsobem 19. 7. 2024, tedy ve věku 158 dní.

VYUŽITÍ ALIZARINOVÉ ČERVENĚ (ARS) PŘI HROMADNÉM ZNAČENÍ JUVENILŮ LOSOSOVITÝCH RYB

Zároveň byla provedena zkouška snášenlivosti pro různé koncentrace ARS v rozmezí 100, 150, 200, 250 a 300 mg.l⁻¹. Při ní bylo do plastových nádob s 10 l roztoku ARS o příslušné koncentraci, vybavených vzduchováním, umístěno 15 ks rozkrmeného plůdku pstruha obecného (biometrické údaje viz výše). Po 4 hodinách koupele, při níž byla teplota vody 17 °C, byla zaznamenána mortalita značených ryb. Ryby použité při této zkoušce nebyly zařazeny do experimentu pro hodnocení detekovatelnosti značení.

Tab. 2. Biometrické údaje experimentálních pstruhů obecných (*Salmo trutta m. fario*) ($n = 20$) v termínech značení: průměrná ($\pm$ směrodatná Odchylna SD) délka těla (DT), celková délka (CD) a hmotnost (Hm).

Věk (dny)	ΣD° (°C)	DT (mm)	CD (mm)	Hm (g)
70	587	26,1 $\pm$ 2,2	29,8 $\pm$ 2,5	0,23 $\pm$ 0,06
90	835	32,2 $\pm$ 2,3	37,7 $\pm$ 2,8	0,46 $\pm$ 0,11
110	1 087	36,8 $\pm$ 1,7	43,1 $\pm$ 1,9	0,80 $\pm$ 0,10

2.2.2.2. Hodnocení detekovatelnosti značení u pstruha obecného

Hodnocení detekovatelnosti proběhlo v roce 2023 i 2024 u pstruha obecného způsobem a s vybavením popsáním výše u pstruha duhového (kapitola 2.2.1.2.).

2.2.3. Ověření značení a identifikace ARS u lipana podhorního

2.2.3.1. Experimentální ryby a postup značení

Vzhledem k nevyhovujícím podmínkám pro odchov plůdku lipana podhorního (*Thymallus thymallus*) na odchovném zařízení FROV bylo u tohoto druhu ověřeno značení ve věku čtvrtročka, který je v poslední době preferovanou věkovou kategorií pro vysazování do volných vod. Lipani podhorní použití pro experiment byli získáni výtěrem vlastních generačních ryb chovaných v rybníce Hulák v Prachaticích. Po vylíhnutí 24. 5. 2023 byl plůdek lipana vysazen do Kandlova rybníka v Prachaticích, kde byl odchováván na přirozené potravě do 7. 8., tedy do věku 75 dní (1 200 D°). Po slovení rybníka bylo 300 ks označeno koupelí v ARS o koncentraci 150 mg.l⁻¹, trvající 4 hodiny (obr. 2). V průběhu koupele byl zaznamenán úhyn 4 kusů značených ryb. V době koupele měly ryby celkovou délku 89,4 $\pm$ 7,3 mm, délku těla 75,2 $\pm$ 6,4 mm a hmotnost 5,36 $\pm$ 1,22 g. Označené ryby byly vysazeny do Kandlova rybníka k dalšímu odchovu. Dne 11. 11. 2023, tedy ve věku ryb 170 dní, byl rybník sloven a byla

provedena kontrola detekovatelnosti značení. Jako kontrolní skupina byli použiti tohoroční lipani nalovení elektrickým agregátem v účelovém rybářském revíru FROV JU Blanice Vodňanská 4B.



Obr. 2. Značící koupel ARS 150 mg.l⁻¹ pro značení čtvrtočka lipana podhorního (*Thymallus thymallus*). (Foto: T. Randák).

2.2.3.2. Hodnocení detekovatelnosti značení u lipana podhorního

Hodnocení detekovatelnosti proběhlo u lipana podhorního způsobem a s vybavením popsáním výše u pstruha duhového (kapitola 2.2.1.2.).

2.2.4. Statistické hodnocení

K posouzení rozdílů v hmotnosti a délce mezi skupinami ryb v obou časech hodnocení detekovatelnosti značení byla použita analýza rozptylu (ANOVA). *Post hoc* srovnání byla provedena Tukeyho testem. Studentův t-test byl použit k testování hmotnostních a délkových rozdílů mezi označenými rybami s detekovaným a nedetekovaným označením u pstruha duhového. Míry rozpoznatelnosti značek byly porovnány s Pearsonovým χ^2 testem. Hladina významnosti byla $P < 0,05$.

