



Fakulta rybnářství  
a ochrany vod  
Faculty of Fisheries  
and Protection  
of Waters

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

---

# Produkce gynogenetických populací jesetera malého

---

I. Lebeda, M. Flajšhans, M. Rodina,  
M. Havelka, D. Gela







Fakulta rybnářství  
a ochrany vod  
Faculty of Fisheries  
and Protection  
of Waters

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

# **Produkce gynogenetických populací jesetera malého**

---

I. Lebeda, M. Flajšhans, M. Rodina,  
M. Havelka, D. Gela

**Vydání a tisk metodiky je uskutečněno za finanční podpory projektu  
OP Rybářství 2007–2013:**

Metodiky III (2014–2015); reg. č. CZ.1.25/3.1.00/13.00473



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND  
„Investování do udržitelného rybolovu“

**Obsahová část metodiky je výsledkem řešení projektů:**

Výsledky byly získány za finanční podpory MŠMT projektu CENAKVA  
(CZ.1.05/2.1.00/01.0024) – 50 %, projektu CENAKVA II  
(LO1205 v rámci programu NPU I) – 20 %

Nové metody a biotechnologické přístupy v genetice a reprodukci ryb  
(GAJU 114/2013/Z) – 15 %

GAČR 14-0290S Ploidní a hybridní diverzita jeseterů (Acipenseriformes)  
a její dopady na ochranu a chov – 15 %

č. 147

**Vodňany**

ISBN 978-80-7514-022-7



<b>1. CÍL METODIKY</b>	<b>6</b>
<b>2. VLASTNÍ POPIS METODIKY</b>	<b>6</b>
2.1. Úvod	6
2.2. Popis technologického postupu	8
2.2.1. Příprava generačních ryb	8
2.2.2. Odběr gamet	8
2.2.3. Ozařování gamet UV světlem	9
2.2.4. Chemická inaktivace otcovské DNA	17
2.2.5. Oplození a aktivace jiker, odlepkování	18
2.2.6. Obnovení diploidního stavu teplým šokem	18
2.2.7. Rozlišení gynogenetického plůdku	20
<b>3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“</b>	<b>23</b>
<b>4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY</b>	<b>24</b>
<b>5. EKONOMICKÉ ASPEKTY</b>	<b>24</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY</b>	<b>25</b>
<b>7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE</b>	<b>27</b>

## 1. CÍL METODIKY

Vysoce výnosný trh s černým kaviárem a decimování divoce žijících populací jeseterů vedou ve svých důsledcích ke zdokonalování akvakultury těchto druhů. Chromozomové manipulace, a v jejich rámci obzvláště gynogeneze, se nachází v centru pozornosti jako způsob, jak změnit poměr samic a samců v potomstvu.

Cílem této metodiky je specifikovat hlavní body protokolu indukce gynogeneze na modelovém druhu jeseteru malém, *Acipenser ruthenus*, široce používaném ve výzkumu genetiky a reprodukce jeseterovitých. Metodika proto krok za krokem řeší způsob inaktivace otcovské DNA, aplikaci fyzikálního šoku v provozních podmínkách k obnovení diploidní konstituce a popisuje optimalizaci jednotlivých parametrů pro tento modelový druh. Dále zmiňuje základní požadavky uspořádání pracoviště, adekvátní způsoby hodnocení experimentálních výsledků a popisuje aplikaci v hromadném měřítku pro budoucí využití v akvakultuře. Metodika je zaměřena na založení gynogenetické populace v chovu ryb v poloprovozním/provozním měřítku, kde získání gynogenetické populace s vyšším zastoupením samic může být důležitým faktorem zlepšení ekonomiky chovu jeseterů k produkci kaviáru. Není určena pro produkci generačního hejna k reprodukci potomstva za účelem jeho vysazování k obnově divokých populací.

## 2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 2.1. Úvod

Čeď jeseterovitých ryb (*Acipenseridae*) je jednou z nejstarších žijících skupin paprskoploutvých ryb, která zahrnuje čtyři rody *Acipenser*, *Huso*, *Scaphirhynchus* a *Pseudoscaphirhynchus* a v nich dohromady 27 druhů. Představují unikátní a reliktní linii chrupavčitých ryb, které dnes čelí nebezpečí vyhynutí. Znečištění prostředí, ztráta vhodných habitatů a příliš vysoký rybářský tlak (drancování) působí stálý pokles četnosti jeseteřích populací, a to i přes mnohé programy zaměřené na jejich vysazování do volných vod a zavádění limitů výlovků (Rosenthal a kol., 2006). V důsledku poklesu populací jeseterů ve volných vodách, případně zákazu jejich odlovu, vzrostly požadavky na chov jeseterů v zajetí, resp. na akvakulturu jeseterů k produkci kaviáru, přestože dosažení pohlavní zralosti jikernaček k produkci kaviáru trvá, v závislosti na daném druhu, od pěti do patnácti let (Mims a Shelton, 1998). Proto se také v hledáčku biologů v akvakultuře ocitly metody uniparentální dědičnosti, jako je indukovaná gynogeneze (Keyvanshokoooh a Gharaei 2010). U druhů

## PRODUKCE GYNOGENETICKÝCH POPULACÍ JESETERA MALÉHO

s chromozómovým určením pohlaví typu *Drosophila* (samice XX, samci XY) vede gynogeneze k produkci celosamčí populace potomstva. U většiny jeseterů se předpokládá chromozómové určení pohlaví podobné typu *Abraxas* (samice WZ, samci ZZ; Keyvanshokoooh a Gharaei 2010) . Aplikace meiotické gynogeneze může zvýšit procentuální zastoupení samic v potomstvu: gynogenezí vznikají samci ZZ, supersamice WW a/nebo samice WZ v různém poměru podle míry rekombinací mezi sex-určujícím lokusem a centromerou. Lze proto očekávat, že gynogeneze může pomoci zvýšit produktivitu akvakultury jeseterů (Van Eenennaam a kol., 1996).

Gynogeneze je jedním z mechanismů unisexuální reprodukce, při kterém potomstvo dědí pouze mateřskou DNA a přítomnost spermií je potřebná jen k aktivaci vývoje vajíčka. Metoda umělé indukce gynogeneze sestává ze tří hlavních kroků. Prvním krokem je inaktivace genetické informace spermií, druhým krokem je aktivace vývoje haploidního vajíčka inaktivovanou spermií a posledním krokem je ošetření k obnovení diploidního stavu (Ihssen a kol., 1990; Komen a Thorgaard, 2007). Ultrafialové světlo (UV) a zvláště krátkovlnné UV světlo tzv. UV-C je obvykle používáno k inaktivaci genetické informace ve spermiích. Obnovení diploidního stavu se obvykle děje pomocí teplotního šoku.

Přes poněkud protichůdné výsledky s indukcí gynogeneze u některých jeseterovitých bylo dosaženo vysokého procenta zastoupení samic v gynogenetickém potomstvu u řady druhů: u jesetera sibiřského *Acipenser baerii* – 81 % (Fopp-Bayat, 2010), jesetera bílého *Acipenser transmontanus* – 82 % (Van Eenennaam a kol., 1999), u bestěra (hybrida vyzy velké *Huso huso* a jesetera malého *Acipenser ruthenus*) – 70 až 80 % (Omoto a kol., 2005) a u jesetera krátkorypého *Acipenser brevirostrum* – 65 % (Flynn a kol., 2006). Gynogeneze, a to zvláště mitotická gynogeneze, je navíc zajímavá proto, že vysoká homozygotnost gynogenetického potomstva může být výhodou pro různé genetické a šlechtitelské studie.

U potomstva jeseterovitých se podle Gely a kol. (2012) rozlišuje stadium embryonální (embryo; od oplození jikry po vykulení), stadium prelarvální (prelarva; od vykulení po začátek příjmu potravy, období endogenní výživy plůdku), stadium larvální (larva; od začátku příjmu potravy do ukončení diferenciacce ploutví a vymizení ploutevního lemu), stadium juvenilní (od diferenciacce ploutví po dosažení pohlavní dospělosti), stadium adultní (od dosažení pohlavní dospělosti až do vymizení rozmnožovací aktivity) a stadium senektivní (od vymizení rozmnožovací aktivity po úhyn jedince). V souladu se zmíněnou metodikou Gely a kol. (2012) budou pro zjednodušení terminologie a na základě zažitě rybářské praxe v této práci prelarvální a larvální stadia dále označována jako plůdek.

