



Technologie hromadné indukce triploidie u lína obecného (*Tinca tinca*) v provozních podmínkách rybích líhní

M. Flajšhans, M. Rodina, V. Kašpar, R. Luhan



evropský
sociální
fond v ČR



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Technologie hromadné indukce triploidie u lína obecného (*Tinca tinca*) v provozních podmínkách rybích líhní

M. Flajšhans, M. Rodina, V. Kašpar, R. Luhan

**VYDÁNÍ PUBLIKACE BYLO USKUTEČNĚNO
ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU:**

Inovace prezenčního studia bakalářského studijního oboru Rybářství

(CZ.1.07/2.2.00/15.0076)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**OBSAHOVÁ ČÁST PUBLIKACE BYLA ZPRACOVÁNA
ZA FINANČNÍ PODPORY NÁSLEDUJÍCÍCH PROJEKTŮ:**

Ověření technologie hromadné indukce triploidie u lína obecného v provozních podmínkách rybích líhní

(OP Rybářství č. 530)

Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz – CENAKVA

(CZ.1.05/2.1.00/01.0024)

Reprodukce a genetika vybraných modelových druhů kostnatých a chrupavčitých ryb

(GA JU 046/2010/Z)

a za technické podpory

Rybářství Hluboká cz. s.r.o.



ISBN 978-80-87437-12-4

OBSAH

1. ÚVOD	6
1.1. Užitkové vlastnosti triploidních ryb v akvakultuře	7
1.2. Užitkové vlastnosti triploidních línů v rybníční akvakultuře	8
2. CÍL	10
3. MÍSTO OVĚŘOVÁNÍ TECHNOLOGIE	10
4. POPIS TECHNOLOGIE A VÝSLEDKY	10
4.1. Hormonální stimulace generačních línů	10
4.2. Příprava imobilizačního roztoku pro spermie lína	11
4.3. Anestézie, umělý výtěr a odběr pohlavních produktů	11
4.4. Kompletace technologické sestavy pro indukci triploidie chladovým šokem	11
4.5. Osemenění, oplození, aktivace gamet a odlepkování jiker	12
4.6. Chladový šok k indukci triploidie	13
4.7. Opatření během inkubace jiker	14
4.8. Ověření triploidie rozplavaného plůdku	15
5. EKONOMICKÝ PŘÍNOS TECHNOLOGIE PRO PODNIKATELSKÝ SUBJEKT	16
6. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGIE V PRODUKCI PODNIKATELSKÉHO SUBJEKTU	17
7. SEZNAM LITERATURY	17

1. ÚVOD

Lín obecný (*Tinca tinca* L.) je původní eurosibiřský druh kaprovité ryby, v Evropě je oblíben jako konzumní ryba z chovu i při sportovním rybářství a jeho barevné mutace jsou chovány jako okrasné ryby. Lín je od středověku chován v rybnících jako doplňkový druh (Steffens, 1995), nicméně jeho domestikace v hlubším slova smyslu je proces zcela recentní (Billard a Flajšhans, 1995; Hulata, 1995), který ukazuje na strategii studia dalších kandidátních druhů ryb pro diverzifikaci produkce akvakultury. Zájem o jeho produkci v Evropě stoupá (Španělsko, Itálie, Řecko, Německo, Rakousko), mimo Evropu se produkce lína prudce rozvíjí zejména v Číně od r. 1998 (Wang a kol., 2004, 2006) na základě dovozu a spolupráce s VÚRH JU ve Vodňanech. V ČR se roční produkce lína v posledních letech pohybuje mezi 150–200 t (Gela a kol., 2006), což představuje proti r. 1985 (Steffens, 1995) pokles zhruba na polovinu. Navíc chov tržního lína v ČR probíhá jen v rybnících v polykulturních obsádkách poměrně extenzivně a růst tohoto druhu ve stredoevropských podmínkách je pomalý (tržní hmotnosti okolo 250 g je dosahováno ve čtyřech letech). V současné době zájem produkčních rybářských podniků sdružených v Rybářském sdružení ČR o chov lína opět stoupá v reakci na situaci v Evropě. Zlepšování biotechnologických chovatelských postupů je nezbytnou součástí inovativního přístupu a důležitým nástrojem k udržení konkurenceschopnosti českého produkčního rybářství ve srovnání s klimaticky zvýhodněnými zeměmi, jako je Španělsko, Řecko, Itálie a Francie. Výzkum triploidie u lína má v ČR světovou prioritu a sedmnáctiletou tradici: Flajšhans a kol. (1993a, b; 2004), Buchtová a kol. (2003a,b; 2004 a 2005) a Linhart a kol. (2006b) zjistili rozdíly v řadě užitkových vlastností (plodnost, somatický růst, tržní hmotnost, jatečná výtěžnost, kvalita masa aj.) mezi diploidní a triploidní populací lína, i rozdíly v růstu u samic a samců, ve prospěch triploidní populace.

V souvislosti se zájmem rybářských výrobních podniků o produkci lína tedy výzkum indukce triploidie a jejího využití ve sladkovodní akvakultuře lína, včetně charakteristiky užitkovosti triploidních populací a jejich vybraných biologických a fyziologických odlišností, znamená pro praxi tyto přínosy:

- Metodické zpracování postupu výběru generačních ryb, jejich umělého výtěru, rychlého odlepkování jiker a hromadné indukce triploidie pro provozní účely.
- Vyšší užitkovost triploidní populace (resp. celosamičí triploidní populace) lína, pokud jsou líni chováni do vyšší tržní hmotnosti, kdy je diploidní lín již pohlavně zralý a zaostává v růstu.
- Lepší kvalitu masa triploidní populace (resp. celosamičí triploidní populace) lína.

