

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

**Optimalizace procesu triploidizace u candáta
obecného (*Sander lucioperca*)**

Autor: Bc. Kamil Trnka

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Tomáš Polícar, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Ing. Václav Kučera

Studijní program a obor: Zemědělská specializace, Rybářství a ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: Druhý

České Budějovice, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 2023

Podpis studenta

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Tomáši Polícarovi Ph.D. za ochotu, odbornou pomoc, poskytnuté rady a zpracování dat při realizaci experimentu a vypracování méj diplomové práce. Dále bych také poděkoval i mému konzultantovi Ing. Václavu Kučerovi za odbornou pomoc při zpracování dat a za cenné rady v průběhu experimentů. Na tomto místě bych velmi rád poděkoval i všem kolegům z Laboratoře intenzivní akvakultury a Laboratoře molekulární, buněčné a kvantitativní genetiky za odbornou pomoc při jednotlivých experimentech a analýzách ploidní úrovně vylíhnutých larev.

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval i své rodině a své přítelkyni.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kamil TRNKA**
Osobní číslo: **V21N002P**
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**
Téma práce: **Optimalizace procesu triploidizace u candáta obecného (*Sander lucioperca*)**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Zásady pro vypracování

Candát obecný (*Sander lucioperca*) je významný a perspektivní hospodářský druh v rámci sladkovodní akvakultury. Tento dravý druh je vysoce oblíbený mezi konzumenty ryb z důvodu vyšší nutriční a organoleptické kvality jeho svaloviny. Dále je tento druh velmi populární mezi sportovními rybáři z důvodu jeho způsobu lovu a také mezi produkčními rybáři pro jeho vysokou realizační prodejní cenu a biomediorační schopnost eliminovat méně cenné ryby v produkčních rybnících. Z výše uvedeného vyplývá, že je o candáta obecného na evropském trhu poměrně velký zájem. Na druhé straně je produkce candáta neustále nedostatečná z důvodu technologických problémů v jeho chovu, které způsobují poměrně vysoké ztráty a nízký růst ryb různých věkových kategorií. Ze zmíněných informací vyplývá, že na evropském trhu neustále převyšuje poptávka po tržním či násadovém candátu obecném nad nabídkou. Nedostatek candátů na trhu se hlavně projevuje v Německu, Francii a Rakousku. Snahou v posledních dvou až třech desetiletích je v celé Evropě více experimentálně a poloprovozně optimalizovat a technologicky podporovat kontrolovaný intenzivní chov candáta v RAS (recirkulačních akvakulturních systémech), jeho řízení reprodukci a domestikaci. Snahou této činnosti je dosahovat u tohoto druhu daleko vyšší efektivity chovu a produkce, a tím i vyšší rentability rybářských podniků, které se právě na chov a produkci candáta specializují. Vedle zmíněných chovatelských inovativních postupů se v budoucnu především v progresivním rybničním chovu candáta může uplatnit úspěšná indukce, produkce a chov triploidních populací. Triploidní populace candáta obecného v rybnících by měly dosahovat vysoké míry sterility, jelikož se u nich nebudou vyvíjet gonády. Takovéto ryby se budou pravděpodobně vyznačovat klidnějším chováním, nižší agresivitou, vyšší mírou přežití a možná i dokonce rychlejším růstem, lepší konverzí živin a vyšší výtěžností filet. Experimentální pokusy produkovat triploidní larvy u candáta obecného pomocí fyzikálních šoků: teplým (29-31 °C), chladovým (1-1,1 °C) a tlakovým (48,3-62,1 MPa) již proběhly, avšak jejich efektivita u neúspěšněji provedených ošetření nebyla příliš vysoká v podobě relativně nízké míry produkce (13-55,2 %) a přežití (6,4-63 %) triploidních larev. Z tohoto důvodu tato diplomová práce bude dále experimentálně hledat a optimalizovat průběh a provedení řízených fyzikálních šoků po oplození jiker s cílem řízeně indukovat a úspěšně produkovat triploidní larvy candáta obecného s vyšší mírou produkce a přežitím. Diplomová práce bude realizována v rámci projektu NAZV č. QK2202144, projektu Velká výzkumná infrastruktura LM2018099 Cenakva a týmového projektu GAJU, které jsou v současné době řešeny v Laboratoři intenzivní akvakultury na VÚRH Vodňany (FROV JU).

Rozsah pracovní zprávy: **50-90 stran**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Blecha, M., Flajshans, M., Lebeda, I., Kristan, J., Svacina, P., Polícar, T., 2016. Triploidisation of pikeperch (*Sander lucioperca*), first success. *Aquaculture* 462: 115-117.
Dadras, H., Blecha, M., Malinovskyi, O., Flajshans, M., Lebeda, I., Křišťan, J., Polícar, T., 2021. Triploidisation in pikeperch (*Sander lucioperca*) induced by cold shock. *Aquaculture*, 533: 736236.

- Malison, J.A., Kayes, T.B., Held, J.A., Barry, T.P., Amundson, Ch., 1993a. Manipulation of ploidy in yellow perch (*Perca flavescens*) by heat shock, hydrostatic pressure shock, and spermatozoa inactivation. *Aquaculture* 110: 229-242.
- Malison, J.A., Procarione, L., Held, J.A., Kayes, T.B., Amundson, Ch., 1993b. The influence of triploidy and heat hydrostatic pressure shocks on the growth and reproductive development of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquaculture* 116: 121-133.
- Malison, J.A., Garcia-Abiado, A.R., 1996. Sex control and ploidy in yellow perch (*Perca flavescens*) and walleye (*Stizostedion vitreum*). *Journal of Applied Ichthyology* 12: 189-194.
- Malison, J.A., Held, J.A., Weil, L.S., Kayes, T.B., Thorgaard, G.H., 2001. Manipulation of ploidy in walleyes by heat shock and hydrostatic pressure shock. *North American Journal of Aquaculture* 63:17-24.
- Overton, J.L., Toner, D., Policar, T., Kucharczyk, D., 2015. Chapter 35: Commercial production: Factors for success and limitations in European percid fish culture. In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (eds.): *Biology and Culture of Percid Fishes – Principles and Practices*, Springer New York, New York, USA, pp. 881 – 890.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguiere, J.C., Flajshans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293: 125-156.
- Policar, T., Bláha, M., Kříšťan, J., Stejskal, V., 2011. Kvalitní a vyrovnaná produkce rychleného plůdku candáta obecného (*Sander lucioperca*) v rybnících. *Edice Metodik (Ověřená technologie)*, FROV JU Vodňany 110: 33s.
- Policar, T., Kříšťan, J., Blecha, M., Vaniš, J., 2014. Adaptace chov juvenilních ryb candáta obecného (*Sander lucioperca* L.) v recirkulačním akvakulturním systému (RAS). *Edice metodik (Technologická řada)*, FROV JU Vodňany 141: 46 s.
- Policar, T., Schaefer, F., Panana, E., Meyer S., Teerlinck S., Toner, D., Žarski, D., 2019. Recent progress in European percid fish culture production technology – Tackling bottlenecks. *Aquaculture International*, 27: 1151-1174.
- Policar, T., Kříšťan, J., Dadras, H., Flajshans, M., 2019b. Produkce a využití triploidů u okounovitých ryb. *Edice Metodik (Certifikovaná metodika)*, FROV JU Vodňany, 179: 30 s.
- Rougeot, C., Minet, L., Prignon, C., Vanderplasschen, A., Detry, B., Pastoret, P-P., Melard, C., 2003. Induce triploidy by heat shock in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquatic Living Resources* 16:90-94.
- Rougeot, C., 2015. Chapter 23: Sex and ploidy manipulation in percid fishes. In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (Eds), *Biology and Culture of Percid Fishes-Principles and Practices*. Springer, New York, USA, pp. 625-634.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Tomáš Policar, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant diplomové práce: **Bc. Václav Kučera**

Datum zadání diplomové práce: **21. ledna 2022**

Termín odevzdání diplomové práce: **2. května 2023**





prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan
prof. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.
ředitel

Obsah

1. ÚVOD	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1. CANDÁT OBECNÝ (<i>SANDER LUCIOPERCA</i>).....	11
2.1.1. <i>Taxonomické zařazení</i>	11
2.1.2. <i>Výskyt</i>	12
2.1.3. <i>Význam candáta</i>	13
2.1.4. <i>Morfologie druh</i>	15
2.1.5. <i>Potrava a růst</i>	16
2.1.6. <i>Nároky na prostředí</i>	17
2.1.6.1. <i>Kyslík</i>	17
2.1.6.2. <i>Teplota</i>	18
2.1.6.3. <i>Intenzita osvětlení</i>	19
2.1.6.4. <i>Dusík</i>	19
2.1.7. <i>Rozmnožování</i>	20
2.1.7.1. <i>Přirozený výtěr</i>	20
2.1.7.2. <i>Řízená reprodukce</i>	21
2.1.7.2.1. <i>Přirozený výtěr bez hormonální stimulace ovulace</i>	22
2.1.7.2.2. <i>Poloumělý výtěr generačních ryb na hnízda s nebo bez hormonální stimulace</i>	22
2.1.7.2.3. <i>Umělý výtěr s hormonální stimulací ovulace</i>	23
2.1.8. <i>Chov candáta v recirkulačním akvakulturním systému (RAS)</i>	24
2.2. POLYPLOIDIE U RYB.....	25
2.3. AUTOPOLYPLOIDIE A ALOPOLYPLOIDIE	26
2.4. UMĚLE INDUKOVANÁ POLYPLOIDIE.....	27
2.4.1. <i>Triploidizace</i>	27
2.4.2. <i>Tetraploidizace</i>	28
2.5. TYPY ŠOKŮ K NAVOZENÍ UMĚLÉ POLYPLOIDIZACE.....	29
2.5.1. <i>Mechanické šoky</i>	29
2.5.2. <i>Chemické šoky</i>	30
2.5.3. <i>Fyzikální šoky</i>	30
2.5.3.1. <i>Elektrofúze</i>	30
2.5.3.2. <i>Teplotní šoky</i>	30

2.5.3.2.1. Teplé šoky	31
2.5.3.2.2. Chladové šoky	31
2.5.3.3. Tlakové šoky	32
2.6. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ EFEKTIVITU UMĚLÉ POLYPLOIDIZACE	33
2.6.1. Čas zahájení šoku po aktivaci gamet (oplození jiker).....	33
2.6.2. Intenzita šoku.....	34
2.6.3. Expozice šoku	34
2.7. METODY VYUŽÍVANÉ K URČENÍ PLOIDNÍ ÚROVNĚ U RYB.....	35
2.7.1. Přímé metody – průtoková cytometrie.....	35
2.7.2. Nepřímé metody.....	36
2.7.3. Morfologické rozdíly mezi triploidy a diploidy	36
2.8. PRODUKCE A VYUŽITÍ TRIPLOIDNÍCH OKOUNOVITÝCH RYB	37
3. METODIKA	40
3.1. MÍSTO PROVEDENÍ EXPERIMENTŮ.....	40
3.2. PŘÍPRAVA GENERAČNÍCH RYB NA UMĚLÝ VÝTĚR	40
3.3. EXPERIMENT Č. 1: CHLADOVÝ ŠOK	43
3.3.1. Příprava chladové lázně.....	43
3.3.2. Oplození a aktivace gamet	43
3.3.3. Inkubace jiker v aparátech	44
3.3.4. Počítání larev, líhivost, deformita	46
3.4. EXPERIMENT Č. 2: TEPLÝ ŠOK	47
3.4.1. Příprava teplé lázně	47
3.4.2. Oplození a aktivace gamet	48
3.4.3. Inkubace jiker v aparátech	48
3.4.4. Počítání larev, líhivost, deformita	49
3.5. EXPERIMENT Č. 3: TLAKOVÝ ŠOK.....	51
3.5.1. Příprava tlakové jednotky.....	51
3.5.2. Oplození a aktivace gamet.....	53
3.5.3. Odlepkování jiker před umístěním do tlakové nádoby	54
3.5.4. Průběh tlakového šoku, inkubace jiker, počítání larev	54
3.6. FIXACE A ZAMRAZENÍ VZORKŮ K NÁSLEDNÝM ANALÝZÁM POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE.....	56
3.7. MĚŘENÍ PLOIDNÍ ÚROVNĚ PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ.....	56

3.8.	STATISTICKÉ HODNOCENÍ DAT.....	57
4.	VÝSLEDKY.....	58
4.1.	CHLADOVÝ ŠOK.....	58
4.1.1.	<i>Chladový šok s 20minutovou expozicí.....</i>	<i>58</i>
4.1.2.	<i>Chladový šok se 40minutovou expozicí.....</i>	<i>59</i>
4.1.3.	<i>Chladový šok se 60minutovou expozicí.....</i>	<i>59</i>
4.1.4.	<i>Chladový šok s 90minutovou expozicí.....</i>	<i>60</i>
4.1.5.	<i>Chladový šok se 120minutovou expozicí.....</i>	<i>61</i>
4.2.	TEPLÝ ŠOK.....	62
4.2.1.	<i>Teplý šok s 5minutovou expozicí.....</i>	<i>62</i>
4.2.2.	<i>Teplý šok s 10minutovou expozicí.....</i>	<i>63</i>
4.2.3.	<i>Teplý šok s 20minutovou expozicí.....</i>	<i>64</i>
4.2.4.	<i>Teplý šok se 30minutovou expozicí.....</i>	<i>65</i>
4.2.5.	<i>Teplý šok se 40minutovou expozicí.....</i>	<i>65</i>
4.3.	TLAKOVÝ ŠOK.....	66
5.	DISKUZE.....	68
6.	ZÁVĚR.....	73
7.	SEZNAM TABULEK.....	75
8.	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY.....	76
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	90

1. Úvod

Candát obecný (*Sander lucioperca*) je jednou z nejvíce oblíbených chovaných evropských okounovitých ryb ve sladkovodní akvakultuře (Kestemont a Dabrowski, 1996). Jedná se o druh ryby, který je možné chovat buď v rybníční akvakultuře, nebo také za pomoci intenzivní akvakultury v tzv. recirkulačním akvakulturním systému (RAS) či je možné tyto metody společně kombinovat (Policar a kol., 2019).

Tento druh je dnes konzumenty vysoce preferovanou rybou, hlavně po celé Evropě, a to především díky jeho vysoké kvalitě masa. Candát obecný je také známý pro jeho vysokou oblibu u sportovních rybářů (Dil, 2008; Schulz a kol., 2007). V dnešní době jsou divoké populace ze svých přirozených vod hojně loveny, a tak dochází k úbytku těchto ryb (Hladík, 2015). Jeho dnešní oblibu můžeme zaznamenat hlavně na trhu Švýcarska, Německa a také skandinávských a středoevropských zemí, jako je Rakousko, Polsko, Česká republika a Maďarsko (Toner, 2015). Candát je pro chovatele důležitý z hlediska jeho vysoké tržní hodnoty (Policar a kol., 2016; 2017). Candát se také využívá k biomelioračním procesům ve vodárenských nádržích. Jeho úkolem je snaha o redukci kaprovitých ryb (Adámek a kol., 2008).

V průběhu 20. století došlo ke snaze vytvořit různé principy, které by vedly k navození polyploidního stavu u ryb. Tyto principy byly od 70. let 20. století využívány k produkci neplodných rychle rostoucích nebo plodných rychle rostoucích ryb a měkkýšů s často vyšší kvalitou svaloviny využívaných ve sladkovodní a mořské akvakultuře. Nejvíce preferovanou metodou indukce polyploidie je tzv. triploidie, popřípadě lze také využít tetraploidii. Těchto jevů lze docílit díky fyzikálním nebo chemickým zásahům ve vývoji zygoty (tzv. fyzikální a chemické šoky) (Flajšhans a kol., 2013).

Metodou triploidizace se myslí, že daný organismus má ve svých buňkách oproti většině živočichů místo dvou sad chromozomů ($2n$) tři sady chromozomů ($3n$). Tento jev je možné navodit uměle, nebo se také může objevit spontánně. Zcela přirozený výskyt triploidie můžeme zaznamenat při delším uchování neoplozených jiker (Flajšhans a kol., 2013).

Uměle se snažíme navodit indukci triploidie především pro komerční akvakulturní účely. Indukce triploidie má několik hlavních produkčních výhod.

Hlavní výhodou je úplná nebo částečná sterilita (neplodnost), která vede především ke zrychlenému růstu ryb oproti diploidním (plodným) rybám, které investují velkou část energie k dosažení pohlavní zralosti. Tyto triploidní ryby ve finále poskytují vyšší celkovou efektivitu chovu, která je způsobena hlavně díky vyšší výtěžnosti svaloviny, lepším organoleptickým vlastnostem masa, ale také má za následek snížení stresu ryb, a také dochází k nižšímu poranění chovaných ryb. Všechny tyto aspekty jsou dány absencí sexuálního, teritoriálního a agresivního chování ryb. V neposlední řadě můžeme sledovat zlepšení konverze krmiv v chovech (snížení spotřeby krmiva na přírůstek 1 kg tělesné hmotnosti). Tyto výhody směřují ke zlepšení rentability chovu a veškerých ekonomických ukazatelů akvakultury (Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013; Policar a kol., 2019c). V případě užití triploidie k rychlejšímu růstu, aplikujeme metodu triploidizace pouze u ryb, které dosahují tržní hmotnosti až po dosažení pohlavní dospělosti (Flajšhans a kol., 2013).

V chovech se v dnešní době nejčastěji používá k navození triploidního stavu tzv. teplotních šoků. Ty můžeme rozdělit na šoky chladové a šoky teplé. Další možností dosažení triploidie je šok tlakový. Tyto šoky jsou aplikovány po oplození a aktivaci gamet při umělých výtěrech ryb a mají za následek zadržení druhého pólového tělíska. Další možností bylo využívání chemických šoků, které se ale u ryb v současné době nepoužívá (Piferrer a kol., 2009; Rougeot, 2015).

Triploidní neplodné ryby jsou využívány k vysazování nepůvodních druhů do volných vod tam, kde zákon zakazuje vysazovat druhy, které jsou schopné se rozmnožovat, např. triploidní amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*) je využíván k redukci vodních porostů v USA a na Novém Zélandě. V Izraeli využívají sterilního amura černého (*Mylopharyngodon piceus*) ke snížení počtu měkkýšů z vodárenských nádrží (Flajšhans a kol., 2013).

Cílem experimentů v rámci této diplomové práce bylo využít různé metody teplotních a tlakových šoků s různými intenzitami ke vzniku triploidních candátů obecných, sledovat a porovnat celkovou líhivost jiker a ploidní úroveň larev s využitím průtokové cytometrie.

2. Literární přehled

2.1. Candát obecný (*Sander lucioperca*)

2.1.1. Taxonomické zařazení

Tab. 1: Taxonomické zařazení candáta obecného (*Sander lucioperca*) (Dubský a kol., 1998).

Říše	živočichové (<i>Animalia</i>)
Kmen	strunatci (<i>Chordata</i>)
Podkmen	obratlovci (<i>Vertebrata</i>)
Třída	ryby (<i>Osteichthyes</i>)
Podtřída	paprskoploutví (<i>Actinopterygii</i>)
Řád	ostnoploutví (<i>Perciformes</i>)
Čeleď	okounovití (<i>Percidae</i>)
Rod	candát (<i>Sander</i>)

Spolu s candátem obecným (*Sander lucioperca*) můžeme do rodu *Sander* zařadit i další druhy candátů: candáta východního (*Sander volgensis*), candáta severoamerického (*Sander vitreus*), candáta kanadského (*Sander canadensis*) a candáta mořského (*Sander marinus*), který žije v moři (Stepien a Haponski, 2015).

Na candáta východního (*Sander volgensis*) můžeme narazit pouze v řekách Černého a Kaspického moře, jako je například řeka Volha, Ural nebo Dunaj. Candát severoamerický (*Sander vitreus*) se vyskytuje ve středozemí Severní Ameriky a v jižní oblasti států Alabama, Mississippi, Arkansas a jeho výskyt sahá až po stát Texas. Candát kanadský (*Sander canadensis*) žije v řece Mississippi a řekách v Alabamě i na Floridě a lze na něj narazit i v jezerech Arkansasu. Candát mořský (*Sander marinus*) preferuje brakické euroasijské vody v ústí řek Černého a Kaspického moře (Baruš a Oliva, 1995; Bokor a kol., 2007; Clark-Kolaks, 2009).



Obr. 1: Candát obecný (*Sander lucioperca*) ulovený na ÚN Vranov (foto: K. Trnka)

2.1.2. Výskyt

Candát obecný je ryba, která se vyskytuje v celé Evropě. Jeho nejčastější původní výskyt byl mapován v povodí řek Labe a Dunaje, dále se přirozeně vyskytuje nejen v řekách ústících do Kaspického a Černého moře, ale také v okolí Aralského jezera včetně oblasti severního Turecka. Na východě je rozšířen hlavně v řece Volze. Na severu se vyskytuje v úmoří Baltského moře

společně s jižní oblastí Finska a Švédska. Výskyt candáta obecného nebyl zaznamenán v řekách ústících do Severního ledového oceánu. Od roku 1920 byl postupně introdukován do Francie, Švýcarska, Itálie, Anglie, na Pyrenejský a na Balkánský poloostrov. Díky umělé introdukci se lze v dnešní době s candátem setkat téměř v celé Evropě (Baruš a Oliva, 1995).

V České republice je candát původním druhem. V naší oblasti se s candátem můžeme setkat ve všech typech vod, a to především ve stojatých vodách a v řekách s pomalejším prouděním vody. Nejčastější místa výskytu jsou řeky Labe, Odra a řeka Morava. Rozšíření candáta v Evropě je hojně podporováno umělou introdukcí násad různých věkových kategorií (Hanel a Lusk, 2005). Preferuje hlavně hlubší nádrže s tvrdým, šterko-písčitým a členitým dnem s dostatkem úkrytů v podobě různých pařezů a kamenů. Candát je stanovištní rybou, která preferuje hluboké části nádrží a řek. Na lov vyráží do mělčích litorálních partií. Přezimuje v hloubce ve fyziologickém klidovém stavu (Holčík a Mihálik, 1971).

2.1.3. Význam candáta

Candát obecný je velice významný a vysoce ceněný dravý druh ryby v evropské sladkovodní akvakultuře (Kestemont a Dabrowski, 1996; Kestemont a Melard, 2000; Dil, 2008). Candát je v posledních letech velice žádanou rybou u evropských konzumentů ryb (Dil, 2008). Jeho kvalita masa je velice oblíbená v oblasti sportovního rybolovu (Kestemont a Melard, 2000; Schulz a kol., 2007). Při chovu candáta je třeba udržovat optimální podmínky, a pak ho lze chovat v RAS ve vysokých hustotách obsádky s využitím peletovaného krmiva (Policar a kol., 2013). Podle Dil (2008) je produkce tržních candátů neustále nestabilní a kvalitativně a kvantitativně nevyrovnaná. A na základě těchto informací a faktů lze předpokládat, že produkce v evropské intenzivní akvakultuře se bude neustále zvyšovat (Policar a kol., 2013).

Aktuální roční produkce candáta je založena zejména na lovu přirozeně se vyskytujících ryb z oblasti ruských, kazachstánských a estonských jezer, dále také z oblastí Finska, Švédska, Německa, Nizozemí a Polska (Dil, 2008, FAO, 2012). Skrze intenzivní lov dochází ke snižování přirozených obsádek candátů, které můžeme pozorovat ve statistikách odlovu candáta z volných vod.

Absolutní produkce candáta je přibližně 9 000 až 15 000 tun tržních ryb (FAO, 2012). Například v 70. letech 20. století bylo z jezer východní Evropy odloveno přes 40 000 t tržních ryb, tato hodnota se za posledních 30–40 let snížila o více než polovinu. Další statistiky z roku 2009 udávají, že celková roční produkce candáta z volných vod byla 9 221 t a pouze 408 t bylo vyprodukováno intenzivním akvakulturním chovem (FAO, 2011). I tak se celková produkce lovem candátů v posledních deseti letech z volných vod snížila, a to ze 14 308 tun (2002) na produkci 9 221 t v roce 2009 (FAO, 2011). Tento stav je způsoben díky poklesu množství přirozeně se vyskytujících candátů (Dil, 2008). To vše je způsobeno snížením životaschopnosti a reprodukovatelnosti přirozeně se vyskytujících populací, společně s nadměrným využíváním přirozených lokalit rybáři (Müller-Belecke a Zeinert, 2008). Naopak v intenzivních akvakulturních chovech můžeme pozorovat nárůst vyprodukovaných ryb (Policar a kol., 2013).

Candát je velice oblíbenou sladkovodní rybou u konzumentů a u sportovních rybářů. V současné době je jím trh nedostatečně zásobován. Díky tomuto problému je tržní cena candáta na čím dál tím vyšší úrovni. Současná velkoobchodní cena se pohybuje v rozmezí 5,6–12,5 USD.kg⁻¹ (celá ryba), ale v některých zemích, jako je např. Německo a Francie, mohou ceny dosahovat až 22,2 USD.kg⁻¹ (FAO, 2023). V České republice se maloobchodní cena candáta pohybuje okolo 405 Kč za kg (kuchaný), za filet s kůží okolo 550 Kč za kg (www.prodejryb-tabor.cz). Rybářství Pohořelice udává maloobchodní cenu 550 Kč za kg živé ryby a 545 Kč za kg kuchané ryby, v případě filetu s kůží je cena dokonce 695 Kč za kg (www.rybnikarstvipoehorelice.cz).

