



Ověřená technologie hromadné indukce triploidie u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) v provozních podmínkách

M. Havelka, M. Kříž, M. Flajšhans



Ověřená technologie hromadné indukce triploidie u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) v provozních podmínkách

M. Havelka, M. Kříž, M. Flajšhans

VYDÁNÍ PUBLIKACE BYLO USKUTEČNĚNO ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU:

Příprava a vydání metodických publikací v roce 2012

OP Rybářství CZ.1.25/3.1.00/11.00381

EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND
„Investování do udržitelného rybolovu“



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

***Ověření technologie hromadné indukce triploidie u pstruha duhového
v provozních podmínkách.***

(OP Rybářství CZ.1.25/3.4.00/10.00325)

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

Pstruhařství ČRS Kaplice, spol. s r.o.



Vodňany

2012

ISBN 978-80-87437-61-2

OBSAH

1. ÚVOD DO PROBLÉMU	6
2. CÍL	9
3. MÍSTO, KDE SE TECHNOLOGIE OVĚŘOVALA	9
4. POPIS TECHNOLOGIE A VÝSLEDKY	9
4.1. Příprava generačních ryb, vlastní výtěr, aktivace a oplození jiker	9
4.2. Technologické sestavy pro indukci triploidie	10
4.3. Indukce triploidie teplým šokem	12
4.4. Indukce triploidie šokem hydrostatickým tlakem	14
4.5. Opatření během inkubace jiker a odchovu plůdku	14
4.6. Ověření triploidie rozplavaného plůdku	16
4.7. Srovnání úspěšnosti triploidizace šokem hydrostatickým tlakem a teplým šokem	17
5. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGIE V PRODUKCI PODNIKATELSKÉHO SUBJEKTU	17
6. EKONOMICKÝ PŘÍNOS TECHNOLOGIE PRO PODNIKATELSKÝ SUBJEKT	17
7. SEZNAM LITERATURY	18

1. ÚVOD DO PROBLÉMU

Pstruh duhový (Pd), *Oncorhynchus mykiss*, se původně vyskytoval pouze v oblasti severního Tichomoří od pobřeží a povodí řek v Kalifornii přes Aljašku až do povodí řek Kamčatky. V druhé polovině 19. století byl postupně introdukovan ze Severní Ameriky na všechny kontinenty s výjimkou Antarktidy. Na území dnešní České republiky byl poprvé dovezen v roce 1888 z Německa, kam byl v roce 1880 importován z líhně na řece McCloud v USA. Po prvotních nezdarech s jeho vysazováním do volných vod se začal rozvíjet jeho chov v rybnících a menších průtočných nádržích. Díky své nízké náročnosti na podmínky prostředí se hodí pro intenzivní způsob chovu, kde je dnes hlavní chovanou lososovitou rybou v České republice.

Celosvětová produkce pstruha duhového v akvakultuře nadále intenzivně stoupá a v roce 2010 dosáhla 728 488 t, z čehož 15 000 t připadlo na produkci triploidních jedinců. Největším producentem této lososovité ryby je Evropa (273 000 t), konkrétně Norsko, Turecko, Dánsko, Francie a Itálie. V České republice se ročně vyprodukuje 600–700 t pstruha duhového, bez podílu uměle indukovaných triploidních jedinců. Pstruh duhový je také intenzivně vysazován do volných vod, kde je poměrně často vyhledáván sportovními rybáři. Na sportovních revírech Českého rybářského svazu bylo v roce 2010 uloveno celkem 41,4 t pstruha duhového při průměrné hmotnosti 0,4 kg.ks⁻¹.

Pstruh duhový dosahuje za optimálních podmínek tržní velikosti (tj. 250–300 g) ve věku 10–13 měsíců, kdy ještě většina ryb nedosáhne pohlavní dospělosti (Werner a kol., 2008). Při evropské poptávce po čerstvých filetech z ryb o hmotnosti 1,2 kg nebo po uzených filetech z ryb o hmotnosti 2,5–3 kg (tzv. „lososový pstruh“) se setkáváme s problémy dlouhodobosti a nákladnosti odchovu během období pohlavního dozrávání (kolem 450 g hmotnosti samic) spojeného s hmotnostním úbytkem, se zhoršenou konverzí krmiva, se snížením kvality masa, se zhoršením odolnosti vůči chorobám a parazitům, případně i vyšší mortalitou ryb (Tiwary a kol., 2004; Kiessling a kol., 2006). Lze také předpokládat, že i na sportovních revírech nadále poroste poptávka po trofejních jedincích přesahujících hmotnost 3 kg. V průběhu pohlavního dospívání, a poté především během výtěrového období vykazují mlíčáci pstruha duhového zvýšenou agresivitu, která vede k vzájemnému napadání jedinců v chovu a znemožňuje tak intenzivní produkci těžších ryb (Piferrer a kol., 2009).