1.1. UŽITKOVÉ VLASTNOSTI TRIPLOIDNÍCH RYB V AKVAKULTUŘE

Užitkové vlastnosti triploidů (zejména růst, přežití a jatečná výtěžnost) indukovaných v laboratorním, poloprovozním a provozním měřítku byly studovány téměř u všech hospodářsky významných druhů sladkovodních ryb, od lososovitých, kaprovitých, sumců a sumečků až po ostnoploutvé (viz hlavní přehledové práce Thorgaarda, 1983; Chourrou-ta, 1987; Donaldsona a Benfeyho, 1987; Ihssena a kol., 1990; Horvátha a Orbána, 1995; Pandiana a Koteleswarana, 1998; Benfeyho, 1999; Gomelského, 2003, Piferrera a kol., 2009 aj.). Výsledky jsou však velmi různorodé a ukazují na nižší, stejnou nebo vyšší růstovou schopnost triploidů vůči diploidům stejného původu. Růstová schopnost triploidů je druhově specifická (Beaumont a Hoare, 2003) a v rámci druhu se může lišit i případ od případu (např. výsledky chovu v monokultuře vs. testování ve společné obsádce). Pandian a Koteleswaran (1998) kriticky porovnali růst triploidů řady zástupců ryb lososovitých, kaprovitých, sumcovitých a cichlid ve vztahu k období před a po dosažení pohlavní dospělosti. Podle jejich výsledků tito triploidi do období pohlavní dospělosti trpí 10 až 15% růstovou depresí a vysokou juvenilní mortalitou a v období po dosažení pohlavní dospělosti triploidi téměř všech hodnocených druhů rostou o 10 až 30% rychleji než jejich diploidní protějšky.

Vysvětlení lepšího růstu triploidů se odvozuje od jejich sterility: diploidi v době pohlavního dospívání spotřebují část energie z přijaté potravy na vývoj gamet, zatímco triploidi většinu této energie stále spotřebovávají na tělesný růst (Beaumont a Hoare, 2003). Ale Benfey (1999) podotýká, že steroidy gonád mají anabolický efekt, díky čemuž diploidi, kteří dospějí a přežijí reprodukci, mohou poté často vykázat kompenzační růst, což může růstovou výhodu triploidů snížit. Podle Piferrera a kol. (2009) dalšími faktory ovlivňujícími růst mohou být mezi- a vnitrodruhová kompetice během růstového testu, vliv typu šoku použitého k indukci triploidie a suboptimální podmínky prostředí (teplota vody, nasycení kyslíkem, hustota obsádky apod.).

Podle Piferrera a kol. (2009) hlavní důvody užitkového chovu triploidů v současné době jsou:

- Zvýšený růst za předpokladu, že jejich sterilita zabrání růstové depresi spojené s pohlavním dozráním diploidů.
- Snížení sexuálního a teritoriálního chování ryb v akvakultuře, vedoucí k nižšímu stresu a menšímu plýtvání energií.
- Zvýšené přežití, pokud je reprodukce spojena s vyšší mortalitou diploidů.
- Lepší organoleptická kvalita masa (vybarvení svaloviny, % tuku, % vody v mase aj.), pokud je produkt prodáván během nebo po dosažení pohlavní zralosti diploidů.
- Sterilita při vysazování nepůvodních druhů nebo nepůvodních populací do volných vod.
- Sterilita při úniku jedinců šlechtěných populací zabrání introgresi genů šlechtěné populace do původní populace.

1.2. UŽITKOVÉ VLASTNOSTI TRIPLOIDNÍCH LÍNŮ V RYBNÍČNÍ AKVAKULTUŘE



Obr. 1. Růstový potenciál triploidů je názorně demonstrován porovnáním diploidní jikernačky lína obecného v tržní hmotnosti (287 g, nahoře) a stejně staré triploidní jikernačky (677 g, dole) ze společného odchovu. Měřítko 100 mm; podle Flajšhans a kol. (2004).

Testy užitkových vlastností (zejména % přežití, hmotnostního růstu a jatečné výtěžnosti) triploidních línů v podmínkách rybníční akvakultury ČR byly realizovány především v monokulturních obsádkách společně s diploidními sourozenci (Flajšhans a kol., 1993b; Buchtová a kol., 2003a, b), v monokultuře společně s diploidními a gynogenetickými sourozenci (Flajšhans a kol., 2004; Obr. 1), v monokultuře společně s diploidními a gynogenetickými sourozenci, dalšími diploidními populacemi a zlatou kontrolní populací (Gela a kol., 2010) nebo v polykultuře s kaprem obecným (*Cyprinus carpio*) a karasem zlatým (*Carassius auratus*) (Sedláček, 1999).

Výsledky odchovů v monokultuře ukazují, že % přežití triploidního plůdku lína obecného v 1. roce života (L_0-L_1) se v závislosti na konkrétních podmínkách odchovu pohybuje na úrovni 90–150% kontroly (diploidních sourozenců), přežití po 1. komorování triploidního plůdku (L_{1+}) dosahuje 68–100% kontroly, zatímco v dalších letech odchovu (L_2-L_4) je % přežití triploidního lína shodné s kontrolou nebo vyšší.