Produkce tržního candáta obecného je ve střední a západní Evropě dosahováno pomocí extenzivního chovu v rybniční akvakultuře s polykulturními obsádkami ryb. Hlavními producenty candáta je Česká republika, Maďarsko, Ukrajina, Bulharsko, Rumunsko, Polsko a Německo. V těchto zemích se touto metodou vyprodukuje 300–500 tun tržních candátů ročně. V této polykulturní obsádce je candát chován společně s kaprem obecným (*Cyprinus carpio*), línem obecným (*Tinca tinca*), amurem bílým (*Ctenopharyngodon idella*) a tolstolobíkem bílým (*Hypophthalmichthys molitrix*), kdy je candát vysazován především k redukci tzv. bílé ryby (např. cejn velký – *Abramis brama*, cejn malý – *Abramis bjoerkna*, plotice obecná –

Rutilus rutilus, perlín ostrobřichý – *Scardinius erythrophthalmus*, střevlička východní – *Pseudorasbota parva* a další) (Wedekind, 2008; Adámek a kol., 2010; Kratochvíl, 2012). V Evropě je akvakulturou vyprodukováno přibližně 500–1000 tun tržních candátů (Polícar a kol., 2014). Česká republika vyprodukuje přibližně 50 000 tun candáta za rok (FAO). Značná obliba candáta u konzumentů a u sportovních rybářů, a také nedostatečně zásobený trh v Evropě dává šanci chovatelům se více věnovat chovu tohoto druhu ryby (Polícar a kol., 2013).

V posledních letech je k produkci candáta využíváno intenzivních akvakulturních chovů v uzavřených RAS (Polícar a kol., 2014). Tento způsob chovu na rozdíl od rybníční produkce využívá domestikované ryby (Fontaine, 2009). Vhodnou reprodukční metodou je realizace poloumělých výtěrů na umělá předem připravená hnízda, realizace umělých výtěrů s umělým osemeněním a odlepkováním jiker (Demska-Zakes a Zakes, 2002; Zakes a Szczepkowski, 2004; Musil a Kouřil, 2006), s pokračujícím odchovem larev a juvenilů v RAS lze také využít umělá peletovaná krmiva k odchovu ryb (Zakes a kol., 2004; Kestemont a kol., 2007; Wang a kol., 2009). V kontrolovaných podmínkách lze juvenilní a tržní candáty chovat v hustotách až do 50 kg ryb na 1000 litrů vody (Wedekind, 2008). Tyto metody disponují velkou výhodou chovu v optimálních kontrolovaných podmínkách, právě díky možnosti řídit a kontrolovat teplotu a kvalitu vody, včetně nasycení vody kyslíkem (ideálně teplota vody 23 °C a 100% nasycení vody kyslíkem) (Wang a kol., 2009).

2.1.4. Morfologie druh

Candát obecný je dravá sladkovodní ryba s protáhlým válcovitým tvarem těla, které je ze stran mírně zploštělé. Hlava je klínového tvaru a je mírně zploštělá. V přední části hlavy se vyskytují poměrně velké oči. V tlamě se na spodní i horní čelisti nachází velké množství drobnějších zoubků. V přední části úst na horní i dolní čelisti můžeme vidět velké výrazné zuby, tzv. psí zuby (Baruš a Oliva, 1995; Dubský a kol., 2003). Od candáta východního lze candáta obecného rozeznat podle psích zubů, společně s rozeklanými ústy, které dosahují až k zádní části oka a podle velkých očí na hlavě, jež jsou pro tento druh candáta charakteristické (Dungel a Řehák, 2005). Barva těla je šedozeleň až tmavě šedá

s olivovými odstíny. Na těle se nachází 8–12 tmavých příčných pruhů, břišní strana je bělavá. Candát má 13 tyčinek na žaberním oblouku, které mohou s věkem stoupat (Baruš a Oliva, 1995). Tělo ryby je pokryto šupinami ktenoidního typu, ty jsou na povrchu drsné (Hanel a Lusk, 2005). Břišní ploutve jsou posunuty k prsním ploutvím. Jeho ocasní ploutev má zřetelné mírné vykrojení a na hřbetní straně se vyskytuje dvojité hřbetní ploutev. Přední ploutev je trnitá a obsahuje tvrdé paprsky na rozdíl od zadní hřbetní ploutve, která má paprsky měkké. Tyto paprsky jsou na koncích větvené (Lusk a kol., 1992). Podle Baruš a Oliva (1995) je ploutevní vzorec: D₁ XII–XV; D₂ I–III, 19-23; A I–III, 9–12; P 15; V I, 5. Candát se může dožít až 20 let a může dosáhnout až 1–1,3 m s hmotností 13 kg (Hanel, 1997). Menší jedinci žijí v hejnech, na rozdíl od starších jedinců, kteří preferují samotářský způsob života (Baruš a Oliva, 1995).

2.1.5. Potrava a růst

Candát je typickou dravou rybou sladkovodních vod, jeho hlavní potravou v dospělosti jsou menší ryby (Baruš a Oliva, 1995). Sedlár a Žitňan (1974) uvádějí, že na přírůstek 1 kg hmotnosti potřebuje candát 3,5–6 kg potravních ryb, to znamená, že v přirozených podmínkách zkonsumuje candát přibližně 200–250 % své hmotnosti za rok. První potravou larev jsou zejména vývojová stádia klanonožců (*Copepoda*), perlooček (*Cladocera*) a vířníků rodu *Rotaria*. Poté následuje přechod na větší zooplankton. Už ve velikosti 12 mm lze sledovat první kanibalismus, ale většina ryb přechází na dravý způsob života (piscivorní) až ve velikosti 30–50 mm, kdy je schopen lovit malé rybičky (Baruš a Oliva, 1995; Balik a kol., 2006). Velikost lovených ryb se s rostoucí délkou těla postupně zvětšuje. Větší jedinci jsou schopni také konzumovat larvy hmyzu, např. pakomárovití (*Chironomidae*), komárovití (*Culicidae*), chrostíci (*Trichoptera*), jepice (*Ephemeroptera*) a následně přecházejí na lov ryb (Dyk, 1956). Hlavní výhodou candáta při lovu je jeho velice kvalitní zrak. Oči jsou vybaveny tenkou vrstvou irydocytů na vnitřní straně oka. Tyto buňky využívají barvivo, které odráží dopadající světlo, tím pádem dobře vidí i ve tmě. Důkazem přítomnosti barviva je světélkování očí candáta ve tmě (Dubský a kol., 2003).

Přírůstky candáta se pohybují v rybničním chovu okolo 80–150 mm celkové délky o hmotnosti 10–15 g za rok, ve druhém roce potom 200–300 mm

a hmotnosti 250–500 g, ve třetím roce 300–350 mm celkové délky a hmotnosti 500–100 g (Volf, 1928).

Lepších přírůstků dosahuje candát v RAS produkčních chovech určených na výkrm do tržní velikosti, kam se vysazují k odchovu ryby o hmotnosti 15–30 g. Z počátku (10–100 g) se obsádka ryb pohybuje od 10 do 30 kg.m⁻³, nádrže o objemu 10–30 m³. Větší nádrže s objemem vody až 100 m³ se používají ve fázi, kdy se ryby chovají do velikosti až 1 kg při maximální hustotě obsádky 80 kg.m⁻³. V tomto odchovu musí být ryby pravidelně tříděny. V rámci tohoto konečného odchovu dochází k prvnímu třídění obvykle při kusové hmotnosti 100–150 g, následně při 200–250 g a k poslednímu třídění dochází, když ryby dosáhnou velikosti 500–600 g. Hmotnosti 1 kg u candáta lze dosáhnout přibližně po 15–18 měsících odchovu v RAS (Szkudlarek a Zakęś, 2002).

2.1.6. Nároky na prostředí

2.1.6.1. Kyslík

Kyslík je jedním z nejdůležitějších parametrů pro život ryb ve vodním prostředí. Candát, stejně jako ostatní ryby využívají kyslík rozpuštěný ve vodě, který je důležité udržovat v dostatečném nasycení. Koncentrace kyslíku rozpuštěného ve vodním prostředí se udává v % nasycení. Množství rozpuštěného kyslíku ve vodě závisí především na teplotě, intenzitě světla, tlaku vzduchu nad vodní hladinou a na organickém znečištění. Přírozenou cestou se kyslík dostává do vodního prostředí difuzí z atmosféry, fotosyntézou zelených rostlin a tak dále. Vody bez organického znečištění se drží v rozmezí 85 až 95 % nasycení O₂. V případě poklesu rozpuštěného kyslíku pod hraniční hodnotu menší než 4 mg.l⁻¹ dochází k negativnímu vlivu na vodní organismy a vede až k jejich úhynu (Pitter, 1990).

V intenzivních akvakulturních chovech je kyslík doplňován z umělých zdrojů. Nejčastějšími metodami dodávání kyslíku do vody v intenzivních chovech je aerace a oxygenace. U RAS je důležitá pravidelná kontrola hladiny rozpuštěného kyslíku ve vodě. Při nedostatku kyslíku ve vodě se může u ryb projevit zrychlené dýchání až dušení a malátné pohyby. Nejčastěji se v chovu kyslík spotřebovává při vysokých obsádkách a při krmení ryb a důležitou roli také hraje celková aktivita ryb.

Optimální koncentrace nasycení rozpuštěného kyslíku pro candáta ve vodě činí 8–10 mg.l⁻¹ (80–95% nasycení O₂, teplota vody 21–22 °C). Jako kritická hodnota nedostatku rozpuštěného kyslíku u candáta se udává 3 mg.l⁻¹ (hodnota pod 40–44 % nasycení O₂, teplota vody 21–22 °C), která může způsobit až úhyn ryb (Čítek a kol., 1998).

V některých případech se také může stát, že dojde k přesycení vody kyslíkem. Nejčastěji tento problém nastává v intenzivních chovech, ale hlavně při přepravě ryb v polyethylenových vacích nebo v bednách, které využívají saturaci čistým kyslíkem (Lusk, 1983). K nekrotám žaber, zaplísnění a k následným úhynům ryb nejčastěji dochází, když hodnota kyslíku vystoupá k hodnotám 250–300 % (Svobodová a kol., 2000). Zde také můžeme konstatovat, že ryby starších věkových kategorií jsou méně náchylné na přesycení vody kyslíkem než ryby mladších věkových kategorií (Policar a kol., 2014).

2.1.6.2. Teplota

Teplota patří k nejdůležitějším fyzikálním parametrům vody. Rozklad organického znečištění, rychlost biochemických reakcí společně s koloběhem ostatních látek ve vodě a jejich vlivem na život ryb je závislý na teplotě vody. Teplota vody má také značný podíl na množství rozpuštěného kyslíku ve vodě, metabolismu ryb, na příjem potravy a v neposlední řadě na reprodukci (Hanel a Lusk, 2005). Se zvyšující se teplotou vody se zvyšuje aktivita ryb, a to má za následek postupné navyšování příjmu potravy, díky těmto procesům dochází ke spotřebě kyslíku a k jeho snižování ve vodním prostředí (Jirásek a kol., 1977).

Candát patří mezi ryby, které jsou schopny se vyrovnat širokým rozpětím teplot, tzv. mezotermní druhy (Frisk a kol., 2012). Teplotní optima pro candáta se mění s věkem. Juvenilní jedinci preferují teplotu od 24–29 °C. V rybníčních chovech se optimální teplota pro larvy pohybuje v rozmezí 16–20,4 °C. Jonas a Wahl (1998) udávají optimální teplotní podmínky pro larvy v přirozeném prostředí od 15 do 25 °C. Při odchovu v RAS při přechodu z larválního stádia do juvenilního stádia se preferují teploty od 21 do 23 °C. Důležitým faktorem je udržovat teplotu vody nad 20 °C, v případě poklesu teploty pod 20 °C může

dojít ke sníženému příjmu potravy a ke stagnaci růstu. Ideální teplotou pro chov v intenzivních chovech se uvádí teplota 23–30 °C (Wang a kol., 2009).

2.1.6.3. Intenzita osvětlení

Pro druhy ryb přijímající potravu zrakem je charakteristická světelná fáze dne, kterou při odchovu ryb musíme uměle navodit. Jednou z výhod candáta je vyvinuté noční vidění. Candát se vyznačuje vysokou aktivitou při soumráčnosti nebo časnou ranní aktivitou či noční aktivitou (Baruš a Oliva, 1995). V intenzivních chovech se intenzita dopadajícího světla na hladinu eliminuje pomocí zastínění, nebo díky snížení intenzity kompletního osvětlení odchovné haly na 10–50 luxů. Beránek a kol. (2005) uvádí, že ideální světelná intenzita pro odchov candáta je osvětlení 10–50 luxů na 18 hodin se 6 hodinami tmy. Zakes a kol. (2004) uvádí osvětlení pro candáta po celý den se světelnou intenzitou 30 luxů. Naopak Nagel (1976) preferuje kompletní zastínění nádrží po celý den s výjimkou krmeného místa. Podle Luchiarho a kol. (2006) je pozitivní růst candáta při osvětlení s vlnovou délkou 535–603 mm.

2.1.6.4. Dusík

Mezi nejčastěji sledované formy dusíku v intenzivních chovech řadíme disociovaný amonný iont NH_4^+ a nedisociovaný amonný iont NH_3 . V chovu ryb je důležité sledovat především hodnotu nedisociovaného amonného iontu NH_3 , protože může snadno pronikat přes tkáně do těla ryby a je pro ryby vysoce toxický. Naopak forma disociovaná NH_4^+ není až tak propustná přes stěny živočišných buněk a nezpůsobuje rybám závažné problémy. Podle Svobodové a kol. (2000) je střední letální koncentraci NH_3 (LC_{50}) pro kaprovité ryby v rozmezí 1–1,5 mg.l^{-1} a pro lososovité ryby 0,5–0,8 mg.l^{-1} . Přijatelná hodnota celkového amoniaku pro okounovité ryby je 0,03 mg.l^{-1} N- NH_3 (Stejskal a kol., 2009).

Amoniak vzniká jako odpadní produkt dusíkatého metabolismu a je vylučován z těla ryb přes žaberní aparát do vodního prostředí pomocí koncentračního spádu. Poměr mezi formou disociovanou a formou nedisociovanou je závislá na hodnotě pH a teplotě vody. V intenzivních chovech jsou k odstranění toxické nedisociované formy amoniaku využívány tzv.

biologické filtry. K tomuto účelu se využívají nádrže s elementy (s velkým povrchem), kde se vyskytují nitrifikační bakterie (Bártů a Kopp, 2004).

Mezi další důležité formy dusíku ve vodě řadíme dusitany a dusičnany. Pro ryby jsou více toxické dusitany, které jsou schopné se vstřebávat do organismu přes takzvané chloridové buňky žaber. V krvi oxidují hemoglobin, a tím vzniká methemoglobin (doprovázeno hnědým zbarvením krve a žaber), který není schopen dále vázat kyslík. Pro ryby jsou vyšší koncentrace dusitanů toxické a mohou pro ně být až letální. Toxicita dusitanů ve vodě je závislá právě na koncentraci chloridů obsažených ve vodě, kdy se letální koncentrace (LC_{50}) pohybuje v širokém rozmezí od 0,3–300 $mg.l^{-1} NO_2^-$. Dusitany se ve volných vodách téměř nevyskytují, protože se snadno oxidují, ale způsobují problémy právě v intenzivních chovech, kde může dojít k otravám ryb dusitany. Tyto problémy s dusitany jsou nejčastěji způsobeny špatným fungováním biologické filtrace, která má problémy s odbouráváním nadměrného množství metabolických produktů ryb (odbourávání NH_3 na NO_2^- a následně pak na netoxickou formu NO_3^-). Kroupová a kol. (2005) udává, že otravám ryb NO_2^- lze předejít aplikací $NaCl$ (0,3–3 $g.l^{-1}$), protože chloridy jsou schopny se vázat na žaberní epitel, a tím zabraňují průchodu toxických látek pronikajících přes žaberní aparát do organismu.

Dusičnany NO_3^- nejsou pro ryby až tak toxické jako dusitany. Letální hodnoty pro ryby jsou až při koncentracích přesahujících 1000 $mg.l^{-1}$ (Čítek a kol., 1997; Pitter, 1990).

2.1.7. Rozmnožování

2.1.7.1. Přirozený výtěr

Pohlavní dospělost v našich klimatických podmínkách u jikernaček candáta nastupuje ve třetím až čtvrtém roce života. Mlíčáci pohlavně dospívají přibližně o rok dříve (Bastl, 1965). Výtěrové období v přirozených podmínkách závisí na teplotě vody, která se pohybuje ideálně okolo 8–16 °C, což odpovídá měsíci dubnu či květnu a výtěr může trvat až do konce května (Sonesten, 1991; Dubský a kol., 2003). Nejčastěji výtěr probíhá už při teplotách 8–10 °C (Bastl, 1965; Krupauer a Pekař, 1967). Baruš a Oliva (1995) udávají, že pohlavní dimorfismus generačních ryb nemusí být na první pohled znatelný. Nejpravděpodobněji lze

rozlišit pohlavní candáta podle ztmavnutí břišních partií nebo celého povrchu těla u mlíčáků, naopak u jikernaček sledujeme plnější břišní dutinu. Břicho jikernačky je světlé až bílé (Dubský a kol., 2003). Mlíčáci před výtěrem hledají ideální místo pro výtěr a vytvářejí tzv. výtěrová hnízda (Erm, 1981). Candát je druhem fytofilním (výtěr na vodní vegetaci) nebo litofilní (výtěr na kameny nebo do štěrkových dutin, které mlíčák před výtěrem vyčistí od usazenin). Výtěr se uskutečňuje nejčastěji v okolí míst zarostlých vegetací, dále v oblasti s kořeny vodních rostlin nebo se štěrkovým substrátem. Candát se vytírá v hloubce ideálně od 1 do 3 metrů (Dubský a kol., 2003). Výtěr probíhá jednorázově v párech, kdy mlíčák po výtěru hlídá hnízdo před predátory a zbavuje je nečistot, tuto péči provádí až do vylíhnutí larev (Baruš a Oliva, 1995). Inkubační doba jiker od výtěru do vykulení se pohybuje v rozmezí od 120 do 150 D° (Lappalainen a kol., 2003). Množství jiker je závislé na velikosti jikernačky, nejčastěji se pohybuje v absolutním rozmezí na jednu rybu od 50 000 do 320 000 kusů jiker. Relativní plodnost se pohybuje od 110 000 do 120 000 ks jiker na kilogram hmotnosti jikernačky (Čítek a kol., 1998). Oliva a Baruš (1995) udávají, že candát patří mezi ryby s malými jikrami, jejich velikost je přibližně 1 mm a mají zelenou až žlutavou barvu (Obr. 2). Dubský a kol. (2003) udává velikost lepivých jiker v rozmezí 0,84–1,08 mm. Potom, co se jikry dostanou do vodního prostředí nabobtnají a zvětší se až na 0,9–1,4 mm (Demirkalp, 1992). Larvy po vylíhnutí mají velikost okolo 4,5 až 6 mm (Schlumberger a Proteau, 1996). Přechod na exogenní způsob příjmu potravy probíhá v poměrně malé velikosti (5–6 mm délky těla), kdy jsou larvy staré přibližně 3 až 4 dny (Ljunggren, 2002; Musil a Peterka, 2005).

2.1.7.2. Řízená reprodukce

K reprodukci se běžně používají generační ryby s kusovou hmotností od 1 do 4 kg. S hmotností generačních jikernaček se zvyšuje i počet vytíraných jiker, jak už bylo zmíněno výše. Pro kvalitní a úspěšnou reprodukci musí být generační ryby chovány v optimálních podmínkách prostředí a musí být v dobré kondici. Nejčastěji se odchovávají generační ryby candáta obecného v produkčních relativně velkých a dostatečně hlubokých rybnících s kvalitním

přítokem vody s polykulturními obsádkami s nižší hustotou násadového nebo tržního kapra (Musil a Kouřil, 2006).

Musil a Kouřil (2006) udávají tři různé metody reprodukce candáta:

1. Přirozený výtěr v rybnících bez hormonální stimulace ovulace.
2. Poloumělý výtěr na hnízda s nebo bez hormonální stimulace ovulace.
3. Umělý výtěr s hormonální stimulací ovulace.

2.1.7.2.1. Přirozený výtěr bez hormonální stimulace ovulace

Tento typ výtěru se uskutečňuje v rybnících a je velice jednoduchou metodou výtěru candáta, ale naopak také patří mezi nejméně spolehlivý způsob získání kvalitní a vyrovnané produkce. Tato metoda je založena na vysazení generačních candátů do menších rybníků v jarním období (v poměru 1 mlíčák : 1 jikernačka) společně s nižší obsádkou kapra (K_1 nebo K_2) nebo je možné nasadit pouze candáta do rybníků bez ostatních druhů ryb. Při tomto způsobu výtěru se nevyužívají umělá výtěrová hnízda. Výlov juvenilních (plůdku) a generačních ryb probíhá nejčastěji na podzim, popřípadě na jaře. Při výlovu rybníků je vhodné provést odlov plůdku candáta pod hrází. Výsledek výtěru a množství odchovaného plůdku je často velmi nejisté a nedosahuje tak kvalitních výsledků, jako ostatní způsoby výtěru (Kouřil a Hamáčková, 2005; Musil a Kouřil, 2006).

2.1.7.2.2. Poloumělý výtěr generačních ryb na hnízda s nebo bez hormonální stimulace

Mezi nejčastěji používané typy umělých hnízd se řadí plastové rohože nebo kartáče. Hnízda umísťujeme do manipulačních rybníků na místa s tvrdým podložím, dále do zemních nebo betonových rybníčků či do sádek s tvrdým dnem, další možností je umístění hnízd do větších rybníků. Díky inovaci a vzniku intenzivního chovu je v dnešní době možné využívat plastové nebo betonové nádrže umístěné v hale v RAS (Blecha a kol., 2016; Policar a kol., 2016). V dřívějších dobách se tato metoda využívala bez podání hormonální stimulace. Díky inovaci a vzniku intenzivního chovu je v dnešní době možné využívat plastové nebo betonové nádrže umístěné v hale. Poloumělý výtěr v nádržích, který jsou koncipovány do uzavřených prostor je nejčastěji spojen

s možností teplotní manipulace (postupné zvyšování teploty vody), dále se v této metodě reprodukce hojně využívá injekčního podání hormonálních přípravků generačním jikernačkám. Mlíčáky není třeba hormonálně stimulovat, jejich výtěru dosáhneme i bez využití hormonální stimulace (Musil a Kouřil, 2006). Avšak Blecha a kol. (2016) udávají, že využití hormonálního přípravku Chorulon (HCG 500 UI.kg⁻¹) u mlíčáků a jikernaček vede ke dvojnásobné produkci larev díky vyšší oplozenosti jiker a líhnivosti larev. Nejčastěji používanými exogenními hormonálními přípravky jsou například hormonální přípravky: Ovopel, Supergestran nebo Chorulon (Kouřil a Hamáčková, 2005). Tato metoda spočívá ve vysazení jednoho páru do nádrží (nejčastěji v rámci RAS) s umělým výtěrovým hnízdem (Musil a Kouřil, 2006). Steffens (1996) a Luczynski a kol. (2007) udávají, že je důležité zvolit vhodnou velikost hnízd, tedy pro ryby větších velikostí je vhodné zvolit větší hnízda než pro ryby menších velikostí, aby nedošlo ke slepení jiker a jejich následnému zaplísnění. Po výtěru generačních ryb na hnízda je důležité odlovit generační ryby z nádrže. Především je důležité odlovit z nádrže co nejdříve po výtěru jikernačku, v opačném případě ji může mlíčák výrazně poškodit (Policar a kol., 2016). Následně se inkubují jikry na hnízdech s nízkým průtokem vody až do vylíhnutí larev z jiker. Dva či tři dny před vylíhnutím je možné nádrže s inkubovanými jikrami úplně odstavit od průtoku, kdy do nádrže musí být instalované silné vzduchování vody (Musil a Kouřil, 2006; Policar a kol., 2016).

2.1.7.2.3. Umělý výtěr s hormonální stimulací ovulace

U této metody se používá injekční hormonální stimulace jak jikernaček, tak i mlíčáků. Generační ryby se drží těsně před výtěrem odděleně (zvláště mlíčáci a zvláště jikernačky) v menších skupinách, cca 5–10 kusů v dobře slovitelných a napustitelných nádržích umístěných v hale s možností regulace teploty vody v rozpětí 10–15 °C. U jikernaček je nutné pravidelně kontrolovat ovulaci jiker. Platí zásada, že čím déle je od injekce ryb, tím kratší interval kontroly ovulace musí být. Při ovulaci ryb dochází k umělému výtěru s využitím tzv. suché metody výtěru s využitím předem odebraného spermatu do imobilizačního roztoku. Jikry uměle oplodňujeme spermatem, po promíchání, oplození a odlepkování jiker umístíme jikry na Zugské inkubační láhve při teplotě vody

15–18 °C. Před nasazením na láhve je důležité jikry odlepkovat v suspenzi jílu nebo talku. Líhnutí larev je závislé na teplotě vody, nejčastěji k líhnutí dochází za 6–8 dní. Velikost líhnutých larev je cca 3,8–5 mm. Vykulený plůdek je přeplavován z lahví do kolíbek s uhelonom (jemná síťovina s velikostí ok do 0,3 mm). Tato metoda má nevýhody oproti poloumělému výtěru ve zvýšeném stresu a poškození vytíraných generačních ryb (Musil a Kouřil, 2006, Policar a kol., 2013).