Značná většina výše zmíněných negativních faktorů spojených s chovem pstruha duhového do větších velikostí se dá eliminovat produkcí celosamičích populací (Werner a kol., 2008) či sterilních triploidních jedinců (Loopstra a Hansen, 2008). V podmínkách českého pstruhařství se však doposud nepodařilo tyto postupy úspěšně aplikovat, a to i přes to, že v Evropě jsou již zcela běžnou praxí.

Z výše uvedeného vyplývá, že produkce triploidních jedinců pstruha duhového o hmotnostech nad 2 kg může mít v budoucnu pro rybářské provozy, zabývající se

chovem tohoto druhu lososovité ryby, významný ekonomický přínos, nehledě na to, že jejich komerční potenciál popsali již Lincoln a Bye v roce 1984.

Triploidní pstruhu duhové lze získat dvěma způsoby.

V prvním případě se jedná o indukci triploidie tzv. **polyplodizačním šokem**, což je nejčastěji fyzikální zásah do raného vývoje oplozené jikry. Tento zásah vede k depolarizaci tubulinu děličního vřeténka během druhé fáze meiotického dělení, v jehož důsledku dojde k přifúzování sekundárního pólového tělíska (Pandian a Koteeswaran, 1998) a výsledný jedinec pak nese tři sady chromozómů. V praxi se u pstruha duhového osvědčily dva typy šoku k indukci triploidie. Prvním je **aplikace teplého šoku**, kdy jsou jikry za přesně definovaných podmínek a po určitý čas (zpravidla dvacet minut po oplození a aktivaci gamet) přeneseny do lázně s vodou o teplotě 26–30 °C a zde inkubovány po dobu dalších dvaceti minut (Chourrout, 1980; Solar a kol., 1984). Druhým typem je **šok hydrostatickým tlakem**. Využívá se speciálních tlakových jednotek, kde jsou jikry s vodou vystaveny působení hydrostatického tlaku cca 65 MPa (Hamor a kol., 1996; Yesaki a kol., 1996). Indukce triploidie hydrostatickým tlakem poskytuje ve srovnání s indukcí pomocí teplého šoku zpravidla vyšší procento triploidů, nižší procento deformit plůdku a také výrazně vyšší přežití jak oplozených jiker, tak i váčkového plůdku (Lincoln, 1989; Haffray a kol., 2007).

Druhým způsobem získání triploidních pstruhů duhových je využití **křížení diploidních a tetraploidních rodičů**. Tento postup se však v praxi příliš neosvědčil především z toho důvodu, že produkce a chov tetraploidních jedinců jsou poměrně náročné a jsou spojeny s velmi vysokou embryonální mortalitou a nižší oplozovací schopností spermatu tetraploidních samců (Chourrout a kol., 1986; Piferrer a kol., 2009).

Technologické postupy pro indukci triploidie u pstruha duhového byly detailně popsány například v pracích Chourrouta (1980, 1984); Loua a Purdoma (1984); Solara a kol. (1984); Lincoln (1989); Hamora a kol. (1996); Yesaki a kol. (1996) a dalších autorů.

Užitkové vlastnosti (zejména přežití, růst a jatečná výtěžnost) triploidů indukovaných v laboratorním, poloprodučním 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; Chourrouta, 1987; Donaldsona a Benfeyho, 1987; Ihssena a kol., 1990; Horvátha a Orbána, 1995; Pandiana a Koteeswarana, 1998; Benfeyho, 1999; Gomelského, 2003; Piferrera a kol., 2009 aj.). Ačkoli se obecně předpokládá vyšší růstový potenciál triploidních jedinců, Benfey (1999) upozorňuje na anabolický efekt pohlavních steroidů, díky čemuž mohou pohlavně dospělí diploidi po proběhnutí reprodukci kompenzovat svůj růst, což může růstovou výhodu triploidů částečně eliminovat.

U triploidních juvenilních jedinců pstruha duhového chovaných odděleně od diploidů bylo zdokumentováno stejné, popřípadě nepatrně nižší přežití ve srovnání s diploidní kontrolou (Sheehan a kol., 1999). Pokud však byli juvenilní triploidi chováni spo-

lečně s diploidy, bylo jejich přežití výrazně nižší než tomu bylo u diploidů (Thorgaard a kol., 1982). Studie Maxime (2008) však neprokázala u triploidních jedinců ve srovnání s diploidy vyšší náchylnost ke stresu způsobenému zhoršením podmínek chovu či manipulací.

Do věku 9 měsíců vykazují triploidní pstruzi duhová vůči diploidním vrstevníkům shodný, popřípadě mírně snížený růst (Sheehan a kol., 1999; Legatt a kol., 2006; Wagner a kol., 2006). Tato růstová deprese se projevuje výrazněji, pokud jsou diploidi a triploidi chováni společně (Wagner a kol., 2006). Po dosažení pohlavní dospělosti diploidů vykazují triploidi růst až o 20% vyšší (Piferrer a kol., 2009). Vysvětlení lepšího růstu triploidů spočívá v jejich sterilitě. 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).