Průměrná hmotnost triploidního plůdku lína v 1. roce života na podzim v závislosti na konkrétních podmínkách odchovu bývá podle výše uvedených autorů shodná nebo nevýznamně nižší než u kontroly. Gela a kol. (2010), kteří využili výpočtu korigo-

vané hmotnosti, zjistili, že po sesazení do společné obsádky může korigovaná hmotnost triploidního lína dosahovat po 1. komorování hodnot významně (o 54 %) nižších proti diploidní populaci, ale pouze o 2 % nižších proti kontrolní zlaté populaci lína. Koncem 2. odchovné sezóny (L_2) a po 2. komorování dosahuje průměrná i korigovaná hmotnost triploidního lína v závislosti na konkrétních podmínkách odchovu hodnot vyšších nebo shodných s diploidními nebo kontrolními populacemi. Ve 3. a 4. odchovné sezóně se již projevuje akcelerovaný somatický růst triploidů i vliv pohlaví: triploidní lín L_3 je, opět v závislosti na konkrétních podmínkách odchovu, schopen v monokultuře dorůst o 91–126 % a triploidní lín L_4 až o 150–206 % vyšší průměrné hmotnosti než stejně stará diploidní populace, přičemž vyšších hodnot zpravidla dosahují triploidní jikernačky. Gela a kol. (2010) rovněž potvrdil hodnoty korigované hmotnosti pro triploidního lína L_3 o 25 % vyšší proti diploidní populaci a o 40 % vyšší proti kontrolní zlaté populaci lína.

Podmínkou manifestace akcelerovaného somatického růstu triploidních línů je vhodný způsob odchovu v monokultuře nebo ve vhodně zvolené polykultuře, např. s býložravými rybami. Podle Sedláčka (1999) se při nevhodné polykultuře silná potravní konkurence kapra projevila na růstové depresi triploidních mlíčáků 2,6krát silněji než u diploidních mlíčáků a na růstové depresi triploidních jikernaček až 2,9krát silněji než u diploidních jikernaček.

Výtěžnost triploidních línů (procentický podíl hmotnosti opracovaného trupu bez žaber a vnitřních orgánů na hmotnosti ryby po zabití) studoval např. Flajšhans a kol. (1993b), Buchtová a kol. (2003a, b) a Gela a kol. (2010). Bylo zjištěno, že výtěžnost triploidních jikernaček v kategoriích L_3 až L_4 může být stejná jako u diploidních jikernaček nebo o 2,4–3,9 % vyšší, zatímco u triploidních mlíčáků se ukazatel výtěžnosti pohybuje o 0,7–1,3 % níže než u stejně starých společně odchovaných diploidních mlíčáků.

Vývoj gonád a reprodukční sterilitu vs. reprodukční schopnosti triploidních línů sledovali např. Flajšhans (1997), Buchtová a kol. (2004), Linhart a kol. (2006) a Pšenička a kol. (2010). Triploidní jikernačky lína v tržní hmotnosti (> 250 g) mají retardované vaječníky, viditelné jako dva tenké provazce obalené tukovými depozity. Histologicky u nich převažuje výskyt oogonií, z vyšších stadií pak výskyt oocytů v protoplazmatickém růstu a jen vzácně byly zaznamenány oocytů ve vakuolizaci. Přítomnost zralých oocytů nebyla zaznamenána.

U triploidních mlíčáků stejné kategorie se varlata jeví rovněž jako dva tenké provazce tkáně obalené tukovými depozity, případně makroskopický obraz odpovídá obrazu o rok mladších diploidních mlíčáků. Histologicky převažuje výskyt zárodečné tkáně, ale byla nalezena všechna vývojová stadia spermatogeneze. Průdukt spermatu je nižší než u diploidních mlíčáků, s nižším % pohyblivých spermií, ale s podobnou počáteční rychlostí pohybu spermií v prvních vteřinách jejich aktivace. Spermie triploidů jsou do velké míry aneuploidní s variabilním obsahem DNA od haploidního (1,0 n) až po diploidní (1,9 n). Experimentální hybridizace triploidních mlíčáků s diploidními jikernačkami

ukázala, že spermie triploidních línů jsou schopny oplodnit jikry diploidních jikernaček s relativně vysokou mírou oplozenosti a líhivosti do 70 % (Linhart a kol., 2006), za vzniku triploidního potomstva s genotypy složenými z mikrosatelitních alel matky i otce (Hulák a kol., 2010). U lína tedy nelze hovořit o 100% sterilitě triploidních mlíčáků.

2. CÍL

Cílem technologie bylo ověřit možnost hromadné indukce triploidie u lína obecného v provozních podmínkách rybí líhně s optimalizací výnosu triploidního váčkového plůdku pro potřeby nasazení plůdkových výtažníků. Optimalizace spočívala v dosažení maximálního procenta indukovaných triploidů v potomstvu ve stadiu váčkového plůdku při maximalizaci procenta oplozenosti jiker a líhivosti plůdku vůči kontrole.

Širším cílem je poskytnout subjektům zabývajícím se chovem tržního lína v rybníční akvakultuře propracovaný technologický postup efektivní umělé indukce triploidie k produkci rychleji rostoucích tržních línů obecných (*Tinca tinca* L.).

Účelem aplikace technologie v praxi má být produkce triploidních línů do vyšší tržní hmotnosti, s vyšší užitkovostí růstových vlastností a s vyšší kvalitou masa za stejných chovatelských podmínek (délka odchovu, krmný režim apod.) jako při běžné rybníční produkci tržního lína.

3. MÍSTO OVĚŘOVÁNÍ TECHNOLOGIE

Proces ověření technologie probíhal v rámci realizace pilotního projektu č. 530 „Ověření technologie hromadné indukce triploidie u lína obecného v provozních podmínkách rybích líhni“, Operační program Rybářství ve výrobních podmínkách firmy Rybářství Hluboká cz. s.r.o. na líhni Mydlovary v roce 2010.