Obr. 2: Jikry candáta obecného (foto: K. Trnka)

2.1.8. Chov candáta v recirkulačním akvakulturním systému (RAS)

Chov candáta v RAS patří mezi jeden z nejnáročnějších a nejnákladnějších chovů ryb v RAS (Schram, 2008; Policar a kol., 2013). Při tomto chovu je důležité udržet velmi kvalitní a vysokou zoohygienu, dále vysokou kvalitu vody. Podstatné je také zajistit kvalitní a vyrovnaný příjem potravy (Zakes a kol., 2006). Velkým problémem tohoto chovu může být nízká produkce násadového materiálu, který je závislý na nízké oplozenosti jiker a nízké líhivosti larev. Výtěr candáta je často spjat s výskytem deformovaných larev a s nízkou životaschopností vyprodukovaných larev. S těmito problémy se setkáváme v chovu generačních candátů v uzavřeném intenzivním chovu využívající RAS technologii. Tyto podmínky chovu neodpovídají podmínkám, které představují přirozené podmínky ve volných vodách a všechny tyto náležitosti mohou narušit

dokonalý vývoj gonád a vlastní přirozenou reprodukci (Polícar a kol., 2011). Jako vhodná metoda se ukázala kombinace rybničního a intenzivního chovu. Rybniční chov se využívá pro chov generačních a následně pro odchov larev a juvenilů až do stádia rychleného plůdku (do velikosti 35–50 mm). Mezi výhody využití rybničního chovu patří přirozené podmínky společně s přísunem kvalitní přirozené potravy, které mají za následek kvalitní vývoj pohlavních produktů, zvýšení životaschopnosti larev a starších věkových kategorií. Tento způsob se také vyznačuje sníženými produkčními náklady, kterých není možné dosáhnout chovem pouze v uzavřeném intenzivním chovu bez využití rybničního chovu (Polícar a kol., 2011). Chov v RAS je následně využit k adaptaci ryb odchovaných v rybnících a k intenzivnímu chovu juvenilů a starších věkových kategorií až do tržních ryb (Polícar a kol., 2013). RAS vytváří optimální podmínky pro vysoký růst a vysoké přežití candáta obecného, kdy můžeme využít umělá peletovaná krmiva, to zajišťuje vysokou efektivitu a produktivitu chovu, která se později pozitivně projeví ve zlepšené rentabilitě chovu (Zakes a kol., 2006). Polícar a kol. (2018) udává optimální podmínky chovu candáta obecného v RAS: teplota vody 21–23 °C, obsah rozpuštěného kyslíku 100±25 %, hodnota pH 6,8–7,2, světelný režim 12 hodin tmy a 12 hodin světla, intenzita dopadajícího světla na hladinu optimálně 70±30 luxů.m⁻² a obsah celkového amoniaku a dusitanů by neměl přesáhnout hodnotu 1 mg.l⁻¹. V průběhu odchovu candáta dochází k nepravidelnému rozrůstání ryb (různá velikost jedinců stejného věku). Proto je nutné ryby pravidelně třídit, viz. popsáno výše). V případě, že nejsou ryby tříděny dochází ke kanibalismu, který je v chovu nepřijatelný. Kanibalismus má za následek snížení přežití odchovávaných ryb a sníženou efektivitu a rentabilitu chovu candáta.

2.2. Polyploidie u ryb

Polyploidie je velice důležitý evoluční mechanismus, který vede k obrovské biodiverzitě ryb, ale i dalších živočichů, jako jsou například měkkýši, korýši, plazi, obojživelníci. Velmi vzácně se s polyploidii můžeme setkat také u savců (Gallardo a kol., 1999; Flajšhans a kol., 2013). Polyploidie je také známa u rostlin, kdy je využívána k vyšlechtění různých zemědělských plodin (Piferrer a kol., 2009).

Většina živočichů, krom některých výjimek (bezobratlí) má zdvojenou sadu chromozomů ($2n$), to znamená, že tyto organismy jsou biologicky diploidní. Díky pohlavnímu rozmnožování, kdy se na začátku vyskytuje jedna sada chromozomů v gametě (haploidie, $1n$), dojde k znovunastolení diploidního stavu nového organismu v každé generaci. Polyploidie je tedy jev, kdy dochází ke znásobení (multiplikaci) celé chromozomové sádky nad standardní haploidní či diploidní stav. Lze také konstatovat, že polyploidní stav vzniká jako vedlejší efekt biotických a abiotických procesů. Mezi tyto procesy řadíme hybridizaci (nejčastěji mezidruhová), přezrání gamet, teplotní a další fyzikální jevy (Flajšhans a kol., 2013). Polyploidie vzniká spontánně přirozenou cestou, nebo může být indukována uměle. U polyploidních ryb je možné sledovat vlastnosti, které jsou velice dobře využitelné v akvakultuře (Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013).

2.3. Autopolyploidie a alopolyploidie

Polyploidie se dělí na dvě základní formy: autopolyploidii a alopolyploidii. Autopolyploidie je založena na znásobení kompletní homospecifické sádky chromozomů, tedy znásobení chromozomových sad u jednoho druhu. A alopolyploidie znamená znásobení kompletní heterospecifické sádky chromozomů, tedy znásobení počtu chromozomových sad, které pochází od dvou a více druhů.

Autopolyploidie nejčastěji nastává díky:

- a) **poruchám gametogeneze** – např. selhání meiózy – potlačení první nebo druhé fáze meiotického dělení; selhání rozchodu mitotických chromozomů (Flajšhans a kol., 2008)
- b) **poruchám při oplození** – polyspermické oplození – oplození vajíčka větším počtem spermií, tento jev je u většiny druhů ryb velmi vzácný, jelikož po průniku spermie do jikry se mikropyle uzavře. Výjimku mohou tvořit jeseterovití, u kterých můžeme zaznamenat polyspermické oplození, protože jikra jeseterů obsahuje větší počet mikropylí (Pšenička a kol., 2010; Flajšhans a kol., 2013).

- c) **přezrání ovulovaných oocytů** – např. poruchy organizace jádra a jadérka, které jsou způsobeny cytoskeletálními změnami buněk oocytů nebo jiker (Flajšhans a kol., 2013).
- d) **poruchám procesu fertilizace** – nejčastěji nastávají působením různých vlivů z vnějšího prostředí (Pudrom a Lincoln, 1973).

K alopolyloidii dochází při hybridizaci (mezidruhové nebo mezirodové). Tento jev zapříčiňuje přechod z klasického bisexuálního rozmnožování, například na partenogenezi, gynogenezi nebo hybridogenezi (Flajšhans a kol., 2013).

Flajšhans a kol. (2013) udává, že spontánní polyploidie je proces, kdy autopolyploidie nebo alopolyloidie vzniká přirozeně (bez zásahu člověka). S jevem spontánní polyploidie se můžeme často setkat i u ryb (Benfey, 1989). Tento jev nastává při poruše průběhu oplození a díky dalším postupům při utváření samčího prvojádra, které před splnutím pohlavních buněk čeká na dokončení sekundární fáze meiotického dělení, odchodu druhého polárního tělíska a tvorbu samičího prvojádra. Při spontánní triploidii ale nedojde k procesu odchodu druhého polárního tělíska, ale k jeho zadržení, tím pádem vzniká triploidní organismus (Flajšhans a kol., 2013).

2.4. Uměle indukovaná polyploidie

Snaha umělého navození polyploidního stavu byla známa a hojně využívána už od 70. let minulého století, především za účelem produkce neplodných a rychle rostoucích nebo plodných polyploidních ryb a měkkýšů využitelných pro sladkovodní a mořskou akvakulturu (Flajšhans a kol., 2013).

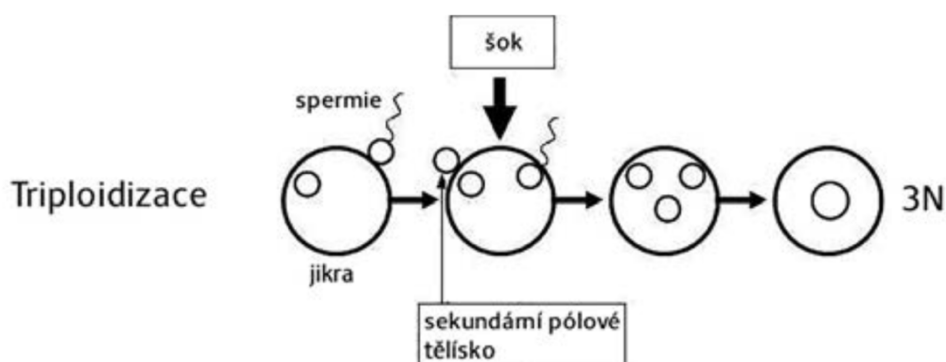
Jevy triploidizace a tetraploidizace jsou nejvíce používané metody polyploidie v akvakultuře. Těchto jevů docílíme využitím různých typů fyzikálních nebo chemických zásahů (tzv. šoky), které působí na vývoj zygoty.

2.4.1. Triploidizace

Tento proces je možné vyvolat takzvaným šokem, kterému se vystaví ovulovaný oocyt nacházející se v takzvané metafázi druhého meiotického dělení, a tím dojde k navození triploidního stavu. Provedením šoku dojde k depolymeraci tubulinových vláken dělicího vřeténka, které má za následek

zabránění oddělení druhého pólového tělíska. Výsledný organismus nese tři sady chromozomů, jedna sada pochází ze samičího prvojádra, jedna ze sekundárního tělíska a jedna sada ze samčího prvojádra (Obr. 3; Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013).

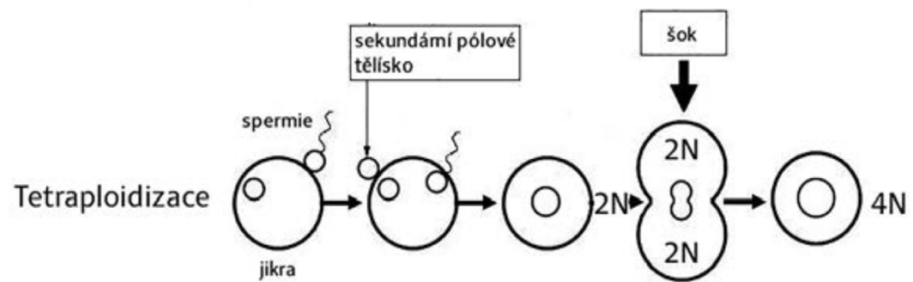
Se spontánní triploidizací se často setkáváme u velkého množství komerčně využívaných druhů ryb. Řadíme sem například sumce velkého (*Silurus glanis*) (Varkonyi a kol., 1998), pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Aegerter a Jalabert, 2004), jesetera malého (*A. ruthenus*) (Havelka a kol., 2013), jesetera sibiřského (*A. baerii*) (Havelka a kol., 2014), lososa obecného (*Salmo salar*) (Glover a kol., 2015), štika obecnou (*Esox lucius*) (Samarin a kol., 2016), candáta obecného (*Sander lucioperca*) (Samarin a kol., 2015) a siveny–*Salvelinus* spp. (Schwinger a kol., 2018). K tomuto jevu nastává kvůli delšímu *in vitro* (mimo organismus) uchování neoplozených jiker. Tento jev je nejčastěji spojen s umělými výtěry v období ovulace a trvá do samotného osemenění jiker (Flajšhans a kol., 2013; Policar a kol., 2019).



Obr. 3: Schéma indukce triploidie (Policar a kol., 2009)

2.4.2. Tetraploidizace

K umělému navození tetraploidie využíváme šok, který působí na cytokinezi prvního mitotického dělení (první rýhování). Působením šoku dojde k depolymeraci tubulinových vláken dělicího vřeténka, tento jev blokuje rozdělení duplikovaných sad chromozomů do dceřiných buněk. Vzniklý organismus má tedy čtyři sady chromozomů, dvě sady pochází ze samičího prvojádra a dvě sady ze samčího prvojádra (Obr. 4; Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013).



Obr. 4: Schéma indukce tetraploidie (Polícar a kol., 2009)

2.5. Typy šoků k navození umělé polyploidizace

Šoky k navození polyploidního stavu jsou fyzikální nebo chemické zásahy do vývoje zygoty, které působí depolymeraci tubulinových vláken dělicího vřeténka. Podle doby použití šoku od oplození a od aktivace gamet způsobí přifúzování (zadrženi) druhého pólóvého tělísko nebo vede k duplikaci chromozomových sad v první mitóze bez následného rozchodu do dceřiných buněk.

Šoky dělíme na mechanické, fyzikální a chemické (Flajšhans a kol., 2013). Jikry se před zahájením tlakového šoku musí zbavit lepivosti, takzvaným odlepkováním jiker, aby nedošlo k jejich nechtěnému slepení. U candáta je k odlepkování jiker vhodné použít roztok enzymu alkalázy (1 ml alkalázy, 0,5 l vody, na 2 minuty, poté 2krát propláchnout) (Kristan a kol., 2016; Klády a kol., 2021). Podle Kristana a kol. (2016) je vhodné po dvou minutách po oplození použít na odlepkování 30 ml roztoku enzymu alkalázy na 30 ml jiker. Po dvou minutách odlepkování jikry propláchnout a následně aplikovat šoky. U krátkých šoků je možné odlepkovat jikry až po aplikaci šoku, nejčastěji plnotučným mlékem.

2.5.1. Mechanické šoky

Tento typ šoků byl využíván ve 30. letech minulého století u kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Tyto šoky se realizovaly napichováním jiker nebo různými otřesy s různou dobou působení. Tyto šoky však nebyly zcela účinné a představovaly vysokou mortalitu embryí (Flajšhans a kol., 2013).

2.5.2. Chemické šoky

K těmto šokům se využívaly různé typy chemických látek, které jsou založené na působení vřetenkových jedů, které vedou k poškození mikrotubulů dělicího vřeténka a tím pádem nedojde k oddělení druhého pólového tělíska. Řadíme sem například kolchicin, kolcemid, cytochalazin B a interní plyny (N₂O), které působí na dělicí aparát buňky (Beaumont a Fairbrother, 1991; Flajšhans a kol., 2013). V akvakultuře je jejich využití minimální (Flajšhans a kol., 2013). Piffer a kol. (2009) a Rougeot (2015) udávají, že se chemické šoky k navození triploidie v současné době vůbec nevyužívají.

2.5.3. Fyzikální šoky

V současnosti jsou nejvíce používané fyzikální šoky po oplození a aktivaci gamet při umělých výtěrech různých druhů hospodářsky významných ryb. Patří sem např. teplotní šoky (teplé a chladové), tlakové šoky a případně elektrofúze (Teskeredžić a kol., 1993; Flajšhans a kol., 2013; Policar a kol., 2019).

2.5.3.1. Elektrofúze

Tento typ šoku je založen na působení elektrického proudu. Elektrofúze byla v minulosti experimentálně testována na lososu kisuč (*Oncorhynchus kisutch*), ale bez kombinace s teplými šoky nebyl tento pokus o indukci triploidních ryb úspěšný (Teskeredžić a kol., 1993).

2.5.3.2. Teplotní šoky

Teplotní šoky patří mezi nejpoužívanější metodu navození triploidie u ryb a řadíme je také mezi jednu z nejstarších metod. Podle Piferrera a kol. (2009) je aplikací teplotních šoků docíleno zadržení druhého pólového tělíska, kdy dojde k narušení mikrotubulů dělicího vřeténka či změnám ve vývoji buněk nebo změnám hustoty v cytoplazmě. Aplikace teplého nebo chladového šoku patří mezi nejjednodušší a nejméně finančně nákladné metody navození triploidního stavu. U teplého šoku je potřeba pouze ohřát vodu v lázni termostatem (nejčastěji na 30 °C) nebo u chladového šoku vodu ochladit ledem (0–1 °C). Do vody se přenesou jikry, které se vystaví šoku, poté se vyjmou a po jejich případném odlepkování inkubují (Flajšhans a kol., 2013).

2.5.3.2.1. Teplé šoky

Princip využití tohoto šoku spočívá v přenesení oplozených jiker do teplé lázně s výrazně vyšší teplotou vody, oproti teplotě, ve které probíhá běžná reprodukce určitého druhu. K ohřátí vody v lázni se nejčastěji používá ohřívač s elektrickou spirálou a termostat. Požadovaná teplota musí být konstantně udržována po celou dobu aplikace šoku (Piferrer a kol., 2009; Policar a kol., 2019). Piferrer a kol. (2009) udává zahájení šoku 2–7 minut od oplození jiker u teplotních druhů nebo 15–20 minut u studenotných druhů, také určuje ideální teploty šoku 34 °C až 41 °C pro druhy mírného pásma nebo pro teplomilné ideálně 29 °C až 32 °C. Vystavení jiker šokem na 45 sekund až 3,5 minuty u teplomilných druhů nebo 10 až 25 minut u studenomilných druhů (Piferrer a kol., 2009).

Pro lososovité ryby se při klasickém výtěru využívá teplota vody při inkubaci přibližně 10 °C, ale v šokové lázni aplikujeme teplotu 26–29 °C po dobu 20 minut. Pro kaprovité ryby je teplota vody při klasické inkubaci cca 20 °C, ale v šokové lázni se používá teplota vody 40–41 °C, kdy se jikry vystavují této teplotě na 1 až 2 minuty (Flajšhans a Linhart, 2000; Linhart a kol., 1991, 2001; Flajšhans a kol., 2010).

Malison a kol. (1993) a Rougeot a kol. (2003) preferují pro chladnomilné ryby teplotu šokové lázně 29–30 °C, jikry vkládají do šokové lázně na 10–25 minut po 5 až 7 minutách po oplození jiker. Don a Avtalion (1986) udává využití tepelné lázně se 40–41 °C po 3–5 minutách po oplození s velmi krátkou expoziční dobou u tlamouna (*Oreochromis aureus*).

2.5.3.2.2. Chladové šoky

Chladové šoky se nejčastěji využívají u chladnomilných druhů ryb, například u lososovitých nebo u ryb s menší velikostí jiker, například u kapra obecného (Piferrer a kol., 2009). Principem chladového šoku je vystavení jiker lázni s chladnou vodou. K zchlazení vodní lázně je využíván šupinkový led či výkonný chladič, který konstantně udržuje teplotu šoku (Policar a kol., 2019). Piferrer a kol. (2009) udává začátek šoku 2–7 minut po aktivaci gamet u teplomilných druhů a 15–20 minut u chladnomilných druhů, současně jak pro

druhy z mírného pásma, tak pro druhy teplomilné se uplatňuje intenzita šoku od -1 do +4 °C při expozici na 2–20 minut.

2.5.3.3. Tlakové šoky

Tlakové šoky patří mezi metody navození triploidie, které jsou velmi spolehlivé a účinné. K tlakovým šokům je potřeba vlastnit speciální tlakovou jednotku. Do uzavíratelné tlakové nádoby se přemístí oplozené jikry s vodou, následuje uzavření nádoby a vystavení oplozených jiker tlaku s požadovanými hodnotami (Flajšhans a kol., 2013). Lepivé jikry se před vložením do tlakové nádoby musí samozřejmě odlepkovat, jak již bylo napsáno výše.

Tlak do nádoby je tlačěn pomocí kompresoru, ruční pumpy nebo z lahví s tlakovým plynem (Flajšhans a kol., 2013). Indukce triploidie tlakovými šoky u pstruha duhového v porovnání s teplotními šoky produkují většinou vyšší množství triploidních jedinců s menším množstvím deformit larev, a také s výrazně vyšším přežitím jak u oplozených jiker, tak i váčkového plůdku (Haffray a kol., 2007).

Nejčastěji využívaná intenzita tlakového šoku je v rozmezí od 58 do 85 MPa s dvou až šestiminutovou expozicí jiker jak u studenomilných, tak i teplomilných druhů. U druhů z oblasti mírného pásma může být expozice 12–30 minut (Flajšhans a kol., 2013; Policar a kol., 2019). Piferrer a kol. (2009) udává začátek šoku po aktivaci gamet 2–7 minut u teplomilných druhů a u studenomilných 15–20 minut. Jako optimální intenzitu šoku udává 62 MPa (rozsah 58–85 MPa) na dobu expozice 2–6 minut. Flajšhans a Lihnart (2000), Lihnart a kol. (1991; 2001) a Flajšhans a kol. (2010) udávají vystavení jiker vysokému tlaku vody v uzavřené tlakové jednotce pro lososovité ryby >600 atmosféry (>60,8 MPa) na expoziční dobu 1–4 minuty. Pro kaprovité ryby uplatňovali hydrostatický tlak 518 atmosféry (52,47 MPa) na dobu expozice 1,5–2 minuty.

Tlakové jednotky s objemem 5–10 litrů jsou komerčně vyráběné ve Francii, Kanadě nebo USA (Flajšhans a kol., 2013). V České republice byl v roce 2012 zaregistrován užitečný vzor na tlakovou jednotku sloužící k indukci polyploidie u ryb (Obr. 5; Flajšhans a kol., 2012).



Obr. 5: Tlaková jednotka pro indukci polyploidie (foto: K. Trnka)

2.6. Faktory ovlivňující efektivitu umělé polyploidizace

Efektivita šoků a jejich zprostředkování závisí na několika velmi důležitých faktorech a na jejich vzájemné kombinaci, která je zásadní pro dosažení produkce triploidních ryb. Při realizaci šoků se snažíme docílit maximálního přežití vylíhlých larev s absencí morfologických a vývojových deformací. Konečná efektivita triploidizace je vyhodnocována takzvanou výtěžností či ziskem triploidních jedinců. Tato veličina zhodnocuje množství získaných triploidních jedinců a přežití embryí či larev. Mezi základní faktory řadíme: čas zahájení šoku po aktivaci gamet, intenzita šoku (jaká byla použita teplota, nebo tlak), expoziční doba šoku (délka na jakou byly jikry vystaveny šoku) (Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013; Polícar a kol., 2019).

2.6.1. Čas zahájení šoku po aktivaci gamet (oplození jiker)

Čas zahájení šoku závisí na druhu ryby a teplotě vody, ve které probíhá inkubace jiker. Zpravidla platí, že rychlost raného vývoje se s teplotou vody nelineárně mění. Standardní teplotou při inkubaci jiker teplomilných druhů je

například u kapra obecného, lína obecného, sumce velkého 20–22 °C. Ryby chladnomilné, kam patří například pstruh duhový nebo další lososovité ryby je standardní inkubační teplota okolo 10 °C. Například u kapra a lína při teplotě vody při inkubaci ve 20 °C se upřednostňuje délka šoku 5 minut po aktivaci gamet. Tímto zásahem je postihnuta druhá fáze meiotického dělení a tím vzniká triploidní jedinec. Pokud by se šok aplikoval později např. 43,5 minut po aktivaci gamet, dojde k postihnutí cytokineze prvního mitotického dělení a vznikne tetraploidní jedinec (Flajšhans a kol., 2013). Polícar a kol. (2019) udává, že u teplomilných druhů se šok aplikuje ideálně 2–7 minut po oplození jiker, u studenomilných druhů 15–20 minut po oplození jiker a u ryb, které pocházejí z mírného pásma, například okounovité ryby se šok zahajuje (4) 5–7 minut po oplození jiker.

Detlaff a Detlaff (1961) udávají, že v případě využití jiné inkubační teploty, než které je považováno za standard, musí být optimální čas začátku šoku vypočítaný s využitím údaje o délce mitotického cyklu τ_0 (tau nula). Tato hodnota vyjadřuje délku jednoho mitotického cyklu (v minutách) při synchronním dělení buňky. Pokud je tato hodnota τ_0 pro určitý druh známa, je možné tuto hodnotu vypočítat díky standardní využívané teplotě a díky použité (nestandardní) teplotě vody, tím se zjistí optimální čas pro zahájení aplikace šoku (Shelton a kol., 1997).

2.6.2. Intenzita šoku

Intenzita šoku, tedy zvolená hodnota teploty či tlaku může mít významný vliv na výsledek indukce polyploidie, a to především na procentuální vznik polyploidů, ale také na jejich přežití. Často je zmiňováno, že vyšší teplota či tlak vede ke vzniku vyššího poměru polyploidních jedinců, ale na druhou stranu mají za následek snížení přežití embryí. Pokud naopak použijeme nízkou teplotu nebo tlak, dosáhneme vysokého procenta přežití, ale nízké efektivity indukce polyploidních jedinců (Flajšhans a kol., 2013).

2.6.3. Expozice šoku

Expoziční doba je doba, po kterou je aplikace šoku prováděna. Je nepřímou úměrná intenzitě šoku. Pokud špatně zvolíme délku šoku může dojít k vysokým

ztrátám embryí nebo k nízké produkci polyploidních jedinců (Flajšhans a kol., 2013).