VYUŽITÍ ALIZARINOVÉ ČERVENĚ (ARS) PŘI HROMADNÉM ZNAČENÍ JUVENILŮ LOSOSOVITÝCH RYB

2.3. Výsledky

2.3.1. Identifikace značení u pstruha duhového

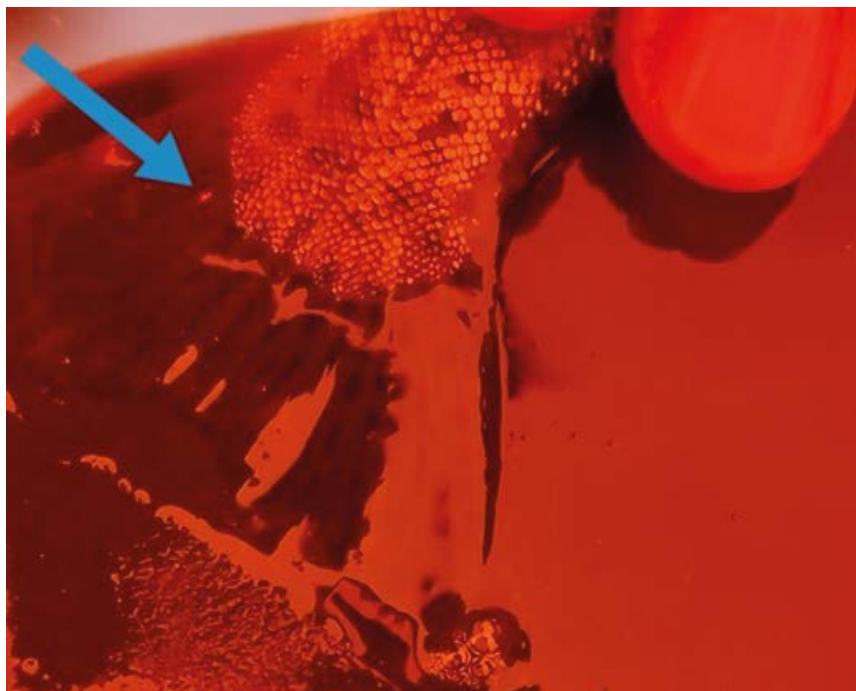
Nebyl zjištěn žádný vliv postupu značení na mortalitu plůdku pstruha duhového. Při ponoření ryb do roztoku ARS byly zaznamenány pouze dva úhyny ryb, a to ve skupinách 60/4 a 90/1. Míra přežití ve 14 experimentálních skupinách během následného odchovu byla 94–100 % ve věku 200 dnů vs. 95,6 % v kontrolní skupině. Ve věku 300 dnů bylo přežití v experimentálních 6 skupinách 90–98 % vs. 93,6 % v kontrolní skupině. Nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly v hmotnosti mezi experimentálními a kontrolními skupinami ryb ve 200 dnech ani 300 dnech věku (tab. 3).

Tab. 3. *Biometrické údaje experimentálních a kontrolní (K) skupiny pstruhů duhových (Oncorhynchus mykiss) (n = 20 u experimentálních skupin, n = 160 u kontrolní skupiny) v termínech hodnocení detekovatelnosti značení: průměrná ($\pm$ SD) délka těla (DT), celková délka (CD) a hmotnost (Hm).*

