

**Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích**  
**Fakulta rybářství a ochrany vod**  
**Ústav akvakultury**

**Bakalářská práce**

Synchronizace ovulace jikernaček sivena  
amerického (*Salvelinus fontinalis*) a pstruha  
duhového (*Oncorhynchus mykiss*)

**Autor:** Antonín Jankových

**Vedoucí bakalářské práce:** prof. Ing. Jan Kouřil, Ph.D.

**Konzultant bakalářské práce:** Ing. Viktor W. Švinger

**Studijní program a obor:** Zootechnika, Rybářství

**Forma studia:** Prezenční

**Ročník:** Třetí

České Budějovice 2012

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že, v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum

Podpis studenta

**Poděkování:**

Děkuji svému vedoucímu prof. Ing. Janu Kouřilovi, Ph.D. i konzultantovi Ing. Viktoru W. Švingerovi za jejich trpělivost, metodické vedení, odbornou pomoc, poskytnuté rady a cenné připomínky při vypracování této bakalářské práce. Svému konzultantovi děkuji i za statistické zpracování výsledků. Dále děkuji Petrovi Trnkovi a panu Miroslavu Fabiánkovi z Rybářství Litomyšl s.r.o. za pomoc při praktickém výtěru ryb a cenné rady.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
Fakulta rybářství a ochrany vod  
Akademický rok: 2010/2011

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Antonín JANKOVÝCH**  
Osobní číslo: **V09B069P**  
Studijní program: **B4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Rybářství**  
Název tématu: **Hormonálně indukovaný umělý výtěr jikernaček sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*)**  
Zadávací katedra: **Ústav akvakultury**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Intenzivní chov lososovitých ryb zahrnuje u nás vedle chovu pstruha duhového i další severoamerický druh - druh - sivena amerického. Hormonálně indukovaný umělý výtěr je v našich podmínkách široce praktikován u celé řady kaprovitých a sumcovitých druhů ryb, v poslední době i u ryb okounovitých, jeseterů a dalších skupin. U lososovitých je tato metoda, ať již s použitím gonadotropinů, či GnRH jen v omezeném rozsahu využívána v zahraničí. Hormonální indukce ovulace umožňuje synchronizaci a urychlení termínu výtěru, což může být z provozních důvodů v řadě případů výhodné. Předmětem řešení diplomové práce je posouzení vhodnosti vybraných hormonálních přípravků k indukci ovulace jikernaček.

Hlavními sledovanými faktory budou zejména: přežití jikernaček, dosažená plodnost, délka intervalu latence, oplozenost a líhivost jiker. Předpokládá se testování předběžně 4 vybraných hormonálních preparátů (obsahujících GnRH<sub>a</sub>) ve srovnání s neošetřenou kontrolou (v jednotlivých skupinách bude minimálně 10 jikernaček). V průběhu pokusu bude sledována teplota vody a základní parametry kvality vody (obsah kyslíku, pH aj.), v delších časových intervalech stanovení dalších hydrochemických parametrů. U vytřených jiker bude sledováno pH ovariální tekutiny. Pokusy budou probíhat jednak na pokusnictví VÚRH FROV JU ve Vodňanech a na pstruží farmě Rybářství Litomyšl, a.s. Diplomová práce je součástí řešení projektu NAZV a Pilotního projektu.

Hlavní testovanou hypotézou je zjištění vlivu hormonálně indukované ovulace jikernaček na synchronizaci a urychlení termínu výtěru jikernaček. Vlastní experimentální části bude předcházet zpracování literární rešerše k danému tématu.

---

Rozsah grafických prací: 10  
Rozsah pracovní zprávy: 30 stran  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná  
Seznam odborné literatury: viz příloha

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Jan Kouřil, Ph.D.**  
Ústav akvakultury  
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Viktor William Švinger**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Datum zadání bakalářské práce: **30. listopadu 2010**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2012**

  
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD  
Země 728/II  
339 25 Vodňany (2)

  
Ing. Pavel Vejsada, Ph.D.  
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. ledna 2011

## Příloha zadání bakalářské práce

### Seznam odborné literatury:

- Arabaci, M., Diler, I., Sari, M. (2004) Induction and synchronization of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified busserelin (GnRHa) and its effects on egg quality. *Aquaculture* 237: 475-484
- Breton B, Weil C, Sambroni E and Zohar Y (1990) Effects of acute versus sustained administration of GnRH on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 91: 371-383
- Donaldson EM, Hunter GA and Dye HM (1981a) Induced ovulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). II. Preliminary study of the use of LH-RH and two high potency LH-RH analogues. *Aquaculture* 26: 129-141
- Gillet C, Breton B and Mikolajczyk T (1996) Effects of GnRHa and pimozide treatments on the timing of ovulation and on egg quality in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) at 5 and 10 °C. *Aquat. Living Resour.* 9: 257-263
- Guy B (2007) The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat. Rev. Microbiol.* 5(7): 505-17
- Hunter GA, Donaldson EM and Dye HM (1981) Induced ovulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). I. Further studies on the use of salmon pituitary preparations. *Aquaculture* 26: 117-127
- Lahnsteiner F, Weismann T and Patzner RA (1999b) Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*. *Fish Physiol Biochem* 20: 375-388.
- Lahnsteiner F (2007) First results on a relation between ovarian fluid and egg proteins of *Salmo trutta* and egg quality. *Aquacult Res* 38: 131-139
- Mansour N, Lahnsteiner F, McNiven MA and Richardson GF (2008) Morphological characterization of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, eggs subjected to rapid post-ovulatory aging at 7 °C. *Aquaculture* 279: 204-208
- Mikolajczyk T, Kuźmiński H, Dobosz S, Goryczko K and Enright W J (2005) The effects of Gonazon<sup>TM</sup>, commercially available GnRH analogue, on induction of ovulation and egg quality in cultured European whitefish (*Coregonus laveratus* L.). *Advanc. Limnol.* 60: 187-194
- Mylonas CC, Hinshaw JM and Sullivan CV (1992) GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. *Aquaculture* 106: 379-392
- Noori A, Amiri BM, Mirvaghefi A and Baker DW (2010) LHRHa-induced ovulation of the endangered-Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) and its effect on egg quality and two sex steroids: testosterone and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone. *Aquaculture Research* 41: 871-877
- Zohar Y, Muñoz-Cueto JA, Elizur A, Kah O (2010) Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 165: 438-455

## OBSAH:

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Druhy ryb .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2. Metody řízené reprodukce ryb .....</b>	<b>11</b>
2.2.1. Reprodukční dysfunkce v umělých chovech ryb .....	11
2.2.2. Hypofyzace .....	11
2.2.3. Lidský choriový gonadotropin-hcG .....	12
2.2.4. GnRHa a syntetické analogy .....	13
2.2.4.1. Akutní indikace .....	13
2.2.4.2. Protrahovaný účinek .....	13
2.2.4.3. Komerční přípravky .....	15
<b>2.3. Reprodukční endokrinologie salmonidů .....</b>	<b>16</b>
2.3.1. Hormonální kaskáda .....	16
2.3.2. Kontrolní a inhibiční mechanismy .....	16
2.3.2.1. Kiss-1/GPR 54 systém .....	16
2.3.2.2. MIS- steroidy indukující zrání oocytů ( <i>Maturation Inducing Steroids</i> ) .....	17
2.3.2.3. GRIF - látky tlumící sekreci GnRH (Gonadotropin Release Inhibiting Factors) .....	17
2.3.2.4. Teplota .....	18
<b>2.4. Parametry kvality jiker .....</b>	<b>19</b>
2.4.1. Velikost jiker .....	19
2.4.2. Hmotnost jiker .....	19
2.4.3. Ovariální plazma .....	20
2.4.4. Oplozenost jiker a oplozovací roztoky .....	20
2.4.4.1. Oplozovací roztoky používané u lososovitých ryb a jejich použití .....	21
<b>2.5. Parametry kvality mlíčí .....</b>	<b>21</b>
2.5.1. Spermie .....	21
2.5.2. Seminální plazma .....	22
<b>3. MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Siven americký- pokus 2010 .....</b>	<b>23</b>
3.1.1. Příprava GnRHa .....	23
3.1.2. Sledování povýtěrové mortality .....	23
3.1.3. Hodnocení vytřených jiker .....	24
3.1.4. Statistická analýza .....	25
<b>3.2. Pokusy v roce 2011 u sivena amerického a pstruha duhového .....</b>	<b>26</b>
3.2.1. Pstruh duhový (Pd) .....	26
3.2.2. Siven americký (Si) .....	26
3.2.3. Kontrola kvality jiker .....	27
3.2.4. Statistické vyhodnocení .....	28

3.2.5.	Teplota a kyslík Pd a Si (r. 2011).....	28
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1.</b>	<b>Siven americký - pokus 2010.....</b>	<b>29</b>
4.1.1.	Indukce synchronizované ovulace .....	29
4.1.2.	Povýtěrová mortalita .....	29
4.1.3.	Kontrola kvality jiker .....	30
<b>4.2.</b>	<b>Grafy.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.</b>	<b>Pstruh duhový (r. 2011).....</b>	<b>36</b>
4.3.1.	Indukce synchronizované ovulace .....	36
4.3.2.	Kvalita jiker .....	36
4.3.3.	Povýtěrová mortalita a stav generačních ryb .....	38
<b>4.4.</b>	<b>Siven americký (r. 2011).....</b>	<b>38</b>
4.4.1.	Indukce synchronizované ovulace .....	38
4.4.2.	Kvalita jiker .....	39
4.4.3.	Povýtěrová mortalita a stav generačních ryb .....	40
<b>4.5.</b>	<b>Grafy.....</b>	<b>41</b>
4.5.1.	Pstruh duhový .....	41
4.5.2.	Siven americký.....	46
<b>5.</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>50</b>
<b>5.1.</b>	<b>Synchronizace ovulace.....</b>	<b>50</b>
<b>5.2.</b>	<b>Teplota .....</b>	<b>51</b>
<b>5.3.</b>	<b>Kvalita jiker .....</b>	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>61</b>
<b>9.</b>	<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>66</b>
<b>10.</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>67</b>



## 1. ÚVOD

Reprodukční cyklus lososovitých ryb je ovlivněn mnoha faktory okolního prostředí; jedná se především o fotoperiodu, teplotu a aktuální podmínky prostředí ve kterém se ryby nacházejí. Z těchto podmínek je pro lososovité ryby nejdůležitější fotoperioda- tzn. sezónní změny v délce slunečního svitu. U lososovitých ryb je prodlužování a zkracování fotoperiody nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje reprodukční cyklus. Další aspekty jsou; věk, velikost, rychlost růstu, energetické zásoby a stádium vývoje gonád ryb. Pro účely hormonálně synchronizované ovulace hraje významnou roli především teplota.

Jednou z technologií používaných v umělých chovech ryb je hormonální indukce ovulace u jikrناček a indukce spermiace u mlíčáků. Existuje několik metod hormonálně indukovaného výtěru ryb. Mezi nejznámější patří hypofyzace ryb, což je postup při kterém se dodává jikrناčkám další gonadotropin obsažený v extraktu převážně z kapří hypofýzy. Tato metoda je v současné době nahrazována novější a častokrát účinnější metodou indukované ovulace pomocí syntetických preparátů. Jedná se o syntetické analogy s obsahem základního spouštěcího hormonu gonadotropinu tzv. GnRH. Přípravky s obsahem GnRH jsou inječně vpravovány do těla ryb, které jsou již ve stavu vrcholné předvýtěrové připravenosti. Injekce se aplikuje do těla ryb nejčastěji intramuskulárně, nebo intraperitoneálně. Podání těchto analogů rybám má za následek za určitou dobu vyvolání ovulace u jikrناček (produkce jiker) nebo spermiace u mlíčáků tzn. zvýšení produkce spermatu. V praxi se osvědčilo použití samostatných funkčních analogů GnRH např. preparátu Lecirelin a Kobarelin, ale také použití kombinovaných přípravků, které obsahují některý analog GnRH a dopaminergní inhibitor (např. metaclopramid). Tyto kombinované přípravky se ukázaly být účinnější vzhledem k inhibici dopaminu, který tlumí celý proces. Co se týče lososovitých ryb, úspěšně se k indukci ovulace používá preparát Gonazon, Ovaprim, Ovaplant a další. Výrobci neudávají žádné závažné nežádoucí účinky, nicméně lze v odborné literatuře narazit na řadu nesrovnalostí, týkajících se především kvality jiker a vlivu hormonální stimulace na přežití generačního hejna. Tato práce se zabývá vyhodnocením účinnosti různých dávek a metod aplikace analogů GnRH na indukci a synchronizaci ovulace, výzkumem vlivu použití hormonálních přípravků na výslednou kvalitu jiker, přežitím jiker do stádia očních bodů a sledováním povýtěrové mortality generačního hejna v důsledku aplikace hormonálních přípravků.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Druhy ryb

Siven americký - *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1814) *Salmonidae*



**Obr. 1** Nahoře; mlíčák, dole; jikernačka sivena amerického

Pstruh duhový - *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), *Salmonidae*



**Obr. 2** nahoře: jikernačka; dole: mlíčák pstruha duhového

## 2.2. Metody řízené reprodukce ryb

### 2.2.1. Reprodukční dysfunkce v umělých chovech ryb

Při chovu generačních ryb chovaných v zajetí se mohou objevit z hlediska reprodukce tzv. reprodukční dysfunkce, které se vyznačují různým stupněm závažnosti. Závažnost reprodukční dysfunkce je závislá především na čeledi ryby. (Mylonas a kol., 1995; Zohar a Mylonas, 2001; Rainis a Ballestrazzi, 2005). Reprodukční dysfunkce střední závažnosti je typická například pro čeleď kaprovitých (*Cyprinidae*). Generační ryby prodělávají vitelogenezi, avšak nejsou schopny adekvátně dokončit finální dozrání oocytů (Mylonas a Zohar, 2007). Aby bylo možné od jikernaček získat požadované množství jiker, k indukci vlastní ovulace je nutností použití hormonálních přípravků. U lososovitých ryb chovaných v zajetí se projevuje nejlehčí forma reprodukční dysfunkce (Mylonas a kol., 2010). Dochází u nich k vitelogenezi i finálnímu dozrání oocytů, avšak jikry nejsou uvolněny z tělní dutiny a musí následovat ruční umělý výtěr (Bromage a Cumarantunga, 1988; Zohar, 1989a).

### 2.2.2. Hypofyzace

Jednou z nejstarších metod stimulace ovulace u ryb je hypofyzace. Je to metoda spočívající v podání GtH (gonadotropní hormon). K tomuto úkonu se může použít extrakt z homogenizované kapří nebo lososí hypofýzy získané od pohlavně dospělých ryb (Donaldson a Hunter, 1983; Crim a Glebe, 1990), nebo extrakt z purifikovaného rybího GtH (Hunter a kol. 1978).

Acetonem odvodněné hypofýzy se mechanicky rozruší a rozpustí ve vodě a nerozpuštěné zbytky se oddělí nejlépe centrifugací od supernatantu, který se zlyofilizuje. Lyofilizát se uchovává v suchém stavu při teplotě  $-18^{\circ}\text{C}$  (Kouřil a kol. 1999). Takto připravená hypofýza se může použít jako výchozí surovina pro získání purifikovaného extraktu z hypofýzy (Hunter a kol. 1978).

Lyofilizát se před injekčním podáním rybám nejprve rozpustí ve fyziologickém roztoku. Jeden mg acetonem odvodněné hypofýzy odpovídá 0,36 mg čištěného extraktu hypofýzy, vypočte se potřebná hmotnost použitého čištěného extraktu hypofýzy vynásobením potřebné dávky odvodněné hypofýzy v mg koeficientem 0,36. Injekce se

provádí buď intramuskulárně (do hřbetní svaloviny), nebo intraperitoneálně (do dutiny břišní) (Kouřil a kol. 1999).

Nevýhodou hypofyzace je především vystavení ryb účinku směsi různých hormonů, což může vést k negativním vedlejším účinkům, které se týkají gametogeneze nebo dalších funkcí v těle ryb (Zohar, 1988).

### 2.2.3. Lidský choriový gonadotropin-hcG

Další metodou indukce ovulace je použití přípravků s obsahem lidského choriového gonadotropinu- hCG (*human Choriogonadotropin*) (Donaldson, 1996).

Nevýhodou přípravků s obsahem hCG je jejich vysoká pořizovací cena (Mylonas a Zohar, 2001, Rainis a Ballestrazzi, 2005) a zjištění, že u ryb dříve injikovaných hCG se v následujících výtěrových obdobích neprojevil účinek na indukci ovulace při další aplikaci hCG (Van der Kraak a kol., 1989; Wantanabe a kol., 1998). U některých druhů ryb jako například u amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*, *Cyprinidae*) a u amura černého (*Mylopharyngodon piceus*, *Cyprinidae*) se neprojevil žádný účinek hCG na indukci ovulace (Lin a kol., 1986a). Může za to pravděpodobně velikost molekuly GtH. Účinek GtH, který je heterogenní povahy, může následně vést k vyvolání imunitní reakce u některých druhů ryb (Mylonas a Zohar, 1997; Mylonas a Zohar, 2001). Jedinou výhodou přípravků s obsahem hCG je delší doba retence v organismu, proto Ohta a Tanaka (1997) doporučují spíše jednorázovou injekci. Avšak Donaldson a kol. (1981a); Sower a kol. (1982); Sower a kol. (1984) zvolili aplikaci dvojitě dávkou přípravku s obsahem hCG v kombinaci se syntetickým analogem GnRH. U salmonidů byl experimentálně spolu s hCG aplikován také antiestrogenní přípravek tamoxifen (Donaldson a kol., 1981b)

Pro účely komerční akvakultury byl schválen přípravek s obsahem hCG; (CHORULON™, Intervet International BV, Nizozemsko) (Mylonas a Zohar, 2007; Mylonas a kol, 2010).

#### 2.2.4. GnRHa a syntetické analogy

První objevený GnRH je svojí chemickou strukturou neurodecapeptid, který se skládá z 10 aminokyselin (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-GlyNH<sub>2</sub>) (Kouřil a kol., 1997). U různých organismů se tyto aminokyseliny mohou lišit v jedné nebo i ve více aminokyselinách. Vyznačuje se klíčovou rolí v kontrole reprodukce u všech obratlovců a je nezbytný pro gametogenezi a syntézu pohlavních steroidů. Vážný nedostatek GnRH jeho mutace v genu pro receptor GnRH a jiné poruchy funkce se projevují sterilitou (MacColl a kol., 2002; Mason a kol., 1986). Ryby mají dvě nebo tři různé varianty GnRH, nejčastěji sGnRH (lososí GnRH) a kuřecí GnRH (cGnRH) (Yu a kol. 1988, Gothilf a kol., 1996, Holland a kol., 2000a).

Syntetické analogy GnRH je účinnější než původní čistá forma GnRH. Syntetické analogy GnRH jsou připravovány v laboratoři a jsou schopné více odolávat enzymatickému štěpení než GnRH v čisté formě a mají vyšší afinitu k receptorům hypofýzy. Přípravky s obsahem GnRHa mají podnítit tvorbu a uvolňování LH a FSH do hypofyzárního portálního krevního řečiště (Rainis a Ballestrazzi, 2005). Syntetické analogy se mimo jiné vyznačují zkrácením desetičlenného řetězce aminokyselin na devítičlenný náhradou některých původních aminokyselin jinými (zejména glycinu na šesté pozici) a rovněž zkrácením karboxyterminální části molekuly (Kouřil a kol., 1997).

##### 2.2.4.1. Akutní indikace

Syntetické analogy mohou být generačním rybám podány různými způsoby, které lze podle kinetiky uvolňování molekuly peptidu rozdělit na akutní a protražované.

Akutní podání GnRHa spočívá v jednorázovém injekčním podání samotného GnRHa, nebo hormonálního přípravku obsahujícího GnRH, zpravidla ve fyziologickém roztoku. Tato metoda se používá u většiny druhů ryb (kaprovitých, sumcovitých, okounovitých apod.). Je vhodná zvláště u těch lososovitých druhů, u kterých délka výtěrové sezóny nepřekračuje 1-1,5 měsíce (např. siven americký) (Breton a kol., 1990).

##### 2.2.4.2. Protražovaný účinek

Pokud u některých druhů salmonidů (pstruh duhový, siven arktický) délka výtěrové sezóny překračuje 1-1,5 měsíce (pstruh duhový), jednorázová dávka GnRH nebývá účinná, protože dochází k rychlé degradaci GnRH v důsledku

endoenzymatických procesů (Goren a kol. 1990; Zohar a kol. 1990a). Proto se u těchto druhů používá nejčastěji dvojitá dávka, aplikovaná nejčastěji 3 dny po sobě, která má za následek další zvyšování hladiny GtH v krevním řečišti (Peter a kol., 1986; Zohar, 1988). Aby uvolňování GtH probíhalo postupně a indukce ovulace byla úspěšná, bylo nutné vyvinout řadu metod využívajících protrahovaného (postupného) uvolňování aktivního peptidu GnRH. K tomuto účelu byly vyvinuty cholesterolové pelety, etylenvinylacetátové implantáty (EVAc) a biologicky rozložitelné polyestery kyseliny mléčné a kyseliny glykolové (Mylonas a Zohar 2001). Nicméně vysoká cena těchto přípravků, omezuje jejich praktické využití pro menší druhy lososovitých ryb (siven americký, lipan podhorní), jejichž hmotnost často nepřesahuje 1.0-1.5 kg, což ztěžuje samotnou implantaci a použití se díky vysokým nákladům nevyplatí. Nadějnou a levnější metodou jak zajistit postupné uvolňování GnRh do krevního řečiště se jeví být využití adjuvancií.