2.7. Metody využívané k určení ploidní úrovně u ryb

Prvním zcela nejdůležitějším aspektem pro chov triploidních ryb je stanovení ploidní úrovně produkovaných larev ryb, pomocí kterého je možné zjistit úspěšnost použitých šoků. Pomocí těchto metod je možné zanalyzovat a vyhodnotit poměr diploidních, triploidních nebo jiných ploidních úrovní ryb v daných analyzovaných populacích (Rougeot a Mélard, 2008). Často je možné se setkat s tím, že triploidní jedinci netvoří stoprocentním podíl v populaci ryb, ale mohou například tvořit 70–80 % ryb v populaci. Pravidelně se také setkáváme při aplikaci šoků k indukci polyploidních ryb produkcí larev s morfologickými nebo tělesnými deformitami a jejich nízkou životaschopností (Piferrer a kol., 2009; Flajšhans a kol., 2013).

Flajšhans a kol. (2013) rozděluje tyto metody na dvě skupiny, a to na přímé a nepřímé. Mezi přímé metody je možné řadit: stanovení karyotypu, kvalifikaci obarvených jader v buňkách, kvalifikaci obsahu DNA ve specificky barevných buněčných jádrech pomocí průtokové cytometrie, spektrofluorometrie a mikrodensitometrie. Mezi nepřímé metody se řadí: stanovení velikosti buněk a buněčných jader hematologickými postupy, Coulterova metoda stanovení velikosti buněk na základě impedance, měření buněčných a jaderných geometrických charakteristik a morfologické rozdíly mezi polyploidy a diploidy.

2.7.1. Přímé metody – průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie patří mezi velice rychlé a přesné metody stanovení ploidie ryb. Tato metoda je tedy vhodná i do poloprovozních nebo komerčních podmínek, kdy jsme schopni testovat až 20 kusů ryb za hodinu. Umožňuje nám sledovat chromozomové manipulace u ryb, dále studovat diploidně-polyloidní komplexy ryb a stanovení ploidie embryí, larev a starších jedinců z buněk krve a tkání (Thorgaard a kol., 1982; Allen, 1983; Ewing a kol., 1991; Lecommandeur a kol., 1994; Ráb a kol., 2007). Velkou nevýhodou průtokového cytometru jsou jeho vysoké pořizovací náklady a vysoké nároky na laboratorní vybavení

a chemikálie ke stanovení intenzity fluorescence (množství DNA). Přesto je tato metoda v praxi hojně využívána kvůli své rychlosti a jednoduchosti (Flajšhans a kol., 2013; Policar a kol., 2019).

2.7.2. Nepřímé metody

Jsou to metody založené na měření velikosti buněk nebo velikosti buněčných jader s využitím klasických hematologických postupů. Další metodou je Coulterova metoda, která stanovuje objem buněk pomocí impedance. Lze sem zařadit měření buněčných či jaderných geometrických charakteristik mikroskopem a mikrofotografií či analýzou obrazu nebo využití měření morfologických rozdílů určitých specifických znaků mezi diploidními a triploidními nebo polyploidními jedinci (Flajšhans a kol., 2013; Policar a kol., 2019). Nevýhodou těchto metod je potřeba větších a starších věkových kategorií ryb, kvůli potřebě odběru krve nebo znakům pohlavního dimorfismu, které jsou viditelné až ve větších velikostech. Díky tomu je tato metoda časově i finančně velmi náročná. V dnešní době se tyto metody hojně nevyužívají, výjimku tvoří například laboratoře či pracoviště s přístroji měřícími objem buněk (Couter Counter) (Fiske a kol., 2019).

2.7.3. Morfologické rozdíly mezi triploidy a diploidy

Tato metoda nepatří mezi nejspolehlivější metody a lze ji použít jen pro omezený počet rybích druhů (Maxime, 2008). Allotriploidní mezidruhové hybridy lze morfologicky od rodičů odlišit na základě fenotypu jejich genomu, obsahujících chromozomové sady obou druhů (Flajšhans a kol., 2008). Mezi druhy, které lze rozeznat podle fenotypu řadíme např. hybridy pstruha obecného f. potoční (*Salmo trutta* m. *fario*) x sivena amerického (*Salvenilus fontinalis*) (Sheerer a kol., 1987).

U autotriploidů se třemi sadami chromozomů stejného druhu, byly morfologické odlišnosti od diploidů popsány pouze zřídka. Mezi hlavní morfologické odlišnosti řadíme především změny v počtu ploutevních paprsků a šupin, délka a tvar břišních ploutví, deformace hlavy, kratší trup, delší ocasní ploutev, menší hlava, změny v tělesných proporcích (Swarup, 1959; Gervai a kol., 1980; Gomelsky a kol., 1982; Wolters a kol., 1982; Bonar a kol., 1988;

Tave, 1993; Flajšhans, 1993; Tiwary a kol., 1992). Gervani a kol. (1980) a Gomelsky a kol. (1992) popisují změny v počtu ploutevních paprsků a šupin u kapra obecného. Flajšhans a kol. (1993) u lína obecného poukazuje na délku a tvar břišních ploutví, kdy samice má kratší břišní ploutve než samec, samcům tyto ploutve přesahují přes řitní otvor.

Tyto fenotypové rozdíly se mohou projevat do různé míry, nejsou zcela přesné. Určitě je nelze zařadit mezi přesné metody stanovení ploidie u ryb (Flajšhans a kol., 2013).

2.8. Produkce a využití triploidních okounovitých ryb

V první řadě je třeba zdůraznit, že podle evropské legislativy řadíme polyploidní ryby (stejně jako hybridy) mimo geneticky modifikované organismy (GMO). Nepatří tedy mezi druhy, u kterých se musí dodržovat přísná pravidla o využívání a biologické ochraně GMO v zemědělství (Piferrer a kol., 2009).

Triploidizace okounovitých ryb a jejich produkce a využití není rybářskými podniky v ČR i v zahraničí významně využívána (Policar a kol., 2019). Lze konstatovat, že vyšší využití triploidních okounovitých ryb, které mohou být v rybníčních podmínkách sterilní, nebo částečně sterilní, můžeme využívat právě jen v takovýchto chovech. Jelikož v RAS chovech jsou okounovité ryby díky stabilní teplotě vody většinou sterilní z důvodu těchto podmínek chovu (Policar a kol., 2019b). Tento fakt je způsoben vnějšími podmínkami prostředí, právě změnou teploty vody a světelného režimu. Tento jev má za následek prodloužení produkčního intervalu, proto dochází k produkci tržních ryb až po dosažení pohlavní dospělosti. Pravděpodobnou výhodou triploidních okounovitých ryb je vyšší růst oproti plodným rybám chovaných v rybníčních podmínkách. Triploidní okounovité ryby z rybníků disponují na konci odchovu nižší hmotností gonád, než je to právě u diploidních okounovitých ryb. Tento fakt má za následek vyšší výtěžnost masa při jejich zpracování. Gonády u diploidních okounovitých ryb mohou v tržní velikosti dosahovat cca 20–25 % hmotnosti těla. Dalším přínosem triploidizace okounovitých ryb je potom lepší konverze krmiva v chovu těchto druhů, která se ve finále může projevit v lepším finančním ohodnocení produkce (Piferrer a kol., 2019; Flajšhans a kol., 2019;

Rougeot a kol., 2015; Policar a kol., 2019). Ovšem všechny tyto informace je nutné ověřit v praxi po úspěšné masové indukci kvalitních triploidních ryb.

Při triploidizace okounovitých ryb je třeba si uvědomit, že okounovité ryby nepatří do typických studenomilných a ani do teplomilných druhů, ale tvoří jakýsi přechod mezi těmito skupinami ryb. Často jsou druhy řazeny do takzvaných ryb mírného pásma. Optimální teplota vody k výtěru těchto druhů ryb je teplota v rozmezí od 10 do 16 °C, přičemž optimální teplota pro růst se však pohybuje v rozpětí 22–25 °C při 100% nasycení vody kyslíkem (Policar a kol., 2013, 2016, 2019; Malinovskyi a kol., 2018).

Teplý šok pro tyto druhy z mírného pásma se většinou experimentálně efektivně uskutečňuje 5–7 minut po aktivaci gamet při teplotě vody 28–30 °C a expoziční době 10–25 minut. Začátek šoku pro chladový a teplý šok byl testovaný jako nejúspěšnější varianta 5–7 minut po aktivaci jiker s teplotou lázně od -1 až +2 °C na dobu expozice 90–120 minut. Tlakový šok se úspěšně testoval se začátkem šoku 4–5 minut po aktivaci jiker s využitím tlaku 62 MPa (od 48 do 76 MPa) a dobou expozice 12–30 minut (Policar a kol., 2019).

Například produkce triploidních ryb u okouna říčního je většinou indukována za využití teplého šoku. Využívaná teplota šokové lázně pro jikry okouna je 30 °C, šok je zahájen 5–7 minut po oplození (teplota vody 16–17 °C), vystavení jiker šoku trvá 25 minut. Tímto způsobem je možné dosáhnout přibližně 93–100 % triploidů, výtěžnost triploidů z počtu použitých jiker se potom pohybuje na úrovni 43–44 % (Rougeot a kol., 2003). Malison a kol. (1993) popisuje triploidizaci u okouna žlutého (*Perca flavescens*). K indukci triploidie využívá teplý šok s teplotou 28–29 °C, začátek šoku 5 minut po oplození (teplota 11 °C), vystavení jiker šoku na 10–25 minut. Podíl triploidů je přibližně 66,7–100 %, výtěžnost triploidů se pohybuje v rozmezí 42,2–53,3 %. Zmínění autoři popsali také indukci triploidie u tohoto druhu okouna s využitím tlakového šoku (62,05–75,84 MPa), kdy k zahájení šoku dochází 5 minut po oplození jiker a šok trvá 12 minut. Produkce triploidních ryb se pohybuje v rozmezí 50–54,4 % triploidů, výtěžnost triploidů 31,7–43,5 %.

Proces optimalizace triploidizace byl také například testován na severoamerických druzích candátů: candát severoamerický (*Sander vitreus*) a mezidruhový hybrid (samice *Sander vitreus* x samec candáta kanadského –

Sander canadensis). U druhu *Sander vitreus* se jako nejlepší možností produkce triploidů osvědčilo využití tlakového šoku. Parametry šoku: tlak 48,26–55,16 MPa, začátek šoku 4 minuty po oplození jiker, délka šoku 15–30 minut. Podíl triploidů se pohyboval v rozmezí 72,2–100 %, s výtěžností triploidů 40,9–63,3 %. U tohoto druhu byl také aplikován teplý šok, který ale nevedl k vysoké hodnotě celkové výtěžnosti triploidních jedinců, která byla pouze 5 %. Teplý šok disponuje teplotou vody 30 °C a začátkem šoku 2 až 5 minut po oplození jiker, vystavení jiker šoku na 25 minut. Podíl triploidů 30,3–44,3 % (Malison a kol., 2001).

U severoamerického hybridu candáta (*Sander vitreus* x *Sander canadensis*) bylo experimentálně ověřeno využití teplého, chladového a tlakového šoku. Největší výtěžnosti triploidů bylo dosaženo teplým šokem (Garcia-Abiado a kol., 2001).

Indukcí triploidních candátů obecných se zabýval například Blecha a kol. (2016); Dadras a kol. (2021) a Klády a kol. (2021). Klády a kol. (2021) dosáhli nejlepších výsledků indukce triploidních jedinců u candáta obecného. Jako nejlepší možnost indukce triploidie byl chladový šok s teplotou vody 1–1,1 °C, a poté teplý šok s teplotou vody 31 °C. Zahájení chladového šoku 5 minut po aktivaci gamet, doba aplikace šoku je 120 minut. Indukce tohoto šoku představovala získání 100% triploidní populace, ale s nízkou líhivostí larev (17,3 %) s celkovou výtěžností triploidních jedinců na úrovni 17,3 %. Teplý šok byl zahájen 3–10 minut po oplození jiker s délkou šoku 20–40 minut. Podíl triploidů se pohyboval na úrovni 13,2–53,3 % s celkovou výtěžností triploidů v rozmezí 10,7–13,2 % (Policar a kol., 2019).

Indukce triploidie u candáta obecného nedosahuje až tak kvalitních výsledků. Mezi hlavní problémy patří velmi nízká líhivost larev a také nízká výtěžnost triploidů v získané populaci, proto je třeba se dále snažit optimalizovat indukci triploidie u candáta obecného (Policar a kol., 2019). Cílem této práce bylo ověřit a sumarizovat jednotlivé fyzikální šoky u candáta obecného a porovnat jejich efektivitu k dalšímu jejich použití.

3. Metodika

3.1. Místo provedení experimentů

Celá škála experimentů v rámci této diplomové práce, optimalizující a porovnávající indukci triploidizace candáta obecného pomocí chladových, teplých a tlakových šoků probíhala v Laboratoři intenzivní akvakultury. Následné stanovení ploidní úrovně larev probíhalo v Laboratoři molekulární, buněčné a kvantitativní genetiky, kde byla stanovena ploidní úroveň larev. Tyto laboratoře jsou součástí Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického Fakulty rybářství a ochrany vod a nacházejí se ve Vodňanech. V Laboratoři intenzivní akvakultury byla ještě před vlastními šoky indukující triploidizaci candáta obecného provedena příprava generačních ryb na výtěr, samotný umělý výtěr generačních ryb, umělé osemenění jiker, provedení jednotlivých šoků s následnou inkubací jiker až do vylíhnutí larev. Následně zde došlo ke vzorkování larev a jejich uchování při teplotě -80°C . V Laboratoři molekulární, buněčné a kvantitativní genetiky proběhlo stanovení ploidní úrovně vylíhnutých larev s využitím průtokové cytometrie s cílem vyhodnotit efektivitu jednotlivých ošetření (šoků) z hlediska podílu triploidních larev v daných experimentálních skupinách – populacích.

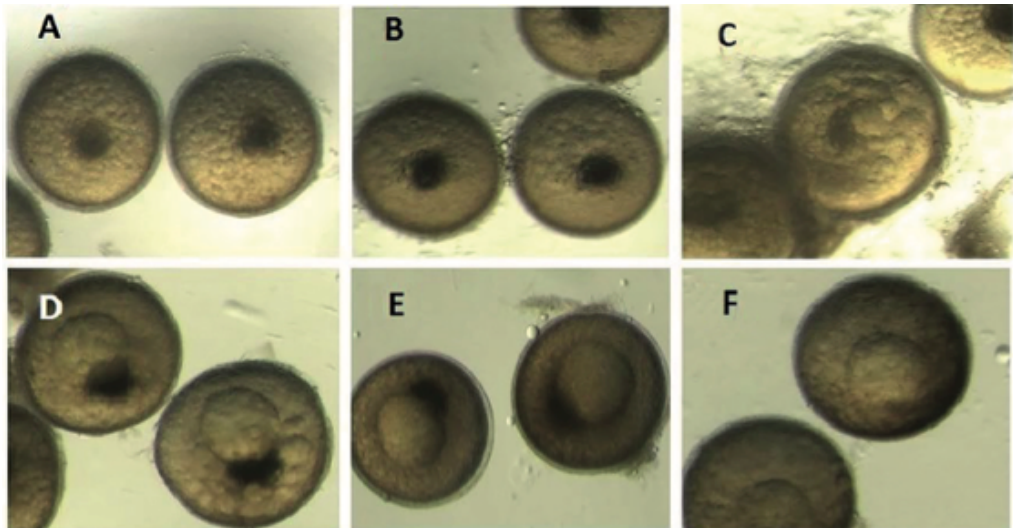
3.2. Příprava generačních ryb na umělý výtěr

K experimentu byly použity generační candáti ve věku cca 3–5 let ($TL=470 \pm 85$ mm a $W=1275 \pm 387$ g) odchovaní v klasické rybníční akvakultuře využívající polykulturní obsádky ryb v rámci produkčního podniku Rybářství Nové Hrady s.r.o. Generační ryby byly z daného rybářského podniku nakoupeny na podzim roku 2021 a byly drženy přes zimní a začátek jarního období v sádce s krmnými rybami podle Malinovskyi a kol. (2018) a Policara a kol. (2021). Na začátku výtěrového období byly generační ryby rozříděny podle pohlaví a u samic byl zkontrolován stupeň zralosti oocytů speciálním katetrem podle Zarski a kol. (2012) a Policara a kol. (2021). Zasunutím katetru do močopohlavní papily ryb bylo odebráno malé množství oocytů. Oocyty po odebrání byly umístěny na Petriho misku a po přidání Serrova prosvětlovacího roztoku (6 dílů 96% ethanolu, 3 díly 36-38% formaldehydu a 1 díl 99,6% kyseliny octové)

proběhla kontrola zralosti oocytů pomocí binokulárního mikroskopu (Olympus BX51). U všech ryb byla po manipulaci provedena preventivní krátkodobá koupel v roztoku kuchyňské soli v koncentraci 3 g NaCl.l⁻¹.

Celkem 13 ks generačních samic s třetím stádiem zralosti oocytů (Obr. 6) bylo přemístěno do jedné nádrže o objemu vody 600 litrů starého recirkulačního akvakulturního systému (RAS) Experimentálního pracoviště a pokusnictví FROV JU. Celkem 39 generačních samců bylo vysazeno do druhé stejně velké nádrže v daném RAS. Tento systém obsahoval vodu s vysokou kvalitou vody o konstantní teplotě vody 15 ± 0,7 °C a obsahu rozpuštěného kyslíku 97,6 ± 7,5 %.

U nasazených generačních ryb obojího pohlaví došlo k hormonální intramuskulární stimulaci přípravkem Chorulon, který byl aplikován injekčně do hřbetní svaloviny v jednotné dávce 500 IU HCG.kg⁻¹ (Kříšťan a kol., 2013). Kvůli zabránění spontánní ovulace jikernaček a snaze o zabránění ztrátám jiker byly po hormonální stimulaci jikernačkám zašity močopohlavní papily. Následně byly 12 hodin po injikaci jikernačky pravidelně kontrolovány jemnou masáží břišní oblasti ve dvou hodinových intervalech po částečném uvolnění stehů zašité močopohlavní papily. Poté, co byla u jednotlivých jikernaček identifikována ovulace oocytů, stehy byly rozešity a ovulované oocyty byly vytřeny do suchých předem zvažovaných misek jemnou masáží břišní oblasti (Obr. 7). Před výtěrem bylo důležité, generační ryby znehybnit v anestetickém přípravku MS222 v dávce 0,7 g.l⁻¹ a následně po znehybnění rybám osušit břišní partie těla společně s močopohlavní papilou a řitní ploutví, aby nedošlo k nechtěné aktivaci jiker vodou. Odběr spermatu od mlíčáků byl proveden jemnou masáží břišních partií těla zase po anestezii jikernaček, kdy sperma bylo odebíráno do injekčních stříkaček (Obr. 8). U spermií byla kontrolována poloprovozně motilita spermií (procento pohybujících se spermií a jejich období pohybu) pod laboratorním mikroskopem (Olympus BX41). Vždy bylo využito spermatu s procentem pohybujících se spermií nad 80 % a délkou pohyblivosti nad 75 sekund. Vždy pro snůšku jiker od jedné samice bylo použito sperma odděleně odebrané od tří mlíčáků.



Obr. 6: Stádia zralosti oocytů u candáta obecného (*Sander lucioperca*): (a) stádium I, (b) stádium II, (c) stádium III, (d) stádium IV, (e) stádium V, (f) stádium VI (foto: T. Polícar a O. Malinovskyi)



Obr. 7: Umělý výtěr jikernaček masáží břišní oblasti (foto: K. Trnka)



Obr. 8: Výtěr spermatu mlíčáků do injekčních stříkaček (foto: K. Trnka)

3.3. Experiment č. 1: Chladový šok

3.3.1. Příprava chladové lázně

Ledová lázeň byla připravena v polystyrenovém termoboxu, do kterého byla nalita voda z nádrží RAS, kde byly umístěny generační ryby, společně se šupinkovým ledem v takové koncentraci, aby teplota vody trvale odpovídala hodnotě 0,5–1 °C. Důležitou součástí byl teploměr, který byl vložen do boxu s chladovou lázní, sloužil k neustálému kontrolování teploty vody.

3.3.2. Oplodnění a aktivace gamet

Pro tento experiment byly využity vytřené jikry od dvou generačních jikernaček. Vytřené jikry postupně od každé jikernačky byly zváženy a rozděleny do experimentálních skupin dle různého časového začátku šoku. Na chladový šok bylo použito celkem 45 g jiker. Tyto jikry se rozdělily do 25 experimentálních skupin + kontrolní skupina (jikry, které nebyly vystavovány šoku). Před samotným oplozením byla provedena kontrola kvality spermií (viz popsáno výše). Při realizaci jednotlivých různých začátků šoku bylo na začátku

tohoto experimentu vytvořeno 6 skupin po 7,5 gramech jiker. Jikry v dané skupině byly smíchány s vodou 15 ml (dvakrát větší objem vody, než byla hmotnost jiker). Následně po 15 sekundách od aktivace jiker vodou byly k jikrám přidány spermie od tří mlíčáků (o celkovém objemu minimálně 0,17 ml na 7,5 g jiker). Po 90 sekundách byla z jiker slita voda se spermatem a oplozené jikry byly propláchnuty vodou a vystaveny v různé době od oplození (2; 4; 8; 12 a 16 minut po oplození) na různě dlouhou dobu (20; 40; 60; 90 a 120 minut) šokové lázni kromě kontroly, která nebyla vystavena šoku. Aktivované jikry byly umístěny do chladové šokové lázně v kruhových skleněných nádobách o objemu 100 mililitrů. K odlepkování jiker se přistoupilo už v průběhu šoku. Jikry se odlepkovávaly plnotučným mlékem (v poměru 1 díl mléka a 6 dílů vody), které bylo vychlazeno na teplotu 0,5 °C. Po vystavení šoku byly jikry vyjmuty z šokové lázně, byly okamžitě ohřáty na 16 °C a následně bylo ukončeno odlepkování na třepačce pomocí mléka s vodou o teplotě 16 °C tak, aby odlepkování trvalo celkem 60 minut. Po 60 minutách odlepkování byly jikry propláchnuty vodou ze systému o stejné teplotě (16 °C), ve kterém následovala inkubace jiker.

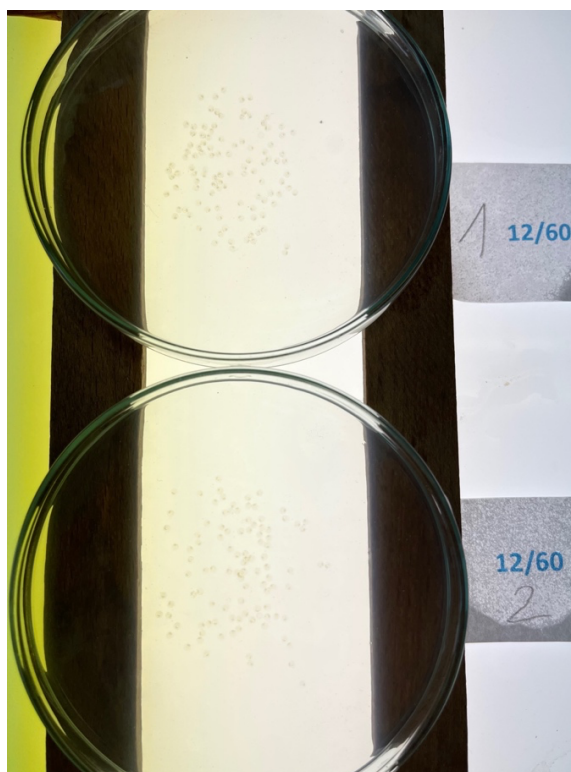
3.3.3. Inkubace jiker v aparátech

Přibližně 80–200 kusů propláchnutých jiker z každé skupiny, která charakterizovala daný chladový šok s různou dobou zahájení šoku a různým trváním šoku, bylo přeneseno do dvou Petriho misek. Před vysazením byly jikry v Petriho miskách vyfoceny pro pozdější přesné spočítání počtu nasazených jiker. Tyto jikry v rámci dvou misek byly vysazeny k samotné inkubaci do dvou miniaturních plastových inkubačních aparátů o rozměrech 200 × 100 × 150 mm s objemem vody 3 litry. V inkubačních aparátech byl nastaven průtok vody 1 l.m⁻¹. Aparáty byly umístěny v experimentálním RAS systému (Obr.10) s celkový objemem vody 1500 litrů vody a konstantním průtokem kvalitní čisté vody, tak aby voda v každém aparátu byla obměněna 2x za 60 minut. Do každého inkubačního aparátu byla umístěna hadička s přitékající vodou. Jikry byly umístěny v aparátech na síťce (rozměry ok 0,5 × 0,5 mm) a přebytečná voda odtékala kruhovým otvorem se síťovinou s velikostí ok 250 μm ven z inkubačního aparátu do žlabu k následné filtraci a okysličení vzduchováním

v rámci využitého malého experimentálního RAS. Tímto způsobem byla do inkubačních aparátů neustále doplňována čerstvá okysličená voda. Inkubační aparáty byly popsány pro přesnou identifikaci dané skupiny (podle doby iniciace a trvání šoku). První číslo u skupiny před lomítkem značí dobu po oplození, po které bylo přistoupeno k šoku. Druhé číslo za lomítkem označuje expoziční dobu působení šoku. Například skupina 2/20 (číslo 2 před lomítkem znamená dvě minuty po oplození a číslo 20 za lomítkem představuje délku šoku 20 minut. Kontrola byla označena písmenem „K“ a představovala skupinu, která nebyla vystavena šokům a sloužila především pro kontrolu líhivosti (%) a deformit (%).