Skup.	Věk 200 dní			Věk 300 dní		
	DT (mm)	CD (mm)	Hm (g)	DT (mm)	CD (mm)	Hm (g)
40/1	165,7 $\pm$ 12,6	187,7 $\pm$ 13,0	73,3 $\pm$ 12,5	---	---	---
40/4	163,3 $\pm$ 18,0	183,3 $\pm$ 18,8	74,3 $\pm$ 16,1	---	---	---
50/1	161,0 $\pm$ 20,2	182,9 $\pm$ 22,1	71,5 $\pm$ 21,6	---	---	---
50/4	167,3 $\pm$ 14,2	188,5 $\pm$ 15,6	74,8 $\pm$ 16,2	---	---	---
60/1	163,6 $\pm$ 18,1	184,8 $\pm$ 19,4	69,4 $\pm$ 17,7	248,7 $\pm$ 20,2	277,7 $\pm$ 21,0	249,5 $\pm$ 55,5
60/4	166,8 $\pm$ 18,5	189,0 $\pm$ 19,6	77,0 $\pm$ 21,1	249,9 $\pm$ 19,6	279,0 $\pm$ 20,5	263,3 $\pm$ 50,4
70/1	164,6 $\pm$ 16,2	186,3 $\pm$ 16,5	77,6 $\pm$ 17,4	---	---	---
70/4	175,1 $\pm$ 14,2	196,9 $\pm$ 15,4	88,7 $\pm$ 17,3	---	---	---
80/1	158,7 $\pm$ 15,9	180,3 $\pm$ 17,6	69,8 $\pm$ 20,6	235,8 $\pm$ 27,4	264,5 $\pm$ 30,2	229,0 $\pm$ 71,5
80/4	164,0 $\pm$ 15,4	185,4 $\pm$ 17,3	75,6 $\pm$ 18,1	251,2 $\pm$ 22,7	279,9 $\pm$ 26,1	286,6 $\pm$ 53,7
90/1	164,4 $\pm$ 15,8	184,7 $\pm$ 16,2	73,7 $\pm$ 19,1	---	---	---
90/4	168,6 $\pm$ 17,0	189,1 $\pm$ 15,7	79,9 $\pm$ 17,0	---	---	---
100/1	163,1 $\pm$ 20,6	183,8 $\pm$ 22,6	78,3 $\pm$ 24,0	250,8 $\pm$ 21,4	279,5 $\pm$ 24,3	272,9 $\pm$ 62,9
100/4	165,7 $\pm$ 12,5	187,2 $\pm$ 14,6	74,5 $\pm$ 21,3	251,5 $\pm$ 36,5	281,2 $\pm$ 39,1	290,4 $\pm$ 99,6
K	162,8 $\pm$ 15,3	182,1 $\pm$ 16,5	71,5 $\pm$ 19,2	244,9 $\pm$ 26,5	271,5 $\pm$ 27,7	254,5 $\pm$ 68,7

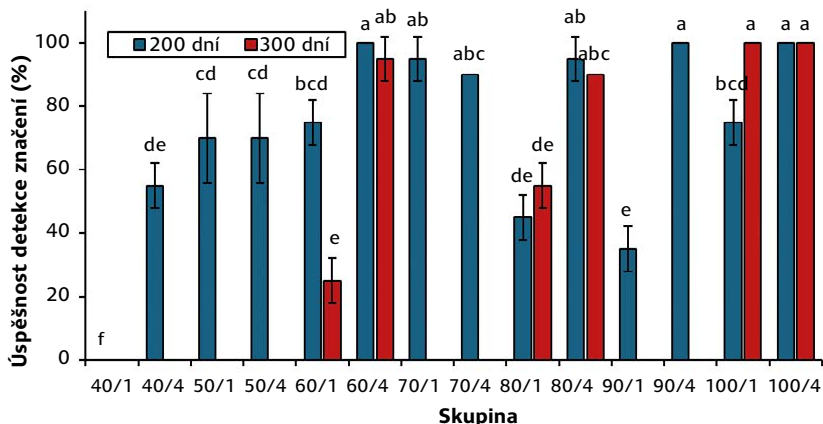
Značení bylo nejlépe rozeznatelné v ploutevních paprscích na ventrální (spodní) bázi ocasní ploutve (obr. 3), rozeznatelné bylo v některých případech i na paprscích ploutve řitní. Míra rozpoznatelnosti značení u jednotlivých

skupiny označených ryb se v obou termínech kontroly statisticky významně lišila (obr. 4). Ve 200 dnech věku byla úspěšnost rozpoznávání známek od 0 % (skupina 40/1) do 100 % (skupina 60/4, 90/4 a 100/4). S výjimkou ryb označených ve věku 50 a 70 dnů bylo rozpoznání značek vždy vyšší ve skupině se čtyřhodinovou značicí koupelí než ve skupině s jednohodinovou koupelí, přičemž rozdíl byl u některých skupin statisticky významný. Při hodnocení ve 300 dnech věku došlo k významnému poklesu rozpoznatelnosti značení ve skupině 60/1 a ke zvýšení ve skupině 100/1 oproti hodnocení ve 200 dnech. U ostatních skupin se rozpoznatelnost značení statisticky významně nelišila. V obou termínech hodnocení nebyly zjištěny žádné významné rozdíly ve hmotnosti, celkové délce a délce těla mezi rybami experimentálních skupin s úspěšnou a neúspěšnou detekcí značení (tab. 4).