---

## 2.2. Popis technologického postupu

---

### 2.2.1. Příprava generačních ryb

---

Individuální příprava generačních ryb je nezbytná z důvodu závislosti stupně zralosti gamet na prostředí a chovných podmínkách. Vzhledem k absenci sekundárních pohlavních znaků lze pohlaví generačních jeseterů určovat pomocí ultrazvukové diagnostiky, analýzou steroidních hormonů v krevní plazmě nebo biopsií gonád. Biopsie gonád je nejpřesnější metodou, která poskytne informace nejen o pohlaví, ale také o stupni zralosti gamet, zejména oocytů (Gela a kol., 2008).

Během plánování gynogeneze je třeba vzít v potaz proměnlivost motility spermií jednotlivých mlíčáků jako odezvu na UV-ozáření. K zajištění dostupnosti dostatečného množství spermatu se proto doporučuje přiměřeně zvýšit počet mlíčáků připravovaných k umělému výtěru oproti počtu mlíčáků pro klasický umělý výtěr, tj. asi o polovinu. Pokud budeme později potřebovat u gynogenetického potomstva určit rodičovství, tedy ověřit maternální dědičnost, je nevhodnější odebrat tkáňové vzorky k analýze DNA od rodičů v době, kdy se s nimi manipuluje, tedy od generačních ryb připravovaných k výtěru (popř. od vytřených ryb). Pro tento účel je nevhodnější odebírat malé části ploutví (cca 1 cm<sup>2</sup>) ze spodního laloku ocasní ploutve sterilním postupem a odebranou tkáň fixovat v 96% etanolu. Generační ryby se připravují k výtěru postupným zvyšováním teploty vody na 14–15 °C po 6–7 dní a poté hormonální stimulací podle Gely a kol. (2008).

### 2.2.2. Odběr gamet

---

#### *Odběr spermatu*

Spermiaci lze u připravovaných mlíčáků vyvolat injekcí suspenze kapří hypofýzy ve fyziologickém roztoku v dávce 4 mg.kg<sup>-1</sup> podle (Linhart a kol., 2000) 24 hodin před předpokládaným odběrem spermatu. Odebírané mlíčáky jesetera malého je nutno fixovat na vhodné podložce hřbetem dolů a osušit urogenitální papilu. K odběru spermatu se u jesetera malého používá úzká ohebná plastová kanyla o vnějším průměru 5–6 mm (např. akvarijní vzduchovací hadička), jejíž jeden konec je vložen do odběrné nádobky, kterou držíme níže, než je umístěn odebíraný mlíčák. Opačný konec kanyly se vsune do pohlavního vývodu (obr. 1), následuje samovolný výtok spermatu a zbylé sperma se uvolní jemnou masáží břišní partie ryby. Sperma po odběru se uchovává při 0–4 °C a lze jej uchovat až po 72 h (Gela a kol., 2008). Nutná je analýza kvality spermatu a koncentrace spermií, protože tyto parametry se mohou mezi jednotlivými



## PRODUKCE GYNOGENETICKÝCH POPULACÍ JESETERA MALÉHO

samci velmi lišit i ve vztahu k době výtěru. Koncentrace spermií se zjišťuje v Thomově nebo Bürkerově počítací komůrce po naředění 400x v imobilizačním médiu; procento pohyblivých spermií se zjišťuje pod světelným mikroskopem. Používá se metoda podle Linharta a kol. (2000).

### ***Odběr jiker***

Ovulaci jikernaček jesetera malého lze vyvolat podle Gely a kol. (2008) hormonální stimulací vnitrosvalovou injekcí první dávky suspenze kapek hypofýzy ve fyziologickém roztoku ( $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  živé hmotnosti ryby) 20–25 h před očekávanou ovulací a aplikací druhé dávky ( $4,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  živé hmotnosti ryby) o 12 h později, tedy 8–13 h před očekávanou ovulací (Dettlaff a kol., 1993). Ovulované jikry lze od jikernaček získat pomocí různých metod, jako je klasická metoda abdominální masáže, chirurgický řez stěnou břišní nebo mikrochirurgický řez stěnou vejcovodu (Gela a kol., 2008). Široce užívaná metoda mikrochirurgického řezu má několik výhod: vysoká účinnost odběru jiker (obr. 1), nízká časová náročnost pro obsluhu, menší stresování ryb a především vysoké procento přežití generačních ryb. Metoda byla popsána Štěchem a kol. (1999).



**Obr. 1.** Umělý výtěr jesetera malého, *Acipenser ruthenus*. Vlevo odběr spermatu po zavedení kanyly, vpravo umělý výtěr jikernačky po provedení mikrochirurgického řezu stěnou vejcovodu. Foto I. Lebeda.

### **2.2.3. Ozařování gamet UV světlem**

Ozařování gamet UV světlem k inaktivaci DNA v gametách, resp. ve spermiích, je klíčovým problémem zavedení produkce gynogenetického potomstva. Následkem ozáření dochází u spermií k poškození DNA přímým vlivem UV světla. Celé spermie včetně pohybového aparátu a/nebo akrozomu mohou být také poškozeny vlivem reaktivních forem kyslíku (Reactive Oxygen

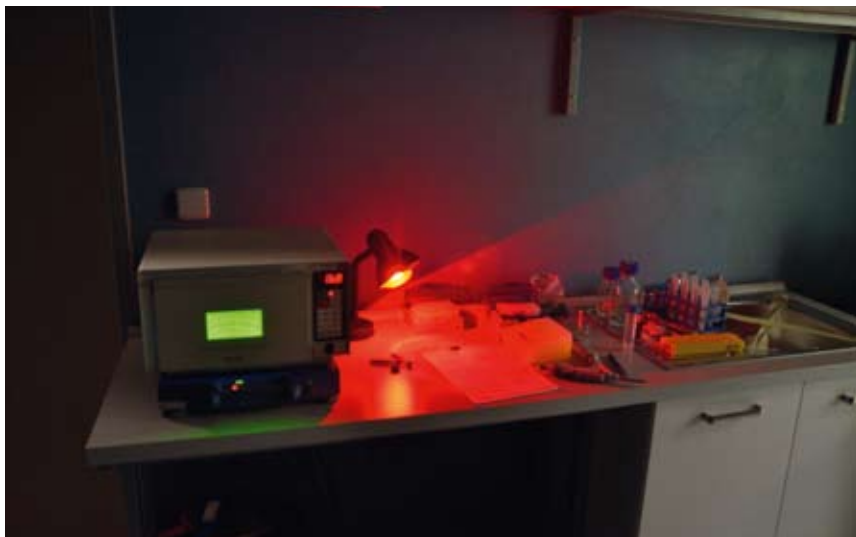
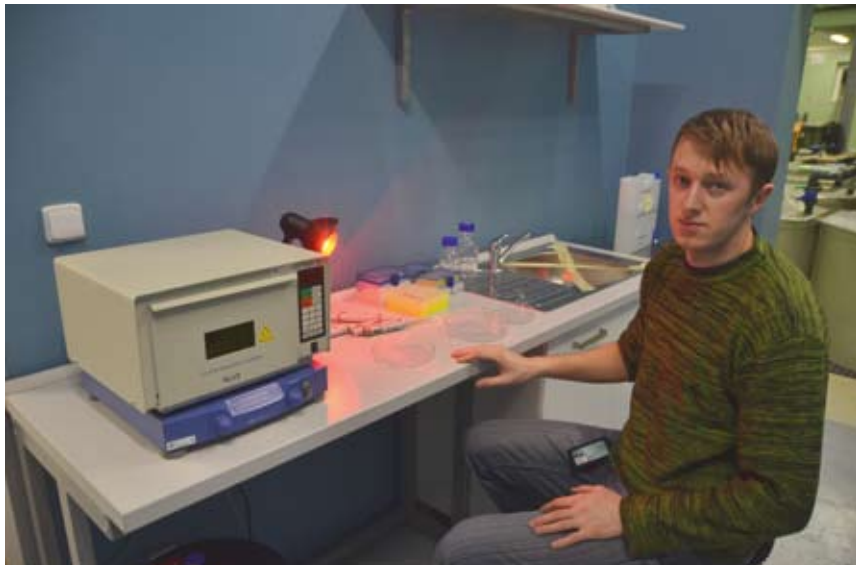
Species, ROS), díky čemuž se snižuje jejich schopnost aktivovat jikry. K zavedení protokolu pro UV ozařování je proto nutné nalézt kompromis mezi inaktivací otcovské DNA a destrukcí pohybového aparátu spermie. Lze použít několik způsobů optimalizace UV ozařování.