Každá skupina obsahovala tedy dvě opakování, které byly tvořeny dvěma inkubátory. Inkubace jiker probíhala při konstantní teplotě 16 °C.

Celkově bylo šokům vystaveno 25 skupin (každá skupina měla dvě opakování tvořené jikrami od dvou vytřených jikernaček) s různými časovými expozičními po aktivaci gamet a různými dobami působení šoku. K těmto skupinám byly na inkubaci přidány i 2 kontrolní skupiny oplozených jiker, které nebyly vystaveny šokové lázni. Tyto dvě skupiny byly inkubovány ve dvou opakováních, tzn. ve čtyřech inkubačních aparátech.



Obr. 9: Vyfocené jikry v Petriho miskách pro přesné počítání (foto: K. Trnka)



Obr. 10: Průtočný systém s inkubačními aparáty (foto: K. Trnka)

3.3.4. Počítání larev, líhivost, deformita

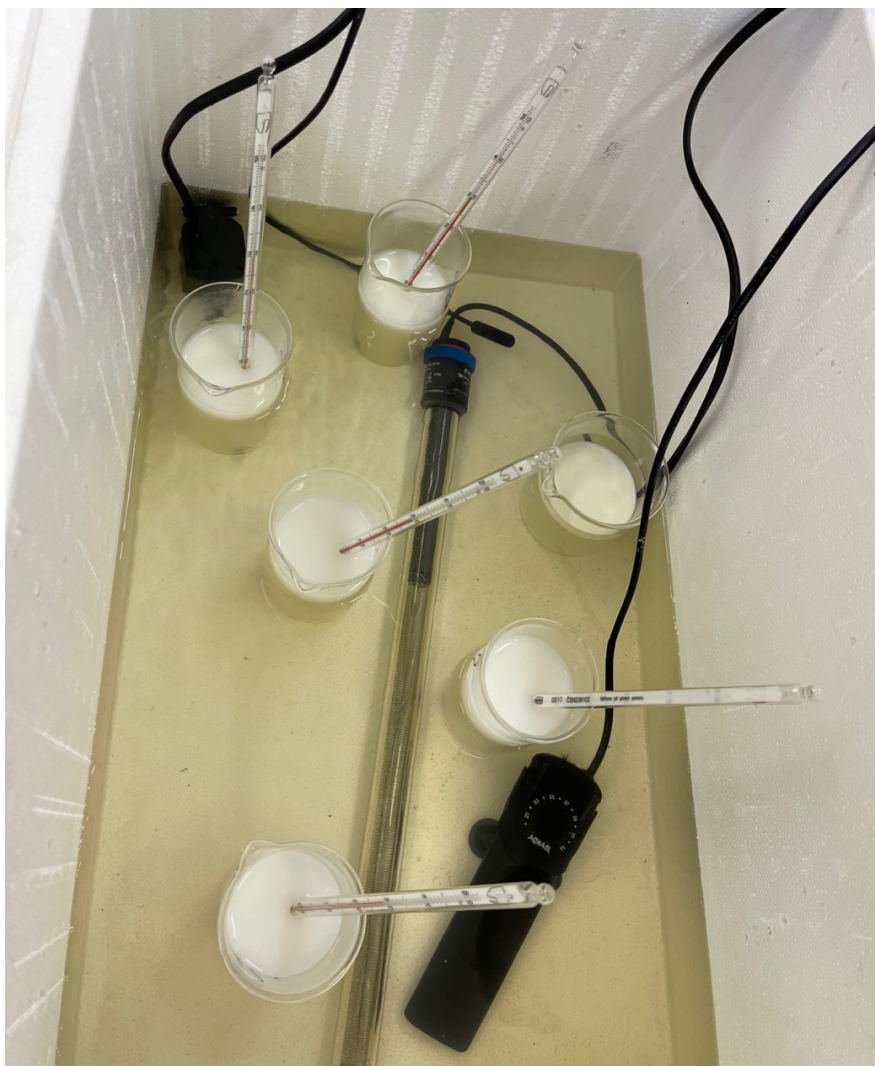
Po přibližně šesti až sedmi dnech následovalo líhnutí larev, po vylíhnutí byly larvy postupně ve všech skupinách a jejich opakování spočítány a byla vypočítána líhivost (%) společně s podílem malformovaných larev, tzn. deformovaných larev (%), např. larvy mající skoliózy, lordózy a další vady páteře. Líhivost larev (L) byla vypočítána jako: $L = VL \times 100 / CL$, kdy VL představuje počet vylíhnutých larev a CL je celkový počet nasazených jiker do inkubačního aparátu. Procento deformovaných larev bylo vypočítáno jako: počet deformovaných larev/počet vylíhnutých larev $\times 100$. Následně byly získané larvy fixovány pomocí DMSO – viz vysvětleno níže a zamrazeny šokově pomocí suchého ledu na mínus 80 °C a poté uloženy v mrazáku při teplotě mínus 80 °C. Z každé skupiny bylo po 65 dnech minimálně použito 20 ks a optimálně 35 ks zmražených larev k zjištění ploidní úrovně pomocí průtokové cytometrie – viz detailní informace níže. Po stanovení ploidní úrovně u larev průtokovou cytometrií bylo vypočítáno: procento diploidů, triploidů a haploidů v dané analyzované skupině a finální zisk triploidů. Procento

triploidů, diploidů a haploidů bylo vypočteno jako počet triploidních (diploidních, haploidních) larev/celkový počet vylíhnutých larev \times 100. Zisk triploidů byl vypočten jako $[(\text{líhivost } (\%)/100) \times (\text{procento triploidů}/100)] \times 100$.

3.4. Experiment č. 2: Teplý šok

3.4.1. Příprava teplé lázně

Teplá lázeň byla připravena v polystyrenovém termoboxu, do kterého byla nalita voda z RAS, kde se držely generační ryby. Termobox byl vybaven topítkem a teploměrem pro kontrolu teploty vody. Teplota vody v teplé lázni byla nastavena na 30 °C, teplota byla konstantně udržována po celou dobu šoku. Teplé šoky probíhaly ve dvou opakováních v závislosti na jikernačkách vytřených v různém okamžiku.



Obr. 11: Teplá šoková lázeň (foto: K. Trnka)

3.4.2. Oplodnění a aktivace gamet

Stejně jako u chladového šoku byly vytřené jikry zváženy a rozděleny do skupin dle různého časového začátku šoku. K prvnímu teplotnímu šoku byly využity 2 generační jikernačky, od kterých bylo použito celkem 45 g jiker. K dalšímu teplému šoku byly využity 3 generační jikernačky, od kterých byly jikry smíchány, celková hmotnost jiker byla 90 g. Před samotným výtěrem byla provedena kontrola spermií (viz popsáno výše). Při realizaci jednotlivých různých začátků šoku prvního teplého šoku bylo vytvořeno 6 skupin po 7,5 g jiker. U druhého šoku také bylo vytvořeno 6 skupin, ale po 15 g jiker.

U obou teplých šoků probíhalo oplození následovně: jikry v dané skupině byly smíchány s vodou, u prvního šoku 15 ml a u druhého teplotního šoku 30 ml vody (vždy dvakrát větší objem vody, než byla hmotnost jiker). Následně po 15 sekundách od aktivace jiker vodou byly k jikrám přidány spermie od tří mlíčáku (o celkovém minimálním objemu 0,17 ml na 7,5 g jiker u prvního šoku a 0,24 ml na 15 g jiker u druhého šoku). Po 90 sekundách byla z jiker slita voda společně se spermatem a oplozené jikry byly propláchnuty vodou a následně vystaveny různě dlouhé šokové lázni. Aktivované jikry byly umístěny do kruhových skleněných nádob o objemu 100 ml. Jikry byly vystavovány šoku v různé době od oplození (2; 4; 8; 12 a 16 minut po oplození) na různě dlouhou dobu (5; 10; 20; 30 a 40 minut). Odlepkování jiker probíhalo už v průběhu šoku. Jikry se odlepkovaly plnotučným mlékem (v poměru 1 díl mléka a 6 dílů vody), které bylo ohřáto na teplotu 30 °C. Po vystavení jiker teplé šokové lázni byly jikry vyjmuty z šokové lázně a okamžitě zchlazeny na teplotu 16 °C a následně bylo ukončeno odlepkování na třepačce pomocí mléka s vodou o teplotě 16 °C (Obr. 12) tak, aby odlepkování trvalo celkem 60 minut. Po 60 minutách odlepkování byly jikry propláchnuty vodou ze systému o stejné teplotě (16 °C), ve kterém následně probíhala inkubace jiker.

3.4.3. Inkubace jiker v aparátech

Přibližně 80–200 kusů propláchnutých jiker z každé skupiny, která charakterizovala daný teplý šok s různou dobou zahájení šoku a různým trváním šoku, bylo přeneseno do Petriho misek a následně vyfoceno pro pozdější přesné

spočítání počtu nasazených jiker. Tyto jikry byly vysazeny k samotné inkubaci do miniaturních plastových inkubačních aparátů o rozměrech 200 × 100 × 150 mm s objemem vody 3 litry a průtokem vody 1 l.m⁻¹ umístěných v experimentálním RAS systému (Obr. 13). S celkovým objemem vody 1500 litrů vody a konstantním průtokem kvalitní čisté vody, tak aby voda v každém aparátu byla obměněna 2x za 60 minut. V každé inkubační nádobě byla umístěna hadička s přitékající vodou a jikry byly umístěny v aparátech na jemné síťce (rozměry ok 0,5 × 0,5 mm). Přebytečná voda odtékala kruhovým otvorem se síťovinou s velikostí ok 250 μm ven z inkubačního aparátu do žlabu k následné úpravě vody do filtrací a provzdušňování v rámci experimentálního RAS, jak tomu bylo u chladového šoku. Tím se v aparátech neustále obměňovala čerstvá okysličená voda. Inkubační aparáty byly popsány pro přesnou identifikaci dané skupiny (podle iniciace a trvání šoku), viz. popsáno výše u chladového šoku. Každá skupina v rámci každého teplého šoku měla 2 opakování při inkubaci oplozených jiker. Inkubace jiker probíhala při teplotě 16 °C.

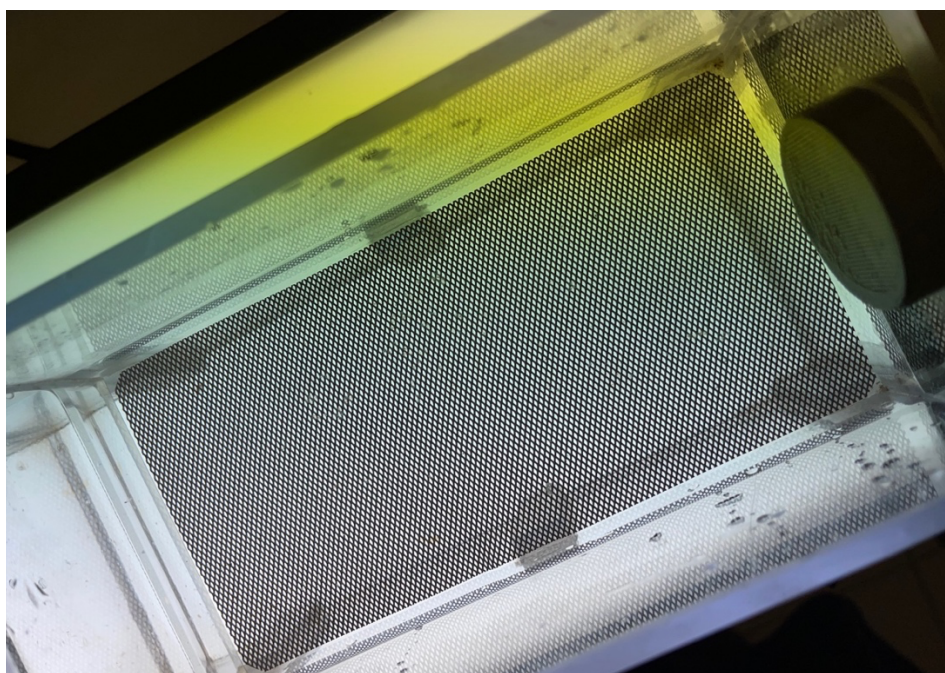
Celkově bylo u každého teplotního šoku vystaveno šokům 25 skupin (každá 4 opakování) s různými časovými expozicemi po aktivaci gamet a různými dobami působení šoku. K těmto skupinám byly na inkubaci přidány i 4 kontrolní skupiny oplozených jiker, které nebyly vystaveny šokové lázni.

3.4.4. Počítání larev, líhnivost, deformita

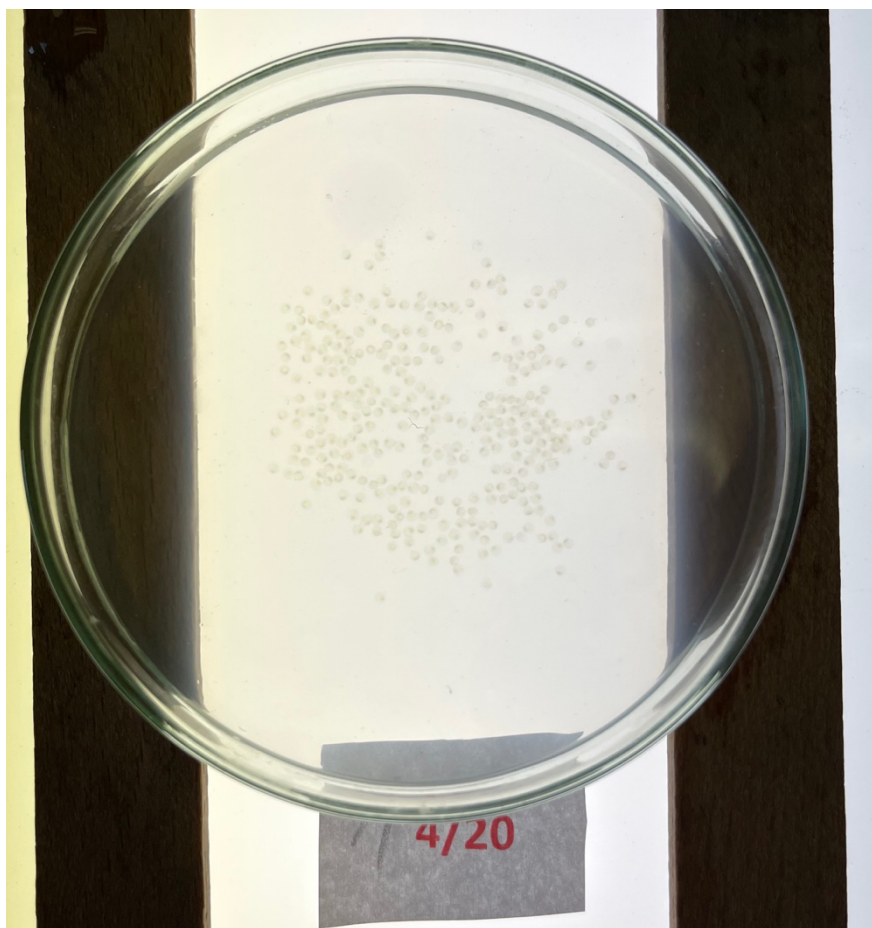
Po přibližně šesti až sedmi dnech následovalo líhnutí larev, po vylíhnutí byly larvy všech skupin postupně spočítány a byla zaznamenána líhnivost (%) společně s podílem malformovaných larev, tzn. deformovaných larev (%), např. skoliózy, lordózy a další vady páteře. Po vyhodnocení líhnivosti a podílu deformit byly larvy fixovány v DMSO (viz níže) a šokově zamrazeny na mínus 80 °C pomocí suchého ledu. Vzorky larev byly následně vloženy do mrazáku s teplotou mínus 80 °C. Z každé skupiny bylo po 65 dnech minimálně použito 20 ks a optimálně 35 ks zmražených larev k zjištění ploidní úrovně pomocí průtokového cytometru – viz detailní informace níže. Po stanovení ploidní úrovně u larev průtokovou cytometrií se vypočítalo procento diploidů, triploidů a haploidů a celkový zisk triploidních larev v dané analyzované skupině. Veškeré postupy výpočtů uvedeny výše viz. chladový šok.



Obr. 12: Odlepkování jiker na třepačce (foto: K. Trnka)



Obr. 13: Inkubační aparát s nasazenými jikrami (foto: K. Trnka)



Obr. 14: Jikry k počítání a následnému nasazení na inkubační aparáty (foto: K. Trnka)

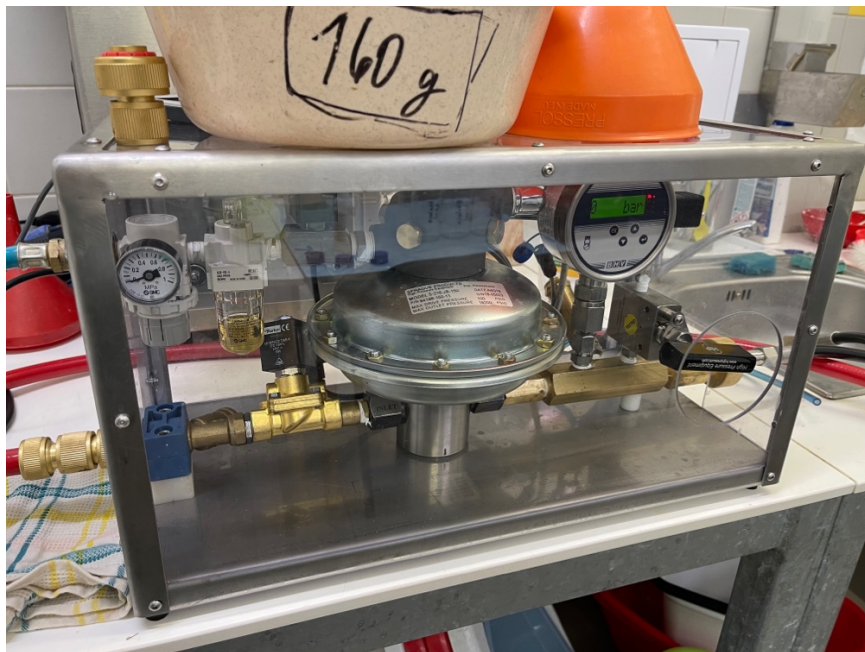
3.5. Experiment č. 3: Tlakový šok

3.5.1. Příprava tlakové jednotky

Byla využita přenosná tlaková jednotka z Laboratoře molekulární, buněčné a kvantitativní genetiky, VÚRH, FROV JU. Technologická sestava tlakové jednotky byla zkompletována z vysokotlakého kompresoru s pojistným ventilem, kterým je dodáván stlačený atmosférický vzduch pomocí vysokotlakých hadic a přes redukční ventil do násobiče. Ten je schopen následně vytvořit požadovaný tlak v tlakové nádobě, kam byly umístěny oplozené a odlepkované jikry s vodou.



Obr. 15: Tlaková jednotka k indukci triploidie (foto: K. Trnka)



Obr. 16: Bližší pohled na části tlakové jednotky (foto: K. Trnka)

3.5.2. Oplození a aktivace gamet

K tlakovým šokům byly získávány jikry od dvou jikernaček. Získané jikry byly zváženy a rozděleny do skupin podle různé intenzity působení tlakového šoku. K prvnímu tlakovému šoku bylo použito 90 g jiker od první generační ryby, od druhé generační ryby bylo ke druhému tlakovému šoku použito 48 g jiker a ke třetímu tlakovému šoku bylo použito 72 g jiker od druhé generační jikernačky. Celkem tedy bylo použito 120 g jiker od druhé generační jikernačky na dva typy šoků. Před oplozením jiker byla provedena kontrola spermií (viz výše). Jikry k prvnímu tlakovému šoku byly rozděleny do 3 experimentálních skupin + kontrola (jikry, které nebyly vystaveny šoku), každá tato skupina společně s kontrolou měla 3 opakování. Jikry byly rozděleny do každé skupiny po hmotnosti 7,5 g jiker. Jikry v dané skupině byly smíchány s vodou 15 ml (dvakrát větší objem, než byla hmotnost jiker). Následně po 15 sekundách od aktivace jiker vodou byly k jikrám přidány spermie od tří mlíčáků (o celkovém objemu 0,17 ml na 7,5 g jiker). Po 90 sekundách byla z jiker slita voda se spermatem a oplozené jikry byly propláchnuty vodou a přesunuty k odlepkování.

Ke druhému tlakovému šoku bylo použito 48 g jiker, které byly rozděleny do 3 experimentálních skupin + kontrola, každá skupina společně s kontrolou měla 3 opakování. Jikry byly rozděleny do každé skupiny po hmotnosti 4 g. Jikry v dané skupině byly smíchány s vodou 8 ml (dvakrát větší objem, než je hmotnost jiker). Následně po 15 sekundách od aktivace jiker vodou byly k jikrám přidány spermie od tří mlíčáků (o celkovém objemu 0,09 ml na 4 g jiker). Po 90 sekundách byla z jiker slita voda se spermatem a oplozené jikry byly propláchnuty vodou a následně byly odlepkovány.

Ke třetímu tlakovému šoku bylo použito 72 g jiker, které byly rozděleny do 3 experimentálních skupin + kontrola, všechny skupiny a kontrola měly 3 opakování, proto byly jikry rozděleny po hmotnostech 6 gramů. Jikry v dané skupině byly smíchány s vodou 12 ml (dvakrát větší objem, než je hmotnost jiker). Následně po 15 sekundách od aktivace jiker vodou byly k jikrám přidány spermie od tří mlíčáků (o celkovém objemu 0,14 ml na 6 g jiker). Po 90 sekundách byla z jiker slita voda se spermatem a oplozené jikry byly propláchnuty vodou a následně byly odlepkovány.

3.5.3. Odlepkování jiker před umístěním do tlakové nádoby

Jikry candáta byly před vložením do tlakové jednotky nutné zbavit lepivosti. Po oplození byly jikry odlepkovány pomocí roztoku alkalázy, tato metoda se ukázala jako nejlepší a nejrychlejší metoda odlepkování jiker candáta obecného, např. oproti odlepkování v roztoku plnotučného mlékem a vody. Dvě minuty po oplození a promíchání jiker se spermatem a aktivační vodou byl k odlepkování využit roztok alkalázy. Bylo použito 1,5 ml roztoku alkalázy, ten byl naředěn 998,5 ml 1% NaCl (20 °C) roztoku a míchán po dobu dvou minut s odlepkovanými jikrami, poté se jikry propláchly vodou a vložily do tlakové jednotky, kde byly vystaveny určitému tlaku.



Obr. 17: Propláchnutí jiker po odlepkování roztokem enzymu alkalázy (foto: K. Trnka)

3.5.4. Průběh tlakového šoku, inkubace jiker, počítání larev

Aktivované a odlepkované jikry byly přelity do tlakové jednotky. U všech skupin probíhal šok 5 minut po oplození jiker. Jikry první skupiny byly

vystaveny tlakovému šoku s jednotnou hodnotou tlaku 70 MPa na 5 minut, další skupina byla vystavena stejnému tlaku na 10 minut. Třetí skupina byla vložena do tlakové jednotky na 20 minut při stejném tlaku, tzn. 70 MPa. Každý tento typ (skupina) šoku měl 3 opakování a kontrolu.

Od všech skupin bylo odebráno přibližně 80–200 kusů jiker z každé skupiny, která charakterizovala daný tlakový šok s různou dobou trvání šoku, tyto jikry byly přemístěny na Petriho misky a následně vyfoceny pro pozdější přesné spočítání počtu nasazených jiker. Tyto jikry byly vysazeny k samotné inkubaci do miniaturních plastových aparátů o rozměrech 200 × 100 × 150 mm s objemem vody 3 litry a průtokem vody 1 ml.l⁻¹ umístěných v experimentálním RAS systému s celkovým objemem vody 1500 litrů a konstantním průtokem kvalitní čisté a okysličené vody tak, aby proběhla obměna vody 2x za 60 minut. Do každé inkubační nádoby přitékala voda hadičkou, jikry byly umístěny v aparátech na síťce (rozměry ok 0,5 × 05 mm) a přebytečná voda odtékala kruhovým otvorem se síťovinou s velikostí ok 250 μm ven z inkubačního aparátu do žlabu k následné filtraci a provzdušnění v rámci použitého RAS. Inkubační aparáty byly popsány pro přesnou identifikaci dané skupiny (podle doby trvání tlakového šoku). Každá skupina obsahovala 3 opakování daného tlakového šoku. Inkubace jiker probíhala při 16 °C.