Obr. 3. Obarvený paprsek ocasní ploutve pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) po nasvícení 532 nm laserem. Fotografováno přes ochranné brýle pro práci s laserem. (Foto: M. Avramović).

VYUŽITÍ ALIZARINOVÉ ČERVENĚ (ARS) PŘI HROMADNÉM ZNAČENÍ JUVENILŮ LOSOSOVITÝCH RYB



Obr. 4. Míra úspěšnosti detekce značení ARS v ploutevních paprscích experimentálních skupin pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) ve stáří 200 a 300 dnů (hodnocení ve věku 300 dní bylo provedeno pouze u skupin značených ve věku 60, 80 a 100 dnů, v obou variantách délky koupele). Různá písmena označují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi skupinami dle Pearsonova χ^2 testu.

Tab. 4. Biometrické údaje označených pstruhů duhových (*Oncorhynchus mykiss*) s rozeznatelným a nerozeznatelným značením v obou termínech kontroly: průměrná ($\pm$ SD) délka těla (DT), celková délka (CD) a hmotnost (Hm).

Značení	Věk 200 dní		Věk 300 dní	
	Rozeznatelné	Nerozeznatelné	Rozeznatelné	Nerozeznatelné
n	197	83	93	27
DT (mm)	165,2 $\pm$ 17,4	164,9 $\pm$ 14,5	246,5 $\pm$ 27,3	253,0 $\pm$ 17,1
CD (mm)	186,4 $\pm$ 18,6	186,4 $\pm$ 15,4	275,5 $\pm$ 29,5	282,0 $\pm$ 18,6
Hm (g)	75,9 $\pm$ 19,7	74,9 $\pm$ 17,1	265,0 $\pm$ 74,3	266,2 $\pm$ 51,2

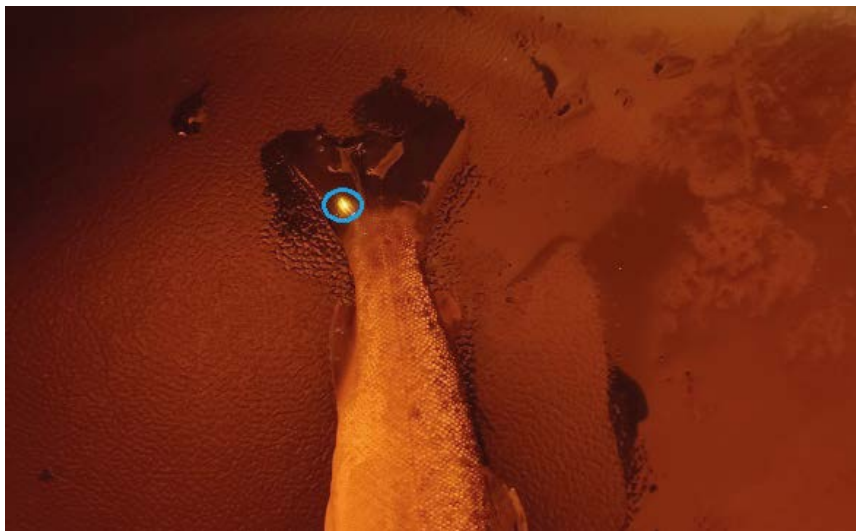
2.3.2. Identifikace značení u pstruha obecného

V roce 2023 se rozpoznatelnost značení u pstruhů obecných ve 200 dnech věku pohybovala od 85 do 100 % (tab. 5). Ani při tomto experimentu nebyla zaznamenána falešně pozitivní identifikace značení. Obecně bylo označení obtížnější rozeznatelné než v případě pstruha duhového, což bylo způsobeno malým přírůstkem ryb v průběhu odchovu po značení zapříčiněným nevyhovující kvalitou vody napájející odchovné nádrže na FROV JU. Mezi