4. POPIS TECHNOLOGIE A VÝSLEDKY

4.1. HORMONÁLNÍ STIMULACE GENERAČNÍCH LÍNŮ

Předem vybrané jikernačky lína byly stimulovány k výtěru jednorázovou vnitrosvalovou injekcí roztoku preparátu Ovopel (Unic-Trade, Maďarsko) ve fyziologickém roztoku v dávce 1 peleta.kg⁻¹ živé hmotnosti ryby (Das, 2004), kdy k ovulaci došlo při teplotě vody 20,5–20,9 °C za 29 hodin. Injikace byla provedena obdobně jako u kapra, tj. ze strany pod hřbetní ploutev.

Stimulace mlíčáků lína ke spermiači byla provedena jednorázovou vnitrosvalovou

injekcí kapří hypofýzy, rozetřené a rozpuštěné ve fyziologickém roztoku, v dávce $1,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ živé hmotnosti ryby. Spermia bylo odebráno po 24 hodinách působení hormonu při teplotě vody $20,5\text{--}20,9 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2. PŘÍPRAVA IMOBILIZAČNÍHO ROZTOKU PRO SPERMIE LÍNA

Byl připraven imobilizační roztok pro spermie lína "Kurokura 180" obsahující na 1 l destilované vody 10,52 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0,2 g NaHCO_3 (Rodina a kol., 2004). Roztok neobsahoval organické složky degradovatelné bakteriemi. Roztok byl uchováván ve zchlazeném stavu v chladničce, dvě hodiny před odběrem spermatu vyňat z chladničky a ponechán při pokojové teplotě (cca $20 \text{ }^\circ\text{C}$).

4.3. ANESTÉZIE, UMĚLÝ VÝTĚR A ODBĚR POHLAVNÍCH PRODUKTŮ

Před umělým výtěrem byly generační ryby anestetizovány hřebíčkovým olejem (fa. Jan Kulich, Hradec Králové/Říčany) v dávce $40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, podle metodiky Kolářové a kol. (2007).

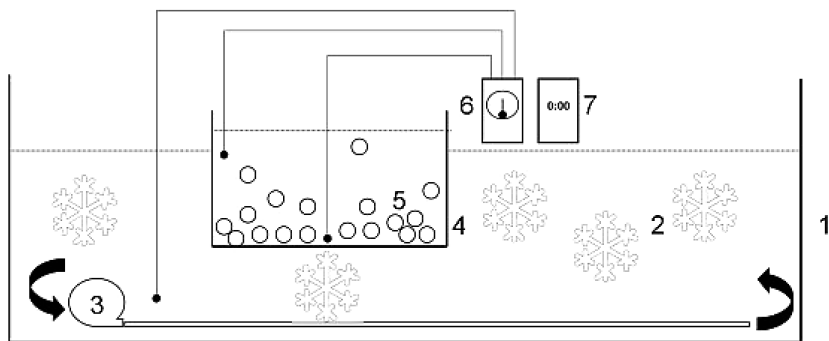
Generační ryby byly vytřeny klasickou suchou metodou. Při výtěru mlíčáků byly ryby nejdříve zbaveny moči masáží břišní partie od břišních ploutví směrem k ocasu. Během masáže břišní partie mlíčáka od prsních ploutví směrem k ocasu byly kapky ejakulovaného spermatu odsávány do jednorázových plastových 10ml injekčních stříkaček s přebytkem imobilizačního roztoku maximálně do poměru spermatu : imobilizačnímu roztoku 1 : 2. Injekční stříkačky se spermatem v imobilizačním roztoku byly uchovány do doby použití v přenosném polystyrenovém tepelně izolovaném kontejneru s drce-ným ledem při teplotě $0 \text{ až } +4 \text{ }^\circ\text{C}$. Celkem bylo pro účely této technologie získáno 40 ml spermatu v imobilizačním roztoku.

Při výtěru jikernaček byly jikry odebrány do předem zvážených suchých misek a jikry zváženy. Přepočtem (1 600 kusů jiker v 1 g jiker) byla zjištěna pracovní plodnost jikernaček k vyhodnocení účinnosti chladového šoku. Misky s jikrami byly přikryty čistou vlhkou utěrkou a krátkodobě (do půl hodiny) uchovány ve stínu na chladné podlaze líhně. Celkem bylo pro účely této technologie vytřeno 1 005 g jiker.

4.4. KOMPLETACE TECHNOLOGICKÉ SESTAVY PRO INDUKCI TRIPLOIDIE CHLADOVÝM ŠOKEM

Technologická sestava pro hromadnou indukci triploidie chladovým šokem byla zkompletována podle schématu na Obr. 2 před zahájením umělého výtěru. Byl dove-

zen šupinový led ze zpracovny ryb. Do laminátového žlabu v líhni (Obr. 2, položka 1) bylo napuštěno 600 l vody z líhně. Nad žlab byl umístěn 3kanalový registrační digitální teploměr (Obr. 2, položka 6), jehož jedno čidlo bylo vloženo do vodního sloupce ve žlabu. Přidáním dostatečného množství šupinového ledu do vody ve žlabu byla vytvořena ledová lázeň (Obr. 2, položka 2) o teplotě 0,5 °C. Do žlabu bylo ponořeno akvaristické čerpadlo (Obr. 2, položka 3) o výkonu 700 l.h⁻¹ s hadicovým rozvodem vody, čímž byla zabezpečena cirkulace ledové vody ve žlabu. Do ledové lázně byla umístěna plastová nádoba (Obr. 2, položka 4) o objemu 40 l pouze s vychlazenou vodou bez kusového ledu. Do nádoby byla umístěna další dvě čidla registračního teploměru, a to ke dnu (tj. do místa, kam byly později převedeny oplozené jikry) a pod hladinu. Stopky (Obr. 2, položka 7) k měření času od aktivace gamet do začátku šoku a k měření expoziční doby byly umístěny vedle registračního teploměru.