Přibližně po 6-7 dnech byly vylíhlé larvy postupně ve všech skupinách spočítány a byla zaznamenána líhivost (%) společně s podílem různých tělesných malformací u larev, tzn. deformovaných larev (%). Larvy byly následně fixovány v roztoku DMSO – viz níže, zamrzeny pomocí suchého ledu na mínus 80 °C a poté uloženy v mrazáku při dané teplotě. Z každé skupiny bylo po 65 dnech minimálně použito 20 ks a optimálně 35 ks zmrazených larev k zjištění ploidní úrovně na průtokovém cytometru – viz detailní informace níže. Po stanovení ploidní úrovně larev průtokovou cytometrií se vypočítalo procento diploidů, triploidů a haploidů v dané analyzované skupině, a také finální zisk triploidů. Veškeré postupy výpočtů uvedeny výše viz. chladový šok.



Obr. 18: Přelití odlepkovaných jiker do tlakové jednotky (foto: K. Trnka)

3.6. Fixace a zamrazení vzorků k následným analýzám pomocí průtokové cytometrie

Vylíhlé larvy z každého experimentu byly před analýzou ploidie průtokovou cytometrií usmrceny plynným CO₂, fixovány a zamrazeny v roztoku DMSO-citrátovém pufru (dimethylsulfoxid) v Eppendorfových mikrozkuřavkách pomocí suchého ledu do teploty mínus 80 °C a poté uloženy v mrazáku při teplotě mínus 80 °C (Hubálek a Flajšhans, 2021).

3.7. Měření ploidní úrovně průtokovou cytometrií

Larvy byly po fixaci přeneseny do Laboratoře molekulární, buněčné a kvantitativní genetiky VÚRH, FROV JU, kde byly podrobeny testování ploidní úrovně na průtokovém cytometru (Partec CCA I; Partec GmbH, Münster, Germany). Z každé testované skupiny a z kontroly se testovalo nejlépe 20–35 ks larev v případě, že této hodnoty dosáhl počet vylíhnutých larev. Tato metoda je založena na propustnosti buněčné membrány, díky obarvení jaderné DNA pomocí DNA-specifického barviva s následným měřením fluorescence vyzářené komplexem obarvené DNA. Výsledné hodnoty ploidie se zobrazily pomocí

intenzity fluorescence v jádrech analyzované suspenze na histogramu. Triploidní ryby měly 1,5krát více DNA než ryby diploidní, proto se ryby triploidní zobrazují 1,5krát dále na ose x oproti rybám diploidním (Flajšhans a kol., 2013).

3.8. Statistické hodnocení dat

Výsledky byly analyzovány pomocí softwaru STATISTICA 12 (StatSoft CR, s.r.o., Praha, Česká republika) a za pomoci programu MS Excel 2023.

Pro vyhodnocení všech dat v této diplomové práci byla zvolena hladina významnosti $p < 0,05$. Pro zjištění, zda mají data normální rozdělení, byl použit Shapiro-Wilkův test, následovala jednocestná analýza rozptylu (ANOVA) a Tukeyho test. Pokud data nevyhovovala potřebám parametrické statistiky, byl použit Kruskalův-Wallisův test.

4. Výsledky

4.1. Chladový šok

4.1.1. Chladový šok s 20minutovou expozicí

Tab. 2: Jikry vystavené chladovému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 20 minut

Skupina	2/20	4/20	8/20	12/20	16/20	Kontrola
Líhivost (%)	11,44±4,77 ^c	11,46±1,82 ^c	24,13±2,18 ^b	34,96±7,23 ^a	25,64±0,40 ^b	39,29±27,19 ^a
Deformity (%)	0	28,57±14,29 ^a	2,5±2,5 ^b	5,36±5,36 ^b	5,85±2,15 ^b	7,52±5,81 ^b
Triploidní larvy (%)	0	60	0	0	0	0
Diploidní larvy (%)	100	40	96,7	100	100	100
Haploidní larvy (%)	0	0	3,3	0	0	0
Zisk triploidů (%)	0	6,88±0,62	0	0	0	0

U chladového šoku s 20minutovou expozicí bylo dosaženo triploidního stavu pouze u skupiny jiker vystavených šoku 4 minuty po oplození jiker, kdy skupina obsahovala 60 % triploidů, hodnota zisku triploidů byla v této skupině 6,88±0,62 %, líhivost byla 11,46±1,82 % a podíl deformovaných larev byl 28,57±14,29 %. V této skupině byl nalezen nejvyšší počet triploidních larev ze všech testovaných skupin chladového šoku.

4.1.2. Chladový šok se 40minutovou expozicí

Tab. 3: Jikry vystavené chladovému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 40 minut

Skupina	2/40	4/40	8/40	12/40	16/40	Kontrola
Líhivost (%)	19,29±1,34 ^b	20,33±3,67 ^b	42,38±9,05 ^a	36,93±2,65 ^a	15,96±1,35 ^b	39,29±27,19 ^b
Deformity (%)	8,61±0,92 ^a	0 ^c	0 ^c	0 ^c	2,78±2,78 ^b	7,52±5,81 ^a
Triploidní larvy (%)	0	10	0	0	0	0
Diploidní larvy (%)	100	43,3	100	100	100	100
Haploidní larvy (%)	0	46,7	0	0	0	0
Zisk triploidů	0	2,03±0,35	0	0	0	0

Chladový šok se 40minutovou expozicí obsahoval stejně jako u předchozího šoku triploidní jedince pouze u skupiny jiker vystavených chladovému šoku 4 minuty po oplození jiker. Celkový podíl triploidních larev byl pouze 10 % a zisk triploidů 2,03±0,35 %. U této skupiny bylo dosaženo líhivosti larev 20,33±3,67 % a skupina neobsahovala žádné procento deformovaných larev.

4.1.3. Chladový šok se 60minutovou expozicí

Tab. 4: Jikry vystavené chladovému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 60 minut

Skupina	2/60	4/60	8/60	12/60	16/60	Kontrola
Líhivost (%)	16,91±5,31 ^b	9,25±0,32 ^c	25,52±6,11 ^a	18,64±3,79 ^b	16,30±1,65 ^b	39,29±27,19 ^a

Deformity (%)	4,55±4,55 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	2,94±2,94 ^a	7,52±5,81 ^a
Triploidní larvy (%)	18,2	16,7	0	0	0	0
Diploidní larvy (%)	77,3	27,7	100	100	100	100
Haploidní larvy (%)	4,5	55,6	0	0	0	0
Zisk triploidů (%)	3,08±0,21	1,55±0,12	0	0	0	0

U chladového šoku s 60minutovou expozicí šoku bylo dosaženo triploidních larev už u dvou skupin. Největšího podílu triploidních larev bylo dosaženo u jiker vystavených chladovému šoku 2 minuty po oplození, kdy procento triploidů bylo 18,2 % a zisk triploidů dosáhl hodnoty 3,08±0,21 %. Líhivost larev u této skupiny byla 16,81±5,31 % a procento deformit u larev bylo 4,55±4,55 %. Druhého největšího množství triploidních larev u 60minutové expozice chladového šoku bylo dosaženo u jiker vystavených chladové lázni 4 minuty po oplození. Zde bylo dosaženo podílu 16,2 % triploidních larev, zisk triploidů činil 3,08±0,21 %, líhivost larev byla 9,25±0,32 % a tato skupina neobsahovala žádné deformované larvy po jejich vylíhnutí.

4.1.4. Chladový šok s 90minutovou expozicí

Tab. 5: Jikry vystavené chladovému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 90 minut

Skupina	2/90	4/90	8/90	12/90	16/90	Kontrola
Líhivost (%)	18,68±2,01 ^b	9,59±0,66 ^c	23,93±1,51 ^b	20,32±2,67 ^b	3,25±0,75 ^c	39,29±27,19 ^a
Deformity (%)	0 ^c	23,33±6,67 ^a	0 ^c	21,39±6,39 ^a	0 ^c	7,52±5,81 ^b

Triploidní larvy (%)	32	14,3	10	0	0	0
Diploidní larvy (%)	21,6	50	90	100	100	100
Haploidní larvy (%)	46,4	35,7	0	0	0	0
Zisk triploidů (%)	5,98±0,35	1,37±0,18	2,39±0,27	0	0	0

U chladového šoku s 90minutovou expozicí šoku bylo dosaženo triploidního stavu larev u třech skupin různě ošetřených oplozených jiker. A to u skupin vystavených chladovému šoku 2; 4 a 8 minut po oplození jiker. Nejvíce triploidních jedinců obsahovala skupina vystavená šoku 2 minuty po oplození, kdy bylo dosaženo 32 % triploidních larev a zisk triploidů dosáhl na hodnotu 5,98±0,35 %. Tato skupina byla také zároveň druhou skupinou s největším podílem triploidních jedinců z chladového šoku. Tato skupina neobsahovala žádné deformované larvy a líhivost larev v této skupině byla 18,68±2,01 %.

4.1.5. Chladový šok se 120minutovou expozicí

Tab. 6: Jikry vystavené chladovému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker na dobu 120 minut

Skupina	2/120	4/120	8/120	12/120	16/120	Kontrola
Líhivost (%)	9,51±0,08 ^c	13,75±1,75 ^b	32,27±4,09 ^a	8,60±0,03 ^c	8,14±0,27 ^c	39,29±27,19 ^a
Deformity (%)	0 ^c	2,5±2,5 ^b	0 ^c	12,5±12,5 ^a	18,84±8,73 ^a	7,52±5,81 ^b
Triploidní larvy (%)	37,5	33,3	0	0	0	0
Diploidní larvy (%)	33,3	66,7	100	100	90,9	100

Haploidní larvy (%)	29,2	0	0	0	9,1	0
Zisk triploidů (%)	3,57±0,05	4,58±0,25	0	0	0	0

U chladového šoku se 120minutovou expozicí šoku bylo dosaženo triploidního stavu pouze u jiker vystavených šoku 2 a 4 minuty po oplození jiker. Skupina vystavená šoku 2 minuty po oplození dosáhla triploidního stavu na úrovni 37,5 %, zisk triploidů byl 3,57±0,05 %. Zjištěná líhivost larev byla 9,51±0,08 % a nebyly zde nalezeny žádné deformované larvy. Tato skupina na rozdíl od skupiny jiker vystavených šoku 4 minuty po oplození obsahovala i 29,2 % haploidních larev. Třetí skupina jiker s největším počtem triploidních larev ze všech skupin vystavených chladovému šoku, byla skupina vystavená šoku 4 minuty po oplození, která dosáhla na množství 33,3 % triploidů, zisk triploidů činil 4,58±0,25 %, líhivost larev dosáhla 13,75±1,75 % a podíl deformovaných larev byl 2,5±2,5 %.

4.2. Teplý šok

4.2.1. Teplý šok s 5minutovou expozicí

Tab. 7: Jikry vystavené teplému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 5 minut

Skupina	2/5	4/5	8/5	12/5	16/5	Kontrola
Líhivost (%)	18,8±9,2 ^c	16,1±7,19 ^c	18,6±3,78 ^c	23,8±2,73 ^b	16±3,04 ^c	39,6±12,34 ^a
Deformity (%)	5,35±0,2 ^b	14,7±8,38 ^a	0 ^c	6,72±4,64 ^b	15,65±13,76 ^a	0 ^c
Triploidní larvy (%)	6,7	0	10	5,3	3,3	0
Diploidní larvy (%)	93,3	100	90	94,7	96,7	100

Zisk triploidů	1,26±0,55	0	1,86±0,21	1,26±0,12	0,53±0,11	0
----------------	-----------	---	-----------	-----------	-----------	---

U teplého šoku s 5minutovou expozicí bylo dosaženo triploidních larev u skupiny jiker vystavených šoku 2; 8; 12 a 16 minut po oplození jiker. Největšího podílu triploidních larev bylo zjištěno u skupiny jiker vystavených teplému šoku 8 minut po oplození, kdy tato skupina byla také v konečném výsledku druhá s největším podílem triploidních jedinců ze všech skupin teplého šoku. Podíl triploidů v této skupině dosáhl hodnoty 10 % a zisk triploidů činil 1,86±0,21 %. Líhivost larev v této skupině byla 18,6±3,78 %, nebyly zde nalezeny žádné deformované larvy.

4.2.2. Teplý šok s 10minutovou expozicí

Tab. 8: Jikry vystavené teplému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut jiker po oplození na dobu 10 minut

Skupina	2/10	4/10	8/10	12/10	16/10	Kontrola
Líhivost (%)	8±0,23 ^b	7,7±0,3 ^b	6±0,32 ^b	11,6±4,54 ^b	10,5±1,67 ^b	39,6±12,34 ^a
Deformity (%)	5,71±5,71 ^a	0 ^b	0 ^b	7,14±7,14 ^a	5,49±3,6 ^a	0 ^b
Triploidní larvy (%)	20	23,3	10	4	10	0
Diploidní larvy (%)	80	76,7	90	96	90	100
Zisk triploidů	1,6±0,11	1,794±0,1	0,6±0,1	0,464±0,05	1,05±0,1	0

U teplého šoku s 10minutovou expozicí jiker bylo dosaženo triploidního stavu u všech skupin ošetřených jiker. Nejvíce triploidů obsahovaly skupiny jiker vystavených šoku 4 a následně 2 minuty po oplození, kdy procento triploidů u jiker vystavených šoku 4 minuty po oplození bylo 23,3 %, se ziskem triploidů

1,6±0,11 %. U skupiny jiker vystavených šoku 2 minuty po oplození bylo množství triploidů 20 % a zisk triploidů odpovídal 1,794 %.

4.2.3. Teplý šok s 20minutovou expozicí

Tab. 9: Jikry vystavené teplému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 20 minut

Skupina	2/20	4/20	8/20	12/20	16/20	Kontrola
Líhivost (%)	8,5±8,32 ^b	2,8±1 ^b	2,1±0,48 ^b	4,6±1,29 ^b	5,7±0 ^b	39,6±12,34 ^a
Deformity (%)	7,14±7,14 ^a	10,42±2,08 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Triploidní larvy (%)	43,8	33	9,1	3,3	0	0
Diploidní larvy (%)	56,2	67	90,9	96,7	100	100
Zisk triploidů	3,72±0,01	0,92±0,05	0,19±0,01	0,15±0,01	0	0

U teplého šoku s 20minutovou expozicí šoku bylo dosaženo triploidních larev u všech skupin jiker, kromě skupiny vystavené šoku 16 minut po oplození. Nejvíce triploidních larev bylo nalezeno u skupiny jiker vystavených 20minutové expozici teplému šoku 2 minuty po oplození, kdy počet triploidních larev byl 43,8 % a hodnota zisku triploidů dosáhla 3,72±0,01 %. Tato skupina byla ve výsledné analýze skupinou s největším podílem triploidů ze všech testovaných skupin teplého šoku. Líhivost larev byla 8,5±8,32 % a larvy dosahovaly tělesných deformit 7,14±7,14 % deformit. Druhý nejvyšších podíl triploidů (0,92±0,05 %) obsahovala skupina jiker vystavených šoku 4 minuty po oplození.

4.2.4. Teplý šok se 30minutovou expozicí

Tab. 10: Jikry vystavené teplému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 30 minut

Skupina	2/30	4/30	8/30	12/30	16/30	Kontrola
Líhivost (%)	2,2±1,18 ^b	1,6±0,05 ^b	1,2±0,09 ^b	2,1±0,86 ^b	1,8±1,41 ^b	39,6±12,34 ^a
Deformity (%)	5,56±5,56 ^c	0 ^c	41,67±8,33 ^a	19,64±5,36 ^b	0 ^c	0 ^c
Triploidní larvy (%)	30,8	40	0	0	0	0
Diploidní larvy (%)	69,2	60	100	100	100	100
Zisk triploidů	0,68±0,01	0,64±0,02	0	0	0	0

Teplý šok se 30minutovou expozicí dosáhl navození triploidního stavu pouze u jiker vystavených teplému šoku 2 a 4 minuty po oplození jiker. U jiker vystavených šoku 2 minuty po oplození bylo dosaženo 30,8 % triploidů a zisk triploidů byl na úrovni 0,68±0,01 %. U jiker vystavených teplému šoku 4 minuty po oplození bylo množství triploidních larev 40 % a zisk triploidů byl 0,64±0,02 %. U 30minutové expozice bylo zřetelné, že prodloužení vystavení jiker šoku má za následek snižování podílu triploidů oproti předchozím kratším expozicím.

4.2.5. Teplý šok se 40minutovou expozicí

Tab. 11: Jikry vystavené teplému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 40 minut

Skupina	2/40	4/40	8/40	12/40	16/40	Kontrola
Líhivost (%)	0,7±0,2 ^b	1±0,03 ^b	0,2±0,15 ^b	1,1±0,48 ^b	3±0,61 ^b	39,6±12,34 ^a

Deformity (%)	37,5±12,5 ^a	0 ^c	0 ^c	7,14±7,14 ^c	19,64±5,36 ^b	0 ^c
Triploidní larvy (%)	0	0	50	0	0	0
Diploidní larvy (%)	100	100	50	100	100	100
Zisk triploidů	0	0	0,1±0	0	0	0

U jiker vystavených 40minutové expozice šoku bylo dosaženo triploidního stavu pouze u skupiny jiker vystavených šoku 8 minut po oplození jiker. Tato skupina obsahovala 50 % triploidních jedinců, ale celkově pouze 0,1±0 % zisku triploidních larev. Tento výsledek byl způsoben velmi nízkou líhivostí larev. U této skupiny byla totiž zjištěna líhivost larev pouze na úrovni 0,2±0,15 % a nebylo zde zjištěno žádné procento deformovaných larev. Zisk triploidů byl 0,1±0 %. Z těchto výsledků lze usoudit, že prodlužující se doba expozice jiker teplému šoku vede ke snižujícímu se podílu triploidních larev.

4.3. Tlakový šok

Tab. 12: Jikry vystavené tlakovému šoku 70 MPa 5 minut po oplození jiker po dobu 5; 10 a 20 minut

Délka šoku (min)	5	10	20	Kontrola
Líhivost (%)	18,2±2,7 ^b	11,5±3,5 ^b	12,8±3,0 ^b	27,5±8,9 ^a
Deformity (%)	2,5±0,7 ^a	2,0±0,5 ^a	4,0±1,0 ^a	0±0 ^b
Triploidní larvy (%)	25	90	95	0
Diploidní larvy (%)	70	5	2	100

Haploidní larvy (%)	5	5	3	0
Zisk triploidů	4,6±1,3^b	10,4±2,0^a	12,2±2,5^a	0±0^b

U tlakového šoku bylo dosaženo triploidního stavu u všech skupin jiker vystavených tlaku 70 MPa, kdy byly jikry vystavené tlakovému šoku vždy 5 minut po oplození a na dobu 5; 10; 20 minut. Líhivost nebyla vysoká u žádné skupiny jiker, a to ani u kontrolní skupiny jiker, kdy jikry nebyly vystavovány šoku. Hlavním problémem nízké hodnoty líhivosti (%) byly nekvalitní jikry na konci výtěrového období generačních ryb candáta obecného. Ale i tak lze konstatovat, že využití tlakových šoků k indukci triploidního stavu u candáta obecného dosáhlo nejlepší výsledků při indukci triploidie.

Nejvyšší líhivosti larev ve srovnání s kontrolou dosáhla skupina jiker vystavených šoku 70 MPa na dobu 5 minut, kdy hodnota líhivosti byla 18,2±2,7 %. Líhivost larev u dalších dvou skupin jiker byla nižší a hodnoty líhivosti larev těchto skupin byly na podobné úrovni. Největšího podílu triploidních larev dosáhla skupina jiker vystavená tlakovému šoku na 20 a 10 minut, kdy skupina jiker vystavená tlakovému šoku na 20 minut dosáhla hodnoty 95 % triploidních larev a zisku triploidů 12,2±2,5 %. Druhá nejvyšší hodnota indukce triploidie byla dosažena u jiker vystavených tlakovému šoku na 10 minut, kdy bylo dosaženo 90 % triploidních larev a zisk triploidů byl tedy 10,4±2,0 %. U skupiny jiker vystavených tlaku na 5 minut byl zjištěn nejnižší podíl triploidních larev, a to 25 % a zisk triploidů byl pouze 4,6±1,3 %.

Nejvyššího množství deformovaných larev dosáhla skupina jiker, které byly vystaveny tlakovému šoku po dobu 20 minut. Dále pak v rámci deformovaných larev následovala skupina vystavená tlakovému šoku na 5 minut a nejnižšího množství deformit bylo dosaženo u skupiny jiker vystavené tlakovému šoku na 10 minut.

5. Diskuze

Experimenty v rámci této diplomové práce nevykazovaly vysoké hodnoty líhnivosti larev ($0,2 \pm 0,15$ % – $42,38 \pm 9,05$ %) jak v kontrole, tak ani u jednotlivých skupin jiker vystavených šokům. Tyto hodnoty byly v kontrolních skupinách u chladového šoku $39,29 \pm 27,19$ %, u teplého šoku v kontrole $39,6 \pm 12,34$ % a u tlakového šoku dokonce jen $27,5 \pm 8,9$ %. Kříšťan a kol. (2018) udává průměrnou líhnivost larev z kvalitních jiker candáta obecného na úrovni 60–70 %, to znamená, že kvalita našich jiker od generačních ryb nebyla zcela ideální a projevila se negativně na životaschopnosti embryí a následně na líhnivosti larev. U všech skupin, které prošly jedním z typů šoku, došlo vždy ke snížení hodnoty líhnivosti larev oproti kontrolnímu vzorku. V našem experimentu byl zjištěn vysoký rozptyl hodnot líhnivosti larev v každé testované skupině, který se pak projevil na celkovém výsledku zisku triploidů. Johnstone (1985) a Malison a kol. (1993) udávají, že tyto rozdílné výsledky v každé testované experimentální skupině mohou být způsobeny právě nízkou kvalitou jiker (směs jiker od několika samic). Garcia-Abiado a kol. (2001) také udávají, že s prodlužující se dobou začátku šoku dochází k postupnému poklesu líhnivosti larev, kdy v jejich studii byly využity jikry hybridního candáta *S. vitreum* (jikernačka) x *S. canadensis* (mlíčák), které byly vystaveny chladovým šokům s teplotou $1,2$ °C, 5 minut po oplození na dobu expozice 120; 130 a 150 minut, kdy docházelo k postupnému snižování líhnivosti larev. V našem případě docházelo u chladového šoku spíše ke zvyšování líhnivosti larev s prodlužující se dobou začátku šoku, ale naopak tento jev vedl ke snižujícímu se podílu triploidních larev ve skupině, např. 20minutová expozice jiker chladovému šoku, 4 minuty po aktivaci jiker vedla k zisku triploidních larev na úrovni $6,88 \pm 0,62$ %, s líhnivostí larev $11,46 \pm 1,82$ %, ale u jiker vystavených chladovému šoku 16 minut po aktivaci jiker s 20minutovou expozicí vedlo k vyšší líhnivosti larev $25,64 \pm 0,40$ %, ale k nulovému zisku triploidů. Zde byly nalezeny pouze diploidní larvy. Tento jev se objevoval v celém experimentu u různých skupin, které byly vystaveny různě dlouhé expozici šoku.

Dadras a kol. (2021) udává ve svém experimentu týkající se indukce triploidie u candáta obecného pomocí chladového šoku ($1,0$ – $1,1$ °C), že se průměrná líhnivost larev snižuje s prodlužující délkou šoku, kdy například při indukci

triploidie pomocí chladového šoku 5 minut po aktivaci gamet po dobu 20minutové expozici jiker byla líhivost 23,2 % a při 90minutové expozici už tato hodnota klesla na 17,3 %. Autoři Petruzzi a Chatain (2000) v jejich experimentu navození triploidního stavu u mořčáka evropského (*Dicentrarchus labrax*) také udávají postupnou snižující se líhivost larev ze 76 % na 56 % s prodlužováním doby šoku. V jejich experimentu byl využit chladový šok v rozmezí 4–7 minut od aktivace jiker s vystavením jiker do chladové lázně s teplotou 0–1 °C na 15minutovou až 20minutovou expozici jiker šoku. Blecha a kol. (2016) využili ve svém experimentu jikry candáta obecného k navození triploidního stavu pomocí teplého šoku (teplota 29 °C a 31 °C) s začátkem šoků 1; 3; 5; 7 a 10 minut po aktivaci jiker s použitím 20minutové a 40minutové expozice šoku. Zjistil, že nejvyšší líhivost ve skupině jiker vystavené teplému šoku s teplotou 29 °C po 10 minutách od aktivace jiker, které byly vystaveny 20minutové expozici byla líhivost larev 11,5±1 % a u 40minutové expozice pouze 1,3±1,8 %. U šoku s teplotou 31 °C byla líhivost larev z ošetřených jiker po 10 minutách od aktivace po dobu 20minutové expozice 20±5,2 % a u 40minutové expozice jen 18,3±7,6 %. Z těchto výsledných hodnot lze usoudit, že jedním z velice důležitých faktorů je také teplota šokové lázně. V našem případě hodnota líhivosti larev u teplého šoku (30 °C) s 20minutovou expozicí šoku byla nejvyšší u skupiny jiker vystavených teplému šoku 2 minuty po aktivaci gamet, kdy hodnota líhivosti larev byla 8,5±8,32 % a u 40minutové expozice byla zjištěna nejvyšší líhivost larev u jiker vystavených šoku 16 minut po aktivaci jiker a tato hodnota líhivosti larev dosáhla pouze na 3±0,61 %.