Ve 40. letech dvacátého století vyvinul Jules Freund adjuvancium na bázi emulze vody v minerálním oleji - Freundovo adjuvancium, které je dostupné ve dvou formách. Pokud obsahuje inaktivované mykobakterie, jedná se o Freundovo kompletní adjuvancium (FCA), bez bakterií je známé jako Freundovo inkompletní adjuvancium (FIA).

Adjuvancia jsou látky využívající se v imunologii sloužící ke zvýšení imunitní odpovědi organismů a účinnosti vakcín. Dále chrání antigen před rychlou degradací navázáním na buňky lymfatického systému a tím prodlužují dobu přítomnosti antigenu v organismu (Flies a Chen, 2003). Současně také aktivují mechanismy zánětlivé reakce, čímž dochází k zesílení imunitní reakce organismu, která je důležitá k zvýšení účinnosti očkování (Ferenčík, 1989). Adjuvancium zesiluje imunogenní účinek antigenů tak, že prodlužuje retenci antigenu (Ferenčík, 1989).

Při použití se také snižuje dávka injektované látky v důsledku působení adjuvancia, což může snížit ekonomické náklady na vakcinaci (Singh a O'Hagan 1999). Adjuvancia mohou vykazovat mnoho nežádoucích účinků. Nežádoucí účinky adjuvancii na bázi minerálních olejů mohou být léze v místě vpichu, srůsty v dutině břišní, vysoká úmrtnost po vakcinaci, špatný příjem krmiva a jeho konverze, poruchy růstu ryb (Lillehaug a kol., 1992; Press a Lillehaug 1995; Midtling a kol. 1996; Poppe a Breck 1997).

#### 2.2.4.3. Komerční přípravky

Ovaprim a Ovaplant jsou kanadské preparáty obsahují sGnRH (lososí GnRH) a dopaminergní inhibitor (domperidon). Ovaprim se poprvé začal používat v polovině 80. let 20. století. Ovaprim se dodává jako tekutina v 10 a 100 mililitrových lahvičkách. Aplikuje se injekčně do abdominální dutiny. Aplikuje se v množství 0,5 mililitru na kilogram ryb u jikernaček. U mlíčáků se používá poloviční dávka. Je nutné uchovávat tento přípravek z dosahu přímého slunečního záření. Pokud je takto uchováván, je možné ho používat až po dobu 1 roku. Ovaplant se dodává ve formě pelet. V jednom balení je 24 pelet. Před aplikací se peleta rozdrť a rozpustí ve fyziologickém roztoku. Pak se aplikuje dávka speciální injekční pistolí.

Gonazon je v Evropské Unii registrovaný veterinární přípravek speciálně určený pro indukci ovulace u ryb. Je speciálně určený hlavně pro synchronizaci ovulace u lososovitých druhů ryb. Aktivní látkou v Gonazonu je Azagly-nafarelin v koncentraci  $1600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Azagly-nafarelin, stejně jako ostatní analogy GnRH, napodobuje působení GnRH ovlivňováním sekrece LH a FSH u savců a ryb. Azagly-nafarelin je složen z peptidového řetězce 10 aminokyselin (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-[D-Nal (2)]-Leu-Arg-Pro-[aza-Gly]).

Dodává se v koncentrovaném roztoku v uzavřených ampulích. K naředění přípravku Gonazon nelze použít klasický fyziologický roztok, používá se speciální ředící roztok. Gonazon se používá v dávce  $32 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ryby. Tato dávka byla stanovena jako optimální po úspěšných experimentech s lososovitými rybami, při kterých bylo dosaženo úspěšné ovulace ryb (90-95%) v krátkém časovém intervalu 9 - 19 dní v závislosti na teplotě vody a druhu ryby (Haffray a kol., 2005)

Aplikuje se intraperitoneálně a rychle se vstřebává. Azagly-nafarelin se po intraperitoneální aplikaci u pstruhů duhových rychle vylučuje z plazmy. Biologický poločas ( $T_{1/2}$ ) azagly-nafarelinu u pstruhů po intraperitoneální aplikaci v dávce  $32 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti je 4,9 hodin a průměrná doba jeho působení je 6,8 hodin. Pro většinu lososovitých druhů ryb se udává doba latence v rozmezí 50 - 100 denních stupňů v závislosti na druhu, teplotě vody a dalších faktorech.

## **2.3. Reprodukční endokrinologie salmonidů**

### **2.3.1. Hormonální kaskáda**

Stejně jako u ostatních obratlovců jsou všechny endokrinní regulace reprodukčního cyklu ryb závislé na tzv. ose mozek-hypofýza-gonády (*brain-pituitary-gonadal axis*) (Sato a kol., 1997; Kobayashi a kol., 1997; Zohar, 1988; Crim a Bettles, 1997). Hypothalamus je součástí mozku a produkuje spouštěcí hormon gonadotropinu (GnRH), který ovlivňuje hypofýzu. Hypofýza signál zesiluje pomocí gonadotropinu (GtH) dekretovaného do krevního řečiště. Gonadotropin se uplatňuje v pohlavních žlázách; jak ve vaječnicích, tak varlatech. Tyto žlázy vylučují pohlavní hormony steroidní povahy mající vliv na konečné zrání jiker a jejich ovulaci a analogické procesy u spermatu (Kouřil a kol. 1999).

Gonadotropin se vyskytuje ve 2 formách: GtH II neboli folikulostimulační hormon (FSH) regulující vitellogenezi a spermatogenezi a GtH I neboli luteinizační hormon (LH) účastnící se konečného dozrávání oocytů a spermiace (Slater a kol., 1994; Moberg a kol., 1995). Do gonád je GtH dopravován krevním řečištěm, kde dochází k uvolňování steroidních hormonů. Steroidní hormony jako například estradiol ( $17\beta$ -estradiol) ovlivňují jednak dozrávání jiker a jejich uvolnění z Graafových folikulů (ovulaci), ale také dozrání spermií u samců (spermiaci).

### **2.3.2. Kontrolní a inhibiční mechanismy**

#### **2.3.2.1. Kiss-1/GPR 54 systém**

Samotná sekrece GnRH je řízena tzv. Kiss-1/GPR 54 systémem. Kisspeptin který působí přes svůj receptor G-vázaný receptor 54 (G protein-coupled receptor 54) (GPR54) jsou látky které se podílí na stimulaci uvolňování GnRH. Tyto látky stojí na počátku reprodukčního cyklu. Stejně tak jako samotný GnRH se vyskytují primárně ve dvou jádrech hypothalamu (*nucleus paraventricularis hypothalami a nucleus arcuatus hypothalami*) odkud aktivují neurony GnRH a tím vyvolají uvolnění GnRH. Hypothalamická exprese genu Kiss-1 je pod kontrolou pohlavních hormonů (Roa a Tena-Sempere, 2007).

Kiss-1 neurony jsou zodpovědné za zprostředkování negativní nebo pozitivní zpětné vazby účinku estradiolu, která se projeví zvýšením nebo snížením sekrece



gonadotropinu. Hypotalamický Kiss-1 systém funguje také jako molekulární kanál pro kontrolu gonadotropní dráhy, který reaguje na odezvu z dalších regulačních míst, jako jsou metabolické signály a pravděpodobně také podněty z okolního prostředí (Roa a Tena-Sempere, 2007).

#### 2.3.2.2. MIS- steroidy indukující zrání oocytů (*Maturation Inducing Steroids*)

Tyto steroidní látky se podílejí na zahájení konečného dozrávání oocytů (Scott a Canario, 1987; Thomas, 1994; Nagahama a kol., 1994; Peter a Yu, 1997), po kterém následuje ovulace jikernaček. FSH uvolněný z hypofýzy přímo působí na ovariální folikuly, kde je produkován testosteron (T), který je následně aromatizován na 17 $\beta$ -estradiol (E2) (Pankhurst a Carragher, 1991; Nagahama a kol., 1994). Estradiol (E2) stimuluje syntézu vitelogeninu (Vtg) v játrech a ten je poté transportován krevním řečištěm do ovárií a následně působí přímo na oocyty (Specker a Sullivan, 1994). Testosteron tady nepůsobí jako kontrolní faktor. Na začátku fáze konečného zrání oocytů, po dokončení vitelogeneze, v reakci na nárůst hladiny LH, klesá hladina estrogeneru (E1) a 17 $\beta$ -estradiolu (E2) (Whitehead a kol., 1978; Elliot a kol., 1984) a v souvislosti s tímto procesem opět stoupá hladina testosteronu (T) působením mechanismů zpětné vazby (Van Der Kraak a kol., 1984). Vitelogenin stále stoupá až dosáhne maximální sekrece v době ovulace (Bromage a kol., 1992). Následkem toho dochází k syntéze většího množství steroidů indukujících zrání oocytů tzv. MIS (*Maturation Inducing Steroids*) v ovariální plasmě; 17 $\alpha$ -hydroxyprogesteron (17 $\alpha$ OH-P), 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-on (17 $\alpha$ ,20 $\beta$ P) nebo 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-on (20 $\beta$ P). U lososovitých ryb je nejpatrnější změna 17 $\beta$ -estradiolu (E2) na 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ P-dihydroxy-4-pregnen-3-on (Nagahama, 1994) během přechodu z vitelogeniní fáze na fázi dozrávání oocytů (Van der Kraak, 1983).

#### 2.3.2.3. GRIF - látky tlumící sekreci GnRH (*Gonadotropin Release Inhibiting Factors*)

Tyto látky jsou označovány jako GRIF tzn. látky zabraňující uvolnění gonadotropinu (*Gonadotropin Release Inhibiting Factors*). GRIF neurony jsou napojeny z preoptické oblasti a vysílají své signály do oblasti hypofýzy (Peter a Paulescu, 1980). Po mnoha studiích bylo prokázáno, že dopaminergní látky mají

inhibiční vliv na procesy reprodukce. Dopaminergní inhibitory působí na obě pohlaví ryb, tzn. inhibují jak proces spermiace u mlíčáků, tak ovulaci u jikernaček. Dopaminergní inhibitory působí na GnRH neurony tak, že blokují syntézu neuropeptidů, nebo brání jejich vydání z hypofýzy do dalších nervových zakončení. Bylo prokázáno, že tyto látky měly především tlumící efekt na syntézu luteinizačního hormonu a tlumí také reakci GnRH receptorů (De Leeuf a kol., 1980; Levavi a kol., 2004). Také se předpokládá, že mají stejný efekt na uvolňování folikulo-stimulačního hormonu, ale bylo provedeno velmi málo pokusů, aby tento fakt byl jednoznačně prokázán (Vacher a kol., 2000).

Hlavní roli při tlumícím účinku dopaminu při procesu vitelogeneze hraje pravděpodobně hladina estradiolu (E2). To bylo zkoumáno a prokázáno u sumce rodu *Heteropneustes fossilis* (Senthilkumaran a Joy, 1995) stejně tak i pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Saligaut a kol., 1999, Linard a kol. 1995). Nejsilnější tlumící účinek se udává ke konci gametogeneze a klesá v důsledku podpory ovulace nebo spermiace, zejména pod vlivem poklesu hladiny estradiolu, nebo vlivem vnějších pochodů, jako jsou například klimatické změny, změny v chování ryb, změny v hladinách feromonů atd.. Toto všechno je závislé především na druhu ryby a jak je daný druh na tyto podmínky prostředí citlivý.

K inhibici dopaminergního vlivu se používá v praxi kombinace GnRH analogů s dopaminergním antagonistou pimozidem. Tato metoda se nazývá Linpe podle svých objevitelů (H. R. Lin a R. E. Peter) (Peter a kol., 1988a) a je používána po celém světě především u kaprovitých druhů ryb. Další látkou se stejným efektem jako pimozid je například domperidon, metoclopramid.

#### 2.3.2.4. Teplota

Teplota je důležitým faktorem ovlivňujícím proces vitelogeneze a proces konečného dozrávání oocytů (*Final Oocyte Maturation*) (King a Pankhurst, 2000). Bylo prokázáno, že pokud byly jikernačky z jakéhokoliv důvodu chovány před následným výtěrem při vyšší teplotě vody, projevilo se to sníženou životaschopností jiker (Gillet, 1991; Taranger a Hansen, 1993; Pankhurst a kol., 1996; Pankhurst a Thomas 1998; Watts a kol., 2004). To pravděpodobně svědčí o selhání funkce endokrinní kontroly vitelogeneze a konečného zrání oocytů u těchto jikernaček. (King a Pankhurst, 2000). U jikernaček lososa obecného chovaného při vysoké teplotě 22°C se signifikantně snížila

hladina  $17\beta$ -estradiolu (E2) a vitellogeninu (Vtg), což pravděpodobně negativně ovlivnilo finální stádium vitelogeneze a dozrávání jiker, ovulaci a životaschopnost embryí (King a kol., 2003; Watts a kol., 2004; Vikingstad a kol., 2008). Malá průměrná velikost jiker je pravděpodobně způsobena vyšší teplotou vody ve které byly chovány jikernačky před výtěrovou sezónou. Tyto změny jsou způsobeny poruchou přeměny testosteronu na  $17\beta$ -estradiol (E2), protože dochází k narušení funkce enzymu P450aromatázy v důsledku zvýšené teploty vody (Watts a kol., 2004), který zprostředkovává tento přechod (Simpson a kol., 1994).

## **2.4. Parametry kvality jiker**

### **2.4.1. Velikost jiker**

Obecně platí, že velikost jiker závisí na velikosti a stáří generačních ryb, větší ryby produkují větší jikry. Zjišťuje se průměr jedné jikry například jednou ze starších metod, kdy se používá měřidlo se žlábkem ve tvaru V do kterého se srovnají jikry jedna vedle druhé, pak se zjistí hodnota na stupnici a je vydělena počtem jiker. Tak se zjišťuje mechanicky průměr jedné jikry (Von Bayer, 1908). Nicméně v dnešní době existují další metody, které se dají použít.

Bromage a kol. (1992) při pokusu se pstruhem duhovým zjistili, velikost jiker se nezdá být důležitým ukazatelem kvality jiker (Bromage a kol, 1992; Brooks a kol. nepublikované údaje).

### **2.4.2. Hmotnost jiker**

Nárůst hmotnosti jiker je způsoben vsáknutím vody do jikry během oplození. Váha těchto jiker korelovala s počtem jiker ve stádiu očních bodů ve studii Lahnsteiner a kol. (1999a), který zkoumal tento jev u pstruha obecného jezerního (*Salmo trutta m. lacustris*). Vyšší relativní hmotnosti jiker v době 30, 45 a 60 min. po oplození byly zaznamenány u jiker s nejlepší kvalitou, naproti tomu jikry které měly v této době relativní hmotnost nižší, měli kvalitu jiker horší. Nárůst hmotnosti jiker v krátkém časovém úseku od oplození se používá jako indikátor životaschopnosti jiker a jejich kvality (Lahnsteiner, 2002; Aegerter a Jalabert, 2004). Tento nárůst hmotnosti je

pravděpodobně způsoben kvůli nástupu kortikální reakce a následné absorpci vody do periviteliního prostoru jikry (Alderdice, 1988).

#### 2.4.3. Ovariální plazma

U lososovitých ryb tvoří ovariální plazma okolo 10 – 30% z celkového objemu jiker (Lahnsteiner a kol. 1999b). Větší množství ovariální plazmy zlepšuje oplozenost jiker, prodlužuje dobu fertility vytřených neoplozených jiker během krátkodobého přechovávání jiker a má podstatný vliv na motilitu spermií při oplození (Lahnsteiner, 2002, Urbach a kol., 2005). Množství ovariální plazmy má také vliv na časový interval motility spermií. (Lahnsteiner a kol. 1997; Hayakawa a Munehara 1998; Lahnsteiner, 2002; Elofsson a kol. 2003a). Bylo prokázáno, že při dostatečném obsahu ovariální plazmy se prodlouží motilita spermií ve srovnání s aktivací pouze vodou o časový interval > 5 min (Nomura a kol.; 1974, Billard 1983). Ovariální plazma má dvakrát až třikrát větší viskozitu než voda a je velmi pravděpodobné, že její nejvyšší koncentrace se drží na povrchu jiker (Wojtzak a kol., 2007). To je důvod, proč se měří pH ovariální plazmy. Obecně se udává, že pH ovariální plazmy u kvalitnějších jiker by mělo být alkalické a přesahovat hodnotu 8,00, zatímco u méně kvalitních jiker je tato hodnota ve většině případů nižší než 8,00. Nižší hodnota pH ovariální plazmy je zaznamenána většinou u poškozených či přezrálých jiker (Dietrich a kol., 2007). Negativní vliv na pH ovariální plazmy při oplození jiker mají i nevhodné produkty jako jsou výkaly a moč, které se mohou dostat do mlíčí při jeho odběru.

#### 2.4.4. Oplozenost jiker a oplozovací roztoky

Ovariální plazma s nízkým pH je pro výsledné oplození jiker nejvíce škodlivá jelikož má na samotné oplození největší vliv. Proto se v moderní akvakultuře začaly používat alkalické oplozovací roztoky, které by měli potlačit do jisté míry negativní vliv nízkého pH ovariální plazmy na finální oplození jiker a zvýšit motilitu spermií (Billard, 1992). Úroveň oplozenosti jiker u uměle vytíraných ryb je závislá na kvalitě jiker, spermatu a oplozovacím roztoku. Oplozovací roztok aktivuje pohyb spermií a osmózu spermií a jiker. Náhrada vody z líhně oplozovacím roztokem zvyšuje produktivitu rybích líhní. Výrazně se zvyšuje oplozenost zvláště při nedostatku spermatu. Projevem zvýšené oplozenosti jiker je dále snížení pracnosti při ošetřování jiker a jejich nižší zaplísnění. Spermie se u většiny ryb po odběru nepohybují, pouze u sumce a lína dochází k pohybu spermií vlivem naředění spermatu močí, což má za následek jejich

aktivaci. Při použití vody místo oplozovacího roztoku dochází k narušení bičíků spermií, což se projevuje zástavou pohybu spermií. Děje se tak protože, má voda příliš nízkou osmotickou koncentraci. Takovýto efekt při použití oplozovacího roztoku nenastává (Linhart, 1985).

#### 2.4.4.1. Oplozovací roztoky používané u lososovitých ryb a jejich použití

U lososovitých ryb jako je pstruh duhový, pstruh potoční, pstruh duhový linie Kamloops se úspěšně používají následující oplozovací roztoky: Ringerův, modifikovaný Ringerův, Hamorův, č. 532 a č. 752. Pro aktivaci spermií se používá především modifikovaný Ringerův roztok, roztok č. 752 a roztok č. 532, může se použít i Hamorův a Ringerův roztok. Před osemeněním u jiker s velkým množstvím ovariální plazmy se může ale nemusí tato ovariální plazma ocedit. Pro osemenění se na 1 litr jiker použije 10 ml spermatu při aktivaci vodou z líhně. Při použití oplozovacího roztoku se může snížit množství spermatu na 3-4 ml na 1 litr jiker. Jikry se oplozují vodou z líhně po dobu 2-4 minut a v oplozovacím roztoku po dobu 10 minut (Linhart, 1985).

U pstruha duhového kamloops je vhodné použít mlíčáky o menší kusové hmotnosti 0,4-1 kg s nižším počtem odběru spermatu (1 - 2 odběry). U velkých mlíčáků ve stáří 4 let o kusové hmotnosti přibližně 4 kg se provádí odběr ve 3 krát až 4 krát ročně a mají mají ve 3. a 4. odběru největší množství spermií se sníženou pohyblivostí. Pokud je k dispozici větší počet mladších mlíčáků, snižuje se počet odběrů na jednoho mlíčáka, zvyšuje se pravděpodobnost dobrého oplození a je umožněno zachovat určité množství mlíčáků na konec výtěrové sezóny, kdy se kvalita spermatu u mlíčáků obvykle zhoršuje. Je také nutné uvědomit si, že spermatogeneze u pstruha duhového vrcholí 3 týdny před výtěrem jikrnaček (Linhart, 1985).

## 2.5. Parametry kvality mlíčí

### 2.5.1. Spermie

U spermií se stanovuje více ukazatelů kvality (zejména koncentrace spermií, spermatokrit, délka pohybu spermií a intenzita pohybu spermií). Linhart a kol. (2006) hodnotil u spermatu lina procentuální motilitu spermií, jejich rychlost a procentuální hodnotu živých a mrtvých spermií v závislosti na stupni ploidie u diploidních a triploidních línů. V několika studiích byla zjištěna pozitivní korelace mezi motilitou spermií a plodností, u pstruha duhového (Moccia a Munkittrick, 1987; Lahnsteiner a

kol., 1998; Cieresko a Dabrowski, 1994), ale nebyla potvrzena u lososa obecného (Aas a kol., 1991), u lososa nerka (Hoysak a Liley, 2000) a tresky obecné (Trippel a Neilson, 1992),

Hustota spermatu se stanovuje pomocí indexu spermatokritu, který má silnou korelaci s počtem spermií na jednotku objemu (Bouck a Jacobson, 1976; Tvedt a kol., 2001). Dvě kapiláry se naplní spermatem a provede se 10 minutová centrifugace. Sperma se usadí ve spodní části kapilár a tvoří neprůhlednou vrstvu, zatímco seminální plazma zůstane na povrchu a vytvoří průhlednou vrstvu. Pak se stanoví procento sedimentovaného spermatu popřípadě procento seminální plazmy. Ze dvou procentuálních hodnot v každé kapiláře se vypočte průměrná hodnota, která udává hodnotu spermatokritu.