jednotlivými skupinami ryb nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly v délce těla, celkové délce ani hmotnosti (tab. 5). U pstruhů obecných použitých pro experiment v roce 2024, odchovávaných v Kandlově rybníce byla rozpoznatelnost značení ve věku 158 dní 100 % bez falešně pozitivní identifikace značení. Značení bylo velmi dobře rozpoznatelné na bázi ploutevních paprsků ocasní ploutve (obr. 5) i díky většímu délkovému přírůstku od označení. Ani u těchto ryb nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly v biometrických ukazatelích mezi kontrolními a značenými rybami (tab. 6). Výsledky provedené zkoušky snášenlivosti ukázaly nulovou mortalitu 80denních pstruhů obecných během 4hodinové koupele v roztoku ARS o koncentracích 100 a 150 mg.l⁻¹, 8% mortalitu v koncentraci 200 mg.l⁻¹, 93% v koncentraci 250 mg.l⁻¹ a 100% v koncentraci 300 mg.l⁻¹ při teplotě vody 17 °C se vzduchováním. V průběhu provádění experimentů se rovněž ukázalo nebezpečí provádění koupele v nádobách s malou plochou dna (kbelík, plastová konev). Při větším počtu značených ryb i přes intenzivní vzduchování došlo k úhynu části ryb v důsledku jejich nahromadění u dna nádoby. Proto lze doporučit provádět značící koupel v nádrži s velkou plochou dna (káď, žlab), případně ryby značit po menších skupinách.

Tab. 5. Biometrické údaje experimentálních a kontrolní (K) skupiny pstruhů obecných (*Salmo trutta m. fario*) ($n = 20$ u experimentálních skupin, $n = 50$ u kontrolní skupiny) a úspěšnost detekce v značení ve věku 200 dní: průměrná ($\pm$ SD) délka těla (DT), celková délka (CD) a hmotnost (Hm).

Skupina	Věk 200 dní			Detekovatelnost značení (%)
	DT (mm)	CD (mm)	Hm (g)	
K	64,9 $\pm$ 9,6	76,0 $\pm$ 10,1	5,3 $\pm$ 2,5	---
70	63,2 $\pm$ 10,1	73,1 $\pm$ 11,3	4,9 $\pm$ 2,4	85
90	64,3 $\pm$ 12,0	74,5 $\pm$ 13,1	5,1 $\pm$ 2,4	100
110	67,1 $\pm$ 11,3	77,4 $\pm$ 12,2	5,4 $\pm$ 2,6	100



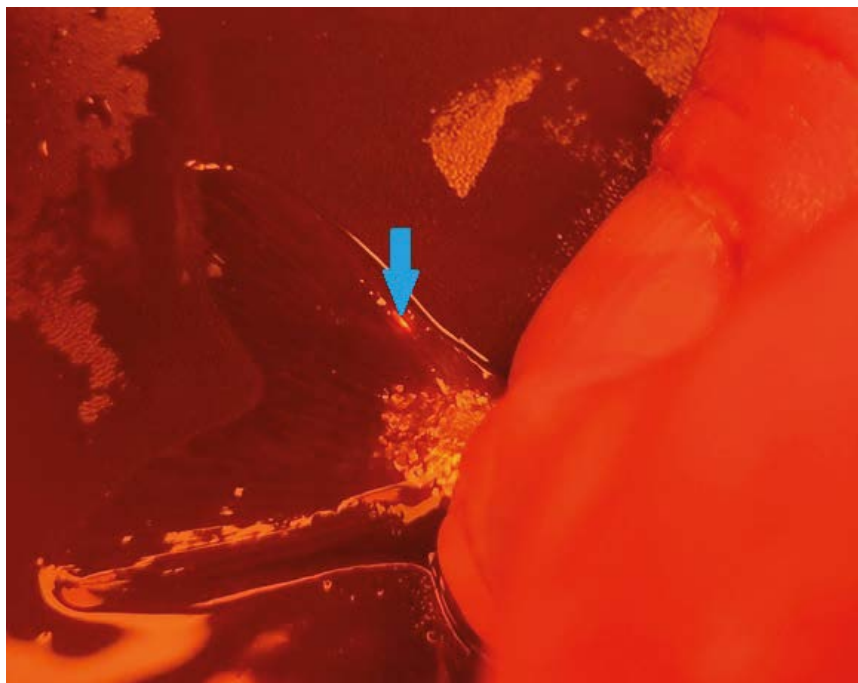
Obr. 5. Obarvené paprsky ocasní ploutve pstruha obecného (*Salmo trutta m. fario*) po nasvícení 532 nm laserem. Fotografováno přes ochranné brýle pro práci s laserem. (Foto: M. Avramović).