Blecha a kol. (2016) také udávají, že se s prodlužující expozicí jiker v teplém šoku snižuje množství vylíhnutých larev. Z našeho experimentu můžeme s tímto faktem souhlasit, např. při teplém šoku s 5minutovou expozicí jiker 2 minuty po aktivaci byla líhivost larev 18,8±9,2 % a postupně docházelo k jejímu snižování, kdy při 40minutové expozici jiker v teplém šoku 2 minuty po aktivaci byla líhivost larev pouze 0,7±0,2 %.

Maxime (2008) udává, že výskyt deformovaných larev je častým problémem při indukci triploidie a má negativní vliv na potomstvo, protože vede ke zvýšení mortality larev potažmo juvenilních ryb během jejich odchovu. V našem experimentu například u tlakového šoku bylo zjištěno, že s prodlužující se

délkou expozice šoku docházelo ke zvyšování množství/podílu deformovaných larev. Při expozici ošetřených jiker 10minutovou expozicí bylo nalezeno $2,0 \pm 0,5$ % deformit vylíhlých larev a u 20minutové expozice už $4,0 \pm 1,0$ % deformovaných larev. Blecha a kol. (2016) udávají ve svém experimentu indukce triploidie u candáta obecného pomocí teplého šoku s teplotou $31\text{ }^{\circ}\text{C}$, že se zvyšující se expoziční dobou společně s prodlužující se dobou šoku od aktivace jiker dochází ke snižování množství deformovaných larev, kdy při teplotním šoku s 20minutovou expozicí a začátkem šoku 1 minutu po oplození bylo nalezeno 74,1 % deformovaných larev a při 40minutové expozici 1; 3; 5 a 7 minut po oplození nebylo zaznamenáno žádné procento deformovaných larev. V našem případě se výsledky neshodují a poukazují spíše na opačný jev, kdy u teplého šoku s 20minutovou expozicí 2 minuty po aktivaci jiker bylo nalezeno $7,14 \pm 7,14$ % deformovaných larev a u 40minutové expozice 2 minuty po oplození bylo napočítáno $37,5 \pm 12,5$ % deformovaných larev. Tato situace se nám projevila u chladového šoku, kdy u šoku s 20minutovou expozicí 2 minuty po aktivaci jiker bylo nalezeno $28,57 \pm 14,29$ % deformovaných larev a následně s prodlužující se dobou expozice byl zaznamenán klesající trend deformovaných larev.

Pifferer a kol. (2009) udává, že k navození triploidního stavu je možné využít různé varianty šoků. Použití závisí nejčastěji na druhu ryby, velikosti jiker a teploty vody, kterou ryby preferují při samotné reprodukci. V této práci byly použity chladové, teplé a tlakové šoky k indukci triploidie u candáta obecného. Jako nejefektivnější ze všech získaných výsledků byly právě vyhodnoceny tlakové šoky, a to i přes to, že k tlakovému šoku nebyly využity zcela nejkvalitnější jikry. Tento jev se následně projevil na výsledku nízké líhivosti larev. Ostatní šoky neprokázaly až tak kvalitní výsledky, jako právě tlakové šoky.

Z výsledků chladového šoku v rámci této diplomové práce lze konstatovat, že největší zisk triploidních jedinců lze získat při 20minutové expozici šoku, který byl zahájen 2 minuty po aktivaci a byl zde zaznamenán zisk triploidů na úrovni $6,88 \pm 0,62$ %. Dále z našeho experimentu chladového šoku můžeme demonstrovat, že s prodlužující se dobou zahájení šoku od aktivace gamet dochází ke snižování množství triploidních larev, kdy doba zahájení šoku 12

a 16 minut od aktivace nepřinesla ani v jedné expoziční době žádného triploidního jedince. Dadras a kol. (2021) udávají podobný trend indukce triploidie, kdy od expoziční doby 60 minut chladového šoku bylo zaznamenáno větší množství triploidních larev u dřívějších dob začátků šoků. Dokonce při 90minutové expozici jiker, které byly vloženy do chladového šoku 5 minut po aktivaci jiker bylo dosaženo 100% indukce triploidie larev candáta a stejného výsledku autoři dosáhli i u 120minutové expozice jiker, také vložených do chladové lázně 5 minut po aktivaci jiker.

V případě teplého šoku v rámci této diplomové práce bylo dosahováno triploidních larev v různých dobách vystavení jiker od jejich aktivace a také v různých expozičních dobách vystavení jiker šoku. Množství triploidních larev se snižovalo s prodlužující se délkou doby šoku od aktivace jiker. Největšího zisku triploidů bylo dosaženo při 20minutové expozici jiker vystavených teplému šoku 2 minuty po aktivaci jiker a tato hodnota dosáhla $3,72 \pm 0,01$ %, kdy bylo dosaženo 43,8 % triploidních larev. Blecha a kol. (2016) udává, že je možné dosáhnout až 100% indukce triploidie teplým šokem při teplotě šokové lázně 31 °C, kdy tohoto jevu dosáhl při indukci triploidie pomocí 20minutové expozice jiker teplé šokové lázni, a to 1 a 5 minut po aktivaci jiker, tohoto výsledku bylo dosaženo i při 40minutové expozici jiker šoku 1 minutu od aktivace jiker. Rougeot a kol. (2003) dosáhl 100% indukce triploidie u okouna říčního (*Perca fluviatilis*) využitím teplého šoku s teplotou 30 °C, kdy jikry byly vystaveny šoku 5 minut po oplození jiker na 25 minut s celkovou výtěžností triploidů 43 ± 34 %. Malison a kol. (1993) u příbuzného okouna žlutého (*Perca flavescens*) udává, že lze získat 66,7–100 % triploidů využitím teplého šoku s teplotou 28–29 °C, se začátkem šoku 5 minut po oplození s délkou trvání šoku 10–25 minut. Teplý šok také provedli Garcia-Abiado a kol. (2001) u hybrida *S. vitreus* x *S. canadensis* s využitím teploty šoku 31 °C na 15–20 minut, se zahájením šoku 5 minut po aktivaci jiker, tímto způsobem bylo dosaženo podílu triploidů na úrovni 80 % a hodnota zisku triploidů odpovídala 42 %.

Tlakový šok v rámci této diplomové práce vedl k nejlepším výsledkům navození triploidního stavu u candáta obecného. Nejlepších výsledků bylo dosaženo využitím tlaku 70 MPa 5 minut po oplození na 20minutovou a 10minutovou expozici jiker šokem. Při 20minutové expozici bylo dosaženo

největšího podílu triploidů, a to 95 %, se ziskem triploidů $12,2 \pm 2,5$ %. Druhý největší podíl triploidů byl zaznamenán u 10minutové expozice s výsledným podílem triploidů na úrovni 90 %, se ziskem triploidů $4,6 \pm 1,3$ %. Podle Malison a kol. (1993) je možné získat 50–54,4 % triploidů u okouna žlutého s využitým tlakem 62,05–75,84 MPa, kdy byl šok zahájen 5 minut po oplození jiker s délkou trvání šoku 12 minut. Malison a kol. (2001) u *Sander vitreum* ve své práci provedl tlakový šok na úrovni 48,26–55,6 MPa, se začátkem šoku 4 minuty po oplození a s délkou šoku 15–30 minut, kdy bylo dosaženo podílu triploidů na úrovni 72,2–100 %, resp. zisk triploidů byl 40,9–63,3 %. Garcio-Abiado a kol. (2021) u hybrida *S. vitreus* x *S. canadensis* dosáhl 100% podílu triploidních jedinců (s ziskem triploidů 29 %) využitím tlaku 62 MPa, kdy byl šok zahájen 4 minuty po aktivaci jiker a byl exponován na dobu 12 minut. Klády a kol. (2021) využil tlak 48,3 MPa, 55,2 MPa a tlak 62,1 MPa k indukci triploidie candáta obecného. Nejlepších výsledků dosáhl při tlaku 55,2 MPa a 62,1 MPa, kdy v prvním případě dosáhl $96,0 \pm 5,7$ % triploidů při 10minutové expozici jiker a ve druhém případě dosáhl hodnoty triploidů 97 ± 3 % při 10minutové expozici. Z jeho výsledků lze usoudit, že hodnota tlaku 46,3 MPa vedla k nižšímu množství či podílu triploidních jedinců.

Při navození triploidního stavu může dojít k různým abnormalitám. Jednou z těchto možností je právě vznik haploidních jedinců (jedinci s jednou sadou chromozomů). Tito jedinci mohou přežít celou embryogenezi až do vykulení, ale následně po strávení žloutkového vajíčka zpravidla hynou (Arai, 2000). V rámci této diplomové práce došlo ke vzniku haploidních larev pouze u chladových a tlakových šoků. Nejvíce těchto haploidních larev bylo nalezeno u teplého šoku, a to při aplikaci začátku šoku 4 minuty po aktivaci jiker, přičemž největšího množství haploidů bylo dosaženo u 60minutové expozice, kdy se procento haploidů vyšplhalo až na 55,6 %. U tlakového šoku byl zaznamenán počet haploidů ve všech skupinách na podobné úrovni a nejméně (3 %) byly nalezeny u skupiny vystavené šoku na 20minutovou expozici, kde byl zaznamenán největší počet triploidních larev (95 %).

6. Závěr

Hlavním cílem těchto experimentů v rámci diplomové práce bylo zoptimalizovat indukci triploidie u jiker candáta obecného s využitím teplého, chladového a tlakového šoku, aby bylo možné zvýšit efektivitu produkce triploidních candátů, která by mohla být následně využívána v rybářské praxi, především v chovu v rybníčních podmínkách. Hlavními výhodami triploidních ryb je jejich úplná či částečná sterilita, která má za následek pravděpodobné zvýšení růstu ryb, celkové výtěžnosti svaloviny a snížení agresivního chování. Z našich výsledků a poznatků lze označit za úspěšný především tlakový šok, u chladového a teplého šoku nebyly výsledky úplně dle mých představ, hlavním problémem byla pravděpodobně nízká kvalita jiker získaných od generačních ryb.

V prvním experimentu bylo využito chladových šoků s využitím teploty šokové lázně 0,5–1 °C. Z výsledků prvního experimentu, tedy chladového šoku lze vyvodit, že nejvyššího počtu triploidních larev bylo dosaženo právě díky co nejkratší době indukce šoku po oplození. Nejlepšího výsledku dosáhla skupina vystavená chladovému šoku s 20minutovou expozicí, 4 minuty po aktivaci jiker, kdy podíl triploidních larev byl 60 %, se ziskem triploidních larev na úrovni $6,88 \pm 0,62$ %. Dále lze konstatovat, že s prodlužující se dobou expozice jiker chladovému šoku se snižovala líhnivost larev. Výsledky chladového šoku byly druhé nejlepší ze všech typů šoků.

V druhém experimentu se využily teplé šoky s využitím teploty 30 °C. Z výsledků teplého šoku lze říci, že bylo dosahováno triploidních larev kontinuálně u všech skupin od 5minutové do 20minutové expozice, kdy byl začátek šoku po aktivaci jiker od 2 do 16 minut. Zisk triploidních larev nedosahoval vysokých hodnot. Od 30minutové expozice jiker šoku se postupně snižovalo množství triploidních jedinců. Největšího zisku triploidů $3,72 \pm 0,01$ % dosáhla skupina jiker vystavených 20minutové expozici, 2 minuty od aktivace jiker, kdy byl počet triploidních larev na úrovni 43,8 %. Nejvyšší počet líhnivosti larev byl dosažen od 5minutové expozice jiker do 20minutové expozice jiker, kdy zcela nejvyšší líhnivost larev ($23,8 \pm 2,73$ %) byla vyhodnocena u skupiny jiker vystavených 5minutové expozici šoku, 12 minut po aktivaci jiker. Množství deformovaných larev se zvyšovalo se zvyšující se dobou šoku od aktivace jiker.

V konečném hodnocení lze konstatovat, že výsledky teplého šoku byly ze všech námi zkoumaných typů šoků nejhorší.

Ve třetím experimentu byl hodnocen vliv tlakového šoku (70 MPa) na jikry candáta. Tento druh šoku se jeví jako nejlepší ze všech námi využitých šoků, přestože je nutné do tlakové nádoby vložit odlepkované jikry. Ze všech výsledků šoků můžeme tlakový šok označit jako nejlepší metodu indukce triploidie u jiker candáta obecného. U tlakového šoku byl problém s líhivostí jak v testovaných skupinách, tak v kontrolním vzorku, který neprošel tlakovou jednotkou. Proto byly výsledné hodnoty líhivosti po tlakovém šoku nízké. Tento problém způsobily nejpravděpodobněji nekvalitní jikry. Nejlepšího výsledku dosáhl tlakový šok s 20minutovou expozicí, kdy podíl triploidních larev byl 95 % a zisk triploidních larev odpovídal $12,2 \pm 2,5$ %. Je také potřeba podotknout, že se zvyšující se dobou expozice dochází ke snižování líhivosti larev a ke zvyšování množství deformovaných larev. Hlavním problémem tlakového šoku jsou jeho vysoké náklady na realizaci a na tlakovou jednotku.

7. Seznam tabulek

Tab. 1: Taxonomické zařazení candáta obecného (<i>Sander lucioperca</i>) (Dubský a kol., 1998).....	11
Tab. 2: Jikry vystavené chladovému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 20 minut.....	58
Tab. 3: Jikry vystavené chladovému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 40 minut.....	59
Tab. 4: Jikry vystavené chladovému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 60 minut.....	59
Tab. 5: Jikry vystavené chladovému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 90 minut.....	60
Tab. 6: Jikry vystavené chladovému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker na dobu 120 minut.....	61
Tab. 7: Jikry vystavené teplému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 5 minut.....	62
Tab. 8: Jikry vystavené teplému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut jiker po oplození na dobu 10 minut.....	63
Tab. 9: Jikry vystavené teplému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 20 minut.....	64
Tab. 10: Jikry vystavené teplému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 30 minut.....	65
Tab. 11: Jikry vystavené teplému šoku 2; 4; 8; 12 a 16 minut od oplození jiker po dobu 40 minut.....	65
Tab. 12: Jikry vystavené tlakovému šoku 70 MPa 5 minut po oplození jiker po dobu 5; 10 a 20 minut.....	66

8. Přehled použité literatury

- Adámek, Z., Helešic, J., Maršálek B., Rulík, M., 2008. Aplikovaná hydrobiologie. VÚRH JU, Vodňany, 256 s.
- Adámek, Z., Helešic, J., Maršálek, B., Rulík, M., 2010. Aplikovaná hydrobiologie. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, 361 s.
- Aegerter, S., Jalabert, B., 2004. Effects of post ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 231: 59–71.
- Allen, S.K., Jr., 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture* 33: 317–328.
- Arai, K., 2001. Genetic improvement of Aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture* 197: 205–228.
- Balik, Ü., Çubuk, H., Karaşahin, B., Özkök, R., Uysal, R., Alp, A., 2006. Food and Feeding Habits of the Pikeperch, (*Sander lucioperca*) (Linnaeus, 1758), Population from Lake Eğirdir (Turkey). *Turkish Journal of Zoology*, 30: 19–26.
- Bártů, V., Kopp, R. 2004. Exkrece amoniaku u plůdku kapra (*Cyprinus carpio L.*) ve vztahu k různé úrovni proteinu v krmivu. Sbíрка referátů s mezinárodní účastí (Brno 30. listopadu a 1. prosince 2004) ÚRH MZLU v Brně, 114–118.
- Baruš, V., Oliva, O., 1995. Mihulovci *Petromyzontes* a ryby *Osteichthyes*. Academia, Praha, 698 s.
- Bastl, I., 1965. Vek a rast zubáku obyčejného (*Stizostedion lucioperca L.*) z Oravskej údolnej nádrže. *Poľnohospodárstvo*, 1(3): 182–194.
- Beaumont, A. R., Fairbrother, J. E., 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish, a review. *Journal of Shellfish Research*, 101–18.
- Beaumont, A.R., Hoare, K., 2003. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Blackwell Publishing, Oxford Malden Ames Victoria Berlin, 158.

- Benfey, T.J., 1989. A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. Canadian Technical Report in Fisheries and Aquatic Sciences 16, 47–52.
- Benfey, T.J., 1999. The psychology and behaviour of triploid fishes. Reviews in Fisheries Science 7, 39–67.
- Beránek, V., Mareš, J., Prokeš, M., Jirásek, J., Spurný, P., 2005. Odchov larev candáta obecného (*Sander lucioperca*) v kontrolovaných podmínkách. 1. vyd. Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Oddělení rybářství a hydrobiologie, 226–227.
- Blecha, M., Flajšhans, M., Lebeda, I., Křišťan, J., Svačina, P., Policar, T., 2016. Triploidisation of pikeperch (*Sander lucioperca*), first success. Aquaculture 462: 115–117.
- Blecha, M., Samarin, A. M., Křišťan, J., Policar, T., 2016. Benefits of hormone treatment of both sexes in semi-artificial reproduction of pikeperch (*Sander lucioperca* L.). Czech Journal of Animal Science, 61: 203 – 208.
- Bokor, Z., Müller, T., Bercsényi, M., Horváth, L., Urbányi, B., Horváth, A. 2007. Cryopreservation of sperm of two European percid species, the pikeperch (*Sander lucioperca*) and the Volga pikeperch (*S. volgensis*). Acta Biologica Hungarica, 58(2), 199–207.
- Bonar, S. A., Thomas, G. L., Pauley, G. B., 1988. Evaluation of the separation of triploid and diploid grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, by external morphology. Journal of Fish Biology 33(6), 895–898.
- Clark-Kolaks, S. 2009. Distribution and movement of walleye (*Sandervitreus*) in monroe reservoir, Indiana 2008 and 2009. Indiana Department of Natural Resources, 4–10.
- Cormier, S.M., Neihiesel, T.W. Williams, D.E., Tiersch, T.R., 1993. Natural occurrence of triploidy in a wild brown bullhead. Transactions of the American Fisheries Society 122: 390–392.
- Cotter, D., O' Donovan, V., O' Maoiléidigh, N., Rogan, G., Roche, N., Wilkins, N. P., 2000. An evaluation of the use of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*.) in minimising the impact of escaped farmed salmon on wild populations. Aquaculture, 186(1-2), 61–75.

- Čítek, J., Krupauer, V., Kubů, F., 1998. Rybníkářství. vydání 2. Praha Informatorium, 123–126.
- Čítek, J., Svobodová, Z., Teserčík, J. 1997. Nemoci sladkovodních a akvarijských ryb. vydání 2. Infomatorium Praha, 218 s.
- Dadras, H., Blecha, M., Malinovskyi. O., Flajšhans, M., Lebeda, I., Křišťan, J., Policar, T., 2021. Triploidisation in pikeperch (*Sander lucioperca*) induced by cold shock. *Aquaculture* 533: 736236.
- Demirkalp, F.,Y., 1992. The reproduction biology of *Cyprinus carpio*, *Mugil cephalus*, *Stizostedion lucioperca*, in Bafra Balik Lakes (Balikgözü-Uzungöl). *Turkish Journal Zoology*, 16, 311–322.
- Demska-Zakes, K., Zakes, Z., 2002. Controlled spawning of pikeperch, (*Stizostedion lucioperca* L.), in lake cages. *Czech Journal of Animal Science* 47: 230–238.
- Detlaff, T., Detlaff, A.A., 1961. On relative dimensionless characteristic of the development duration in embryology. *Archives de Biologie (Liege)* 72: 1–16.
- Dil, H., 2008. The European market of the pikeperch for human consumption, Percid fish culture, from research to production In : P. Fontaine, P. Kestemont, F. Teletchea, N. Wang., (Eds), *Presses Universitaires de Namur*, Namur, Belgium, s. 15–16.
- Don, J., Avtalion, R. R., 1986. The induction of triploidy in *Oreochromis aureus* by heat shock. *Theoretical and Applied Genetics*, 72(2), 186–192.
- Dubský, K., 1998. Základy chovu vedlejších druhů ryb. Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, Praha, 35 s.
- Dubský, K., Kouřil, J., Šrámek, V., 2003. *Obecné rybářství*. Informatorium Praha, 308 s.
- Dungel, J., Řehák, Z., 2005. Atlas ryb, obojživelníků a plazů České a Slovenské republiky. *Academia*, Praha, 181 s.
- Dyk, V., 1956. Potravní základna v pstruhových vodách. Sb. ČSAZV – Živočišná výroba, 29 (12), 985–990.
- Erm, V., 1981. *Koha*. Tallinn Valgus. 128 s.

- Ewing, R. R., Scalet, C. G., Evenson, D. P., 1991. Flow cytometric identification of larval triploid walleyes (*Sander vitreum*). Prog. fish-cult. 53(3), 177–180.
- FAO, (2012). Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service – 8/10/2012 <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquacultureproduction/query/en>
- Fiske, J.A., Van Eenennaam, J.P., Todgham, A.E., Young, S.P., Holem-Bell, C.E., Goodbla, A.M., Schreier, A.D., 2019. A comparison of methods for determining ploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Aquaculture 507: 435–442.
- Flajšhans, M., Havelka, M., Kříž, M., Toncar, J., Veselý, L., 2012. Tlaková jednotka pro indukci polyploidie u ryb. Užitečný vzor č. 23378. Úřad průmyslového vlastnictví ČR.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Šlechtová, V.B., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2013. Genetika a šlechtění ryb. FROV JU, Vodňany, 305 s.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Šlechta, V., Linhart, O., 2008. Genetika a šlechtění ryb. VÚRH JU Vodňany, 230 s.
- Flajšhans, M., Kvasnička, P., Ráb, P., 1993. Genetic studies in tench (*Tinca tinca*), high incidence of spontaneous triploidy. Aquaculture. 110(3-4), 243–248.
- Flajšhans, M., Linhart, O., 2000. Produkce triploidních línů. Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 62, 14 s.
- Flajšhans, M., Ráb, P., 1987. Nález triploidního pstruha duhového formy kaploops (*Salmo gairdneri* kamloops). Živočišná výroba, 32 (3), 279–282.
- Flajšhans, M., Ráb, P., Dobosz, S., 1992. Frequency analysis of active NORs in nuclei of artificially induced triploid fish. Theoretical and Applied Genetics 85: 68–72.
- Flajšhans, M., Rodina, M., Kašpar, V., Luhan, R., 2010. Technologie hromadné indukce triploidie u lína obecného (*Tinca tinca*) v provozních podmínkách rybích líhní. Edice Metodik (technologická řada), FROV JU, Vodňany, č. 106, 19 s.
- Flajšhans, M., Vajcová, V., 2000. Odd ploidy levels in sturgeons suggest a backcross of interspecific hexaploid sturgeon hybrids to evolutionarily tetraploid and/or octaploid parental species. Folia Zoologica 49 (2): 133–138.

- Fontaine, P., 2009. Development of European inland fish culture and domestication of new species. *Cahiers Agricultures*, 18 (2–3), 144–147.
- Frisk, M., Skov, P. V., Steffensen, J. F., 2012. Thermal optimum for pikeperch (*Sander lucioperca*) and the use of ventilation frequency as a predictor of metabolic rate. *Aquaculture*, 324–325, 151–157.
- Gallardo, M.H., Bickham, J.W., Honeycutt, R.L., Ojeda, R.A., Köhler, N., 1999. Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature*. 401, 341.
- Garcia-Abiado, M., A., R., Lynch Jr, W. E., Dabrowski, K., Hartman, T., 2001. Use of thermal and pressure shocks to induce triploid hybrid saugeyes (*Sander vitreum* x *Sander canadensis*). *North American Journal Aquaculture* 63(2), 83–91.
- Gervai, J., Páter, S., Nagy, A., Horvath, L., Csényi, V., 1980. Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio*. *Journal Fish Biology* 17(6), 667–671.
- Glover, K.A., Madhun, A.S., Dahle, G., Sørvik, A.G.E., Wennevik, V., Skaala, Ø., Morton C.H., Hansen, T.J., Fjellidal, P.G., 2015. The frequency of spontaneous triploidy in farmed Atlantic salmon produced in Norway during the period 2007–2014. *BMC Genetics* 16: 37.
- Gomelsky, B., 2003. Chromosome set manipulation and sex control in common carp (*Cyprinus carpio*): a review. *Aquatic Living Resources*, 16(5), 408–415.
- Haffray, P., Aubin, J., Houis, V., Labbe, L., Jalabert, B., 2007. Comparison of pressure or thermal treatments on triploid yields and malformations up to swim up stage in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 272: 265 s.
- Hanel, L., 1997. Klíč k určování ryb a mihulí. *EkoCentrum*, Brno, 85 s.
- Hanel, L., Lusk, S., 2005. Ryby a mihule České republiky – Rozšíření a ochrana. *Český svaz ochránců přírody Vlašim*, 341–352.
- Havelka, M., Hulák, M., Ráb, P., Rábová, M., Lieckfeldt, D., Ludwig, A., Rodina, M., Gela, D., Pšenička, M., Bytyutskyy, D., Flajšhans, M., 2014. Fertility of a spontaneous hexaploid male Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *BMC Genetics* 15: 5.