#### 2.5.2. Seminální plazma

Ingermann a kol. (2002) zjistili, že pufrční kapacita ovariální plazmy je dvakrát až třikrát vyšší než u seminální plazmy. Proto je pro aktivaci spermií důležitější než seminální plazma a pro kvalitní oplození je důležité, aby byla zastoupena v dostatečné míře. Chemické složení seminální plazmy u mlíčáků se během roku liší, to je patrné hlavně ve srovnání seminální plazmy odebrané od mlíčáků na začátku výtěrové sezóny a od mlíčáků na konci výtěrové sezóny (Aas a kol., 1991).

### 3. MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1. Siven americký- pokus 2010

Na začátku října 2010 byly přivezeny dvouleté pohlavně dospělé jikrnačky sivena amerického ( $350 \pm 24\text{g}$ ) na pokusnictví VÚHR FROV JU ve Vodňanech přibližně pět týdnů před začátkem přirozeného výtěrového období. Jikrnačky byly náhodně rozděleny do 5 skupin po 10 kusech. Aklimatizační období trvalo 7 dní. Ryby byly chovány ve žlabech ( $0.8\text{ m}^3$ ) ve vodě přitékající z řeky Blanice s obsahem kyslíku  $11.8 \pm 0.5\text{ mg.l}^{-1}$ . Teplota vody poklesla v průběhu experimentu nejprve z počátečních  $9.6^\circ\text{C}$  na  $5.5^\circ\text{C}$  a dále stoupla na  $9^\circ\text{C}$  na konci října. Jikrnačky byly injikovány těmito hormonálními přípravky:

Skupina A: sGnRHa-FIA v dávce  $50\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$

Skupina B: dávka sGnRHa-FIA  $25\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$

Skupina C: dvojitá dávka sGnRHa  $25\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$  v intervalu 3 dnů

Skupina D: jednorázová dávka sGnRHa  $25\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$

Skupina E: pouze fyziologický roztok  $0.9\text{ g.kg}^{-1}$  NaCl (kontrola)

##### 3.1.1. Příprava GnRHa

Byl použit přípravek s účinnou látkou lososího [D-Arg<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>,NET]-sGnRH (výrobce Bachem AG, SRN). K přípravě GnRHa-FIA je potřeba rozpustit přípravek v 0.9% roztoku chloridu sodného a homogenizovat jej s Freundovým inkompletním adjuvanciem (FIA, Sigma Aldrich) v poměru 1:1. K tomuto účelu jsme použili Ika T-10 homogenizér. Každá jikrnačka pak dostala dávku 0,5 ml GnRHa-FIA připraveného roztoku.

##### 3.1.2. Sledování povýtěrové mortality

Po aplikaci druhé dávky ve skupině C bylo u jikernaček v třídních intervalech kontrolováno dosažení ovulace. Jikernačka se považovala za ovulující pokud pouštěla jikry v důsledku mírného manuálního tlaku na dutinu břišní. Každá jikrnačka, která se vytěřela, byla označena ustřížením části ploutve pro následnou identifikaci skupin a byla umístěna do sádky ( $54\text{ m}^3$ ) kde se sledovala povýtěrová mortalita ryb po dobu šesti měsíců. Do sádky rovněž přitékala voda z řeky Blanice. Byla zaznamenána počáteční

teplota vody 8,9 °C, která během zimního období klesala průměrně měsíčně o  $0.5 \pm 0,8^\circ\text{C}$  a stoupla na konečných  $12 \pm 1,5^\circ\text{C}$  v dubnu, kdy bylo sledování ukončeno. Průměrný obsah kyslíku ve vodě se pohyboval v rozmezí  $12 \pm 1,3 \text{ mg.l}^{-1}$  během celého sledovacího období. Ryby začaly přijímat krmivo (Biomar, EFICO Enviro 920, 3 mm) 3-4 dny po výtěru. Byly stanoveny ukazatele specifické rychlosti růstu (specific growth rate-SGR, % day<sup>-1</sup>), která se vypočítá:  $\text{SGR} = [(\ln \text{WT} - \ln \text{Wt}) \times \text{T}^{-1}] \times 100$ , kde WT a Wt udávají hmotnost ryby na začátku a na konci sledovacího období (T =160 - 180 dní) a konverze krmiva (*Food conversion ratio* – FCR:  $\text{FCR} = \text{celková spotřeba krmiva} \times (\text{WT}-\text{Wt})^{-1}$ ). 14. dubna, kdy se ukončilo sledování mortality, byly ryby spočteny, zabity a vypitvány ke zhodnocení jejich zdravotního stavu.

### 3.1.3. Hodnocení vytřených jiker

Ihned po výtěru bylo změřeno pH jiker. Použili jsme multifunkční inoLAB 720 pH metr (WTW, 823 62 Weilheim, SRN). Byl stanoven pseudogonadosomatický index zvážením celkového množství získaných jiker od každé jikernačky (pGSI = hmotnost vytřených jiker/hmotnost jikernačky před výtěrem  $\times 100$ ). Dále byly zaznamenány velikostní průměry náhodně vybraných neoplozených jiker (n = 35) a jejich absolutní hmotnost s přesností na 0,01 g ve vzorcích z každé skupiny. Pro přesné měření bylo nutné z jiker v sítku odsát filtračním papírem zbytky ovariální tekutiny. Pro měření průměru každé jikry jsme použili Quick PHOTO CAMERA 2,2 software (Olympus, Hamburg,SRN) po vyfotografování jiker digitálním fotoaparátem Olympus E-510 napojeným na binokulární mikroskop Olympus BX51.

Dále byl odebrán vzorek v počtu  $200 \pm 10$  jiker od každé jikernačky pro stanovení oplození. Pro oplození každého vzorku se použil přibližně stejný objem spermatu, odebraný 3-4 mlíčákům. Inkubace tohoto vzorku jiker, odebraného od každé vytřené jikernačky probíhala samostatně v malých experimentálních inkubačních přístrojích vlastní konstrukce (obr. 1) s regulovatelným přítokem vody. Inkubační přístroje byly napájeny vodou ze samostatného recirkulačního systému. Teplota vody byla udržována pomocí chladicího zařízení s termostatem v rozmezí  $6,1 \pm 0,4^\circ\text{C}$  po celou dobu inkubace. Obsah kyslíku ve vodě byl průměrně  $11,4 \text{ mg.l}^{-1}$ , hodnota pH se pohybovala  $7,80 \pm 0,02$ . Byly sledovány i další parametry, které by mohly negativně ovlivnit inkubaci jiker (koncentrace  $\text{Cl}^-$ , Fe,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4$ , N -  $\text{NO}_2$ , and N -  $\text{NO}_3$ ). Nicméně jejich hodnoty byly příliš nízké, aby mohly negativně ovlivnit vývin jiker.



Z celkového počtu nasazených jiker do jednotlivých inkubačních přístrojů bylo vypočítáno procento přežití do stádia očních bodů.



**Obr. 3** Inkubační přístroje s jikrami

#### 3.1.4. Statistická analýza

Všechna data byla vyhodnocena programem Statistica 9 Cz (StatSoft, Tulsa, USA) na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  pokud není uvedeno jinak. Dynamika ovulace a procento ovulujících jikraček byly posouzeny statistickým Z testem (analýzou přežívání). Použitím neparametrického Kruskal – Wallisova testu byly zjištěny rozdíly v intervalu latence. Odchytky v hodnotách pH ovariální plazmy a hmotnosti jiker byly vyhodnoceny použitím jednocestné metody ANOVA. Rozdíly ve velikostních průměrech jiker byly zhodnoceny pomocí hierarchické metody ANOVA. Lineární regresní analýza se použila pro korelaci hmotnosti jiker a přežití do stádia očních bodů. Nelineární a lineární regresní model byl použit pro korelaci pH ovariální plazmy a přežití do stádia očních bodů. Rozdíly v procentech jiker ve stádiu očních bodů byly zhodnoceny použitím jednostupňové metody ANOVA nebo Studentova t-testu. Pokud byly metodou ANOVA nalezeny signifikantní rozdíly, Tukeyho HSD test se aplikoval pro detailnější mnohonásobné porovnání. Povýtěrová mortalita byla zhodnocena  $\chi^2$  testem.

### 3.2. Pokusy v roce 2011 u sivena amerického a pstruha duhového

Na farmě pro chov lososovitých ryb v Nedošíně (Rybářství Litomyšl, s.r.o.) byly provedeny dva experimenty s hormonální indukci synchronizace ovulace, jeden u pstruha duhového (místní formy s jarním výtěrem) a druhý u sivena amerického (podzim 2011). V obou případech byly ryby před provedením hormonálního zásahu pečlivě vytříděny tak, aby byla ve výsledných experimentálních skupinách dodržena co nejvyšší velikostní a hmotnostní homogenita.

#### 3.2.1. Pstruh duhový (Pd)

Vzhledem k tomu, že u této místní formy Pd se výtěrová sezóna táhne po dobu až 4 měsíců, bylo od použití sGnRHa podaného v akutní formě předem upuštěno. Testovány byly dvě dávky sGnRHa-FIA. Vytříděné generační jikernačky byly rovnoměrně rozděleny do 3 skupin po 25ks:

- A. jednorázová injekce sGnRHa-FIA v dávce  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$
- B. jednorázová injekce sGnRHa-FIA v dávce  $25 \mu\text{g.kg}^{-1}$
- C. kontrolní skupina bez podání sGnRHa

Od 6. dne po aplikaci sGnRHa-FIA bylo u jikernaček v třídních intervalech kontrolováno dosažení ovulace. Jikernačka se považovala za ovulující pokud pouštěla jikry v důsledku mírného manuálního tlaku na dutinu břišní. Jednotlivé dny po podání GnRHa, ve kterých došlo k ovulaci, byly zaznamenávány pro výpočet průměrného intervalu latence (doby od podání hormonu do dosažení ovulace). Ovulující jikernačky byly před výtěrem anestetizovány pomocí lázně v hřebíčkovém oleji ( $0.03 \text{ ml.l}^{-1}$ ), následně zváženy a vytřeny. Po výtěru bylo zváženo celkové množství získaných jiker od každé jikernačky pro zjištění tzv. pseudogonadosomatického indexu ( $\text{pGSI} = \text{hmotnost vytřených jiker/hmotnost jikernačky před výtěrem} \times 100$ ).

#### 3.2.2. Siven americký (Si)

Protože výtěrová sezóna u sivena amerického není tak zdlouhavá, jako u výše jmenované místní formy Pd, byla u tohoto druhu ryby testována i metoda akutního hormonálního zásahu sGnRHa-FR. Vzhledem k tomu, že jsme z minulém roce zjistili účinné dávky sGnRHa-FIA a sGnRHa-FR, byly u Si použity poloviční dávky. Pokud by se prokázalo, že i nižší dávky hormonu jsou účinné, představovalo by to velmi výrazné

snížení nákladů na provádění podobných operací v praxi. Vytřídění generační jikernačky byly rovnoměrně rozděleny do 4 skupin po 25ks. Výsledný design experimentu vypadal takto:

- A. jednorázová injekce sGnRHa-FIA v dávce  $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
- B. dvojitá injekce sGnRHa-FR v dávce  $12,5+12,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
- C. jednorázová akutní injekce sGnRHa-FR v dávce  $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
- D. kontrolní skupina – injikována FR a FIA bez GnRHa

Po provedení druhého podání sGnRHa ve skupině B bylo u jikernaček v třídních intervalech kontrolováno dosažení ovulace. Jikernačka se považovala za ovulující, pokud pouštěla jikry v důsledku mírného manuálního tlaku na dutinu břišní. Jednotlivé dny po podání GnRHa, ve kterých došlo k ovulaci, byly zaznamenávány pro výpočet průměrného intervalu latence (doby od podání hormonu do dosažení ovulace). Ovulující jikernačky byly před výtěrem anestetizovány pomocí lázně v hřebíčkovém oleji ( $0,03 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ), následně zváženy a vytřeny. Po výtěru bylo zváženo celkové množství získaných jiker od každé jikernačky pro zjištění tzv. pseudogonadosomatického indexu ( $\text{pGSI} = \text{hmotnost vytřených jiker} / \text{hmotnost jikernačky před výtěrem} \times 100$ ).

### 3.2.3. Kontrola kvality jiker

Kvalita jiker byla hodnocena a mezi jednotlivými skupinami porovnávána měření následujících parametrů u všech jikernaček: pH ovariální plasmy, individuální hmotnost jiker, přežití do stadia očních bodů, líhivost embryí a četnost deformit. U sivena amerického byla provedena korelace velikosti jiker s velikostí vykuleného váčkového plůdku. pH ovariální plasmy bylo měřeno multifunkčním inoLAB 720 pH metrem (WTW, Weilheim, SRN) ihned po výtěru. Pro zjištění individuální hmotnosti jiker bylo použito analytických předvážek ( $d = 0,001 \text{ g}$ ) KERN 572-32 (Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, SRN), sítko a sacích filtračních papírků. 25 ks jiker bylo vloženo do malého sítko a pomocí sacích filtračních papírků byla z jiker opatrně odstraněna přebytečná ovariální plasma. Takto „osušené jikry“ byly následně váženy na petriho miskách. Od každé jikernačky byly odebrány tři vzorky jiker ( $150 \pm 10$  ks jiker na každý vzorek) za účelem sledování přežití do stadia očních bodů a líhivosti. Tyto vzorky byly, po kontrole motility, oplozeny stejným objemem spermatu, odebraným od 3-4 mlíčáků. Inkubace vzorků jiker probíhala na miniaturních aparátech typu Rückl-

Vacek uložených ve sklolaminátových žlabech. Každý aparát byl individuálně napájen z vodního zdroje, který je využíván v líhni v Nedošíně. Procento jiker v očních bodech a vykulených embryí bylo počítáno z celkového počtu nasazených jiker na inkubátoru.

#### 3.2.4. Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu Statistica 9 na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  pokud není uvedeno jinak. Výsledky statistické analýzy a k tomu použitých testů jsou uvedeny u všech prezentovaných výsledků v této zprávě. Data jsou zobrazena ve tvaru průměr $\pm$ SEM (mean $\pm$ SEM – Standard Error of Mean - *standardní chyba průměru*).

#### 3.2.5. Teplota a kyslík Pd a Si (r. 2011)

Průběh teploty vody u jikernaček pstruha duhového měl vzestupnou tendenci (od února do května v rozmezí 4,6 - 10,7°C (Graf 7), průměrná teplota byla 8,07 °C  $\pm$  1,5°C. Obsah kyslíku kolísal v rozmezí 7-10 mg.l<sup>-1</sup>. U pokusu s jikernačkami sivena amerického se průměrná teplota vody pohybovala sestupně od října do prosince v rozmezí od 11,5°C do 5,6°C (Graf 16). Průměrná teplota byla 8,5°C  $\pm$  1,5°C. Teplota vody při inkubaci jiker kolísala v rozmezí 7 - 10°C, kyslík okolo 10 - 12 mg.l<sup>-1</sup> u obou experimentů.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Siven americký - pokus 2010

#### 4.1.1. Indukce synchronizované ovulace

První ovulace byly zaznamenány 9. den po provedení aplikace hormonů. K tomuto dni bylo ve skupinách A, B, C, a D vytřeno 30, 60, 40, a 30 % ryb (Graf 1). 12. den po aplikaci bylo ve skupinách A, B, C, a D vytřeno již 70, 80, 100, a 50% jikernaček. U ryb ve skupině D byla ovulace od 12. do 21. dne pozastavena. Ve skupině C bylo vytřeno 100 % ryb během 3 dnů. 15. den byly vytřeny všechny ryby ve skupině A, a ve skupině B až 18. den protože byla ovulace stejně jako ve skupině D od 12. do 15. dne pozastavena. Ryby ve skupině D začaly znovu ovulovat až 24. den a dosáhly 100 % ovulace až do 30. dne. V kontrolní skupině E byly zaznamenány první ovulace 21. dne. Počet ovulujících jikernaček v této skupině postupně rostl, až bylo vytřeno 100 % ryb 33. den. Analýza přežití ukázala, že hormonální stimulace signifikantně synchronizovaly ovulaci v porovnání s kontrolou ( $\chi^2 = 23,5$ ;  $df = 4$ ;  $P = 0,0001$ ). Délka doby od aplikace hormonálního přípravku do ovulace ve skupinách A, B, a C byla  $12 \pm 2,4$ ;  $11,4 \pm 3,7$ , a  $10,8 \pm 1,5$  dní, a lišila se signifikantně v porovnání s kontrolní skupinou E ( $26,7 \pm 3,7$  dní) (Kruskal –Wallisův test mnohonásobného porovnání ( $n = 50$ ;  $df = 4$ ;  $P < 0,01$ )). Délka doby od aplikace hormonálního přípravku do ovulace ve skupině D měla střední hodnotu,  $18,3 \pm 8,8$  dní, a nebyly nalezeny žádné statistické odchylky od skupin A, B, C a E.

#### 4.1.2. Povýtěrová mortalita

Během 6 měsíců nebyla zaznamenána povýtěrová úmrtnost v žádné ze skupin. Nicméně při následném počítání ryb v říjnu 2011 několik ryb chybělo. Procento zbývajících ryb ve skupinách A, B, C, D, a E bylo 90, 100, 90, 90, a 80 %, Všechny jikernačky, které přežily, byly ve výborné kondici a jejich konečná váha ( $720 \pm 47$  g) se nelišila v rámci všech skupin. Na konci sledovacího období nebyly zaznamenány žádné odchylky v hodnotách FCR a SGR. Specifická rychlost růstu byla přibližně 0.47 % za den a konverze krmiva byla pro všechny skupiny v rozmezí 1,1 - 1,2. Příjem potravy se nesnížil ani když teplota vody klesla 1°C pod bod mrazu a sádka byla celá pokryta vrstvou ledu. Na ovariih vypitvaných ryb se nenašly žádné viditelné abnormality (intra-abdominální léze, záněty, krevní sraženiny nebo granulomy).

#### 4.1.3. Kontrola kvality jiker

Největší množství ovariální plazmy bylo odebráno u skupin, kde ovulace nastoupila nejrychleji: skupiny A, B, a C ( $8,46 \pm 0,07$ ,  $8,38 \pm 0,09$ , a  $8,38 \pm 0,17$ ). Signifikantní rozdíly byly nalezeny pouze mezi skupinou A, skupinou D a skupinou E ( $8,29 \pm 0,09$  a  $8,2 \pm 0,13$ ) použitím Tukeyho HSD testu ( $P = 0,025$  a  $P = 0,003$  mezi skupinou D a E) (Tab 1). U skupin, kde byly aplikovány hormony, byla individuální hmotnost jiker nižší. Signifikantně lehčí jikry než ve skupině E ( $25,2 \pm 1,8$  mg) byly zaznamenány ve skupině B ( $20,3 \pm 2,9$  mg) ( $P < 0,01$ ). Jikry ve skupině A ( $21,7 \pm 1,7$  mg) ve srovnání se skupinou E byly blízko hladiny signifikance ( $P = 0,054$ ). Nebyly nalezeny žádné výrazné rozdíly mezi váhou jiker ve skupinách C a D ( $22,4 \pm 2,9$  mg a  $22,7 \pm 2,9$  mg) ve srovnání s dalšími skupinami. Nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly u hodnot pGSI (Tab. 1). Průměr jiker koresponduje s trendy hmotnosti jiker. Při porovnání údajů metodou hierarchické metody ANOVA byly zjištěny statisticky významné rozdíly jak mezi jednotlivými skupinami ryb tak mezi jednotlivými jikrňáčkami ( $p < 0,01$  pro obě). Analýza průměru jiker s využitím Tukeyeho HSD testu ukázala signifikantní rozdíly u všech případů ( $MSE = 0,0165$ ,  $df = 1,632$ ,  $P < 0,01$ ), s výjimkou skupin C a D (tabulka 1). Nejmenší průměry jiker byly změřeny ve skupinách A a B ( $3,65 \pm 0,24$  mm a  $3,61 \pm 0,18$  mm) a největší průměry jiker byly změřeny u kontrolní skupiny E ( $3,81 \pm 0,17$  mm). Signifikantně vyšší přežití do stádia očních bodů bylo pozorováno ve skupinách A, B, a C ( $27 \pm 22$  %,  $39 \pm 24$  %, a  $30 \pm 18$  %) v porovnání s  $5 \pm 5$  % v kontrolní skupině E ( $P < 0,05$ ,  $0,01$  a  $0,01$  pro skupiny A, B a C Tukeyův HSD test). Procento jiker ve stádiu očních bodů ve skupině D bylo  $22 \pm 24$  % a nelišilo se od kontrolní skupiny E nebo dalších skupin (tabulka 1). Analýza pomocí Studentova t-testu ukázala, že 50 % ryb v skupině D, které ovulovaly ve dnech 9 a 12 (obr. 1) vykazovali výrazně vyšší procento přežití do stádia očních bodů ( $41 \pm 24$  %), než ty, které ovulovaly 24. dne ( $9 \pm 4$  %) ( $P = 0,035$ ) (obr. 3). Tento rozpor nebyl pozorován u ostatních skupin. Kromě toho, jikrňáčky ve skupinách s hormonální indukcí ovulace měly lehčí a menší jikry, které se vyznačovaly vyšším pH ovariální plazmy (tab. 1) a vyšším přežitím do stádia očních bodů. Nicméně, po vykreslení dat od všech jikrňáček do jediného lineárního regresního modelu (obr. 4), byl zjištěn nízký negativní vztah mezi hmotností jiker a přežitím do stádia očních bodů ( $R^2 = -0,26$ ). Tyto jikry, které vážily méně než 23 mg vykazovaly mírně vyšší přežití do stádia očních bodů než jikry o

hmotnosti vyšší (obr. 4). Vztah mezi pH ovariální plazmy a procentem jiker ve stádiu očních bodů byl malý ( $R^2 = 0,12$ ), jak je vidět na modelu nelineární regrese (obr. 5). Podrobná regrese v rámci jednotlivých skupin ukázala, že některé jikračky s nejmenšími jikrami měly také vyšší pH ovariální plazmy se sníženým přežitím do stádia očních bodů, např. u skupiny A (tab. 2 a 3). Kromě toho se u některých skupin neprokázal vliv hmotnosti neoplozených jiker a pH ovariální plazmy na přežití do stádia očních bodů (Tab. 2 a Tab. 3).