Hlavní důvody užitkového chovu triploidních jedinců pstruha duhového jsou následující:

- Vyšší růstová schopnost, která se projeví především po dosažení pohlavní dospělosti jejich diploidních vrstevníků (Sheehan a kol., 1999).
- Snížení sexuálního a teritoriálního chování ryb (především samců) v akvakultuře (Piferrer a kol., 2009).
- Lepší organoleptická kvalita masa, především pokud je produkt prodáván po dosažení pohlavní dospělosti diploidů (Werner a kol., 2008).
- Částečně lepší schopnost vázat červená barviva ve svalovině (Choubert a Blanc, 1989).

2. CÍL

Cílem technologie bylo ověření hromadné indukce triploidie u pstruha duhového v provozních podmínkách rybí líhně na pstruhařství s optimalizací výnosu triploidního váčkového plůdku v měřítku potřebném pro produkci dostatečného množství jedinců pro produkční chovy a pro vysazování do volných vod, s ohledem na dosažení maximálního procenta indukovaných triploidů v potomstvu ve stadiu váčkového plůdku při maximalizaci procenta oplozenosti jiker a líhivosti plůdku vůči kontrole.

Inovativnost testované technologie spočívá v prvním otestování tlakové jednotky k hromadné indukci triploidie šokem hydrostatickým tlakem u pstruha duhového na pstruhařství v ČR. Dále pak v paralelním testování tohoto postupu s umělou indukcí triploidie teplotním šokem, jehož výsledek slouží k porovnání účinnosti obou typů fyzikálního šoku vůči kontrole. Jedná se o inovaci pro celé odvětví rybářství v České republice, která doposud nebyla rybářským podnikem v provozu využita.

Účelem aplikace technologie v praxi má být produkce triploidních pstruhů duhových do vyšší tržní hmotnosti, s vyšší užitkovostí, s lepšími růstovými vlastnostmi a o vyšší kvalitě masa za stejných chovatelských podmínek (délka odchovu, krmný režim, apod.) jako při běžné produkci.

3. MÍSTO, KDE SE TECHNOLOGIE OVĚŘOVALA

Proces ověření technologie probíhal v rámci realizace pilotního projektu CZ.1.25/3.4.00/10.00325 „Ověření technologie hromadné indukce triploidie u pstruha duhového v provozních podmínkách“, Operační program Rybářství v roce 2011, ve výrobních podmínkách firmy Pstruhařství ČRS Kaplice, spol. s r.o.

4. POPIS TECHNOLOGIE A VÝSLEDKY

4.1. Příprava generačních ryb, vlastní výtěr, aktivace a oplození jiker

V předvýtěrovém období byly ryby sloveny a umístěny do manipulačních nádrží v líhni, kde byla pravidelně kontrolována jejich připravenost k výtěru. V době, kdy u samic (jikernaček) docházelo k samovolnému uvolňování jiker při mírném tlaku na břicho, bylo přistoupeno k umělému výtěru. Hormonální stimulace generačních ryb se neprováděla.

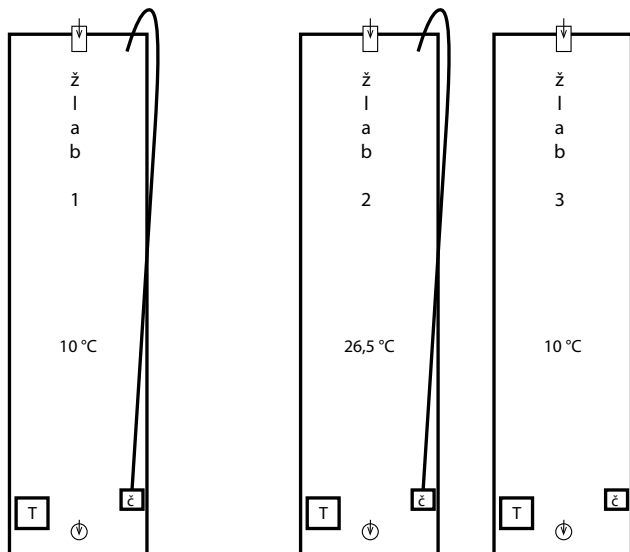
Jikry byly vytírány separátně od každé samice do suché misky, stejně tak sperma každého samce (mlíčáka) bylo odebíráno do suchých připravených plastových kádinek. Při dvou umělých výtěrech v jarním období byly získány gamety celkem od 170

generačních ryb (105 samců a 65 samic) Oplození bylo provedeno klasickou německou metodou. Směs jiker od různých samic byla oplozena heterospermicky v dávce 3 ml heterospermatu na každých 100 ml jiker, s aktivací vodou v množství dvojnásobném vůči objemu jiker. Aktivace byla provedena okamžitě po osemnění, vodou z líhne temperovanou na 10 °C. Voda k aktivaci gamet a inkubaci jiker do začátku šoku byla temperována 2 kW závěsnými termostaty Julabo v odchovných žlabech a cirkulována akvarijními čerpadly o výkonu 700 l.h⁻¹ s hadicovým rozvodem vody. Čas aktivace gamet byl zaznamenán jako čas 0 min. Misky s aktivovanými jikrami byly uchovány v 10 °C. Po +1,5 min od aktivace gamet byly jikry propláchnuty vodou temperovanou na 10 °C, aby byly zbaveny veškerých zbytků spermatu a odstraněna jejich nepatrná lepkavost. Jikry byly umístěny po 7 500 ks na inkubační aparáty (vločky) do žlabu s vodou o teplotě 10 °C. Do této chvíle byl metodický postup shodný pro kontrolu i pro indukci triploidie.