- Havelka, M., Hulák, M., Rodina, M., Flajšhans, M., 2013. First evidence of autotriploidization in sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Journal of Applied Genetics* 54: 201–207.
- Hladík, M., 2015. Principy hospodaření na rybářských revírech. In: Randák, T., Slavík, O., Kubečka, J., Adámek, Z., Horký, P., Turek, J., Vostradovský, J., Hladík, M., Peterka, J., Musil, J., Prchalová, M., Jůza, T., Kratochvíl, M., Boukal, D., Vašek, M., Andreji, J., Dvořák, P., Just, T., Blabolil, P., Říha, M. (Eds), *Rybářství ve volných vodách*. 2. upravené vydání, FROV JU, Vodňany, s. 160–171.
- Holčík, J., Mihálik, J., 1971. *Sladkovodní ryby*. vydání 1. Praha Artia, 133 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.
- Hulata, G., 2001. genetic manipulation in Aquaculture: a Review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* 111: 155–173.
- Jirásek, J., Adámek, Z., PHA, N. 1977. Vliv různé potravy na spotřebu kyslíku a kapřího plůdku. In: *Živočišná výroba*, 22, 833–838.
- Jonas, J. L., Wahl, D. H., 1998. Relative importance of direct and indirect effects of starvation for young walleyes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 127, 192–205.
- Kestemont, P., Dabrowski, K., 1996. Recent advances in the aquaculture of Percid fish. *Journal of Applied Ichthyology* 12: 137–200.
- Kestemont, P., Melard, C., 2000. Aquaculture. In: Craig, J.F. (ed.), *Percid Fishes Systematic, Ecology and Exploitation*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, s. 191–224.
- Kestemont, P., Xu, X., Hamza, N., Maboudou, J., Toko, I.I., 2007. Effect of weaning age and diet on pikeperch larviculture. *Aquaculture* 264, 197–204.
- Káldy, J., Patakiné Várkonyi, E., Fazekas, G. L., Nagy, Z., Sándor, Z. J., Bogár, K., ... & Ljubobratović, U. (2021). Effects of Hydrostatic Pressure Treatment of Newly Fertilized Eggs on the Ploidy Level and Karyotype of Pikeperch Sander lucioperca (Linnaeus, 1758). *Life*, 11(12), 1296.

- Kouřil, J., Hamáčková, J. 2005. Metody poloumělé a umělé reprodukce candáta obecného (*Sander lucioperca*) a odchovu juvenilního plůdku v rybnících. Bulletin VÚRH Vodňany 41: 121–127.
- Kratochvíl, M. 2012. Výlov tržních ryb u členů RS v roce 2011 a užití produkce ryb v ČR v letech 1990–2011. Rybářské sdružení České republiky, České Budějovice: 31 s.
- Kroupová, H., Máchová, J., Svobodová, Z., 2005. Nitrite influence on fish – a review. Veterinary Medicine – Czech 50, 461–471.
- Krupauer, V., Pekař, Č., 1967. Přirozené rozmnožování hospodářsky významných druhů ryb v Lipenské údolní nádrži II. Dravé druhy. Práce VÚRH Vodňany 7: 91–115.
- Křišťan, J., Alvi, S.M.H., Stejkal, V., Policar, T., 2013. Hormonal induction of ovulation in pikeperch (*Sander lucioperca* L.) using human chorionic gonadotropin (hCG) and mammalian GnHR analogue. Aquaculture international 21(4): 811–818.
- Kristan, J., Blecha, M., Policar, T., 2016. Alcalase treatment for elimination of stickiness in pikeperch (*Sander lucioperca* L.) eggs under controlled conditions. Aquaculture Research, 47: 3998 – 4003.
- Lappalainen, J., Dörner, H., Wysujack, K., 2003. Reproduction biology of pikeperch (*Sander lucioperca*). Ecology of Freshwater Fish, 12(2), 95–106.
- Lecommandeur, D., Haffray, P., Philippe, L., 1994. Rapid flow cytometry method for ploidy determination in salmonid eggs. Aquaculture and Fisheries Management 25: 345–350.
- Linhart, O., Flajšhans, M., Kvasnička, P., 1991. Induced triploidy in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): A comparison of two methods. Aquatic Living Resources 4: 139–145.
- Linhart, O., Haffray, P., Ozouf-Costaz, C., Flajshans, M., Vandeputte, M., 2001. Triploidization of European catfish (*Silurus glanis* L.) with heat-, cold-, hydrostatic pressure shocks and growth experiment. Journal of Applied Ichthyology 17: 247–255.
- Ljunggren, L., 2002. Growth response of pikeperch larvae in relation to boby size and zooplankton abundance. Journal of Fish Biology 60, 405–414.

- Luczynski, M. J., Kucharczyk, D., Szczerbowski, A., Szkudlarek, M., Mamcarz, A., Gomulka, P., 2007. State of art of pikeperch reproduction – a short review. In: Kucharczyk, D., Kestemont, P., Mamcarz, A. (Eds), Artificial reproduction of pikeperch, 10–16.
- Luchiari, A. C., Freire, F. A. D., Koskela, J., Pirhonen, J., 2006. Light intensity preference of juvenile pikeperch (*Sander lucioperca* L.). *Aquaculture Research*, 37, 1572–1577.
- Lusk S., Baruš, V., Vostradovský, J., 1992. Ryby našich vod. Praha Academia, 239 s.
- Lusk, S., Baruš, V., Vostradovský, J., 1992. Ryby našich vod. Praha: Academia, 202-204.
- Malinovskyi, O., Veselý, L., Blecha M., Křišťan, J., Policar T., 2018. The substrate selection and spawning behavior of pikeperch *Sander lucioperca* L. broodstock under pond conditions. *Aquaculture Research* 49: 3541–3547.
- Malison, J. A., Held, J. A., Weil, L. S., Kayes, T. B., Thorgaard, G. H., 2001. Manipulation of ploidy in walleyes by heat shock and hydrostatic pressure shock. *North America Journal of Aquaculture*, 63(1), 17–24.
- Malison, J. A., Procarione, L. S., Held, J. A., Kayes, T. B., Amundson, C. H., 1993. The influence of triploidy and heat and hydrostatic pressure shocks on the growth and reproductive development of juvenile yellow perch (*Perca Flavescens*). *Aquaculture*, 116(2-3), 121–133.
- Maxime, V., 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish and Fisheries*, 9(1), 67–78.
- Müller-Belecke, A., Zienert, S., 2008. Out-of-season spawning of pike perch (*Sander lucioperca* L.) without the need for hormonal treatments. *Aquaculture Research*, 39, 1279–1285.
- Musil, J., Kouřil, J., 2006, Řízená reprodukce candáta obecného a odchov jeho plůdku v rybnících. Edice Metodík, VÚRH JU, č. 76, 16 s.
- Musil, J., Peterka, J. 2005. Potrava 0+ okouna a candáta – Některé aspekty přechodu od planktivorie k piscivorii. *Bulletin VÚRH Vodňany* 41: 99–106.

- Nagel, T., 1976. Intensive culture of fingerlings walleyes on formulated feeds. *The Progressive Fish-Culturist*, 90–91.
- Philipsen, A., 2008. Excellence Fish: production of pikeperch in recirculating systém. In: Fontaine, P., Kestemont, P., Teletchea, F., Wang, N. (Eds), *Proceeding of Percid Fish Culture From Research to Production*, Universitaires de Namur, Belgium, p. 67.
- Phillips, R.B., Zajicek, K.D., Ihssen, P.D., Johnson, O., 1986. Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. *Aquaculture* 54: 313–319.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, 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*. 293(3), 125–156.
- Pitter, B. (1990). *Hydrochemie*. vydání 2. Nakladatelství technické literatury Praha, 565 s.
- Polícar, T., Blecha, M., Křišťan, J., 2016a. Hromadný poloumělý výtěr candáta obecného (*Sander lucioperca* L.) s použitím recirkulačního akvakulturního systému (RAS). *Edice Metodik (Poloprovoz)*, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, 163, 32 s.
- Polícar, T., Blecha, M., Křišťan, J., 2016. Hromadný poloumělý výtěr candáta obecného (*Sander lucioperca* L.) s použitím recirkulačního akvakulturního systému (RAS). *Edice Metodik (Poloprovoz)*, FROV JU Vodňany, 163: 32 s.
- Polícar, T., Blecha, M., Křišťan, J., Malinovskyi, O., Vaniš, J., 2017. Může být kombinace rybníčního a intenzivního chovu candáta obecného (*Sander lucioperca* L.) úspěšně využita v rámci českého produkčního rybářství? In: Urbánek, M. (Ed.), 4. ročník odborné konference Rybářské sdružení České republiky. *Sborník referátů z odborné konference, České Budějovice 9.–10. února 2017*, 33–41 s.
- Polícar, T., Blecha, M., Křišťan, J., Mráz, J., Velíšek, J., Stará, A., Stejskal, V., Malinovskyi, O., Svačina, P., Samarin, A. M., 2016b. Comparison of production efficiency and quality of differently cultured pikeperch (*Sander lucioperca* L.) juveniles as a valuable product for ongrowing culture, *Aquaculture International*, 24, 1607–1626.
- Polícar, T., Křišťan, J., Blecha, M., Vaniš, J., 2014. Adaptace a chov juvenilních ryb candáta obecného (*Sander lucioperca* L.) v recirkulačním akvakulturním systému

- (RAS). Edice metodik (Technologická řada), Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, 146, 46 s.
- Policar, T., Křišťan, J., Dadras, H., Flajšhans, M., 2019. Produkce a využití triploidů u okounovitých ryb. Edice Metodik (Certifikovaná metodika), FROV JU Vodňany, 179: 25 s.
- Policar, T., Malinovskyi, O., Kristan, J., Stejskal, V., Samarin, A. M., 2019. Post-spawning bath treatments to reduce morbidity and mortality of pond-cultured pikeperch (*Sander lucioperca* L.) broodstock. *Aquaculture International*, 27(4), 1065–1078.
- Policar, T., Schaefer, F., Panana, E., Meyer S., Teerlinck S., Toner, D., Żarski, D., 2019. Recent progress in European percid fish culture production technology – Tackling bottlenecks. *Aquaculture International*, 27: 1151–1174.
- Policar, T., Stejskal, V., Křišťan, J., Podhorec, P., Švinger, V., Bláha, M., 2013. The effect of fish size and density on the weaning success in pond-cultured pikeperch (*Sander lucioperca* L.) juveniles. *Aquaculture International*, 21 (4), 869–882.
- Pšenička, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010. Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (Acipenser), function of acrosome and prevention of polyspermy. *Animal Reproduction Science*, 117(1), 147–154.
- Pudrom, C.E., Lincoln, R.F. 1973. Chromosome manipulation in fish. In: Schroder, J. (Ed.), *Genetics and mutagenesis of fish*, Springer, Berlin, Germany, pp. 38–39.
- Ráb, P., Bohlen, J., Rábová, M., Flajšhans, M., Kalous, L., 2007. Cytogenetics as a tool in fish conservation: the present situation in Europe. In: Pisano, E., Ozouf-Cotaz, C. Foresti, F., Kapoor, B.G. (Eds), *Fish Cytogenetics*. Science Publisher Enfield, USA, 215–241 s.
- Rothbard, S., 2006. A review of ploidy manipulations in aquaculture: the Israeli experience. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 58: 266–279.
- Rougeot, C., 2015. Chapter 23: Sex and ploidy manipulation in percid fishes. In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (Eds), *Biology and Culture of Percid Fishes – Principles and Practices*. Springer, New York, USA, 625–634 s.

- Rougeot, C., 2015. Chapter 23: Sex and ploidy manipulation in percid fishes. In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (Eds), *Biology and Culture of Percid Fishes – Principles and Practices*. Springer, New York, USA, 625–634 s.
- Rougeot, C., Mélard, C., 2008a. Genetic improvement of growth. In: Rougeot, C., Toner, D., (Eds), *Farming of Eurasian Perch*, Special publication BIM 24, Dublin, Ireland, 42–51 s.
- Rougeot, C., Minet, L., Prignon, C., Vanderplasschen, A., Detry, B., Pastoret, P. P., Mélard, C. 2003. Induce triploidy by heat shock in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquat. Living. Resour.* 16(2), 90–94.
- Samarin, A. M., Blecha, M., Uzhytchak, M., Bytyutskyy, D., Zarski, D., Flajshans, M., Policar, T., 2016. Post-ovulatory and post-stripping oocyte ageing in northern pike, *Esox lucius* (Linnaeus, 1758), and its effect on egg viability rates and the occurrence of larval malformations and ploidy anomalies. *Aquaculture* 450: 431–438.
- Samarin, A.M., Blecha, M., Bytyutskyy, D., Policar, T., 2015. Post-ovulatory oocyte ageing in pikeperch (*Sander lucioperca* L.) and its effect on egg viability rates and the occurrence of larval malformations and ploidy anomalies. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 15: 435–441.
- Sedlár J., Žitňan R., 1974: *Zubáč obyčajný*, Vyd. Obzor, Bratislava, s. 97.
- Shelton, W. L., Mims, S. D., Clark, J. A., Hiott, A. E., Wang, C., 1997. A temperature-dependent index of mitotic interval (τ_0) for chromosome manipulation in paddlefish and shovelnose sturgeon. *The Progressive Fish-Culturist*, 59(3), 229–234.
- Scheerer, P. D., Thorgaard, G. H., Seeb, J. E., 1987. Performance and Developmental Stability of Triploid Tiger Trout (Brown Trout ♀ X Brook Trout ♂). *Transactions of the American Fisheries Society* 116(1), 92–97.
- Schlumberger, O., Proteau, J. P., 1996. Reproduction of pike-perch (*Stizostedion lucioperca*) in captivity. *Journal of Applied Ichthyology.*, 12(3-4), 149–152.
- Schram, E. 2008. Production costs of perch and pikeperch juveniles. In: Fontaine, P., Kestemont, P., Teletchea, F., Wang, N. (Eds), *Proceeding of Percid Fish Culture From Research to Production*, Universitaires de Namur, Belgium, 75–79 s.

- Schulz, C., Böhm, M., Wirth, M., Rennert, B., 2007. Effect of dietary protein on growth, feed conversion, body composition and survival of pike perch fingerlings (*Sander lucioperca*). *Aquac. Nutr.* 13(5), 373–380.
- Schwinger, V., Seyfried, R., Kallert, D., Fjellidal, P.G., Baierl, F., Lebeda, I., Speierl, T., Täubert, J-E., Flajšhans, M., 2018. Späte Laichreife und spontane Triploidie bei Saiblingen – hängt natürliche Aneuploidie mit Fehlentwicklungen und Absterben der Embryos zusammen? *Fischer und Teichwirt* 69: 5–8.
- Sonesten, L., 1991. The biology of pikeperch-a literature review. Information fraan Soetvattenslaboratoriet, Drottningholm (Sweden).
- Steffens, W., Geldhauser, F., Gerstner, P., Hilge, V., 1996. German experiences in the propagation and rearing of fingerling (*Stizostedion lucioperca*). *Annales Zoologici Fennici*, 33, 627–634.
- Stejskal, V., Kouril, J., Valentova, O., Hamackova, J., Policar, T., 2009. Size-related oxygen consumption and ammonia excretion of Eurasian perch (*Perca fluviatilis L.*) reared in a recirculating system. *Aquaculture Research*, 41, 135–142
- Stepien, C. A., Haponski, A. E., 2015. Chapter 1: Taxonomy, Distribution, and Evolution of the Percidae In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R. C., (Eds), 2015. Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R. C, (Eds.): *Biology and Culture of Percid Fishes-Principles and Practices*. Springer, New York, USA, 3–60 s.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Flajšhans, M., 1998. The First Findings on the Differences in Complete Blood Count Between Diploid and Triploid Tench, *Tinca tinca*. *Acta Veterinaria. Brno.* 67(4), 243–248.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Beklová, M., Cupáková, Š., Minsk, J., 2000. *Ekotoxikologie-Praktická cvičení část II: diagnostika havarijních úhynů ryb a dalších vodních organismů*. Vydání 1. Brno, Ediční středisko Veterinární a farmaceutická univerzity Brno, 134 s.
- Swarup, H., 1959. Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus*. *Genet. Med.*, 56(2), 143–155.

- Szkudlarek, M., Zakęś, Z., 2002. The effect of stock density on the effectiveness of rearing pikeperch (*Sander lucioperca* (L.) summer fry. Archives of Polish Fisheries 10, 115–119.
- Tave, D., 1993. Growth of triploid and diploid bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis*. Journal Applied Ichthyology. 2(2), 13–26.
- Teskeredžić, E., Teskeredžić, Z., Donaldson, E. M., McLean, E., Solar, I., 1993. Triploidization of coho salmon following application of heat and electric shocks. Aquaculture, 116(2-3), 287–294
- Thorgaard, G. H., Rabinovitch, P. S., Shen, M. W., Gall, G. A., Propp, J., Utter, F. M., 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. Aquaculture. 29(3-4), 305–309.
- Thorgaard, G.H., 1986. Ploidy manipulation and performance. Aquaculture 57: 57–64.
- Varkonyi, E., Bercsenyi, M., Ozouf-Costaz, C., Billard, R., 1998. Chromosomal and morphological abnormalities caused by oocyte aging in *Silurus glanis*. Journal of Fish Biology 52: 899–906.
- Tiwary, B. K., Kirubakaran, R., Ray, A. K., 2004. The biology of triploid fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries 14(4), 391–402.
- Toner, D., 2015. Chapter 34: The market for Eurasian perch. In: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (Eds), Biology and Culture of Percid Fishes – Principles and Practices, Springer New York, New York, USA, pp. 865–879.
- Volf, F. (1928). Biologie a hospodářský význam candáta obecného. Zpráva výzkumného ústavů zemědělských, Praha, 35, 68 s.
- Wang, H. Y., Cook, H. A., Einhouse, D. W., Fielder, D. G., Kayle, K. A., Rudstam, L. G., Höök, T. O., 2009. Maturation schedules in the Great Lakes region: comparison of maturation indices and evaluation of sampling-induced biases. North American Journal of Fisheries Management, 29, 1540–1554.
- Wattendorf, R.J., 1868. Rapid identification of triploid grass carp with a Coulter Counter and Channelyzer. Progressive Fish-Culturist 48: 125–132.

- Wedekind, H., 2008. German experiences with the intensive culture of pikeperch (*Sander lucioperca* L.). In: Fontaine, P., Kestemont, P., Teletchea, F., Wang, N. (Eds), Percid Fish Culture -From Research to Production, Proceeding of abstracts and short communications of the workshop, Namur, Belgium, 68–70.
- Wolters, W. R., Chrisman, C. L., Libey, G. S., 1982. Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Fish Biology*. 20(3), 253–258.
- Zakeš, Z., Kowalska, A., Czerniak, S., Demska-Zakeš, K., 2006. Effect of feeding frequency on growth and size variation in juvenile pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). *Czech Journal of Animal Science*, 51, 85–91.
- Zakeš, Z., Szczepkowski, M., 2004. Induction of out-of-season spawning of pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). *Aquaculture International*, 12, 11–18.
- Zakes,Z., Szczepkowski, M., 2004. Induction of out-of-season spawning of pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). *Aquaculture International* 12: 11–18.
- Žarski, D., Kucharczyk, D., Targońska, K., Palińska, K., Kupren, K., Fontaine, P., Kestemont, P. (2012). A new classification of pre-ovulatory oocyte maturation stages in pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), and its application during artificial reproduction. *Aquaculture research*, 43(5), 713–721.

Internetové zdroje:

Prodej ryb Tábor, 2023 – <https://www.prodejryb-tabor.cz>

Dostupné na WWW: <https://www.prodejryb-tabor.cz/produkt/candat-filet-05-1kg/>

Rybníkářství Pohořelice, 2023 – <https://www.rybnikarstvipohorelice.cz>

Dostupné na WWW: <https://www.rybnikarstvipohorelice.cz/cerstve-ryby-maloobchod>

9. Seznam obrázků

Obr. 1: Candát obecný (<i>Sander lucioperca</i>) ulovený na ÚN Vranov (foto: K. Trnka)	12
Obr. 2: Jikry candáta obecného (foto: K. Trnka)	24
Obr. 3: Schéma indukce triploidie (Policar a kol., 2009)	28
Obr. 4: Schéma indukce tetraploidie (Policar a kol., 2009)	29
Obr. 5: Tlaková jednotka pro indukci polyploidie (foto: K. Trnka)	33
Obr. 6: Stádia zralosti oocytů u candáta obecného (<i>Sander lucioperca</i>): (a) stádium I, (b) stádium II, (c) stádium III, (d) stádium IV, (e) stádium V, (f) stádium VI (foto: T. Policar a O. Malinovskyi)	42
Obr. 7: Umělý výtěr jikernaček masáží břišní oblasti (foto: K. Trnka)	42
Obr. 8: Výtěr spermatu mlíčáků do injekčních stříkaček (foto: K. Trnka)	43
Obr. 9: Vyfocené jikry v Petriho miskách pro přesné počítání (foto: K. Trnka)	45
Obr. 10: Průtočný systém s inkubačními aparáty (foto: K. Trnka)	46
Obr. 11: Teplá šoková lázeň (foto: K. Trnka)	47
Obr. 12: Odlepkování jiker na třepačce (foto: K. Trnka)	50
Obr. 13: Inkubační aparát s nasazenými jikrami (foto: K. Trnka)	50
Obr. 14: Jikry k počítání a následnému nasazení na inkubační aparáty (foto: K. Trnka)	51
Obr. 15: Tlaková jednotka k indukci triploidie (foto: K. Trnka)	52
Obr. 16: Bližší pohled na části tlakové jednotky (foto: K. Trnka)	52
Obr. 17: Propláchnutí jiker po odlepkování roztokem enzymu alkalázy (foto: K. Trnka)	54
Obr. 18: Přelití odlepkovaných jiker do tlakové jednotky (foto: K. Trnka)	56

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá problematikou optimalizace indukce triploidizace u candáta obecného (*Sander lucioperca*) využívající chladové, teplé a tlakové šoky. K navození triploidního stavu larev u chladového šoku byly oplozené jikry ponořeny do chladové lázně o teplotě 0,5–1 °C, u teplého šoku do teplé lázně s teplotou vody 30 °C a u tlakového šoku byly oplozené jikry vystaveny tlaku 70 MPa. Jikry při chladovém šoku byly šokovány po 2; 4; 8; 12 a 16 minutách od aktivace s délkou expoziční doby 20; 40; 60; 90 a 120 minut. U teplého šoku byly jikry šokovány po 2; 4; 8; 12 a 16 minutách od aktivace při délce expoziční doby 5; 10; 20; 30 a 40 minut. U tlakového šoku byly jikry vystaveny tlaku 5 minut po oplození na 5; 10 a 20 minut. Ploidní úroveň larev byla následně stanovena pomocí průtokové cytometrie. Výsledkem všech experimentů byla líhivost larev (%), podíl deformovaných larev (%) a množství triploidních larev (%) a zisk triploidů (%). Žádný z využitých šoků nevedl k navození 100% triploidního stavu u všech zkoumaných larev průtokovou cytometrií. Nejblíže se k tomuto výsledku přiblížil tlakový šok s 20minutovou expozicí jiker, který vedl k podílu 95 % triploidních larev a zisk triploidů odpovídal tedy hodnotě $12,2 \pm 2,5$ %. Je také potřeba podotknout, že se zvyšující se dobou expozice tlakového šoku dochází ke snižování líhivosti larev a ke zvyšování množství deformovaných larev. Druhých nejlepších výsledků dosáhl chladový šok. Nejhorší výsledky byly po analýze zjištěny u teplého šoku.

Klíčová slova: Candát obecný, triploidizace, chladový šok, teplý šok, tlakový šok, průtoková cytometrie.

Abstract

This thesis was aimed on optimization of induction of triploidization of pikeperch (*Sander lucioperca*) using cold, hot and pressure shocks. To induce the triploid status of the larvae using cold shock fertilized eggs of pikeperch were dropped into the cold bath of temperature 0,5-1°C in 2, 4, 8, 12 and 16 minutes post fertilization with shock duration of 20, 40, 60, 90 and 120 minutes. Hot shock was induced by 30°C bath 2, 4, 8, 12 and 16 minutes post fertilization with duration of shock 5, 10, 20, 30 and 40 minutes. Pressure shock was also tested for induction of triploidization using pressure of 70 MPa 5, 10 and 20 minutes post fertilization with duration of shock 5 minutes. Ploidy level was then determined using flow cytometry. As a result hatchability (%), share of malformed larvae (%), share of triploid individuals (%) and yield of triploids (%) were determined. None of the experimental shocks have led to a 100% share of triploids concerning the samples examined by flow cytometry. Best result was reached via pressure shock with duration of 20 minutes which resulted with share of triploid individuals of 95% and yield of triploids $12.2 \pm 2.5\%$. It must be noticed that increasing duration of pressure shock resulted in decreased hatchability and increased share of malformed larvae. Second best result was achieved via cold shock. Worst results were obtained via hot shock.

Key words: pikeperch, triploidization, cold shock, hot shock, pressure shock, flow cytometry