**Tab. 1** Výsledky umělého výtěru sivena amerického po hormonální indukci ovulace (r. 2010)

Skupina	pGSI (%)	pH ovariální plazmy	Průměrná hmotnost jedné jikry (mg)	Velikost jiker (mm)	Přežití jiker do očních bodů (%)
	$\bar{X} \pm s$ n = 10	$\bar{X} \pm s$ n = 10	$\bar{X} \pm s$ n = 10	$\bar{X} \pm s$ n = 10	$\bar{X} \pm s$ n = 10
A	8.8 ± 2.3a	8.46 ± 0.07c	21.7 ± 1.7ab	3.65 ± 0.24b	27 ± 22b
B	7.3 ± 2.9a	8.38 ± 0.09bc	20.3 ± 2.9a	3.61 ± 0.18a	39 ± 24b
C	6.5 ± 3.4a	8.38 ± 0.17bc	22.5 ± 3.0ab	3.72 ± 0.25c	30 ± 18b
D	8.6 ± 2.2a	8.29 ± 0.09ab	22.7 ± 2.9ab	3.73 ± 0.26c	22 ± 24ab
E	9.1 ± 2.8a	8.25 ± 0.13ab	25.2 ± 1.8bc	3.81 ± 0.17d	5 ± 5a

Hodnoty se stejnými písmeny se signifikantně neliší (jednocestná ANOVA a Tukeyův HSD test  $P < 0,05$ ).

**Tab. 2** Jednoduché regresní modely popisující vztah mezi procentem přežití jiker do stádia očních bodů a pH ovariální plazmy.

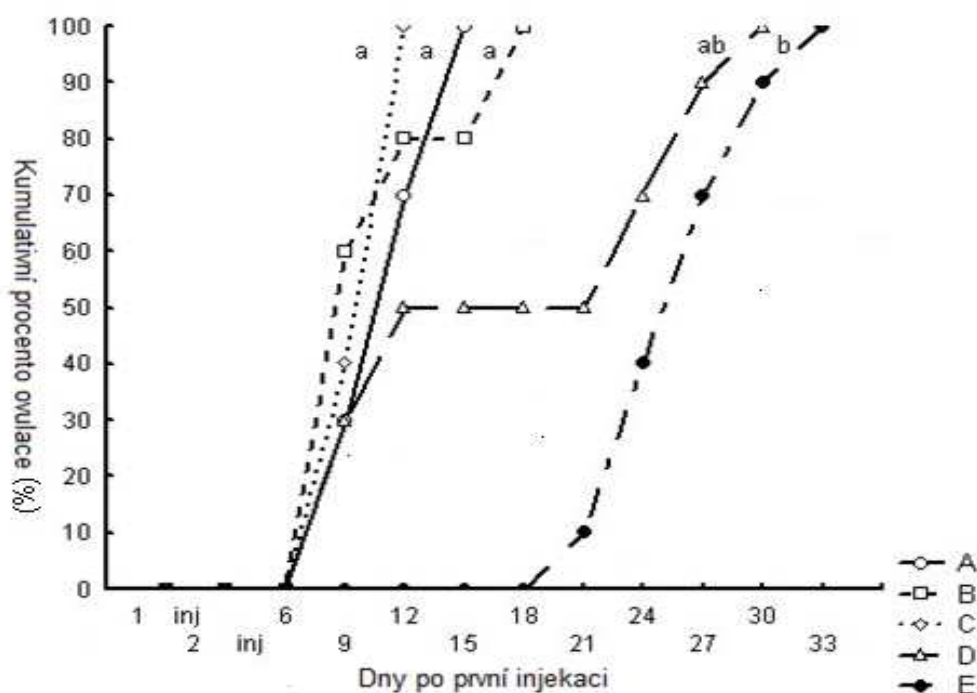
Skupina	R	P	R <sup>2</sup>	rovnice
A	0.22	0.55	0.05	$y = -799.6 + 97.96x$
B	-0.03	0.94	0.001	$y = 103.14 - 7.08x$
C	-0.61	0.08	0.37	$y = 976.1 - 111.9x$
D	0.32	0.4	0.1	$y = -537 + 67.21x$
E	-0.42	0.25	0.18	$y = 147.4 + 17.31x$

**Tab. 3** Jednoduché regresní modely popisující vztah mezi procentem přežití jiker do stádia očních bodů a hmotností jiker.

Skupina	R	P	R <sup>2</sup>	rovnice
A	0.9	0.0008	0.82	$y = -162.73 + 9.1x$
B	0.53	0.22	0.28	$y = 117.43 + 3.7x$
C	-0.21	0.58	0.05	$y = 59.18 + 1.15x$
D	-0.61	0.08	0.37	$y = 126.51 + 4.65x$
E	-0.007	0.99	0	



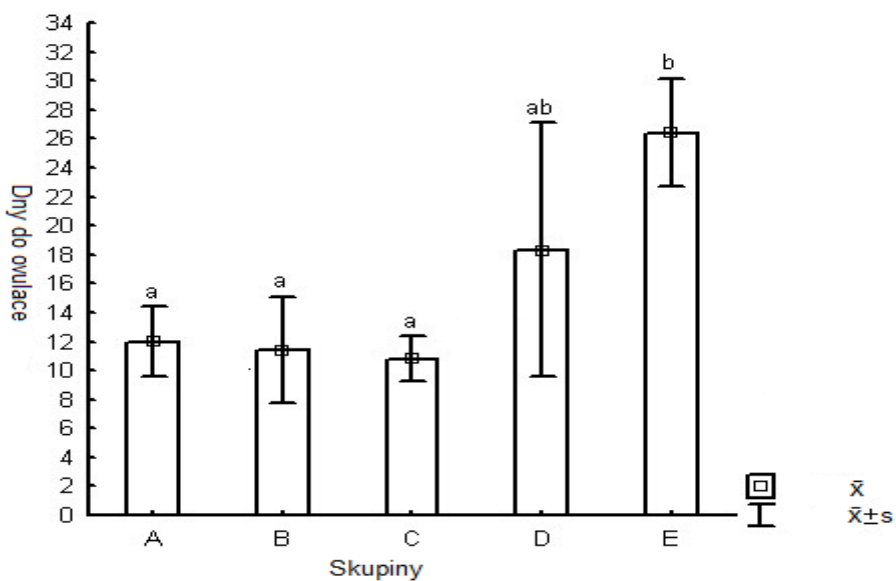
## 4.2. Grafy



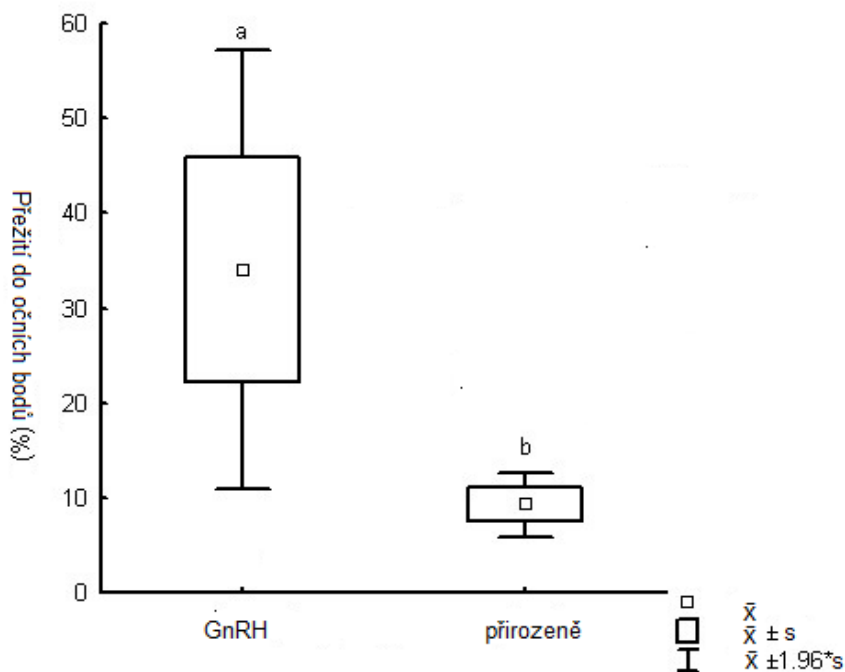
**Graf 1** Časový průběh ovulace jikernaček sivena amerického po hormonální indukci ovulace (A: sGnRH<sub>a</sub>-FIA 50 µg.kg<sup>-1</sup>; B: sGnRH<sub>a</sub>-FIA 25 µg.kg<sup>-1</sup>; C: sGnRH<sub>a</sub> 25+25 µg.kg<sup>-1</sup>; D: sGnRH<sub>a</sub> 25 µg.kg<sup>-1</sup>; E: Kontrola). Křivky se stejnými písmeny se významně neliší (P < 0,05)

**Tab. 4** Tabulka znázorňuje časový průběh ovulace z grafu 1 a procenta vytřených ryb k jednotlivým dnům ve skupinách A - D a také samostatně výtěr ve skupině E. Stejná procentuální hodnota značí pozastavení výtěru.

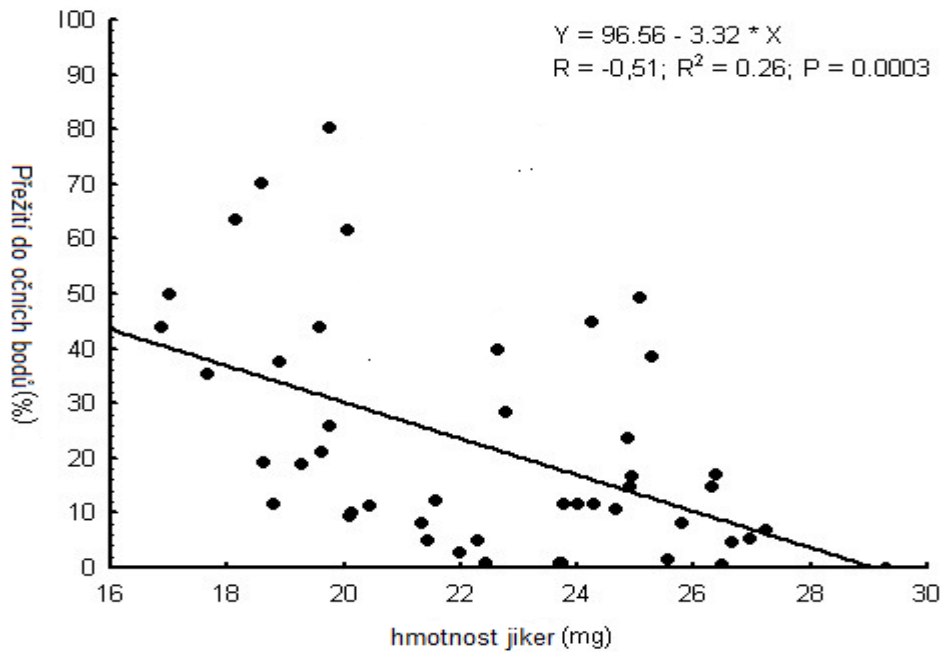
Dny	Skupiny				Dny	Skupina
	A	B	C	D		E
9.den	30%	60%	40%	30%	21.den	10%
12. den	70%	80%	100%	50%	24.den	40%
15. den	100%	80%		50%	27. den	70%
18. den		100%		50%	30.den	90%
30. den				100%	33.den	100%



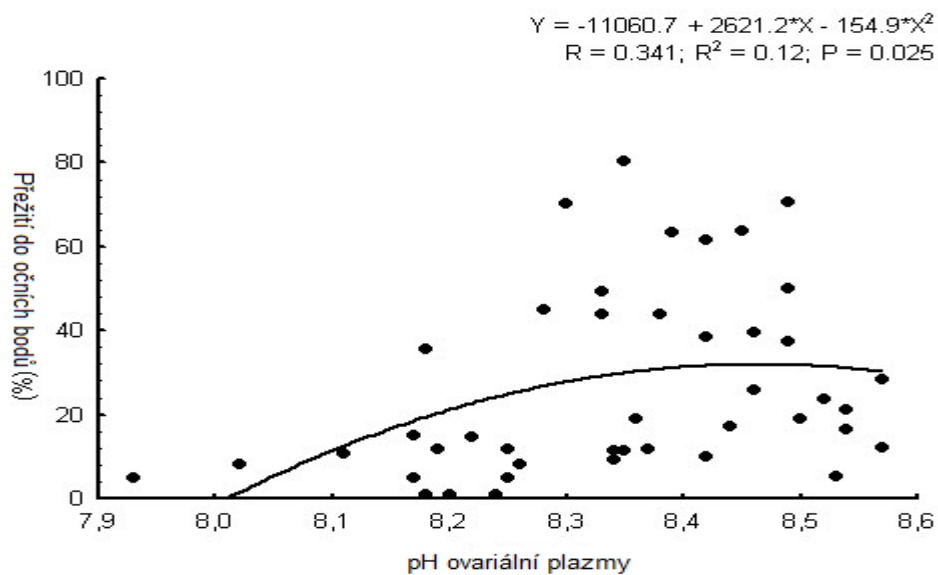
**Graf 2** Průměrná délka intervalu latence u jikernaček sivena amerického po hormonální indukci ovulace (A: sGnRH<sub>a</sub>-FIA 50  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; B: sGnRH<sub>a</sub>-FIA 25  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; C: sGnRH<sub>a</sub> 25+25  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; D: sGnRH<sub>a</sub> 25  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; E: Kontrola). Průměry ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ ) se stejnými písmeny se singnifikantně neliší (Kruskal-Wallisův test).



**Graf 3** Rozdíly v přežití do stádia očních bodů mezi jikrami s hormonální synchronizací ovulace ve skupině D sGnRH<sub>a</sub>-PS SI 25 mikrogramů. $\text{kg}^{-1}$  a přirozeným výtěrem. Střední hodnoty ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ ) se stejnými písmeny se singnifikantně neliší.



**Graf 4** Závislost přežití do stádia očních bodů na hmotnosti jiker u sivena amerického (n= 50 ).  
Lineární regresní model.



**Graf 5** Závislost přežití do stádia očních bodů na pH ovariální plazmy (n = 50) u sivena amerického (r. 2010). Nelineární regresní model.

### **4.3. Pstruh duhový (r. 2011)**

#### **4.3.1. Indukce synchronizované ovulace**

Obě dvě dávky hormonu podané ve formě sGnRHa-FIA signifikantně synchronizovaly ovulaci v porovnání s kontrolou ( $P < 0,01$ , Z-test). Ovulace u prvních jedinců byla zaznamenána 11. den (7.3. 2011) po aplikaci hormonálních přípravků. Ve skupinách A a B bylo vytřeno 20 % a 30 % jikernaček (4 a 6 z 20 ks), viz Graf 6. 14. 3. 2011 (18. den po aplikaci) bylo ve skupinách A a B vytřeno již 65 % jikernaček (13 z 20ks při kumulativním vyjádření), zatímco u kontrolních ryb byla k tomuto datu vytřena pouze 1 jikernačka (5 %). 24.3.2011 (28. den po aplikaci) ve skupině B dosáhlo kumulativní procento ovulace hodnoty 90 % oproti 65 % a 10 % ve skupině A a C. 100 % podílu ovulovaných a vytřených jikernaček v kontrolní skupině C bylo dosaženo až 17.5. 2011, tj. 80. den po injikaci hormonálních přípravků ve skupině A a B. Je nutno podotknout, že 85 % jikernaček ve skupině B bylo vytřeno v časovém úseku 10 dní. 100 % jikernaček v této skupině pak v rozmezí 38 dní, což je ve 2x kratší době než u kontrolní skupiny B (Graf 6). Ovulace posledních jikernaček ve skupině A byla zaznamenána 14.3. 2011 (Graf 6). Dne 14.4. 2011 (49. den po aplikaci hormonálních přípravků), kdy bylo ve skupině B vytřeno 100 % ryb, bylo rozhodnuto o provedení pitvy u zbývajících 7 jikernaček za účelem zjištění polohy jádra v ovocytech. Pitva a následné prosvětlení ovocytů v prosvětlovacím roztoku prokázaly, že hormonální zásah u těchto jikernaček nebyl účinný. Poloha zárodečného jádra se u všech 7 ryb nacházela stále v centrální pozici, což bylo vzhledem k výši použité dávky sGnRHa překvapením.

#### **4.3.2. Kvalita jiker**

Hodnota pH ovariální plasmy se mezi jednotlivými skupinami lišila. Nicméně rozdíly, ačkoliv signifikantní, nebyly tak dramatické, aby ovlivnily kvalitu pohlavních produktů. Obecně se ve všech skupinách hodnota pH pohybovala v rozmezí 8,00 - 8,44, což naznačuje, že žádná jikernačka neměla jikry ve stavu degradace jikerných obalů. Navíc nebyla zjištěna žádná korelace mezi pH ovariální plasmy a přežitím do stadia očních bodů.

Individuální hmotnost jiker byla signifikantně nižší ( $P < 0,05$ , jednocestná ANOVA, Tukeyho HSD test mnohonásobného porovnání) u hormonálně ošetřených skupin A a B v porovnání s kontrolou C (Graf 11). V průměru byly jikry o  $7-9 \text{ mg.ks}^{-1}$

lehčí od jikernaček, kterým byl aplikován sGnRHa. Individuální hmotnost jiker dosáhla  $55.3 \pm 2,6$ ,  $53.1 \pm 2,1$  a  $62,2 \pm 2,1$  mg ve skupinách A, B a C, Nicméně signifikantní závislost přežití jiker do očních bodů a líhnivosti na hmotnosti jiker nebyla prokázána.

Přežití do stádia očních bodů bylo signifikantně nižší ( $P < 0,05$ , jednocestná ANOVA, Tukeyho HSD test mnohonásobného porovnání) u jiker ve skupinách A a B v porovnání s kontrolou C (Graf 12). Podíl přežívajících jiker ve stádiu očních bodů ve skupinách A, B a C dosahoval  $67,8 \pm 6,1$ ,  $71,3 \pm 4,9$  a  $87,8 \pm 5,1\%$ . Byla zjištěna pozitivní korelace mezi délkou intervalu latence a přežitím do stádia očních bodů ve skupině B ( $P < 0,01$ ,  $R^2 = 0,3$ ) (Graf 8). U kontrolní skupiny takovýto fenomén nebyl pozorován (Graf 8). U skupiny A nemohla být signifikance prokázána z důvodu malého počtu jikernaček zařazených do hodnocení (vzhledem k 7 nevytřeným jikernačkám). Nicméně počáteční výše podílu přežitých jiker do očních bodů v závislosti na délce intervalu latence v této skupině je téměř identická jako ve skupině B.

Mortalita embryí v období mezi stádiem očních bodů a kulením byla vyšší u jiker ve skupinách A a B v porovnání s kontrolou C (Graf 13). Rozdíly ale nebyly signifikantně průkazné. Nicméně hodnota  $P = 0,066$  je pod indikační hladinou významnosti  $\alpha = 0,1$ , která se v biologii ještě dá považovat za signifikantní ( $P < 0,1$ , jednocestná ANOVA, Tukeyho HSD test mnohonásobného porovnání). To naznačuje fakt, že při větším počtu dat a eliminaci velké variability souboru by výsledky s velkou pravděpodobností byly signifikantní i na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Mortalita jiker v tomto období dosáhla hodnot  $11,3 \pm 3,9$ ,  $11,5 \pm 3,2$  a  $1,6 \pm 3,3\%$  ve skupinách A, B a C (Graf 13). Byla zjištěna pozitivní korelace mezi číslem kontroly ryb na ovulaci, tj. délkou doby od aplikace hormonálního přípravku do ovulace, a mortalitou mezi stádiem očních bodů a kulením v hormonálně ošetřených skupinách A a B ( $P < 0,01$ ,  $R^2 = 0,59$  a  $P < 0,01$ ,  $R^2 = 0,3$ ) (Graf 9). U kontrolní skupiny takovýto fenomén nebyl pozorován (Graf 9).

Líhnivost jiker byla signifikantně nižší ( $P < 0,01$ , jednocestná ANOVA, Tukeyho HSD test mnohonásobného porovnání) ve skupinách A a B v porovnání s kontrolou C (Graf 14). Podíl vykulených jiker byl  $61,8 \pm 6,4$ ,  $64,6 \pm 5,2$  a  $86,6 \pm 5,3\%$  ve skupinách A, B a C. Byla zjištěna pozitivní korelace mezi délkou intervalu latence a hodnotou líhnivosti u hormonálně ošetřených skupin A a B ( $P < 0,05$ ,  $R^2 = 0,15$  a  $P < 0,01$ ,  $R^2 = 0,45$ ) (Graf 10). U kontrolní skupiny takovýto fenomén nebyl pozorován (Graf 10).

Četnost deformit se mezi jednotlivými skupinami signifikantně nelišila ( $P > 0,05$ , jednocestná ANOVA). Zaznamenaný podíl deformit dosáhl u skupin A, B a C hodnot  $0,1 \pm 0,1$ ,  $0,15 \pm 0,1$  a  $0,2 \pm 0,1$  %.