Obr. 2. Schéma chladového šoku k hromadné indukci triploidie u lína obecného.

1 – laminátový žlab

2 – ledová lázeň (voda z líhně se šupinovým ledem)

3 – čerpadlo s rozvodem vody

4 – plastová nádoba

5 – oplozené jikry lína ve vychlazené vodě (bez přítomnosti kusového ledu)

6 – kanálový registrační digitální teploměr s čidly a) u dna nádoby 4, b) u hladiny nádoby 4, c) v ledové lázni 2

7 – stopky (timer)

4.5. OSEMENĚNÍ, OPLOZENÍ, AKTIVACE GAMET A ODLEPKOVÁNÍ JIKER

Voda z líhně použitá k aktivaci gamet byla ohřáta na 20 °C, a to předem ve 40l plastové nádobě vytemperováním závěsným termostatem (2 kW; Julabo).

Před oplozením byly dávky spermatu v imobilizačním roztoku od jednotlivých mlí-

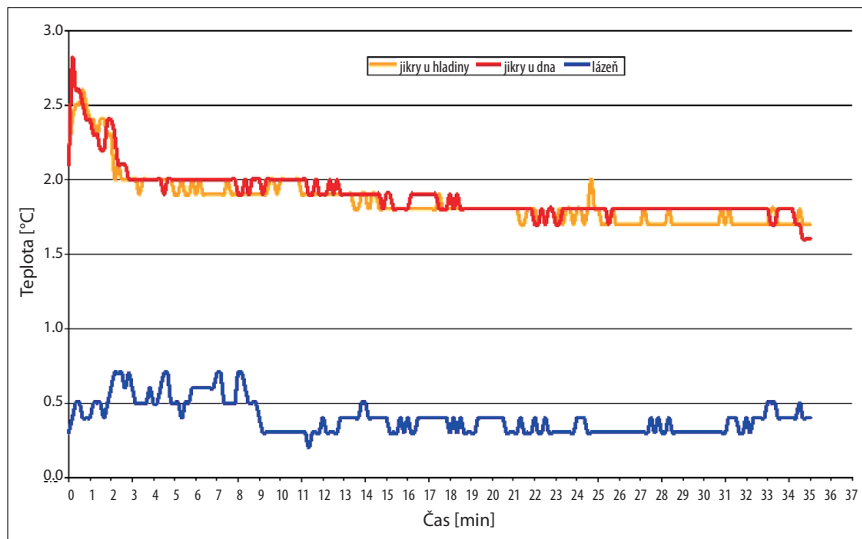
čádků smíseny v suché čisté odměrné nádobě a dále bylo pracováno s tzv. heterospermaterem. Heterosperma na jikry bylo dávkováno velkoobjemovou mikropipetou.

Směs jiker od různých jikernaček byla oplozena heterospermicky v dávce 2 ml heterospermatu v imobilizačním roztoku na každých 100 g jiker. Aktivace byla provedena okamžitě po osemenění pomocí desetinásobného množství vody, než bylo množství heterospermatu v imobilizačním roztoku. K aktivaci bylo použito vody z líhně temperované na 20 °C. Od okamžiku aktivace gamet byl měřen čas na stopkách (Obr. 2, položka 7).

Čas aktivace gamet byl zaznamenán jako čas 0 min. Misky s aktivovanými jikrami byly uchovány ve 20 °C. Po +2 min od aktivace gamet bylo provedeno odlepkování jiker alkalázou (Alcalase, Merck EC 3.4.21.14.) podle metodiky Linhart a kol. (2000). Pracovní roztok byl vytvořen naředěním 1,5 ml enzymu v 998,5 ml vody z líhně temperované na 20 °C a přidán v dávce 100 ml pracovního roztoku enzymu na každých 100 g jiker do misky s jikrami, z nichž byla předem slita voda. Odlepkování bylo provedeno opatrným mícháním jiker s roztokem enzymu po dobu 2 min. Před ukončením odlepkování byl enzym slit a přesně dvě min od začátku odlepkování (tedy +4 min od aktivace) byly jikry 3krát po sobě propláchnuty čistou vodou z líhně o teplotě 20 °C. V +4 min 30 s po aktivaci gamet byla z jiker slita přebytečná voda.

4.6. CHLADOVÝ ŠOK K INDUKCI TRIPLOIDIE

V +5 min po aktivaci gamet byly jikry převedeny (Obr. 2, položka 6) do plastové nádoby (Obr. 2, položka 4) s ledovou vodou na expoziční dobu 35 min, s ukončením v čase +40 min od aktivace gamet. Teplota vody v nádobě byla udržována ručním přiléváním ledové vody a jikry byly udržovány v mírné cirkulaci mícháním vody v nádobě. Průběh a rozložení teplot ledové lázně, jiker a vody v nádobě s jikrami je znázorněn na Obr. 3.



Obr. 3. Rozložení a dynamika teplot v průběhu 35 min chladového šoku.

modrá – teplota ledové lázně

oranžová – teplota u dna nádoby s jikrami

červená – teplota u hladiny nádoby s jikrami

Po ukončení chladového šoku v čase +40 min od aktivace gamet byla plastová nádoba vyňata z ledové lázně a byla slita přebytečná voda. Jikry byly 3x propláchnuty vodou z líhně o teplotě 20 °C a vysazeny k inkubaci do Zugských lahví, zásobovaných vodou z líhně o teplotě $19,4 \pm 0,5$ °C. S kontrolní skupinou diploidů bylo manipulováno stejně, bez aplikace chladového šoku.