4.2. Technologické sestavy pro indukci triploidie

Technologické sestavy pro inkubaci oplozených jiker do začátku šoku a pro hromadnou indukci triploidie teplým šokem byly zkompletovány před zahájením umělého výtěru (obr. 1 a 2). Tyto sestavy se skládaly ze tří inkubačních žlabů, do kterých byly umístěny inkubační vločky na jikry. Dva inkubační žlaby, které sloužily k temperování vody na 10 °C, byly osazeny vždy po jednom 2 kW závěsném termostatu Julabo a jeden z těchto žlabů byl osazen akvarijním čerpadlem o výkonu 700 l.h⁻¹ s hadicovým rozvodem pro zajištění cirkulace vody ve žlabu. Inkubační žlab použitý pro indukci triploidie teplým šokem byl osazen dvěma 2 kW závěsnými termostaty Julabo pro zajištění stability požadované teploty a jedním akvarijním čerpadlem jako v předchozím případě.

Technologická sestava pro indukci triploidie tlakovým šokem byla sestavena firmou SZDT, s.r.o. ve spolupráci s Pstruhařstvem ČRS Kaplice, spol. s r.o. a Fakultou rybářství a ochrany vod JU. Tato sestava je chráněna užitným vzorem Úřadu průmyslového vlastnictví ČR, č. 23378 (Flajšhans a kol., 2012). Celá tlaková jednotka se skládá z vysokotlakého kompresoru s pojistným ventilem, kterým je stlačený atmosférický vzduch dodáván přes vysokotlaké hadice a redukční ventil do násobiče. Ten následně umožňuje vytvořit požadovaný tlak (> 500 atm; > 50 MPa) v tlakové nádobě s jikrami a vodou. Celé zařízení je po jeho rozložení možné převážet osobním automobilem.



Obr. 1. Schéma uspořádání inkubačních žlabů při ověření technologie hromadné indukce triploidie na Pstruhařství ČRS Kaplice, spol. s r.o. T = termostat; Č = akvarijní čerpadlo.



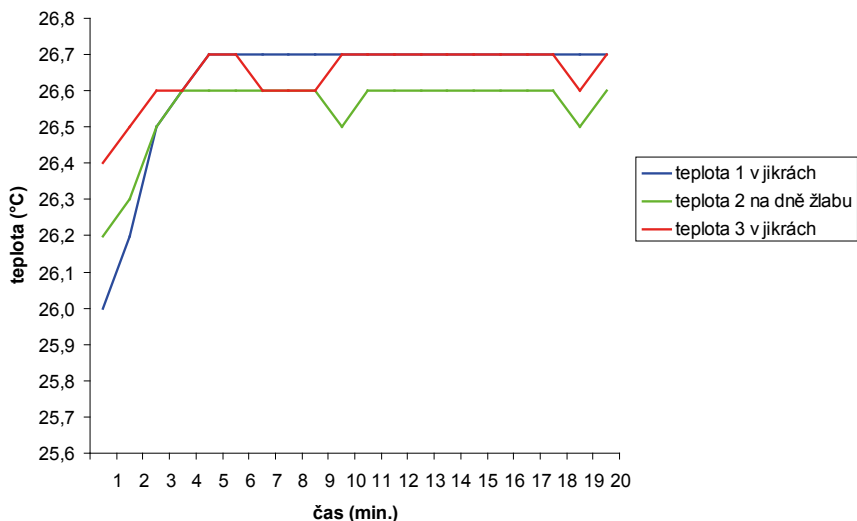
Obr. 2. Sestava inkubačních žlabů na Pstruhařství ČRS Kaplice, spol. s r.o. Vzadu a vpředu žlaby temperované na 10 °C na inkubaci jiker do začátku šoku a na předeřtání vody k aktivaci gamet; druhý žlab vpředu temperovaný na 26,5 °C k realizaci teplého šoku. Červené hadice vedou od akvarijních čerpadel a zajišťují cirkulaci temperované vody. Foto M. Kříž.

4.3. Indukce triploidie teplým šokem

K indukci triploidie teplým šokem bylo použito metodického postupu oplození, aktivace gamet a počáteční inkubace oplozených jiker popsáno v části 4.1. V čase +20 min po aktivaci byly celé vložky s jikrami přeneseny do inkubačního žlabu vyhřátého na 26,5 °C, na dobu 20 min. Nad žlab byl umístěn 3kanálový registrační digitální teploměr, přičemž jedno jeho čidlo bylo umístěno do vodního sloupce ve žlabu a dvě čidla byla vnořena do inkubačních vložek mezi jikry. Průběh teplot je znázorněn na obr. 3.