#### 4.3.3. Povýtěrová mortalita a stav generačních ryb

Žádné signifikantní rozdíly v povýtěrové mortalitě pokusných ryb nebyly zjištěny. V poovulačním období ve skupině A uhynuly 3 jikernačky. U jedné jikernačky byl ve svalovině a dalšího kusu silné překrvení v tělní dutině. U třetí uhynulé jikernačky bylo zjištěno silné povrchové zaplísnění. Ve skupině B uhynuly 4 jikernačky, z toho u 3 ks bylo zaznamenáno silné zaplísnění, jedna jikernačka pravděpodobně uhynula na následky nedostatečného vytření jiker a silného vnitřního krvácení v dutině břišní (pitva prokázala přítomnost velkých krevních sraženin). V kontrole C uhynulo celkem 6 jikernaček, z toho 5 ks bylo silně zaplísněných, u jednoho kusu se příčina úhynu nedala stanovit.

U 7 vypitvaných ryb ve skupině A v předovulačním období nebyly zjištěny žádné degenerativní změny či alergické reakce jak na ovarii, tak ve svalovině.

### 4.4. **Siven americký (r. 2011)**

#### 4.4.1. Indukce synchronizované ovulace

Všechny použité hormonální zásahy signifikantně ( $P < 0,05$ , Z-test) urychlovaly a synchronizovaly ovulaci v porovnání s kontrolou (Graf 15). První ovulace byly zaznamenány 10. den po provedení první aplikace hormonů 14.10.2011. V tento den dosáhl ve skupinách A, B, C a D podíl vytřených jikernaček 8, 24, 12 a 0 %. 17.10.2011 (13. den po 1. aplikaci) bylo již ve skupinách A, B a C vytřeno 12, 28 a 12 % jikernaček, zatímco v kontrolní skupině prozatím neovulovala zatím žádná jikernačka. Obecně měla synchronizace ovulace v tomto pokusu velmi pozvolný průběh ve všech hormonálně ošetřených skupinách, lišila se jen její dynamika v závislosti na použití akutní či protražované metody uvolňování GnRH<sub>a</sub>, tj. sGnRH-FR či sGnRH<sub>a</sub>-FIA. Zatímco se ve skupině A podíl ovulovaných a vytřených jikernaček kontinuálně zvyšoval po celou dobu experimentu, ve skupinách B a C došlo k strmějšímu nárůstu ovulací 10. a 13. den po první aplikaci hormonálních přípravků. Potom se ovulace dalších jikernaček v těchto skupinách zastavila až do 31.10.2011 (27. den po 1. aplikaci), kdy již byly zaznamenány první ovulace a provedeny první výtěry v kontrolní

skupině D. Lze rovněž tvrdit, že nízká jednorázová dávka protražovaného sGnRHa-FIA (skupina A) a nízká dvojitá dávka akutního sGnRHa-FR (skupina B) jsou téměř dvakrát účinnější, než vysoká jednorázová dávka akutního sGnRHa-FR (skupina C). To je patrné 7.11.2011 (34. den po 1. aplikaci), kdy podíl vytřených jikernaček ve skupinách A, B, C a D byl 56, 52, 28 a 16 %. Podíl ovulovaných jikernaček v žádné skupině nedosáhl 100 %. Důvodem byl výskyt předvýtěrové mortality jikernaček ve všech skupinách.

#### 4.4.2. Kvalita jiker

Hodnota pH ovariální plazmy se mezi jednotlivými skupinami lišila. Nicméně rozdíly, ačkoliv signifikantní, nebyly tak dramatické, aby ovlivnily kvalitu pohlavních produktů. Obecně se ve všech skupinách hodnota pH pohybovala v rozmezí 8,00 - 8,35, což naznačuje, že žádná jikernačka neměla jikry ve stavu degradace jikerných obalů. Navíc nebyla zjištěna žádná korelace mezi pH ovariální plasmy a přežitím do stadia očních bodů.

Individuální hmotnost jiker byla vysoce signifikantně nižší ( $P < 0.01$ , jednocestná ANOVA, Tukeyho HSD test mnohonásobného porovnání) u hormonálně ošetřených skupin A, B a C v porovnání s kontrolou D (Graf 17). V průměru byly jikry o 5-6 mg.ks<sup>-1</sup> lehčí od jikernaček kterým byl aplikován sGnRHa. Individuální hmotnost jiker dosáhla 39,2±0,9 , 39,1±1,0 , 38,5±1,0 a 44,7±0,9 mg ve skupinách A, B, C a D, resp. Nicméně signifikantní závislost přežití jiker do očních bodů a líhnivosti na hmotnosti jiker nebyla nalezena.

Individuální hmotnost váčkového plůdku byla signifikantně nižší ( $P < 0.05$ , jednocestná ANOVA, Tukeyho HSD test mnohonásobného porovnání) u hormonálně ošetřených skupin A, B a C v porovnání s kontrolou D (Graf 18). V průměru byl váčkový plůdek o 4 - 6 mg.ks<sup>-1</sup> lehčí od jikernaček, kterým byl aplikován sGnRHa. Individuální hmotnost váčkového plůdku dosáhla 44,0±1,0, 43,9±1,1, 42,3±1,1 a 48,2±1,1 mg ve skupinách A, B, C a D. Nicméně signifikantní závislost přežití jiker do očních bodů a líhnivosti na hmotnosti váčkového plůdku nebyla prokázána. Oproti tomu velikost váčkového plůdku byla prokazatelně přímo závislá na velikosti jiker ( $R^2=0,76$ ,  $P < 0,01$ ) (Graf 19), což je velmi důležité zjištění. Regresní analýza rovněž potvrdila vysokou závislost líhnivosti na procentu přežití jiker do očních bodů ( $R^2=0,93$ ,  $P < 0,01$ ) (Graf 20).

Procento přežití jiker do očních bodů se signifikantně nelišilo mezi jednotlivými skupinami. Podíl jiker ve stádiu očních bodů byl  $82,0 \pm 3,3$ ,  $82,3 \pm 3,7$ ,  $74,5 \pm 3,6$  a  $79,4 \pm 3,5$  % ve skupinách A, B, C a D. Nebyla zjištěna korelace mezi délkou intervalu latence a přežitím jiker do stádia očních bodů.

Mortalita embryí v období mezi stádiem očních bodů a kulením byla vyšší u jiker ve skupinách B ( $7,1 \pm 1,0$  %) a C ( $6,3 \pm 1,0$  %) v porovnání se skupinou A ( $4,3 \pm 0,9$  %) a kontrolou D ( $3,9 \pm 1,0$  %) (Graf 13). Rozdíly ale nejsou průkazné na hladině významnosti  $\alpha=0,05$ . Nicméně hodnota  $P=0,0621$  je pod indikační hladinou významnosti  $\alpha=0,1$ , která se v biologii ještě dá považovat za signifikantní ( $P < 0,1$ , jednocestná ANOVA, Tukeyho HSD test mnohonásobného porovnání). To naznačuje fakt, že při větším počtu dat a eliminaci velké variability souboru by výsledky s velkou pravděpodobností byly signifikantní i na hladině významnosti  $\alpha=0,05$ .

Líhivost se signifikantně nelišila mezi jednotlivými skupinami. Podíl vykuleného váčkového plůdku byl  $77,7 \pm 3,4$ ,  $75,2 \pm 3,9$ ,  $68,2 \pm 3,8$  a  $75,5 \pm 3,7$  % ve skupinách A, B, C a D. Nebyla zjištěna korelace mezi číslem kontroly ryb na ovulaci, tj. délkou doby od aplikace hormonálního přípravku do ovulace, a líhivostí.

U vykuleného plůdku všech skupin nebyly zaznamenány žádné deformity.

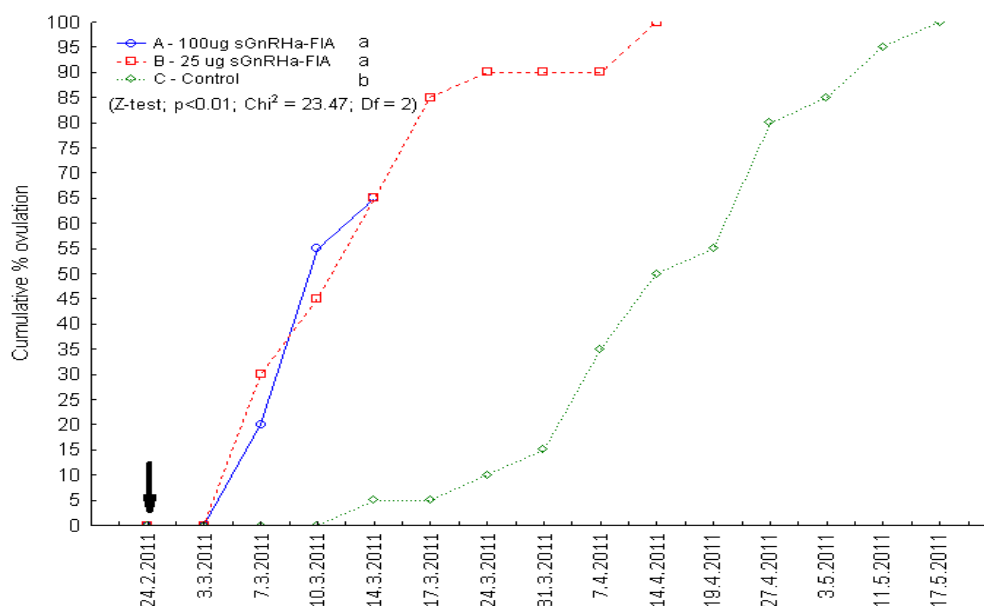
#### 4.4.3. Povýtěrová mortalita a stav generačních ryb

V tomto experimentu došlo hlavně k předvýtěrové mortalitě z důvodů zaplísnění generačních ryb. To je však u sivena amerického obecně známá skutečnost. Ve skupinách A, B, C a D uhynulo 3, 8, 7 a 6 ks jikernaček. Žádné degenerativní změny či alergické reakce v souvislosti s aplikací hormonů nebyly zjištěny jak na ovaríích, tak ve svalovině.



## 4.5. Grafy

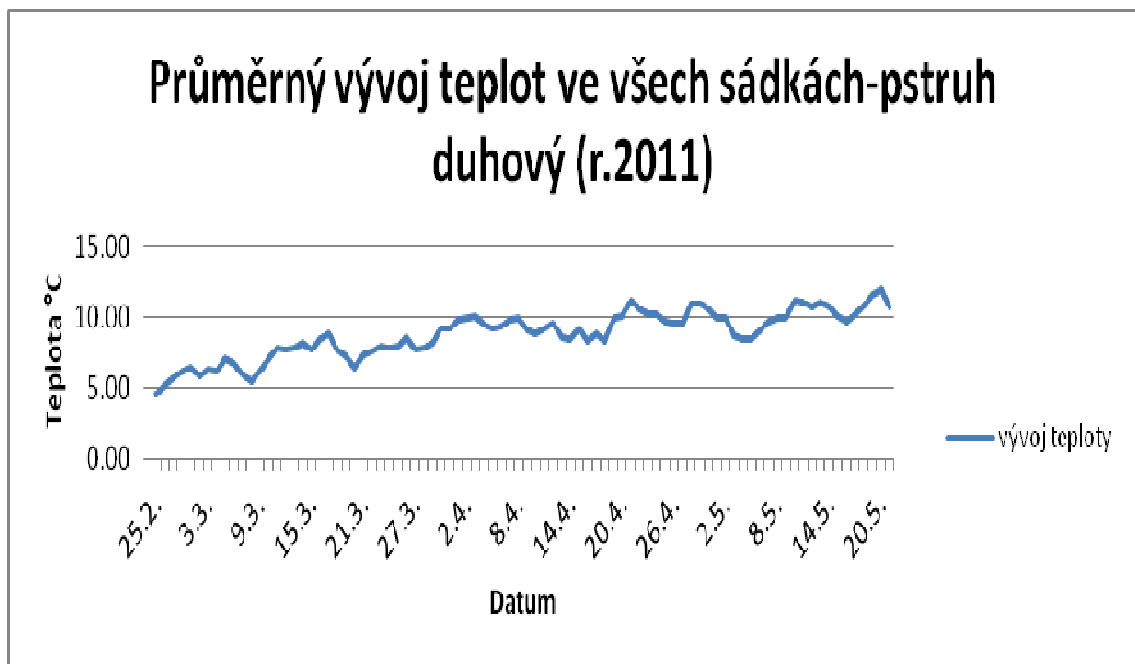
### 4.5.1. Pstruh duhový



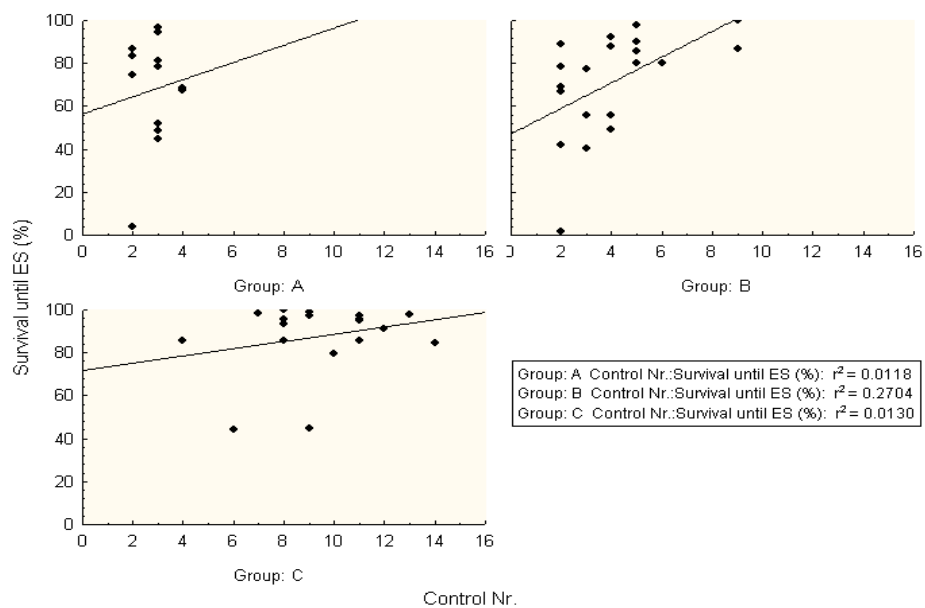
**Graf 6** Průběh ovulace v jednotlivých skupinách vyjádřený v kumulativních četnostech. Šipka představuje den provedení hormonálního zásahu. Rozdílná písmenka značí signifikantní rozdíly mezi skupinami ( $p < 0,01$ , Z-test).

**Tab.5** Časový průběh ovulace (viz graf 7) a kumulativní podíl vytřených ryb k jednotlivým dnům ve skupinách A-D a samostatně výtěr v kontrolní skupině C. Stejná procentuální hodnota značí pozastavení výtěru.

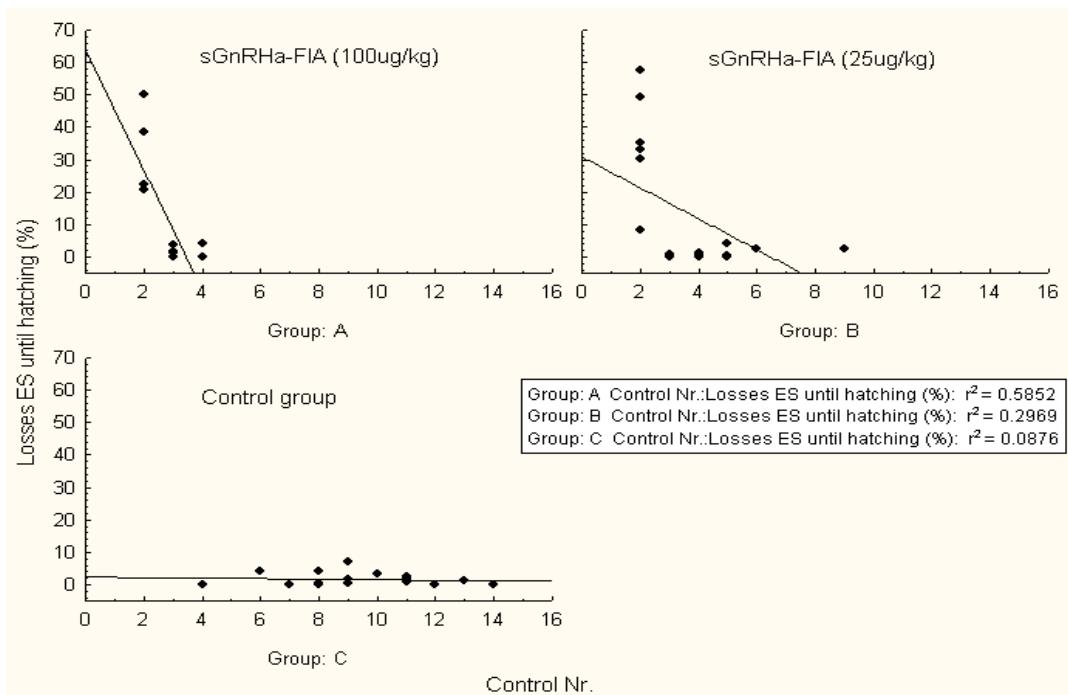
Datum	Skupiny			Dny	C
	A	B			
7.3.	20%	30%		14.3.	5%
10.3.	55%	45%		17.3.	5%
14.3.	65%	65%		24.3.	10%
17.3.		85%		7.4.	35%
24.3.		90%		14.4.	50%
31.3.		90%		17.5.	100%
7.4.		90%			
14.4.		100%			



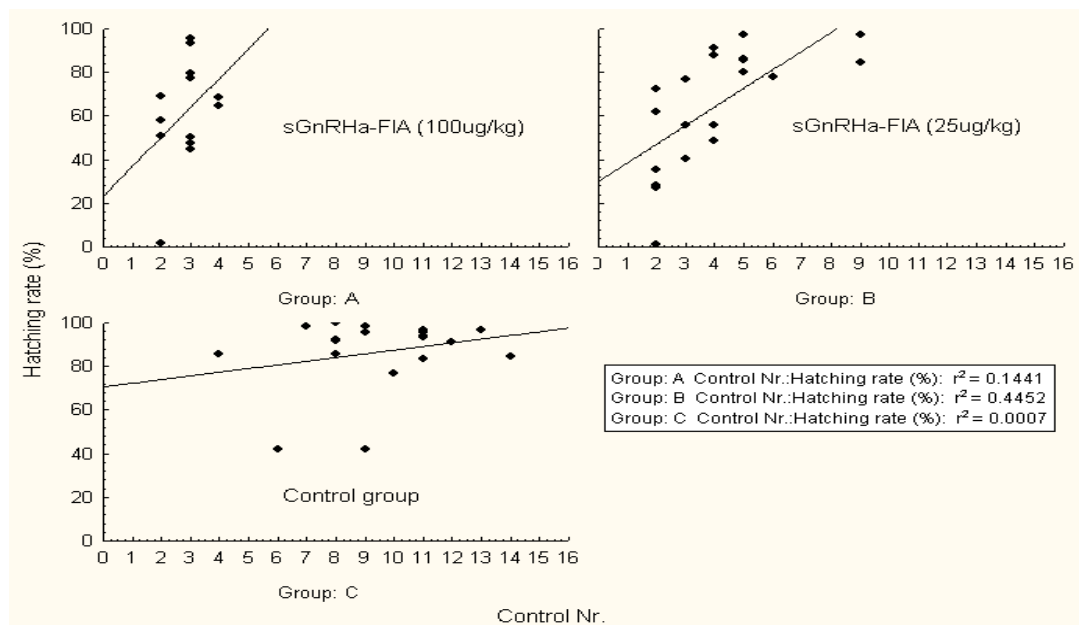
**Graf 7** Průměrný vývoj teplot ve všech sádkách-pstruh duhový (r.2011)



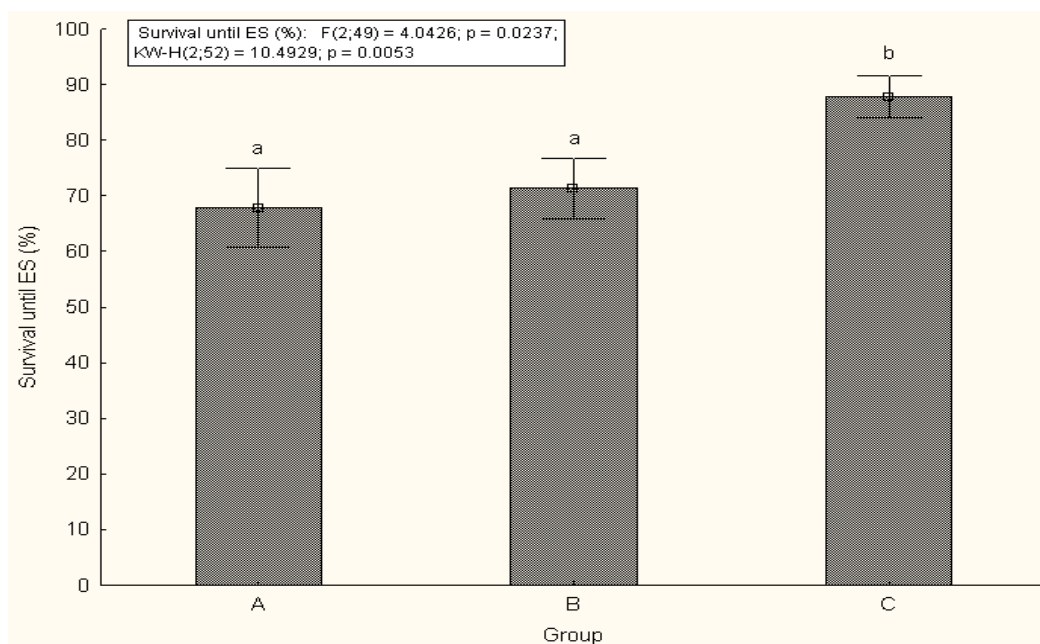
**Graf 8** Závislost přežití jiker do očních bodů na počtu dní po provedení hormonálního zásahu, kdy daná jikernačka ovulovala.