Do 24 h po aktivaci gamet byla stanovena oplozenost jiker v % podle Linharta a kol. (2004; 2006a,b) a Caille a kol. (2006) podle vzorce:

$$F_r = [(E_t - E_d)/E_t] \times 100$$

kde F_r bylo % oplozenosti,

E_t byl počet jiker získaný výpočtem z hmotnosti jiker (1 600 ks jiker v 1 g navážky jiker),

E_d byl počet mrtvých jiker během prvních 24 h.

4.7. OPATŘENÍ BĚHEM INKUBACE JIKER

Triploidizace chladovým šokem mírně zvýšila mortalitu jiker proti kontrole. Průměrná oplozenost jiker po chladovém šoku byla 65 %, oplozenost kontroly byla 75 %, tj. průměrná oplozenost triploidů dosahovala 86,67 % kontroly, přičemž za kontrolu (tj.

100% živých jiker) byly považovány klasicky odinkubované jikry z týchž generačních ryb a téhož výtěru. Byla proto věnována zvýšená pozornost odebrání mrtvých jiker z inkubačních aparátů a protiplísňovým koupelím jiker do stadia očních bodů.

Z počtu kusů plůdku po vykulení zjištěného objemovou metodou byla stanovena líhivost plůdku v % podle Linharta a kol. (2004; 2006a,b) a Caille a kol. (2006) podle vzorce:

$$H_r = (H_i/E_i) \times 100$$

kde H_r byla líhivost plůdku v %,

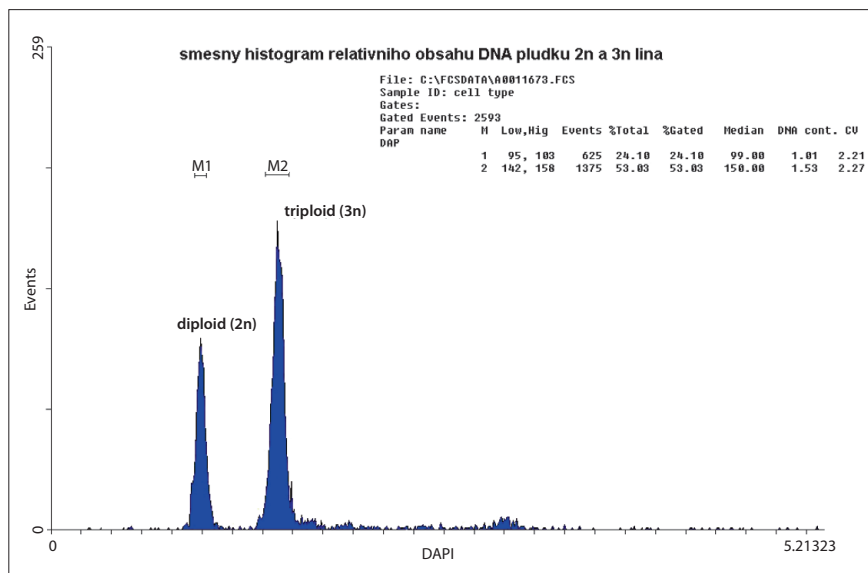
H_i byl počet vykuleného plůdku,

E_i byl počet jiker získaný výpočtem z hmotnosti jiker.

Průměrná líhivost triploidního plůdku byla zjištěna na úrovni 58,05 %, průměrná líhivost kontroly byla 67,5 %, tj. průměrná líhivost triploidů dosahovala 86 % kontroly, což lze v provozních podmínkách považovat za velmi dobrý výsledek. Z celkem 705 g jiker bylo získáno 658 584 ks triploidního plůdku k nasazení do plůdkových výtažníků.

4.8. OVĚŘENÍ TRIPLOIDIE ROZPLAVANÉHO PLŮDKU

Ověření triploidní konstituce rozplavaného plůdku bylo provedeno v Laboratoři molekulární, buněčné a kvantitativní genetiky FROV JU stanovením relativního obsahu DNA průtokovou cytometrií, tj. metodou založenou na permeabilizaci buněčné membrány, obarvení jaderné DNA barvivem DNA-specifickým (v tomto případě 4',6-diamidino-2-phenylindolem, DAPI) a na měření fluorescence emitované komplexem obarvené DNA. Výsledky byly zobrazeny formou histogramu intenzity fluorescence v jádrech analyzované suspenze. U triploidního lína obecného, který má tři sady chromozómů a tedy 1,5x více DNA než diploid, se zobrazil vrchol histogramu zhruba 1,5x dále na ose x než u diploida (Obr. 4). Průtoková cytometrie je rychlou a přesnou metodou stanovení ploidie ryb a tato metoda je od 80. let 20. stol. celosvětově používána k hodnocení úspěšnosti chromozómových manipulací u ryb. Umožňuje stanovení ploidie embryí a larev, a starších jedinců z buněk krve a tkání. Ověřením triploidie bylo zjištěno, že chladový šok indukoval 100% triploidního lína ve stadiu rozplavání plůdku.



Obr. 4. Výsledky analýzy relativního obsahu DNA průtokovou cytometrií v jádrech somatických buněk diploidního (2n) a indukovaně triploidního (3n) plůdku lina obecného. Obsah DNA (tabulka vpravo nahoře, sloupec DNA cont.) potvrzuje 1,53násobný obsah DNA v jádrech buněk 3n lina.