V čase +40 min po aktivaci byly celé vložky s jikrami vyjmuty z teplé lázně a přeneseny do inkubačního žlabu s vodou o teplotě 10 °C, postupně adaptovaného na teplotu přítokové vody. Zde byly jikry inkubovány do vykulení plůdku. Zjišťována byla a) mortalita jiker do stadia očních bodů, b) relativní oplozenost ve stadiu očních bodů (%), c) počet vykuleného plůdku a relativní líhnivost (%), a d) procento triploidního plůdku ve vzorku (tab. 1).

Průběh teplot při hromadné indukci triploidie u pstruha duhového teplým šokem



Obr. 3. Rozložení a dynamika teplot v průběhu 20 min teplého šoku.

modrá – teplota ve vložce 1 s jikrami

zelená – teplota u dna inkubačního žlabu

červená – teplota ve vložce 3 s jikrami

INKUBAČNÍ VLOŽKA	OPLOZENÍ JIKER (KS)	SPERMA (ML)	OPLOZENÍ CELKEM (KS)	ZTRÁTY DO OČ. B. (KS)	ZTRÁTY DO OČ. B. CELKEM (KS)	OPLOZENOST (%)	VYKULENO CELKEM (KS)	LIHIVOST (%)	VZORKO- VANO (KS)	PROCENTO TRIPLOIDŮ (%)
TLAK 1	7 500	20	3 719							
TLAK 2	7 500	20	3 452	13 650		54,5	4 700	15,67%	30	100
TLAK 3	7 500	20	3 122							
TLAK 4	7 500	20	3 357							
TEPLOTA 1	7 500	20	3 693							
TEPLOTA 2	7 500	20	3 254	14 340		52,2	3 200	10,67%	30	90
TEPLOTA 3	7 500	20	3 490							
TEPLOTA 4	7 500	20	3 903							
KONTROLA 1	7 500	20	1 264							
KONTROLA 2	7 500	20	1 157	4 399		85,3	6 150	20,50%	30	0
KONTROLA 3	7 500	20	993							
KONTROLA 4	7 500	20	985							

Tab. 1. Počet oplozených jiker, množství spermatu použitého k oplození, mortalita jiker do stadia očních bodů, relativní oplozenost ve stadiu očních bodů, počet vykuleného plůdku, relativní lihivost a procento triploidního plůdku ve vzorku. Vyjádřeno pro kontrolu a procento triploidního plůdku použité k indukcí triploidie.

Průměrná oplozenost jiker po teplém šoku byla 52,2% a oplozenost kontroly byla 85,3%, tzn. že průměrná oplozenost triploidů dosahovala 61,2% kontroly. Průměrná líhivost triploidního plůdku byla zjištěna na úrovni 10,67%, průměrná líhivost kontroly byla 20,5%, tzn. že průměrná líhivost triploidů dosahovala 42,7% kontroly, což lze v praktických podmínkách považovat za nepříliš uspokojivý výsledek.

Z celkem 30 000 jiker podrobených teplému šoku bylo získáno 3 200 ks plůdku Pd k dalšímu odchovu, s 90% úspěšností triploidizace, tedy 2 880 ks triploidního plůdku Pd.

4.4. Indukce triploidie šokem hydrostatickým tlakem

Bylo použito metodického postupu oplození, aktivace gamet a počáteční inkubace oplozených jiker popsaného v části 4.1. V čase +25 min po aktivaci gamet byly jikry přeplavením z inkubační vložky převedeny do nádoby s vodou o teplotě 10 °C a pomocí této nádoby přelity do tlakové komory, předem naplněné do třetiny svého objemu vodou o stejné teplotě. Tlaková komora byla poté dolita vodou o téže teplotě.

V čase +30 min po aktivaci byl v tlakové komoře vyvolán hydrostatický tlak 646 atm (65,5 MPa). Cílové intenzity tlaku bylo dosaženo během 20 s. Expoziční doba byla 6 min. V čase +36 min po aktivaci byl ukončen šok hydrostatickým tlakem. Přebytečný tlak byl vypuštěn během 5 s. Jikry byly vypuštěny do nádoby s vodou a opět převedeny do vložek na inkubačních žlabech s vodou o teplotě 10 °C, postupně adaptovaných na teplotu přítokové vody. Zde byly jikry inkubovány do vykulení plůdku. Zjišťována byla a) mortalita jiker do stadia očních bodů, b) relativní oplozenost ve stadiu očních bodů (%), c) počet vykuleného plůdku a relativní líhivost (%), a d) procento triploidního plůdku ve vzorku (tab. 1).