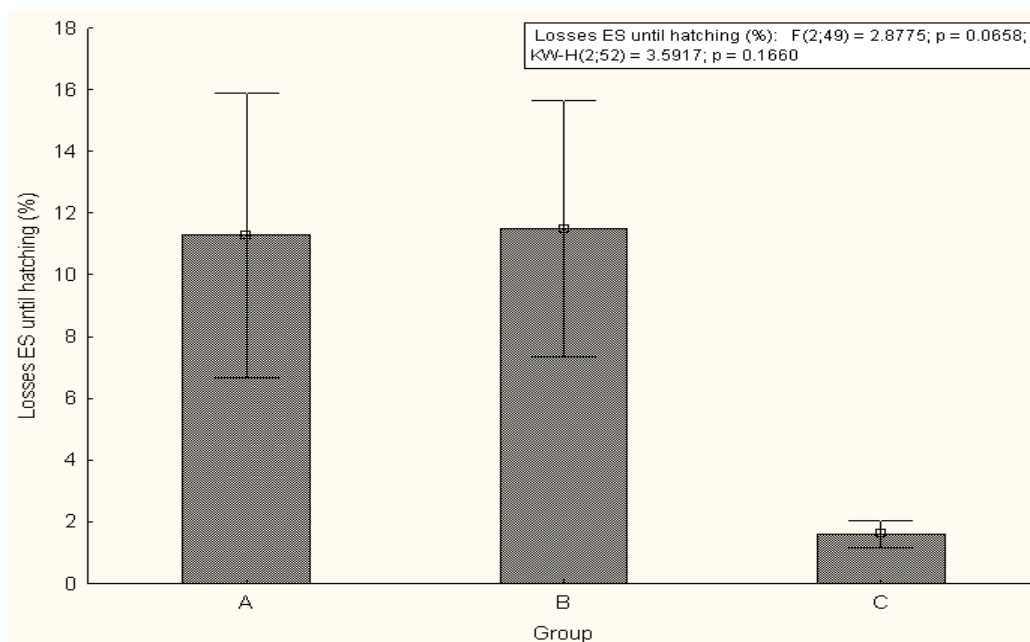
**Graf 9** Závislost ztrát od stádia očných bodů do kuleňí na počtu dní po provedení hormonálního zásahu, kdy daná jikernačka ovulovala.



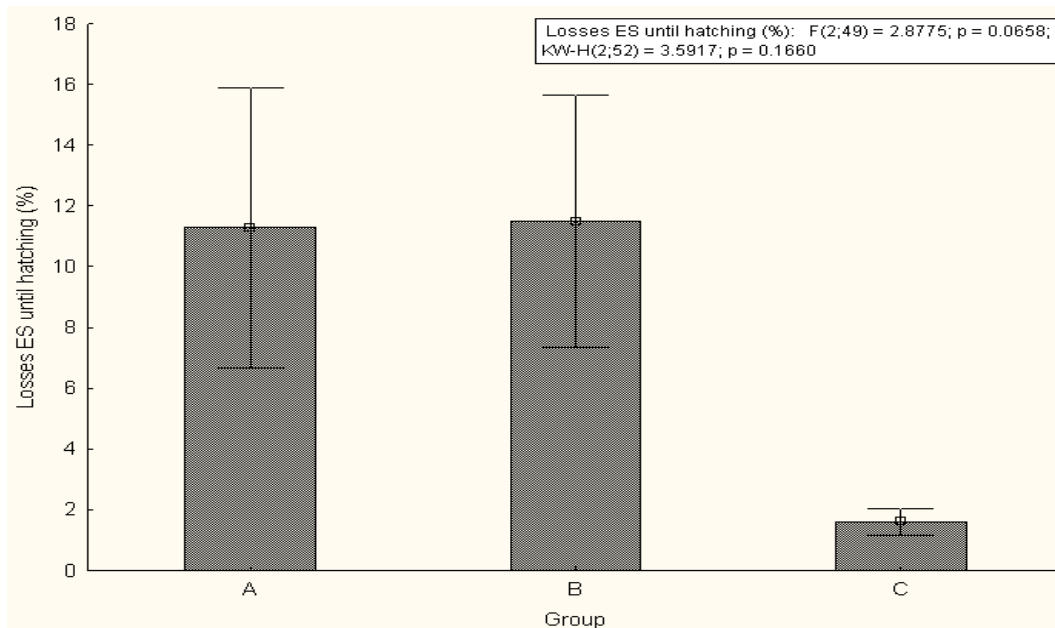
**Graf 10** Závislost líhivosti embryí na počtu dní po provedení hormonálního zásahu, kdy daná jikernačka ovulovala.



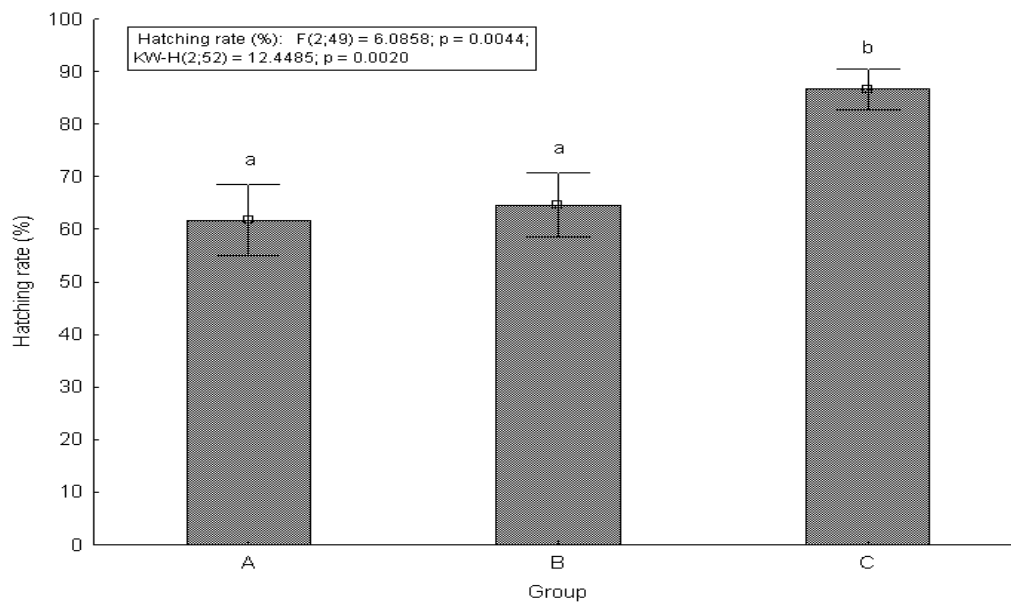
**Graf 11** Rozdíly mezi individuální hmotností jiker mezi jednotlivými skupinami. Rozdílná písmenka značí signifikantní rozdíly mezi skupinami ( $p < 0,05$ ; ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem mnohonásobného porovnávání).



**Graf 12** Rozdíly v přežití jiker do očních bodů mezi jednotlivými skupinami. Rozdílná písmenka značí signifikantní rozdíly mezi skupinami ( $p < 0,05$ ; ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem mnohonásobného porovnávání, Kruskal-Wallis test).

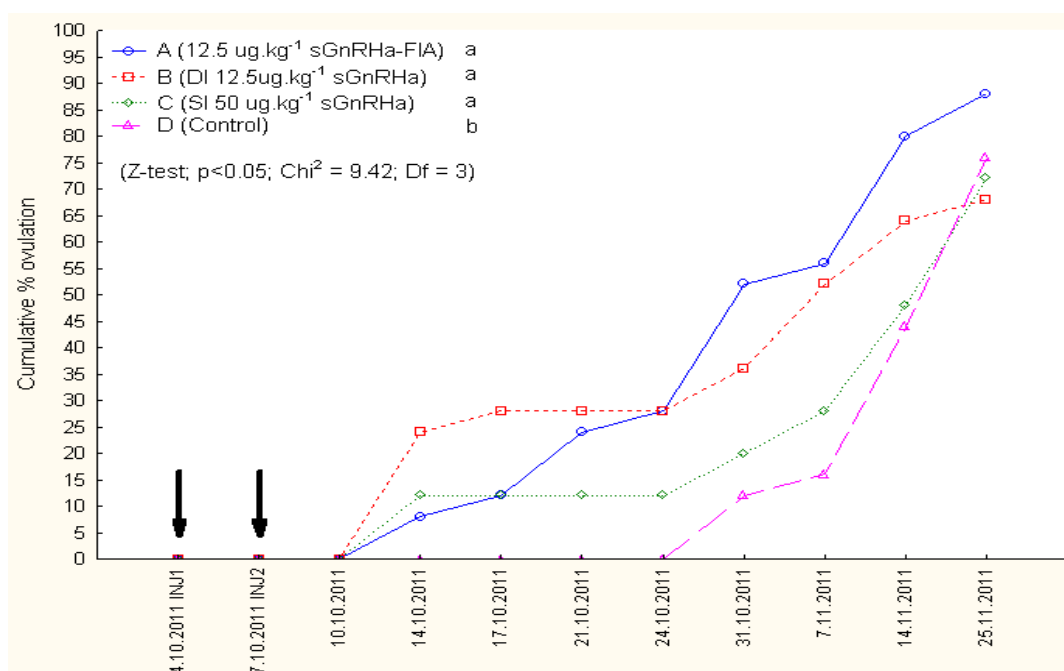


**Graf 13** Mortalita jiker mezi stádium očných bodů a kulením. Rozdíly nejsou signifikantní. Nicméně  $p = 0,066$ , což je pod hranicí indikační hladiny významnosti  $\alpha=0,1$ , což naznačuje vysokou pravděpodobnost rozdílnosti při vyšším počtu pozorování. ( $p < 0,1$ ; ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem mnohonásobného porovnávání).



**Graf 14** Rozdíly v líhivosti mezi jednotlivými skupinami. Rozdílná písmenka značí signifikantní rozdíly mezi skupinami ( $p < 0,01$ ; ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem mnohonásobného porovnávání, Kruskal-Wallis test).

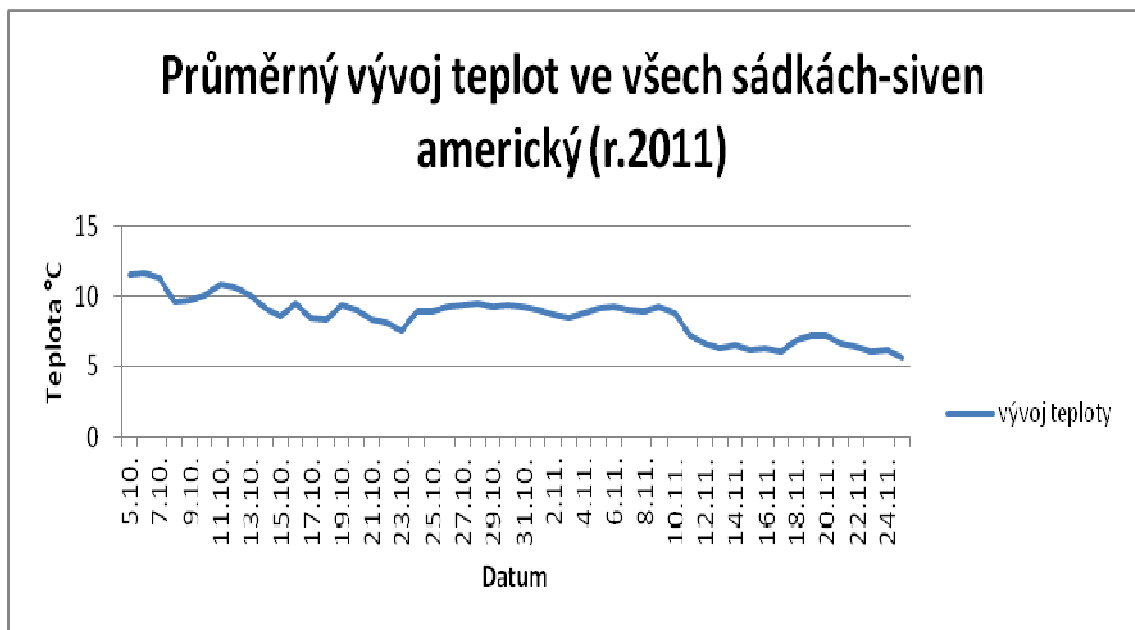
#### 4.5.2. Siven americký



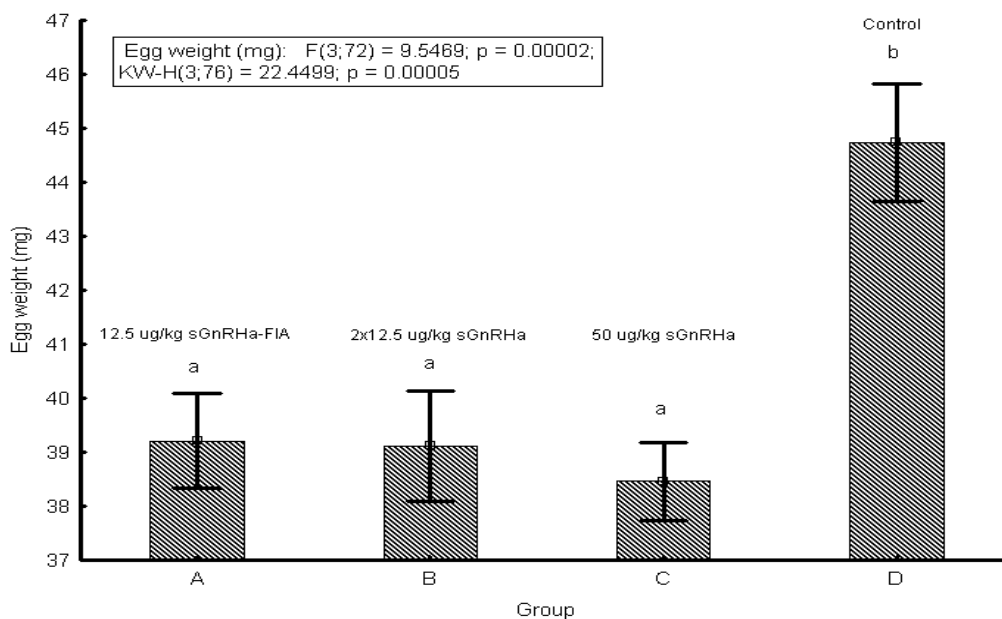
**Graf 15** Průběh ovulace v jednotlivých skupinách vyjádřený v kumulativních četnostech. Šipky představují dny provedení hormonálního zásahu. Rozdílná písmenka značí signifikantní rozdíly mezi skupinami ( $p < 0,01$ , Z-test).

**Tab. 6** znázorňuje časový průběh ovulace z grafu 15 a procenta vytřených ryb k jednotlivým dnům ve skupinách A-D a také samostatně výtěr ve skupině E. Stejná procentuální hodnota značí pozastavení výtěru.

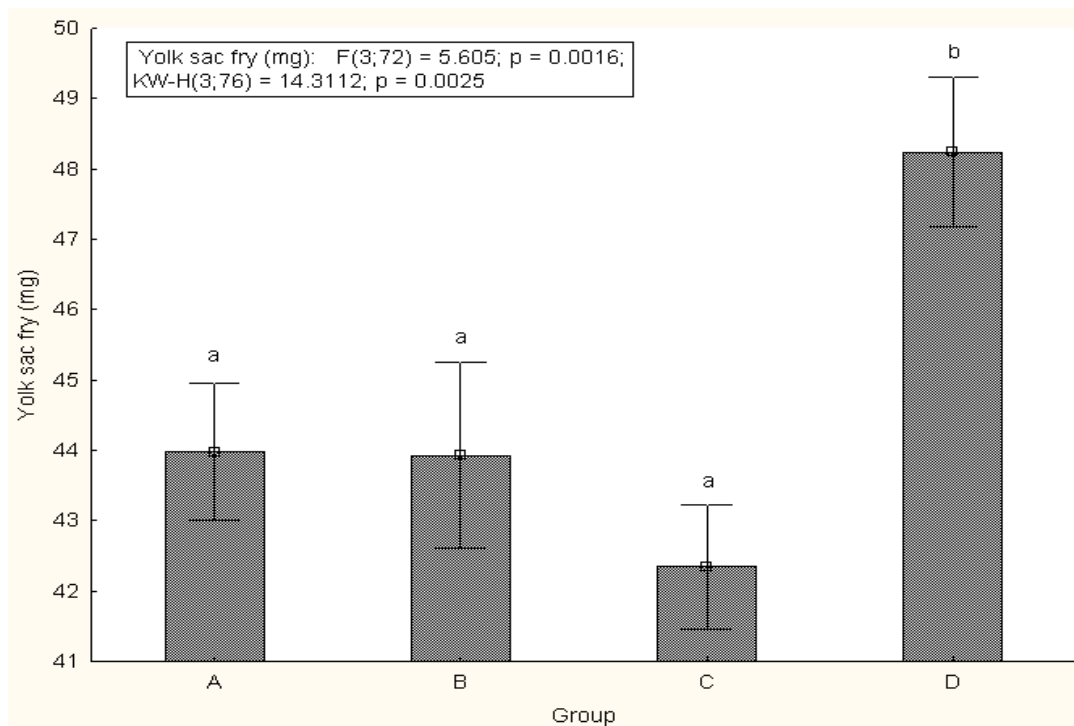
Skupiny					
Dny	A	B	C	Dny	D
14.10.	8%	24%	12%	31.10.	12%
17.10.	12%	28%	12%	7.11.	15%
21.10.	23%	27%	12%	14.11.	45%
24.10.	27%	27%	12%	25.11.	75%
31.10.	50%	35%	20%		
7.11.	56%	52%	28%		
14.11.	80%	65%	48%		
25.11.	90%		75%		



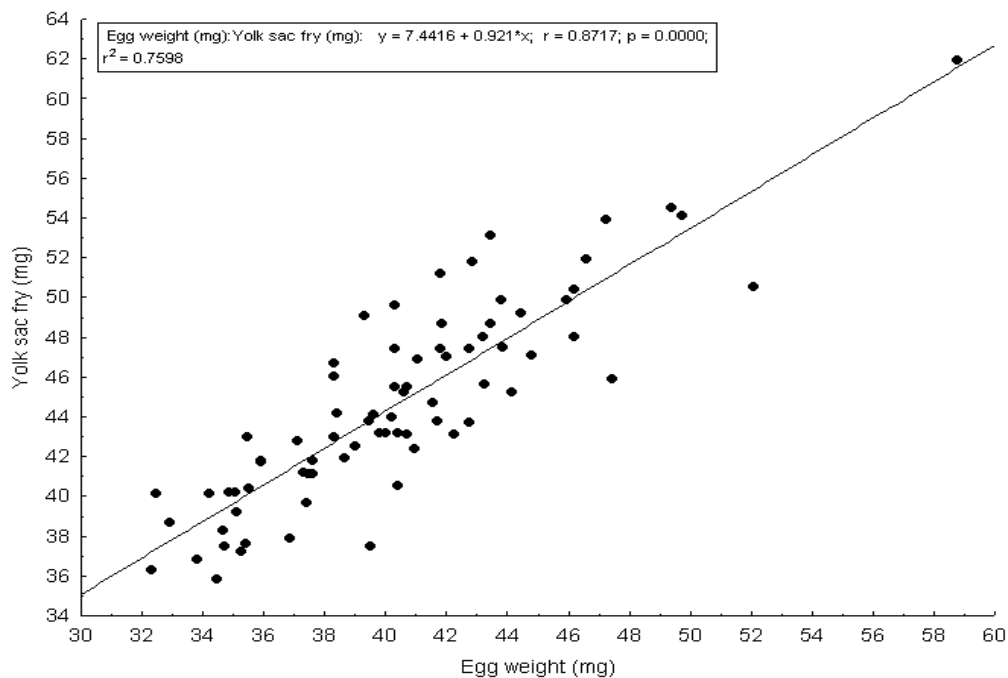
**Graf 16** Průměrný vývoj teplot ve všech sádkách-sivenamerický (r.2011)



**Graf 17** Rozdíly mezi individuální hmotností jiker mezi jednotlivými skupinami. Rozdílná písmenka značí signifikantní rozdíly mezi skupinami ( $p < 0,01$ ; ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem mnohonásobného porovnávání).

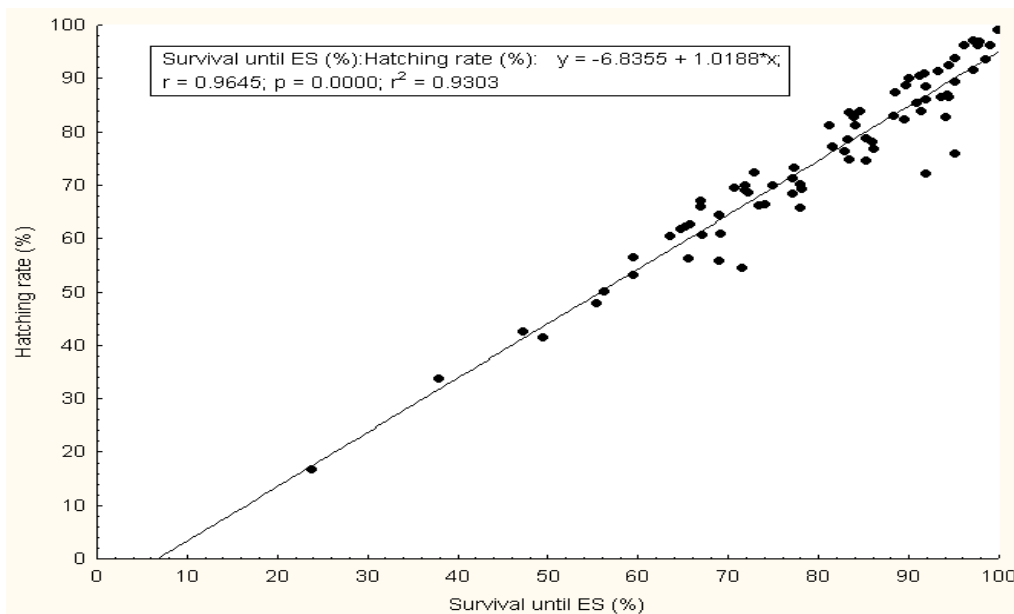


**Graf 18** Rozdíly mezi individuální hmotností váčkového plůdku mezi jednotlivými skupinami. Rozdílná písmenka značí signifikantní rozdíly mezi skupinami ( $p < 0,01$ ; ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem mnohonásobného porovnávání).