### ***Zařízení pracovního místa pro UV ozařování***

UV ozařování by mělo probíhat na místě bez přímého světla nebo při osvětlení červeným světlem (obr. 2), které by bránilo fotoreaktivaci DNA ozářených spermií (Lebeda a Flajšhans, 2014). K UV ozařování spermatu lze použít různé typy UV zářivek, které vydávají světlo o vlnové délce 250–260 nm (germicidní zářivky) a jsou umístěny 20 až 50 cm nad vzorkem nebo lze využít automatizované UV ozařovací systémy používané pro navázání nukleových kyselin na membrány a pro eliminaci kontaminace PCR. Kromě toho lze pro ozařování spermatu použít různé typy UV sterilizátorů používaných ke sterilizaci lékařských pomůcek nebo transiluminátorů navržených pro iluminaci elektroforetických gelů v kombinaci se zásobníky průsvitnými pro UV světlo (obr. 2). Při práci s manuálně instalovanými UV zářivkami je nutné zachovávat bezpečnostní opatření, tj. nošení ochranných brýlí a oděvu.

Komerčně dostupné systémy pro UV ozařování, jako jsou různé typy UV crosslinkerů (CL-1000 Ultra-Violet Products Limited, 45 W.m<sup>2</sup>, 254 nm; VILBER LOURMAT BIO-LINK BLX Crosslinker 365/312/254 nm; obr. 3), zajišťují správné měření dávky UV záření a celý proces ozařování do velké míry usnadňují. Sperma se vkládá do crosslinkeru obvykle na Petriho miskách. Crosslinker se umístí na laboratorní třepačku a jejím uvedením do pohybu (50–100 ot.min<sup>-1</sup>) při ozařování se docílí promíchávání spermatu a tím i homogenního ozáření. Modely crosslinkerů, které podporují dlouhodobé ozařování UV-A, mohou být navíc využity i k chemické inaktivaci otcovské DNA ve spermiích.

V případě použití manuálně instalovaných UV zářivek musí být jejich upevnění takové, aby zajistilo stálou vzdálenost mezi zářivkou a vzorkem během jeho protřepávání, rovněž kvůli homogenitě ozáření. Intenzitu a homogenitu ozáření lze měřit a monitorovat pomocí UV radiometru (obr. 4), umístěním senzoru ve stejné rovině s ozařovanými vzorky.



**Obr. 2.** Nahoře: Pracovní plocha pro UV ozařování gamet pomocí crosslinkeru CL-1000 Ultra-Violet Products Ltd. umístěného na laboratorní třepačce. Dole: Během ozařování gamet je osvětlení místnosti vypnuto a pracovní plochu osvětluje červené světlo, které nepodporuje fotoreaktivaci ozářené DNA. Foto I. Lebeda.



**Obr. 3** (Vlevo). Komora transiluminátoru. Foto I. Lebeda. (Vpravo). Transiluminátor se zářivkami UV-C (254nm) a UV-A (360 nm). Foto I. Lebeda



**Obr. 4.** Radiometr Blak-Ray UVP (USA) s J-225 (220–290 nm) senzorem pro měření světla UV-C o intenzitě 0–120 W.m<sup>-2</sup>. Foto I. Lebeda

### **Ředění spermatu**

Ředění spermatu je způsobem, jak překonat problémy při optimalizaci UV ozařování spojené s vysokou optickou hustotou spermatu a s významnými rozdíly v koncentraci spermií ve spermatu různých samců. Postupovat je nutno obezřetně, protože nevhodné ředění spermatu může působit problémy s aktivací spermií a vnést do práce další proměnnou. Procedura UV ozařování

ředěného spermatu je také pracnější (Lebeda a kol., 2014a). Kritickým bodem je proto zvolení vhodných parametrů pro UV ozařovací protokol, jako jsou vhodný ředící poměr, hloubka vrstvy ozařovaného spermatu a správné měření dávky. Ředící poměr se stanoví podle denzity spermatu a měl by dostačovat pro homogenní ozáření dávky spermatu. K ředění se používá buď semenná plazma nebo umělé médium s koncentrací iontů podobnou přirozené semenné plazmě. Semenná plazma se získá ze supernatantu spermatu odstředěného při 1 000–10 000 ot.min<sup>-1</sup> (500–8 000 g) po dobu 2–5 min. Pro sperma jesetera malého je doporučeno používat umělé médium, které napodobuje přirozené iontové složení spermatu (Psenicka a kol., 2008) s přísadkou 0,2% Pluronic F127 k usnadnění tvorby tenké vrstvy spermatu a se zvýšenou koncentrací K<sup>+</sup> iontů až na 3 mM a osmolalitou až 80 mOsmol.kg<sup>-1</sup>, aby se zabránilo aktivaci spermií během ředění. Úroveň absorpce UV světla ve správně ředěném spermatu lze stanovit spektrofotometricky ve křemíkových kyvetách pomocí spektrofotometru pokrývajícího UV rozsah, např. SPECORD 210. Měří se několik vzorků spermatu s různým ředěním při 254 nm vůči prázdné kyvetě, aby bylo možné stanovit závislost absorpce na koncentraci. Tato závislost může být extrapolována pro různé koncentrace podle Beer–Lambert–Bouguerova zákona, podle něhož homogenita záření závisí exponenciálně na koncentraci a hloubce vrstvy. Tímto způsobem lze odhadnout homogenitu ozařování. Tento postup je však pracný a časově náročný, proto se z praktického hlediska považuje za dostačující ředění 1 : 5 (sperma : ředící roztok) pro homogenní ozáření UV-C světlem při hloubce vrstvy ozařovaného spermatu menší než 1 mm.

Naředěné sperma se nalévá (pipetuje) na rovné, suché a čisté dno nádoby, obvykle Petriho misky nebo skleněného tácu a opatrně se rozprostře po celém povrchu pomocí gumové špachtle nebo konusu pipety. Doporučuje se během ozařování vzorky promíchávat při 50–100 ot.min<sup>-1</sup>. Po ozáření se sperma sbírá z Petriho misek nebo jiných nádobek a uchovává se na ledu v suchých kontejnerech chráněných před světlem až do aktivace jiker.

Vzhledem k variabilitě odezvy spermií jednotlivých mlíčeků na UV ozáření se doporučuje stanovit přibližnou motilitu ozářeného spermatu po aktivaci vodou z líhně.

### ***Optimalizace ozařovacího protokolu***

Obvyklou cestou optimalizace gynogeneze je používání spermatu ozářeného různými dávkami záření, přičemž je hledána optimální dávka záření. Pro stanovení účinnosti ozařování můžeme využít dvě varianty postupu gynogeneze. Při první z nich se odebrané sperma naředí, DNA spermií se inaktivuje UV zářením, provede se umělé osemenění a aktivace gamet, ale vynechává se šok k obnově diploidního stavu. Pak potomstvo vzniklé oplozením oocytů optimálně ošetřeným

spermatem vždy vykazuje tzv. haploidní syndrom (rohličkovité zakřivení a segmentovaný žlutkový váček). Procento potenciálních gynogenů pak může být zhruba odhadnuto podle fenotypové charakteristiky plůdku (prelarev; obr. 5) nebo přesně stanoveno podle úrovně ploidie.