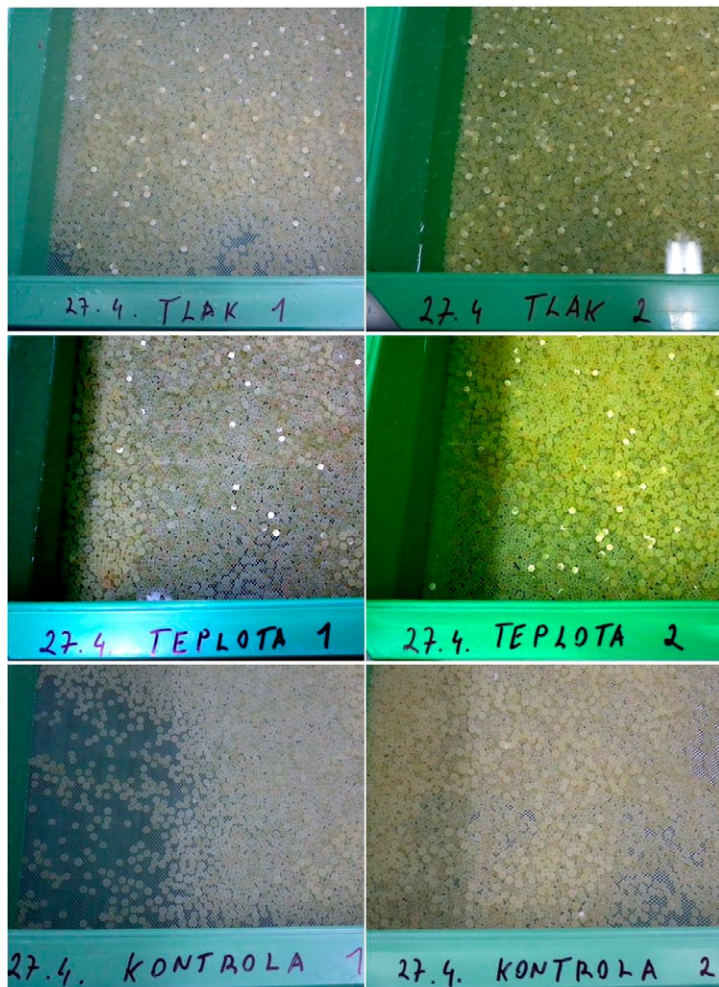
Průměrná oplozenost jiker po tlakovém šoku byla 54,5% a oplozenost kontroly byla 85,3%, tj. průměrná oplozenost triploidů dosahovala 63,9% kontroly. Průměrná líhivost triploidního plůdku byla zjištěna na úrovni 15,7%, průměrná líhivost kontroly byla 20,5%, tj. průměrná líhivost triploidů dosahovala 76,6% kontroly, což lze v praktických podmínkách považovat za velmi dobrý výsledek.

Z celkem 30 000 jiker podrobených tlakovému šoku bylo získáno 4 700 ks plůdku Pd k dalšímu odchovu, se 100% úspěšností triploidizace. Kontrolní skupina obsahovala 6 150 ks diploidního plůdku Pd.

4.5. Opatření během inkubace jiker a odchovu plůdku

Triploidizace oběma typy šoků zvýšila mortalitu jiker a plůdku vůči kontrole (obr. 4). Byla proto věnována zvýšená pozornost odebrání mrtvých jiker a odumřelého plůdku z inkubačních aparátů a odchovných žlabů, protiplísňové koupele nebyly aplikovány.

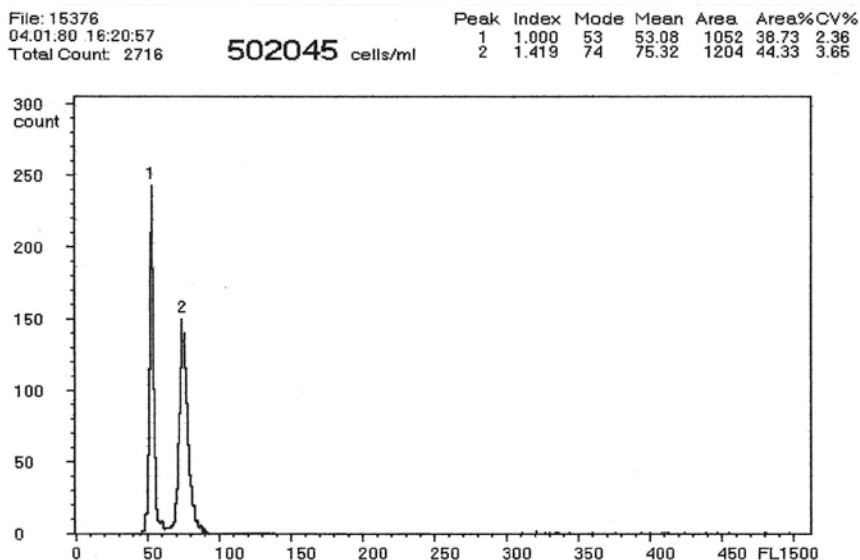
Ve stadiu rozplavaného plůdku bylo provedeno laboratorní vyšetření přítokové vody. Byl analyzován celkový obsah rozpuštěného kyslíku, pH, BSK₅, CHSK_{Mn}, obsah amoniakálního dusíku a obsah těžkých kovů. Výsledky neprokázaly zvýšené biologické zatížení ani přítomnost chemických látek ovlivňujících přežití. Stejně tak veterinární vyšetření rozplavaného plůdku, zaměřené na nejběžnější bakteriální a parazitární onemocnění pstruha duhového, bylo negativní.