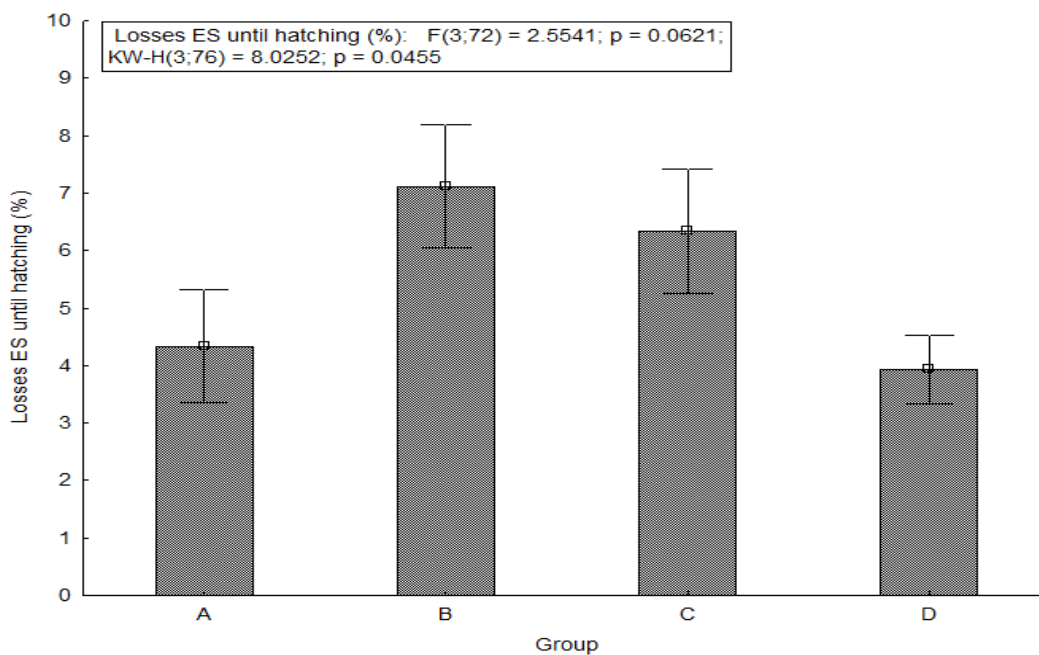


**Graf 19** Závislost hmotnosti žlutkového váčku na hmotnosti jiker (ihned po vytření, před oplozením)





**Graf 20** Závislost líhnivosti embryí na přežití do očních bodů.



**Graf 21** Rozdíly mezi ztrátami jiker mezi stádiem očních bodů a kulením. Rozdíly nejsou signifikantní. Nicméně  $p = 0,0621$ , což je pod hranicí indikační hladiny významnosti  $\alpha=0,1$ , což naznačuje vysokou pravděpodobnost rozdílnosti při vyšším počtu pozorování. ( $p < 0,1$ ; ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem mnohonásobného porovnávání).

## 5. DISKUZE

### 5.1. Synchronizace ovulace

Ve všech třech experimentech (u pstruha duhového i sivena amerického), u všech skupin injikovaných sGnRHa [D-Arg<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>,NET]-sGnRH] ovulovaly jikernačky dříve než v kontrolních skupinách. To znamená, že provedené hormonální zásahy byly načasovány s dostatečným předstihem, ještě před dosažením spontánní ovulace jikernaček. Nejlepšího výsledku v obou výtěrových sezónách bylo dosaženo při použití dvojitě dávky sGnRHa 25+25  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Jikernačky ovulovaly a byly uměle vytřeny v průběhu dvou za sebou následujících kontrol v intervalu 3 dnů. Současně byl v obou letech prokázán pozitivní vliv působení adjuvancia na vyvolání ovulace jikernaček. Oba uvedené postupy indukce a synchronizace ovulace byy účinnější, než další testované (jednorázové dávky bez adjuvancia). Námi dosažené výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými výsledky u pstruha duhového (Arabaci a kol. 2004, Vazirzadeh a kol. 2008).

U pstruha duhového bylo dosaženo nejlepších výsledků při aplikaci vyšší dávky (100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) v kombinaci s Freundovým inkompletním adjuvanciem. Dynamika nástupu ovulace měla nejstrmější průběh ve skupině A i přesto, že celkově bylo zaznamenáno vyšší procento vytřených ryb ve skupině B při prvních ovulacích 7.3.2011. Potvrdilo se tvrzení Bretona a kol., 1990, kteří přišli se závěrem, že pro pstruha duhového je vhodnější využít raději hormonálního přípravku s protražovaným působením, vzhledem k tomu, že jikernačky pstruha duhového mají jednak dlouhé výtěrové období a také proto, že dosahují vyšší kusové hmotnosti, než jikernačky sivena amerického.

Jednorázová akutní dávka (tzn. bez Freundova adjuvancia) nebyla příliš účinná. To se projevilo hlavně v roce 2011, kdy došlo u sivena amerického i u pstruha duhového k pozastavení ovulace ve více skupinách. Toto bylo zaznamenáno častěji než v předcházejícím roce. Pravděpodobně za to jsou zodpovědné příliš nízké dávky hormonálních přípravků a teplota vody. Pokud by jednorázová dávka pouze sGnRHa poskytla požadovanou indukci a synchronizaci ovulace, nebylo by potřeba používat přípravky s pozvolným uvolňováním GnRHa, a tím by se podařilo minimalizovat náklady. Nicméně Arabaci a kol., 2004; Mikolajczyk a kol. 2005; Švinger a kol 2010; Noori a kol. 2010 potvrzují špatné výsledky s použitím jednorázové dávky

hormonálního přípravku. Toto selhání u některých jedinců může být kvůli rychlému odplavení a enzymatické degradace účinného GnRHa z krevního oběhu (Zohar a kol. 1990b), což vede k nedostatku LH v ovariální plazmě (Breton a kol., 1990).

V našem druhém pokusu se sivenem jsme se snažili snížit dávky hormonů za účelem minimalizace ceny hormonálních zásahů, výsledek však nebyl uspokojivý, protože průběh ovulací byl velmi pozvolný. To je však v rozporu s Tarangerem a kol. (1992), kteří uvádějí, že pouze  $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$  GnRHa byl účinný u lososa obecného (*Salmo salar*) je-li aplikován ve správný čas. Podobné výsledky potvrzují i jiní autoři Crim a Glebe (1984); Crim a kol. (1986) a Fitzpatrick a kol. (1984).

## 5.2. Teplota

V našem experimentu z roku 2010, byly jikernačky sivena amerického injikovány hormonálními přípravky přibližně 4 týdny před začátkem ovulace při teplotě vody  $9 - 9.5 \text{ }^\circ\text{C}$ , což je přibližně  $3,5 - 4,0 \text{ }^\circ\text{C}$  výše, než teplota, při které se u nás siveni američtí běžně spontánně ovulují. Podobné teploty byly u sivena amerického zaznamenány i následujícího roku (2011), kdy se teplota vody pohybovala od 23.10. až do 10.11. těsně pod hranicí  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ . Stejný fenomén byl pozorován i u pstruha duhového na jaře, ale v menší míře. Toto pravděpodobně mělo výrazný vliv na průběh ovulace, syntézu LH, FSH a dalších látek a i na další faktory. Gillet a kol. (1996); Gillet a Breton (2009) prokázali, že zvýšená teplota má negativní vliv na sekreci LH tím, že při zvýšené teplotě dochází k vyšší sekreci inhibičního dopaminu a sekrece LH se postupně snižuje.

## 5.3. Kvalita jiker

Rozdílné hodnoty v přežití jiker do stádia očních bodů u jikernaček, které byly injikovány GnRHa mohou být vysvětleny přítomností 0jiker v různém stupni zralosti ještě před aplikací hormonů, nebo různou mírou imunitní odpovědi organismu ryb na hormonální zásah (různá hladina plazmatického GtH II po injikaci) (Fitzpatrick a kol., 1984, Crim a Glebe 1984). V roce 2010 bylo procento jiker ve stádiu očních bodů nízké u všech skupin. Toto bylo pravděpodobně způsobeno nízkým věkem použitých jikernaček (Kallert 2009). Další vliv měly extrémně vysoké pozdní letní teploty vody ( $19-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Vysoká teplota během vitellogeneze u lososovitých může mít za následek sníženou kvalitu jiker v následujícím výtěrovém období (Gillet 1991; Taranger a Hansen, 1993; Pankhurst a kol. 1996).

## 6. ZÁVĚR

Podstatou našich experimentů bylo ověření možnosti dosáhnout při injekčním podání hormonů dřívější a synchronizované ovulace jikernaček. Dosavadní obvyklý postup, založený na opakovaném, každotýdenním přebírání generačních ryb po dobu 1-2 měsíců (podle druhu ryb) a selektování ovulujících jikernaček znamená značnou spotřebu lidské práce, stresování a riziko poškození generačních ryb. Při použití metody hormonální stimulace lososovitých ryb je možno tyto zažité postupy nahradit menším počtem manipulací s generačními rybami a možností realizace plánovaného termínu umělého výtěru (podobně jako u jiných, např. kaprovitých druhů ryb, sumce apod.). Výsledky pokusů s lososovitými rybami rozšiřují druhové spektrum ryb, jež jsou předmětem hormonálně řízeného umělého výtěru, podobně jako je tomu již několik desítek let u kapra, amura, tolstolobiků, lína, sumce a v poslední době i dalších (druhů, jako jsou třeba reofilní kaprovité ryby, ale i candát, okoun a další. Bylo ověřeno, že hormonální stimulace ryb přispěje ke snížení pracnosti, lepší organizaci práce a lepšímu využití kapacit rybích líhní. To by mělo přispět ke zvýšení konkurenceschopnosti českého chovu lososovitých ryb.

## 7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Aas, G.H., Refstie, T., Gjerde, B., 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture* 95, 125–132.
- 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.
- Alderdice, D. F., 1988. Osmotic and ionic regulation in teleost eggs and larvae. In *Fish Physiology*, vol. 11a (ed. W. S. Hoar and D. J. Randall), pp. 163–251. New York: Academic Press. *Aquaculture* 273, 748–751.
- Arabaci M., Diler I., Sari M. 2004. Induction and synchronization of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified busserelin (GnRHa) and its effects on egg quality. *Aquaculture* 237:475–484.
- Billard, R. 1983. Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the fertilizing ability of spermatozoa in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Reprod. Fert.* 68: 77–84.
- Billard, R., 1992. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture* 100, 263–298.
- Bouck, G.R., Jacobson, J., 1976. Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique. *Transactions of the American Fisheries Society* 105, 534–535.
- Breton, B., Weil, C., Sambroni, E., Zohar, Y., 1990. Effects of acute versus sustained administration of GnRHa on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 91: 373-383.
- Bromage, N., R., Cumarantunga, R., 1988. Egg production in the rainbow trout. In: Muir, J. F., Roberts, R. J. (eds.), *Recent Advances in Aquaculture*. Croom Helm/Timber Press, London, pp. 63–138.
- Bromage, N., Randall, C., Davies, B., and McAndrew, B., 1992. The control of reproduction in salmonid fish. *ICEL. AGR. SCI.* 6: 11–23.
- Bromage, N.R., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J. and Barker, G. Egg quality in fish (1992). Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100, 141±166.
- Cieresko, A., Dabrowski, K., 1994. Relationship between biochemical constituents of fish semen and fertility: the effect of short-term storage. *Fish Physiology and Biochemistry Controlled Release of Bioactive Materials* 17:51–52.
- Crim L.W., Glebe B.D. 1984. Advancement and synchrony of ovulation in Atlantic salmon with pelleted LH RH analog. *Aquaculture* 43:47–56.
- Crim L.W., Glebe B.D., Scott A.P. 1986. The influence of LHRH analog on oocyte development and spawning in female Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 56:139–149.

- Crim, L., W., Glebe, B., D., 1990. Reproduction. In: C. B. Schreck and P. B. Moyle, (eds.). *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA, pp. 529—553.
- Crim, L.W. and Bettles, S., 1997. Use of GnRH analogues in fish culture. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. and Thompson, M.F. (eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology*, Vol. 1: Endocrinology and Reproduction. Oxford& IBH Publishing Co., New Delhi, pp. 369—382.
- De Leeuw, R., Habibi, H.R., Nahorniak, C.S., Peter R.E., 1989. Dopaminergic regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor activity in the goldfish (*Carassius auratus*). *J. Endocrinol.* 121: 239–247.
- Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Słowińska, M., Dobosz, S., Kuźmiński, H., Ciereszko, A., 2007. Broken eggs decrease pH of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovarian fluid. *Aquaculture* 273, 748–751.
- Donaldson, E. M., Hunter, G. A. and Dye, H. M. 1981a. Induced ovulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). II. Preliminary study of the use of LH-RH and two high potency LH-RH analogues. *Aquaculture* 26: 129—141.
- Donaldson, E. M., Hunter, G. A., and Dye, H. M., 1981b. Induced ovulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). III. Preliminary study on the use of the antiestrogen tamoxifen. *Aquaculture* 26: 143—154.
- Donaldson, E., M., Hunter, G., A., 1983. Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fishes. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, Orlando, FL, pp. 351—403.
- Donaldson, E., M., 1996. Manipulation of reproduction in farmed fish. *Animal Reproduction Science* 42: 381—392.
- Elliot, J., Bromage, N. R., Springate, J., 1984. Changes in reproductive function of three strains of rainbow trout exposed to constant and seasonally-changing light cycles. *Aquaculture* 43: 23—34.
- Ferenčík M.: *Imunochémia* (2. přepracované vydání), nakladatelství Alfa, Bratislava 1989.
- Fitzpatrick M.S., Suzumoto B.K., Schreck C.B., Oberbillig D., 1984. Luteinizing hormone releasing hormone analogue induces precocious ovulation in adult coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 43:67–73.
- Flies, D. B., Chen, L., 2003. A simple and rapid vortex method for preparing antigen/adjuvant emulsions for immunization. *J. Immunol. Methods* 276: 239—242.
- Gillet, C., 1991. Egg production in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) broodstock: effects of temperature on the timing of spawning and the quality of eggs. *Aquat. Living Res.* 4: 109—116.
- Gillet C., Breton B., Mikolajczyk T., 1996. Effects of GnRH $\alpha$  and pimozone treatments on the timing of ovulation and on egg quality in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) at 5 and 10°C. *Aquat. Liv. Resour.* 9:257–263.
- Gillet C., Breton B. 2009. LH secretion and ovulation following exposure of Arctic charr to different temperature and photoperiod regimes: Responsiveness of females to a

- gonadotropin-releasing hormone analogue and a dopamine antagonist. *Gen. Comp. Endocr.* 162:210–218.
- Goren A., Zohar Y., Fridkin, M., Elhanati E., Koch Y. 1990. Degradation of gonadotropin releasing hormones in the gilthead seabream, *Sparus aurata*. I. cleavage of native salmon GnRH and mammalian LHRH in the Pituitary. *Gen. Comp. Endocr.* 79:291–305.
- Gothilf, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Sagrillo, C.A., Selmanoff, M., Chen, T.T., Kah, O., Elizur, A. and Zohar, Y. 1996. Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): Complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. *Biol. Reprod.* 55, 636–645.
- Haffray P., Enright W. J., Driancourt M. A, Mikolajczyk T., Rault P., Breton, B., 2005. Optimisation of breeding of Salmonids: Gonazon®, the first officially approved inducer of ovulation in the EU, *World Aquaculture Magazine*, pp. 52-56.
- Holland, M.C., Hassin, S., and Zohar, Y., 2000a. Gonadal development and plasma steroid levels during pubertal development in captive-reared striped bass, *Morone saxatilis*. *J. Exp. Zool.* 286,49–63.
- Hoysak, D.J., Liley, N.R., 2000. Fertilization dynamics in sockeye salmon and a comparison of sperm from alternative male phenotypes. *Journal of Fish Biology* 58, 1286– 1300.
- Hunter, G. A., Donaldson, E., M., Stone, E., T., and Dye, H., M., 1978. Induced ovulation of female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) at production Hatchery. *Aquaculture*, 15: 99—112.
- Ingermann, R.L., Bencic, D.C., Cloud, J.G., 2002. Low seminal plasma buffering capacity corresponds to high pH sensitivity of sperm motility in salmonids. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 299–307.
- King, H. R., Pankhurst, N. W., 2000. Ovulation of Tasmanian Atlantic salmon maintained at elevated temperatures: implications of climate change for sustainable industry development. In: Norberg, B., Kjesbu, O. S., Taranger, G. L., Andersson, E., Stefansson, S. O. (Eds.). *Proceedings of the Sixth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, John Greig, Bergen: pp. 396—398.
- King, H. R., Pankhurst, N. W., Watts, M., Pankhurst, P. M., 2003. Effect of elevated summer temperatures on gonadal steroid production, vitellogenesis and egg quality in female Atlantic salmon. *J. Fish Biol.* 63: 154—167.
- Kobayashi, M., Amano, M., Kim, M. H., Yoshiura, Y., Sohn, Y. C., Suetake, H. and Aida, K., 1997. Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin in goldfish and masu salmon in Lake Shikotsu. *Zool. Sci.* 15: 767—771.
- Kouřil, J., Hamáčková, J., Barth, T., 1997. Hormonální indukce umělého výtěru jikernaček některých druhů ryb. *Edice metodik VÚRH Vodňany*, č. 54 : 5 s.
- Kouřil, J., Hamáčková, J., Hulová, I., Barthová, J., 1999. Hormonální indukce ovulace u kapra pomocí čištěného extraktu kapří hypofýzy. *Edice metodik VÚRH Vodňany*, č. 61 : 4 s.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., Patzner, R.A., 1998. Determination of semen quality of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture* 163, 163– 181.

- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R.A., 1999a. Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 375–388.
- Lahnsteiner, F., 2002. The influence of ovarian fluid on the gamete physiology in the *Salmonidae*. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 49–59.
- Lahnsteiner, F., Patzner, R.A., 2002. Rainbow trout egg quality determination by the relative weight increase during hardening, a practical standardization. *J. Appl. Ichthyol.* 18, 24–26.
- Levavi-Sivan, B., H., Safrian, H., Rosenfeld et al. 2004. Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-receptor gene expression in tilapia: effect of GnRH and dopamine. *Biol. Reprod.* 70: 1545–1551.
- Lillehaug, A., Lunder T., Poppe T.T., 1992. Field testing of adjuvanted furunculosis vaccines in Atlantic salmon, *Salmo salar L.* *J Fish Dis* 15:485–496.
- Lin, H.R., G. Van Der Kraak, J.Y. Liang, C. Peng, G.Y. Li, L.Z. Lin, X.J. Zhong, M.L. Chang and R.E. Peter, 1986a. The effects of LHRH analogue and drugs which block the effects of dopamine on gonadotropin secretion and ovulation in fish cultured in China. In: *Aquaculture of cyprinids* (eds. R. Billard and J. Marcel), pp.139-150. INRA Press, Paris.
- Linard, B., S. Bennani & C. Saligaut, 1995. Involvement of estradiol in a catecholamine inhibitory tone of gonadotropin release in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 99: 192–196.
- Linhart O., Rodina M., Flajšhans M., Mavrodiev N., Nebesarová J., Gela D. & Kocour M. 2006: Studies on sperm of diploid and triploid tench, *Tinca tinca*. *Aquaculture International* 14 (1-2): 9-25.
- Linhart, O., 1985. Použití oplozovacích roztoků při výtěru ryb. *Edice metodik VÚRH Vodňany*, č.17: (Placeholder1), č.17:13 s.
- MacColl, G., Quinton, R., and Bouloux, P. M. G. 2002. GnRH neuronal development: Insights into hypogonadotropic hypogonadism. *Trends Endocrinol. Metab.* 13:112–118.
- Mason, A. J., Hayflick, J. S., Zoeller, R. T., Young, W. S., III, Phillips, H. S., Nikolics, K., and Seeburg, P. H. 1986. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* 234:1366–1371.
- Mikolajczyk T., Kuźmiński H., Dobosz S., Goryczko K., Enright W. J. 2005. The effects of Gonazon™, a commercially available GnRH analogue, on induction of ovulation and egg quality in cultured European whitefish (*Coregonus laveratus L.*). *Adv. Limnol.* 60:187–194.
- Moberg, G.P., Watson, J.G., Doroshov, S., Papkoff, H. and Pavlick, R.J., Jr., 1995. Physiological evidence for two sturgeon gonadotropins in *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture* 135, 27–39.
- Moccia, R.D., Munkittrick, K.R., 1987. Relationship between the fertilization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and the motility of spermatozoa. *Theriogenology* 27, 679–688.