**Obr. 5.** Vlevo haploidní (potenciálně gynogenetický) plůdek jesetera malého *Acipenser ruthenus* 1 den po vykulení; vpravo srovnání rohličkovitě zakřivený haploidní plůdek j. malého s diploidním plůdkem. Měřítka 1 cm. Foto I. Lebeda

Při druhé variantě se odebrané sperma naředí, DNA spermií se inaktivuje UV zářením, provede se umělé osemenění a aktivace gamet a následuje šok k obnovení diploidního stavu. V takovém případě gynogenetický plůdek vykazuje tutéž úroveň ploidie jako matka (resp. mateřský druh). Podíl plůdku, u něhož se nepodařilo gynogenezi vyvolat, může být z menší části haploidní, tj. neovlivněn obnovením diploidního stavu. Většina negynogenetického plůdku může být triploidní. Takový plůdek vzniká jako výsledek splynutí prvojádra spermie, jež se nepodařilo ozářením inaktivovat, s prvojádrum oocyty (jikry) a s druhým pólóvým tělískem, zadržným díky šoku k obnovení diploidního stavu zárodku. K rozlišení gynogenetického potomstva se pak jako jediná spolehlivá metoda vyhodnocení účinnosti gynogeneze používá analýza mikrosatelitní DNA (OConnell a Wright, 1997). Někteří autoři navrhují optimalizovat dávku UV záření na základě odezvy motility spermií. Podle tohoto návrhu je 40 % letální dávky UV pro spermie (jež zastavuje motilitu) dostatečných pro inaktivaci paternálního genomu, přičemž zachovává pohyblivost spermií (Mims a Shelton, 1997). Pro optimalizaci ozařovacího protokolu je vhodné inkubovat neodlepkané jikry v maloobjemových inkubátorech a odumřelé jikry vybírat ve stadiu neuruly (obr. 6).

## PRODUKCE GYNOGENETICKÝCH POPULACÍ JESETERA MALÉHO



**Obř. 6.** Vlevo inkubace neodlepkořaných jiker na Petriho miskách v maloobjemových průtočných inkubátorech. Vpravo ukázka vybírání odumřelých jiker (označeny šipkou) během inkubace. Foto I. Lebeda

### Dávky záření

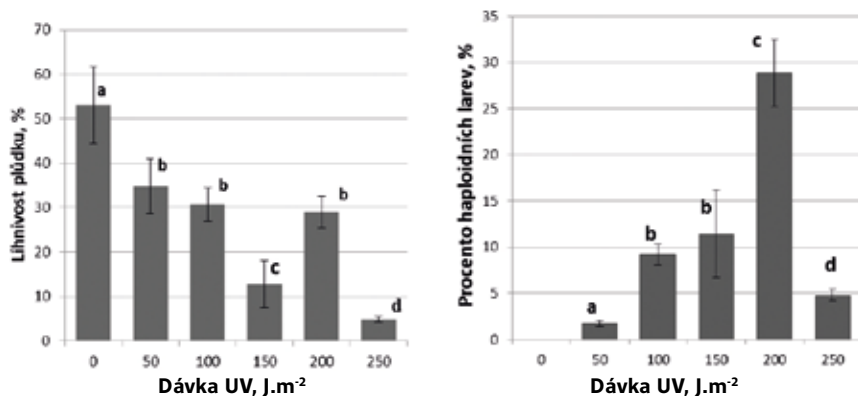
Pro popis dávky UV záření ( $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ ) a intenzity UV světla ( $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ ) se doporučuje používat mezinárodní systém jednotek SI. Nedoporučuje se pro popis protokolu používat elektrický výkon UV žárovky, vzhledem k variabilitě účinnosti konverze energie mezi jednotlivými modely žárovek, kdy tento parametr nespecifikuje intenzitu UV záření. Typické jednotky používané při měření dávky UV záření a jejich konverze jsou uvedeny v tab. 1.

**Tab. 1.** Konverze dávkových jednotek.

Jednotky	$\text{J}\cdot\text{m}^{-2} =$ $\mu\text{W}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$\text{erg}\cdot\text{mm}^{-2} =$ $100 \text{ erg}\cdot\text{cm}^{-2}$	$\text{mW}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1} = 0.1$ $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$\text{ft}\cdot\text{lbf}\cdot\text{in}^{-2}$
$\text{J}\cdot\text{m}^{-2} =$ $\mu\text{W}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$		10	$10^3$	$1,87\cdot 10^{-2}$
$\text{erg}\cdot\text{mm}^{-2} = 100$ $\text{erg}\cdot\text{cm}^{-2}$	0,1		$10^2$	$1,87\cdot 10^{-3}$
$\text{mW}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1} =$ $0.1 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$		$1,87\cdot 10^{-5}$
$\text{ft}\cdot\text{lbf}\cdot\text{in}^{-2}$	53,4	534	53 400	

Optimální dávka UV záření závisí na druhu ryby a cíli indukce gynogeneze. Při správném ředění a technice ozařování je pro jesetery obecně k inaktivaci paternální DNA vhodná dávka cca 200–500  $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$  (Lebeda a kol., 2014a). Pro sperma jesetera malého dostačují k indukci gynogeneze nižší dávky 100–200  $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ ,

viz obr. 7. Při použití optimální dávky záření lze očekávat nejvyšší účinnost v rozsahu 20–50 % gynogenetického plůdku z použité navážky jiker. To odpovídá líhivosti v rozsahu 40–80 % hodnot pro kontrolní (neošetřenou) skupinu oplozených jiker, viz obr. 8. Účinnost se může lišit v závislosti na kvalitě gamet a inkubačních podmínkách pro jikry.



**Obr. 7.** Vlevo líhivost plůdku ve vztahu k dávce UV-C záření použitého při indukci gynogeneze u jesetera malého, *Acipenser ruthenus*. Vpravo procento haploidního plůdku ve vztahu k dávce UV-C záření použitého při indukci gynogeneze u téhož druhu. Hodnoty označené různými písmeny jsou statisticky významně odlišné na úrovni  $P < 0,05$  (ANOVA, Tukeyův test). Podle Lebedy (2014a).

Přestože při ošetření spermatu nižšími dávkami záření může potomstvo vykazovat vyšší procento líhivosti, tento přístup je méně vhodný vzhledem k přítomnosti negynogenetického plůdku (ryb, u nichž se indukce gynogeneze nezdařila). Výjimkou může být indukce gynogeneze s použitím heterologního spermatu, tedy spermatu jiného druhu, která při selhání inaktivace otcovské DNA vede k produkci rozpoznatelných nebo neživotaschopných hybridů. Například při indukci gynogeneze u veslonosa amerického, *Polyodon spathula* bylo použito ozářeného spermatu lopatonose amerického, *Scaphirhynchus platyrhynchus* (Mims a Shelton, 1997). Jako marker u jeseterů lze použít například odlišnou evoluční úroveň ploidie, viz tab. 2.

Fotoreaktivace, čili na světle závislá reparace DNA, může narušit výsledky gynogeneze působením posunu optimální dávky záření. Je proto doporučeno uchovávat ozářené sperma a oplozené a aktivované jikry v temnu až do ošetření k obnovení diploidního stavu. Pro pohodlné zacházení se spermatem při oplozování a aktivaci lze doporučit osvětlení pracovní plochy červeným

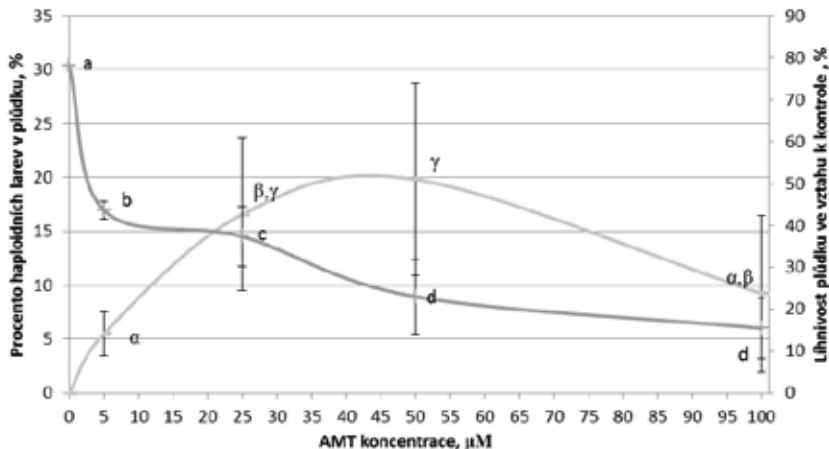


## PRODUKCE GYNOGENETICKÝCH POPULACÍ JESETERA MALÉHO

světlem (viz obr. 3). Červené světlo neaktivuje na světle závislou reparaci DNA, a tudíž nenarušuje indukci gynogeneze.