5. EKONOMICKÝ PŘÍNOS TECHNOLOGIE PRO PODNIKATELSKÝ SUBJEKT

Technologie je určena především pro líhně rybářských podniků a chovatelů, zabývajících se produkcí tržního lina obecného do vyšší tržní hmotnosti nad 250 g. Účelem aplikace technologie v praxi má být zvýšení a stabilizace produkce triploidního plůdku lina obecného k odchovu do vyšší tržní hmotnosti při vysoké kvalitě tržního produktu. Vlastního přínosu tedy není dosahováno bezprostředně po indukci triploidie, ale při dalším odchovu do vyšší tržní hmotnosti, kdy je diploidní lín již pohlavně zralý a zůstává v růstu pro tvorbu gamet, zatímco sterilní či substerilní triploidní lín v tomto období roste rychleji. Při takovémto odchovu ve stejné obsádkce s diploidy dosahuje tržní hmotnosti o 25 % až 206 % vyšší. Při průměrné velkoobchodní ceně tržního lina 86,50 Kč.kg⁻¹ může tento nárůst představovat zvýšení tržeb o 21,62 Kč až o 91,69 Kč na 1 kilogram tržní hmotnosti.

6. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGIE V PRODUKCI PODNIKATELSKÉHO SUBJEKTU

Technologie byla již v roce 2010 uplatněna v rybářském výrobním podniku Rybářství Hluboká cz. s.r.o., technologie hromadné indukce triploidie chladovým šokem u lína obecného byla zavedena na líhni Mydlovary a triploidní plůdek lína obecného byl vysazen do plůdkových výtažníků v objektu Ostrov – Čejkovice.

7. SEZNAM LITERATURY

- Beaumont, A.R., Hoare, K., 2003. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Blackwell Publishing, 158 pp.
- Benfey, T.J., 1999. The physiology and behaviour of triploid fishes. *Reviews in Fisheries Science* 7: 39–67.
- Billard, R., Flajšhans, M., 1995. The current state of research and culture of the tench, *Tinca tinca* Linnaeus (1758). Concluding remarks on the workshop. In: The International Workshop on the Biology and Culture of the Tench, *Tinca tinca*, Ohrada Hunting Lodge, Czech Republic, August 28 – September 1, 1994. *Polish Archives of Hydrobiology* 42 (1–2): 221–227.
- Buchtová, H., Svobodová, Z., Flajšhans, M., Vorlová, L., 2003a. Analysis of growth, weight and relevant indices of diploid and triploid population of tench *Tinca tinca* (Linnaeus 1758). *Aquaculture Research* 34 (9): 719–726.
- Buchtová, H., Svobodová, Z., Flajšhans, M., Vorlová, L., 2003b. Analysis of slaughtering value of diploid and triploid population of tench (*Tinca tinca*, Linnaeus 1758). *Czech Journal of Animal Science* 48 (7): 285–294.
- Buchtová, H., Flajšhans, M., Svobodová, Z., Tremlová, B., 2004. Genomové manipulace u ryb. Vliv indukované polyploidie na gonadogenezi u lína obecného (*Tinca tinca*, Linnaeus 1758). *Veterinářství* 54 (2): 107–112.
- Buchtová, H., Vorlová, L., Svobodová, Z., Flajšhans, M., 2005. Chemical composition of flesh of diploid and triploid population of tench (*Tinca tinca*, Linnaeus 1758). *Czech Journal of Animal Science* 50 (5): 213–219.
- Caille, N., Rodina, M., Kocour, M., Gela, D., Flajšhans, M., Linhart, O., 2006. Quantity, motility and fertility of tench, *Tinca tinca* (L.) sperm after LHRH analogue and carp pituitary stimulation. *Aquaculture International* 14 (1–2): 75–87.
- Das, S.K., 2004. Evaluation of a new spawning agent, Ovopel in induced breeding of Indian carps. *Asian Fisheries Science* 17: 313–322.
- Donaldson, E.M., Benfey, T.J., 1987. Current status of induced sex manipulation. In: Idler, D.R., Crim, L.W., Walsh, J.M. (Eds), *Proc. Third Int. Symp. on the Reproductive Physiology of Fish*, Memorial Univ. of Nfld., St. John, pp. 108–119.

- Flajšhans, M., 1997. Reproduction sterility caused by spontaneous triploidy in tench (*Tinca tinca*). Polish Archives of Hydrobiology 44 (1–2): 39–45.
- Flajšhans, M., Linhart, O., 2000. Produkce triploidních línů. Edice Metodik, VÚRH JU Vodňany, č. 62, 14 s.
- Flajšhans, M., Kvasnička, P., Ráb, P., 1993a. Genetic studies in tench (*Tinca tinca* L.) High incidence of spontaneous triploidy. Aquaculture 110: 243–248.
- Flajšhans, M., Linhart, O., Kvasnička, P., 1993b. Genetic studies of tench (*Tinca tinca* L.): induced triploidy and tetraploidy and first performance data. Aquaculture 113: 301–312.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Gela, D., Piačková, V., 2004. The first results on relationships among amphimictic diploid, diploid gynogenic and triploid tench, *Tinca tinca* L. under communal testing. Aquaculture International 12 (1): 103–118.
- Gela, D., Flajšhans, M., Kocour, M., Rodina, M., Linhart, O., 2006. Tench (*Tinca tinca*) broodstock management in breeding station under conditions of pond culture: a review. Aquaculture International 14 (1–2): 195–203.
- Gela, D., Kocour, M., Flajšhans, M., Linhart, O., Rodina, M., 2010. Comparison of performance of genome manipulated and standard tench, *Tinca tinca* (L.), groups under pond management conditions. Reviews in Fish Biology and Fisheries 20: 301–306
- Gomelsky, B., 2003. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review. Aquatic Living Resources 16: 408–415.
- Horváth, L., Orbán, L., 1995. Genome and gene manipulation in the common carp. Aquaculture 129: 157–181.
- Hulák, M., Kašpar, V., Pšenička, M., Gela, D. Li, P and Linhart, O., 2010. Does triploidization produce functional sterility of triploid males of tench (*Tinca tinca* L.)? Reviews in Fish Biology and Fisheries 20: 307–315.
- Hulata, G., 1995. A review of genetic improvement of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) and other cyprinids by crossbreeding, hybridization and selection. Aquaculture 129: 143–155.
- Chourrout, D., 1987. Genetic manipulations in fish: review of methods. In: Tiews, K. (Ed.), Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, vol. 2. Heenemann Verlagsgesellschaft mbH, Berlin, pp. 111–126.
- Ihssen, P.E., McKay, L.R., McMillan, I., Phillips, R.B., 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: Cytogenetic and fisheries applications. Transactions of the American Fisheries Society 119: 698–717.
- Kolářová, J., Velíšek, J., Nepejchalová, L., Svobodová, Z., Kouřil, J., Hamáčková, J., Máchová, J., Piačková, V., Hajšlová, J., Holadová, K., Kocourek, V., Klimánková, E., Modrá, H., Dobšíková, R., Groch, L., Novotný, L., 2007. Anestetika pro ryby. Edice Metodik, VÚRH JU Vodňany, č. 77, 19 s.