Obr. 4. Oplozené jikry pstruha duhového po obou typech šoku a po vrácení do inkubačních žlabů, dne 27. 4. 2011. Fotografovány vždy 2 vložky z celkem 4 opakování každé varianty. Bílé jikry jsou odumřelé. Foto M. Havelka

4.6. Ověření triploidie rozplavaného plůdku

Ověření triploidní konstituce rozplavaného plůdku ve stáří 200 d° po vykultivaci 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 (4',6-diamidino-2-fenylindolem, DAPI), a na měření fluorescence emitované komplexem obarvené DNA. Výsledky byly zobrazeny formou histogramu intenzity fluorescence v jádrech analyzované suspenze (obr. 5). U triploidního pstruha duhového, který má tři sady chromozómů a tedy 1,5x více DNA než diploidní Pd, bylo zjištěno, že teplý šok indukoval 90% triploidního pstruha duhového a šok hydrostatickým tlakem 100% triploidního pstruha duhového ve stadiu rozplavaného plůdku.



Obr. 5. Výsledky analýzy relativního obsahu DNA průtokovou cytometrií v jádrech somatických buněk diploidního ($2n$; pík histogramu 1) a indukovaně triploidního ($3n$; pík histogramu 2) plůdku pstruha duhového. Hodnota obsahu DNA v jádrech buněk indukovaně triploidního pstruha duhového (tabulka vpravo nahoře, sloupec Mean) je 75,32 proti 53,08 v jádrech buněk kontrolního diploidního pstruha duhového, což potvrzuje úspěšnou indukci triploidie.

4.7. Srovnání úspěšnosti triploidizace šokem hydrostatickým tlakem a teplým šokem

Použití technologie indukce triploidie šokem hydrostatickým tlakem mělo za následek vyšší procento oplozenosti jiker než při použití teplého šoku a přibližně o třetinu vyšší líhivost plůdku, až stoprocentní účinnost triploidizace a v důsledku tedy vyšší úroveň produkce triploidů. Lze konstatovat, že při dodržení stanovených parametrů je šok hydrostatickým tlakem s relativně krátkou expoziční dobou šetrnější k oplozeným jikrám a účinnější v indukci triploidie u pstruha duhového než provozně jednodušší teplý šok.

5. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGIE V PRODUKCI PODNIKATELSKÉHO SUBJEKTU

Výrobní postup byl již v roce 2011 a 2012 uplatněn v rybářském podniku Pstruhařství ČRS Kaplice, spol. s r.o. Technologie hromadné indukce triploidie šokem hydrostatickým tlakem zde byla aplikována za účelem produkce triploidních jedinců pstruha duhového. Triploidní plůdek byl následně rozkrmen a vysazen do příkopových rybníčků s cílem produkovat trofejní jedince pro vysazování do sportovních revírů Jihočeského územního svazu ČRS.

6. EKONOMICKÝ PŘÍNOS TECHNOLOGIE PRO PODNIKATELSKÝ SUBJEKT

Technologie je určena především pro líhně rybářských podniků a chovatelů, zabývajících se produkcí tržního pstruha duhového do větších velikostí (nad 500 g), a dále také pro podniky a organizace rybářských svazů, které chtějí v budoucnu produkovat trofejní jedince pstruha duhového a vysazovat je do svých sportovních revírů. Účelem aplikace technologie v praxi má být zavedení produkce triploidního plůdku pstruha duhového 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 jsou diploidní pstruzi duhový již pohlavně zralí a zaostávají v růstu pro tvorbu gamet, zatímco sterilní či substerilní triploidní jedinci v tomto období rostou rychleji.

Na druhou stranu je nutné počítat s potřebou většího počtu generačních ryb pro produkci stejného množství plůdku, důsledkem zhoršené líhivosti jiker, které prodělaly triploidizační šok. Dále je nutné zohlednit vyšší nároky na obsluhu při odstraňování odumřelých jiker a odumřelého váčkového plůdku během inkubace. V ideálním případě je vhodné chovat triploidy odděleně od diploidů, což může částečně zvyšovat požadavky na produkční plochu rybářských podniků.

7. SEZNAM LITERATURY

- Beaumont, A.R., Hoare, K., 2003. *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture*. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom.
- Benfey, T.J., 1999. The physiology and behaviour of triploid fishes. *Reviews in Fisheries Science* 7: 39–67.
- 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., Havelka, M., Kříž, M., Toncar, J., Veselý, L., 2012. Tlaková jednotka pro indukci polyploidie u ryb. Užitený vzor č. 23378 zapsaný ke dni 6. 2. 2012. Úřad průmyslového vlastnictví ČR.
- 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.
- Choubert, G., Blanc, J.M., 1989. Dynamic of dietary canthaxanthin utilisation in sexually maturing female rainbow trout *Salmo gairdneri* Rich. compared to triploids. *Aquaculture* 83: 359–366.
- Chourrout, D., 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Reproduction Nutrition Development* 20: 727–733.
- Chourrout, D., 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all-triploids, all-tetraploids and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture* 36: 111–126.
- 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, Germany, pp. 111–126.
- Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G., Renard, P., 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females – potential of tetraploidfish. *Theoretical and Applied Genetics* 72: 193–206.
- Haffray, P., Aubin, J., Houis, V., Labbe, L., Jalabert, B., 2007. Comparison of pressure or thermal treatments on triploid yields and malformations up to swim up stage in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 272: S265.

- Hamor, T., Beck, R., Stewart, J., 1996. Alternation of ploidy in rainbow trout with heat and hydrostatic pressure. Proceedings of the 47th Annual Northwest Fish Conference, 174–186.
- 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.
- Kiessling, A., Ruohonen, K., Bjørnevik, M., 2006. Muscle fibre growth and quality in fish. Archiv Tierzucht, Dummerstorf 49, Special Issue, pp. 137–146.
- Legatt, R.A., Scheer, K.W., Afonso, L.O.B., Iwama, G.K., 2006. Triploid and diploid rainbow trout do not differ in their stress response to transportation. North American Journal of Aquaculture 68: 1–8.
- Lincoln, R.F., 1989. Triploid induction in rainbow trout using hydrostatic pressure. Trout News 8: 8–10.
- Lincoln, R.F., Bye, V.J., 1984. Triploid rainbows show commercial potential. Fish Farmer 7: 30–32.
- Loopstra, D.P., Hansen, A.P., 2008. Induction of triploidy in rainbow trout *Oncorhynchus mikiss* using hydrostatic pressure. Fishery Data Series No. 08–22.
- Lou, Y.D., Purdom, C.E., 1984. Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri Richardson*. Journal of Fish Biology 25: 345–351.
- Maxime, V., 2008. The physiology of triploidfish: current knowledge and comparisons with diploid fish. Fish and Fisheries 9: 67–78.
- 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.
- Sheehan, R.J., Shasteen, S.P., Suresh, A., Kapuscinski, A.R., Seeb, J.E., 1999. Better growth in all-female diploid and triploid rainbow trout. Transactions of the American Fisheries Society 128: 491–498.
- Solar, I., Donaldson, E.M., Hunter, G.A., 1984. Induction of triploidy in rainbow trout *Salmo gairdneri Richardson* by heat shock, and investigation of early growth. Aquaculture 42: 57–67.
- Thorgaard, G.H., Rabinovitch, P.S., Shen, M.W., Gall, G.A.E., Propp, J., Utter, F.M., 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. Aquaculture 29: 305–309.

- 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* 9B. Academic Press, New York, USA, pp. 405–434.
- Tiwary, B.K., Kirubakaran, R., Ray, A.K., 2004. The biology of triploid fish. *Reviews of Fish Biology and Fisheries* 14: 391–402.
- Wagner, E.J., Arndt, R.E., Routledge, M.D., Latremouille, D., Mellenthin, R.F., 2006. Comparison of hatchery performance, agonistic behaviour, and poststocking survival between diploid and triploid rainbow trout of three different Utah strains. *North American Journal of Aquaculture* 68: 63–73.
- Werner, C., Poontawee, K., Mueller-Belecke, A., Hoertgen-Schwark, G., Wicke, M., 2008. Flash characteristics of pan-size triploid and diploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reared in commercial fish farm. *Archiv Tierzucht* 51 (1): 71–83.
- Yesaki, T.Y., Scheer, K.W., Greiner, D.L., 1996. Production-scale pressure shocking of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in British Columbia. *Proceedings of the 47th Annual Northwest Fish Conference*, 170–173.

Odborný externí oponent

Ing. Václav Senft

Klatovské rybářství a.s.
K letišti 442/II, 339 01 Klatovy

Odborný interní oponent

Ing. David Gela, Ph.D.

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

Ověření a uplatnění technologie 2012

Pstruhařství ČRS Kaplice, spol. s r.o
Rybářská 237, 373 82 Boršov nad Vltavou

Adresa autorů

Ing. Miloš Havelka (havelm02@frov.jcu.cz)

Ing. Michal Kříž (mkriz@frov.jcu.cz)

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

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

V edici Metodik (Technologická řada)

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

Redakce: MVDr. Jitka Kolářová, Ing. Blanka Vykusová, CSc., Zuzana Dvořáková

Náklad: 200 ks, vydáno v roce 2012, 1. vydání

Grafický design a technická realizace: Jesenické nakladatelství Jena Šumperk



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH



EVROPSKÁ UNIE

EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND

„Investování do udržitelného rybolovu“



ISBN 978-80-87437-61-2