Tab. 6. Biometrické údaje značené a kontrolní (K) skupiny pstruhů obecných (*Salmo trutta m. fario*) ($n = 20$) a úspěšnost detekce v značení ve věku 158 dní: průměrná ($\pm$ SD) délka těla (DT), celková délka (CD) a hmotnost (Hm).

Skupina	Věk 158 dní			Detekovatelnost značení (%)
	DT (mm)	CD (mm)	Hm (g)	
K	75,0 $\pm$ 6,7	86,5 $\pm$ 7,6	5,9 $\pm$ 1,8	---
Značení	78,7 $\pm$ 7,8	90,7 $\pm$ 8,4	6,6 $\pm$ 2,1	100

2.3.3. Identifikace značení u lipana podhorního

Rozpoznatelnost značení byla u lipanů ve věku 170 dní 100 %, bez falešně pozitivní identifikace značení u kontrolních ryb. Na rozdíl od pstruhů obecných i duhových nebyly u některých jedinců lipana označeny celé báze ploutevnických paprsků, ale značení bylo identifikovatelné ostrůvkovitě, jako body či úseky označených paprsků ve spodní polovině ocasní ploutve (obr. 6). To naznačuje, že navzdory rychlejšímu růstu lipanů u nich neprobíhá osifikace ploutevnických paprsků spojitě a takovou rychlostí jako u pstruhů. V obou délkových parametrech ani v případě hmotnosti nebyly mezi skupinou značených ryb a kontrolními lipany zaznamenány statisticky významné rozdíly (tab. 7).



Obr. 6. Obarvený paprsek ocasní ploutve lipana podhorního (*Thymallus thymallus*) po nasvícení 532 nm laserem. Fotografováno přes ochranné brýle pro práci s laserem. (Foto: M. Avramović).

Tab. 7. Biometrické údaje značené a kontrolní (K) skupiny lipanů podhorních (*Thymallus thymallus*) ($n = 20$) a úspěšnost detekce značení ve věku 170 dní: průměrná ($\pm$ SD) délka těla (DT), celková délka (CD) a hmotnost (Hm).

Skupina	Věk 170 dní			Detekovatelnost značení (%)
	DT (mm)	CD (mm)	Hm (g)	
K	112,6 $\pm$ 7,6	129,5 $\pm$ 8,2	21,6 $\pm$ 4,3	---
Značení	121,8 $\pm$ 6,4	140,7 $\pm$ 6,8	23,8 $\pm$ 3,6	100

2.4. Shrnutí a závěry

Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že minimální věk pro označení juvenilních lososovitých ryb pomocí koupele v ARS (lze zakoupit např. na: P-LAB = Potřeby pro laboratoř, Chemikálie, Life Science, Nábytek), který umožňuje následnou efektivní detekci (úspěšnost detekce > 90 %) označených

VYUŽITÍ ALIZARINOVÉ ČERVENĚ (ARS) PŘI HROMADNÉM ZNAČENÍ JUVENILŮ LOSOSOVITÝCH RYB

ryb v terénních podmínkách, se pohybuje v rozmezí 60–70 dní od vylíhnutí, což odpovídá cca 700–800 denních stupňů u pstruha obecného a duhového a 1 200 denních stupňů u lipana podhorního. Pro všechny zmíněné druhy lze doporučit koncentraci značící koupele 150 mg.l^{-1} ARS a dobu trvání koupele 4 hodiny. Označení ryb v tomto věku umožní efektivní terénní identifikaci značení i v případě výrazného velikostního růstu označených jedinců, jak prokázaly výsledky experimentu se pstruhem duhovým. Značení většího množství ryb je nutno provádět v nádrži s dostatečnou plochou dna a zajištěným vzduchováním pro zabránění ztrát v důsledku udušení ryb nahromaděných u dna nádrže/nádoby. Pro úspěšnou identifikaci je nutné „proškolení“ hodnotitelů na označených rybách s dobře viditelným značením. Pro úspěšnou identifikaci značení lze doporučit umístění kontrolované ryby na černou podložku mimo přímé sluneční záření (stín) a anestezii kontrolovaných ryb. K vlastní identifikaci značení je třeba pouze zelené laserové ukazovátko (ideálně s výkonem 100 mW) emitující světlo o vlnové délce 532 nm a ochranné brýle pro práci s laserem, které zabraňují průchodu světla o vlnové délce 190–540 nm, ale umožňují pozorovat světlo o vlnové délce 580 nm (obojí lze zakoupit např. na: Laser-shop.cz - prodej laserové techniky a příslušenství).