- Linhart, O., Gela, D., Flajšhans, M., Duda, P., Rodina, M., Novák, V., 2000a. Alcalase enzyme treatment for elimination of egg stickiness in tench, *Tinca tinca* L. Aquaculture 191: 303–308.
- Linhart, O., Gela, D., Flajšhans, M., Rodina, M., 2000b. Umělý výtěr lína obecného s použitím enzymu k odlepkování jiker. Edice Metodik, VÚRH JU Vodňany, č. 63, 14 s.
- Linhart, O., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., 2004. Optimization of artificial propagation in European catfish, *Silurus glanis* L. Aquaculture 235: 619–632.
- Linhart, O., Rodina, M., Flajšhans, M., Mavrodiev, N., Nebesářová, J., Gela, D., Kocour, M., 2006a. Studies on sperm of diploid and triploid tench (*Tinca tinca* L.). Aquaculture International 14 (1–2): 9–25.
- Linhart, O., Rodina, M., Kocour, M., Gela, D., 2006b. Insemination, fertilization and gamete management in tench, *Tinca tinca* (L.). Aquaculture International 14 (1–2): 61–73.
- Pandian, T.J., Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. Hydrobiologia 384: 167–243.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.-C., Flajšhans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid Fish and Shellfish: Production, Biology and Applications to Aquaculture for Performance Improvement and Genetic Containment. Aquaculture 293 (3–4): 125–156.
- Pšenička, M., Flajšhans, M., Hulák, M., Kašpar, V., Rodina, M., Borishpolets, S., Linhart, O., 2010. The influence of ploidy level on ultrastructure and motility of tench *Tinca tinca* (L.) spermatozoa. Reviews in Fish Biology and Fisheries 20: 331–338.
- Rodina, M., Cosson, J., Gela, D., Linhart, O., 2004. Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench (*Tinca tinca* L.) Aquaculture International 12: 119–131.
- Sedláček, P., 1999. Studie vybraných morfologických, fyziologických a užitkových vlastností triploidního lína obecného. Diplomová práce MZLU Brno, 81 s.
- Steffens, W., 1995. The tench (*Tinca tinca* L.), a neglected pond fish species. Polish Archives of Hydrobiology 42: 161–180.
- Thorgaard, G.H., 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds), Fish Physiology, vol. 9B. Academic Press, New York, pp. 405–434.
- Wang, J., Min, W., Guan, M., Hu, S. 2004. Tench farming in China: present status and future prospects. In: IVth. International Workshop on Biology and Culture of the Tench, *Tinca tinca* (L.). Wierzba, September 20–23, 2004. Programme and Abstracts, Stanislaw Sakowicz Inland Fisheries Institute in Olsztyn, Poland, p. 32.
- Wang, J., Min, W., Guan, M., Gong, L., Ren, J., Huang, Z., Zheng, H., Zhang, J., Liu, H., Han, Y., 2006. Tench farming in China: Present status and future prospects. Aquaculture International 14: 205–208.

ODBORNÝ OPONENT

prof. Ing. Petr Ráb, DrSc.

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.

277 21 Liběchov

Adresa autorů:

doc. Ing. Martin Flajšhans, Dr.rer.agr. (flajshans@vurh.jcu.cz)

Ing. Marek Rodina, Ph.D. (rodina@vurh.jcu.cz)

Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D. (vkaspar@vurh.jcu.cz)

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Zátíší 728, 389 25 Vodňany,

www.frov.jcu.cz

Ing. Radek Luhan

Rybářství Hluboká cz. s.r.o., Tyršova 681, 373 41 Hluboká nad Vltavou, www.rybarstvihluboka.cz

Ověření a uplatnění technologie 2010, Rybářství Hluboká cz. s.r.o.,

Tyršova 681, 373 41 Hluboká nad Vltavou

Vedici Metodik (Technologická řada)

vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,

Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany,

vydáno v roce 2010,

redaktorka Zuzana Dvořáková

Náklad: 200 ks, předáno do tisku 2010

Grafický design a technická realizace: iDigitisk s. r. o.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

VYDÁNÍ PUBLIKACE BYLO USKUTEČNĚNO
ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU:
INOVACE PREZENČNÍHO STUDIA BAKALÁŘSKÉHO STUDIJNÍHO OBORU RYBÁŘSTVÍ
(CZ.1.07/2.2.00/15.0076)