### 2.2.4. Chemická inaktivace otcovské DNA

Pro masovou indukci gynogeneze se použití UV světla k ozařování spermatu může jevit jako komplikované a časově náročné vzhledem k omezení ozařovaného objemu a nutnosti ředění spermatu. V takovém případě lze otcovskou DNA ve spermii inaktivovat prostřednictvím chemických látek, které lze aplikovat do většího objemu spermatu. Chemická inaktivace však obvykle má nižší úspěšnost ve srovnání s UV zářením. Nejvyšší účinnost chemické inaktivace DNA při gynogenezi dosáhla do 19,8 % gynogenů z 23 % vykuleného plůdku, a byla získána s použitím spermatu inkubovaného 2 min s 50  $\mu\text{M}$  4'-aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralenu (AMT) ke zvýšení propustnosti pro UV záření, a následně ozářeného UV-A (360 nm) zářením v dávce 900  $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$  (obr. 8). Vzhledem k nižší úspěšnosti nelze tuto metodu doporučit pro práci s malými objemy jiker. Na druhé straně, větší propustnost spermatu pro záření UV-A umožňuje zvýšit objem ozařovaného spermatu 2x až 3x proti objemům pro záření UV-C, což zjednodušuje aplikaci gynogeneze ve větších objemech jiker (Lebeda a kol., 2014b).



**Obr. 8.** Líhivost a procento haploidního plůdku v potomstvu získaném aktivací jiker spermii ošetřenými AMT v koncentracích 0, 5, 25, 50 a 100  $\mu\text{M}$  a ozářením UV-A zářením v dávce 900  $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ . Hodnoty označené různými písmeny řecké abecedy (% haploidních larev) a latinské abecedy (% líhivosti plůdku) jsou statisticky významně odlišné uvnitř těchto souborů na úrovni  $P < 0,05$  (ANOVA, Tukeyův test). Podle Lebedy a kol. (2014a).

### 2.2.5. Oplození a aktivace jiker, odlepkování

K oplození 1 kg jiker jesetera malého se používá 20–25 ml spermatu a k aktivaci 4 l vody z líhně nebo inkubačního systému o teplotě 16 °C (Gela a kol., 2008). Sperma se smísí s vodou a vzniklá suspenze se bezprostředně nalije na jikry. K oplození jiker dochází během 2 min za šetrného míchání. Po oplození se jikry přelijí do síta a třikrát promyjí 2–4 l vody s odlepkovací suspenzí (1 : 30, sušené mléko nebo jíl) (Gela a kol., 2003). Propláchnuté jikry se přelijí do nádoby s odlepkovací suspenzí nebo do inkubátoru ponořeného do odlepkovací suspenze o teplotě 16 °C, kde jsou šetrně promíchávány až do ošetření k obnovení diploidního stavu.

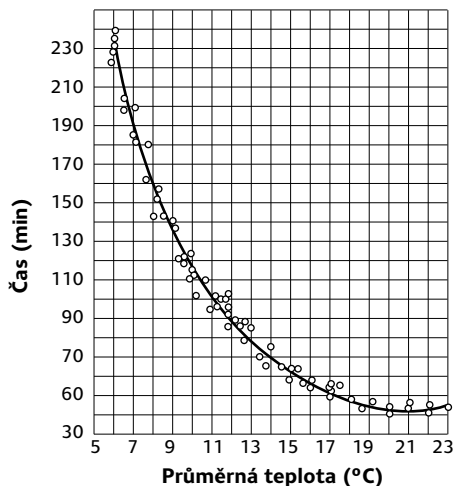
### 2.2.6. Obnovení diploidního stavu teplotním šokem

Potomstvo získané aktivací jiker UV-ozářeným spermatem je haploidní a hyne po vykulení na konci období endogenní výživy. K vytvoření životaschopného potomstva je nutno aplikovat ošetření k obnovení diploidního stavu, tzv. rediploidizace. Existují dva potenciální mechanismy, potlačení druhé fáze meiotického dělení, tzv. meiotická gynogeneze nebo potlačení prvního mitotického dělení, tzv. mitotická gynogeneze (Flajšhans a kol., 2013). Potlačení prvního mitotického dělení vede sice k obnovení diploidie, ale zároveň výrazně zvyšuje mortalitu, snižuje oplozenost a líhivost a vede k vysokému procentu malformovaného potomstva, které hyne po vykulení. Gynogenetické potomstvo získané tímto způsobem je homozygotní a obvykle se nazývá „dvojí haploidi“ (Komen a Thorgaard, 2007). Potlačení druhé fáze meiotického dělení je neobvyklejší praxí obnovení diploidie, s protokolem podobným tomu pro indukci triploidie. Hlavní rozdíl v protokolech mitotické a meiotické gynogeneze je načasování šoku. Při mitotické gynogenezi je šok aplikován při  $0,9 \tau_0$  ( $\tau_0$  – délka jednoho mitotického cyklu při synchronním dělení buněk) po oplození, zatímco při meiotické gynogenezi je šok aplikován při  $0,25–0,3 \tau_0$ .

Obnovení diploidie ve druhé fázi meiózy lze provést pomocí chladového nebo teplého šoku. Při 16 °C je pro jesetera malého (*Acipenser ruthenus*)  $\tau_0 = 63$  až 65 min (obr. 9), pro vyzu velkou (*Huso huso*) je  $\tau_0 = 60$  min, pro j. ruského (*Acipenser gueldenstaedtii*) je  $\tau_0 = 55$  min, pro j. hvězdnatého (*Acipenser stellatus*) je  $\tau_0 = 50$  min (Dettlaff a kol., 1993).

Nejefektivnějším a jednoduše provozně zvládnutelným ošetřením k obnovení diploidie u jeseterů je teplý šok ponořením oplozených jiker v čase  $0,25–0,3 \tau_0$  do 34 °C teplé odlepkovací suspenze na dobu 2 min s následným propláchnutím vodou o 16 °C používanou k inkubaci pro rychlé zchlazení

## PRODUKCE GYNOGENETICKÝCH POPULACÍ JESETERA MALÉHO



**Obr. 9.** Doba trvání jednoho cyklu  $\tau_0$  ve vztahu k teplotě inkubace jiker u jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) podle Dettlaffa (1993).

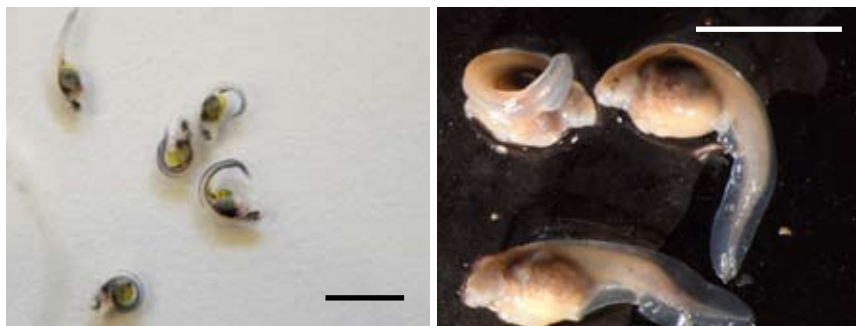
(obr. 10). Jestliže byly jikry po oplození a promytí umístěny do inkubátoru ponořeného do odlepkovací suspenze o teplotě 16 °C, pak se celý inkubátor ze suspenze vyjme, sítem v jeho dnu se nechá zbylá odlepkovací suspenze odtéci a celý inkubátor se přenese a ponoří do 34 °C teplé odlepkovací suspenze.



**Obr. 10.** Na snímku vlevo uspořádání pracoviště pro aplikaci teplého šoku; teploty vody a odlepkovací suspenze v nádobách jsou udržovány závěsnými termometry: vpředu nádoba s vodou pro aktivaci gamet (16 °C), uprostřed nádoba s odlepkovací suspenzí kaolínu (16 °C) do začátku a po ukončení šoku, vzadu nádoba s odlepkovací suspenzí kaolínu (34 °C) pro teplý šok. Snímek vpravo ukazuje přenos maloobjemového inkubátoru s jikrami do odlepkovací suspenze. Foto I. Lebeda

Po aplikaci šoku a propláchnutí inkubační vodou z líhně o 16 °C pro rychlé zchlazení se jikry přelijí zpět do nádoby s odlepkovací suspenzí o teplotě 16 °C, ve které zůstávají za šetrného promíchávání po 40 min. Po dokončení odlepkování se jikry 2–3krát promyjí inkubační vodou z líhně a vysazují se do inkubačních líhňářských lahví (Kannengieterových, Zugských nebo MacDonaldových).

Teplý šok lze doporučit jako rychlou, nenáročnou a levnou cestu k obnovení diploidního stavu při indukci gynogeneze. Na druhé straně při použití šoku k obnovení diploidního stavu lze obecně očekávat výskyt vyššího podílu malformací během embryonálního a larválního vývoje v řádu několika procent (obr. 11).



**Obr. 11.** Makroskopicky (vlevo) a mikroskopicky (vpravo) rozpoznatelné malformace vykuleného plůdku jesetera malého, *Acipenser ruthenus*, způsobené teplým šokem. Měřítko 1 cm. Foto I. Lebeda

### 2.2.7. Rozlišení gynogenetického plůdku

Vzhledem k heterogenitě a stochastickému charakteru UV záření nelze vyloučit, že i při aplikaci vhodného postupu může vzniknout určitý podíl negynogenetického potomstva. Hypoteticky může pouze gynogenetické potomstvo vzniknout v případě, kdy se k aktivaci jiker použije ozářené sperma jiného druhu, se kterým mateřský druh za normálních okolností tvoří neživotaschopné hybridní potomstvo. Tato hypotéza však není u jeseterů dosud ověřena.

Gynogenetický plůdek lze od plůdku ostatního odlišit fenotypově (v případě interspecifických nebo intergenerických hybridů) nebo podle genotypických markerů. Vzhledem k velké variabilitě fenotypových markerů u juvenilních jeseterů poskytuje separace podle fenotypu nepřesné výsledky. Moderním spolehlivým postupem identifikace gynogenů je analýza mikrosatelitních markerů, tato metoda je však pracná a nákladná.

## PRODUKCE GYNOGENETICKÝCH POPULACÍ JESETERA MALÉHO

Jako vhodný způsob u jeseterů se proto ukazuje použití ozářeného heterologního spermatu (spermatu jiného druhu), který se od mateřského druhu liší evoluční úrovní ploidie, a kde lze podle ploidní úrovně odlišit gynogenetický plůdek (vykazuje úroveň ploidie shodnou s mateřským druhem) a negynogenetický plůdek (vykazuje intermediární úroveň ploidie mezi úrovní obou rodičovských druhů). Mezi negynogenetický plůdek však lze teoreticky počítat i plůdek haploidní (po aktivaci jikry ozářeným spermatem s inaktivovanou DNA, neproběhla však rediploidizace) a plůdek triploidní (u spermií neproběhla inaktivace DNA, proběhla rediploidizace). Příklady u některých hospodářsky využívaných druhů jeseterů ukazuje tab. 2.

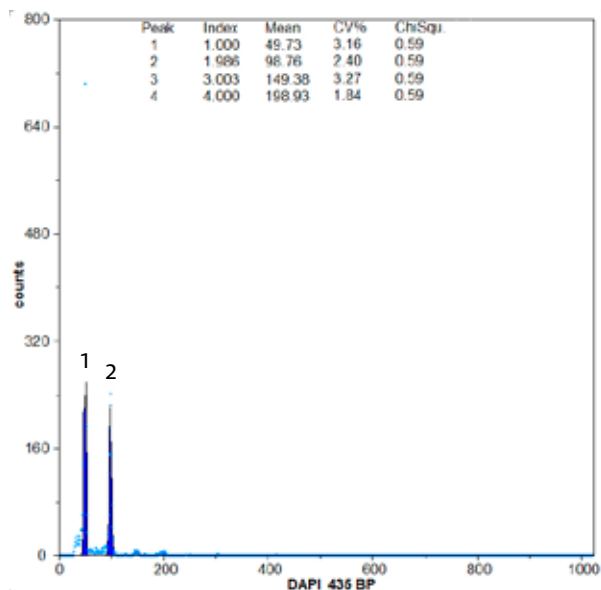
**Tab. 2.** Příklady ploidních úrovní rodičů a potomstva jeseterů po gynogenezi při použití ozářeného spermatu jiného druhu, který se od mateřského druhu liší evoluční úrovní ploidie. „Haploidní“ úroveň je zde myšlena poloviční úroveň ploidie somatických buněk mateřského druhu; „triploidní“ úroveň označuje potomstvo po fúzi samčího prvojádra ze spermií, samčího prvojádra z vajíčka a druhého pólového tělíska zadrženo šokem.

Druh a evoluční ploidní úroveň rodičů		Ploidní úroveň potomstva a možná příčina			
Samec	Samice	„Haploidní“ (správná inaktivace DNA spermií, selhání rediploidizace šokem)	Ploidní úroveň gynogenetického potomstva $G_1$ (správná inaktivace DNA spermií, správná rediploidizace šokem)	Ploidní úroveň negynogenetického (F, hybridního) potomstva (selhání inaktivace DNA spermií a selhání rediploidizace šokem)	„Triploidní“ (selhání inaktivace DNA spermií, funguje rediploidizace šokem)
jeseter sibiřský 8n	jeseter malý 4n	2n	4n	6n	8n
jeseter malý 4n	jeseter sibiřský 8n	4n	8n	6n	10n
jeseter ruský 8n	jeseter malý 4n	2n	4n	6n	8n
jeseter malý 4n	jeseter ruský 8n	4n	8n	6n	10n

V takovém případě lze procento gynogenetického plůdku odhadnout na základě vzorku minimálně 30 ks jednotlivě analyzovaného plůdku stanovením relativního obsahu DNA průtokovou cytometrií, u starších ryb lze ploidní úroveň stanovit toutéž metodou individuálně ze vzorku krevních buněk. Podle typu průtokového cytometru, který je k dispozici, se volí vhodné fluorescenční

barvivo, jež se váže na jadernou DNA [např. 4', 6- diamidino-2-fenylindol (DAPI), propidium jodid (PI), SYBR Green aj.].

Další postup se bude lišit podle dostupného typu cytometru, vhodného fluoresceinu a příslušné sestavy reagentů. Uvádíme proto jen obecné zásady přípravy vzorků. U plůdku usmrčeného předávkováním  $\text{CO}_2$  a přeneseného na hodinové sklo se odebere celá část trupu a ocasu odříznutím za žlutkovým váčkem a opláchne fyziologickým roztokem. Tkáň se nařeže skalpelem nebo rozstříhá anatomickými nůžkami ve fyziologickém roztoku, aby se do suspenze uvolnily jednotlivé buňky (obr. 12). Mikropipetou se přidá pufr pro extrakci buněčných jader. Suspenze buněk se poté odsaje Pasteurovou pipetou a přefiltruje se přes 30  $\mu\text{m}$  filtr nebo uhelon o podobném rozměru ok do zkumavky nebo kyvety pro průtokovou cytometrii. Do ní se přidá barvicí roztok příslušného fluoresceinu. Po uplynutí inkubační doby se připravené vzorky při pokojové teplotě analyzují na relativní obsah DNA průtokovým cytometrem (obr. 13). Rychlost průtoku buněčné suspenze komůrkou cytometru lze doporučit na úrovni  $0,4 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ . Vzorky z normálního oplození (bez inaktivace DNA spermií a bez použití šoku) slouží jako diploidní kontrola.



**Obr. 13.** Histogram relativního obsahu DNA v jádrech buněk směsného vzorku z haploidního plůdku (pík 1) a z diploidního gynogenetického plůdku (pík 2) po úspěšně provedené meiotické gynogenezi. Osa x udává číslo kanálu, na ose y je udán počet měřených částic. Snímek D. Bytyutskyy

### 3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Protokoly indukce gynogeneze byly zveřejněny pro celou řadu druhů ryb, jak shrnuje např. přehled Komena a Thorgaarda (2007). V metodologii inaktivace DNA ve spermích a rediploidizace však existují podstatné rozdíly, díky nimž je nutná optimalizace pro každý konkrétní případ. I přes skutečnost, že základní kroky gynogeneze u jeseterů jsou zavedené, ve zveřejněných protokolech stále existují podstatné odchylky. Například, publikovaná data o UV záření pro indukci gynogeneze zahrnují velmi různorodé hodnoty parametrů ozařování, intenzity světla, stejně jako hodnoty ředění spermatu. Pro jeseterovité ryby literatura popisuje dvě hlavní skupiny „optimálních dávek“ UV záření pro indukci gynogeneze (viz tab. 3), a to i pro stejné druhy nebo hybridy. Významné, více než desetinásobné, rozdíly mezi nimi nekorelují ani s ředěním, ani s úrovní ploidie a velikostí genomu a tato variabilita pravděpodobně mohla vzniknout vzhledem k chybějící optimalizaci a standardizaci celého postupu. Tato práce si proto kládla za cíl důkladně popsat proces optimalizace a věnovat obzvláštní pozornost pravděpodobným chybám, které mohou ovlivnit posouzení výsledků gynogeneze. Jeseter malý byl zvolen jako modelový druh pro své rozšíření ve středoevropské akvakultuře a pro využití v hybridizaci s vysoce ceněnou vyzou velkou (*Huso huso*) k produkci bestěra. Použití této metodiky však lze rozšířit po patřičné optimalizaci i na jiné druhy jeseterů.

**Tab. 3.** Dávky UV záření používané různými autory k inaktivaci DNA ve spermích pro indukovanou gynogenezi u jeseterů.

	Druh	Dávka UV záření (J.m <sup>-2</sup> )	Obsah DNA v haploidní buňce (pgDNA.jádro <sup>-1</sup> )	Ředění spermatu (sperma: médium)	Autoři
Skupina A	<i>Acipenser stellatus</i>	2 838	2,35	1 : 9	Saber a kol., 2008
	<i>Acipenser schrenckii</i>	2 589	4,0	1 : 4	Zou a kol., 2011
	<i>Acipenser transmontanus</i>	2 160	5,1	1 : 9	Van Eenennaam, 1996
	bestěr (hybrid)	2 100	1,8	1 : 9	Omoto a kol., 2005
	<i>Acipenser brevirostrum</i>	1 200	6,89	1 : 4	Flynn a kol., 2006
Skupina B	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	297	3,94	1 : 19	Recoubratsky a kol., 2003
	<i>Acipenser baerii</i>	288,75	4,15	1 : 9	Fopp-Bayat, 2010
	<i>Acipenser stellatus</i>	243	2,35	1 : 19	Recoubratsky a kol., 2003
	<i>Acipenser ruthenus</i>	135	1,8	1 : 19	Recoubratsky a kol., 2003
	bestěr (hybrid)	135	1,8	1 : 9	Fopp-Bayat a kol., 2007a
	<i>Acipenser baerii</i>	135	4,15	1 : 9	Fopp-Bayat a kol., 2007b

#### 4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Postupy uvedenými v této metodice lze účinně dosáhnout indukované meiotické gynogeneze u jesetera malého v měřítku, které dovoluje při úspěšném odchovu dosáhnout početnější populace s vyšším, až 80% zastoupením samic. Předpokládá se, že tyto populace po dosažení pohlavní dospělosti bude vhodné používat k efektivnější produkci kaviáru. Přitom při obecně akceptované hypotéze o chromozomovém určení pohlaví u jeseterů typu *Abraxas* (pohlavní chromozómy ZW/ZZ) se u gynogenetické populace mohou vyskytovat tzv. supersamice s pohlavními chromozómy WW, a proto by bylo možné gynogenetické potomstvo jeseterů využít k budoucí produkci celosamičí populace.

Založení gynogenetické populace v chovu může vzhledem k vyšší homozygotnosti gynogenetických ryb dále urychlit šlechtitelský proces. Vzhledem k pozdější pohlavní dospělosti jeseterů a k omezenému počtu chovů jeseterů v akvakultuře zde mají klasické šlechtitelské postupy ztíženou pozici. Tato metodika je určena především pro chovatele jeseterovitých ryb s výhledovým zaměřením na produkci kaviáru a dále pro výzkumné a vývojové týmy, které se chtějí touto problematikou v budoucnu dále zabývat. Indukce gynogeneze u jesetera malého v poloprovozním měřítku byla zavedena na Fakultě rybářství a ochrany vod JU v rámci projektu CENAKVA. Ačkoli je metodika primárně zaměřena na produkci gynogenetické populace jesetera malého, data v ní uvedená mohou být extrapolována pro další druhy jeseterů.

#### 5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Konvenční akvakultura jeseterů vyžaduje společný odchov obou pohlaví podle druhu po několik let, než je možné pohlaví diagnostickými metodami rozlišit. Při chovu jeseterů na produkci kaviáru z akvakultury ale není odchov samců do vyšší hmotnosti ekonomicky výhodný, vzhledem k násobným až řádovým rozdílům mezi cenou 1 kg jeseteřího masa (350 Kč) a 1 kg kaviáru (15 400 Kč). Dodržením postupů uvedených v této metodice lze účinně dosáhnout indukované meiotické gynogeneze u jesetera malého v měřítku, které dovoluje při úspěšném odchovu dosáhnout početnější populace s vyšším zastoupením samic. Tyto populace lze po dosažení pohlavní dospělosti používat k efektivnější produkci kaviáru.



## 6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S., Schmalhausen, O.I., 1993. Sturgeon Fishes. Berlin: Springer-Verlag, DE, 300 pp.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Bohlen Šlechtová, V., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2013. Genetika a šlechtění ryb. Druhé rozšířené a upravené vydání. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 305 s.
- Flynn, S.R., Matsuoka, M., Reith, M., Martin-Robichaud, D.J., Benfey, T.J., 2006. Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. *Aquaculture* 253: 721–727.
- Fopp-Bayat, D., 2010. Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt). *Aquaculture* 305: 174–177.
- Fopp-Bayat, D., Kolman, R., Woznicki, P., 2007a. Induction of meiotic gynogenesis in sterlet (*Acipenser ruthenus*) using UV-irradiated bester spenn. *Aquaculture* 264: 54–58.
- Fopp-Bayat, D., Jankun, M., Woznicki, P., Kolman, R., 2007b. Viability of diploid and triploid larvae of Siberian sturgeon and bester hybrids. *Aquaculture Research* 38: 1301–1304.
- Gela, D., Linhart, O., Flajšhans, M., Rodina, M., 2003. Egg incubation time and hatching success in tench *Tinca tinca* (L.) related to the procedure of egg stickiness elimination. *Journal of Applied Ichthyology* 19: 132–133.
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). *Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 78, 24 s.*
- Gela, D., Kahanec, M., Rodina, M., 2012. Metodika odchovu raných stadií jeseterovitých ryb. *Edice Metodik č. 126, FROV JU, Vodňany, 46 s.*
- 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.
- Keyvanshokoo, S., Gharaei, A., 2010. A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon. *Aquaculture Research* 41: e1–e7.
- Komen, H., Thorgaard, G.H., 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture* 269: 150–173.
- Lebeda, I., Flajšhans, M., 2014. Influence of photoreactivation on induction of gynogenesis in sterlet, *Acipenser ruthenus*. *Aquaculture Research* (DOI: 10.1111/are.12596).

- Lebeda, I., Dzyuba, B., Rodina, M., Flajshans, M., 2014a. Optimization of sperm irradiation protocol for induced gynogenesis in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Aquaculture International* 22: 485–495.
- Lebeda, I., Gazo, I., Flajshans, M., 2014b. Chemical induction of haploid gynogenesis in sterlet *Acipenser ruthenus*. *Czech Journal of Animal Science* 59: 8.
- Linhart, O., Gela, D., Rodina, M., 2000. Umělá reprodukce veslonosa amerického (*Polyodon spathula*). *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 64, 15 s.
- Mims, S.D., Shelton, W.L., 1997. A method for irradiation of shovelnose sturgeon, *Scaphirhynchus platyrhynchus*, milt to induce gynogenesis for paddlefish, *Polyodon spathula*. The Fourth Asian Fishery Forum. Beijing: China Ocean Press.
- Mims, S.D., Shelton, W.L., 1998. Induced meiotic gynogenesis in shovelnose sturgeon. *Aquaculture International* 6: 323–329.
- OConnell, M., Wright, J.M., 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7: 331–363.
- Omoto, N., Maebayashi, M., Adachi, S., Arai, K., Yamauchi, K., 2005. Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female x *Acipenser ruthenus* male). *Aquaculture* 245: 39–47.
- Psenicka, M., Alavi, S.M.H., Rodina, M., Cicova, Z., Gela, D., Cosson, J., Nebesarova, J., Linhart, O., 2008. Morphology, chemical contents and physiology of chondrosteian fish sperm: a comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Journal of Applied Ichthyology* 24: 371–377.
- Recoubratsky, A.V., Grunina, A.S., Barmintsev, V.A., Golovanova, T.S., Chudinov, O.S., Abramova, A.B., Panchenko, N.S., Kupchenko, S.A., 2003. Meiotic Gynogenesis in the Stellate and Russian Sturgeons and Sterlet. *Russian Journal of Developmental Biology* 34: 92–101.
- Rosenthal, H., Pourkazemi, M., Bruch, R., 2006. The 5(th) International Symposium on Sturgeons: a conference with major emphasis on conservation, environmental mitigation and sustainable use of the sturgeon resources. *Journal of Applied Ichthyology* 22: 1–4.
- Saber, M.H., Noveiri, S.B., Pourkazemi, M., Yarmohammadi, M., 2008. Induction of gynogenesis in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) and its verification using microsatellite markers. *Aquaculture Research* 39: 1483–1487.

## PRODUKCE GYNOGENETICKÝCH POPULACÍ JESETERA MALÉHO

- Štěch, L., Linhart, O., Shelton, W., 1999. Minimally invasive surgical removal of ovulated eggs from paddlefish (*Polyodon spathula*). *Aquaculture International* 7:129–133.
- Van Eenennaam, A.L., VanEenennaam, J.P., Medrano, J.F., Doroshov, S.I., 1996. Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). *Aquaculture* 147: 177–189.
- Van Eenennaam, A.L., Van Eenennaam, J.P., Medrano, J.F., Doroshov, S.I., 1999. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. *Journal of Heredity* 90: 231–233.
- Zou, Y.C., Wei, Q.W., Pan, G.B., 2011. Induction of meiotic gynogenesis in paddlefish (*Polyodon spathula*) and its confirmation using microsatellite markers. *Journal of Applied Ichthyology* 27: 496–500.

### 7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Flajšhans, M., Kocour, M., Ráb, P., Hulák, M., Petr, J., Bohlen Šlechtová, V., Šlechta, V., Havelka, M., Kašpar, V., Linhart, O., 2013. *Genetika a šlechtění ryb (Fish Genetics and Breeding)*. Druhé rozšířené a upravené vydání. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 305 s. (CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024; GAJU 046/2010/Z; GAJU 047/2010/Z; GACR 523/08/0824; NAZV MZe QH 82118)
- Gela, D., Linhart, O., Flajshans, M., Rodina, M., 2003. Egg incubation time and hatching success in tench *Tinca tinca* (L.) related to the procedure of egg stickiness elimination. *Journal of Applied Ichthyology* 19: 132–133. (MSMT 126100001; KONTAKT ME 420)
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). *Edice Metodik č. 78, VÚRH, Vodňany, 24 s.* (MSM600766809; NAZV MZe QH 71305)
- Gela, D., Kahanec, M., Rodina, M., 2012. Metodika odchovu raných stadií jeseterovitých ryb. *Edice Metodik č. 126, FROV JU, Vodňany, 46 s.* (CZ.1.05/2.1.00/01.0024; GAJU 046/2010/Z; GAJU 047/2010/Z; CZ 1.25/3.1.00/11.00258)
- Lebeda, I., Dzyuba, B., Rodina, M., Flajšhans, M., 2014. Optimization of sperm irradiation protocol for induced gynogenesis in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Aquaculture International* 22: 485–495. (CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024; GAJU 046/2010/Z; GACR 523/08/0824)

- Lebeda, I., Flajšhans, M., 2014. Influence of photoreactivation on induction of gynogenesis in sterlet, *Acipenser ruthenus*. Aquaculture Research (DOI: 10.1111/are.12596). (CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024; LO1205; GAJU 114/2013/Z; GAJU 086/2013/Z)
- Linhart, O., Gela, D., Rodina, M., 2000. Umělá reprodukce veslonosa amerického (*Polyodon spathula*). Edice Metodik, VÚRH Vodňany, č. 64, 16 s. (NAZV 6051; CEZ:J06/98:126100001)
- Linhart, O., Cosson, J., Mims, S.D., Shelton, W.L., Rodina, M., 2002. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa. Reproduction 124: 713–719. (GACR 524/03/0178; MSMT 126100001; USDA 1890 CBG KYX-01-11469)
- Psenicka, M., Alavi, S.M.H., Rodina, M., Cicova, Z., Gela, D., Cosson, J., Nebesarova, J., Linhart, O., 2008. Morphology, chemical contents and physiology of chondrosteian fish sperm: a comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*). Journal of Applied Ichthyology 24: 371–377. (MSM6007665809; GACR 524/06/0817)



*Poznámky*

---



*Poznámky*

---



**Externí odborný oponent**

*doc. Ing. Lukáš Kalous, Ph.D.*

*Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie potravinových  
a přírodních zdrojů, katedra zoologie a rybářství,  
Kamýčká 129, 16521 Praha 6 – Suchdol, www.af.czu.cz*

**Interní odborný oponent**

*Ing. Martin Kocour, Ph.D.*

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany  
vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz  
a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany,  
www.frov.jcu.cz*

**Oponent za státní správu**

*Ing. Vladimír Gall*

*MZe Praha*

*Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství (16230)  
Těšnov 17, 117 05 Praha 1*

**Osvědčení o uplatnění certifikované metodice č. 147/89037/2014-16230 Nmet  
CERTIFIKOVANÁ METODIKA**

*Vydalo: Ministerstvo zemědělství, úsek lesního hospodářství, Sekce lesního  
hospodářství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství,  
Těšnov 17, 117 05 Praha 1.*

**Adresa autorského kolektivu**

*M.Sc. Ievgen Lebeda, Ph.D. (50 %)*

*prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr.rer.agr. (30 %)*

*Ing. Marek Rodina, Ph.D. (5 %)*

*Ing. Miloš Havelka, Ph.D. (5 %)*

*Ing. David Gela, Ph.D. (10 %)*

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany  
vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz  
a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany,  
www.frov.jcu.cz*

*V edici Metodik (technologická řada) vydala Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany,  
[www.frov.jcu.cz](http://www.frov.jcu.cz);*

*odborný editor: RNDr. Bořek Drozd, Ph.D.,  
redakce: Ing. Antonín Kouba, Ph.D., Ing. Blanka Vykusová, CSc.,  
Zuzana Dvořáková*

*náklad: 200 ks, 1. vydání; metodika uplatněna v roce 2014;  
vytištěna v roce 2014;*

*grafický design a technická realizace: Profí-tisk group, s.r.o.*





Fakulta rybnářství  
a ochrany vod  
Faculty of Fisheries  
and Protection  
of Waters

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



ISBN 978-80-7514-022-7

Vydání a tisk metodiky je uskutečněno za finanční podpory projektu  
OP Rybnářství 2007–2013:  
Metodiky III (2014–2015); reg. č. CZ.1.25/3.1.00/13.00473



**EVROPSKÁ UNIE**  
**EVROPSKÝ RYBNÁŘSKÝ FOND**  
„Investování do udržitelného rybolovu“