- Mylonas, C.C., Tabata, Y., Langer, R. and Zohar, Y., 1995. Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone (GnRH), for inducing ovulation and spermiation in fish. *J. Control. Release* 35: 23—34.
- Mylonas, C.C. and Zohar, Y., 1997. New technologies for the control of gamete maturation in marine fishes, as tools in broodstock management. In: Bartley, D.M., Basurco, B. (eds.), Seminar of the CIHEAM Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean (TECAM). Zaragoza (Spain), pp. 193—213.
- Mylonas C.C. and Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev Fish Biol Fisher* 10:463—491.
- Mylonas, C. C. and Zohar, Y., 2007. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin, J. P., Cerda, J., Lubzens, E., (editors), *The Fish Oocyte*. Springer, The Netherlands, pp. 437—474.
- Mylonas, C., C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 165: 516—534.
- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tanaka, M., 1994. Regulation of oocyte maturation in fish. In: Farrel, A. P. and Randall, D. J. (eds.). *Fish Physiology, Volume XIII, Molecular Endocrinology of Fish*, San Diego, California: pp. 393—439.
- Nomura, M., Sakai, K., Takashima, F., 1974. The over-ripening phenom of rainbow trout. II. Changes in the percentage of eyedeggs, hatching rate and incidence of abnormal alvelins during the process of over-ripening. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 41: 855—860.
- Noori A., Amiri B.M., Mirvaghefi A., Baker D.W. 2010. LHRHa-induced ovulation of the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) and its effect on egg quality and two sex steroids: testosterone and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone. *Aquac Res* 41:871—877.
- Ohta, H., Tanaka, H., 1997. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 153: 123—134.
- Pankhurst, N. W., Carragher, J. F., 1991. Seasonal endocrine cycles in marine teleosts. In: Scott, A. P., Sumpter, J. P., Kime, D. E., Rolfe, M. S. (eds.). *Reproductive Physiology of Fish*, Fish. Symp. 91, Sheffield: pp. 131—135.
- Pankhurst, N. W., Purser, G. J., Van Der Kraak, G., Thomas, P. M., Forreath, G. N. R., 1996. Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovaria steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 146: 277—290.
- Pankhurst, N. W., Thomas, P. M., 1998. Maintenance at elevated temperature delays the steroidogenic and ovulatory responsiveness of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to luteinizing hormone releasing hormone analogue. *Aquaculture* 166: 166—177.
- Peter, R.E., C.R. Paulencu. 1980. Involvement of the preoptic region in the gonadotropin release-inhibition in the goldfish. *Neuroendocrinology* 31: 133—141.

- Peter, R. E., Chang, J. P., Nahorniak, C. S., Omeljanuik, R. J., Sokolovska, M., Shih, S. H., and Billard, P., 1986. Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. *Rec. Prog. Hormone Res.* 42: 513—548.
- Peter, R.E., H.R., Lin and G. Van Der Kraak. 1988a. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: Advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonist. *Aquaculture* 74:1-10.
- Peter, R.E. and Yu, K.L. (1997): Neuroendocrine regulation of ovulation in fish: Basic and applied aspects. *Rev. Fish Biol. Fish.* 7: 173—197.
- Poppe, T.T., Breck O. 1997. Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil adjuvanted vaccine. A case report. *Dis Aquat Org* 29:219–226.
- Press, C.M., Lillehaug, A., 1995. Vaccination in European salmonid aquaculture: a review of practices and prospects. *Brit. Vet. J.* 151:45–69.
- Rainis, S., Ballestrazzi, R., 2005. The control of reproduction in finfish species through GnRH treatments. *Ital. J. Anim. Sci.* 4: 345—353.
- Roa J, Tena-Sempere M., 2007. KiSS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2007;153:132–140.
- Saligaut, C., B. Linard., B. Breton et al. 1999. Brain aminergic systems in salmonids and other teleosts in relation to steroid feedback and gonadotropin release. *Aquaculture* 177: 13–20.
- Sato, N., Kawazoe, I., Suzuki, Y., Aida, K., 1997. Development of an emulsion prepared with lipophilized gelatin and its application for hormone administration in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish Physiology and Biochemistry* 17: 171—178.
- Scott, A. P., Canario, A. V. M. 1987. Status of oocyte maturation-inducing steroids in teleosts. In: Idler, D. R., Crim, L. W., Walsh, J. M. (eds.). *Reproductive Physiology of Fish*, Memorial University of Newfoundland, St. Johns: pp. 224—234.
- Senthilkumaran, B., K.P., Joy, 1995. Changes in hypothalamic catecholamines, dopamine-beta-hydroxylase, and phenylethanolamine-N-transferase in the catfish *Heteropneustes fossilis* in relation to season, raised photoperiod, and temperature, ovariectomy, and estradiol-17-beta replacement. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97: 121–134.
- Simpson, E. R. , Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C., Michael, M. D., Mendelson, C. R., Bulun, S. E., 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* 15: 342—355.
- Singh, M., O'Hagan D., 1999. Advances in vaccine adjuvants. *Nat. Biotechnol.* 17 (11):1075–81.
- Slater, C., Schreck, C.B., Swanson, P., 1994. Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) *Comp. Biochem. Physiol. A*, 109 (1994), p. 167–175.
- Sower, S. A., Schreck, C. B., and Donaldson, E. M., 1982. Hormone-induced Ovulation of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Held in Seawater and Fresh Water. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 627—632.

- Sower, S. A., Iwamoto, R.N., Dickhoff, W.W., and Gorbman A., 1984. Ovulatory and steroidal responses in coho salmon and steelhead trout following administration of salmon gonadotropin and D-Ala<sup>6</sup>, des Gly<sup>10</sup> gonadotropin-releasing hormone ethylamide (GnRHa). *Aquaculture* 43: 35—46.
- Specker, J. L. and Sullivan, C. V., 1994. Vitellogenesis in fishes: Status and perspectives. In: Davey, K. G., Peter, E. E., Tobe, S. S. (eds.). *Perspectives in Comparative Endocrinology*, Nat. Res. Council. Can., Ottawa: p. 304—315.
- Svinger V.W., Kouril J., Pavlista, R. 2010. Induced and synchronized ovulation in northern whitefish (*Coregonus peled*) using GnRHa (D-Tle<sup>6</sup>,Pro<sup>9</sup>-NET) Lecirelin in different dosages. In: Abstracts of Aquaculture Europe 2010 Conference, Porto, 5–8 October 2010:1279–1280.
- Taranger, G. L., Hansen, T., 1993. Ovulation and egg survival following exposure of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodstock to different water temperatures. *Aquacult. Fish. Manage.* 24: 151—156.
- Thomas, P., 1994. Hormonal control of final oocyte maturation in scianid fishes. In: Davey, K. G., Peter, R. E., Tobe, S. S. (eds.). *Perspectives in Comparative Endocrinology*, Nat. Res. Council. Can.: pp. 619—625.
- Trippel, E.A., Neilson, J.D., 1992. Fertility and sperm quality of virgin and repeat-spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*) and associated hatching success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 2118–2127.
- Tvedt, H.B., Benfey, T.J., Martin-Robichaud, D.J., Power, J., 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* 194, 191–200.
- Urbach, D., Folstad, I., Rudolfson, G., 2005. Effects of ovarian fluid on sperm velocity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 57, 438–444.
- Vacher, C., E.L. Mananos, B. Breton et al. 2000. Modulation of pituitary dopamine D1 or D2 receptors and secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the annual reproductive cycle of female rainbow trout. *J. Neuroendocrinol.* 12: 1219–1226.
- Van Der Kraak, G., 1983. An introduction of gonadotropin receptor studies in fish. In: Hoar W. S., Randall, D. J. and Donaldson E. M. (eds.). *Fish Physiology*, vol. IX A, Academic Press, New York: pp. 405—441.
- Van Der Kraak, G., Dye, H. M., Donaldson, E. M., 1984. Effects of LH-RH nad des Gly<sup>10</sup>[D-Ala<sup>6</sup>]-LH-RH ethylamide on plasma sex steroid profiles in adult female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinology.* 55: 36–45.
- Van Der Kraak, G., Pankhurst, N.W., Peter, R.E. and Lin, H.R. 1989. Lack of antigenicity of human chorionic gonadotropin in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture* 78: 81—86.
- Vazirzadeh A., Hajimoradloo A., Esmaili HR., Akhlaghi M. 2008. Effects of emulsified versus saline administration of GnRHa on induction of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 280:267–269.

- Vikingstad, E., Andersson, E., Norberg, B., Mayer, I., Klenke, U., Zohar, Y., Stefansson, S. O., Taranger, G. L., 2008. The combined effects of temperature and GnRHa treatment on the final stages of sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish. Physiol. Biochem* 34: 289—298.
- Von Bayer., 1908. A method of measuring fish eggs. *Bulletin of the US Bureau of Fisheries*. 28 (2),1009-1014.
- Watanabe, W.O., Ellis E.P., and M.W., Feeley 1998. Progress in controlled maturation and spawning of summer flounder, *Paralichthys dentatus*, broodstock. *Journal of the World Aquaculture Society* 29(4): 393—404.
- Watts, M., Pankhurst, N. W., King H. R., 2004. Maintenance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) at elevated temperature inhibits cytochrome P450 aromatase activity in isolated ovarian follicles. *General and Comparative Endocrinology* 135: 381—390.
- Whitehead, C., Bromage, N. R., Forster, J., Matty, A. J., 1978. The effects of alterations in photoperiod on ovaria development and spawning time in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 18: 1035—1043.
- Wojtczak, M., Dietrich, G. J., Słowińska, M., Dobosz, S.; Kuzminski, H., Ciereszko, A. 2007. Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Aquaculture* 270, 259–264.
- Yu, K.L., Sherwood, N.M. and Peter, R.E. 1988. Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides* 9: 625–630.
- Zohar, Y., 1988. Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in Teleosts: basic and applied considerations. In: Zohar, Y. and Breton, B. (eds.), *Reproduction in Fish: Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics*. INRA Press, Paris, pp. 47—62.
- Zohar, Y., 1989a. Endocrinology and fish farming: Aspects in reproduction, growth and smoltification. *Fish. Physiol. Biochem.* 7: 395—405.
- Zohar, Y., Pagelson, G., Gothilf, Y., Dickhoff, W.W., Swanson, P., Duguay, S., Gombotz, W., Kost, J. and Langer, R., 1990. Controlled release of gonadotropin releasing hormones for the manipulation of spawning in farmed fish. *Proceedings, International Symposium on Controllable Release and Bioactive Materials* 17, 833±834.
- Zohar, Y., Goren, A., Fridkin, M., Elhanati, E., Koch, Y., 1990a. Degradation of gonadotropin-releasing hormones in the gilthead seabream, *Sparus aurata*. II. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH, and their analogs in the pituitary, kidney, and liver. *General and Comparative Endocrinology* 79: 306—319.
- Zohar Y., Goren A., Fridkin M., Elhanati E., Koch Y. 1990b. Degradation of gonadotropin releasing hormones in the gilthead seabream, *Sparus aurata*. II. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH, and their analogs in the pituitary, kidney, and liver. *Gen. Comp. Endocr.* 79:306–319.
- Zohar, Y., Mylonas C., C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99—136.

## 8. PŘÍLOHY



**Obr. 4** Anestezie jikernačky sivena amerického



**Obr. 5** Vážení ryby



**Obr.6** Umělý výtěr jikernačky sivena amerického



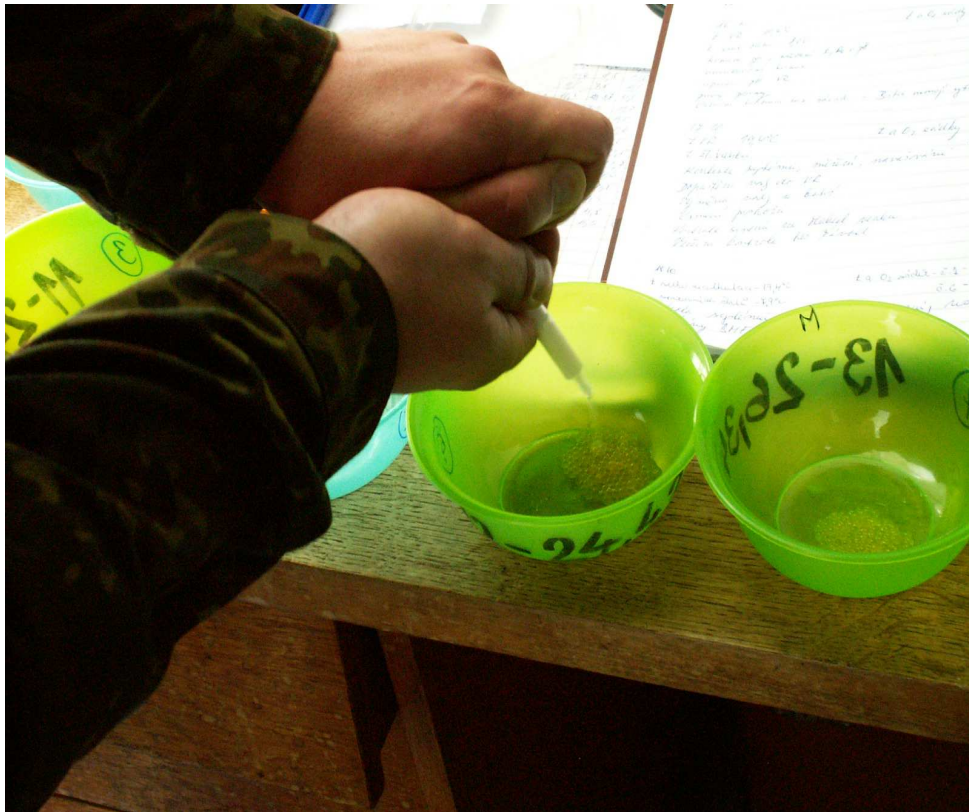
**Obr.7** Značení jikernačky sivena amerického



**Obr.8** Desinfekční koupel



**Obr.9** Odběr spermatu u mlíčáka sivena amerického



**Obr.10** Osemenění jiker mlíčem

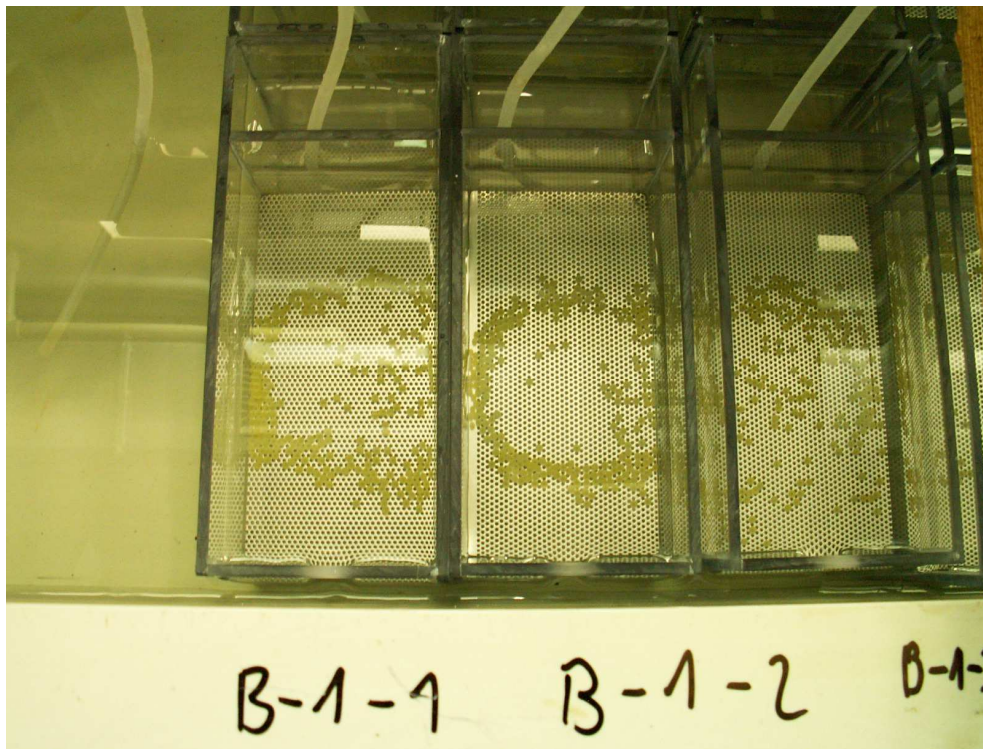


**Obr.11** Oplozování jiker





**Obr.12** Transport oplozených vzorků jiker na inkubační přístroje



**Obr.13** Jikry v inkubačních přístrojích

## 9. ABSTRAKT

Synchronizace ovulace u jikernaček sivena amerického a pstruha duhového

Ve 3 pokusech (2010- siven americký, 2011- siven americký+pstruh duhový) byl zkoumán vliv GnRH analogu na synchronizaci ovulace. Před začátkem nástupu výtěrového období byly jikernačky sivena amerického i pstruha duhového hormonálně stimulovány. V prvním roce (2010) byly jikernačky ve skupinách A a B injikovány intraperitoneální injekcí FIA (Freundovo inkompletní adjuvancium) sGnRHa (sGnRHa-FIA) v dávkách 50 a 25  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti. Ve skupině C byla aplikována dvojitá dávka sGnRHa rozpuštěná ve fyziologickém roztoku (sGnRHa-FR) 25+25  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti jikernačky. Jikernačky ve skupině D dostaly jednorázovou dávku 25  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  sGnRHa-FR. V roce 2011 byly u sivena použity snížené dávky hormonálních přípravků: (A- sGnRH-FIA 12  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; B- sGnRHa-FR 12,5+12,5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; C- sGnRHa-FR 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Mezi dvojitými dávkami hormonálních přípravků byl 3 denní interval. U pstruha duhového byly použity následující jednorázové dávky hormonálních přípravků: A- sGnRHa-FIA v dávce 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; B- sGnRHa-FIA v dávce 25  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Kontrolní skupiny nebyly injikovány. Ryby byly ve 3 denních intervalech po injikaci hormonálních přípravků kontrolovány. Po dosažení ovulace a provedení umělého výtěru byla u vytřených jiker kontrolních skupin naměřena nižší hodnota pH ve srovnání s experimentálními skupinami ( $P < 0,05$ ). Byl zaznamenán negativní vztah mezi průměrnou hmotností jiker a přežitím jiker do stádia očních bodů ( $P < 0,05$ ). V prvním experimentu bylo vytřeno 100% jikernaček. Ve druhém experimentu vzhledem k předvýtěrové mortalitě nedošlo k výtěru části injikovaných jikernaček. U experimentálních skupin ovulovaly jikernačky průměrně o 1-2 týdny dříve než u kontrolních skupin. Přežití embryí do stádia očních bodů bylo vyšší u experimentálních skupin v porovnání s kontrolou. V roce 2010 nebyla zaznamenána žádná předvýtěrová ani povýtěrová mortalita jikernaček během 6 měsíců. V roce 2011 byla u sivena amerického povýtěrová mortalita vyšší: Ve skupinách A, B, C a kontrole D uhynulo 3, 8, 7 a 6 ks jikernaček. Jikernaček pstruha duhového uhynulo v kontrole C 6 ks, ve skupinách A a B 3 a 4 ks. Ukázalo se, že jednorázová dávka sGnRHa-FIA má srovnatelnou účinnost jako dvojitá dávka. Nejlepších výsledků u sivena amerického se dosáhlo při použití dvojitě dávky sGnRHa 25+25  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . U pstruha duhového působila neúčinněji dávka sGnRHa-FIA 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

## 10. ABSTRACT

### Synchronization of Ovulation in Females of Brook Charr and Rainbow Trout

The effect of GnRH analogue on synchronizing ovulation in the female brook charr and rainbow trout was assessed in 3 experiments (2010- brook charr, 2011-brook charr+rainbow trout). Prior to the onset of the spawning season females of brook charr and rainbow trout were hormonally stimulated. In 2010, groups A and B were injected with intraperitoneal injection of FIA (Freund's incomplete adjuvant)- sGnRHa (sGnRHa-FIA). Doses were 50 and 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  body weight (BW). A double injection (DI) of PS-dissolved sGnRHa (sGnRHa-PS) at 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  BW was used in group C. Fish in group D received a 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  BW single injection (SI) of sGnRHa-PS.

In 2011, were doses of hormonal treatments for brook charr reduced: (A- sGnRH-FIA 12  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; B- sGnRHa-PS 12,5+12,5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; C- sGnRHa-PS 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Between double dose application was 3 days interval. In case of rainbow trout single injections (SI) were used: A- sGnRHa-FIA 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; B- sGnRHa-FIA 25  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Control groups were not injected. The maturation of fish eggs was controlled in 3 days interval after application of hormonal treatment. Lower ovarian fluid pH value was measured in control groups in comparison with GnRHa treated groups ( $P < 0.05$ ). A negative relationship was found between average egg weight end eyed eggs percent ( $P < 0.05$ ). In the first experiment spawned 100 % fish. In the second experiment spawned only part of the fish due to prespawning mortality. In the GnRH treated groups ovulation came in average 1-2 weeks earlier compare to control groups. The survival to eyed stage was significantly higher in GnRHa treated groups compared to the control groups. No prespawning or postspawning broodstock mortality during 6 months was observed in 2010. The postspawning broodstock mortality of brook charr was higher in 2011: In groups A, B, C and control group D died 3, 8, 7 and 6 fish. 6 females of rainbow trout died in group C, in groups A and B 3 and 4. The sGnRHa-FIA injections proved to exhibit the same efficacy as the DI doses with sGnRHa-PS. The best result in brook charr experiments was achieved with double injection (DI) of sGnRHa 25+25  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . The best result in rainbow trout experiment was achieved with single injection of sGnRHa-FIA 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .