Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Ústav akvakultury

Bakalářská práce

Vliv hormonálního preparátu na úspěšnost indukovaného umělého výtěru piskoře pruhovaného *Misgurnus fossilis*

Autor: Jakub Žák

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Bořek Drozd, PhD.

Konzultant: Ing. Radek Gebauer

Studijní program a obor: B4103 Zootechnika (bakalářské), Rybářství

Forma studia: Kombinovaná

Ročník: 3

České Budějovice

2015

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: .....

Jakub Žák

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval vedoucímu této práce RNDr. Bořkovi Drozdovi, PhD. za skvělé a přátelské vedení, trpělivost se mnou a podnětné rady, které byly využity v rámci této práce. Můj velký dík patří i technickým pracovníkům pečujícím zejména o recirkulační systém v Českých Budějovicích. Jmenovitě Ing. Pavlu Šablaturovi a Ing. Michalu Gučíkovi za vždy ochotnou pomoc v průběhu praktické části práce. na tomto místě bych rád poděkoval i Bc. Martinu Chytrému, který ochotně spolupracoval během experimentální části této práce a pořídil a následně mi poskytl skvělé fotografie. Mimo jiné je i autorem fotografie na titulní straně této práce. Děkuji i ochotné Mgr. Barboře Cvrkvové-Dobiášové za poskytnutí fotografie larvy piskoře ze skenovacího elektronového mikroskopu. Děkuji i Bc. Pavlu Vebrovi a jeho rodině, díky nimž jsem mohl kdykoliv, kdy jsem potřeboval, přespat v Českých Budějovicích. V neposlední řadě chci poděkovat mé rodině, která mě po celou dobu mých studií nesmírně podporovala.

V Hradci Králové dne 1. 5. 2015

Jakub Žák

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: **2013/2014**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Jakub ŽÁK**
Osobní číslo:	**V12B034K**
Studijní program:	**B4103 Zootechnika**
Studijní obor:	**Rybářství**
Název tématu:	**Vliv hormonálního preparátu na úspěšnost indukovaného umělého výtěru piskoře pruhovaného(*Misgurnus fossilis*)**
Zadávající katedra:	**Ústav akvakultury**

Zásady pro vypracování:

Objektem bakalářské práce je piskoř pruhovaný, *Misgurnus fossilis* (L.), v současnosti jeden z nejrychleji mizejících druhů ryb ichtyofauny ČR, který byl tak zařazen mezi ohrožené druhy ryb nejen na území ČR (status druhové ochrany: ohrožený), ale v rámci celé EU (druh ze seznamu Přílohy II. v rámci sítě NATURA 2000). Piskoř obývá především stojaté a pomalu tekoucí sladké vody s hustým zárostem submersní vegetace v rámci aluviálních oblastí řek, tj. lokality s nestálými a často nepříznivými životními podmínkami.
Cílem navržené bakalářské práce je shrnutí dosud známých informací z oblasti přirozené a umělé reprodukce piskoře pruhovaného, které budou v případě řízené reprodukce tohoto druhu rozšířeny experimentální cestou. V teoretické části se student naučí pracovat s odbornou vědeckou literaturou (samostatné vyhledávání a nastudování cizojazyčné literatury). Student se tak seznámí s daným druhem, problematikou studia přirozené i umělé reprodukce (rozmnožování za pomocí stimulace ovulace a/nebo spermiace vhodnou kombinací vnějších abiotických faktorů, pomocí hormonálních přípravků, apod.) u cílového druhu a u ryb jako celku (se zvláštním zřetelem na blízce příbuzné druhy ryb - čeleď Cobitidae). Vypracuje tak zevrubnou literární rešerši na dané téma (tvořící základ bakalářské práce). Během vlastního experimentu, který bude probíhat v experimentálních podmínkách Ústavu Akvakultury v Českých Budějovicích, student ověří možnost využití hormonální stimulace při umělém výtěru piskoře s cílem porovnat účinnost a posoudit vhodnost jednotlivých vybraných komerčně dostupných hormonálních preparátů při řízené reprodukci cílového druhu. Zaměří se tak na studium vlivu použitého hormonálního preparátu (popř. jeho dávky) na úspěšnost umělého výtěru (vč. posouzení délky intervalu latence, procentuálního podílu ovulujících samic, množství a kvality gamet, případné mortality generačních ryb a stanovení jednotlivých indexů plodnosti).
Dosažené výsledky pak student následně vyhodnotí pomocí počítačového software (Statistica, Image Analysis, MS Office) a srovná s výsledky a závěry z dostupné literatury. Veškerá snad a vyvinutá v rámci BP tak povede k doplnění účinného managementu (díky návrhu metod úspěšné umělé reprodukce tohoto druhu) směřujícího k posílení stavu přirozených populací piskoře pruhovaného v ČR.

Rozsah grafických prací:	**15-25 tabulek a grafů**
Rozsah pracovní zprávy:	**30-50 stran**
Forma zpracování bakalářské práce:	**tištěná**
Seznam odborné literatury:	**viz příloha**

Vedoucí bakalářské práce:	**RNDr. Bořek Drozd, Ph.D.** Ústav akvakultury
Konzultant bakalářské práce:	**Ing. Radek Gebauer**

Datum zadání bakalářské práce:	**14. února 2014**
Termín odevzdání bakalářské práce:	**30. dubna 2015**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší 728/II
389 25 Vodňany (5)

L.S.

prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

Ing. Jan Mráz, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. února 2014

Příloha zadání bakalářské práce

Seznam odborné literatury:

Adamková-Stibranyiová, I., Adámek, Z., Šutovský, I., 1999. A comparative study on the induced spawning in female loach (Misgurnus fossilis) by means of single and double pituitary injection technique, Czech Jouranl of Animal Science 44, 403-407

Baruš, V., Oliva, O. (eds), 1995. Mihulovci (Petromyzontes) a Ryby (Osteichthyes) (2), Academia, 693 s.

Bauch, G., 1954. Die einheimischen Süsswasserfische, Neumann Verlag, 215 s.

Bohl, E., 1993. Ökologische Untersuchungen zur Bestands- und Lebensraumsitutation von Bachneunauge (Lampetra planeri), Schlammpeitzger (Misgurnus fossilis), Steinbeisser (Cobitis taenia) in Bayern, Bayerische Landensanstalt für Wasserforschung, 22 s.

Drozd, B., 2011. Study of selected population parameters of weatherfish *Misgurnus fossilis* (Cypriniformes, Cobitidae): Early life history and status of ploidy in fish from Lužnice River floodplain area, Ph.D. thesis, FROV JU, 122 s.

Geldhauser, F., 1992. Die kontrollierte Vermehrung des Schlammpeitzgers (*Misgurnus fossilis* L.), Fischer und Teichwirt 43 (1), 2-6

Grieb, A. W., 1937. Die larvale Periode in der Entwicklung des Schlammbeissers (*Misgurnus fossilis* L., Cobitidae Cyprinoidea), Acta Zoologica 18, 1-6

Hliwa, P., Krejszeff, S., Król, J., Gomułka, P., 2010. Pozasezonowy kotrolowany rozród piskorza (*Misgurnus fossilis* L.) z zastosowaniem Ovopelu. In: Zakes, Z., Demsky-Zakes, K., Kowalska, A. (eds): Rozród, podchów, profilaktyka ryb rzadkich i chonionych oraz innych gatunków, Instytut Rybactwa Śródlądowego, Olsztyn, 45-54

Klupp, R., Popp, M., 1992. Erzeungung von Schlammpeitzgern in Karpfenteichen, Fischer und Teichwirtschaft 43 (1), 6-7

Kostomarova, A. A., 1975. Weatherfish *Misgurnus fossilis* L. In: Astaurov, B. L. (ed.): Objekty biologii razvitija, Nauka Moskva, 308-323

Kotliarevskaia, N. V., 1967. Hatching periods in the groundling (*Misgurnus fossilis* L.) in relation to osygen regime, Dokl. Akad.Nauk SSSR 177 (5), 1245-1248

Kouřil, J., 2002. Metody řízené reprodukce ryb. In: Vykusová, B. (ed.): Sborník "Produkce násadového materiálu ryb a raků" VÚRH JU Vodňany, 92-102

Kouřil, J., Hamáčková, J., Adámek, Z., Sukop, I., Vachta, R., Stibranyiová, I., 1996. The artificial propagation and culture of young weatherfish (*Misgurnus fossilis* L-). In: Kirchofer, A., Hefti, D., (eds): Conservation of Endangered Freshwater Fish in Europe, Birkhäuser Verlag, 305-310

Kouřil, J., Hamáčková, J., Barth, T., 2006. Hormonálně indukovaná umělá reprodukce ryb, Science Pedagogical Publishing, 251-253

Kouřil, J., Podhorec, P., Stejskal, V., Policar, T., Křišťan, J., Drozd, B., 2011. Optimalizace metod hormonálně indukované ovulace při řízené reprodukci vybraných hospodářsky významných a teplomilných druhů ryb, Edice Metodik 120, FROV JU Vodňany, 26 s.

Lei, F. Y., Wang, B. X., 1990. Studies on reproduction and growth of loach, Acat Hydrobiologica Sinica 14 (1), 60-67

Suzuki, R., 1983. Multiple spawning of the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, Aquaculture 31 (2-4), 233-243

Wang, Y., Hu, M., Wang, W., Liu, X., Cheung, S. G., Shin, P. K. S., Song, L., 2009. Effects of GnRHa (D-Ala^6, Pro^9-NEt) combined with domperidone on ovulation induction in wild loach *Misgurnus anguillicaudatus*, Aquaculture 291 (1-2), 136-139

Obsah

1. Úvod 9

2. Literární přehled 11

2.1. Rozšíření a ochrana 11

2.2. Biologie piskoře pruhovaného 13

2.2.1. Pohlavní dimorfismus 16

2.2.2. Přirozená reprodukce piskoře pruhovaného 17

2.2.3. Charakterizace jiker 18

2.3. Metody využívané při umělém výtěru ryb 19

2.3.1. Environmentální stimulace k výtěru 22

2.4. Shrnutí dosavadních poznatků o umělém výtěru piskoře pruhovaného 24

2.4.1. Uměle indukovaná produkce gamet u příbuzných druhů 25

3. Materiál a metody 28

3.1. Odlov generačních ryb a rozdělení do skupin 28

3.2. Podmínky chovu 30

3.2.1. Prevence proti onemocněním 32

3.3. Použité stimulační hormonální preparáty 32

3.3.1. Kapří hypofýza (CPE) 32

3.3.2. Chorulon 33

3.3.3. Pregnyl 34

3.3.4. Ovaprim 34

3.3.5. Ovopel 35

3.3.6. Dagin 35

3.4. Hormonální stimulace ryb 36

3.5. Výtěr a oplození pohlavních produktů 38

3.6. Laboratorní analýza vzorků 41

3.6.1. Gravimetrická analýza neoplozených jiker 41

3.6.2. Prvková a energetická analýza neoplozených jiker 42
3.7. Statistická analýza 42
4. Výsledky 44
4.1. Obecné aspekty řízené reprodukce 44
4.1. Řízená reprodukce v závislosti na preparátu 48
4.1. Analýzy jiker 52
5. Diskuze 56
5.1. Možné směřování dalších výzkumů 63
6. Závěr 65
7. Seznam citované literatury: 67
8. Přílohy 78
9. Seznam zkratek 80
10. Abstrakt 82
11. Abstract 84

1. Úvod

Piskoř pruhovaný (*Misgurnus fossilis* L.) je velice zajímavým a v mnohém podivuhodným druhem paprskoploutvé ryby a tato bakalářská práce ve své úvodní části poodhalí v čem její podivuhodnost a zvláštnost spočívá. Tento druh je na území bývalého východního bloku využíván jako modelový organismus k řadě experimentů např. ve vývojové biologii, biochemii či cytologii (Neyfakh, 1959; Zotin a kol., 1967; Kostomarova, 1991; Sleptzova a kol., 2000; Drozd a kol., 2010). V minulosti byl využíván i k detekci aktivity hypofýzy ryb (Lusk a kol., 1983). Důvodů pro využití piskoře pruhovaného jako modelového organismu je hned několik. Především má krátkou délku vývoje, jikry se získávají poměrně snadno a není náročný na chovné prostředí (Kostomarova, 1991). Na druhou stranu ve srovnání s druhy s komerčním významem patří k druhům na okraji výzkumných zájmů (Podubský a Štědronský, 1953; Legalle a kol., 2005). Zároveň je od nepaměti součástí druhové diverzity ryb v České republice (Frič, 1859).

V současnosti se jedná o jeden z nejrychleji mizejících druhů ryb v Evropě (Hartvich a kol., 2009). Do budoucna se tedy dá předpokládat, že se bude muset přikročit k jeho umělému vysazování do volných vod (Dubský, 2013b). Proto je žádoucí zvládnout techniky jeho umělého výtěru (Hartvich a kol., 2009). Jedním z problémů řízené reprodukce většiny druhů ryb, včetně piskoře pruhovaného, je neschopnost dosáhnout spontánní ovulace při chovu v kontrolovaných podmínkách (Yaron a kol., 2002; Podhorec a Kouřil, 2009a). Proto je třeba ke stimulaci ovulace či spermiace využívat úpravy environmentálních podmínek (fotoperiody, teplotního režimu atd.), aplikace hormonálních preparátů, či jejich vzájemnou kombinaci (Kouřil a Hamáčková, 1996; Adámková-Stibranyiova a kol., 1999; Hliwa a kol., 2010). Je všeobecně známo, že odlišné hormonální preparáty mají různou efektivitu na dozrávání a produkci gamet (Żarski a kol., 2009; Křištan a kol., 2013). O otázce vlastního působení hormonálních preparátů na řízenou reprodukci ryb existuje již řada zajímavých poznatků. Hlavně u těch ryb, které člověk k potřebám zvýšeného zarybňování vod uměle vytírá, aby mohl oplozené jikry odchovat a poté vysadit do volných vod. Tyto znalosti však nikdy nebyly komplexně studovány u cílového druhu této práce. Řízená reprodukce je šetrnou metodou z hlediska sledování reprodukčních ukazatelů tohoto druhu, jelikož generační ryby nejsou usmrcovány (Drozd a kol., 2009).

Tato bakalářská práce má za cíl vytvořit kompilaci a komparaci odborné literatury týkající se řízené reprodukce ryb, se zvláštním apelem na reprodukci piskoře pruhovaného a jemu příbuzných druhů. Rovněž poukázat na pohlavní dimorfismus tohoto druhu a ověřit některé základní aspekty řízené reprodukce cílového druhu. Těmi jsou např. závislost hmotnosti samice na množství vytřených jiker, vliv hmotnosti samice na hmotnost jikry a další. V experimentální části si tato práce klade za cíl posouzení účinků několika komerčně dostupných hormonálních preparátů a jejich různých koncentrací na reprodukční ukazatele piskoře pruhovaného v experimentálních podmínkách. Těmi jsou zejména zjištění úspěšnosti umělého výtěru, zhodnocení délky intervalu latence, procentuálního podílu ovulujících samic, množství a kvality gamet. Výsledkem bakalářské práce by pak mělo být posouzení účinnosti a vhodnosti jednotlivých preparátů pro úspěšnou reprodukci piskoře pruhovaného.

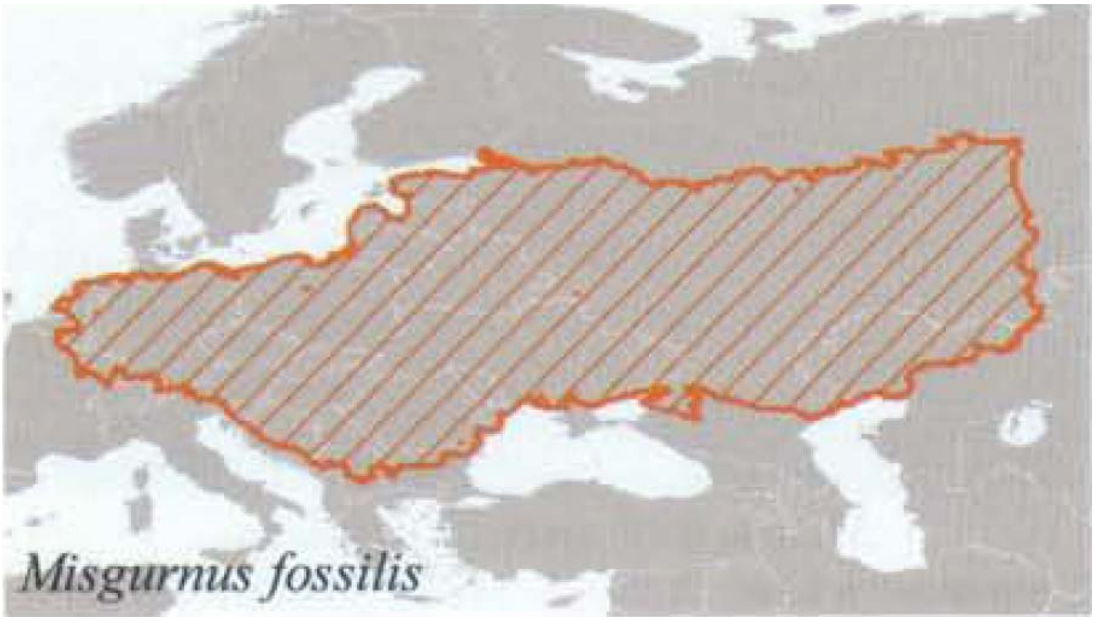
Všechna tato hlediska tak mohou mít do budoucna velký význam při produkci a případné podpoře či posílení početních stavů přirozených populací tohoto ohroženého druhu ve volných vodách.

2. Literární přehled

2.1. Rozšíření a ochrana

Piskoř pruhovaný se přirozeně vyskytuje ve velké části Evropy (Bohlen a kol., 2007; Kottelat a Freyhof, 2007). Obývá území severně od Alp a na západě svého areálu se vyskytuje po řeku Mázu (V. Španělsko). Severní okraj rozšíření zasahuje po řeku Něvu (SZ Rusko). Jeho rozšíření pokračuje až k povodí Uralu a na jihu končí řekou Kuban mezi Kaspickým a Černým mořem (Obr. 1; Kottelat a Freyhof 2007).

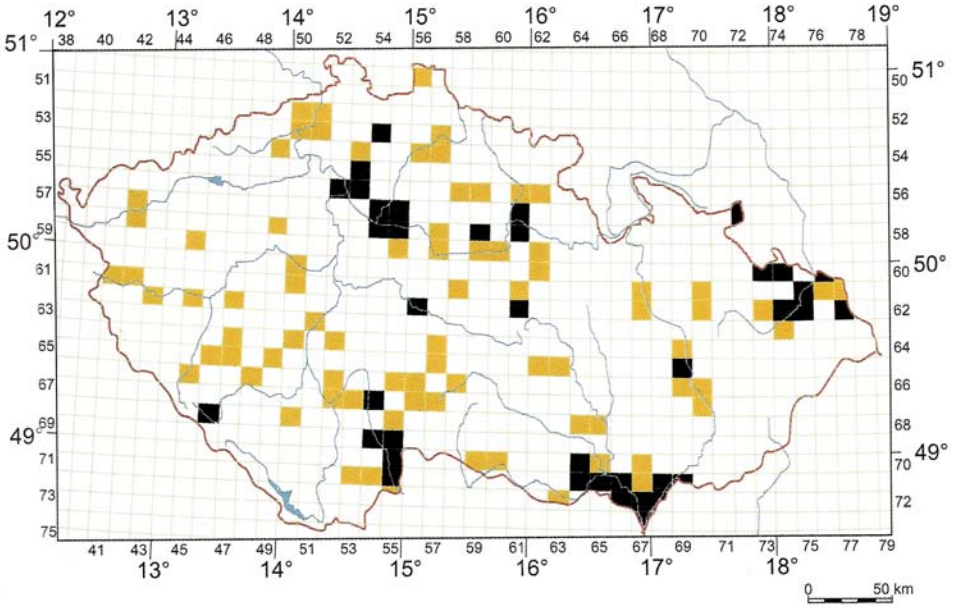
Piskoř pruhovaný má, v rámci svého rozšíření v Evropě, relativně malou genetickou diverzitu. Ta je způsobena jeho postglaciálním rozšířením z dunajského



Obrázek 1: Rozšíření piskoře pruhovaného (Misgurnus fossilis L.) v Evropě podle Kottelat a Freyhof, (2007).

povodí (Bohlen a kol., 2007). Tato skutečnost může vést k větší zranitelnosti piskoře k narušení jeho přirozeného habitatu (Hartvich a kol., 2009). Na evropském kontinentu lze v současnosti potvrdit výskyt čtyř druhů piskořů. Tři druhy jsou z rodu *Misgurnus* – piskoř pruhovaný *Misgurnus fossilis* (L.), piskoř dálnovýchodní *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor, 1842), piskoř čínský *Misgurnus mizolepis* (Günther, 1888) a čtvrtý je rodu *Paramisgurnus* – sekavec tajvanský - *Paramisgurnus dabryanus* Sauvage, 1878 (Bohlen, pers. comm.; Freyhof a Korte 2005; Zięba a kol., 2010; Freyhof a Brook 2011). Jediným původním druhem pro Evropu je piskoř pruhovaný. Ostatní druhy byly dovezeny z Asie za účelem akvarijního chovu.

Aktuální rozšíření piskoře pruhovaného v České republice je ostrůvkovitého charakteru v nížinách pod 600 m. n. m. (Obr. 2; Hanel a Lusk 2005). Tak tomu pravděpodobně bývalo i v minulosti (Frič, 1859). Bohužel v druhé polovině 20. století začalo docházet k přetváření přirozených habitatů v zemědělskou krajinu, stále se zhoršovala kvalita vod a docházelo k introdukci exotických druhů (Kotusz, 1995; Kouřil a kol., 1996; Lusk a Hanel, 1996; Meyer a Hinrichs, 2000). Všechny tyto faktory vedou k úbytku nejenom piskoře, ale i dalších původních druhů organismů (Pimm a kol., 2014).



Obrázek 2: Rozšíření piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis L.*) v České republice. Žluté čtverce jsou nepotvrzené lokality, černé čtverce jsou potvrzené lokality. Podle Hanel a Lusk, (2005).

Piskoř je v České republice chráněným živočichem. K jeho ochraně zavazuje ČR unijní Směrnice o stanovištích. Podle zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny a jeho prováděcí vyhlášky č. 395/1992 se jedná o zvláště chráněný, silně ohrožený druh živočicha. Je přísně zakázáno škodlivě zasahovat do jeho přirozeného vývoje, zejména jej usmrcovat, zraňovat, rušit, chytat nebo chovat v zajetí, a to ve všech vývojových stadiích. V rámci Červeného seznamu ryb a mihulí České republiky je hodnocen jako druh ohrožený - EN (Lusk a kol., 2011). Avšak v celkovém hodnocení pro území Evropské unie je hodnocen jako druh málo dotčený – LC (Freyhof a Brook, 2011). Piskoř je v rámci Evropské unie jedním z druhů, kterému se dostává velké péče o zlepšení stávajícího stavu především z evropských dotací (Silva a kol., 2015). K podpoře populací piskoře je třeba rekonstrukce přirozených habitatů (Lusk a kol.,

2003; Hartvich a kol., 2009; Silva a kol., 2015). Budoucí znovuobnovení přirozených habitatů bude nepochybně spojeno se znovuosazením či posílením početních stavů původních druhů ryb včetně piskoře pruhovaného.

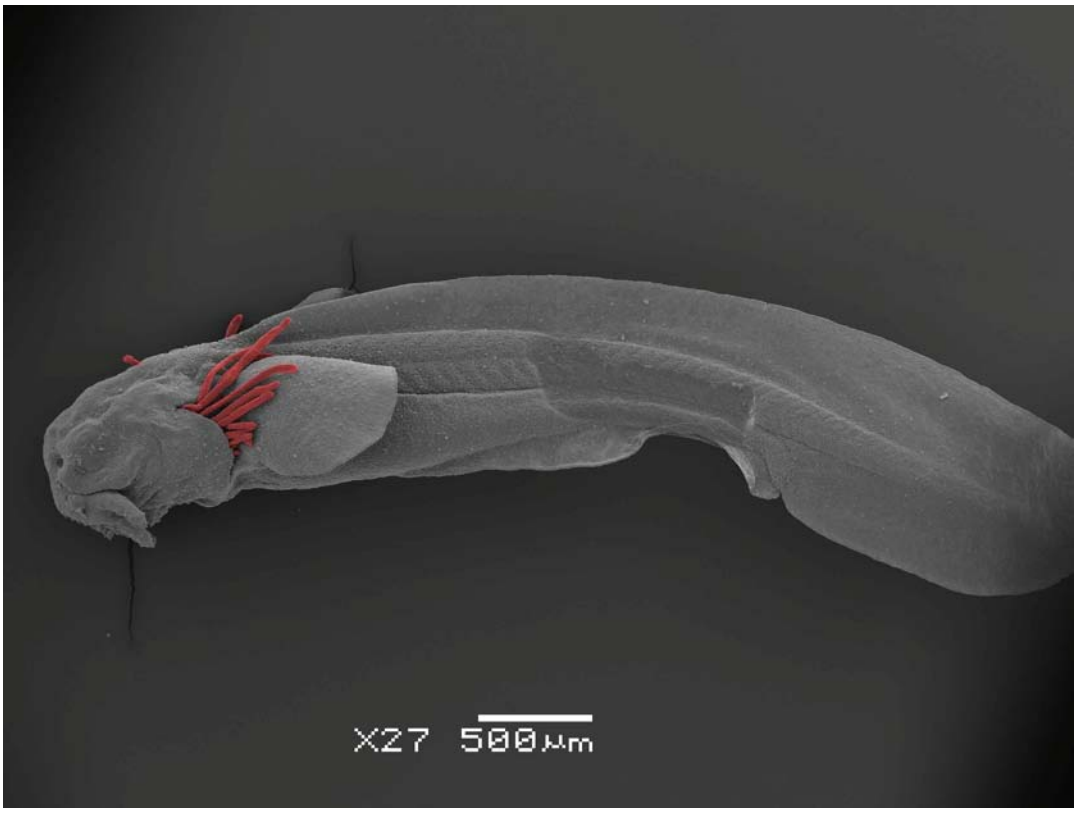
2.2. Biologie piskoře pruhovaného

Piskoř pruhovaný (Obr. 3) se jako zástupce třídy paprskoploutvých ryb (Actinopterygii) taxonomicky řadí k řádu máloostní (Cypriniformes) do čeledi sekavcovití (Cobitidae) (Perdices a kol., 2011).

Obrázek 3: Pohled na piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis L.*). Samec (dole) má kaštanovitě zbarvenou ztluštěninu pod hřbetní ploutví. Foto: Martin Chyrý

Jedná se o poměrně malý druh dorůstající do maximální celkové délky kolem 35 cm a hmotnosti až 150 g. Okolí ústního otvoru má 10 vousků, z toho čtyři umístěné na spodním pysku nejsou zcela typické vousky, ale spíše laločnaté výrůstky spodního pysku (Lusk a kol., 1983). Jeho tělo je hadovitého tvaru s několika podélnými tmavými pruhy táhnoucími se od oka až po ocasní násadec. Na rozdíl od ostatních, u nás se vyskytujících druhů čeledi Cobitidae, nemá pod okem viditelný vztyčitelný trn, i když jsou prefrontalia protažena ve výrůstek. Tento trn je překrytý kůží a nefunkční. Plynový měchýř je obdán kostěnou schránkou (Baruš a Oliva, 1995). Požerákové zuby (*dentes pharyngei*) mají 11 – 14 kuželovitých zubů. Není vytvořena tvrdá zubům protistojná ploténka, o níž se drtí tvrdé složky potravy (Banarescu, 1964). Za zmínku stojí,

že larvální stádia piskoře jsou adaptovány k životu ve vodách s nízkým obsahem kyslíku přídatnými žaberními filamenty (Obr. 4; Grieb 1937; Crkvová 2012). Ty se



Obrázek 4: Fotografie ze skenovacího elektronového mikroskopu larvy piskoře (*Misgurnus fossilis L.*). Červená struktura jsou vnější žaberní filamenta. Publikováno se souhlasem autorky Barbory Crkvové – Dobiášové (Crkvová, 2012)

začínají objevovat ve vývojovém stádiu 38 (1. den po vykulení) a své maximální velikosti dosáhnou ve stádiu 40 tj. 6. den po vykulení (Kostomarova, 1991; Crkvová, 2012). Tato filamenta jsou ektodermáního původu stejně jako žábra čelistnatých obratlovců (Gaisler a Zima, 2007; Crkvová, 2012) Tato filamenta jsou pouze přechodnou dýchací strukturou, jejíž funkci v pozdějších larválních stádiích později přebírají zejména segmentální cévy ploutevního lemu. Na rozdíl od vnějších žáber nelze u filament pozorovat větvení. Filamenta nemají žádnou pevnou podporu a nejsou vybavena svalovinou, a proto lze předpokládat, že jde o pasivní strukturu bez aktivního pohybu. V pozdním vývoji filament dochází k jejich zkracování, až zmizí pod operkulem. (Crkvová, 2012). Piskoř vyniká i vysokou regenerační schopností kůže. Při pokusech, kdy byla piskoři způsobena řezná rána až do svaloviny, se kůže zacelila již za 12 hodin (Dyk, 1956).

V rámci svého rozšíření má velice nízkou genetickou diverzitu, která je nejnižší z doposud zkoumaných druhů ryb Evropy (Bohlen a kol., 2007). Ta je způsobena velmi rychlou expanzí po skončení ledových dob z Dunajského povodí do recentního areálu rozšíření. Jsou u něj obvyklé chromosomové duplikace a tak vytváří jak diploidní

jednice n=50 tak n=100 označované za tetraploidní jedince (Raicu a Taisescu, 1972; Drozd a kol., 2010). na našem území se lze setkat se sympatrickým (společným) výskytem jedinců 2n, 3n i 4n (Drozd a kol., 2010).

Piskoř je limnofilním druhem obývající zarostlé, zabahněné, pomalu tekoucí a stojaté vody (Hanel a Lusk, 2005). Obývá i vody s nižší koncentrací kyslíku (Meyer a Hinrichs, 2000; Pekarik a kol., 2008). S nedostatkem kyslíku se vypořádává kožním a tzv. „střevním dýcháním“ (Podubský, 1955). Piskoř má totiž bohatě prokrvenou distální část střeva (Obr. 5), kterým je schopen absorbovat kyslík z polykaného vzduchu (Podubský, 1955; Dyk, 1956). Požadavky kyslíku je schopen tímto způsobem pokrýt

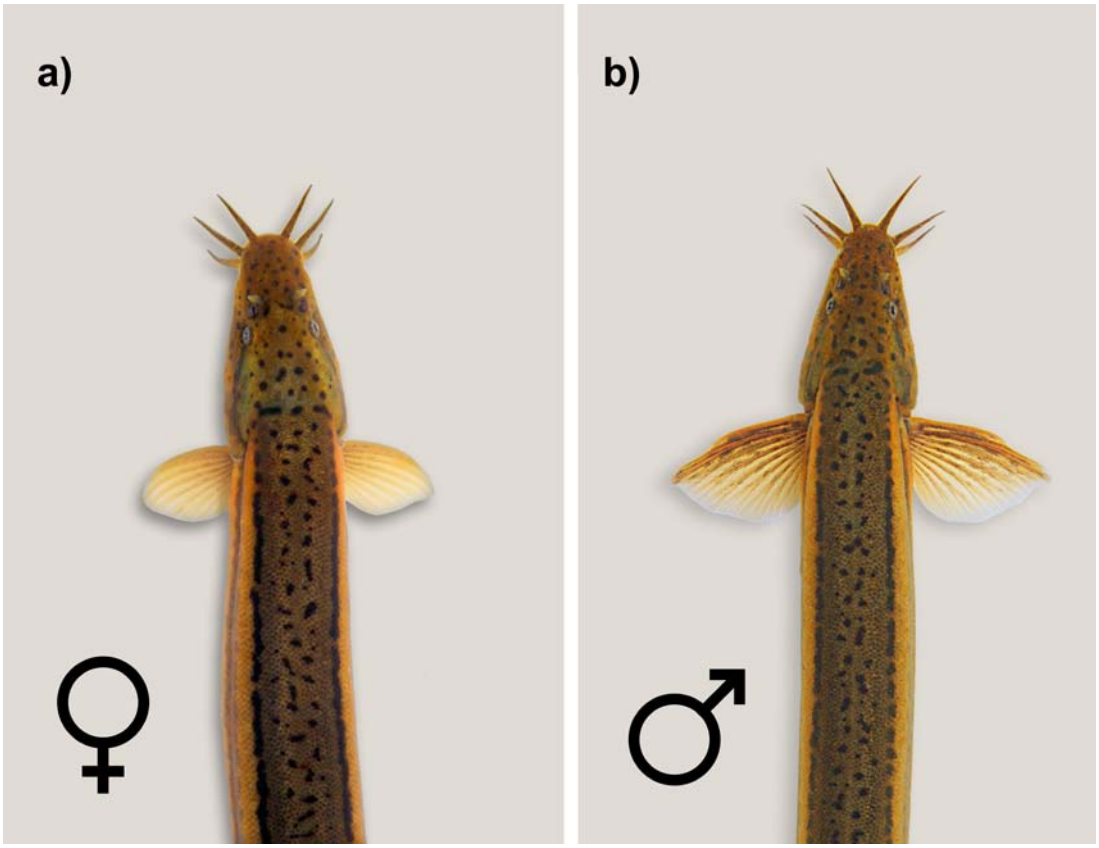
Obrázek 5: Kresba histologického řezu střevem piskoře v respirační oblasti. Jsou zde viditelné krevní kapiláry zasahující blízko k povrchu lumenu střeva. (in Dyk 1956 by Wunder 1936)

až z 30 % (Podubský, 1955). Stejnou adaptací disponují i ostatní zástupci rodu (Park 2001; Park a kol., 2003). Tuto vlastnost nevyužívá pouze jako nouzové dýchání, ale i za dostatku rozpuštěného kyslíku ve vodě (Podubský, 1955). Piskoř má velice dobře vyvinuté kožní dýchání (Podubský, 1955; Jakubowski, 1958). To je zajištěno velkým vlásečnicovým zásobením škáry (Jakubowski, 1958; Park a kol., 2001). Rád vyhledává různé úkryty a během dne se často zahrabává do substrátu (Podubský a Štědronský, 1953; Hanel a Lusk, 2005). Podobné chování je typické pro celou řadu demerzálních

(u dna žijících) ryb a označuje se jako thigmotaxe (von Brandt, 1984). Tohoto chování se využívá při lovu do různých pastí, vězenců či vrší (von Brandt, 1984; Kostomarova, 1991; Hliwa a kol., 2011). Z tohoto způsobu života však plyne jeho citlivost na koncentrace škodlivin v sedimentech dna (Hanel a Lusk, 2005). Piskoř žije společensky a na vhodných lokalitách bez predačního tlaku může tvořit početné populace čítající až 5 jedinců na m^2 (Podubský a Štědronský, 1953; Baruš a Oliva, 1995). Nepříznivá období, jako vysychání obývané tůně či dlouhou periodu s pokrývkou ledu, přečkává zahrabán v 20 až 30 výjimečně i 70 cm hlubokých chodbách (Kottelat a Freyhof, 2007). Při vyschnutí obývané nádrže je ve vyhrabané chodbičce v pozici hlavou směrem ven, aby mohl polykat bublinky vzduchu pro střevní dýchání (Ip a kol., 2004). Ve vlhkém bahně je schopen přežít téměř půl roku bez příjmu potravy (Podubský, 1955). Některé zdroje uvádí přežití piskoře v sedimentu až jeden rok (Muus a Dahlstrom, 1978). Podle Dyka, (1956) je piskoř schopen v bahně přežít i přezimování rybníka. Podubský, (1955) vyvrací tvrzení o klidném přečkávání zimního období v substrátu svým pozorováním na komorových rybnících, kde se piskoři pohybovali čile v přítoku. Vrchol aktivity piskoře pruhovaného nastává za soumraku a v noci (Baruš a Oliva, 1995). Během náhlých změn tlaku bývá neklidný a čile se pohybuje ve vodním sloupci (Hanel a Lusk, 2005). Odtud pravděpodobně pochází anglický název piskoře „weather loach“ či „weatherfish“ (Novák, 2011). Český výraz piskoř vyjadřuje jeho schopnost vydávat pískavé zvuky, je-li stisknut piskoř v ruce (Dyk, 1956).

2.2.1. Pohlavní dimorfismus

U tohoto druhu můžeme k rozeznání pohlaví využít vnějších znaků lišících se mezi oběma pohlavími. Ty jsou popsány např. v pracích Oliva a Chitravadivelu (1973), Kotusz, (1995) Drozd, (2011). Samci mají odlišný tvar a velikost prsních ploutví než samice. Samci mají spíše trojúhelníkovitý tvar prsních ploutví (Obr. 6 b), zatímco samice mají prsní ploutve okrouhlé (Obr 6 a). Navíc samci mají ztluštělý a prodloužený druhý měkký paprsek prsních ploutví. Stejně tak se liší i velikost břišních ploutví, které u samice nedosahují k řitnímu otvoru, zatímco u samce ano (Drozd, 2011). Při pohledu shora na celého jedince, je u samce patrné ztluštění trupu v oblasti pod hřbetní ploutví. Při laterálním pohledu je tato ztluštěnina patrná jako tmavěji zbarvený „mozol“ (Obrázek 3). Ten se však objevuje až po dosažení minimální délky cca 120 mm (Oliva a Chitravadivelu, 1973). Samice piskoře pruhovaného v průměru dorůstají větších



Obrázek 6: Sexuální dimorfismus piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis* L.). Samci mají větší trojúhelníkovité prsní ploutve. Druhý měkký paprsek prsní ploutve je ztluštěn a protažen.
Foto: Martin Chytrý (upravil Jakub Žák)

velikostí než samci (Geldhauser 1992; Hliwa 2010). Zajímavostí je, že samice mají v porovnání k tělesné hmotnosti menší mozek nežli samci (Ridet a kol., 1976).

2.2.2. Přirozená reprodukce piskoře pruhovaného

Piskoř pruhovaný je fytofilní druh (lepící jikry na ponořenou vegetaci) neochraňující své jikry ani potomstvo (Holčík a Hensel, 1972; Hanel a Lusk, 2005). K dosažení pohlavní dospělosti u samců dochází ve druhém roce života, zatímco u samic o rok později (Baruš a Oliva, 1995). Tření piskoře probíhá na našem území v dubnu až v červnu (Baruš a Oliva, 1995). Teplota vody při tření obvykle bývá vyšší jak 19 °C (Kottelat a Freyhof, 2007) ovšem v Rusku v okolí Moskvy se piskoř vytírá již při teplotě vody kolem 13 – 14 °C (Kotljarevskaja, 1967). Je zřejmé, že se období výtěru liší v závislosti na oblasti areálu jeho výskytu. Při samotném pohlavním aktu samec pronásleduje samici do příbřežních oblastí s vegetací. Zde se obtočí kolem těla samice tak, že vytvoří pevný prstenec v oblasti za břišními ploutvemi. V této pozici oba jedinci vypouští gamety a oplozené jikry se posléze lepí na vegetaci (Bohl, 1993; Kottelat a Freyhof, 2007). Tento způsob výtěru je typický pro všechny ryby čeledi

Cobitidae vyskytující se na našem území (Bohlen, 2008). Výtěr probíhá v poměrně krátkém intervalu v několika dávkách. U ryb čeledi Cobitidae není výjimkou, že každou dávku oplodní jiný samec (Bohlen, 2000). Při samotném rozmnožovacím aktu a ovulaci se uplatňují feromony, zejména prostaglantin $F_{2\alpha}$ (Ogata a kol., 1994; Evans, 1998).

Plodnost piskoře podle některých autorů dosahuje kolem 220 000 $ks \times kg^{-1}$ (Geldhauser, 1992; Kouřil a kol., 1996; Adámková-Stibranyiova a kol., 1999). Avšak při pitevním prozkoumání jedinců lze dosáhnout vyšších hodnot i přes 320 000 $ks \times kg^{-1}$, jelikož nelze vytřít všechny jikry z těla samice (Podubský a Štědronský, 1953). Počet jiker je ovlivněn velikostí samice (Obr. 13 c). Větší samice mívají více jiker (Pivnička, 1981). Samci vypouští poměrně malý objem spermatu, který dosahuje 10 – 40 µl (Hliwa a kol., 2010).

2.2.3. Charakterizace jiker

Jikry jsou největšími buňkami v těle, jelikož musí zajistit kompletní výživu pro vývoj zárodku. Piskoř má jikry oranžové až nahnědlé barvy (Hanel a Lusk, 2005). Jejich hmotnost se pohybuje kolem 1 mg a jsou velké cca 1 - 1,5 mm. (Kouřil a kol., 1996; Adámková-Stibranyiova a kol., 1999; Drozd a kol., 2009). Jelikož je piskoř druhem fytofilním, má jikry mírně lepivé avšak jikry mají menší perivitelinní prostor (oblast okolí jikry zabraňující vniku dalších spermií) než kaprovité druhy ryb (Kryžanovskij, 1949; Bohl, 1993; Kouřil a kol., 1996). Lepivost je způsobená jemnými výběžky (*villi*) na povrchu jikry. Těmito výběžky se jikra lepí k substrátu (Kostomarova, 1991). Svým charakterem jde o telolecitální jikry, tedy jikry s nejvyšší koncentrací žloutku u animálního pólu (Kostomarova, 1991). Při experimentálním odstranění až 75 % žloutku ze žloutkového váčku se líhnou larvy menších velikostí (Korvin-Pavlovskaya a kol., 1996). Všeobecně se u kostnatých ryb dá říci, že menší samice mají menší jikry a líhnou se z nich menší larvy (Kamler, 2005, ale Obr. 13 d).

K odlepkování jiker piskoře se využívá ředěného roztoku mléka v poměru 1:4 až 1:10 (Kouřil a kol., 1996; Adámková-Stibranyiova a kol., 1999; Drozd a kol., 2009). Odlepkování jiker probíhá 15 až 60 minut. Lze využít i kombinovaného odlepkování mlékem a poté jílem po dobu pěti minut (Adámková-Stibranyiova a kol., 1999). K inkubaci se využívá Zugských lahví libovolného objemu, či se mohou nehybně ponechat v kolébkách vyrobených z uhelonu či podobných materiálů (Kouřil a kol., 1996; Adámková-Stibranyiova a kol., 1999; Kocián, 2014).

2.3. Metody využívané při umělém výtěru ryb

Umělý výtěr patří v současnosti mezi běžně využívané metody k získání potomstva zejména hospodářsky využívaných ryb, okrasných ryb či při reintrodukci ohrožených druhů ryb (Kouřil a kol., 2011; Kouřil a Podhorec, 2011).

S umělým rozmnožováním ryb se na našem území začalo již v první polovině 19. století (Frič, 1872). Tehdy bylo potřeba podporovat naše ubývající populace lososovitých ryb. K výtěru byly využívány generační ryby ulovené v místě trdliště, u nichž docházelo ke spontánní ovulaci. Neexistoval zde problém výtěru gamet z těla ryb. Člověk tak měl kontrolu nad oplozením pohlavních produktů a následnou inkubací a odchovem plůdku. Nicméně pro vyšší efektivitu produkce bylo třeba přijít s jinou metodou, pokud možno aplikovatelnou pro ryby chované v zajetí. To se povedlo o století později, kdy von Ihering (1937) přišel se stimulací ryb pomocí intramuskulární injikace rybí hypofýzy. A tak se otevřela brána k řízené produkci ryb, které nejsou schopny při chovu v řízených podmínkách dosáhnout spontánní ovulace (Brzuska, 1999; Yaron a kol., 2002; Podhorec a Kouřil, 2009a; Kouřil a Podhorec, 2011).

Tato reprodukční dysfunkce je zapříčiněna nedostatečností některého z environmentálních faktorů (např. světelný režim, teplota, výtěrový substrát, potrava, hydraulika toku atp.) nutných k navození vhodného fyziologického prostředí v organismu a následně finálního zrání gamet při gametogenezi (Podhorec a Kouřil, 2009a, 2009b). K překonání těchto obtíží a navození ovulace či spermiace se v současnosti využívá vhodná kombinace abiotických faktorů a hormonální stimulace kapří hypofýzou či syntetickými analogy (GnRH*a*). Tyto stimulanty spouští v těle ryby gonadotropní kaskádu (Podhorec a Kouřil, 2009a). Kapří hypofýza obsahuje již sama o sobě gonadotropní hormon (GtH) a to GtH II neboli luteinizační hormon (LH) (Haffray a kol., 2005). Synteticky vyrobené analogy GnRHa se liší od těch přirozených jejich strukturou a to většinou rozdílnými aminokyselinami v řetězci (Podhorec a Kouřil, 2009b). Používané gonadotropiny bývají svým původem savčí, ptačí, žabí či rybí (Egami a Susumu, 1962; Yu a kol., 1995; Podhorec a Kouřil, 2009b).

Sekrece gonadotropinu (GtH) je u kostnatých ryb regulována dvěma neurohormony (Millar a kol., 2004). Spouštěčem gonadotropinu (GnRH) a dopaminem, který funguje jako antagonista GnRH (Lin a kol., 1991). Avšak na maturaci gamet mají vliv i další hormony např. tryptofan (Akiyama a kol., 1996). Hormonální terapie prováděná extraktem z hypofýzy nebo choriongonadotropinem je zaměřena na zvýšení hladiny

luteinizačního hormonu (LH) v těle ryby, který je v tu chvíli v nedostatku (Podhorec a Kouřil, 2009a). Naproti tomu použití analogů GnRH (GnRHa) působí přímo na buňky sekretující LH rybímu tělu vlastní (Peter a kol., 1988). Samotné uvolňování gonadotropního hormonu, je u celé řady ryb (zejména kaprovitých) spojeno se silnou dopaminergní inhibicí (Yaron a kol., 2002). Proto při podání analogů gonadotropních hormonů je nezbytné pro vyšší efektivitu výtěru, nebo vůbec k jeho uskutečnění, využít i receptorového antagonisty dopaminu (Peter a kol., 1988; Yaron a kol., 2002). Těmi jsou např. domperidone, pimozide, reserpine, haloperidol, isofloxythepin či metoclopramide (Protiva a kol., 1986; Peter a kol., 1988; Kouřil a kol., 1995; Horvath a kol., 1997; Wang a kol., 2009; Mylonas a kol., 2010). Kombinace GnRHa a inhibitoru je známa jako „Linpeho metoda“ (Peter a kol., 1988). Nejčastěji používané hormonální preparáty sloužící ke stimulaci zrání gamet jsou podávány injekčně nebo perorálně (Breton a kol., 1995; Mylonas a kol., 2010).

Samotná injikace preparátů se provádí nejčastěji jedním z několika možných postupů. Prvním z nich je intraperitoneální injikace, kdy je preparát injikován pod bázi břišních ploutví či do peritonea pod ocasní ploutví (Żarski a kol., 2009; Kouřil a Podhorec, 2011). Tento způsob má výhodu, že nedochází tak často k úniku podaného přípravku z těla ryby do okolního prostředí (Peňáz a Prášil, 1987; Policar a kol., 2010). Druhou využívanou metodou je intramuskulární injikace do hřbetní svaloviny (Obr. 7, Kouřil a kol., 2013). Dále se zřídka můžeme setkat i s nitrolebeční injikací přípravku (Peňáz a Prášil, 1987). Nejméně invazivní metodou je perorální podání GnRHa v potravě (Breton a kol., 1995; Mikolajczyk a kol., 2002). V tomto případě musí preparát odolat pH v trávicím traktu a poté být vstřebán ve střevech. Nicméně vývoji této metody je věnováno podstatně nižší úsilí než tradičním injekčním aplikacím (Mylonas a Zohar, 2007).

V zásadě se využívá injekční aplikace preparátů v jedné nebo ve dvou dílčích dávkách (Geldhauser, 1992; Kouřil a kol., 2011). V případě využití aplikace přípravku ve dvou dávkách se první z nich označuje jako tzv. přípravná dávka. Ta obsahuje 10 až 40 % celkové dávky (Kouřil a kol., 1996; Hliwa a kol., 2010; Legendre a kol., 2012). Maximální objem vpíchnutý během jedné injikace do těla ryby by se měl pohybovat kolem 0,4 ml až 0,5 ml na kilogram živé hmotnosti ryby (Yaron a kol., 2002; Kouřil a Podhorec, 2011).

Jinou možností jak získat gamety z dospělé ryby je jejich vyjmutí chirurgickou cestou. Jikry jsou tímto způsobem získávány punkcí, či vyjmutím celých vaječníků (Nakano, 1953; Klyachko a kol., 1995). Spermie se pak mohou získat vyjmutím celých

Obrázek 7: Intramuskulární aplikace hormonálního preparátu do hřbetní svaloviny piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis* L.) Foto: Jakub Žák

varlat a při nutnosti použití se pak rozstříhají nůžkami nad sítkem (Kostomarova, 1991; Hamáčková a kol., 2007). K laboratorním experimentům se využívá i *in vitro* maturace vajíček. Při této metodě se chirurgicky získají gonády ze samice a ty jsou inkubovány v hormonálním médiu, které způsobuje maturaci gamet (Nakano, 1953; Saat, 1980). Tyto metody jsou značně destruktivní, málo efektivní a zcela nevhodné k využití pro záchranné či reintrodukční programy ohrožených druhů ryb. Svoji úlohu v umělém výtěru ryb sehrává i kvalita přijímané potravy v období před výtěrem. Ta ovlivňuje zejména kvalitu pohlavních produktů (Vorlíčková a kol., 2006; Izquierdo a kol., 2001). Nedostatek potřebných složek obsažených v potravě pro produkci gamet vede ke snížení jejich kvality či k zastavení reprodukce (Izquierdo a kol., 2001). V tomto směru hrají důležitou úlohu mastné kyseliny, karotenoidy, vitamin C a vitamín E (Izquierdo a kol., 2001; Palace a Werner, 2006; Tizkar a kol., 2013). Předkládání nekvalitní potravy může vést ke ztučnění gonád a následnému zhoršení jejich funkce (Vorlíčková

a kol., 2006; Stejskal a kol., 2010; Policar a kol., 2011a). S problémem produkce málo kvalitních gamet se setkáváme zejména u druhů ryb chovaných v recirkulačních systémech (Randák a kol., 2009; Policar a kol., 2011a). Tento faktor se dá eliminovat předkládáním speciálních krmiv pro generační ryby, odchovem generačních ryb v extenzivních podmínkách nebo přikrmováním živou potravou (Suzuki, 1983; Vorlíčková a kol., 2006; Fontaine a kol., 2008; Randák a kol., 2009; Policar a kol., 2011a). Méně vhodným způsobem jak tomuto předejít, je zisk generačních ryb z volných vod (Krupka, 1987; Policar a kol., 2010).

2.3.1. Environmentální stimulace k výtěru

Jak již bylo řečeno, k úspěšnému navození finálního zrání gamet u ryb, je třeba celého spektra environmentálních faktorů. Konkrétní požadavky na vhodné prostředí bývají druhově specifické (Balon, 1975). Pokud některý z těchto faktorů chybí, tak dochází k reprodukčním dysfunkcím (Yaron a kol., 2002).

Environmentální stimulace k výtěru ryb je přistupováno zejména ve dvou případech. V prvním případě je environmentální stimulace využíváno k zefektivnění umělého výtěru ryb (Policar a kol., 2011a, 2011b). Ve druhém případě je ho využíváno k posunu termínu výtěru do jiného období (Migaud a kol., 2002; Hliwa a kol., 2010; Policar a kol., 2010, 2011b).

K finální stimulaci výtěru hormonálně stimulovaných ryb často stačí pouze nabídnutí výtěrového substrátu. Poté probíhá výtěr ryb a oplození jiker přirozenou cestou. V takovém případě se jedná o poloumělý výtěr (Dubský, 1998b; Policar a kol., 2011a, 2011b). Finální stimulace substrátem se využívá v produkci candáta obecného – *Sander lucioperca* (tzv. Šustova metoda), kapra – *Cyprinus carpio* (Dubraviova metoda s hypofyzací), okouna – *Perca fluviatilis* i parmy – *Barbus barbus* (Dubský, 1998a; Policar a kol., 2010, 2011a, 2011b).

Poloumělý výtěr u okouna říčního probíhá tak, že jsou samci i samice hormonálně stimulovány a poté vypuštěny do společné nádrže (Policar a kol., 2011a). Do té jsou instalovány větve měkkých dřevin např. vrby jívy (*Salix caprea*) či bezu černého (*Sambucus nigra*). Ty slouží jako substrát pro odkládání jikerných provazců, které jsou samci oplodněny. Vytřené provazce jiker jsou poté sebrány a dále inkubovány.

Do nádrží, kde se chovají generační ryby candáta obecného, se připraví umělá hnízda zpravidla čtvercového tvaru. Hnízda se sestávají z kovového rámu, na který je připevněn umělý trávník (či jiný inertní materiál podobné struktury). Samec obsadí

vhodné hnízdo a čeká na samici. Samotný výtěr pak probíhá v páru. Po výtěru na hnízdě začíná samec hlídat. Stejné chování při výtěru lze sledovat i ve volných vodách (Lappalainen a kol., 2003). V momentu, kdy jikry dosáhnou stádia očních bodů, jsou hnízda transportována k inkubaci (Dubský, 1998b).

Dalším z velice důležitých faktorů je fotoperioda a teplota vody (Policar a kol., 2010). Ve své podstatě jde o navození délky dne připodobňující období před přirozeným rozmnožováním. To je prováděno pomocí umělého osvětlení. S environmentálními faktory se manipuluje zejména při mimosezónním výtěru ryb (Suzuki, 1983; Migaud a kol., 2002; Hliwa a kol., 2010).

Na příklad při chovu generačních ryb parmy obecné za stálé teploty 20 - 21 °C a prodlužující se fotoperiody lze v intenzivních podmínkách produkovat potomstvo téměř po celý rok (Policar a kol., 2010). K výtěrové stimulaci parem obecných chovaných v kontrolovaných podmínkách lze využít i upravených sádek, tak aby simulovaly přírodní podmínky. To spočívá v kontinuálním přítoku do venkovních sádek, poskytnutí výtěrového substrátu (štěrku). O fotoperiodu a teplotu se pak postará příroda sama. Takovouto předvýtěrovou stimulací je navýšen počet vytřených jiker (Policar a kol., 2010). U okouna říčního lze stimulovat výtěr ryb řízeným teplotním režimem a v předvýtěrovém období zvýšením teploty o 2 – 6 ° C (Policar a kol., 2009).

Výhod poloumělého výtěru je několik. Obsluha nemusí s rybami tak často manipulovat, jikry mají vyšší oplozenost i líhnivost, a generační ryby mají nižší povýtěrovou mortalitu (Policar a kol., 2011a, 2011b). Nevýhodou poloumělého výtěru je delší doba latence (Policar a kol., 2011b). Nižší oplozenost a líhnivost jiker při umělém výtěru okouna říčního a candáta obecného může být způsobena několika faktory. Jedním z nich může být ten, že nejsou spolu vytírány ryby, které by se přirozeně selektovaly k výtěru (Reichard a kol., 2012). Tento faktor by mohl hrát roli u ryb, u kterých dochází k párovému výtěru. Nebo zde může hrát roli i fakt, že při umělém výtěru nemusí být všechny gamety dostatečně dozrálé (Mylonas a Zohar, 2007).

Stimulaci piskoře pruhovaného environmentálními faktory testovali např. Hliwa a kol., (2010). Ryby pro jejich experiment byly uloveny na podzim při teplotě vody 7,5 °C. Po převozu do laboratoře byly ryby aklimatizovány po dobu 14 dní a krmeny mraženou potravou. Poté byl postupně upravován teplotní a světelný režim po dobu 44 dní. Z počátečních 8,5 °C na 19 °C a délka dne byla prodlužována z 10 hod. na 15 hod. Poté byly ryby stimulovány Ovopelem ve dvou dávkách (viz. 2.4.).

Environmentální stimulace bylo využito i u příbuzných druhů. Např. Suzuki a kol., (1983) stimuloval piskoře dálnovýchodního. Ryby byly chovány ve venkovních rybníčcích, nad nimiž byly instalovány lampy. Ty prodlužovaly denní svit na 17 hod. Teplota vody byla držena na 25±1 °C. na začátku experimentu byly generační ryby stimulovány 10 IU hCG $\times g^{-1}$ a poté se sledoval jejich opakovaný výtěr.

2.4. Shrnutí dosavadních poznatků o umělém výtěru piskoře pruhovaného

První umělý výtěr piskoře pruhovaného v České republice byl proveden v roce 1993 na půdě Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech (Kouřil a Hamáčková, 1996).

K hormonální stimulaci piskoře již byly učiněny pokusy s kapří hypofýzou (Geldhauser, 1992; Bohl, 1993; Kouřil a kol., 1996; Adámková-Stibranyiova a kol., 1999, Drozd a kol., 2009). Kapří hypofýza byla zprvu podávána v jedné dávce s velice různorodými výsledky. Například úspěšnost ovulace samice při dávce 3 $mg \times kg^{-1}$ při průměrné teplotě kolem 15,3 °C byla 69 – 75 % (Geldhauser, 1992). Při jednorázové dávce 5 $mg \times kg^{-1}$ a teplotě 19 – 20 °C může být dosaženo ovulace u 100 % samic po 20 hodinách (Adámková-Stibranyiova a kol., 1999). Naopak Bohl (1993) uvádí, že při jednorázové dávce 3 – 5 $mg \times kg^{-1}$ nedošlo u žádné ze samic k ovulaci. K té došlo až při velmi vysokých dávkách 8 – 12 $mg \times kg^{-1}$ v 85 % případů.

Lepších výsledků je dosahováno při podání přípravku ve dvou dílčích dávkách, kdy první dávka obsahuje 10% koncentraci celkové dávky přípravku (Kouřil a kol., 1996; Adámková-Stibranyiova a kol., 1999). Při použití dávky 5 $mg \times kg^{-1}$ (interval mezi dávkami 17,5 hod) a teplotě 18 °C, ovuluje 60 % samic po 16 - 17 hodinách (Kouřil a kol., 1996). Při stejné dávce – zkrácení intervalu mezi jednotlivými dávkami na 12 hodin a inkubaci při 19 – 20 °C došlo k ovulaci u všech samic (Adámková-Stibranyiova a kol., 1999). K té došlo téměř za poloviční čas (za 12 hod oproti 20 hod) nežli u samic injikovaných jednou dávkou (Adámková-Stibranyiova a kol., 1999).

Jako nejúspěšnější se tedy jeví injikace samic ve dvou dílčích dávkách (s intervalem mezi dávkami 12 hod). U samců nebývá problém se stimulací spermiace, a proto lze využít jednorázovou injikaci (Kouřil a kol., 1996; Adámková-Stibranyiova a kol., 1999). Této metody se při použití hypofýzy úspěšně využívá do současnosti (Drozd a kol., 2009).

Dalším preparátem úspěšně použitým k indukci ovulace u piskoře je choriongonadotropin (Neyfakh, 1959; Zotin a kol., 1967; Klyachko a kol., 1995; Kopeika a kol., 2003). Po podání chorionického gonadotropinu v dávce 200 RU[1] (rat unit) dojde k ovulaci po 30 až 36 hodinách při 18 °C. Takto získané jikry mají oplozenost 70 – 98 % (Neyfakh, 1959). Při dávce 300 IU hCG (Profasi, Laboratories Serono SA, Švýcarsko) došlo k ovulaci za 43 hodin. Při této metodě dosahovala oplozenost jiker 90 % (Kopeika a kol., 2003). Všechny tyto pokusy byly provedeny pouze za účelem zisku gamet pro experimentální účely, nikoliv pro zkoumání efektu preparátu na reprodukční ukazatele piskoře pruhovaného.

Maďarský preparát Ovopel byl u piskoře pruhovaného úspěšně použit k produkci pohlavních produktů při mimosezónním výtěru za účelem zisku viabilního potomstva (Hliwa a kol., 2010). Pro stimulaci samic bylo využito dvou dílčích dávek v rozmezí 12 hodin. První, přípravná dávka byla o koncentraci 1/5 peletky na kg živé hmotnosti. Druhá dávka obsahovala 1 peletku na 1 kg živé hmotnosti. Po 12 hodinách od druhé injikace bylo vytřeno 60 % samic a všichni samci. Oplozenost činila 76 %. Ovšem výsledky mohou být ovlivněny tím, že experiment byl proveden mimo přirozenou sezónu výtěru v přírodě.

2.4.1. Uměle indukovaná produkce gamet u příbuzných druhů

V současnosti, na rozdíl od hospodářsky významných druhů ryb, existuje velice málo informací o produkci gamet piskoře pruhovaného. Proto je v rámci této práce představen i přehled hormonální stimulace ovulace/spermiace dalších vybraných druhů ryb z čeledi Cobitidae. Těmi jsou piskoř dálnovýchodní – *Misgurnus anguillicaudatus* a sekavec tajvanský – *Paramisgurnus dabryanus*. Tyto druhy mají svůj ekonomický význam jako gastronomické i akvarijní druhy zejména ve východní Asii (You a kol., 2009). U těchto druhů jsou známí mezidruhoví hybridi a tak lze předpokládat podobnou reprodukční fyziologii (Fujimoto a kol., 2008; You a kol., 2009).

Využitím různých stimulantů a jejich kombinací u sekavce tajvanského se zabýval Lin a kol., (1991). Podání pouze dopaminergního inhibitoru - pimozidu v dávce 5 mg×kg^{-1} nevedlo ke změně koncentrace GtH v krvi a tedy ke stimulaci jedince. Ryby stimulované samotným *s*GnRH*a* v dávce 0,001 mg×kg^{-1} vykazovaly zvýšenou koncentraci GtH ale neovulovaly. Při stejné dávce LHRH*a* však nedošlo k výraznému

[1] RU (rat unit) jednotka udávající množství látky, které je za standardních podmínek schopné vyvolat cílený efekt u zkoumaného počtu krys (http://www.merriam-webster.com/medical/rat%20unit)

zakolísání GtH. Naopak dávka dopaminergního inhibitoru domperidonu (DOM) podaná společně s 5 mg×kg^{-1} LHRH-a vedla k ovulaci 20 % samic. Za stejné dávky 0,001 mg×kg^{-1} *s*GnRH*a* při současné aplikaci PIM v dávce 1 nebo 5 mg×kg^{-1} již došlo k ovulaci šesti respektive sedmi samic z deseti. Při nahrazení PIM domperidonem ovulovaly čtyři respektive sedm samic z deseti. K ovulaci všech samic sekavce tajvanského došlo až při společném podání 0,01 mg×kg^{-1} *s*GnRH*a* a 5 mg×kg^{-1} DOM. Doba latence v tomto případě byla 11 – 14 hod při 22 – 24 °C. U tohoto druhu je tedy zjevná dopaminergní inhibice. Hormonální stimulaci ovulace u sekavce tajvanského zkoumal i (Yu a kol., 1995). Ryby v citované práci byly chovány v malých akváriích při světelném režimu 12 D : 12 L a ve dvou teplotách 16 a 22 °C. Rybám byla v jedné dávce aplikována dávka ekvivalentní jedné hypofýze následujících živočichů: kapr obecný, tolstolobik bílý (*Hypopthalmichthys molitrix*), kachna divoká (*Anas platyrhynchus)*, kur (*Gallus gallus*). Všechny tyto dávky vedly k 100% ovulaci (krom kachní hypofýzy = 92 %) při 22 °C. Doba latence se pohybovala v rozmezí 11 až 14 hod. U skupiny chované při 16 °C bylo dosaženo ovulace u 92 % samic za 20 až 24 hodin. V současné době se však ustupuje od využívání hormonů z živočichů a přechází se k přípravkům v lékových formách (Yaron a kol., 2002; Policar a kol., 2010). Vysokého procenta ovulujících samic sekavce tajvanského lze dosáhnout při dávkách (100 μg×kg^{-1}) analogu lutein produkujícího hormonu (LHRHa) či *s*GnRH*a* v dávce 10 nebo 100 μg×kg^{-1} bez využití dopaminového inhibitoru (Lin a kol., 1988 in Peter a kol., 1988). To vše za intervalu latence kolem 24 hodin. Při podání dopaminergního inhibitoru PIM (5 mg×kg^{-1}) a dávce GnRH*a* (1 μg×kg^{-1}) došlo ke zkrácení doby latence na 11 až 14 hodin a zlepšila se i synchronizace výtěru (Lin a kol., 1988 in Peter a kol., 1988).

Podle You a kol., (2009) stačí k navození ovulace u piskoře dálnovýchodního i sekavce tajvanského dávka hCG 6 000 – 8 000 IU×kg^{-1} a k navození spermiace dávka 2000 IU×kg$^{-1,}$ Teplota vody v citované práci se pohybovala mezi 20 – 23 °C.

V minulosti již byla provedena stimulace piskoře dálnovýchodního pomocí různých hypofýz (Yu a kol., 1995). Hypofýzy byly původu rybího (kapr obecný, tolstolobik bílý) a ptačího (kachna divoká, kur domácí). Hormony byly do těla samice aplikovány v jedné dávce ekvivalentně odpovídající jedné hypofýze. Podmínky chovu byly nastaveny na 22 °C a 12 L : 12 D. V tomto případě došlo k úspěšné ovulaci u všech samic po 10 - 14 hodinách. Doposud nejlepších výsledků u piskoře dálnovýchodního bylo dosaženo při použití analogu *m*GnRH*a* (D-Ala^{6}, Pro^{9}-Net) v dávce 20 μg×kg^{-1}

s 10 mg×kg^{-1} inhibitoru dopaminu domperidonu (Wang a kol., 2009). Naopak jako méně úspěšné uvádí Wang a kol., (2009) aplikaci samotného *m*GnRH*a* v dávce 10 – 60 μg×kg^{-1}, kdy ovulovalo 20 – 40 % samic s dobou latence 15,6 – 19 hod. Naopak kombinace DOM a *m*GnRH*a* měla průměrnou dobu latence 10 – 16,3 hod a při dávkách 20 μg×kg^{-1} s 10 mg×kg^{-1} a 40 μg×kg^{-1} s 20 mg×kg^{-1} (*m*GnRH*a* a DOM) došlo k ovulaci všech samic. Tyto dvě dávky měly kratší interval latence, než podání CPE (carp pituitary extract – extrakt z kapří hypofýzy) v dávce 4 mg×kg^{-1}.

Tyto poznatky lze shrnout tak, že LHRHa je při stimulaci ovulace příbuzných druhů méně potentní než GnRH-a (Peter a kol., 1988). Podání samotného GnRHa vede k ovulaci či spermiaci, ale za relativně delší dobu (Lin a kol., 1991; Wang a kol., 2009). Při kombinaci GnRHa a dopaminergního inhibitoru se zkracuje interval latence a vzroste množství produkovaných gamet (Lin a kol., 1991). Při stimulaci pomocí hCG (lidský choriongonadotropin) je třeba pro úspěšnou stimulaci samic aplikovat o několik tisíc jednotek více na kg b.w. než samcům (You a kol., 2009). Skutečnost, že při podání inhibitoru dopaminu dojde ke zvýšení efektivity ovulace, dokazuje, že u druhů příbuzných piskoři pruhovanému existuje dopaminergní inhibice.

3. Materiál a metody

3.1. Odlov generačních ryb a rozdělení do skupin

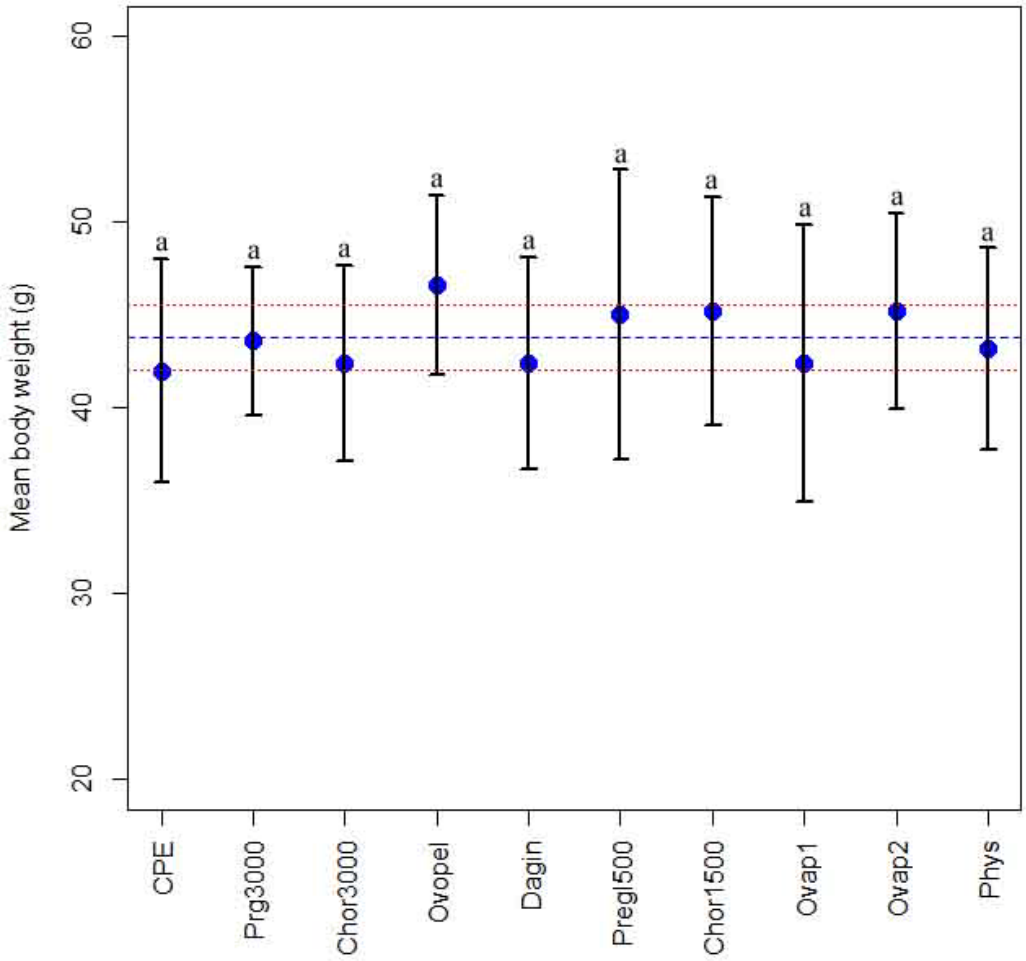
K experimentu bylo použito celkem 77 ks samců a 50 ks samic. Ryby pro experiment pocházely z experimentálního rybníku na pokusnictví FROV JU ve Vodňanech. Generační ryby byly odloveny v předvýtěrovém období v druhé polovině dubna (18. 4. 2014). K odlovu generačních ryb bylo využito přenosného benzinového elektrického agregátu Honda GXV50 1,8 kW (Německo). Teplota vody na lokalitě byla 8 °C. Celkem bylo uloveno cca 180 ks piskoře. Ulovené ryby byly roztříděny a k dalšímu experimentu byly využity pouze dospělí piskoři (127 ks). Při lovu elektrickým agregátem byla pozorována velice rychlá rekonvalescence piskoře pruhovaného po zasažení elektrickým proudem. Ta na rozdíl od omráčených okounů říčních (TL 5-25 cm), slunečnic pestrých – *Lepomis gibbosus* (TL 5-10 cm) či kapra obecného (TL cca 30 cm) trvala méně než 5 s.

Dospělé ryby byly převezeny na experimentální pracoviště ústavu akvakultury a ochrany vod v Českých Budějovicích. Zde bylo určeno pohlaví ryb na základě vnějších znaků (viz 2.2.1). Samci byli přeneseni po dvouhodinové aklimatizaci do žlabu s aeračními kameny a se substrátem (sediment z lokality přirozeného výskytu – viz 3.2.1). Teplota vody ve žlabu byla 14,5 °C.

Samice byly náhodně roztříděny do deseti věder. Rozdělení tedy proběhlo tak, aby rozdíly v průměrné hmotnosti samice v každé skupině nebyly významné. To prokázala i následná statistická analýza (Obr. 8). I přes málo početné skupiny (N = 5 samic na jednu experimentální skupinu) se dá u spojité veličiny, jako je hmotnost, předpokládat normální rozdělení. Proto byla využita jednostranná ANOVA (One-way ANOVA). Průměrná hmotnost jedné samice byla 43,8 g ± 6,27 (průměr ± S. D.). V hmotnosti samic nebyly mezi skupinami signifikantní rozdíly (One-way ANOVA, $F=0,284$, $p=0,975$).

Po rozdělení do jednotlivých skupin se přešlo k individuálnímu značení samic. Ty byly značeny podkožními barevnými elastomery VIE (Visible Implant Elastomer tag, Northwest Marine Technology, Ltd., USA). Elastomery byly v každé skupině implantovány na pět různých míst, čímž se zajistilo individuální značení (Obr. 9). Elastomery byly na místech PV – (pectoralis ventralis) značka umístěna u prsních ploutví blízko břišní části, VV – (ventralis ventralis) značka umístěna ventrálně

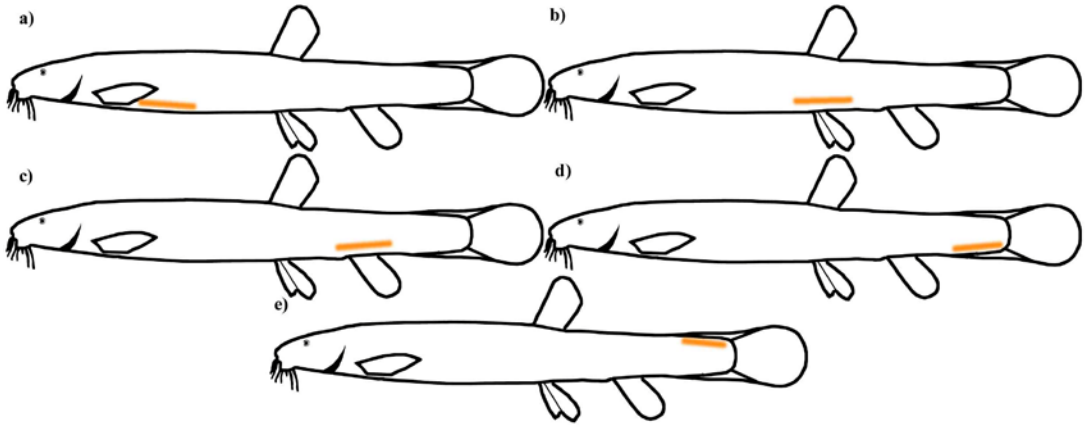
u břišních ploutví, AV – (analis ventralis) značka umístěna ventrálně u řitní ploutve, CV - (caudalis ventralis) značka umístěna ventrálně u ocasní ploutve, CD – (caudalis dorsalis) značka umístěna dorzálně u ocasní ploutve. Procedura značení a vážení samic



Obrázek 8: Průměrná tělesná hmotnost samic piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*) rozdělených do experimentálních skupin. Modrý bod je průměr. Chybové úsečky jsou 95 % konfidenční intervaly. Modrá linka značí průměrnou hmotnost všech samic (43,8 g ± 6,27 (průměr ± S.D.). Červené čáry značí 95 % konfidenční interval průměru. Skupiny se od sebe signifikantně neliší (One-way ANOVA, F=0,284, p =0,975).

trvala cca 2 hodiny. Vzhledem k jednodušší manipulaci s rybami, snížení rizika jejich poranění a s ohledem na současnou legislativu ohledně ochrany zvířat proti týrání, byly ryby před samotným značením uspány anestetikem, kterým byl hřebíčkový olej (Eugenol, Dr. Kulich Pharma s.r.o., Hradec Králové) v koncentraci 0,05 $ml \times l^{-1}$. Doba expozice byla dlouhá až do dosažení anestezie ryb (Hamáčková a kol., 2003). Avšak piskoř je poměrně odolný druh vůči anestezii, a tak lze využít koncentrace hřebíčkového oleje až 0,07 $ml \times l^{-1}$ (Drozd a kol., 2009). K vyvolání anestezie u piskoře je možno

využít i přípravku 2-phenoxyethanolu v koncentraci 0,7 $ml \times l^{-1}$ (Hliwa a kol., 2010). Po zklidnění byly samice nejdříve zváženy s přesností 0,1 g na digitálních váhách a přeneseny na navlhčenou tkaninu. Pomocí zjištěných hmotností byl testován pohlavní dimorfismus v tělesné hmotnosti. Označené samice byly po rekonvalescenci z anestezie vpuštěny do kýblů s aeračními kameny a se substrátem. Vědra byla ponořena ve žlabu naplněného vodou, aby se zajistila stejnost teplotního režimu. Ryby byly aklimatizovány v těchto podmínkách do 22. 4. 2014 tedy čtyři dny. Během aklimatizace nebyly ryby krmeny.

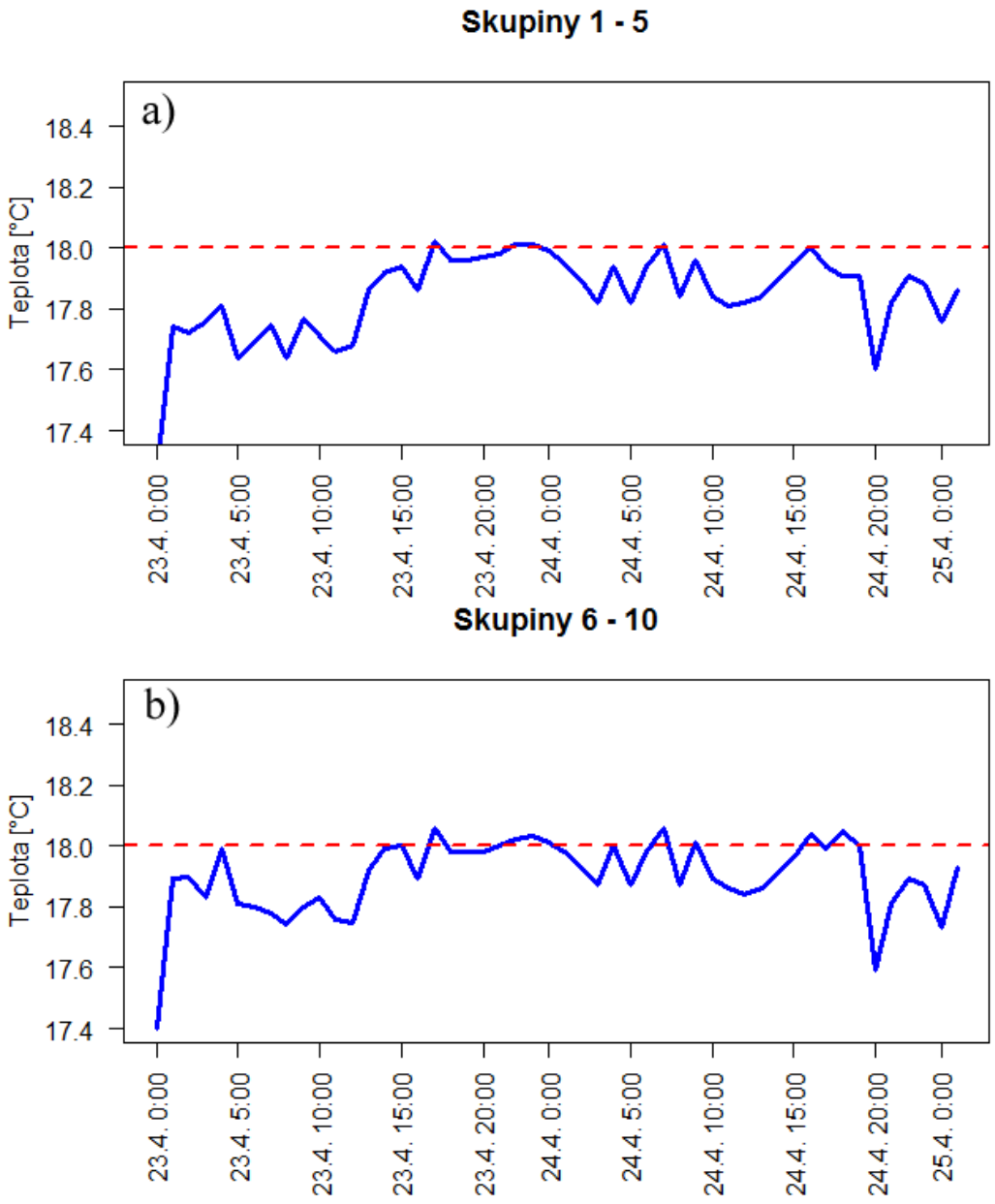


Obrázek 9: Způsob individuálního značení generačních samic piskoře pruhvaného (*Misgurnus fossilis)* pomocí VIE elastomerů aplikovaných do podkoží. Pozice a) PV – (pectoralis ventralis); b) VV – (ventralis ventralis); c) AV – (analis ventralis); d) CV - (caudalis ventralis); e) CD – (caudalis dorsalis).

3.2. Podmínky chovu

Dne 22. 4. 2014 se začalo přelovením samic z věder se substrátem do čistých průhledných plastových boxů. Samci byli přeloveni do věder bez substrátu. Uzavřené boxy pro samice byly zvoleny proto, aby byly jednotlivé skupiny izolovány a nebyly ovlivňovány hormony uvolňovanými z těl ryb jiných skupin do vody. Navíc doba, po kterou byly ryby uchovávány v boxech, byla dostatečně krátká na to, aby neměly vylučované metabolity vliv na welfare ryb. Na každý z boxů byl napsán specifický kód sestávající se z čísla skupiny a preparátu aplikovaný samicím. Boxy byly po pěti kusech umístěny do dvou žlabů. Do každého z boxů byl instalován aerační kámen. Do žlabů byly vloženy automatické záznamové teploměry tzv. dataloggery (RT-F53, Qi analytical, Praha, ČR), které po celou dobu experimentu snímaly teplotu v žlabech v intervalu 60 minut. Ohřívání vody bylo nastaveno samcům na 19 °C a samicím na 18 °C (Obr. 10). Tyto teploty jsou optimální pro reprodukci piskoře pruhovaného (Drozd

a kol., 2009). Skutečný teplotní režim samic získaný z dataloggerů byl v průměru 17,9 °C ± 0,13 (17,27 – 18,06 °C) průměr ± S.D. (min – max). Tyto teploty byly drženy



Obrázek 10: Průběh teploty během experimentu s řízenou reprodukcí piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*). a) Skupiny 1-5, tj. pro skupiny stimulované extraktem z hypofýzy Pregnyl 3000 IU, Chorulon 3000 IU, Ovopel, Dagin b) Skupiny 6-10 tj. Pregnyl 1500 IU, Chorulon 1500 IU, Ovaprim 1 ml×kg^{-1}, Ovaprim 2 ml×kg^{-1}, fyziologický roztok. Modrá křivka ukazuje skutečný teplotní průběh. Červená linka znázorňuje požadovanou hodnotu 18 °C..

až do skončení pokusu. Během experimentu byl pravidelně (2× denně) měřen chemismus vody včetně koncentrace kyslíku. Po celou dobu pokusu byly tyto parametry v optimálních intervalech.

3.2.1. Prevence proti onemocněním

Piskoř je při přechovávání v kontrolovaných podmínkách náchylný k napadení ektoparazity zejména kožovcem *Ichthyoptirius multifilis* Fouquet, 1876 (Kouřil a Hamáčková, 1996; Kouřil a kol., 1996) či k různému zaplísnění saprolegnií *Saprolegnia sp.* Nees, 1823 (Dyk, 1940). Tato zranitelnost může být způsobena obtížemi při zacházení s piskořem jakožto rybou nadmíru kluzkou a mrštnou. Proto je třeba k jeho udržení použít poměrně silného stisku. To vede ke stresování ryby a porušení slizové vrstvy, která slouží jako ochranná bariéra vůči vnějším vlivům (Dyk, 1940).

Jako prevence zaplísnění se v tomto pokusu osvědčilo přidání sedimentu (bahna) do nádrží, v nichž byly ryby přechovávány před započetím experimentu. Substrát byl dovezen několik dní před přivezením ryb. Využití bahna při přechovávání piskoře doporučuje již Frič, (1859). Podubský (1955) dokázal živého piskoře uchovat v malém akváriu pouze ve vlhkém bahnu po dobu několika měsíců bez známek onemocnění.

Díky tomu nebyly během celé doby našeho experimentu potíže s parazitací či zaplísněním piskořů.

3.3. Použité stimulační hormonální preparáty

Celkem bylo použito pět různých hormonálních preparátů. Z toho některé ve dvou koncentracích. Jako pozitivní kontroly bylo použito extraktu z lyofilizované kapří hypofýzy (CPE) v dávce 5 $mg \times kg^{-1}$. Jako negativní kontrola sloužil čistý fyziologický roztok (0,9 $g \times l^{-1}$ NaCl). Testovanými preparáty byly Chorulon v dávce 3000 $IU \times kg^{-1}$ a 1500 $IU \times kg^{-1}$, Pregnyl v dávce 3000 $IU \times kg^{-1}$ a 1500 $IU \times kg^{-1}$, Ovaprim v dávce 1 $ml \times kg^{-1}$ a 2 $ml \times kg^{-1}$, Ovopel a nakonec Dagin. Různých koncentrací preparátů bylo využito proto, aby byla nalezena optimální dávka přípravku pro dosažení co nejlepších výsledků. Zjištění optimální dávky vede ke zmírnění případných dopadů při použití příliš vysokých dávek, a to jak ekonomických, tak i welfare ryb.

V následujících odstavcích je uvedena stručná charakteristika všech v pokusu použitých hormonálních přípravků.

3.3.1. Kapří hypofýza (CPE)

Hypofýza ryb (nejčastěji kapra obecného) byla k indukci ovulace poprvé použita ve 30. letech minulého století (von Ihering, 1937). Jde o doposud snad nejčastěji

využívaný přípravek v rybářské praxi (Wang a kol., 2009; Dubský, 2013a). Avšak není účinný u všech druhů ryb (Kouřil a kol., 2002). Dnes se nejčastěji distribuuje jako extrakt v podobě peletek, které se rozetřou a smíchají s fyziologickým roztokem pro zajištění optimální koncentrace. Neobsahuje analog GnRH ale přímo GtH II. Jelikož jde o přípravek přírodního původu, tak obsah jeho účinných látek může kolísat (Haffray a kol., 2005). Proto byly učiněny různě úspěšné pokusy o purifikaci a kalibraci obsahu účinné látky – gonadotropinu II a kapří hypofýza je nyní distribuována jako vyčištěný extrakt v podobě peletek (Yaron, 1995). V současnosti existuje trend přecházet od tohoto přípravku k jeho syntetickým analogům v lékové formě (Yaron a kol., 2002; Randák a kol., 2009; Wang a kol., 2009; Policar a kol., 2010). Hlavními důvody jsou: těžce stanovitelná koncentrace podávaných účinných látek, riziko zavlečení patogenních agens či nepřiměřená imunitní reakce akceptora (Yaron, 1995; Haffray a kol., 2005).

V tomto experimentu byla použita lyofilizovaná kapří hypofýza původem z Rybářství Pohořelice a. s. Rybám byla podána celková dávka 5 $mg \times kg^{-1}$ ve dvou dílčích aplikacích s rozestupem 12 hodin. První dávka činila 10 % celkové dávky hypofýzy (Adámková-Stibranyiova a kol., 1999).

Piskoř byl v minulosti využíván k detekci aktivity kapří hypofýzy (Lusk a kol., 1983). Z toho lze odvodit, že je k tomuto přípravku dostatečně citlivý. V našem experimentu sloužil CPE jako pozitivní kontrola. Extrakt z kapří hypofýzy již byl využit k hormonální stimulaci piskoře za účelem zisku gamet (Kouřil a Hamáčková, 1996; Adámková-Stibranyiova a kol., 1999, Drozd a kol., 2009).

3.3.2. Chorulon

Přípravek Chorulon (Intervet International B. V., Holandsko) je využíván ke stimulaci ryb po dobu minimálně dvou posledních dekád (Richter a kol., 1987; Křištan a kol., 2013). Balení obsahuje deset ampulek. Pět z nich obsahuje fyziologický roztok a zbylých pět ampulek obsahuje prášek s humánním choriovým gonadotropinem (hCG) o koncentraci 1500 IU (International Units) na ampulku. V tomto pokusu byl testován tento přípravek ve dvou dávkách a to 1500 $IU \times kg^{-1}$ a 3000 $IU \times kg^{-1}$. Chorulon není v České republice na seznamu povolených přípravků k hormonální stimulaci ryb a proto je třeba při jeho použití žádat o výjimku Státní veterinární správu ČR (Policar a kol., 2011b). Přípravek byl aplikován ve dvou dílčích dávkách. Nejprve 150 respektive 300 $IU \times kg^{-1}$ a poté 1350 respektive 2700 $IU \times kg^{-1}$.

HCG je jeden z nejčastěji používaných preparátů k hormonální stimulaci piskoře a jemu příbuzných druhů (Saat, 1980; Suzuki, 1983; Peter a kol., 1988; Yu a kol., 1995).

3.3.3. Pregnyl

Účinnou látkou Pregnylu (Pregnyl, N.V.Organon, Oss. Holandsko) je hCG obvykle v koncentraci 5000 IU či 1500 IU. Tento přípravek je využíván v humánní medicíně zejména ke kontrolované ovariální stimulaci u žen (Ezcurra a Humaidan, 2014). Účinná látka přípravku je extrahována z moči těhotných žen (Mannaerts a kol., 1998). Je dodáván ve formě prášku a před vlastním použitím je rozmíchán v přibaleném rozpouštědle. Tento přípravek byl v tomto experimentu použit ve dvou koncentracích a to 1500 IU×kg^{-1} a 3000 IU×kg^{-1}. Pregnyl byl aplikován ve dvou dílčích dávkách (stejné schéma jako u Chorulonu viz 3.3.2.).

Jak již bylo zmíněno u přípravku Chorulon, tak hCG již byl využit ve stimulaci piskoře.

3.3.4. Ovaprim

Hormonální preparát Ovaprim (Syndel, Kanada) je komplexem analogů lososích hypotalamických hormonů (D-Arg^{6}, Pro^{9}-Net – *s*GnRH). Jako inhibitor dopaminu u tohoto přípravku funguje domperidone. Koncentrace *s*GnRHa je 20 µg×ml^{-1} a koncentrace domperidonu je 10 mg×ml$^{-1,}$ Tento přípravek je dodáván jako kapalina o objemu 10 ml v lahvičkách, takže jej lze okamžitě používat. Výrobce udává, že jedna dávka (0,5 ml×kg^{-1}) u většiny druhů dostačuje k navození ovulace/spermiace. V tomto experimentu bylo použito dvou dávek, kdy první obsahovala 10 % a druhá 90 % dávky. Tento přípravek byl použit ve dvou koncentracích a to 1 ml×kg^{-1} a 2 ml×kg^{-1}.

Ovaprim již byl využit k hormonální stimulaci piskoře pruhovaného (Hliwa a kol., 2011). U příbuzných druhů z čeledi Cobitidae byl využit u sekavky nádherné - *Chrombotia macracanthus* (Legendre a kol., 2012) a u *Kichulchoia brevifasciata* (Myeong-Hun and In-Chul, 2014). U sekavce tajvanského bylo využito *s*GnRH s domperidonem ve stejných koncentracích (Lin a kol., 1991).

3.3.5. Ovopel

Přípravek Ovopel (AgroFish či Unic-Trade, Maďarsko) je dodáván v podobě bílých peletek, které svým vzezřením imitující široce rozšířenou lyofilizovanou kapří hypofýzu. Tento přípravek obsahuje jednak savčí analog GnRHa (*des* Gly^{10}, D-Ala^{6}, Pro^{9}-NHet – *m*GnRH*a*) v koncentraci 18 - 20 $\mu g \times kg^{-1}$, tak i inhibitor dopaminu metoclopromide v koncentraci 2 $mg \times kg^{-1}$ (Horvath a kol., 1997). Doporučená dávka je jedna peletka (o průměrné hmotnosti 25 mg) na 1 kg samic všech vhodných druhů ryb, pro které je tento přípravek doporučen (Kouřil a kol., 2011).

Pro přípravu roztoku bylo odebráno požadované množství pelet, které byly opatrně rozetřeny v třecí misce pomocí tloučku. Oproti peletám kapří hypofýzy je Ovopel tvrdší a je třeba třecí misku zakrýt (např. potravinovou folií), aby nedocházelo k vylétávání pelet. Po rozetření bylo přidáno potřebné množství fyziologického roztoku k dosažení odpovídající koncentrace. Poté by přípravek aplikován ve dvou dílčích dávkách (10 % a 90 %). V našem experimentu bylo ke stimulaci samic využito dávky 1 $peletka \times kg^{-1}$.

Tento přípravek již byl využit k hormonální stimulaci piskoře (Hliwa a kol., 2010, 2011).

3.3.6. Dagin

Dagin (Gan Samueal Fish – Hatchery, Izrael) je dodáván v podobě lyofilizovaného prášku v ampulkách uzavřených gumovou zátkou. Jednotlivé ampulky představují dávku celkově pro 20 nebo 40 kg samic. Jeho složení představuje funkční analog lososího GnRH (*des* Gly^{10}, D-Arg^{6}, Pro^{9}NHet – *s*GnRH*a*) v koncentraci 10 $\mu g \times kg^{-1}$ spolu s inhibitorem dopaminu metoclopramide v koncentraci 20 $mg \times kg^{-1}$ (Yaron a kol., 2002). Před samotnou aplikací je třeba prášek rozmíchat s fyziologickým roztokem. Běžně se dávkuje 1 ml roztoku na kilogram samic (Vavrečka a kol., 2010). V našem experimentu bylo využito 1 $mg \times kg^{-1}$ přípravku (použita ampule na 40 kg samic) ve dvou dílčích dávkách a to 10 % přípravku v první a 90 % v druhé.

Tento přípravek pravděpodobně zatím nebyl testován na piskoři ani jemu příbuzném druhu.

Mezi další, v rybářské praxi používané, preparáty patří například Supergestran, Gonazon, Kobarelin, Synachorin či Aquaspawn (Haffray a kol., 2005; Kouřil a kol., 2008a; Vavrečka a kol., 2010).

3.4. Hormonální stimulace ryb

Přípravky byly injikovány intramuskulárně ve dvou dílčích dávkách do hřbetní svaloviny. Koncentrace každého přípravku byla vypočítána tak, aby celkový objem roztoku injikovaný do těla ryby činil maximálně 0,2 ml. První dávka (tzv. přípravná) obsahovala jednu desetinu koncentrace celkové dávky (Tab. 1). Druhá dávka, aplikovaná za 12 hodin po první dávce, obsahovala zbylých 90 %. Vpich první dávky byl aplikován do hřbetu blíže k ocasu. Druhá dávka pak byla aplikována blíže k hlavě. Po injikaci bylo místo vpichu mírně promasírováno mokrým ukazovákem ruky, aby se předešlo úniku přípravku. Aplikace ve dvou dávkách snižuje délku doby latence (Adámková-Stibranyiova a kol., 1999). Ryby byly před samotnou injikací anestezovány v koupeli s hřebíčkovým olejem o koncentraci 0,05 ml×l^{-1}. Po dosažení anestezie byla každá ryba individuálně zvážena na digitálních váhách s přesností 0,1 g a položena na vlhkou tkaninu. Takto zjištěná hmotnost byla poté využita ke zjištění, zda se významně změnila hmotnost jikernačky pomocí vzorce $\Delta W_H = \frac{t \times (W_0 - W_1)}{24 \times W_1} \times 100$; (%×den^{-1}). ΔW_H je změna hmotnosti samice; W_0 je hmotnost samice na začátku experimentu; W_1 hmotnost samice před první aplikací preparátu. Ve 23:30 dne 22. 4. 2014 bylo započato s injikací prvních dávek hormonálních preparátů do těla ryb.

Nejprve byli hypofyzováni samci. Těm byl aplikován extrakt z kapří hypofýzy v první dávce o koncentraci 0,5 mg×kg^{-1}(Tab. 1).

Tabulka 1: Hmotnost samic a samců, hormonální preparáty a jejich dávkování. Rozdíl v hmotnosti samic mezi skupinami I-X nebyl signifikantní One-way ANOVA, p = 0,977).

Skupina	Počet	Hmotnost (g)		Preparát	První dávka	Druhá dávka	Interval mezi dávkami
		Průměr	Rozpětí				
Skupina I	5	42,0	37-52	CPE (5 mg×kg^{-1})	0,5	4,5	12
Skupina II	5	43,6	37-52	Pregnyl (3000 IU×kg^{-1})	300	2700	12
Skupina III	5	42,4	36-52	Chorulon (3000 IU×kg^{-1})	300	2700	12
Skupina IV	5	46,6	37-59	Ovopel (peleta×kg^{-1})	0,1	0,9	12
Skupina V	5	42,4	33-50	Dagin (lahvička×40kg^{-1})	0,1	0,9	12
Skupina VI	5	45,0	36-51	Pregnyl (1500 IU×kg^{-1})	150	1350	12
Skupina VII	5	45,2	39-53	Chorulon (1500 IU×kg^{-1})	150	1350	12
Skupina VIII	5	42,4	31-54	Ovaprim (1 ml×kg^{-1})	0,1	0,9	12
Skupina IX	5	45,2	37-53	Ovaprim (2 ml×kg^{-1})	0,2	1,8	12
Skupina X	5	43,2	40-51	Fyziologický r. (1 ml×kg^{-1})	0,2	0,8	12
Samci	30*	27,8	24-35	CPE (5 ml×kg^{-1})	0,5	4,5	12

* Ke zjištění hmotnosti samců jich bylo zváženo 30

Dále bylo postupováno dle následujícího harmonogramu.

00:30 injikována 1. dávka hypofýzy (0,5 mg×kg^{-1}) samicím sk. 1

00:40 injikována 1. dávka Pregnylu 3000 IU×kg^{-1} (300 IU×kg^{-1}) sk. 2

01:00 injikována 1. dávka Chorulonu 3000 IU×kg^{-1} (300 IU×kg^{-1})sk. 3

01:30 injikována 1. dávka Ovopelu (0,1 pelety×kg^{-1}) sk. 4

02:10 injikována 1. dávka Daginu (0,1 mg×kg^{-1}) sk. 5

02:30 injikována 1. dávka Pregnylu 1500 IU×kg^{-1} (150 IU×kg^{-1}) sk. 6

03:10 injikována 1. dávka Chorulonu 1500 IU×kg^{-1} (150 IU×kg^{-1}) sk. 7

03:30 injikována 1. dávka Ovaprimu 1ml/kg (0,1 ml×kg^{-1}) sk. 8

03:35 injikována 1. dávka fyziologického roztoku (V= 0,2 ml na samici) sk. 10

04:05 injikována 1. dávka Ovaprimu 2ml/kg (0,2 m×kg^{-1}) sk. 9

Skupina, která dostala dávku pouze fyziologického roztoku, sloužila jako negativní kontrola. Skupina injikovaná extraktem z lyofilizované kapří hypofýzy (CPE) sloužila jako pozitivní kontrola. Z harmonogramu je patrné, že injikace prvních dávek preparátů trvala tři hodiny a 45 minut.

Dne 23. 4. 2014 v 11:55 bylo přistoupeno k aplikování druhých dávek. První byli stimulováni opět samci. Druhá dávka CPE měla koncentraci 4,5 mg×kg^{-1}. Poté se postupovalo dle harmonogramu. Ryby byly opět nejprve anestezovány (hřebíčkový olej 0,05 ml×l^{-1}) a zváženy na digitálních váhách s přesností na 0,1 g. Zjištěná hmotnost dále posloužila k otestování, zda hormonální preparát ovlivňuje průměrnou denní změnu hmotnosti samice od 1. aplikace preparátu po čas před druhou aplikací preparátu. Tak bylo učiněno pomocí vzorce $\Delta W_H = \frac{t \times (W_0 - W_1)}{24 \times W_1} \times 100$; (%×den^{-1}). ΔW_H je změna hmotnosti samice; W_0 je hmotnost samice před aplikací první dávky; W_1. hmotnost samice před aplikací 2. dávky.

12:05 injikována 2. dávka CPE (4,5 mg×kg^{-1}) sk. 1

12:40 injikována 2. dávka Pregnylu 3000 IU×kg^{-1} (2700 IU×kg^{-1}) sk. 2

13:10 injikována 2. dávka Chorulonu 3000 IU×kg^{-1} (2700 IU×kg^{-1}) sk. 3

13:35 injikována 2. dávka Ovopelu 1peleta×kg^{-1} (0,9 pelety×kg^{-1}) sk. 4

14:05 injikována 2. dávka Daginu (0,9mg×kg^{-1}) sk. 5

14:40 injikována 2. dávka Pregnylu 1500 IU×kg^{-1} (1350 IU×kg^{-1}) sk. 6

15:05 injikována 2. dávka Chorulonu 1500 IU×kg^{-1} (1350 IU×kg^{-1}) sk. 7

15:55 injikována 2. dávka Ovaprimu 1ml×kg^{-1} (0,9 ml×kg^{-1}) sk. 8

16:10 injikována 2. dávka fyziologického roztoku (V=0,2 ml na samici) sk. 10

16:15 injikována 2. dávka Ovaprimu 2 ml×kg^{-1} (1,8 ml×kg^{-1}) sk. 9

Aplikace druhých dávek trvala celkem 4 hodiny a 10 minut.

3.5. Výtěr a oplození pohlavních produktů

Přibližně hodinu před předpokládaným výtěrem prvních samic (tj. po 16 hodinách po aplikaci druhé dávky) bylo začato s kontrolami připravenosti k výtěru. Ty byly prováděny jemnou palpací břišní dutiny. Od tohoto času probíhaly kontroly v 60 minutových intervalech. Kontroly probíhaly velmi pečlivě a zároveň opatrně, aby nedošlo k poranění ryb. Pokud při mírném promasírování břicha vypouštěla samice jikry, tak bylo přistoupeno k jejímu výtěru.

Samice z každé skupiny byly před provedením výtěru anestezovány v roztoku hřebíčkového oleje (0,05 ml×l^{-1}). Vědra s anestetickou koupelí byly označeny vždy jen pro jednu konkrétní skupinu. Tím bylo předcházeno pomíchání samic z různých skupin. Po navození anestezie byly samice zváženy s přesností na 0,1 g. Zjištěná předvýtěrová hmotnost dále posloužila k otestování vlivu hormonálního preparátu na průměrnou denní změnu hmotnosti samice od aplikace preparátu po čas před výtěrem. Tak bylo učiněno pomocí vzorce $\Delta W_H = \frac{t\times(W_0-W_1)}{24\times W_1} \times 100$; (%×den^{-1}). ΔW_H je změna hmotnosti samice; W_0 je hmotnost samice před aplikací druhé dávky; W_1 je předvýtěrová hmotnost samice. Po získání tohoto údaje byl testován vliv preparátu na zisk vody samicí a vliv tohoto jevu na vybrané reprodukční ukazatele.

Po zjištění hmotnosti byla samice položena na navlhčenou tkaninu. Poté byla samice šetrně uchopena jednou rukou pracovníka břichem vzhůru. Následně byla asistentem osušena urogenitální papila a její okolí. Pracovník počal palcem volné ruky jemně masírovat břicho samice tak, aby postupně byly vypuzeny všechny ovulované jikry z těla. Během výtěru byla k urogenitální papile přiložena předem umytá a suchá plastová kompotová miska. Tu přidržoval asistent ve vhodné poloze (Obr. 11 b). Každá miska byla předem označena specifickým kódem odpovídající kódu samice. Po skončení výtěru byly jikry zváženy na digitální váze s přesností na 0,01 g. Tento údaj byl použit k výpočtu relativní plodnosti samice a to jak procentuální podíl k hmotnosti těla samice ($RP_p = \frac{W_j}{W_p} \times 100$; [% b.w.]), tak jako počet jiker na gram hmotnosti samice ($RP_p = \frac{N_j}{W_p}$; [ks×g^{-1}]). RP_p značí relativní pracovní plodnost; W_j celková hmotnost všech

vytřených jiker; W_v předvýtěrová hmotnost samice, N_j je počet kusů vytřených jiker. Byly zvoleny obě relativní pracovní plodnosti z toho důvodu, že relativní plodnost vyjádřená v % b.w. počítá i s množstvím ovariální tekutiny, jejíž množství se může lišit. Jelikož samice během aklimatizace na laboratorní podmínky hladověly, tak nám odpadá zkreslení relativní plodnosti v podobě různě naplněných zažívadel. Po zvážení vytřených jiker byly misky s vytřenými jikrami schraňovány na chladné podlaze líhně přikryté vlhkým hadrem. Tak bylo zabráněno jejich oschnutí. Takto uložené jikry vydržely až do oplození. Během celého procesu bylo nezbytně nutné dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci gamet vodou. Voda by způsobila aktivaci vytřených pohlavních produktů a tím jejich znehodnocení. Údaje o výtěru (datum, čas, označení samice, pracovní a relativní plodnost) byly zaznamenávány do výtěrových listů. Po výtěru samice byla zaznamenána vytřenost samice v kategoriálním měřítku. To znamená, zda bylo možné samici vytřít úplně či jen částečně. Z takto zjištěných informací byl proveden výpočet pravděpodobnosti té které vytřenosti v závislosti na preparátu. Výpočet byl proveden dle $P_v = \frac{V_x}{V_c}$, kde P_v je pravděpodobnost vytřenosti; V_x kolik samic mělo částečnou vytřenost nebo úplnou (v závislosti na tom, která z těchto dvou vytřeností je počítána); V_c celkový počet vytřených samic. Oba faktory vytřenosti byly považovány za stejně pravděpodobné. Je to z toho důvodu, že se v literatuře o řízené reprodukci piskoře často nevyskytují údaje o vytřenosti samic. V literatuře jsou dostupné údaje pouze o tom, zda samice ovulovaly či nikoliv (např. Hliwa a kol., 2011).

Zjištěné množství jiker bylo použito k otestování, zda hmotnost samice ovlivňuje její pracovní plodnost. Bylo sledováno i procento ovulujících/neovulujících samic a průměrná doba latence. Interval latence je časový interval mezi aplikací druhé dávky a časem výtěru. Dalším sledovaným parametrem byla míra synchronizace výtěru, tj. časový interval, během kterého byla vytřena první až poslední samice. Znalost předchozích dvou údajů usnadňuje obsluze práci na líhni a předchází spontánním výtěrům.

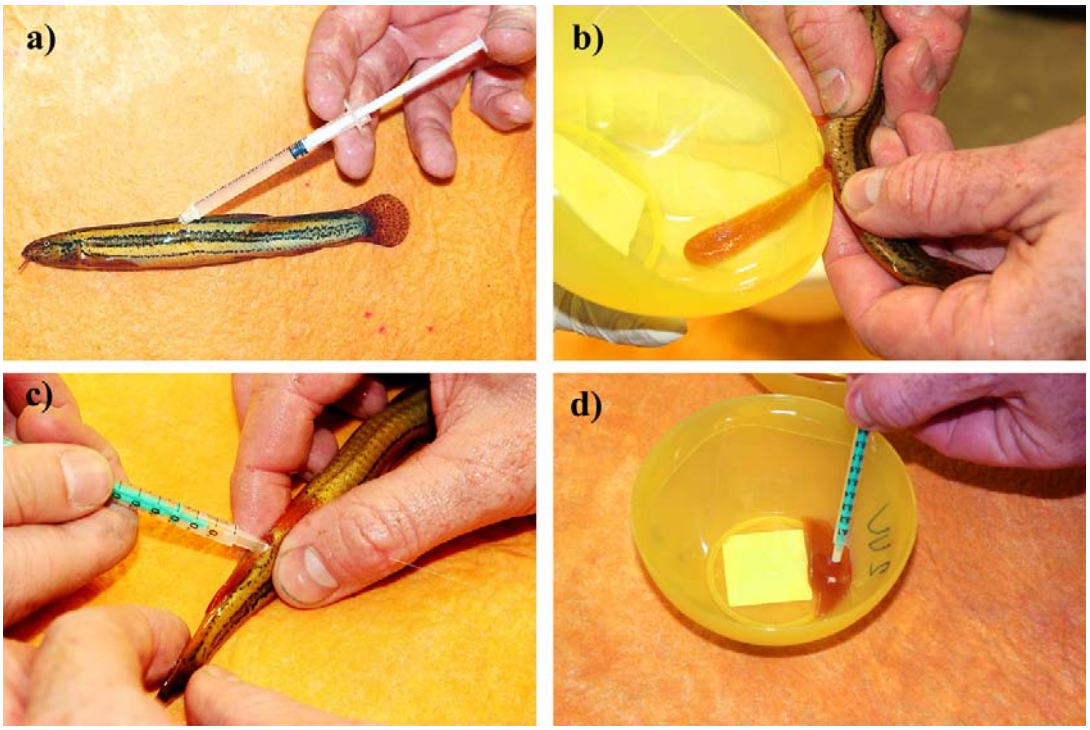
Během každého výtěru bylo odebráno několik vzorků jiker, které byly laboratorně analyzovány (viz kapitola 3.6).

Po získání jiker bylo započato s výtěrem samců. Před výtěrem byl každý samec uspán v lázni s hřebíčkovým olejem (0,05 ml×l^{-1}). Po dosažení anestezie byl uchopen pracovníkem břichem vzhůru a asistent osušil urogenitální papilu. Poté pracovník masíroval břicho samce tak, aby vypuzoval sperma. Uvolněné sperma bylo odebíráno

do mililitrové stříkačky vždy od několika samců (Obr. 11 c). Po získání dostatečného objemu spermatu (cca 0,05 – 0,25 ml – v závislosti na množství jiker k oplození) bylo pokračováno oplozováním vytřených jiker.

Vlastní oplození jiker probíhalo takzvanou suchou (německou nebo také švýcarskou) metodu (Kouřil a kol., 2008b). Ta spočívá v nakapání potřebného množství spermatu na jikry s ovariální tekutinou (Obr. 11 d). Množství použitého spermatu bylo odhadnuto k množství jiker tak, aby podíl spermatu vůči jikrám byl stejný u všech skupin. Jelikož ve stříkačce bylo sperma od několika samců, bylo oplození heterospermatické (Kocour a kol., 2012). Poté byla směs jiker a spermatu promíchána a následně aktivována přilitím vody z líhně (Příloha 1). Objem přilité vody byl ekvivalentní objemu jiker. Poté byla miska s oplozenými jikrami nechána v klidu bez míchání cca 3 minuty. Po uplynutí cca 3 minut byla voda slita a jikry byly propláchnuty. Proplachování bylo opakováno, dokud z jiker neodtékala čirá voda. Tímto byla kromě nečistot odstraněna i mírná lepkavost jiker.

Poté bylo z misky odebráno plastovou lžící 3× cca 300 jiker. Každý 300ks set jiker



Obrázek 11: Proces výtěru a oplozování jiker piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis* L.).
a) Intramuskulární aplikace preparátu; **b)** Výtěr samice do čisté a suché misky; **c)** odběr spermatu do injekční stříkačky; **d)** hererospermatické oplození jiker. Foto: Martin Chytrý a Jakub Žák

byl převeden k inkubaci do 5l akvárií připravených ve žlabech recirkulačního systému v Českých Budějovicích (Obr. 12). Tyto odebrané sety jiker sloužily ke studiu vlivu preparátu na míru oplození a líhnivost jiker (viz DP Houda nepubl.). Zbytek jiker byl

převeden do kolébky z uhelonu ve žlabu RAS. Na závěr byla sledována bezprostřední (4 hod po vytření) povýtěrová mortalita generačních ryb.

Po zjištění, které samice ovulovaly a které ne, byl spočten koeficient inbreedingu. Ten byl spočten pro zjištění, zda počet použitých generačních ryb vyhovuje požadavkům pro management ohrožených druhů (Flajšhans a Ráb, 2013). Podle vzorce $N_e = \frac{4(počet\ samic)(počet\ samců)}{počet\ samic+počet\ samců}$ byla nejprve zjištěna efektivní velikost populace (N_e). Ta byla následně dosazena do vzorce pro výpočet koeficientu inbreedingu $\Delta F = \frac{1}{2N_e}$.

Po ukončení experimentu byly všechny generační ryby vypuštěny zpět do experimentálního rybníčku na pokusnictví ve Vodňanech.

Obrázek 12: Odchovná zařízení v Českých Budějovicích. a) Experimentální 5 l akvária se stálým přítokem vody připravená k nasazení oplozených jiker. b) Kolébka u uhelonu k „masové“ produkci larev piskoře. Foto: Bořek Drozd

3.6. Laboratorní analýza vzorků

3.6.1. Gravimetrická analýza neoplozených jiker

První vzorek jiker bylo odebrání cca 100 jiker kopistkou do předem zvážené a označené ependorfky. Tyto vzorky sloužily k zjištění průměrné mokré hmotnosti jikry (hmotnost jikry v nativním stavu bez předchozí úpravy a obsahu vody v ní). Po odebrání vzorku, byly ependorfky individuálně zváženy na analytických vahách s přesností na 0,0001 g. Poté byly odebrané vzorky zakápnuty 4% roztokem formaldehydu a uchovávány v chladu. Druhý den byly jikry v každé ependorfce spočítány. Po vydělení počtu jiker jejich zjištěnou hmotností byla určena průměrná hmotnost vytřené jikry. Spočítané jikry z ependorfek byly přeneseny na označené a předem zvážené filtrační papíry a dány do vysoušecí pece na 12 hod při teplotě 55 °C. Tímto procesem vzniká tzv. sušina, tj. neodpařitelný zbytek látky (vzorku), který zbude po zahřívání a odpařování až do konstantní hmotnosti, tedy do stavu, kdy se všechny odpařitelné

látky (voda) beze zbytku odpaří a žádné další se již dále neodpařují. Poté byly papíry společně s vysušenými jikrami zváženy na analytických vahách s přesností na 0,0001 g. Podíl sušiny pak byl určen jako procentuální podíl suché hmotnosti vzorku vůči mokré hmotnosti.

Zjištěné hmotnosti jiker byly využity k ověření, zda existuje vztah mezi hmotností samice a velikostí (hmotností) jiker.

3.6.2. Prvková a energetická analýza neoplozených jiker

Druhý vzorek byl odebírán do plastových kontejnerků. Do nich bylo odebíráno 1 g jiker od každé samice v rámci jedné skupiny (přípravku). V průběhu experimentu byly kontejnerky uchovávány v chladničce. Tento vzorek byl poté odeslán k chemické analýze do chemické laboratoře. Vytřené neoplozené jikry byly podrobeny testům v chemické laboratoři, které určili prvkové složení (C, N, H, S, O) a energetickou hodnotu jiker (kJ×g-1). Vzorky byly po odebrání až do jejich zpracování zamraženy při -80°C. Následně byly vzorky rozmraženy, usušeny (stejným způsobem jako v případě gravimetrických analýz), homogenizovány a analyzovány pomocí prvkového analyzátoru CHNS/O ThermoFinniganFlash EA 1112 (Finnigan, Itálie). Podstatou této analytické metody je spálení vzorku v proudu kyslíku za vysoké teploty s následnou separací vzniklých plynů a detekci jednotlivých prvků na TCD detektoru. Stejným způsobem byly připraveny i vzorky na energetické analýzy, při kterých bylo termickou analýzou za pomocí kalorimetru MS 10A (Laget, ČR) měřeno množství uvolněné energie a určeno tzv. spalné teplo ($kJ \times g^{-1}$). Každá z analýz byla pro každou skupinu udělána v tripletu tj. analýza po 3 vzorcích na skupinu. Poté bylo vyhodnoceno relativní zastoupení zkoumaných prvků v jikře.

3.7. Statistická analýza

Všechna data byla před statistickým testováním otestována na normalitu rozdělení a homoskedacitu. Normalita dat byla ověřována diagnostickými grafy a Shapiro-Wilksovým testem normality ($p>0,05$). Ověření homoskedacity (stejnosti rozptylu) bylo prováděno pomocí Levene's testu variance ($p>0,05$). Při splnění normality a homoskedacity bylo využito dvouvýběrového t-testu a jednostranné analýzy variance (One-way ANOVA). Při nalezení signifikantního rozdílu ($p<0,05$) byl použit post-hoc Tukey's HSD test. Při nesplnění zmíněných parametrů bylo použito přiměřené transformace dat. Při nesplnění normality rozdělení či stejnosti variance (nebo obojího)

bylo využito neparametrického Kruskal-Wallisova testu a poté *post-hoc* Nemenyi testu (Pohlert, 2014) nebo obecného mnohonásobného porovnávání (Giraudoux, 2015). Jelikož je Kruskal-Wallisův test testem neparametrickým, tak nám oproti parametrickým testům hrozí vyšší riziko zamítnutí nepravdivé hypotézy (Zvára, 2013). Proto bylo v této práci zvoleno v případě Kruskal-Wallisova testu hladiny významnosti $\alpha=0,01$. Pro prvkovou analýzu jiker a zjištění spalného tepla byly vždy směsné vzorky analyzovány v tripletu, tudíž nelze zajistit normalitu rozdělení. Proto k analýze bylo rovnou využito neparametrického Kruskal-Wallisova testu.

Ke statistickému zpracování a tvorbě grafů bylo využito statistického softwaru R ve verzi 3.1.2 (R Core Team, 2014) a další package (Fox, 2005; Pohlert, 2014; Giraudoux, 2015).

4. Výsledky

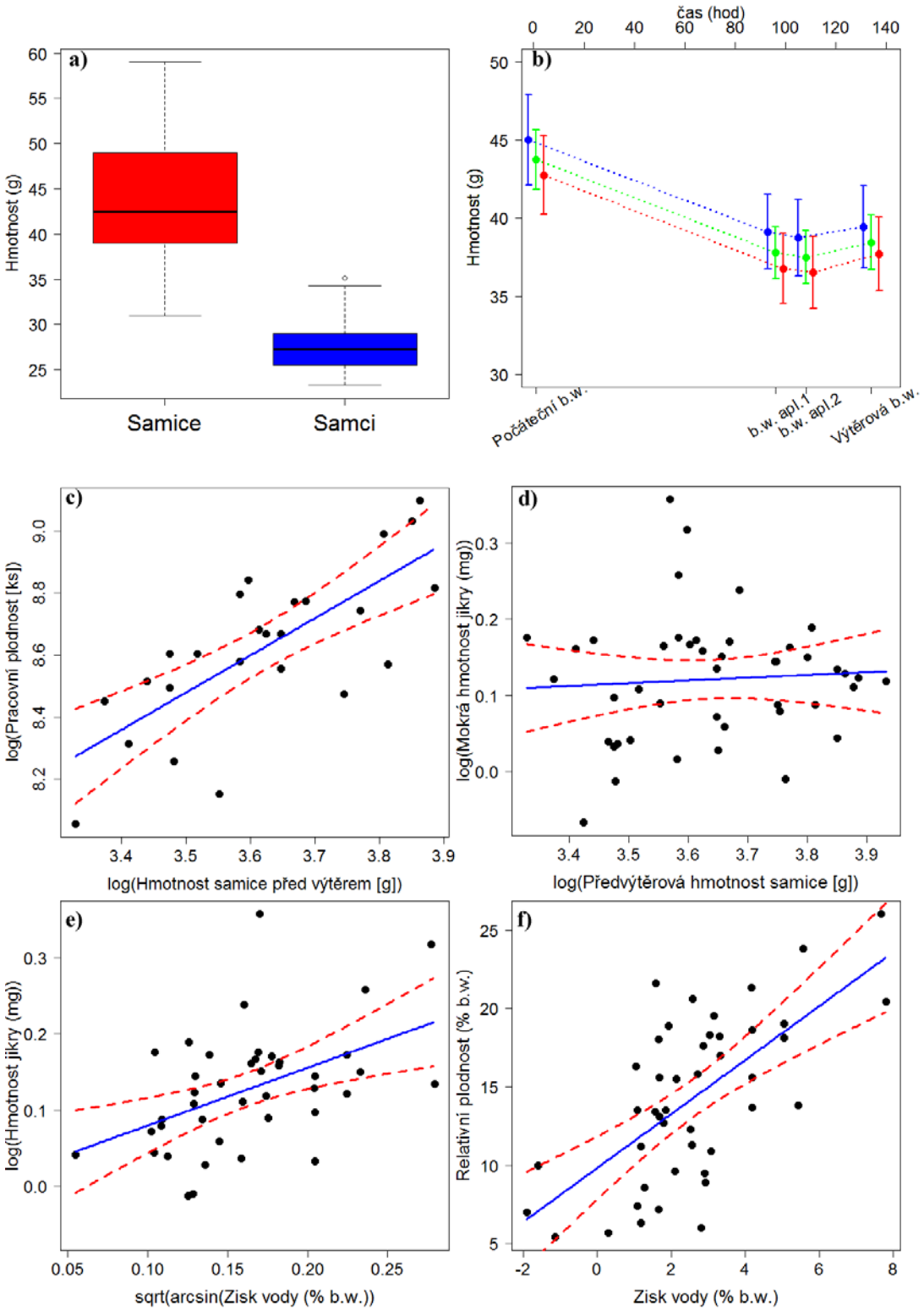
4.1. Obecné aspekty řízené reprodukce

V této práci byly oplozeny jikry 44 samic spermatem 77 samců. Efektivní velikost populace generačních ryb použitých k experimentu (N_e) činila 112. Po dosazení této hodnoty do vzorce určující koeficient příbuznosti za jednu generaci bylo zjištěno, že koeficient inbreedingu činil 0,446 %. To je přijatelná hodnota pro management záchranného chovu ohroženého druhu zajišťující pouze zanedbatelnou inbrední depresi (Flajšhans a Ráb, 2013).

Mezi pohlavími byl prokázán pohlavní dimorfismus v průměrné hmotnosti těla (Welchův t-test; t=12,45; p<0,001; Obr 13 a). Průměrná hmotnost samce v tomto experimentu činila 27,7 ± 3,05 g a samice 43,8 ± 6,27 g (průměr ± S.D.). Nejtěžší samice vážila 59 g. Naopak samice s nejnižší hmotností vážila 31 g. Nejtěžší samec vážil 35 g a nejlehčí 23,5 g. Konfidenční interval (95%) rozdílu hmotnosti mezi pohlavími činil 14,0 – 18,2 g.

Během pokusu se významně měnila hmotnost samic (Obr 13 b). Zprvu samice ztrácely hmotnost, jelikož během aklimatizace nepřijímaly potravu a došlo k jejich vylačnění. Během 96 hodin samice ztratily v průměru 13,5 ± 3,82 % b.w. (průměr ± S.D.), což je tempo ztráty 3,4 % b.w. denně. Ke zpomalení snižování hmotnosti došlo po aplikaci první (tzv. přípravné) dávky hormonálního preparátu u 36 % stimulovaných samic. Během 12 hodin se snížila hmotnost samic o 0,83 ± 2,35 % b.w. (průměr ± S.D.). To odpovídá tempu lačnění 1,66 % b.w. denně. K výraznému vzrůstu hmotnosti došlo po aplikaci druhé dávky preparátu u 93 % samic a to o 2,6 ± 1,99 % b.w. (průměr ± S.D.) během 26 hodin. To odpovídá průměrnému vzrůstu hmotnosti o 2,4 % b.w. za den. Všechny tyto rozdíly hmotnosti jsou vzájemně signifikantní (Kruskal-Wallis, X^2=104,5, p<0,001, mnohonásobné porovnání).

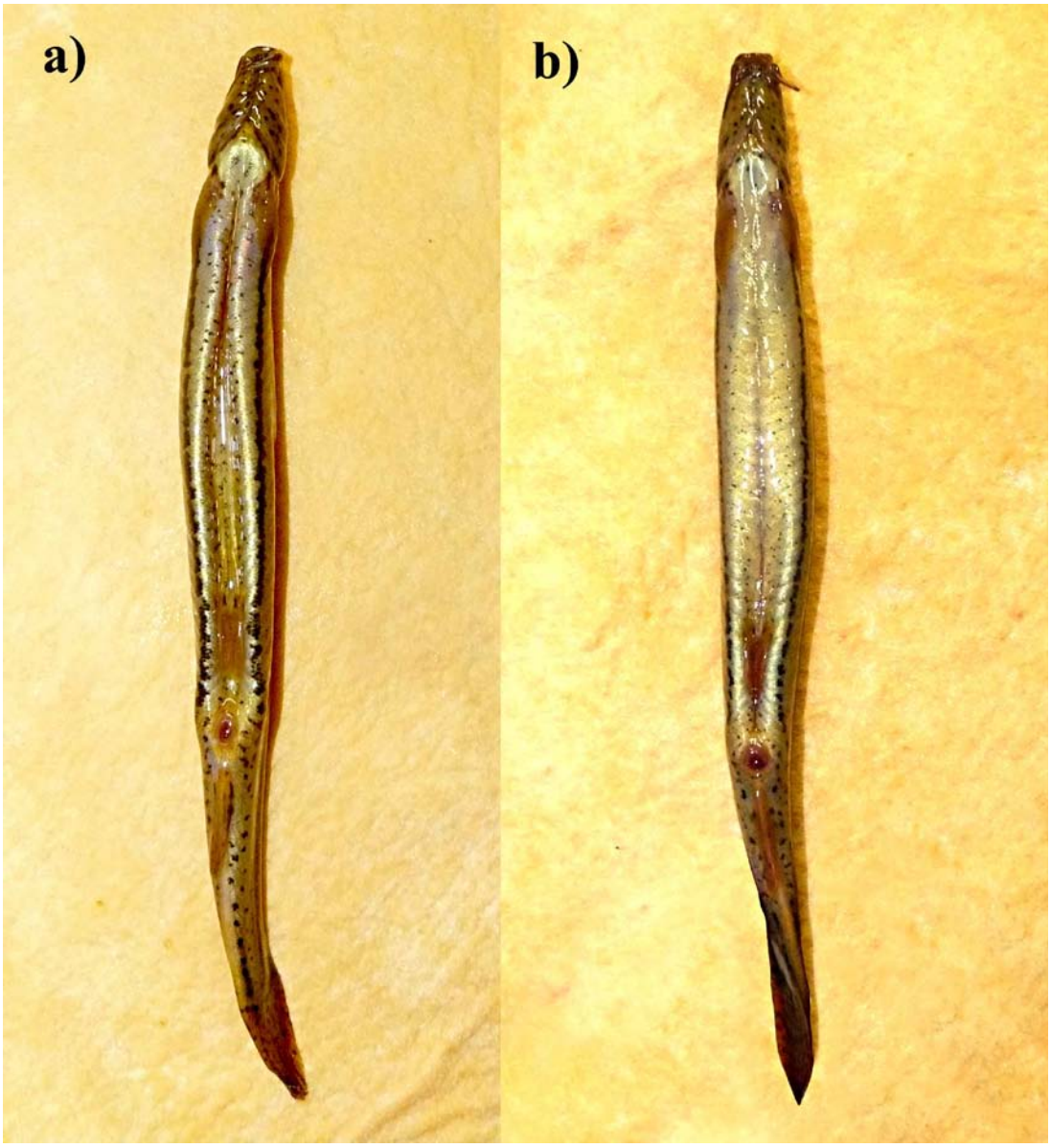
Změna hmotnosti po druhé aplikaci preparátu souvisela se zadržováním vody v těle samice. To kolik přijme samice vody po 2. aplikaci preparátu do výtěru má pozitivní vztah k tomu, jaká bude hmotnost jikry (Pearsonův korelační koeficient r=0,47, p=0,002; Obr. 13 e). Tento vztah vysvětluje 20 % variability (R^2=0,20). Množství zadržované vody bylo silně korelováno r = 0,65 (Pearsonův korelační koeficient, p<0,001) s relativní pracovní plodností vyjádřenou jako % b.w. (Obr. 13 f). Tento vztah vyjadřoval 41 % variability (R^2=0,41). Dá se tedy říci, že plodnější samice zadržely více



Obrázek 13: Vztahy mezi reprodukčními ukazately piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*). a**)** Pohlavní dimorfismus v hmotnosti těla (t-test, p < 0,001). Samice (N=50); Samci (N=30). **b)** Změna hmotnosti vytřených samic (N=44) v průběhu experimentu. Zelená = průměr (N=44). Modrá pro úplně vytřené samice (N=25) a červená pro částečně vytřené (N=19). Chybové úsečky jsou 95 % konfidenční interval. **c)** Vztah hmotnosti smice k pracovní plodnosti. (N=25). **d)** Vztah mezi hmotností samice a hmotností jikry, **e)** Korelace mezi ziskem vody a hmotností jikry, **f)** Vztah mezi ziskem vody a relativní plodností (% b.w.). Modré křivky jsou regresní přímky.Červené křivky jsou konfidenční intervaly (95%).

vody.

Množství jiker vytřených z jedné samice při umělém výtěru (tj. pracovní plodnost) bylo pozitivně korelováno s předvýtěrovou hmotností samice (Pearsonův korelační koeficient r=0,74, p<0,001; Obr 13 c). To znamená, že větší samice produkovaly větší



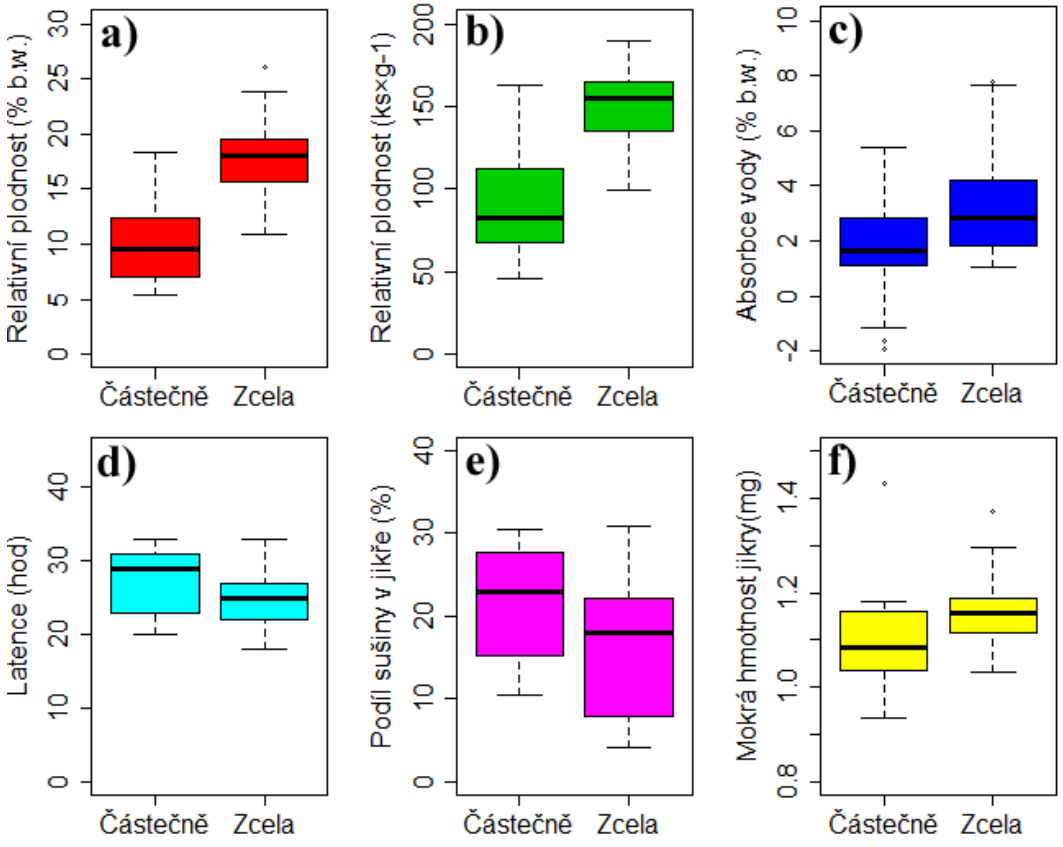
Obrázek 14: Rozdílná vytřenost samic piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*). a**)** Zcela vytřená samice **b)** částečně vytřená samice. Foto: Jakub Žák

množství jiker. Tento vztah vysvětluje 53 % variability (R^2=0,53). Do této analýzy byly zahrnuty pouze samice, které byly prokazatelně úplně vytřeny (N=25). V tomto pokusu nebyl prokázán žádný vztah mezi velikostí samice a hmotností jikry (Pearsonův korelační koeficient, p=0,66; Obr 13 d). Plodnější samice měly v jikrách významně méně sušiny (Pearsonův korelační koeficient, p=0,02, r= -0,35). Tento vztah vysvětluje 10 % variability (R^2=0,10).

Některé samice nebyly vytřeny úplně, ale jen část jejich vaječníku ovulovala jikry (Obr. 14 b; Obr. 15; Tab. 2). Tato dysfunkce byla významně ovlivněna použitým preparátem (X^2=72,81; p<0,001).

Po rozdělení samic na skupinu úplně vytřených (N=25) a částečně vytřených (N=19) bylo zjištěno, že částečně vytřené samice měly v průměru nižší relativní plodnost (poměr celkové hmotnosti vytřených jiker ku celkové hmotnosti samice před výtěrem) než úplně vytřené samice (t-test; t= -7,14; p<0,001; Obr. 15 a, b). Částečně vytřené samice měly v průměru o 5,6 až 9,8 % b.w. respektive o 43 až 78 ks×g^{-1} méně jiker (95% konfidenční interval). Úplně vytřené samice měly relativní plodnost v průměru 17,6 ± 3,63 % b.w. respektive 150 ± 25 ks×g^{-1} jiker a částečně vytřené dosahovaly hodnoty relativní plodnosti 9,8 ± 3,50 % b.w. respektive 90 ± 32 ks×g^{-1} (průměr ± S.D.) jiker.

Částečně vytřené samice absorbovaly méně vody v intervalu po druhé dávce



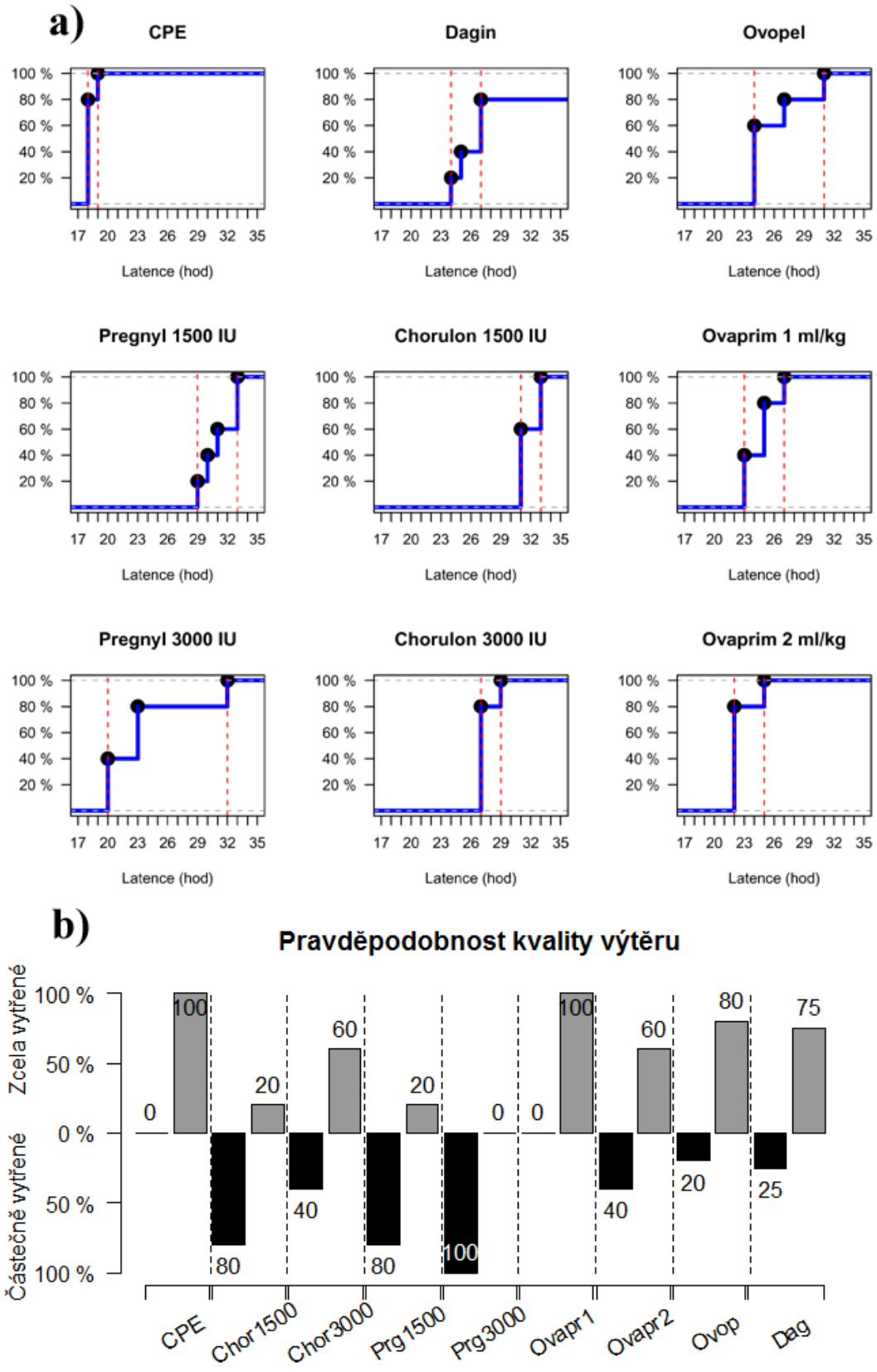
Obrázek 15: Vliv vytřenosti na reprodukční ukazatele řízené reprodukce piskoře pruhovaného *Misgurnus fossilis* (t-test, p<0,05). a**)** Graf relativní plodnosti vyjádřené v % b.w.; **b)** Graf relativní plodnosti v ks jiger na 1 gram předvýtěrové hmotnosti samice; **c) a**bsorbce vody (% b.w.) v závislosti na vytřenosti samice; **d)** Graf intervalu latence v závislosti na vytřenosti samic; **e)** Podíl sušiny v jikře v závislosti na vytřenosti samice v hmotnostních % vztažených k mokré hmotnosti jikry; **f)** Graf mokré hmotnosti jikry ovlivněné vytřeností samice; Silná čára v boxplotu značí median.

preparátu a vytřením (t-test; t=-2,89; p=0,006). Úplně vytřené samice absorbovaly v průměru 3,3 ± 1,84 % b.w. respektive 1,18 ± 0,692 g vody, zatímco částečně vytřené samice zvýšily podíl vody ve svém těle jen o 1,7 ± 1,85 % b.w. respektive o 0,68 ± 0,746 g (Obr. 15 c). Stejně tak měly částečně vytřené samice delší interval latence 27,3 ± 4,72 hod. než úplně vytřené 24,5 ± 4,11 hod. (průměr ± S.D.; Obr. 15 d). Tento vztah je však jen slabě signifikantní (t-test; t=2,09; p=0,04). Podobně slabý vztah (t-test; t=2,06; p=0,05) byl nalezen v rozdílném podílu sušiny v jikrách u vytřených 16,7 ± 8,34 % respektive 0,19 ± 0,094 mg a u částečně vytřených samic 21,6 ± 7,08 % respektive 0,24 ± 0,082 mg (průměr ± S.D.; Obr. 15 e). U částečně vytřených samic byl podíl sušiny v jikře v průměru o 0,1 až 9,7 % vyšší (95 % konfidenční interval). Úplně vytřené samice v průměru produkovaly jikry o vyšší hmotnosti a to o 0,01 až 0,12 mg (95 % konfidenční interval). Tento vztah byl signifikantní p=0,03. Průměrná hmotnost jikry u úplně vytřené samice činila 1,16 ± 0,076 mg zatímco u částečně vytřené samice 1,09 ± 0,110 mg.

4.1. Řízená reprodukce v závislosti na preparátu

Po podání hormonálních preparátů došlo k ovulaci u 98 % ze všech stimulovaných samic. Ve většině skupin ovulovaly všechny samice mimo skupinu samic stimulovaných Daginem. V této skupině ovulovalo 80 % samic (Obr. 16a). Tato hodnota nebyla významně odlišná od ostatních skupin (X^2, p=0,41). V negativní kontrolní skupině stimulované fyziologickým roztokem nedošlo k ovulaci ani u jedné samice. Jelikož v případě hodnot intervalu latence nebyla splněna normalita dat, tak jsou míry polohy uvedeny jako medián (minimum – maximum). Nejkratší interval latence měl CPE 18 (18-19) hod. Z dalších testovaných přípravků měly krátký interval latence přípravek Ovaprim 2 ml×kg^{-1} a to 22 hod. (22-25 hod.). Naopak nejdelší a signifikantně odlišný (Kruskal-Wallis X^2 = 33,46; p<0,001; mnohonásobné porovnání) byl interval latence u nízkých dávek přípravků na bázi hCG (1500 IU×kg^{-1} Pregnylu a Chorulonu). Pro Pregnyl 1500 IU×kg^{-1} byl medián latence 31 hod. (29-33 hod.) a pro Chorulon 1500 IU×kg^{-1} pak 31 hod. (31-33 hod.).

Nejlepší synchronizace, tedy nejkratšího intervalu mezi vytřením první a poslední samice, bylo dosaženo u skupiny samic stimulovaných CPE. Samice stimulované tímto preparátem byly vytřeny během 1 hodiny. Naopak nejhorší synchronizace bylo dosaženo u přípravku Pregnyl v dávce 3000 IU×kg^{-1}, kde byl interval mezi vytřením

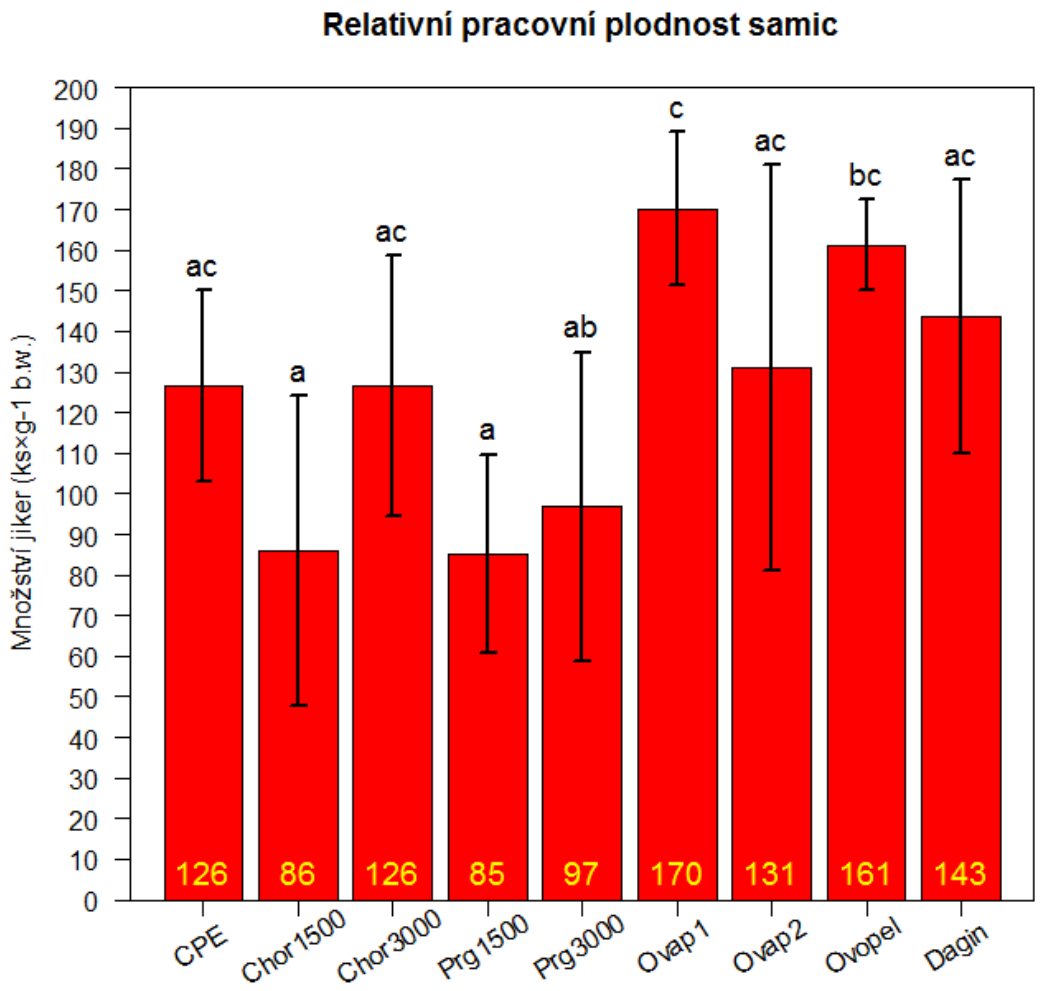


Obrázek 16: Graf přehledu latence a výtěrovosti samic piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*). a) Intervaly latence po aplikaci různých stimulantů. Červené kolmice označují čas výtěru první a poslední samice. b) Pravděpodobnost vytřenosti v závislosti na použitém preparátu

první a poslední samice 12 hodin (Obr. 16 a).

Pravděpodobnost vytřenosti (neboli míry vyprázdněnosti ovarií po vytření; rozlišována částečná a úplná vytřenost) v jednotlivých skupinách byla významně odlišná (X^2=431, p<0,001). Úplně byly vytřeny samice ve 100 % případů po podání CPE a Ovaprimu v dávce 1 ml×kg^{-1}. Po aplikaci Ovopelu byla pravděpodobnost úplné vytřenosti samic 80 %. Pravděpodobnost úplné vytřenosti samic dosahovala u Daginu 75 %. Samice stimulované Chorulonem 3000 IU×kg^{-1} a Ovaprimem 2 ml×kg^{-1} měly 60 % pravděpodobnost úplné vytřenosti. Při nízkých dávkách hCG (1500 IU×kg^{-1} Pregnyl a Chorulon) byla pravděpodobnost úplné vytřenosti samic pouze 20 %. Částečné vytřenosti bylo s 80 % pravděpodobností dosaženo u Pregnylu v dávce 1500 IU×kg^{-1} a u Chorulonu ve stejné dávce. Naopak malá (20%) pravděpodobnost jen částečné vytřenosti samic byla u skupiny stimulované Ovopelem. Pravděpodobnost vytřenosti v závislosti na preparátu je uveden na obrázku 16 b) Během experimentu nebyl zaznamenán spontánní výtěr žádné samice.

Pracovní plodnost piskoře samic byla v průměru 4814 ± 1832 ks. Jelikož je tato hodnota zkreslená velikostí samice, je dále porovnávána relativní plodnost. Relativní pracovní plodnost vyjádřená jako celková hmotnost vytřených jiker vůči předvýtěrové hmotnosti samice (% b.w.) či jako počet jiker na gram hmotnosti samice před výtěrem v průměru dosahovala 14,24 ± 5,25 % b.w. respektive 125 ± 41 ks×g^{-1} (Obr. 17; průměr ± S.D.). Mezi použitými preparáty byl signifikantní rozdíl (One-way ANOVA, F=4,897; p<0,001 pro % b.w. a F=4,65, p=0,001 pro ks×g^{-1}). Pozitivní kontrola (CPE) dosáhla relativní plodnosti 13,9 ± 2,84 % b.w. respektive 126 ± 24 ks×g^{-1}. (Tab. 2). Nejlepších výsledků bylo dosaženo u preparátu Ovaprim v dávce 1 ml×kg^{-1} u kterého relativní pracovní plodnost samice dosahovala 20,2 ± 3,61 % b.w. respektive 170 ± 19 ks×g^{-1} (průměr ± S.D.). Tato hodnota byla signifikantně odlišná (Tukey HSD, p<0,05) od přípravků Pregnyl v dávce 3000 IU×kg^{-1} (10,8 ± 1,89 % b.w. respektive 97 ± 24 ks×g^{-1}) i 1500 IU×kg^{-1} (9,1 ± 3,86 % b.w. respektive 85 ± 38 ks×g^{-1}) a od přípravku Chorulon v dávce 1500 IU×kg^{-1} (9,4 ± 3,81 % b.w. respektive 86 ± 32 ks×g^{-1}). Skupina samic stimulovaná Ovopelem v průměru dosáhla relativní pracovní plodnosti 18,5 ± 2,61 % b.w. respektive 161 ± 11 ks×g^{-1}. Tato hodnota nebyla významně odlišná od žádné skupiny a to ani od Ovaprimu v dávce 1 ml×kg^{-1} či od Pregnylu 1500 (One-way ANOVA, *post hoc* Tukey HSD p>0,05). Skupina samic stimulovaná Daginem v průměru dosáhla relativní pracovní plodnosti 17,5 ± 4,9 % b.w.



Obrázek 17: Relativní pracovní plodnost vyjádřená jako počet jiker na jeden gram tělesné hmotnosti samice piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*). Sloupce s různými písmeny jsou signifikantně odlišné (One-way ANOVA, p<0,001, Tukey HSD)

respektive 144 ± 34 ks×g^{-1}. Stejně jako u Ovopelu nebyla tato hodnota významně odlišná od všech ostatních skupin.

Zisk vody tělem samice mezi aplikací druhé dávky preparátu a vlastním výtěrem činil v průměru 2,6 ± 2,00 % b.w. respektive 0,96 ± 0,750 g (Tab. 2) tělesné hmotnosti. Mezi jednotlivými skupinami byl signifikantní rozdíl (One-way ANOVA, F=4,14; p=0,001 pro % b.w.) Největší zisk vody měly obě skupiny samic stimulované Ovaprimem. Pro Ovaprim v dávce 1ml×kg^{-1} to bylo 4,9 ± 1,67 % respektive 1,7 ± 0,55 g a pro Ovaprim v dávce 2 ml×kg^{-1} pak 4,8 ± 2,07 % b.w. respektive 1,8 ± 1,02 g (průměr ± S.D.). Naopak nejmenší nárůst hmotnosti (zisku vody) a signifikantně odlišné hodnoty od skupin stimulované Ovaprimem, měly skupiny stimulované nižšími dávkami hCG tedy Pregnyl 1500 IU×kg^{-1} a Chorulon 1500 IU×kg^{-1}. Pro Chorulon 1500 IU×kg^{-1} to bylo 1 ± 1,20 % b.w. respektive 0,42 ± 0,726 g a pro Pregnyl 1500 IU×kg^{-1} pak 1 ± 1,89 % b.w. respektive 0,40 ± 0,458 g (průměr ± S.D.).

Během tohoto experimentu nebyla u žádné z generačních ryb zaznamenána bezprostřední (4 hod) povýtěrová mortalita.

Tabulka 2: Tabulka výsledků vybraných ukazatelů řízené reprodukce piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*). [2] One-way ANOVA a Tukey's HSD, hodnoty s jinými indexy se signifikantně liší p<0,05.

Preparát	[2]Relativní plodnost (% b.w.) průměr± S.D.		[2]Absolutní pracovní plodnost průměr ± S.D.		[2]Zisk vody (% b.w.) průměr ± S.D.	
CPE	13,9^{ac}	±2,84	4652^{ab}	± 914	2,2^{ab}	±0,57
Chorulon 1500 IU	9,4^{a}	±3,81	3505^{ab}	±1914	1,0^{a}	±1,89
Chorulon 3000 IU	14,2^{ac}	±5,26	4594^{ab}	±1457	1,7^{ab}	±2,06
Pregnyl 3000 IU	10,8^{ab}	±1,89	3862^{ab}	±1274	2,0^{ab}	±0,76
Pregnyl 1500 IU	9,1^{a}	±3,86	3288^{a}	±1324	1,0^{a}	±1,20
Ovaprim 1ml×kg^{-1}	20,2^{c}	±3,61	6450^{ab}	±1620	4,9^{b}	±1,67
Ovaprim 2 ml×kg^{-1}	15,4^{ac}	±5,78	5170^{ab}	±1493	4,8^{b}	±2,07
Ovopel	18,5^{bc}	±2,61	6701^{b}	±1457	2,5^{ab}	±1,23
Dagin	17,5^{ac}	±4,9	5169^{ab}	±1493	3,2^{ab}	±2,05
Fyziologický roztok	0	±0	0	±0	0	±0
Průměr	14,24	±5,25	4813	±1832	2,6	±2,00

4.1. Analýzy jiker

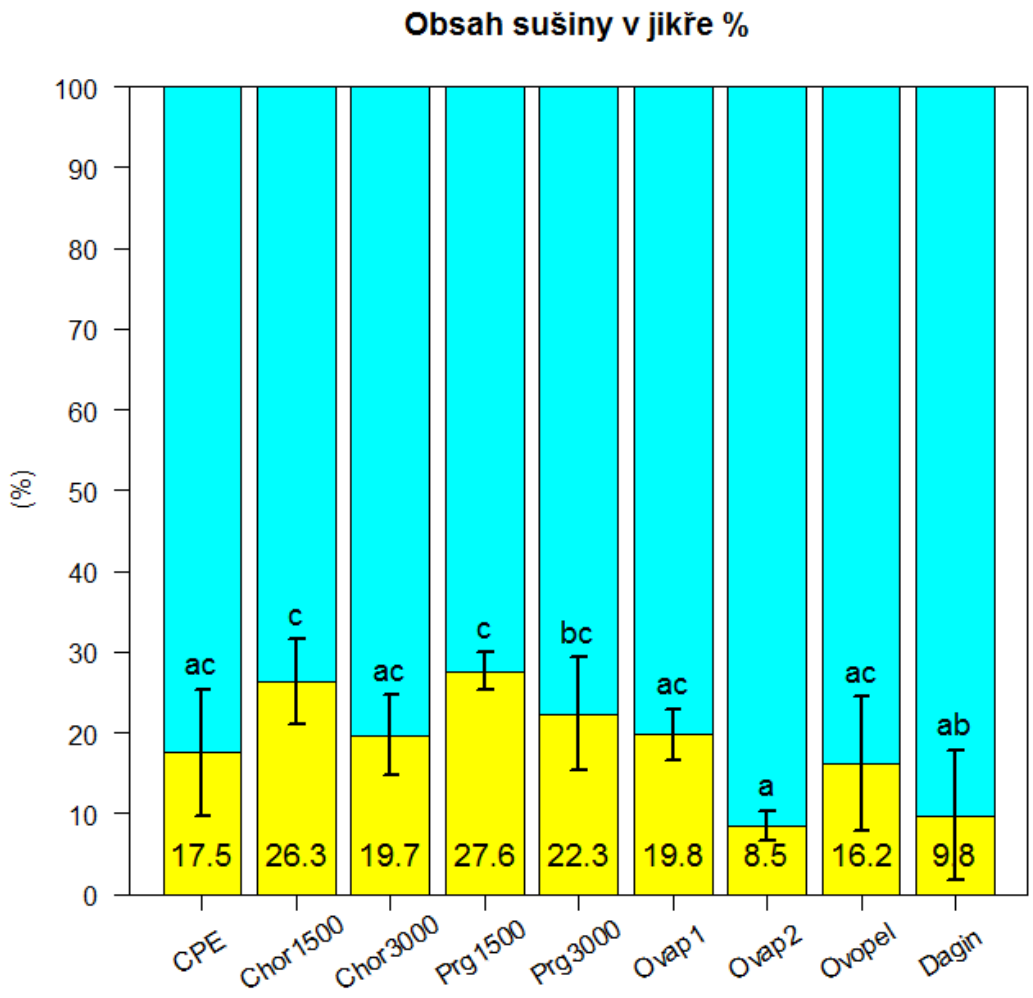
Průměrná mokrá hmotnost jikry piskoře byla 1,13 ± 0,095 mg (průměr ± S.D.). Hmotnost jikry nebyla ovlivněna použitým preparátem (One-way ANOVA; F=1,17; p=0,34; Tab. 3). Jak již bylo zmíněno výše, tak na hmotnost jikry měla prokazatelný vliv skutečnost, zda byla či nebyla samice ideálně stimulovaná (a tedy úplně či částečně

Tabulka 3: Charakterizace vytřených jiker piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*). [1]One way ANOVA a *post hoc* Tukey HSD. [2]Kruskal-Wallis test. Žádná z veličin není signifikantně odlišná.

Preparát	[1]Mokrá hmotnost (mg) průměr±S.D.		[2]Spalné teplo (kJ×g-1) průměr ±S.D.	
Dagin	1,207^{a}	±0,060	25,69^{a}	±0,056
CPE	1,096^{a}	±0,039	25,72^{a}	±0,061
Chorulon 1500 IU×kg^{-1}	1,082^{a}	±0,062	25,70^{a}	±0,065
Chorulon 3000 IU×kg^{-1}	1,102^{a}	±0,110	25,69^{a}	±0,017
Ovaprim 1 ml×kg^{-1}	1,184^{a}	±0,109	25,71^{a}	±0,076
Ovaprim 2 ml×kg^{-1}	1,173^{a}	±0,021	25,66^{a}	±0,066
Ovopel	1,142^{a}	±0,097	25,69^{a}	±0,035
Pregnyl 1500 IU×kg^{-1}	1,079^{a}	±0,090	25,53^{a}	±0,059
Pregnyl 3000 IU×kg^{-1}	1,141^{a}	±0,165	25,71^{a}	±0,057
Průměr	1,132	±0,095	25,68	±0,074

vytřená;Obr 15 f).

Použitý hormonální preparát významně ovlivnil množství sušiny v jikře (One-way ANOVA; F=5,99; p<0,001; Obr. 19). Hmotnost sušiny jikry činila v průměru 0,21 ±

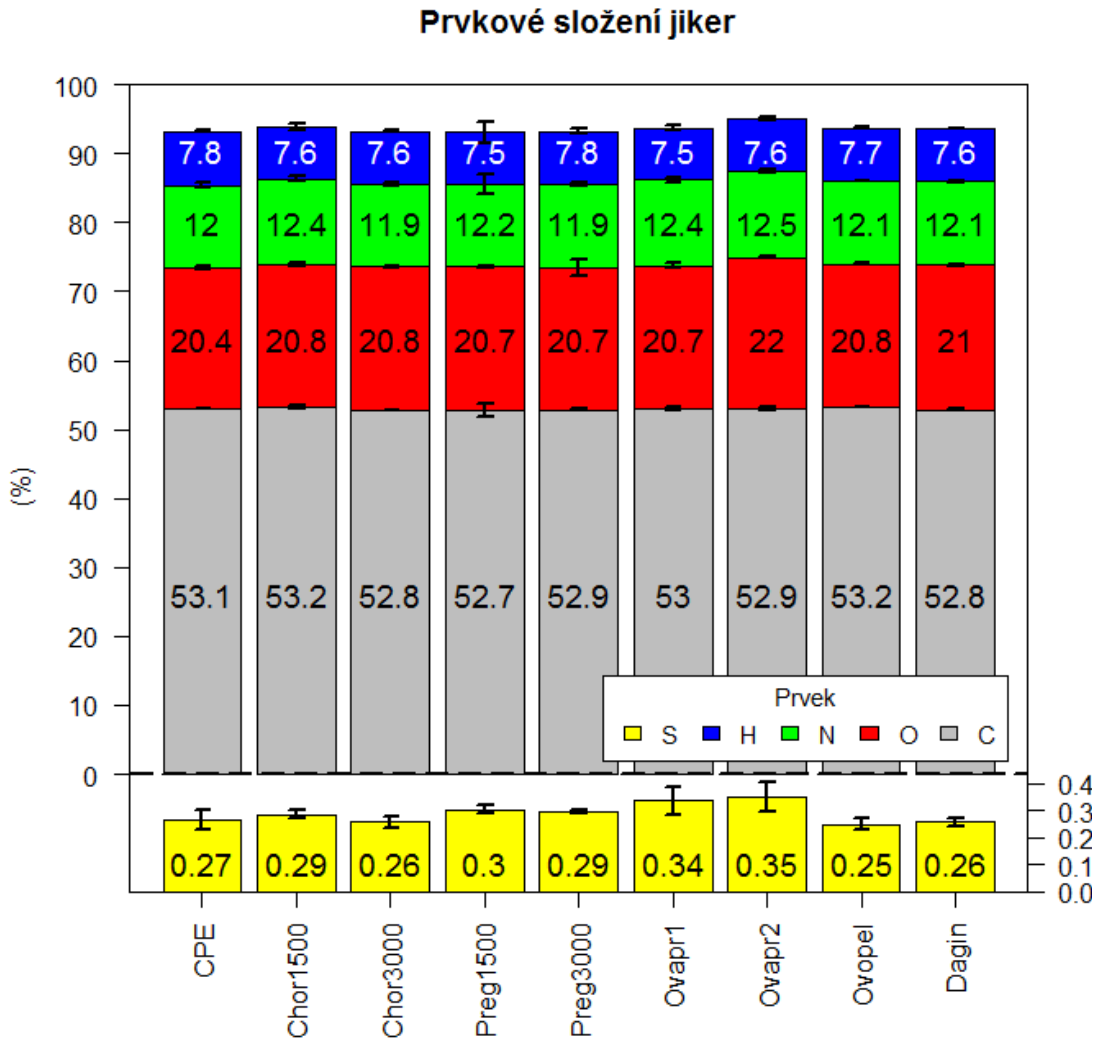


Obrázek 19: Obsah sušiny v jikře piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*) v závislosti na preparátu. Sloupce s různými písmeny jsou signifikantně odlišné (One-way ANOVA, p<0,001, Tukey HSD)

0,091 mg (průměr ± S.D.) tedy 18,8 ± 8,12 % z původní mokré hmotnosti jikry. Nejvíce sušiny obsahovaly jikry samic stimulované Pregnylem 1500 IU×kg^{-1} a to 27,6 ± 2,32 % respektive 0,30 ± 0,034 mg a Chorulonem 1500 IU×kg^{-1} a to 26,3 ± 5,25 % respektive 0,29 ± 0,065 mg (průměr ± S.D.). Zcela nejmenší podíl sušiny měly jikry samic stimulované Ovaprimem v dávce 2 ml×kg^{-1} a to 8,5 ± 1,87 % respektive 0,10 ± 0,040 mg i Daginem a to 9,8 ± 8,12 % respektive 0,12 ± 0,092 mg (průměr ± S.D.). Jikry ovulované samicemi stimulované Ovaprimem v dávce 2 ml×kg^{-1} se významně lišily od samic stimulovaných Chorulonem v dávce 1500 IU×kg^{-1}, od samic stimulovaných Pregnylem v dávce 1500 IU×kg^{-1} i od samic stimulovaných Pregnylem v dávce 3000 IU×kg^{-1}, kdy jikry měly obsah sušiny 22,3 ± 6,97 % respektive 0,26 ± 0,096 mg.

Spalné teplo neboli energetická hodnota jikry (kJ×g^{-1}) se mezi použitými preparáty významně nelišila (Kruskal-Wallisův test, X^2=9,67, p=0,29). Průměrné spalné teplo jikry bylo 25,68 ± 0,074 kJ×g^{-1} (průměr ± S.D.).

Prvková analýza ukázala, že jikry piskoře pruhovaného průměrně obsahují 53 ± 0,34 % uhlíku (C), 12,2 ± 0,24 % dusíku (N), 7,6 ± 0,13 % vodíku (H), 20,9 ± 0,46 % kyslíku (O) a 0,29 ± 0,07 % síry (S); průměr ± S.D.; Obr. 20). Chemické složení jiker



Obrázek 20: Prvkové složení jiker piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis* L.). Chybové úsečky jsou S.D. Signifikantní rozdíly jsou pouze v obsahu kysliku (Kruskal-Wallisův test, X^2 = 18,99, p=0,01) a to mezi CPE a Ovaprimem v dávce 2 ml×kg^{-1}.

mezi skupinami stimulovanými různými hormonálními preparáty nebylo významně odlišné v obsahu C (Kruskal-Wallis, X^2 = 12,53, p=0,13), H (Kruskal-Wallis, X^2 = 14,61, p=0,07), N (Kruskal-Wallis, X^2 = 18,68, p= 0,02), i S (Kruskal-Wallis, X^2 = 18,56, p=0,02). Významné rozdíly byly nalezeny pouze v obsahu O (Kruskal-Wallis, X^2 = 18,99, p=0,01). Jediný významný rozdíl byl mezi CPE a Ovaprimem

v dávce 2 ml×kg$^{-1,}$ Největší podíl kyslíku v jikře měla skupina stimulovaná Ovaprimem v dávce 2 ml×kg^{-1} a to 22,04 ± 0,19 % (průměr ± S.D.).

5. Diskuze

V předložené bakalářské práci byl potvrzen pohlavní dimorfismus piskoře pruhovaného v tělesné hmotnosti. Toto zjištění je v souladu i s jinými publikovanými pracemi (Podubský a Štědronský, 1953; Adámková-Stibranyiova a kol., 1999; Drozd, 2011). Větší velikost těla je pro samici výhodná a to z důvodu významně vyšších investic energie do reprodukce (Tarkan, 2006). Navíc větší samice jsou plodnější, což bylo prokázáno i v této práci. Toto zjištění koresponduje s dříve publikovanými pracemi (Podubský a Štědronský, 1953; Kouřil a Hamáčková, 1996; Adámková-Stibranyiova a kol., 1999; Legendre a kol., 2012). Nejedná se však o univerzální pravidlo. Velké samice se totiž mohou nalézat již v senektivním stádiu života, kdy sice produkují velké množství jiker, ale jejich kvalita je nízká, případně jikry již neprodukují vůbec (Pivnička, 1981; Švátora, 1986; Baruš a Oliva, 1995). V této práci se však nepotvrdil vliv velikosti samice na velikost jiker, jako je tomu u některých jiných druhů ryb (Sivakumaran a kol., 2003; Kamler, 2005), kdy různě veliké samice piskoře pruhovaného produkovaly jikry přibližně stejné velikosti i hmotnosti.

Po aplikaci hormonálních preparátů došlo ke změně hmotnosti samic. Tento rozdíl hmotnosti byl způsoben hydratací gonád a následným zvětšením abdominální části těla (Schoonbee a Prinsloo, 1986; Milla a kol., 2006; Yousefian a kol., 2009). K malému zvýšení hmotnosti došlo u třetiny samic již po aplikaci první tzv. přípravné dávky preparátu. Po druhé dávce preparátu došlo ke vzrůstu hmotnosti u téměř všech samic. Je to pravděpodobně proto, že první dávka preparátu nebyla dostatečně účinná na to, aby měla velký vliv na fyziologii samice. Hliwa a kol., (2010) pozorovali stejný fenomén po aplikaci druhé dávky Ovopelu u poloviny samic piskoře pruhovaného. Nicméně tento jev nebyl ve výše citované práci nijak interpretován. U komerčně významných druhů ryb lze fenoménu vzrůstu hmotnosti před výtěrem využít k přibližné determinaci času výtěru (Zakęś, 2007). Množství zadržené vody je přímo úměrné výslednému vyzrání oocytů produkovaných samicí a tedy i výsledné velikosti oocytů (Milla a kol., 2006; Zakęś 2007). To se potvrdilo i v této práci. Množství zadržené vody má i pozitivní vliv na relativní pracovní plodnost (vyjádřenou jak v $ks \times g^{-1}$, tak v procentech b.w.). V předložené bakalářské práci byl potvrzen nepatrně silnější vztah mezi množstvím přijaté vody a relativní plodností (vyjádřenou jako hmotnostní poměr všech vytřených jiker k předvýtěrové hmotnosti samice v % b.w.). Tento efekt je pravděpodobně způsoben zahrnutím ovariální tekutiny do hmotnosti vytřených jiker i do výpočtu tohoto

parametru. Ovariální tekutina je totiž převážně tvořena vodou a ve vodě rozpuštěnými látkami (Lahnsteiner a kol., 1995).

Výsledky této bakalářské práce v souladu s výsledky předchozích prací (Peter a kol., 1988; Kouřil a kol., 1995; Żarski a kol., 2009; Mylonas a kol., 2010; Hliwa a kol., 2011; Kouřil a kol., 2011; Křištan a kol., 2013) ukazují, že použitý hormonální preparát různým způsobem ovlivňuje vybrané ukazatele řízené reprodukce. Dále byla potvrzena i vyšší efektivita stimulace při použití přípravků s dopaminergním inhibitorem, jako tomu je u příbuzného druhu piskoře dálnovýchodního (Wang a kol., 2009). V experimentu podniknutém v rámci předložené bakalářské práce měly samice stimulované hCG (Pregnyl a Chorulon; tedy preparáty bez inhibitoru dopaminu) významně horší výsledky zejména ve vytřenosti samic (poměr zcela a částečně vytřených samic), délce intervalu latence, synchronizaci ovulace (interval mezi výtěrem první a poslední samice) i relativní pracovní plodnosti.

Celkem se podařilo vytřít 98 % stimulovaných samic a 100 % stimulovaných samců. U samců nebývá problém se stimulací spermiace v řízených podmínkách a tak vysoké procento vytřených samců není překvapivé (Hliwa a kol., 2011; Legendre a kol., 2012). Dobrým výsledkem této bakalářské práce je pak vysoké procento ovulujících samic. Podobně dobrých výsledků jako v předložené práci dosáhli i Hliwa a kol. (2011), (92 % ovulujících samic) či Adámková-Stibranyiova a kol., (1999) (100 % ovulujících samic). Na základě této skutečnosti lze tedy konstatovat, že piskoř pruhovaný je na rozdíl od jiných zástupců čeledi Cobitidae – např. sekavky nádherné (*Chrombotia macracanthus*) méně problematický druh z hlediska řízené reprodukce (Legendre a kol., 2012).

K ovulaci všech samic došlo po aplikaci všech preparátů, kromě Daginu, u kterého nedošlo k ovulaci pouze jedné samice. K tomu mohlo dojít nejpravděpodobněji v důsledku toho, že nemusela být tato samice zcela fyziologicky připravená k výtěru ještě před obdobím odlovu nebo mohlo dojít k náhodnému úniku preparátu z těla ryby (Policar a kol., 2010). V procentu ovulace však nebyl mezi experimentálními skupinami signifikantní rozdíl. Stejně jako v některých dříve publikovaných pracích (Adámková-Stibranyiova a kol., 1999; Drozd a kol., 2009), bylo i v rámci experimentu podniknutého v rámci předložené bakalářské práce dosaženo 100% ovulace u samic simulovaných CPE. Geldhauser, (1992) však dosáhl po podání 6 – 12 $mg \times kg^{-1}$ CPE ovulace pouze u 65-73 % samic. V tomto případě však bezesporu hrály roli zejména dva negativní faktory. Prvním z nich byla suboptimální teplota (15,3 °C) pro reprodukci

piskoře pruhovaného. Druhým faktorem pak byla aplikace preparátu pouze v jedné dávce. Podání přípravku ve dvou dílčích dávkách totiž výrazně zlepšuje reprodukční ukazatele řízené reprodukce piskoře pruhovaného (Adámková-Stibranyiova a kol., 1999). Při pokusu podniknutém v rámci předkládané práce ovulovaly všechny samice stimulované jak nižšími (1500 IU×kg^{-1}), tak vyššími (3000 IU×kg^{-1}) dávkami přípravků na bázi lidského choriongonadotropinu (Pregnyl, Chorulon). Porovnání výsledků u těchto preparátů s daty z dostupné literatury je složité, jelikož je pouze zmiňována informace, zda samice po podání přípravků na bázi hCG ovulovaly či ne, případně za jak dlouho k ovulaci došlo (Neyfakh, 1959; Zotin a kol., 1967; Klyachko a kol., 1995; Kopeika a kol., 2003). To je způsobeno odlišným cílem těchto prací, jelikož autoři těchto prací použili hormonální přípravky jako způsob jak získat jikry piskoře, ale nesledovali jakékoliv reprodukční ukazatele. Přípravek Ovaprim, který byl testován v koncentracích 1 ml×kg^{-1} a 2 ml×kg^{-1} stimuloval k ovulaci 100 % samic v obou koncentracích. Tyto výsledky korespondují s výsledky Hliwy a kol., (2011). Po aplikaci Ovopelu bylo stimulováno k ovulaci 100 % samic. Hliwa a kol., (2011) však uvádí ovulaci 83 % samic. Tato nižší hodnota může být způsobena tím, že v citované práci šlo o mimosezónní výtěr. U příbuzného druhu sekavky nádherné se procento ovulujících samic po aplikaci dvou dávek Ovaprimu pohybuje mezi 50 až 86 % (Legendre a kol., 2012). Tato variabilita může být způsobena tím, že sekavka nádherná je značně problematický druh pro chov v zajetí a metodika její řízené reprodukce není prozatím zcela zvládnuta.

Na rozdíl od procenta ovulujících samic byl významný rozdíl ve vytřenosti samic v závislosti na preparátu. Vytřenost samice je míra vyprázdnění vaječníku po provedeném umělém výtěru. Ne všechny samice bylo možné úplně vytřít. V literatuře jsou částečně vytřené samice zahrnuty do analýz dvojím způsobem. Buď je jich naprosté minimum a jsou zahrnuty do analýz (Adámková-Stibranyiova a kol., 1999), nebo jsou z experimentu úplně vyřazeny (Legendre a kol., 2012). V této práci byly částečně vytřené samice jak součástí samostatných analýz, tak analyzovány dohromady se zcela vytřenými samicemi. Samostatné analýzy pro částečně vytřené samice byly provedeny pro porovnání reprodukčních ukazatelů s úplně vytřenými samicemi. Samice, které nebylo možné úplně vytřít, pravděpodobně nebyly dostatečně efektivně stimulovány použitým preparátem, což mohlo být způsobeno buď chybějícím účinkem dopaminergního inhibitoru, příliš nízkou dávkou preparátu, či nedostatečnou citlivostí druhu na použitý preparát, nebo všemi zmíněnými parametry najednou (Peter a kol.,

1988; Wang a kol., 2009; Legendre a kol., 2012). Ne všechny druhy jsou k určitému preparátu stejně citlivé. V rybářské praxi hojně využívaná kapří hypofýza, která se používá pro stimulaci celé řady sladkovodních i mořských ryb (Yaron a kol., 2002) je zcela neefektivní při stimulaci např. okouna říčního (Kouřil a kol., 2002). Částečně vytřeným samicím zůstávají v ovariích nedozrálé oocyty. Nevytřené jikry pak mohou představovat pro samici určité zdravotní riziko. Dalším rizikovým faktorem může být přílišná snaha vytírajícího vytřít co nejvíce jiker z těla samice. Tím roste riziko vnitřních zranění a následná povýtěrová mortalita. Při řízené reprodukci ryb by se pak měl brát ohled na dostatečnou stimulaci samice, a to jako prevence před případnými zdravotními následky (Kouřil a kol., 2002).

Po aplikaci lyofilizované kapří hypofýzy a Ovaprimu v dávce 1 $ml \times kg^{-1}$ byly samice vytřeny úplně. Tento výsledek je pro CPE lepší v porovnání s prací Adámková-Stibranyiova a kol., (1999), ve které měla jedna samice částečnou vytřenost. Při použití přípravku Ovaprim u příbuzného druhu sekavky nádherné nebylo možné úplně vytřít několik samic (Legendre a kol., 2012). Poměrně špatných výsledků z hlediska vytřenosti dosahovaly preparáty bez dopaminergního inhibitoru. Po aplikaci nižších dávek (1500 IU) Pregnylu a Chorulonu byla zaznamenána částečná vytřenost u 80 % samic. U dávek 3000 IU byla v případě Chorulonu částečná vytřenost samic zaznamenána ve 40 % výtěrů a u Pregnylu dokonce ve 100 %. U částečně vytřených samic se dá soudit, že nebyly dostatečně stimulovány použitým preparátem. Jestliže k takto výraznému jevu docházelo pouze u přípravků bez dopaminergního inhibitoru, šlo o vliv inhibičních účinků dopaminu v endokrinní regulaci finální maturace oocytů (Dufour a kol., 2010). Tato inhibice je dobře známá u piskoře dálnovýchodního (Wang a kol., 2009) i u sekavce tajvanského (Peter a kol., 1988). Přípravky na bázi hCG – Pregnyl a Chorulon tedy nelze v těchto dávkách, které standardně fungují u kaprovitých ryb – např. u karase zlatého – *Carassius auratus auratus* (L.) (Targońska a Kucharczyk, 2011) doporučit ke stimulaci piskoře pruhovaného. U příbuzného druhu – piskoře dálnovýchodního je efektivní dávka hCG ke stimulaci ovulace 15 000 $IU \times kg^{-1}$ (Gao a kol., 2014). Takto vysoká dávka není ekonomickým řešením a ani neprospívá welfare stimulovaných ryb.

Interval latence (časový úsek mezi aplikací druhé dávky preparátu a ovulací samice) se významně lišila v závislosti na použitém preparátu. Extrakt z kapří hypofýzy měl nejkratší dobu latence 18 až 19 hodin. Adámková-Stibranyiova a kol., (1999) dosáhly kratšího intervalu latence a to 12 až 13 hodin po stejné dávce kapří hypofýzy

jako v experimentu v rámci předkládané práce. To bylo pravděpodobně způsobeno vyšší teplotou při chovu (19 až 20 °C). Stejného intervalu latence jako v tomto experimentu bylo dosaženo za stejných podmínek v práci Drozd a kol., (2009). Z komerčních přípravků v lékové formě se od hypofyzovaných samic významně nelišily samice stimulované Ovaprimem v dávce 2 $ml \times kg^{-1}$. Samice stimulované Ovaprimem v dávce 1 $ml \times kg^{-1}$ neměly významně odlišný interval latence ani od samic s nejdelším intervalem latence, tedy samic stimulovaných Pregnylem a Chorulonem. Pro samice stimulované Ovaprimem jsou z literatury dostupné hodnoty o intervalu latence v rozmezí 36 – 42 hodin pří 19 °C (Hliwa a kol., 2011). To je v porovnání s předkládanou prací podstatně delší interval. Rozdíl byl pravděpodobně způsoben tím, že v citované práci bylo Ovaprimu použito k mimosezónnímu výtěru. Pro příbuznou sekavku nádhernou při chovu 26 až 30 °C došlo k ovulaci mezi 4,5 a 18 hodinami (Legendre a kol., 2012). Tato hodnota je však těžko porovnatelná jelikož jde o druh z tropického klimatického pásma a tudíž byl odchováván za podstatně vyšší teploty. Hliwa a kol., (2011) uvádí, že po podání Ovaprimu latence značně variovala v porovnání s Ovopelem. Tento údaj je v rozporu s předkládanou prací, jelikož větší variability intervalu latence bylo dosaženo u Ovopelu. Hliwa a kol., (2010) po 12 hodinách experimentu při 19 °C byl schopen vytřít 83 % samic. Zda byly v dalších hodinách vytřeny další samice, již není uváděno. V dostupné literatuře se uvádí, že kombinace Ovaprimu s hCG vede u některých druhů k přesnějšímu určení času výtěru (Legendre a kol., 2012). Po aplikaci hCG je při 18 °C uváděna doba latence 36 až 38 hodin (Neyfakh, 1959; Kostomarova, 1991). V našem experimentu byl interval latence kratší až o třetinu a navíc nebylo dosaženo tak dobré synchronizace výtěru.

Synchronizace ovulace (interval mezi výtěrem první a poslední samice) byla významně odlišná za použití různých hormonálních stimulantů. Nejlepší synchronizace byla dosažena po aplikaci kapří hypofýzy (1 hodina). Pro kapří hypofýzu je to v případě piskoře pruhovaného obvyklá hodnota (Kouřil a kol., 1996; Kouřil a Hamáčková, 1996; Adámková-Stibranyiova a kol., 1999; Drozd a kol., 2009). Výrazně se tak snížila potřeba manipulovat se samicemi. Synchronizace u přípravku Ovaprim byla mezi 3 až 4 hodinami. To je v porovnání se synchronizací sekavky nádherné přijatelná hodnota (Legendre a kol., 2012). u přípravku Ovopel byla synchronizace 7 hodin., jak bylo zmíněno, rozdíl v synchronizaci Ovopelu a Ovaprimu je v rámci této práce v rozporu s dostupnou literaturou, která uvádí, že horší synchronizace je u Ovaprimu, nežli u Ovopelu (Hliwa a kol., 2011; Legendre a kol., 2012). Je dostupná pouze jediná

publikovaná práce, která tyto dva přípravky porovnává u piskoře pruhovaného (Hliwa a kol., 2011). Poměrně dobré synchronizace výtěru (2 hodiny) bylo dosaženo po podání Chorulonu v obou dávkách (1500 IU×kg^{-1} i 3000 IU×kg^{-1}). Naopak u Pregnylu, který obsahuje stejnou účinnou látku (hCG) byla synchronizace rozkolísaná, a to při 1500 IU×kg^{-1} 4 hodiny a při 3000 IU 12 hodin. V případě Pregnylu 3000 IU×kg^{-1} však jde o vliv jedné samice, která tento interval zkreslila, protože 80 % samic bylo vytřeno již během třech hodin. To mohlo být způsobeno zvýšeným stresem, který prožívala během opakovaných kontrol připravenosti k výtěru. Nicméně tyto kontroly jsou nezbytně nutné z toho důvodu, aby nedošlo k „přezrání“ jiker uvnitř těla samice. To by vedlo ke snížení kvality jiker a následně nižší oplozenosti a líhnivosti (Mylonas a Zohar, 2007).

Průměrná pracovní plodnost piskoře pruhovaného byla cca 4820 jiker. Adámková-Stibranyiova a kol., (1999) dosáhly pracovní plodnosti téměř dvojnásobné i když samice v jejich experimentu měly průměrnou hmotnost nižší (36,4 g), než samice v použité pro účely předložené práce (43,8 g). Pro vysvětlení diskrepance by se nabízelo vysvětlení, že by tento rozdíl mohl být způsoben rozdílným podílem částečně a zcela vytřených samic. (43 % částečně vytřených samic v této práci, 13 % v citované práci). Všechny samice v citované práci byly stimulovány lyofilizovanou kapří hypofýzou. V předkládané práci bylo dosaženo pracovní plodnosti po stimulaci hypofýzou 4650 ks. Lze tedy velmi těžko určit proč bylo v citované práci dosaženo tak vysokých výsledků. V práci Drozd a kol., (2009) byla průměrná pracovní plodnost samic stimulovaných lyofilizovanou kapří hypofýzou 6900 ks. Zde by svoji roli mohla sehrát hmotnost stimulovaných samic. V citované práci byly stimulovány samice o hmotnosti v rozmezí 48 až 65 g. V předkládané práci nedosahuje nejnižší hmotnosti z citované práce 62 % stimulovaných samic. Podubský, (1953) udává průměrnou absolutní plodnost piskoře pruhovaného 20 000 ks. Tyto hodnoty však byly získány po vyoperování vaječníků v předvýtěrovém období. Při umělém výtěru nelze vytřít všechny jikry z těla a tak je plodnost získaná z relativní plodnosti podhodnocená (Bacon a kol., 2012). z hlediska pracovní plodnosti lze konstatovat, že dosažená hodnota v této práci byla mírně podprůměrná.

Relativní pracovní plodnost v tomto experimentu v průměru dosáhla 14,2 % b.w. respektive 125 ks×g^{-1}. Adámková-Stibranyiova a kol., (1999) získaly při použití extraktu hypofýzy hodnotu 22,6 % b.w. respektive 225 ks×g $^{-1}$. Tato hodnota je jen málo rozdílná od relativní hmotnosti vaječníků v předvýtěrovém období (Podubský a Štědronský, 1953). Pro samice stimulované kapří hypofýzou, z experimentu

provedeném v rámci předkládané práce, bylo dosaženo téměř poloviční hodnoty relativní plodnosti než v citované práci. Naopak téměř stejných hodnot jako v předkládané práci bylo dosaženo v práci Drozd a kol. (2009). Nabízí se možnost nadprůměrného výsledku v případě práce Adámková-Stibranyiova a kol. (1999). Nejvyšší relativní plodnosti bylo v tomto experimentu dosaženo po podání Ovaprimu v dávce 1 $ml \times kg^{-1}$ a to 20,2 % respektive 170 $ks \times g^{-1}$. Tato hodnota je srovnatelná s údaji získanými v práci Kouřil a kol. (1996) pro CPE. Naopak je podstatně lepší ve srovnání s prací Hliwa a kol., (2011). Hliwa a kol., (2010) uvádí relativní plodnost uvádí sotva pětinovou hodnotu. Citovaná práce však zkoumala mimosezónní výtěr piskoře pruhovaného. Vzhledem k dostupné literatuře lze tedy konstatovat, že relativní plodnost piskoře pruhovaného v tomto experimentu dosahovala průměrných hodnot. Samice stimulované přípravky neobsahující inhibitor dopaminu měly podstatně nižší relativní plodnost. Všeobecně se tak potvrdila nutnost dopaminergní inhibice při řízené reprodukci piskoře pruhovaného. Stejně tomu tak je u příbuzného piskoře dálnovýchodního (Wang a kol., 2009). Piskoř pruhovaný je druhem s porcionálním výtěrem (Holčík a Hensel, 1972). U druhů s tímto typem výtěru existuje mezi jednotlivými výtěry variabilita v počtu vytřených jiker (Bohlen, 2000; Moshgani a Van Dooren, 2011). Rozdílná relativní plodnost mezi citovanými pracemi může být ovlivněna právě zmiňovaným faktorem.

Byla zjištěna průměrná mokrá hmotnost neoplozené jikry piskoře pruhovaného na 1,13 mg ± 0,095 (průměr ± S.D.). Drozd a kol., (2009) uvádí hmotnost o něco nižší a to 0,88 mg ± 0,08 (průměr ± S.D.). Stejně tak nižší hmotnost jikry uvádí Adámková-Stibranyiova a kol., (1999) a to 1,00 mg. Podobná variabilita je obvyklým jevem u druhů kladoucí jikry na určitý typ substrátu (Einum a Fleming, 2002). Samice totiž investuje do jikry energii na základě podmínek, které přetrvávají dlouhou dobu před výtěrem (Einum a Fleming, 2002). Rozdílná mezisezónní investice tedy může být zdrojem podobné variability. Aby se však eliminovala případná neúspěšnost slabší generace, tak samice dokáže ovlivnit výběrem místa výtěru to, v jakých podmínkách se bude její potomstvo vyvíjet (Einum a Fleming, 2002). Dá se tedy říci, že si na základě kondice může vybrat, kam se vytře. Jiným vysvětlením může být pouhá vnitrodruhová variabilita ve velikosti jikry (Einum a Fleming, 2002; Kamler, 2005). Dalším důvodem může být to, že jikry získané umělým výtěrem mají větší variabilitu ve velikosti, než jikry z přirozeného výtěru (Einum a Fleming, 1999; Mylonas a kol., 2010). Svou roli ve velikosti jikry sehrává i ploidie samice (Juchno a kol., 2013). Například jikry samic

sekavce písečného s vyšší ploidií, než původní diploidií, mají větší jikry (Juchno a kol., 2013). u piskoře pruhovaného je známá jak původní diploidie (dvě chromozomové sady v jádře buňky; 2n), tak odvozená triploidie (3n), až tetraploidie (4n) (Drozd a kol., 2010). Velikost jikry ovlivňuje velikost larev a tedy i jejich přežití (Bohlen, 2000). Velikost jikry u lososovitých druhů ryb je ovlivněna i podmínkami během ontogeneze rodičovského jedince (Burton a kol., 2013).

Energetická hodnota (spalné teplo) jiker piskoře pruhovaného nebyla ovlivněna použitým hormonálním preparátem a její hodnota (v průměru 25,7 $kJ \times g^{-1}$) byla velice blízká jikrám lína obecného –*Tinca tinca*, (L.) (Kamler, 2005). Tyto dva druhy mají velice podobnou ekologii (Baruš a Oliva, 1995) a tato spojitost může být i v tomto parametru. V porovnání s jinými sladkovodními druhy ryb jde o spíše průměrnou hodnotu. Mořské druhy ryb mají spíše jikry s nižší energetickou hodnotou (pro srovnání i s dalšími druhy viz Kamler, 2005).

Chemická kompozice jiker se mezi skupinami stimulovanými různými preparáty nelišila vyjma kompozice kyslíku. Málo významný byl rozdíl mezi jikrami ovulovanými samicemi, které byly stimulovány kapří hypofýzou a jikrami od samic stimulovanými Ovaprimem v dávce 2 $ml \times kg^{-1}$. Z dřívějších prací je známo, že na kompozici jikry má vliv teplota inkubace jiker (Kamler a kol., 1994; Prokešová, 2012). Možná proto v této práci nebyl sledován velký rozdíl v chemickém složení jiker. Na chemickou kompozici však netřeba nahlížet jako na hlavní kriterium ovlivňující líhnivost (Izquierdo a kol., 2001).

Vzhledem k výsledkům této práce je k další produkci gamet doporučován preparát Ovaprim v dávce 1 $ml \times kg^{-1}$ či Ovopel v dávce 1 $peleta \times kg^{-1}$. Tyto preparáty se osvědčily v produkci gamet jak piskoře pruhovaného (Hliwa a kol., 2010, 2011), tak jemu příbuzných druhů (Legendre a kol., 2012; Juchno a kol., 2013; Myeong-Hun a In-Chul, 2014).

5.1. Možné směřování dalších výzkumů

Piskoře pruhovaný je doposud málo prozkoumaný druh paprskoploutvé ryby. Jednou ze stále nevyřešených otázek je vliv odlepkování jiker na přežívání embryí, či zvolení vhodného odlepkovacího média. V této souvislosti by se nabízelo srovnání tradičních metod (mléko, jíl, talek) s využitím enzymů, které u jiných fytofilních druhů ryb zvyšují líhnivost, zkracují čas líhnutí larev a zkracují dobu odlepkování (Linhart a kol., 2000, 2003; Żarski a kol., 2009). Dále by bylo vhodné zjistit i vliv použitého

hormonálního přípravku na míru vývojových odlišností např. na procento vývojově poškozených jedinců (Peter a kol., 1988; Brzuska, 1999).

Dalším směrem výzkumu by mělo být zkoumání, zda dochází ke kompetici spermií při heterospermatickém oplozování jiker, což je poměrně známý jev u řady druhů ryb (Gage a kol., 2004; Kaspar a kol., 2008).

Ve chvíli, kdy bude známa optimální dávka jednoho preparátu k dosažení ovulace, bude dále vhodné zkoumat vliv kombinace těchto preparátů, tak jako tomu bylo např. u použití kombinace Ovopelu a Ovaprimu u dvou druhů jelců (Żarski a kol., 2009) či kombinace hCG a Ovaprimu u sekavky nádherné (Legendre a kol., 2012).

O reprodukční biologii piskoře pruhovaného doposud není mnoho známo. Bylo by zajímavé se podívat, zda jsou na těle samic patrné povýtěrové znaky, podobně jako tomu je u sekavce (Bohlen, 2008). Z hlediska reprodukce piskoře pruhovaného by bylo zajímavé zkoumat, zda samice produkuje jikry jiné velikosti v závislosti na fenotypu samce (Moshgani a Van Dooren, 2011).

Jelikož piskoř pruhovaný je agastrickým druhem, bylo by do budoucna vhodné vyvinout krmivo, které by obsahovalo GnRH*a* a sloužilo k neinvazivní stimulaci generačních ryb (Breton a kol., 1995). Tím by se zvýšila celková welfare generačních ryb.

Pro budoucí produkci násad piskoře pruhovaného by mohlo být vhodné využití chovu generačních ryb v kontrolovaných podmínkách, kde by piskoř pruhovaný mohl pohlavně dospívat dříve, jako je tomu u jiných druhů ryb (Vorlíčková a kol., 2006; Zakęś, 2007). Při případné aplikaci záchranného programu, by bylo ze všeho nejdříve nutné zjistit genetickou diverzitu našich populací piskoře pruhovaného (Hanel a Lusk, 2005). V tomto směru jsou doposud zjištěny jenom kusé informace (Bohlen a kol., 2008; Drozd a kol., 2010). Kompletní genetické zmapování si vyžádá nějaký čas a nemalé finanční prostředky. Proto je třeba se držet opatření, která zamezí genetickému promíchání izolovaných populací (Lusk a kol., 2002; Flajšhans a Ráb, 2013). Těmi jsou zejména následující opatření. Výběr matečných ryb a vysazování násad pocházející z populace, která má být posílena. Nepřesouvat násady mimo hydrologický systém úmoří. Nepřesouvat násady mimo dílčí hydrologické regiony.

Na záchranných programech ohrožených druhů ryb by se měly podílet rybářské organizace zejména dodržováním výše zmíněných zásad. Avšak aby byla ochrana tohoto druhu efektivní, tak nestačí pouhá podpora jeho populací vysazováním, ale je nezbytně nutná rekultivace jeho přirozených habitatů a jejich následná ochrana.

6. Závěr

Předkládaná práce hodnotí vliv komerčních hormonálních preparátů CPE, Chorulonu, Pregnylu, Ovaprimu, Ovopelu a Daginu na ukazatele řízené reprodukce piskoře pruhovaného. Sledované ukazatele byly procento ovulujících samic, interval latence, synchronizace, vytřenost, pracovní plodnost, hmotnost jikry, obsah sušiny jikry a chemická kompozice jikry.

Byla potvrzena i vyšší efektivita stimulace při použití přípravků s dopaminergním inhibitorem, jako tomu je u příbuzného druhu piskoře dálnovýchodního. Samice stimulované preparáty na bázi hCG mají slušnou synchronizaci, ale mají naopak dlouhou dobu latence a nízkou plodnost v porovnání s ostatními preparáty použitými v tomto experimentu.

V tomto experimentu ovulovaly všechny samice krom skupiny stimulované Daginem, kde ovulovalo 80 % samic.

Interval latence byl ovlivněn použitým preparátem. Nejkratší interval latence měla skupina stimulovaná kapří hypofýzou a Ovaprimem v dávce 2 $ml \times kg^{-1}$. Vytřenost samic se významně lišila v závislosti na použitém preparátu. Nejlepší vytřenost (>80%) byla po použití kapří hypofýzy, Ovaprimu 1 $ml \times kg^{-1}$a Ovopelu. Částečná vytřenost u více než 80 % stimulovaných samic byla po podání Chorulonu 1500 $IU \times kg^{-1}$, Pregnylu 1500 $IU \times kg^{-1}$ a Pregnylu 3000 $IU \times kg^{-1}$.

Nejlepší synchronizace byla po podání lyofilizované kapří hypofýzy (1 hod.). Naopak nejhorší byla po podání Pregnylu 3000 $IU \times kg^{-1}$ (12 hod.).

Nejvyšší relativní plodnosti bylo dosaženo po podání Ovaprimu v dávce 1 $ml \times kg^{-1}$ a to 20,2 % b.w. respektive 170 $ks \times g^{-1}$. To je v souladu s doposud publikovanou literaturou. Tato hodnota není výrazněji odlišná od relativní hmotnosti ovarií v předvýtěrovém období. Naopak nejhorší plodnosti dosáhly samice stimulované přípravky bez dopaminergního inhibitoru. V tomto experimentu to byly přípravky Pregnyl a Chorulon, u kterých byl tento parametr poloviční.

Průměrná mokrá hmotnost jikry piskoře pruhovaného se mezi preparáty nelišila a v tomto experimentu činila 1,13 mg. Hmotnost jikry byla ovlivněna kvalitou výtěru. Částečně vytřené samice měly lehčí jikry, jelikož neabsorbovaly tolik vody.

Sušina jikry v průměru činila 0,21 mg respektive 19 %. V závislosti na použitém preparátu se měnil podíl sušiny v jikře. Nejvíce sušiny měla skupina samic stimulovaná Pregnylem 1500 $IU \times kg^{-1}$ a to 27 %. Nejmenší podíl sušiny byl u skupiny samic

stimulované Ovaprimem v dávce 2 ml×kg^{-1}. Tento ukazatel byl ovlivněn i vytřeností samice. Částečně vytřené samice produkovaly jikry o vyšším podílu sušiny.

Energetická hodnota jikry nebyla ovlivněna použitým preparátem. Průměrná hodnota činila 25,7 kJ×g^{-1}.

Jikra piskoře pruhovaného v tomto experimentu v průměru obsahovala 53 % uhlíku, 12 % dusíku, 21 % kyslíku, 8 % Vodíku a 0,3 % síry. Chemická kompozice jiker byla rozdílná v množství kyslíku pouze mezi hypofýzou a Ovaprimem 2 ml×kg^{-1}.

Vzhledem k výsledkům této práce je k další produkci gamet doporučován preparát Ovaprim v dávce 1 ml×kg^{-1} či Ovopel v dávce 1 peleta×kg^{-1}. Tyto preparáty se osvědčily i v produkci gamet jak piskoře pruhovaného, tak jemu příbuzných druhů.

7. Seznam citované literatury:

ADÁMKOVÁ-STIBRANYIOVA, I, Z. ADÁMEK a I. ŠÚTOVSKÝ, 1999. A comparative study on the induced spawning in female loach (*Misgurnus fossilis*) by means of single and double pituitary injection technique. *Czech Journal of Animal Science*. vol. 44, pp. 403–407.

AKIYAMA, T., M. SHIRAISHI, T. YAMAMOTO a T. UNUMA, 1996. Effect of Dietary Tryptophan on Maturation of Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fisheries Science*. vol. 62, no. 5, pp. 776–782.

BACON, P. J., J. C. MACLEAN, I. A. MALCOLM a W. S. C. GURNEY, 2012. Ova fecundity in Scottish Atlantic salmon *Salmo salar*: Predictions, selective forces and causal mechanisms. *Journal of Fish Biology*. vol. 81, pp. 921–938.

BALON, E. K., 1975. Reproductive guilds of fishes: A proposal and definition. *Journal of the Fisheries Board of Canada*. vol. 32, pp. 821–864.

BANARESCU, P., 1964. Pisces - Osteichthyes. Fauna Republicii Populare Romine. Bucuresti: Acad. RPR.

BARUŠ, V. a O. OLIVA, eds., 1995. Mihulovci (Petromyzontes) a ryby (Osteichthyes) (2) Fauna ČR a SR. 1st ed. Praha: Academia. ISBN 80-200-0218-9.

BOHL, E., 1993. Schlammpeitzger. In: Rundmäuler und Fische im Sediment. Ökologische Untersuchen an Bachneunauge (*Lampetra planeri*), Schlammpeitzger (*Misgurnus fossilis*) und Steinbeisser (*Cobitis taenia*) in Bayern. Bayern: Bayerische Landesanstalt für Wasserforschung, pp. 30–43.

BOHLEN, J, 2000. Similarities and differences in the reproductive biology of loaches (*Cobitis* and *Sabanejewia*) under laboratory conditions. *Folia zoologica*. vol. 49, pp. 179–186.

BOHLEN, J., 2008. Spawning marks in spined loaches (*Cobitis taenia*, Cobitidae, Teleostei). *Folia Zoologica*. vol. 57, pp. 168–171.

BOHLEN, J., V. ŠLECHTOVÁ, I. DOADRIO a P. RÁB, 2007. Low mitochondrial divergence indicates a rapid expansion across Europe in the weather loach, *Misgurnus fossilis* (L.). *Journal of Fish Biology*. 10., vol. 71, pp. 186–194.

BRETON, B., I. ROELANTS, T. MIKOLAJCZYK, P. EPLER a F. OLLEVIER, 1995. Induced spawning in teleost fish after oral administration of GnRH-a. *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Austin 1995*. pp. 102–104.

BRZUSKA, E, 1999. Artifcial spawning of herbivorous Fish: use of an LHRH-a to induce ovulation in grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes) and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes). *Aquaculture Research*. vol. 30, pp. 849–856.

BURTON, T., S. MCKELVEY, D. C. STEWART, J. D. ARMSTRONG a N. B. METCALFE, 2013. Offspring investment in wild Atlantic salmon (*Salmo salar*): relationships with smolt age and spawning condition. *Ecology of Freshwater Fish*. vol. 22, pp. 317–321.

CRKVOVÁ, B., 2012. Komparativní vývojová morfogeneze vnějších žaber obratlovců. B.m. Charles University in Prague, Diplomová práce

DROZD, B., 2011. Study of selected population parameters of weatherfish *Misgurnus fossilis* (Cypriniformes, Cobitidae): early life history and status of ploidy in fish from Lužnice River floodplain area. Vodňany. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

DROZD, B., M. FLAJŠHANS a P. RÁB, 2010. Sympatric occurrence of triploid, aneuploid and tetraploid weatherfish *Misgurnus fossilis* (Cypriniformes, Cobitidae). *Journal of Fish Biology*. 12., vol. 77, no. 9, pp. 2163–70.

DROZD, B., J. KOUŘIL, M. BLÁHA a J. HAMÁČKOVÁ, 2009. Effect of temperature on early life history in weatherfish, *Misgurnus fossilis* (L. 1758). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*. vol. 392, pp. 04p1-04p17.

DUBSKÝ, K., 1998a. Základy chovu kapra. Praha: Institut výchovy a vzdělávání MZe ČR. ISBN 80-7105-167-5.

DUBSKÝ, K., 1998b. Základy chovu vedlejších ryb. Praha: INSTITUT PRAHA. ISBN 80-7105-168-3.

DUBSKÝ, K., 2013a. Chov ryb v rybnících. In: *Příručka pro rybářské hospodáře*. 1st ed. Praha: Český rybářský svaz, p. 161–240. ISBN 978-80-905280-2-4.

DUBSKÝ, K., 2013b. Zarybňování mimopstruhových revírů. In: *Příručka pro rybářské hopodáře*. Praha, Český rybářský svaz, p. 325–331. ISBN 978-80-90528-2-4.

DUFOUR, S., M. E. SEBERT, F. A. WELTZIEN, K. ROUSSEAU a C. PASQUALINI, 2010. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *Journal of Fish Biology*. vol. 76, pp. 129–160.

DYK, V., 1940. Zaplísnění a hynutí piskořů (*Misgurnus fossilis* L .). *Zvláštní otisk ze Zvěrolékařského obzoru*. vol. 33, no. 17, pp. 3–7.

DYK, V., 1956. Naše ryby. 4th ed. Praha: ČSAZV.

EGAMI, N. a I. SUSUMU, 1962. Hypophyseal Control of Reproductive Functions in Teleost Fishes. *General and Comparative Endocrinology*. no. Sup 1, pp. 248–253.

EINUM, S. a I. A. FLEMING, 1999. Maternal effects of egg size in brown trout (*Salmo trutta*): norms of reaction to environmental quality. *Proceedings: Biological Sciences*. vol. 266, pp. 2095–2100.

EINUM, S. a I. A. FLEMING, 2002. Does within-population variation in fish egg size reflect maternal influences on optimal values? *The American naturalist*. vol. 160, no. 6, pp. 756–765.

EVANS, D. H., 1998. The physiology of fishes. 2nd ed. Florida: CRC Marine Science Series. ISBN 08-4938427-3.

EZCURRA, D. a P. HUMAIDAN, 2014. A review of luteinising hormone and human chorionic gonadotropin when used in assisted reproductive technology. *Reproductive Biology and Endocrinology*. vol. 12, no. 1, pp. 12–95. ISSN 1477-7827.

FLAJŠHANS, M. a P. RÁB, 2013. "Konzervační genetika", ochrana genetických zdrojů a záchranné chovy. In: *Genetika a šlechtění ryb*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, p. 17–34. ISBN 978-80-87437-48-3.

FONTAINE, P., P. KESTEMONT, F. TELETCHEA a N. WANG, eds., 2008. Percid Fish Culture: From Research to Production. ISBN 978-2-87037-582-2.

FOX, J., 2005. The R Commander: A Basich Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software*. vol. 14, no. 9, pp. 1–42.

FREYHOF, J. a E. BROOK, 2011. European Red List of Freshwater Fishes. Luxembourg: Publications Office of the European Union. ISBN 978-92-79-20200-1.

FREYHOF, J. and E. KORTE, 2005. The first record of *Misgurnus anguillicaudatus* in Germany. *Journal of Fish Biology*. vol. 66, pp. 568–571.

FRIČ, A., 1859. České ryby od Antonína Friče, kustota živočišného oddílu při Museu království Českého v Praze. *Živa*. vols. 1-4, p. 56 pp.

FRIČ, A., 1872. O rybářství v řekách českých a o jeho poměru k umělému pěstování ryb a k průmyslu. *Archiv pro přírodovědecké prozkoumání Čech*. vol. 2, no. 4, pp. 151–189.

FUJIMOTO, T., G. S. YASUI, H. YOSHIKAWA, E. YAMAHA a K. ARAI, 2008. Genetic and reproductive potential of spermatozoa of diploid and triploid males obtained from interspecific hybridization of *Misgurnus anguillicaudatus* female with *M. mizolepis* male. *Journal of Applied Ichthyology*. vol. 24, pp. 430–437.

GAGE, M. J.G., C. P. MACFARLANE, S. YEATES, R. G. WARD, J. B. SEARLE a G. A. PARKER, 2004. Spermatozoal Traits and Sperm Competition in Atlantic Salmon. *Current Biology*. 1., vol. 14, no. 1, pp. 44–47.

GAISLER, J. a J. ZIMA, 2007. Zoologie obratlovců. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-1484-9.

GAO, J., S. KOSHIO, W. WANG, Y. LI, S. HUANG a X. CAO, 2014. Effects of dietary phospholipid levels on growth performance, fatty acid composition and antioxidant responses of Dojo loach *Misgurnus anguillicaudatus* larvae. *Aquaculture*. B.m.: Elsevier B.V., vols. 426-427, pp. 304–309.

GELDHAUSER, F., 1992. Die kontrollierte Vermehrung des Schlammpeitzgers (*Misgurnus fossilis*, L.). *Fischer und Teichwirt*. vol. 43, pp. 2–6.

GIRAUDOUX, P., 2015. Data analysis in ecology Package " pgirmess .",*R core*, Austria

GRIEB, A. W., 1937. Die larvale Periode in der Ebtwicklung des Schlammbeissers (*Misgurnus fossilis* L., Cobitidae, Cyprinoidea). *Acta Zoologica*. vol. 18, pp. 1 – 6.

HAFFRAY, P., W. J. ENRIGHT, M. A. DRIANCOURT, T. MIKOLAJCZYK, P. RAULT a B. BRETON, 2005. Optimization of breeding of Salmonids: GonazonTM the first officially approved inducer of ovulation in the EU. *World Aquaculture Magazine*. vol. 36, pp. 52–56.

HAMÁČKOVÁ, J., J. KOUŘIL, J. MASÁR a R. TURANSKÝ, 2007. Technologie chovu keříčkovce jihoafrického - sumečka afrického *(Clarias gariepinus)*. č. 79. Vodňany: Edice metodik, VÚRH.

HAMÁČKOVÁ, J., Z. STUPKA, P. LEPIČ, J. KOUŘIL, A. LEPIČOVÁ, P. KOZÁK, T. POLICAR, J MIKODINA a M.A. SEDOVA, 2003. Použití hřebíčkového oleje jako anestetika pro ryby. *Bulletin VÚRH Vodňany*. vol. 39, pp. 22–30.

HANEL, L. a S. LUSK, 2005. Ryby a mihule České republiky. Rozšíření a ochrana. Vlašim: ČSOP.

HARTVICH, P., S. LUSK a J. RUTKAYOVÁ, 2009. Threatened fishes of the world: *Misgurnus fossilis* (Linnaeus, 1758) (Cobitidae). *Environmental Biology of Fishes*. 30.10., vol. 87, no. 1, pp. 39–40.

HLIWA, P., S. KREJSZEFF, J. KRÓL a P. GOMULKA, 2010. Pozasezonowy kontrolowany rozród piskorza (*Misgurnus fossilis*) z zastosowaniem Ovopelu. In: *Rozród, podchów, profilaktyka ryb rzadkich i chronionych oraz innych gatunków*. Olsztyn: Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Śródladowego, p. 45–54 (in polish). ISBN 978-83-60111-50-5.

HLIWA, P., S. KREJSZEFF, J. KRÓL, K. KOZLOWSKI a P. GOMULKA, 2011. Out-of-season Spawnining of Threatened Weatherfish *Misgurnus fossilis* (L. 1758) Using Commercial Preparations Containing GnRH Analogues. *Indian Journal of Science and Technology*. vol. 4, no. 8, p. 294.

HOLČÍK, J. a K. HENSEL, 1972. Ichtyologická príručka. Bratislava: Vydavateľstvo Obzor.

HORVATH, L., T. SZABO a J. BURKE, 1997. Hatchery testing of GnRH analogue-containing pellets on ovulation in four cyprinid species. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*. vol. 44, no. (1-2), pp. 221–226.

IP, Y. K., S. F. CHEW a D. J. RANDALL, 2004. Five tropical air-breathing fishes, six different strategies to defend against ammonia toxicity on land. *Physiological and Biochemical Zoology*. vol. 77, pp. 768–782.

IZQUIERDO, M .S., H. FERNANDEZ-PALACIOS a G. J. TACON, 2001. Effect of broodtsock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*. vol. 197, pp. 25–42.

JAKUBOWSKI, M., 1958. The structure and vascularization of the skin of the pond-loach (*Misgurnus fossilis* L.). *Acta Biologica Cracoviensia*. vol. 1, pp. 113–127.

JUCHNO, D., A. BOROŃ, R. KUJAWA, J. SZLACHCIAK, S. SZACHERSKI, A. SPÓZ a A. GRABOWSKA, 2013. Comparison of egg and offspring size of karyologically identified spined loach , *Cobitis taenia* L ., and hybrid triploid *Cobitis* females (Pisces , Cobitidae). *Archives of Polish Fisheries*. vol. 21, pp. 293–299.

KAMLER, E., 2005. Parent–egg–progeny Relationships in Teleost Fishes: An Energetics Perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 11., vol. 15, no. 4, pp. 399–421.

KAMLER, E., M. SZLAMIŃSKA, M. KUCZYŃSKI, J. HAMÁČKOVÁ, J. KOUŘIL a R. DABROWSKI, 1994. Temperature-induced changes of early development and yolk utilization in the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal of Fish Biology*. vol. 44, pp. 311–326.

KASPAR, V., M. VANDEPUTTE, K. KOHLMANN, M. HULAK, M. RODINA, D. GELA, M. KOCOUR a O. LINHART, 2008. A proposal and case study towards a conceptual approach of validating sperm competition in common carp (*Cyprinus carpio* L.), with practical implications for hatchery procedures. *Journal of Applied Ichthyology*. 8., vol. 24, no. 4, pp. 406–409.

KLYACHKO, O. S., E. S. POLOSUKHINA a N. D. OZERNYUK, 1995. The effects of temperature and chorionic gonadotropin on the functional properties of lactate dehydrogenase from oocytes of loach *Misgurnus fossilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. vol. 111, no. 4, pp. 517–521.

KOCIÁN, P., 2014. Potravní biologie a růst piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*) v průběhu prvního roku života. FROV JU, Bakalářská práce.

KOCOUR, M., V. KAŠPAR, D. GELA a M. FLAJŠHANS, 2012. Způsoby osemeňování jiker při umělé reprodukci ryb z hlediska následného využití potomstva. č. 133. Vodňany: Edice metodik, VÚRH. ISBN 978-80-87437-54-4.

KOPEIKA, J., E. KOPEIKA, T. ZHANG, D. M. RAWSON a W. V. HOLT, 2003. Detrimental effects of cryopreservation of loach (*Misgurnus fossilis*) sperm on subsequent embryo development are reversed by incubating fertilised eggs in caffeine. *Cryobiology*. 2., vol. 46, no. 1, pp. 43–52.

KORVIN-PAVLOVSKAYA, E. G., I. V. NEKLYUDOVA, L. A. SLEPTZOVA a V. A. GOLYCHENKOV, 1996. Studies of regulation proceses in early Loach Embryos with Reduced yolk volume of the zygote. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya 16. Biologiya*. vol. 4, pp. 33–36 (in Russian).

KOSTOMAROVA, A. A., 1991. Weather loach (*Misgurnus fossilis*). In: T. A. DETTLAFF a S. G. VASSETZKY, eds. *Animal species for developmental studies, Volume 2: Vertebrates*. New York: Consultants Bureau, p. 125–144.

KOTLJAREVSKAJA, N. V., 1967. O srokach vyluplenija vjuna (*Misgurnus fossilis* L.) v zavisimosti ot kislorodnogo režima. *Doklady AN SSSR*. vol. 177, no. 5, pp. 1245–1248.

KOTTELAT, M. a J. FREYHOF, 2007. Handbook of European freshwater fishes. Berlin, Germany: Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof. ISBN 978-2-8399-0298-4.

KOTUSZ, J, 1995. Morphological characteristics of the mud loach *Misgurnus fossilis* from the mid Odra and Vistula River basins. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*. vol. 25, no. 2, pp. 4 – 14.

KOUŘIL, J., B. DROZD, M. PROKEŠOVÁ a V. STEJSKAL, 2013. Intenzivní chov keříčkovce jihoafrického - sumečka afrického (*Clarias gariepinus*). č. 138. Vodňany: Edice metodik, VÚRH. ISBN 978-80-87477-79-7.

KOUŘIL, J. a J. HAMÁČKOVÁ, 1996. The artificial reproduction of weatherfish, *Misgurnus fossilis* L. *Biodiverzita ichtyofauny České republiky*. vol. 1, pp. 69–72.

KOUŘIL, J., J. HAMÁČKOVÁ, Z. ADÁMEK, I. SOKUP, I. STIBRANYIOVÁ a R. VACHTA, 1996. The artificial propagation and culture of young weatherfish (*Misgurnus fossilis* L.). In: A. KIRCHHOFER a D. HEFTI, eds. *Conservation on Endangenred Freshwater Fish in Europe*. Basel: Berhäuser Verlag, p. 305–310.

KOUŘIL, J., J. HAMÁČKOVÁ, P. LEPIČ a J. MAREŠ, 2002. Poloumělý a umělý výtěr okouna říčního a odchov jeho raného plůdku. Vodňany: Edice metodik, VÚRH, č. 68. ISBN 80-85887-38-X.

KOUŘIL, J., J. HAMÁČKOVÁ, A. LEPIČOVÁ, Z. ADÁMEK, P. LEPIČ, P. KOZÁK a T. POLICAR, 2008a. Řízená reprodukce a odchov plůdku perlína ostrobřichého a hrouzka obecného. Vodňany: Edice metodik, VÚRH, č. 69. ISBN 978-80-85887-73-0.

KOUŘIL, J., J. HAMÁČKOVÁ, O. LINHART, T. BARTH, A. l. GLUBOKOV a P. HAFFRAY, 1995. Induced ovulation of European catfish (*Silurus glanis*) by carp pituitary, GnRH analogue and/or dopamine inhibitor isofloxythepin. *Živočišná výroba*. vol. 41, no. 5, pp. 205–207.

KOUŘIL, J., J. MAREŠ, J. POKORNÝ, Z. ADÁMEK, T. RANDÁK, J. KOLÁŘOVÁ a M. PALÍKOVÁ, 2008b. Chov lososovitých ryb, lipana a síhů. 1st ed. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech. ISBN 978-80-85887-80-8.

KOUŘIL, J. a P. PODHOREC, 2011. Umělý výtěr lína obecného. Vodňany: Edice metodik, VÚRH, č. 113. ISBN 978-80-87437-31-5.

KOUŘIL, J., P. PODHOREC, V. STEJSKAL, T. POLICAR, J. KŘIŠŤAN a B. DROZD, 2011. Optimalizace metod hormonálně indukované ovulace při řízené reprodukci vybraných hospodářsky významných teplomilných druhů ryb. č. 120. Vodňany: Edice metodik, VÚRH. ISBN 978-80-87437-38-4.

KRUPKA, I., 1987. Umělý výtěr a odchov plůdku parmy. Vodňany: Edice metodik, VÚRH č. 23.

KRYŽANOVSKIJ, 1949. Ekologo-morfologicseskije zakonomernosti razvitija karpovych, vjunovych i somovych ryb (Cyprinoidei i Siluroidei). Trudy Instituta Morfologii Zivotnych AN SSSR.

KŘIŠTAN, J., S. M. H. ALAVI, V. STEJSKAL a T. POLICAR, 2013. Hormonal induction of ovulation in pikeperch (*Sander lucioperca* L.) using human chorionic gonadotropin (hCG) and mammalian GnRH analogue. *Aquaculture International*. 3.8., vol. 21, no. 4, pp. 811–818.

LAHNSTEINER, F., T. WEISMANN a R. A. PATZNER, 1995. Composition of the ovarian fluid in 4 salmonid species: *Oncorhynchus mykiss, Salmo trutta f lacustris, Salvelinus alpinus* and *Hucho hucho*. *Reproduction, nutrition, development*. vol. 35, pp. 465–474.

LAPPALAINEN, J., H. DÖRNER a K. WYSUJACK, 2003. Reproduction biology of pikeperch (*Sander lucioperca* (L .)) – a review. *Ecology of Freshwater Fish*. vol. 12, pp. 95–106.

LEGALLE, M., S. MASTRORILLO, F. SANTOUL a R. CÉRÉGHINO, 2005. Ontogenetic Microhabitat Shifts in the Bullhead,*Cottus gobio* L.,in a Fast Flowing Stream. *International Review of Hydrobiology*. 6., vol. 90, no. 3, pp. 310–321.

LEGENDRE, M., D. SATYANI, S. SUBANDIYAH, SUDARTO, L. POUYAUD, E. BARAS a J. SLEMBROUCK, 2012. Biology and culture of the clown loach *Chrombotia macracanthus* (Cypriniformes, Cobitidae) : 1 - Hormonal induced breeding, unusual latency response and egg production in two populations from Sumatra and Borneo Islands. *Aquatic Living Resources*. vol. 25, pp. 95–108.

LIN, H. R., G. VAN DER KRAAK, X. J. ZHOU, J. Y. LIANG, R. E. PETER, J. E. RIVIER a W. W. VALE, 1988. Effects of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9NEt]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozide or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. *General and Comparative Endocrinology*. vol. 69, no. 1, pp. 31–40.

LIN, H. R., X. J. ZHOU, G. VAN DER KRAAK a R. E. PETER, 1991. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonists and dopamine antagonists on gonadotropin secretion and ovulation in Chinese loach, *Paramisgurnus dabryanus*. *Aquaculture*. vol. 95, pp. 139–147.

LINHART, O., D. GELA, M. FLAJŠHANS a P. DUDA, 2000. Alcalase enzyme treatment for elimination of egg stickiness in tench, *Tinca tinca* L. *Aquaculture*. vol. 191, pp. 303–308.

LINHART, O., D. GELA, M. FLAJŠHANS a M. RODINA, 2003. Proteolytic enzyme treatment: an improved method for elimination of egg stickiness in tench, *Tinca tinca* L., in aquaculture. *Journal of Applied Ichtyology*. vol. 19, pp. 134–137.

LUSK, S., V. BARUŠ a J. VOSTRADOVSKÝ, 1983. Ryby v našich vodách. 1st ed. Praha: Academia. ISBN 509-21-856.

LUSK, S., K. HALAČKA a V. LUSKOVÁ, 2003. Rehabilitating the floodplain of the lower River Dyje for fish. *River Research and Applications*. 5., vol. 19, no. 3, pp. 281–288.

LUSK, S. a L. HANEL, 1996. Druhová diverzita ichtyofauny České republiky. *Biodiverzita ichtyofauny České republiky*. vol. 1, pp. 5 –15.

LUSK, S., V. LUSKOVÁ a M. DUŠEK, 2002. Biodiverzita ichtyofauny České republiky a problematika její ochrany. *Biodiverzita ichtyofauny České republiky, Ústav biologie obratlovců AV ČR, Brno*. vol. 4, pp. 5–22.

LUSK, S., V. LUSKOVÁ, L. HANEL a B. LOJKÁSEK, 2011. Červený seznam mihulí a ryb České republiky – verze 2010. *Biodiverzita ichtyofauny České republiky*. vol. VIII, pp. 68–78.

MANNAERTS, B. M. J. L., T. B. P. GEURTS a J. ODINK, 1998. A randomized three-way cross-over study in healthy pituitary-suppressed women to compare the bioavailability of human chorionic gonadotrophin (Pregnyl) after intramuscular and subcutaneous administration. *Human Reproduction*. vol. 13, no. 6, pp. 1461–1464.

MEYER, L. a D. HINRICHS, 2000. Microhabitat preferences and movements of the weatherfish, *Misgurnus fossilis*, in a drainage channel. *Environmental biology of fishes*. vol. 58, pp. 297–306.

MIGAUD, H., P. FONTAINE, I. SULISTYO a P. KESTEMONT, 2002. Induction of out-of-season spawning in Eurasian perch Perca fluviatilis: effects of rates of cooling and cooling durations on female gametogenesis and spawning. *Aquaculture*. vol. 205, pp. 253–267.

MIKOLAJCZYK, T., I. ROELANTS, P. EPLER, F. OLLEVIER, J. CHYB a B. BRETON, 2002. Modified absorption of sGnRH-a following rectal and oral delivery to common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture*. vol. 203, pp. 375–388.

MILLA, S., B. JALABERT, H. RIME, P. PRUNET a J. BOBE, 2006. Hydration of rainbow trout oocyte during meiotic maturation and in vitro regulation by 17,20{beta}-dihydroxy-4-pregnen-3-one and cortisol. *The Journal of experimental biology*. vol. 209, pp. 1147–1156.

MILLAR, R. P., Z. L. LU, A. J. PAWSON, C. FLANAGAN, K. MORGAN a S. R. MAUDSLEY, 2004. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine reviews*. 4., vol. 25, no. 2, pp. 235–275.

MOSHGANI, M. a T. J. M. VAN DOOREN, 2011. Maternal and paternal contributions to egg size and egg number variation in the blackfin pearl killifish *Austrolebias nigripinnis*. *Evolutionary Ecology*. vol. 25, pp. 1179–1195.

MUUS, B. J. a P. DAHLSTROM, 1978. Freshwater fish of Britain and Europe. London: Collins. ISBN 00-021-9270-5.

MYEONG-HUN, K. a B. IN-CHUL, 2014. Spawning Character and Early Life History of the Endangered Korean Dwarf Loach, *Kichulchoia brevifasciata* (Teleostei: Cobitidae). *Korean Journal of Ichthyology*. vol. 26, no. 2, pp. 89–98.

MYLONAS, C.C. a Y. ZOHAR, 2007. Promoting Oocyte Maturation , Ovulation and Spawning in Farmed Fish. In: *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. p. 437–474.

MYLONAS, C. C., A. FOSTIER a S. ZANUY, 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and comparative endocrinology*., vol. 165, no. 3, pp. 516–34.

NAKANO, E., 1953. Respiration during maturation and at fertilization of fish eggs. *Embryologia*. vol. 2, no. 2, pp. 21–31.

NEYFAKH, A. A., 1959. X-ray inactivation of nuclei as method for studying their function in the early development of fishes. *Journal of embryology and experimental morphology*. 6., vol. 7, pp. 173–92.

NOVÁK, L., 2011. O původu slov (Etymologie názvosloví sladkovodních druhů ryb v ČR a anglicky mluvících zemích Evropy). PřF UK Praha., Diplomová práce.

OGATA, H., S. KITAMURA a F. TAKASHIMA, 1994. Release of 13,14-Dihydro-15Keto-Prostaglandin F2, a Sex Pheromone, to Water by Cobitid Loach Following Ovulatory Stimulation. *Fisheries Science*. vol. 60, no. 2, pp. 143–148.

OLIVA, O. a K. CHITRAVADIVELU, 1973. Morphometrical note on the weather-fish, *Misgurnus fossilis* (Linnaeus, 1758) (Osteichthyes - Cobitidae). *Acta Societas Zoologicae Bohemicae*. vol. 4, pp. 275–281.

PALACE, V. P. a J. WERNER, 2006. Vitamins A and E in the maternal diet influence egg quality and early life stage development in fish: a review. *Recent Advances in the Study of Fish Eggs and Larvae. Scientia Marina 70S2*. no. October, pp. 41–57.

PARK, J, 2001. Histology and mucin histochemistry of the gastrointestinal tract of the mud loach, in relation to respiration. *Journal of Fish Biology*. 3., vol. 58, no. 3, pp. 861–872.

PARK, J. Y., I. S. KIM a S. Y. KIM, 2001. Morphology and Histochemistry of the Skin of the Mud Loach, *Misgurnus mizolepis*, in Relation to Cutaeneous Respiration. *Korean Journal of Biological Sciences*. vol. 5, pp. 303–308.

PARK, J. Y., I. S. KIM a S. Y. KIM, 2003. Structure and mucous histochemistry of the intestinal respiratory tract of the mud loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor). *Journal of Applied Ichthyology*. vol. 19, pp. 215–219.

PEKARIK, L., J. KOSCO, L. KOSUTHOVA a P. KOSUTH, 2008. Coenological and habitat affinities of *Cobitis elongatoides*, *Sabanejewia balcanica* and *Misgurnus fossilis* in Slovakia. *Folia Zoologica*. vol. 57, pp. 172–180.

PEŇÁZ, M. a O. PRÁŠIL, 1987. Úhoř říční. Praha: ČRS. ISBN 07-009-87.

PERDICES, A., V. VASIL'EV a E. VASIL'EVA, 2011. Molecular phylogeny and intraspecific structure of loaches (genera *Cobitis* and *Misgurnus*) from the Far East region of Russia and some conclusions on their systematics. *Ichthyological Research*. 20.12., vol. 59, no. 2, pp. 113–123.

PETER, R. E., H. R. LIN a G. VAN DER KRAAK, 1988. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: Advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture*. 11., vol. 74, no. 1-2, pp. 1–10.

PIMM, S. L., C. N. JENKINS, R. ABELL, T. M. BROOKS, J. L. GITTLEMAN, L. N. JOPPA, P. H. RAVEN, C. M. ROBERTS a J. O. SEXTON, 2014. The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. *Science*. 30.5., vol. 344, no. 6187, p. 1246752.

PIVNIČKA, K., 1981. Ekologie ryb: Odhady základních parametrů charakterizujících rybí populace. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství.

PODHOREC, P. a J. KOUŘIL, 2009a. Hypothalamic factor (GnRH and DA) and their utilization to elimination of reproductive dysfunction in cyprinidae fish (A review). *Bulletin VÚRH Vodňany*. vol. 45, no. 1, pp. 10–17.

PODHOREC, P. a J. KOUŘIL, 2009b. Induction of final oocyte maturation in Cyprinidae fish by hypothalamic factors : a review. *Veterinarni Medicina*. vol. 54, no. 3, pp. 97–110.

PODUBSKÝ, V., 1955. Střevní dýchání piskoře pruhovaného (*Misgurnis fossilis* L.), mřenky mramorované (*Nemachilus barbaturlus* L.) a sekavce obecného (*Cobitis taenia* L.). *Živočišná výroba*. vol. 25, no. 5, pp. 423–432.

PODUBSKÝ, V. a E. ŠTĚDRONSKÝ, 1953. Příspěvek k biologii piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis* L.). *Sborník československé akademie věd*. vols. 2-3, pp. 333–336.

POHLERT, T., 2014. The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). *R package*. pp. 1–9.

POLICAR, T., M. H. ALAVI, V. STEJSKAL, J. KŘIŠŤAN a J. KOUŘIL, 2011a. Umělý a poloumělý výtěr okouna říčního *(Perca fluviatilis)* používaný k masové produkci embryí. Vodňany: Edice metodik, VÚRH č. 117. ISBN 978-80-87437-35-3.

POLICAR, T., M. BLÁHA, J. KŘIŠŤAN a V. STEJSKAL, 2011b. Kvalitní a vyrovnaná produkce rychleného plůdku cándáta obecného (Sander lucioperca) v rybnících. Vodňany: Edice metodik, VÚRH č. 110. ISBN 978-80-87437-30-8.

POLICAR, T., B. DROZD, J. KOUŘIL, J. HAMÁČKOVÁ, S. M. H. ALAVI, A. VAVREČKA a P. KOZÁK, 2010. Současný stav, umělá reprodukce a odchov násadového materiálu parmy obecné *(Barbus barbus L.)*. Vodňany: Edice metodik, VÚRH, č. 95. ISBN 978-80-85887-95-2.

POLICAR, T., V. STEJSKAL, M. BLÁHA, S. M. H. ALAVI a J. KOUŘIL, 2009. Technologie intenzivního chovu okouna říčního *(Perca fiuviatilis L.)*. Vodňany: Edice metodik, VÚRH č. 89.

PROKEŠOVÁ, M., 2012. Vliv teploty na průběh rané ontogeneze u keříčkovce červenolemého (*Clarias gariepinus*). FROV JU, Diploová práce.

PROTIVA, M., J. JÍLEK, M. RAJŠNER, J. POMYKÁČEK, M. RYSKA, J. HOLUBEK, E. SVÁTEK a J. METYŠOVÁ, 1986. Fluorinated tricyclic neuroleptics with prolonged action: 7-Fluoro-11-[4-(2-hydroxyethyl) piperazino]-2-isopropyl-10, 11-dihydrodibenzo [b, f] thiepin. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. vol. 51, pp. 698–722.

R CORE TEAM, 2014. *R:* The language and environment for statistical computing [online]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computig. Retrieved z: http://www.r-project.org/

RAICU, P. a E. TAISESCU, 1972. *Misgurnus fossilis*, a tetraploid fish species. *Journal of Heredity*. vol. 63, no. 2, pp. 92–94.

RANDÁK, T., J. TUREK, J. KOLÁŘOVÁ, M. KOCOUR, J. KOUŘIL, R. HANÁK, J. VELÍŠEK a V. ŽLÁBEK, 2009. Technologie chovu generačních lipanů podhorních za účelem udržitelné produkce kvalitního násadového materiálu pro zarybňování volných vod. Vodňany: Edice metodik, VÚRH č. 97. ISBN 978-80-85887-97-6.

REICHARD, M., R. SPENCE, A. BRYJOVÁ, J. BRYJA a C. SMITH, 2012. Female rose bitterling prefer MHC-dissimilar males: experimental evidence. *PloS one*. 1., vol. 7, no. 7, p. e40780.

RIDET, J. M., R. BAUCHOT a M. DIAGNE, 1976. The encephalus of the pond-loach, *Misgurnus fossilis* (L.), 1758 (fish, teleosts, Cobitidae). An example of sexual dimorphism. *Acta anatomica*. 1., vol. 95, no. 2, pp. 169–81.

RICHTER, C. J. J., A. J. ROTHUIS, E. H. EDING, F. G. F. OYEN, J. F. B. VAN CELLECUM, C. STRIJBOS, F. J. VERBON a J. T. GEIELEN, 1987. Ovarian and body responses of the African catfish (*Clarias gariepinus*) to human chorionic gonadotropin (Chorulon R) and carp pituitary suspension, used in a bioassay for estimating the gonadotropic activity of a crude carp powder preparation. *Aquaculture*. vol. 62, no. 1, pp. 53–66.

SAAT, T.V., 1980. Oocyte maturation and ovulation in the loach (*Misgurnus fossilis*) in vitro in different media and under different hormonal influences. *Ontogenezis*. vol. 30, pp. 545–554.

SCHOONBEE, H. J. a J. F. PRINSLOO, 1986. Use of pituitary glands of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* in the induced spawning of the European common carp *Cyprinus carpio* and the Chinese grass carp *Ctenopharyngodon idella* . *Water S. A.* vol. 12, pp. 235–237.

SILVA, J. P., J. TOLAND, S. NOTTINGHAM, W. JONES, J. ELDRIDGE, T. HUDSON, K. HEPPNER, D. MCGLYNN a C. THÉVIGNOT, 2015. Life and freshwater fish. Luxembourg: European Union. ISBN 978-92-79-44027-4.

SIVAKUMARAN, K. P., P. BROWN, D. STOESSEL a A. GILES, 2003. Maturation and reproductive biology of female wild carp, *Cyprinus carpio*, in Victoria, Australia. *Environmental Biology of Fishes*. vol. 68, pp. 321–332.

SLEPTZOVA, L. A., I. V. NEKLYUDOVA, E. G. KORVIN-PAVLOVSKAYA a O. V. BURLAKOVA, 2000. The Loach as an object of experimental embryological studies at the Department of Embryology. *Russian Journal of Developmental Biology*. 9., vol. 31, no. 5, pp. 282–286.

STEJSKAL, V., T. POLICAR, M. BLÁHA a J. KŘIŠŤAN, 2010. Produkce tržního okouna říčního (*Perca fluviatilis*) kombinací rybničního a intenzivního chovu. Vodňany: Edice metodik, VÚRH č.105. ISBN 978-80-87437-11-7.

SUZUKI, R., 1983. Multiple spawning of the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture*. vol. 31, pp. 233–243.

ŠVÁTORA, M., 1986. Okoun říční. České Budějovice: Český rybářský svaz.

TARGOŃSKA, K. a D. KUCHARCZYK, 2011. The Application of hCG, CPH and Ovopel in Successful Artificial Reproduction of Goldfish (*Carassius auratus auratus*) Under Controlled Conditions. *Reproduction in Domestic Animals*. vol. 46, pp. 651–655.

TARKAN, A. S., 2006. Reproductive ecology of two cyprinid fishes in an oligotrophic lake near the southern limits of their distribution range. *Ecology of Freshwater Fish*. vol. 15, pp. 131–138.

TIZKAR, B., M. SOUDAGAR, M. BAHMANI, S. A. HOSSEINI a M. CHAMANI, 2013. The Effects of Dietary Supplementation of Astaxanthin and B-caroten on the Reproductive Performance and Egg Quality of Female Goldfish (*Carassius auratus*). *Caspian Journal of Environmental Sciences*. vol. 11, no. 2, pp. 217–231.

VAVREČKA, A., T. POLICAR, J. KOUŘIL a J. VANIŠ, 2010. Reproduction of barbel (*Barbus barbus* L.) under controlled conditions. *Buletin VÚRH Vodňany*. vol. 46, no. 3, pp. 21–36.

VON BRANDT, A., 1984. Fish Catching Methods of the World. Farnham, England: Fishing News Books Ltd. ISBN 0-85238-125-5.

VON IHERING, R., 1937. A method for inducing fish to spawn. *The Progressive Fish-Culturist*. vol. 34, pp. 15–16.

VORLÍČKOVÁ, P., T. POLICAR, J. HAMÁČKOVÁ a P. KOZÁK, 2006. The effect of food supply on gonadal development of females and males of Barb (*Barbus barbus*) in controlled conditions. *Bulletin VÚRH Vodňany*. vol. 42, no. 1, pp. 25–32.

WANG, Y., M. HU, W. WANG, X. LIU, S. G. CHEUNG, P. K. S. SHIN a L. SONG, 2009. Effects of GnRHa (D-Ala, Pro-NEt) combined with domperidone on ovulation induction in wild loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture*. vol. 291, pp. 136–139.

WUNDER, W., 1936. Physiologie der Süswasser fische Mitteleropas.

YARON, Z., 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*. 1., vol. 129, no. 1-4, pp. 49–73.

YARON, Z., B. SIVAN, S. DRORI a Z. KULIKOVSKI, 2002. Spawning induction in Cyprinids: Hypophyseal and hypothalamic approaches. *Bulletin VÚRH Vodňany*. vol. 38, no. 4, pp. 181–193.

YOU, C., X. YU a J. TONG, 2009. Detection of hybridization between two loach species (*Paramisgurnus dabryanus* and *Misgurnus anguillicaudatus*) in wild populations. *Environmental Biology of Fishes*. vol. 86, pp. 65–71.

YOUSEFIAN, M., M. GHANEI, R. POURGOLAM a H. K. H. ROSTAMI, 2009. Gonad Development and Hormonal Induction in Artificial Propagation of Grey Mullet, *Mugil cephalus*. *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology*. vol. 4, no. 2, pp. 35–40.

YU, J.Y.L., S.T. SHEN, C.T. LIU, C.F. WENG, H.K. PENG a F.G. LIU, 1995. Comparative effects of avian and piscine gonadotrophins on gonadal steroidogenesis, and of avian and piscine pituitaries on induction of spermiation and ovulation in the loach and white silver carp. *Aquaculture*. 10., vol. 135, no. 1-3, pp. 59–72.

ZAKĘŚ, Z., 2007. Out-of-season spawning of cultured pikeperch [*Sander lucioperca* (L.)]. *Aquaculture Research*. 9., vol. 38, no. 13, pp. 1419–1427.

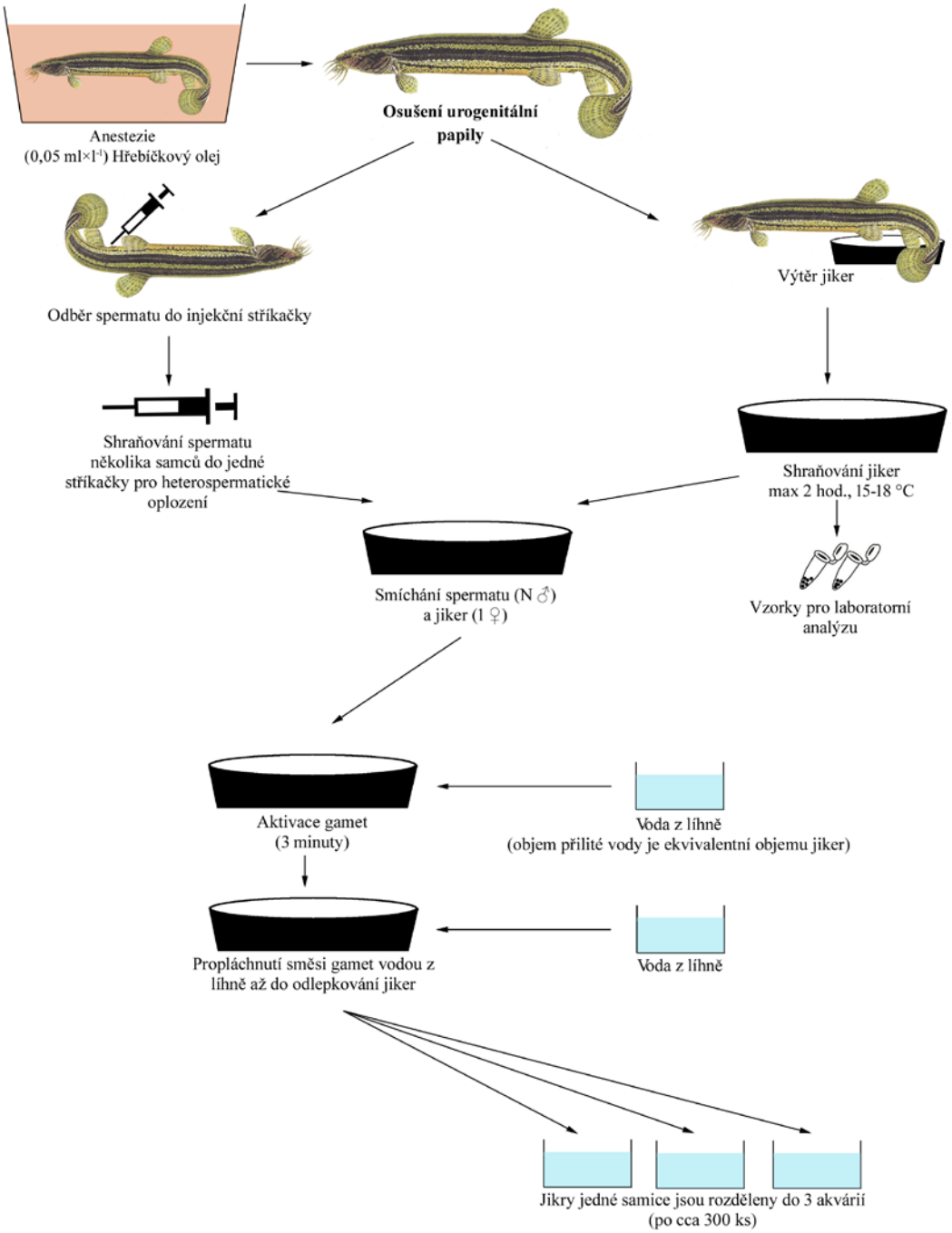
ŻARSKI, D., D. KUCHARCZYK, K. TARGOŃSKA, M. JAMRÓZ, S. KREJSZEFF a A. MAMCARZ, 2009. Application of Ovopel and Ovaprim and their Combinations in Controlled Reproduction of Two Reophilic Cyprinid Fish Species. *Polish Journal of Natural Science*. 1.12., vol. 24, no. 4, pp. 235–244.

ZIĘBA, G., G. COPP, G. DAVIES, P. STEBBING, K. WESLEY a R BRITTON, 2010. Recent releases and dispersal of non-native fishes in England and Wales, with emphasis on sunbleak *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843). *Aquatic Invasions*. 6., vol. 5, no. 2, pp. 155–161.

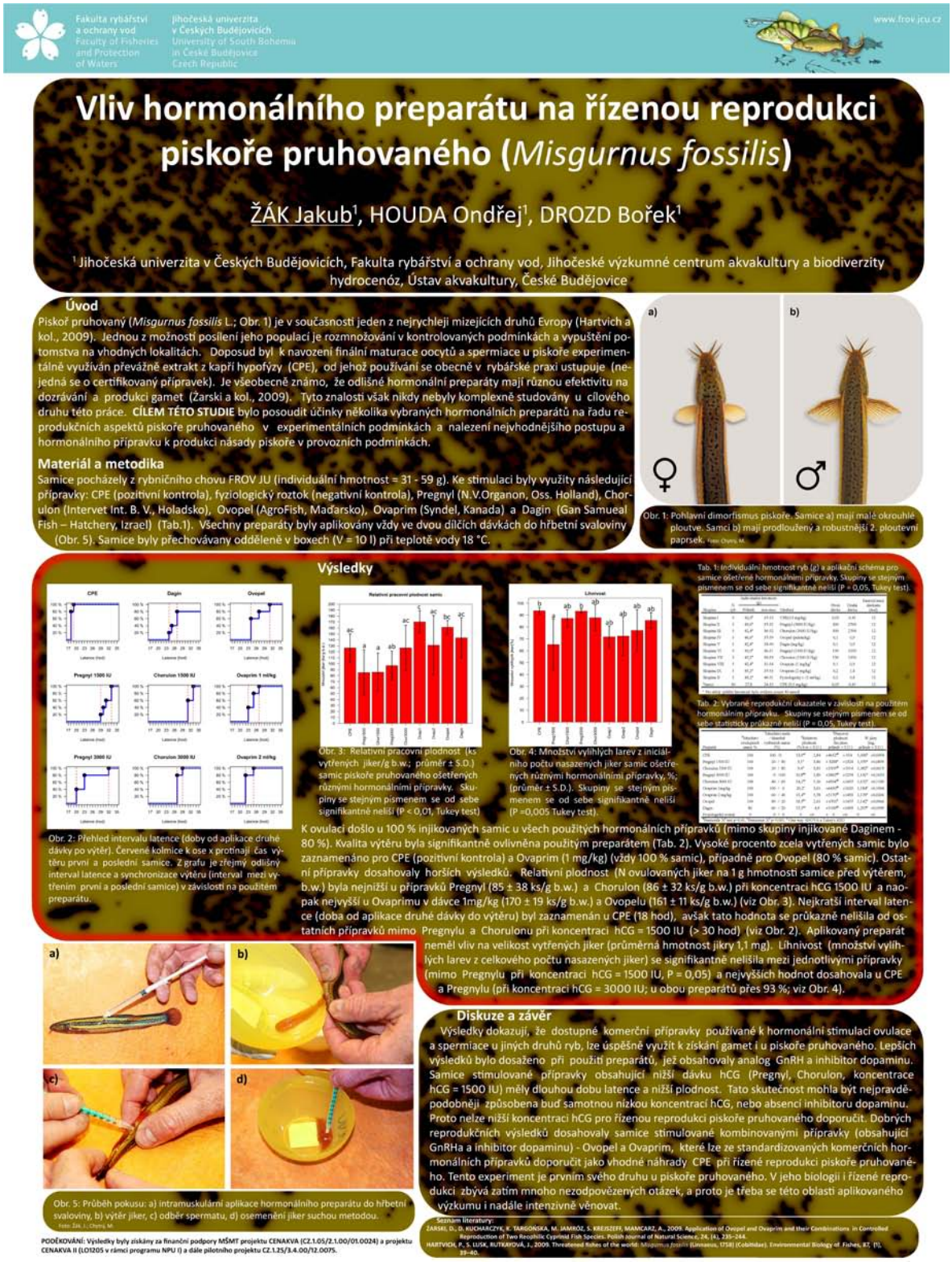
ZOTIN, I., V. S. FAUSTOV, L. I. RADZINSKAJA a N. D. OZERNYUK, 1967. ATP level and respiration of embryos. *Journal of embryology and experimental morphology*. 8., vol. 18, no. 1, pp. 1–12.

ZVÁRA, K., 2013. Základy statistiky v prostředí R. 1st ed. Praha: Karolinum.

8. Přílohy



Příloha: 1 Schéma procesu řízené reprodukce piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis L.)*.



Příloha 2: Příspěvek ve formě plakátového sdělení z konference „Zoologické dny Brno 2015," kde byly publikovány výsledky této práce.
Citace: ŽÁK, J., HOUDA, O. a DROZD, B., 2015, Vliv hormonálního preparátu na řízenou reprodukci piskoře pruhovaného (*Misgurnus fosilis*). In: J. BRYJA, Z. ŘEHÁK a J. ZUKAL, (ed.), *Zoologické dny Brno 2015*,, Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., p. 271–272, ISBN 978-80-87189-18-4,

9. Seznam zkratek

hCG (human chorionic gonadotropin) – lidský gonadotropní hormon

GtH – gonadotropní hormon

GnRH*a* – (gonadotropin releasing hormone analogue) –analog gonadotropin produkujícího hormonu

*s*GnRH*a* – (salmon gonadotropin releasing hormone analogue) – lososí analog gonadotropin produkujícího hormonu

*m*GnRH*a* - (mammal gonadotropin releasing hormone analogue) – savčí analog gonadotropin produkujícího hormonu

GtH II – (viz LH)

LH – luteinizační hormon

LHRH*a* – (luteinizing hormone – releasing hormone analogue) analog lutein produkujícího hormonu

L – (light) světelná část dne

D – (darknes) temnostní fáze dne

S.D. – (standard deviation) směrodatná odchylka

b.w. – (body weigth) tělesná hmotnost

IU – (international units) mezinárodní jedotky

RU – (rat units) krysí jednotky

CPE – (carp pituitary extract) extrakt z kapří hypofýzy

Preg3000 – Pregnyl v dávce 3000 IU

Ovop – Ovopel

Ovap1 – Ovaprim v dávce 1 $ml \times kg^{-1}$

Ovap2 – Ovaprim v dávce 2 $ml \times kg^{-1}$

Preg1500 – Pregnyl v dávce 1500 $IU \times kg^{-1}$

Chor1500 – Chorulon v dávce 1500 $IU \times kg^{-1}$

Chor3000 – Chorulon v dávce 3000 $IU \times kg^{-1}$

Dag – Dagin

DOM – domperidone, inhibitor dopaminu

PIM – pimozide, inhibitor dopaminu

M. mizolepis – Misgurnus mizolepis

M. fossilis – Misgurnus fossilis

M. anguillicaudatus – Misgurnus anguillicaudatus

P. dabryanus – Paramisgurnus dabryanus

FyzR – Fyziologický roztok

TCD detektor – thermal conductivity detector, jde o detektor využívající plynné chromatografie k určení chemického složení vzorku

10. Abstrakt

V rámci bakalářské práce byl zkoumán vliv využitého hormonálního preparátu na řízenou reprodukci piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*). Testovanými preparáty byly: extrakt z lyofilizované kapří hypofýzy (CPE) v dávce 5 mg×kg^{-1} (účinná látka: GtH, pozitivní kontrola), Pregnyl v dávkách 1500 a 3000 IU×kg^{-1}, Chorulon v dávkách 1500 a 3000 IU×kg^{-1} (účinná látka: hCG), Ovaprim v dávce 1 a 2 ml×kg^{-1}, Ovopel v dávce 1 peleta×kg^{-1} a Dagin v dávce 1 ampule na 40 kg (účinná látka: GnRHa + dopaminní inhibitor). Preparáty byly aplikovány ve dvou dílčích dávkách (10 a 90 %) do hřbetní svaloviny. Generační ryby - 50 samic (individuální hmotnost = 31 – 59 g) a 77 samců pocházely z rybničního chovu FROV JU. Teplota vody byla během experimentu na 17,9 ± 0,13 °C.

Po použití všech preparátů, mimo Dagin (80 %), ovulovalo 100 % stimulovaných samic. Nejvyšší relativní pracovní plodnosti (počet jiker na g hmotnosti samice před výtěrem), bylo dosaženo stimulací Ovaprimem v dávce 1 ml×kg^{-1} (170 ± 19 ks×g^{-1}; průměr ± S.D.). Nízké relativní plodnosti dosáhly samice stimulované Pregnylem v dávce 1500 (85 ± 38 ks×g^{-1}) i 3000 (97 ± 24 ks×g^{-1}) IU×kg^{-1} a Chorulonem v dávce 1500 IU×kg^{-1} (86 ± 32 ks×g^{-1}). Nejkratšího intervalu latence (čas od aplikace druhé dávky preparátu do ovulace jiker samicí) bylo dosaženo po podání CPE (18 hod, medián), respektive Ovaprimu v dávce 2 ml×kg^{-1} a to 23 hod. U nižších dávek (1500 IU×kg^{-1}) přípravků bez obsahu dopaminergních inhibitorů (Chorulon a Pregnyl) přesáhl interval latence 31 hod. Nejlepší synchronizace ovulace (interval od výtěru první a poslední samice) bylo dosaženo u CPE (1 hod) a u obou koncentrací Chorulonu (2 hod). Vytřenost samic (částečná či úplná) byla významně ovlivněna použitým preparátem. Úplně vytřeny (>80 %) byly vytřeny samice po stimulaci CPE, Ovaprimem 1 ml×kg^{-1} a Ovopelem. Naopak částečně vytřeny (>80 %) byly samice po stimulaci Chorulonem 1500 IU×kg^{-1}, Pregnylu 1500 a 3000 IU×kg^{-1}. Jikra piskoře pruhovaného v průměru obsahovala 53 % uhlíku, 21 % kyslíku, 12 % dusíku, 8 % vodíku a 0,3 % síry. Chemická kompozice jiker byla rozdílná pouze v obsahu kyslíku mezi skupinami injikovanými CPE a Ovaprimem 2 ml×kg^{-1}.

Obecně dosahovaly samice stimulované preparáty bez dopaminergního inhibitoru horších hodnot ukazatelů reprodukce. Tím byla potvrzena nutnost dopaminergní inhibice při řízené reprodukci piskoře pruhovaného. Výsledky předkládané práce dokazují, že dostupné komerční přípravky používané k hormonální stimulaci jiných

druhů ryb lze úspěšně využít k produkci gamet piskoře pruhovaného. Ze standardizovaných komerčních přípravků jsou doporučeny při řízené reprodukci piskoře pruhovaného preparáty Ovopel či Ovaprim (v dávkách 1 i 2ml×kg^{-1}).

Klíčová slova: CPE, dopaminergní inhibice, GnRHa, hCG, umělý výtěr,

11. Abstract

The aim of this thesis was the comparison of different hormonal stimulants on selected aspects of artificial spawning of Weather loach (*Misgurnus fossilis*). The stimulants were: carp pituitary extract (CPE) in dose 5 mg×kg^{-1}(GtH, positive control), Pregnyl in doses 1500 and 3000 IU×kg^{-1} respectively, Chorulon in doses 1500 and 3000 IU×kg^{-1} respectively (hCG), Ovaprim in doses 1 ml×kg^{-1}and 2 ml×kg^{-1} respectively, Ovopel in dose 1 pellet×kg^{-1} and Dagin in dose 1 ampulla on 40 kg (GnRHa, dopaminergic inhibitor). Stimulants were injected intramusculatury in two doses (10 and 90 % of contrencation). Females (n=50) and males (n=77) were taken from experimental pond in Vodňany FROV JU (individual body weight 31 – 59 g). Temperature was kept at 17,9 ± 0,13 °C.

The lowest percentage of ovulating females (80 %) was achieved after stimulation by Dagin (dose: one ampula per 40 kg). With use of the other stimulants, all females were ovulating. The highest relative amount of stripped eggs in relation to pre-stripping weight of female was reached after application of Ovaprim in dose 1 ml×kg^{-1} (170 ± 19 ks×g^{-1}; mean ± S.D.). The smallest amount of stripped eggs was obtained after application of Pregnyl in dose 1500 IU×kg^{-1} (85 ± 38 ks×g^{-1}), Pregnyl in dose 3000 IU×kg^{-1} (97 ± 24 ks×g^{-1}) Chorulon 1500 IU×kg^{-1} (86 ± 32 ks×g^{-1}) respectively. The shortest latency interval was observed after stimulation by CPE (18 hours) and by Ovaprim in dose 2 ml×kg^{-1} (23 hours) respectively. Interval of latency was longer than 31 hours in females stimulated with lower doses (1500 IU×kg^{-1}) of a stimulant without dopaminergic inhibitor. The best synchronization of ovulation was observed after stimulation by CPE (1 hour) and Chorulon in dose 3000 IU×kg^{-1} and 1500 IU×kg^{-1} (2 hours) respectively. Females were fully stripped (in >80 % cases) after stimulation by CPE, Ovaprim in dose 1 ml×kg-1 and Ovopel. Females were partialy stripped (in > 80 % cases) after stimulation by Chorulon 1500 IU×kg^{-1}, Pregnyl 1500 and 3000 IU×kg^{-1} respectively. The egg of weather loach contained 53 % of carbon, 21 % of oxygen, 12 % of nitrogen, 8 % of hydrogen and 0.3 % of sulfur. Chemical composition was significantly different only in oxygen concentration between females stimulated by CPE and 2 ml×kg^{-1} Ovaprim.

In general, worse results of artifficial spawning aspects were observed after stimulation by stimulants without dopaminergic inhibitor. It confirms neceserity of dopaminergic inhibitor in controlled spawning of weatherloach. The results of this

thesis show which accessible commercial hormonal stimulants used in stimulation of other fish species are useable for controlled reproduction of weather loach. Ovopel and Ovaprim (in dose 1 $ml \times kg^{-1}$ and 2 $ml \times kg^{-1}$) can be recommended for stimuation of ovulation or spermiation of weather loach.

Keywords: artifficial spawning, CPE, dopaminergic inhibition, GnRHa, hCG