3. Srovnání „novosti postupů“

Metodu využití alizarinové červeně (ARS) pro značení různých druhů ryb, včetně pstruha duhového a následnou identifikaci, značení popsali Halačka a kol. (2018a,b, 2021). Tato metodika rozšiřuje již publikované údaje o využití metody pro pstruha obecného a lipana podhorního coby naše původní druhy, jejichž populace v posledních letech výrazně klesají. Proto jsou do volných vod vysazovány i v raných věkových kategoriích. Metodika zároveň poskytuje informace o minimálním věku těchto druhů ryb pro efektivní identifikaci značení přímo v reálných terénních podmínkách, i v případě výrazného velikostního růstu označených jedinců. To může zpřístupnit použití této metody značení i uživatelům, jako jsou jednotlivé místní organizace Českého rybářského svazu. Právě ty se nejčastěji zabývají chovem a vysazováním pstruha obecného a lipana podhorního a v naprosté většině případů nemají možnost ověřit reálnou efektivitu svých aktivit.

4. Popis uplatnění certifikované metodiky

Využití metody značení a následné identifikace lososovitých ryb popsané v této metodice umožňuje rozšířit sledování efektivity vysazovacích programů v rámci managementu volných vod. Umožní označit vysazované ryby

a následně vyhodnotit efektivitu zvoleného postupu vysazování i organizacím či jednotlivcům bez speciálního vybavení, jako jsou např. místní organizace Českého rybářského svazu. Výzkumným institucím pak může popsaná metoda pomoci provádět experimenty s velkým množstvím lososovitých ryb malé velikosti, které byly při použití dalších metod značení dosud obtížně realizovatelné, nebo zcela neproveditelné.

5. Ekonomické aspekty

Současná cena ARS se pohybuje okolo 4 tisíc Kč za 100 g. Toto množství stačí při doporučené koncentraci 150 mg.l⁻¹ na cca 650 litrů značící koupele, což bohatě postačí pro označení tisíců až desetitisíců juvenilních jedinců lososovitých ryb. Pomůcky potřebné pro následnou detekci značení u znovuodlovených ryb představují jednorázovou položku v řádu jednotek tisíc Kč a jsou použitelné dlouhodobě po několik sezón. Oproti jiným metodám značení a identifikace ryb je časově, cenově, personálně i technicky nenáročná.

6. Seznam použité související literatury

- Baer, J., Rösch, R., 2008. Mass-marking of brown trout (*Salmo trutta* L.) larvae by alizarin: method and evaluation of stocking. *Journal of Applied Ichthyology* 24: 44–49.
- Caudron, A., Champigneulle, A., 2009. Multiple marking of otoliths of brown trout, *Salmo trutta* L., with alizarin redS to compare efficiency of stocking of three early life stages. *Fisheries Management and Ecology* 16: 219–224.
- Einum, S., Fleming, I.A., 2001. Implications of stocking: Ecological interactions between wild and released salmonids. *Nordic Journal of Freshwater Research* 75: 56–70.
- Fraser, D.J., Weir, L.K., Bernatchez, L., Hansen, M.M., Taylor, E.B., 2011. Extent and scale of local adaptation in salmonid fishes: Review and meta-analysis. *Heredity* 106: 404–420.
- Halačka, K., Poštulková, E., Kopp, R., Mareš, J., 2018a. Možnost využití značení štik pomocí Alizarinové červeně a způsob terénní detekce značených ryb. *Mendelova univerzita v Brně, Ústav biologie obratlovců AV ČR v.v.i. Technologie R18/2018*, 16 s.
- Halačka, K., Poštulková, E., Kopp, R., Mareš, J., 2018b. Alternativní značení vysazovaných ryb pro umožnění jejich následného sledování. *Mendelova univerzita v Brně, Ústav biologie obratlovců AV ČR v.v.i. Technologie R17/2017*, 18 s.
- Halačka, K., Mareš, J., Poštulková, E., Malý, O., 2021. Značení pstruha duhového pomocí alizarinu. *Certifikovaná metodika 14/2021, Ústav biologie obratlovců AV ČR*, 18 s.
- Järvi, T., 2002. Performance and ecological impacts of introduced and escaped fish: physiological and behavioural mechanisms-AQUAWILD. Final report to: European Commission EC Contract No. FAIR CT, 97-1957. National Board of Fisheries, Institute of Freshwater Research, Sweden.

VYUŽITÍ ALIZARINOVÉ ČERVENĚ (ARS) PŘI HROMADNÉM ZNAČENÍ JUVENILŮ LOSOSOVITÝCH RYB

- Lejk, A.M., Martyniak, A., 2018. Low temperature effect on multiple alizarin immersion mass-marking of juvenile sea trout *Salmo trutta* m. *trutta* L. otoliths. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 18: 747–752.
- Lejk, A.M., Radtke, G., 2021. Effect of marking *Salmo trutta lacustris* L. larvae with alizarin red S on their subsequent growth, condition, and distribution as juveniles in a natural stream. Fisheries Research 234: 105786.
- Lü, H.J., Fu, M., Xi, D., Yao, W.Z., Su, S.Q., Wu, Z.L., 2015. Experimental evaluation of using calcein and alizarin red S for immersion marking of bighead carp *Aristichthys nobilis* (Richardson, 1845) to assess growth and identification of marks in otoliths, scales and fin rays. Journal of Applied Ichthyology 31: 665–674.
- Lü, H.J., Fu, M., Dai, S., Xi, D., Zhang, Z.X., 2016. Experimental evaluation of calcein and alizarin red S for immersion marking of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844). Journal of Applied Ichthyology 32: 83–91.
- Metcalfe, N.B., Valdimarsson, S.K., Morgan, I.J., 2003. The relative roles of domestication, rearing environment, prior residence and body size in deciding territorial contests between hatchery and wild juvenile salmon. Journal of Applied Ecology 40: 535–544.
- Puchtler, H., Meloan, S.N., Terry, M.S., 1968. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red s stains for calcium. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 17: 110–124.
- Thorsteinsson, V., 2002. Tagging methods for stock assessment and research in fisheries. Report of Concerted Action FAIR CT.96.1394 (CATAG). Marine Research Institute Technical Report (no. 79), Iceland, 179 pp.
- Uglen, I., Kristiansen, T.S., Mejdell, C.M., Basic, D., Mortensen, S., 2020. Evaluation of large-scale marking methods in farmed salmonids for tracing purposes: Impact on fish welfare. Reviews in Aquaculture 12: 600–625.
- Unfer, G., Pinter, K., 2013. Marking otoliths of brown trout (*Salmo trutta* L.) embryos with alizarin red S. Journal of Applied Ichthyology 29: 470–473.
- Warren-Myers, F., Dempster, T., Swearer, S.E., 2018. Otolith mass marking techniques for aquaculture and restocking: benefits and limitations. Reviews in Fish Biology and Fisheries 28: 485–501.

7. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Turek, J., Horký, P., Slavík, O., Randák, T., 2014. Značení ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 154, 33 s.
- Turek, J., Lepič, P., Bořík, A., Galicová, P., Nováková, P., Avramovič, M., Randák T., 2024. Evaluation of large-scale marking with Alizarin S in different age rainbow trout fry for nonlethal field identification. Acta Ichthyologica et Piscatoria 54: 43–48.

Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Ministerstva zemědělství České republiky – projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QK23020064 Zhodnocení hydrologické situace pstruhových toků ČR a stavu populací lososovitých ryb v souvislosti s klimatickou změnou – 90 %, a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy – projektu CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000869 Udržitelná produkce zdravých ryb v různých akvakulturních systémech (PROFISH) – 10 %.

Externí odborný oponent

doc. Ing. Pavel Horký, Ph.D.

Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha 6 Suchbát

Interní odborný oponent

doc. RNDr. Zdeněk Adámek, Ph.D.

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Zátíší
728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz*

Oponent za státní správu

Ing. Ondřej Tomášek

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

*Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. MZE-80968/2024-16232 ze dne
25. 11. 2024 vydalo Ministerstvo zemědělství Odbor státní správy lesů, myslivosti
a rybářství Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1*

Adresa autorského kolektivu

Ing. Jan Turek, Ph.D. – 50%

M.Sc. Mladen Avramović – 20%

Ing. Adam Bořík, Ph.D. – 10%

Ing. Pavel Lepič, Ph.D. – 10%

prof. Ing. Tomáš Randák, Ph.D. – 10%

*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 2024; vytištěna v roce 2025;
grafický design a technická realizace: Jesenické nakladatelství Jena Šumperk.*



Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



ISBN 978-80-7514-213-9